

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FQF**  
Facultad de  
Química y Farmacia

Departamento de Química

## TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Implementación de una metodología para determinar  
el  $\delta^{13}\text{C}$  del Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar

Autor : Elianet Pérez Pérez

Tutores: Dr.C. Carlos M. Alonso Hernández

M.Sc. Alejandro García Moya

M.Sc. Jorge B. de la Torre

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FQF**  
Facultad de  
Química y Farmacia

Chemistry Department

## DIPLOMA THESIS

Title: Implementation of a methodology to determine the  $\delta^{13}\text{C}$  of Inorganic Carbon Dissolved in seawater

Author: Elianet Pérez Pérez

Tutors: Dr.C. Carlos M. Alonso Hernández

M.Sc. Alejandro García Moya

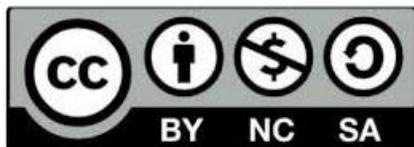
M.Sc. Jorge B. de la Torre

Santa Clara, 2019  
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

**Atribución- No Comercial- Compartir Igual**



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

***DEDICATORIA***

***A mi Familia***

## **AGRADECIMIENTOS**

*Le agradezco a toda mi familia por el apoyo brindado, en especial a mis padres.*

*A mis tíos, por acogerme y apoyarme en esta última etapa.*

*A mis tutores, en especial a Alejandro García Moya por su ayuda en todo momento y por hacer posible que hoy este aquí.*

*Al Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos y a sus trabajadores por la oportunidad brindada.*

*Al científico François Hélie por su ayuda y los conocimientos brindados.*

*A mis profesores por sus enseñanzas durante toda la carrera, en especial a la profe Surey y al profesor Ribalta.*

*A todos mis compañeros de estudio por su amistad.*

*A ti, Julio porque siempre que te necesité estuviste ahí para mí.*

*A Fiti y a su familia por el apoyo.*

## **RESUMEN**

La acidificación oceánica es el descenso del pH de los océanos, causado por la incorporación de CO<sub>2</sub>. Entre los compromisos de Cuba con los Objetivos de Desarrollo Sostenible, está el estudio de este fenómeno dentro del objetivo número 14. El presente estudio está dirigido a implementar una metodología para cuantificar el  $\delta^{13}\text{C}$  del Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar, para discriminar el origen del CO<sub>2</sub> disuelto en ecosistemas marino-costeros. Para ello, se comprobó esta metodología en dos etapas fundamentales, 1) empleo de patrones internos con concentraciones similares a la del agua de mar de 30mg/L de carbono y 2) determinaciones en muestras reales de agua de mar. Los resultados obtenidos confirman que la metodología es eficiente para la determinación de  $\delta^{13}\text{C}$  del Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar, obteniéndose valores con una precisión de  $\pm 0,37\%$  para el patrón de control utilizado (CB). En muestras reales, se obtuvieron valores entre  $-12,87\%$  y  $-0,65\%$ , con un promedio de  $-3,35 \pm 5,01\%$ . Por lo tanto, la metodología propuesta permitió cuantificar el  $\delta^{13}\text{C}$  del Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar, así como distinguir entre aguas con aporte de CO<sub>2</sub> disuelto proveniente de fuentes diferentes.

**Palabras claves:** acidificación oceánica; Carbono Inorgánico Disuelto;  $\delta^{13}\text{C}$ ; origen

## **ABSTRACT**

Ocean acidification is the decrease in the pH of the oceans, caused by the incorporation of CO<sub>2</sub>. Among the commitments of Cuba to the Sustainable Development Goals, is the study of this phenomenon within objective number 14. The present study is aimed at implementing a methodology to quantify the  $\delta^{13}\text{C}$  of Inorganic Carbon Dissolved in seawater, to discriminate the origin of dissolved CO<sub>2</sub> in marine-coastal ecosystems. The proposed methodology was tested in two main stages, 1) using internal standards with concentrations similar to seawater 30mg/L of carbon; and 2) performing determinations in real samples of seawater. The results obtained, confirm that the methodology is efficient for the determination of  $\delta^{13}\text{C}$  of Inorganic Carbon Dissolved in seawater, obtaining values with an accuracy of  $\pm 0,37\text{‰}$  for the control pattern used (CB). In real samples, values between  $-12,87\text{‰}$  and  $-0,65\text{‰}$  were obtained, with an average of  $-3,35 \pm 5,01\text{‰}$ . Therefore, the proposed methodology allowed to quantify the  $\delta^{13}\text{C}$  of Dissolved Inorganic Carbon in seawater, as well as to distinguish between different sources of dissolved CO<sub>2</sub> in marine waters.

**Keywords:** ocean acidification; Dissolved Inorganic Carbon;  $\delta^{13}\text{C}$ ; origin

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ABSTRACT.....	IV
GLOSARIO.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Acidificación de los océanos.....	6
1.1.1. Efectos de la acidificación en la vida marina.....	9
1.1.2. Parámetros que describen la acidificación oceánica.....	10
1.2. Carbono Inorgánico Disuelto.....	11
1.2.1. <sup>13</sup> C del Carbono Inorgánico Disuelto.....	11
1.3. Espectrometría de masa de relaciones isotópicas.....	13
1.3.1. Notación delta ( $\delta$ ).....	16
1.3.2. Normalización.....	17
1.4. Muestreo de agua de mar para la determinación del $\delta^{13}\text{C-CID}$ .....	19
1.5. Metodología para la determinación de $\delta^{13}\text{C-CID}$ .....	20
1.6. Principio del método.....	21
2. CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1. Protocolo para la determinación del $\delta^{13}\text{C-CID}$ en agua de mar.....	23
2.1.1. Preparación de la instrumentación de laboratorio.....	23
2.1.2. Preparación de las soluciones patrones y los blancos.....	23
2.1.3. Preparación de las muestras.....	25
2.1.4. Extracción de $\text{CO}_2$ .....	26
2.1.5. Determinación analítica.....	26
2.1.6. Normalización de las muestras a la escala V-PDB.....	27
2.2. Comprobación del protocolo.....	27
2.2.1. Análisis de la contribución de los blancos (Prueba 1).....	27
2.2.2. Determinación de $\delta^{13}\text{C-CID}$ en patrones internos (Prueba 2).....	27

2.2.3.	Determinación de $\delta^{13}\text{C}$ -CID en muestras reales (Prueba 3).....	28
2.2.3.1.	Zona de estudio.....	28
2.2.3.2.	Colecta de las muestras.....	30
2.2.3.3.	Determinaciones <i>in situ</i> .....	30
3.	<b>CAPÍTULO 3. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
3.1.	<b>Comprobación del protocolo para la determinación del <math>\delta^{13}\text{C}</math> del Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar.....</b>	<b>32</b>
3.1.1.	Resultados de la contribución de los blancos (Prueba 1).....	32
3.1.2.	Resultados de la determinación de $\delta^{13}\text{C}$ -CID en patrones internos (Prueba 2).....	34
3.1.3.	Resultados de la determinación de $\delta^{13}\text{C}$ -CID en muestras reales (Prueba 3).....	39
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>50</b>

## GLOSARIO

<b>CID</b>	Carbono Inorgánico Disuelto: sumatoria de las distintas especies del carbono inorgánico disueltos en agua.
<b>CEAC</b>	Centro de Estudios ambientales de Cienfuegos.
<b>IRMS</b>	Espectrómetro de masa de relaciones isotópicas ( <i>Isotope Ratio Mass Spectrometer</i> , en inglés).
<b>LIA</b>	Laboratorio de Isotopía Ambiental.
<b>PDB</b>	( <i>PeeDee Belemnite</i> , en inglés): patrón estándar utilizado inicialmente en el cálculo de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .
<b>VPDB</b>	( <i>Viena-PeeDee Belemnite</i> , en inglés): estándar internacional decretado por el OIEA para referenciar como patrón primario de caracterización de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .
$\delta$	Notación delta: describe la diferencia en la composición isotópica de una muestra respecto a un estándar.
$\delta^{13}\text{C}$	Composición isotópica del carbono trece ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) para una sustancia determinada con respecto a un estándar internacional certificado.
$\delta^{13}\text{C}$ -CID	Composición isotópica del carbono trece en el Carbono Inorgánico Disuelto.

### **INTRODUCCIÓN**

La acidificación del océano es el progresivo incremento en la acidez del océano sobre un largo período. La acidez puede entenderse simplemente como la concentración de iones hidrógeno ( $H^+$ ) en un líquido y el pH es la escala logarítmica con la cual se mide dicha concentración. A medida que la acidez aumenta, el pH disminuye producto de la captura del  $CO_2$  de la atmósfera. De igual forma la acidificación del océano puede ser ocasionada o incrementada por la adición y remoción de otros compuestos y elementos químicos del océano.

Cuando el  $CO_2$  se disuelve, reacciona con el agua para formar un equilibrio entre especies químicas iónicas y no iónicas: el dióxido de carbono libre en disolución  $CO_2$ , el ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ), el bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) y el carbonato ( $CO_3^{2-}$ ). Este fenómeno modifica la química de los carbonatos del agua de mar. La concentración de  $CO_2$  disuelto, iones hidrógeno e iones bicarbonato están incrementando mientras que la concentración de iones carbonato está disminuyendo (proyecto Ocean Carbon, 2014).

El déficit de carbonato interfiere en el desarrollo de especies que construyen caparazones o esqueletos de carbonato de calcio; lo cual puede afectar a diferentes especies del fitoplancton. También pudiera ocasionar la destrucción de arrecifes coralinos, del hábitat de ciertas especies y una crisis alimentaria mundial (Broadgate et al., 2013). Por lo tanto, es de urgencia y prioridad global que se investigue la categorización completa del sistema del Carbono Inorgánico Disuelto (CID).

El conocimiento de las variables de datos asociadas con el monitoreo de la acidificación del océano que incluyen pH, presión parcial de dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ ), Carbono Inorgánico Disuelto (CID) y Alcalinidad Total (AT); constituyen en la actualidad indicadores de seguimiento del Objetivo 14 de desarrollo sostenible de Naciones Unidas. Plantea el seguimiento de la exposición de los ecosistemas marinos y los sitios de acuicultura a circunstancias corrosivas e identificar oportunidades para reducir la vulnerabilidad del ecosistema a la acidificación del océano.

A nivel nacional se desarrolla el plan de estado para enfrentar el cambio climático, conocido como Tarea Vida, el cual identifica las áreas vulnerables a la acidificación costera y se propone conocer el origen del  $\text{CO}_2$  presente para establecer acciones de mitigación y adaptación al cambio climático (IGBP et al., 2013). El Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC), perteneciente al Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), desarrolla un programa de observaciones prolongadas de los parámetros que caracterizan la acidificación e investiga sobre las fuentes de  $\text{CO}_2$  en el ecosistema marino costero de Cuba.

Dentro de estos programas de investigación, el uso de isótopos estables constituye una prioridad para comprender complejos procesos marino-costeros, entre ellos la evaluación de las fuentes de  $\text{CO}_2$  presentes en la columna de agua.

La composición isotópica del carbono trece en el Carbono Inorgánico Disuelto ( $\delta^{13}\text{C}$ -CID) permite conocer los medios de recarga y el origen biológico del carbono. En Cuba existen limitadas capacidades para la cuantificación de isótopos estables en

general y en particular para la determinación del  $\delta^{13}\text{C-CID}$  por lo complejo del procedimiento y los elevados costos del equipamiento requerido, basado en la espectrometría de masas de relaciones isotópicas. El CEAC, como resultado de proyectos con el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), ha adquirido un espectrómetro de masas acoplado a un analizador elemental y a un sistema de equilibrio de flujos múltiples que permite la cuantificación de las relaciones isotópicas del oxígeno, hidrógeno, azufre, nitrógeno y carbono en diferentes matrices ambientales, entre ellas, aguas marinas. Sin embargo, no dispone de metodologías analíticas para la cuantificación de  $\delta^{13}\text{C-CID}$ .

Para dar solución a esta problemática se desarrolla esta investigación que tiene como objetivo general:

Implementar una metodología que permita cuantificar la composición isotópica del carbono trece en el Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar.

Objetivos específicos:

1. Comprobar la eficacia de la metodología analítica para la determinación de la composición isotópica del carbono trece en el Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar, vía Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas acoplado a un sistema de equilibración múltiple (MultiFlow-IRMS).
2. Cuantificar la señal de la composición isotópica del carbono trece en el Carbono Inorgánico Disuelto en muestras reales de agua de mar.

CAPÍTULO 1  
MARCO TEÓRICO

## **CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. Acidificación de los océanos**

La acidificación de los océanos es el nombre dado al descenso en curso del pH de los océanos de la Tierra, es un proceso causado por el incremento en dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico, también puede ser ocasionado o incrementado por la adición y remoción de otros compuestos y elementos químicos del océano (Kerrison et al., 2011).

El océano absorbe alrededor del 30% del CO<sub>2</sub> atmosférico (24 millones de toneladas diarias). Debido a que se emite cada vez más CO<sub>2</sub> a la atmósfera, el océano ha absorbido cantidades cada vez mayores y a velocidades más rápidas. Este proceso está alterando la capacidad del sistema de ajustarse a los cambios de CO<sub>2</sub> que ocurren naturalmente a lo largo de milenios y a su vez la química de los mares causando una progresiva acidificación (Oceánica, 2009).

El pH global de la superficie del océano ha disminuido desde 8,2 registrado en la era pre-industrial a 8,1; lo cual corresponde a un aumento cercano al 26% en la acidez del océano. Para el año 2100 se proyectan valores de pH entre (7,8 – 7,9) representando un aumento del doble en acidez (IGBP et al., 2013).

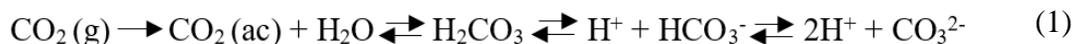
La elevación de la acidez disminuye la situación natural básica o alcalina del océano y fuerza el equilibrio ácido-base del agua de mar hacia el lado ácido. Si como se prevé, este proceso se acelera durante las cuatro próximas décadas, el consiguiente

aumento de la acidez del océano será mayor que cualquiera de los ocurridos en los últimos 21 millones de años. Estos cambios se están produciendo a una velocidad 100 veces mayor que en cualquier otro momento en la historia del planeta (IGBP et al., 2013).

En el ciclo natural del carbono, la concentración de CO<sub>2</sub> muestra un equilibrio de flujos entre los océanos, la biósfera terrestre y la atmósfera. Las actividades humanas tales como los cambios en los usos del suelo, la quema de combustibles fósiles y la producción de cemento; han supuesto un nuevo aporte de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. Parte del aporte de CO<sub>2</sub> ha permanecido en la atmósfera (donde es responsable del aumento de las concentraciones atmosféricas); el cual ha sido tomado por las plantas terrestres y también ha sido absorbido por los océanos (CDISSOAMRIA et al., 2010).

Las observaciones regulares de la acidez marina en lugares oceánicos abiertos durante los últimos 30 años han revelado una clara tendencia a disminuir el pH y se ha descubierto que las condiciones actuales a menudo están fuera de los límites preindustriales. En algunas regiones los cambios se amplifican por procesos naturales como surgencias; en las que el agua fría a menudo rica en CO<sub>2</sub> y en nutrientes, se eleva hacia la superficie del mar. Además, otros factores como la escorrentía de agua dulce, el derretimiento del hielo, la eutrofización (Ge et al., 2017), la actividad biológica, el cambio de temperatura y las grandes oscilaciones oceánicas que influyen en los niveles de CO<sub>2</sub> (Severiche Sierra et al., 2013) particularmente en las aguas costeras; deben tenerse en cuenta al interpretar los impulsores de la acidificación de los océanos y los impactos relacionados (Cooley et al., 2012).

Cuando el CO<sub>2</sub> gaseoso reacciona con el agua se forma ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) y sus productos de disociación; bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) (Alarcón et al., 2015).



En condiciones normales la calcita es estable en las aguas superficiales dado que el ion carbonato se encuentra en concentraciones sobresaturadas. No obstante, a medida que el pH desciende con el aumento del CO<sub>2</sub>, disminuye la concentración de este ion; esto se puede explicar a partir de las constantes de disociación del ácido carbónico.

Ecuaciones de disociación (François Hélie and Marcel, 2006):

$$K_0 = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{H}_2\text{O}][\text{CO}_2]} \quad (2)$$

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]} \quad (4)$$

Partiendo de lo anterior, se puede plantear que a medida que aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto, se incrementa las concentraciones de iones hidrógeno e iones bicarbonato, lo cual trae consigo que disminuyan las concentraciones de iones carbonato (Pelejero et al., 2010). Se ha demostrado que los cambios observados causan una variedad de respuestas a nivel de organismo que pueden afectar la

biodiversidad, la estructura del ecosistema y la seguridad alimentaria (Doney et al., 2009).

### **1.1.1. Efectos de la acidificación en la vida marina**

La disminución del carbonato disuelto reduce la solubilidad de los minerales de carbonato, incluidos la aragonita y la calcita; siendo estas las dos formas principales de carbonato de calcio utilizadas por las especies marinas para formar conchas y material esquelético. La aragonita es la forma más soluble y su disponibilidad para la construcción de conchas por parte de organismos como los corales y las ostras, llamada estado de saturación de la aragonita ( $\Omega$ ), se usa junto con el pH como un indicador en el seguimiento de la progresión de la acidificación del océano. Además, de igual importancia para algunos organismos marinos claves es el  $\text{CO}_2$  disuelto y la concentración de bicarbonato (Lefèvre et al., 2016).

Muchos animales marinos necesitan iones carbonato para el carbonato cálcico, indispensable en la formación de sus esqueletos y conchas. Este cambio en la química de los carbonatos exige a los organismos marinos gastar más energía en regular la química de sus células. Para algunos organismos, esto podría implicar dejar menos energía disponible para desarrollar otros procesos biológicos como crecer, reproducirse o responder a otros agentes estresantes (Ries, 2011).

El impacto biológico de la acidificación de los océanos será variable, debido a que diferentes grupos de organismos marinos tienen un amplio rango de sensibilidad a los cambios en pH y la química de los carbonatos. Los corales, bivalvos, pterópodos y

ciertas especies de fitoplancton presentan una gran sensibilidad a estos cambios. Este impacto en cualquier estado de desarrollo puede reducir la capacidad de crecer o de recuperarse de una población frente a pérdidas en abundancia debido a perturbaciones o estrés; en particular, nuevos estudios indican que los estadíos juveniles de estas especies son altamente sensibles a los efectos de la acidificación (OCB-OA et al., 2014) (Hendriks and Duarte, 2010).

Por lo tanto, es de urgencia y prioridad global que se investigue el sistema de los carbonatos, a partir del conocimiento de las variables asociadas con el monitoreo de la acidificación del océano ya que las concentraciones y actividades del ácido carbónico disuelto, bicarbonato disuelto y carbonato disuelto no pueden medirse directamente pero sí se puede medir la presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ), Carbono Inorgánico Disuelto (CID), pH y Alcalinidad Total (AT) (Eisler, 2012).

### **1.1.2. Parámetros que describen la acidificación oceánica**

Para caracterizar adecuadamente los diferentes componentes del sistema del carbonato en las aguas oceánicas, deben medirse al menos dos de los cuatro parámetros medibles; incluyen pH (Hemming and Honisch, 2007),  $\text{pCO}_2$ , CID y AT (Newton et al., 2015) (Severiche Sierra et al., 2013).

Estos parámetros constituyen en la actualidad indicadores de seguimiento de la exposición de los ecosistemas marinos y los sitios de acuicultura a condiciones corrosivas. Permite además, identificar oportunidades económicas a la acidificación del océano y la reducción de la vulnerabilidad del ecosistema; por lo que es

importante conocer el origen del CO<sub>2</sub> presente para establecer acciones de mitigación y adaptación al cambio climático.

El uso de isótopos estables constituye una herramienta para comprender complejos procesos marino-costeros, entre ellos la evaluación de las fuentes de CO<sub>2</sub> presentes en la columna de agua (IGBP et al., 2013).

## **1.2. Carbono Inorgánico Disuelto**

El mayor grupo activo en el ciclo global del carbono es el CID. Este grupo es en gran parte H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (casi no está presente), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (~95% de carbono en CID) pero también incluye CO<sub>2</sub> disuelto (<1% de carbono) y CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> disuelto (~5% de carbono) (Coleman and Fry, 1991).

La fuente de CO<sub>2</sub> en aguas naturales puede ser atmosférica o biogénica. El componente biogénico es predominantemente de las fuentes de respiración o la oxidación de la materia orgánica. El componente de carbonato en aguas subterráneas y superficiales se deriva de la disolución del suelo junto o no con la disolución de los carbonatos de las rocas. Los cambios en la concentración del CID pueden ocurrir debido a reacciones de disolución, precipitación dentro del sistema del carbonato acuoso, absorción biogénica, liberación de CO<sub>2</sub> y a partir de la mezcla de carbono de diferentes fuentes (de Groot, 2004).

### **1.2.1. <sup>13</sup>C del Carbono Inorgánico Disuelto**

El grupo CID de aguas naturales está relativamente enriquecido en <sup>13</sup>C, respecto al CO<sub>2</sub> atmosférico. El <sup>13</sup>C es el isótopo estable más pesado, presente en las especies

químicas que forman parte del CID. Es uno de los trazadores biogeoquímicos más utilizados en los procesos biológicos (Planavsky et al., 2014), que además ha sido esencial para el desarrollo de la comprensión de los flujos de carbono modernos y la evolución a largo plazo del ciclo global del carbono. Sus principales aplicaciones se centran en estudios de hidrología isotópica y geoquímica de aguas interiores y oceánicas; donde permiten conocer el origen del CID a partir de sus diferentes fuentes en el ecosistema. (Coleman and Fry, 1991).

Los cambios en el  $\delta^{13}\text{C}$  del CID son el resultado del fraccionamiento (procesos cinéticos y en equilibrio capaces de producir una relativa separación entre los isótopos ligeros y pesados) (Reyes, 2004) que acompaña a las transformaciones del carbono durante el ciclo de los carbonatos; las cuales dependen de la temperatura y del pH, por lo que el fraccionamiento isotópico del  $^{13}\text{C}$  entre algunas especies del carbono es bastante marcado (hasta un 10 ‰) (Fry, 2006).

El valor  $\delta^{13}\text{C}$  del CID en el agua oceánica varía entre 0 y +2,5‰, siendo el rango correspondiente de los valores  $\delta^{13}\text{C}$  de la fracción más abundante. En este sentido, el bicarbonato, se ha de calcular corrigiendo los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de los tres constituyentes ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ ), y está sobre el +1‰. La calcita que precipita lentamente en equilibrio con el bicarbonato oceánico tiene valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre +2,0 y +2,5‰. La composición isotópica del CID se ve intensamente afectada por los cambios estacionales en la temperatura en el  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  atmosférico, debido a la relativamente baja tasa de intercambio. No obstante la actividad biológica causa

variaciones del  $\delta^{13}\text{C}$ , por ejemplo, el crecimiento de las algas implica un fraccionamiento del orden de -20‰ hasta el -23‰ (Fry, 2006).

### **1.3. Espectrometría de masa de relaciones isotópicas**

La espectrometría de masa de relaciones isotópicas es la técnica analítica utilizada para determinar las masas relativas de los isótopos. Es una técnica destructiva, puesto que el analito se altera dentro del instrumento en condiciones de vacío, de tal forma que no es posible su recuperación posterior. Se trata de una técnica extremadamente sensible, por lo que se precisan cantidades de muestras muy pequeñas, lo que minimiza esfuerzos de muestreo.

Esta técnica se basa en tres etapas:

#### 1) Ionización

En esta etapa se forman los iones de masa ( $m$ ) en la fuente de ionización mediante el impacto electrónico a partir de circular un valor de corriente en la trampa de ionización para luego ser acelerados por un gradiente de potencial ( $V$ ), adquiriendo una energía cinética.

A mayor valor de corriente de la trampa de ionización, se van a formar un mayor número de iones y a medida que aumenta el gradiente de potencial, aumenta también la energía cinética con que se desplazan dichos iones, por lo que la sensibilidad del equipo va a depender tanto del valor de la corriente de la trampa de ionización como del gradiente de potencial aplicado. Para este tipo de estudio

se establecen valores de intensidad de la corriente entre (200 – 800 $\mu$ A) y de voltaje de aceleración de aproximadamente 3500V (Isoprime, 2009a).

2) Deflexión

La fuerza centrípeta magnética, no es más que la fuerza de deflexión ejercida por un campo magnético (H) perpendicular que debe balancear a la fuerza centrífuga ejercida sobre un ion que viaja en un círculo de radio (r). El equilibrio de estas fuerzas se expresa en la siguiente ecuación:

Ecuación 5. Ecuación fundamental de la espectrometría de masa (con analizador o sector magnético).

$$r = \frac{1}{H} \sqrt{\frac{2Vm}{e}} \quad (5)$$

Indica que el grado de deflexión de los iones de masa (m) y carga (e) constante se incrementa (el radio de la trayectoria disminuye) a mayores campos magnéticos o a menores potenciales de aceleración. En el caso de los IRMS, donde estos parámetros se mantienen constantes, el radio de giro es menor para los isótopos ligeros, es decir, su trayectoria se deflacta en mayor medida que la de los iones pesados (que se recogen en la coja de Faraday más externa del detector) (Redondo Ortega, 2008).

3) Detección

En los detectores (cajas de Faraday) se focalizan, respectivamente, los diferentes iones isotópicos del CO<sub>2</sub>, debido a la abundancia de moléculas con masas iguales a 44, 45 y 46g/mol que contienen diferentes combinaciones de isótopos en la molécula de CO<sub>2</sub>; conocidos como isotopólogos. (Ver detalles en la tabla 1).

Tabla 1 Abundancias naturales de los isotopólogos del CO<sub>2</sub> (Sharp, 2014).

Masa	Isotopólogos	Abundancia
44	<sup>12</sup> C <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O	98,4 %
	<sup>13</sup> C <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O	1,1 %
45	<sup>12</sup> C <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O	760mg/L
	<sup>12</sup> C <sup>16</sup> O <sup>18</sup> O	0,4 %
46	<sup>13</sup> C <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O	8,5mg/L
	<sup>12</sup> C <sup>17</sup> O <sup>17</sup> O	150μg/L

Estos colectores recogen las cargas eléctricas (los iones positivos atraen a los electrones) generando corrientes eléctricas (I) para las diferentes moléculas isotópicas.

A partir de determinar las razones de las corrientes eléctricas generadas por los colectores [ver en ecuación (6) y (7) (Fry, 2006)] se pueden deducir las relaciones isotópicas del CO<sub>2</sub>.

$$\frac{I_{45}}{I_{44}} = (C_{45}/C_{44}) \frac{CO_2 \text{ con masa } 45}{CO_2 \text{ con masa } 44} = (C_{45}/C_{44}) R_m \quad (6)$$

$$\frac{I_{46}}{I_{44}} = (C_{46}/C_{44}) \frac{CO_2 \text{ con masa } 46}{CO_2 \text{ con masa } 44} = (C_{46}/C_{44}) R_m \quad (7)$$

Cada una de las muestras se analiza simultáneamente con un pulso de gas de referencia. Las ecuaciones anteriores se aplican a la muestra (m) y al gas de referencia de trabajo (est); se eliminan los factores de eficiencia (c); las medidas de la masa 45 y la masa 46 y otros errores instrumentales (generalmente proporcionales o multiplicativos).

La señal  $\delta^{13}\text{C}$ -CID se obtiene a partir de una serie de cálculos, ejecutados por el software del instrumento, en los que se corrige la contribución de los isótopos del oxígeno para formar los diferentes isotopólogos del  $\text{CO}_2$ , teniendo como referencia la relación  $I_{45}/I_{44}$  de la muestra ( $R_m$ ) respecto a la relación  $I_{45}/I_{44}$  del estándar de trabajo ( $R_{\text{est}}$ ). Por último la señal  $\delta^{13}\text{C}$  de la muestra se calcula de acuerdo con una expresión en notación  $\delta$ .

### **1.3.1. Notación delta ( $\delta$ )**

“ $\delta$ ” es una unidad específica que expresa la composición isotópica de una muestra en abundancias isotópicas naturales, respecto al valor de un estándar internacional certificado. (Ver detalles en la ecuación 8). En algunos laboratorios se utiliza el propio gas de referencia como estándar de trabajo, previamente caracterizado y con su composición isotópica calibrada respecto a algún material estándar internacional. Sin embargo, esta práctica no es recomendable, pues existen factores que pueden afectar esta composición isotópica certificada como son la viscosidad del gas, su

flujo, presión de vapor y volumen; por los cuales se genera un fraccionamiento de la misma con el uso diario. Para ello se utiliza como alternativa un proceso de corrección de los resultados que se conoce como “Normalización”. (Ver detalles más adelante).

Ecuación 8. Cálculo de la relación isotópica de un material de muestra en notación  $\delta$ .

$$\delta^{13}\text{C} = \left[ \frac{R_m - R_{est}}{R_{est}} \right] \times 1000 \quad (8)$$

Donde R es la cantidad de isótopo pesado dividida por la cantidad del ligero ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), tanto en la muestra como en el estándar (Guerrero and Berlanga, 2000). Finalmente se multiplica por mil (1000) para ampliar las pequeñas diferencias medidas entre los valores de ( $R_m$  y  $R_{est}$ ) y se expresa el resultado en partes por mil (‰) (Fry, 2006).

### **1.3.2. Normalización**

La normalización de los datos de isótopos estables es importante para las comparaciones significativas de datos entre laboratorios, especialmente en aguas donde pueden existir grandes variaciones naturales en las relaciones de isótopos del carbono. Como resultado, pueden surgir grandes errores sistemáticos en aplicaciones de flujo continuo sin corrección, mientras que la normalización a la escala NBS-LSVEC frente a VPDB para el  $\delta^{13}\text{C}$ -CID puede facilitar la comparación entre laboratorios y puede lograrse mediante un procedimiento simple en el que se analizan

estándares de laboratorio secundarios cuidadosamente calibrados junto con muestras desconocidas.

Los valores delta para estos estándares, según se analizan, se representan en función de los valores calibrados y se realiza una regresión lineal. La ecuación resultante se aplica a muestras desconocidas para lograr la normalización. La desviación estándar para muestras repetidas mediante este método de normalización debe ser del 0,1%. Debido a que las muestras se analizan directamente contra los estándares de laboratorio calibrados, en un proceso analítico conocido como “*Identical Treatment Principle*”, en inglés (Werner and Brand, 2001). Con este proceso se elimina la necesidad de calibrar cuidadosamente los gases de referencia y por tanto, los pequeños cambios en la composición isotópica del gas de referencia, afectan los resultados analíticos.

El uso de patrones con un amplio rango de composición minimiza el error introducido por la corrección lineal, creando entonces una escala de calibración dentro de la cual se recomienda que estén los valores esperados de las muestras que se miden regularmente. Por lo tanto, en la práctica diaria se recomienda el empleo de uno o varios patrones de control que se calibran por separado y se tratan como muestras regulares para comprobar los resultados finales.

Por lo general, el 10% o más del volumen de muestra desconocido debe estar compuesto por el estándar de control de calidad para monitorear la precisión externa. Para un lote de muestras desconocidas, la reproducibilidad del estándar de control de

calidad proporciona una medida de precisión externa, dado que su composición isotópica absoluta ha sido calibrada, su análisis repetido proporciona un control sinóptico de precisión (Nelson, 2000).

#### **1.4. Muestreo de agua de mar para la determinación del $\delta^{13}\text{C}$ -CID**

La primera preocupación durante el proceso de muestreo, transporte y almacenamiento es evitar el fraccionamiento isotópico a través de la evaporación o pérdidas difusivas del vapor de agua, junto o no con el intercambio isotópico con los alrededores y con el material del envase. Estos efectos se pueden minimizar siempre y cuando se utilicen métodos de recolección y envases adecuados. Los envases más seguros para el almacenamiento son las botellas de cristal con cuellos estrechos, las cuales permiten el almacenamiento durante al menos una década, siempre y cuando el cierre no se rompa. Para ello se requieren tapas con cierres herméticos (arandelas de teflón, silicona u otros); si el cierre no es perfecto, el agua podría entrar en contacto con la atmósfera y sufrir algún intercambio (Fry, 2006).

Otra de las preocupaciones es el crecimiento de materia orgánica o transformaciones biológicas de la muestra de agua. Como en este caso el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  producido por el metabolismo celular es mucho menor que el de CID, esto generaría un fraccionamiento de la muestra a partir de la mezcla de diferentes fuentes, afectando directamente la representatividad (calidad) de la misma. Para evitar este proceso se recomiendan medidas como: 1) la filtración de las muestras por un tamaño de poro inferior a  $0,45\mu\text{m}$ , preferiblemente  $0,2\mu\text{m}$ ; 2) el tratamiento de la muestra con agentes

químicos conservantes como  $\text{HgCl}_2$  o  $\text{BaSO}_4$ , lugol u otros; 3) el almacenamiento de la muestra en un lugar oscuro y a baja temperatura ( $4^\circ\text{C}$  aproximadamente) (François Hélie and Hillaire Marcel, 2005).

Normalmente, el método de recogida de aguas superficiales supone pocos problemas pues se requieren cantidades relativamente pequeñas (30mL). Para el caso del análisis de  $\delta^{13}\text{C}$ -CID se debe de prestar especial cuidado durante la recogida del agua para evitar el burbujeo de las muestras o la mezcla de aguas ajenas a la misma. Si se requiere la composición isotópica de los distintos componentes del CID, es necesario además obtener mediciones *in situ* de otros parámetros como son la temperatura, salinidad y pH del agua; de los que depende el fraccionamiento. Estas mediciones pueden ayudar a descifrar las reacciones químicas en el sistema de los carbonatos, su balance de masas y su balance isotópico. Por último, es necesario obtener una medición estimada del contenido de CID en la muestra, para el posterior procesamiento de laboratorio, por lo que se puede utilizar la AT como una expresión del contenido de CID en la muestra (Coleman and Fry, 1991).

### **1.5. Vías para la determinación de $\delta^{13}\text{C}$ -CID**

Para la extracción del  $\delta^{13}\text{C}$ -CID existen dos vías principales: La primera es la precipitación del CID como carbonato, para lo que se puede añadir solución de NaOH (Fry, 2006) o  $\text{SrCl}_2$  (Singleton et al., 2012); luego al precipitado obtenido se le puede agregar ácido en un contenedor hermético aplicando vacío para extraer el dióxido de carbono gaseoso generado para su posterior determinación mediante IRMS. Otra

forma de analizar el sólido obtenido es utilizando un analizador elemental de combustión catalítica del carbonato a 1200°C, en el que todo el carbonato en estado sólido pasa a estado gaseoso para su posterior análisis por IRMS.

La segunda vía que se utiliza es convertir todo el CID en dióxido de carbono gaseoso utilizando ácido para la posterior extracción y análisis utilizando un IRMS. Para la obtención del dióxido de carbono gaseoso a partir del CID se puede utilizar un analizador TIC-TOC (Jean, 2002) o un sistema de equilibración múltiple de inyección automatizada (MultiFlow) (ISOPRIME, 2009b).

En esta investigación todas las muestras fueron analizadas a partir de la segunda vía ya que la primera requiere enormes cantidades de muestra para lograr que todo el CID precipite como carbonato. Además se utilizó la técnica MultiFlow-IRMS en vez de TIC-TOC-IRMS ya que es el equipamiento disponible hoy el CEAC.

#### **1.6. Fundamento del método**

Se basa en la espectrometría de masa de relaciones isotópicas. Es decir, la relación entre el  $C^{13}/C^{12}$  de una muestra en comparación con un estándar. El  $CO_2$  obtenido por la metodología de extracción (MultiFlow) es introducido al IRMS en modo flujo continuo donde cada una de las muestras es analizada simultáneamente con un pulso de gas de referencia, utilizado para determinar la señal  $\delta^{13}C$ -CID.

CAPÍTULO 2  
MATERIALES Y MÉTODOS

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Metodología para la determinación del $\delta^{13}\text{C}$ -CID en agua de mar**

La metodología utilizada en este estudio es una recopilación de técnicas descritas por autores como (Coleman and Fry, 1991); (Jean, 2002); (ISOPRIME, 2009b);(Singleton et al., 2012) , ajustándola a las condiciones y a la instrumentación del Laboratorio de Isotopía Ambiental (LIA) del CEAC. Los elementos fundamentales a tener en cuenta para la implementación de esta metodología se describen seguidamente.

#### **2.1.1. Preparación de la instrumentación de laboratorio**

Toda la cristalería utilizada fue lavada primeramente con una solución de ácido nítrico (p.a.) al 10% para eliminar cualquier resto de carbonatos inorgánicos, luego fue lavada con agua destilada y MiliQ. Por último toda la cristalería fue secada en una estufa a 50°C.

#### **2.1.2. Preparación de las soluciones patrones y los blancos**

Los materiales utilizados como patrones internos fueron tres alícuotas de bicarbonato de sodio provenientes de diferentes suministradores, los cuales fueron caracterizados con materiales de referencia certificados NBS-19 ( $1,95 \pm 0,05\%$ ) y IAEA-603 ( $2,46 \pm 0,01\%$ ) a la escala NBS-VPDB en el laboratorio de isótopos estables del centro de investigación Geotop-UQAM. El valor reportado para el patrón primario superior NC fue ( $\delta^{13}\text{C} = -3,41 \pm 0,06\%$ ) y para el patrón primario inferior AH fue ( $\delta^{13}\text{C} = -19,51 \pm 0,06\%$ ). Para el patrón secundario CB no se ha recibido aún su caracterización, pero según comunicación verbal con los especialistas del laboratorio de Geotop, este

tiene un valor aproximado de  $\delta^{13}\text{C} = -14\text{‰}$  frente a VPDB. Este último se utilizó como patrón de control entre cada secuencia analítica de normalización, tratándolo como una muestra.

Para la preparación de los patrones se pesaron las masas correspondientes de cada uno utilizando una micro-balanza analítica (MX, METTLER TOLEDO), para obtener las concentraciones requeridas a disolver en un volumen de 250mL (30mg/L de carbono) similar al agua de mar, utilizando muestras de Dickson de agua de mar certificada como referencia, con un valor de CID = 24mg/L (Dickson, 2015).

Los siguientes cálculos se realizaron para determinar la masa en gramos que se necesita pesar de cada patrón.

Datos:

$$n_c = n_{\text{NaHCO}_3}$$

M (NaHCO<sub>3</sub>) = 84g/mol

$$c_c v_c = \frac{m_{\text{NaHCO}_3}}{M_{\text{NaHCO}_3}}$$

M (C) = 12g/mol

$$M_{\text{NaHCO}_3} \left[ \frac{m_c}{M_c} v_c \right] = m_{\text{NaHCO}_3}$$

$$84 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \left[ \frac{0,03\text{g}}{12 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} 0,25 \text{ L} \right] = m_{\text{NaHCO}_3}$$

$$52,5 \text{ g} = m_{\text{NaHCO}_3}$$

Los blancos se prepararon en dos grupos, uno con agua MiliQ (Res > 18,2Ωm/cm) y otro con agua desionizada (Res < 18,2Ωm/cm) (Humphreys et al., 2015) para comprobar la calidad del agua utilizada en la preparación de las soluciones patrones.

### **2.1.3. Preparación de las muestras**

La preparación de las muestras se realizó de acuerdo con el Principio de Tratamiento Idéntico “*IT Principle*”(Werner and Brand, 2001), para garantizar el resultado a partir de la normalización de los datos según lo descrito por (Nelson, 2000).

A cada vial se le añadió manualmente la misma cantidad (12 gotas) de una solución viscosa de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% (BioUltra, CAS No. 7664-38-2), utilizando una jeringuilla de 3mL (BECTON DICKINSON, punta Luer-Lok). El contenido de aire en el espacio aéreo interior de los viales fue removido con He (99,9999% ALPHAGAZ II) utilizando el sistema de flujos múltiples MultiFlow (ISOPRIME) para efectuar la inyección automatizada del gas a un flujo de 5,6 mL/min durante 200 segundos.

El volumen utilizado para cada solución fue de 1mL y fueron inyectadas manualmente a los viales utilizando jeringuillas de 5mL (BECTON DICKINSON, punta Luer-Lok). La secuencia analítica se concibió de forma tal que se distribuyeran en bloques de normalización (aproximadamente 15 muestras por bloques) incluyendo blancos, patrones de normalización y control; teniendo en cuenta en el siguiente orden: blancos, patrones de normalización (superior e inferior), patrones de control, muestras, patrones de normalización, patrones de control, muestras, patrones de normalización y patrones de control. Las muestras se dejaron equilibrar durante una hora a una temperatura controlada de 60°C en un bloque calentador (ver detalles en la figura 2) para la posterior extracción del CO<sub>2</sub>.

#### 2.1.4. Extracción de CO<sub>2</sub>

Una vez equilibradas las muestras, el CO<sub>2</sub> contenido en el espacio aéreo del vial entró de forma automatizada por el sistema de inyección del MultiFlow, utilizando He como gas portador. En este sistema, los componentes que puedan existir en el espacio aéreo del vial además del CO<sub>2</sub>, son separados en una columna cromatográfica a 100°C y de allí el CO<sub>2</sub> es introducido al IRMS.

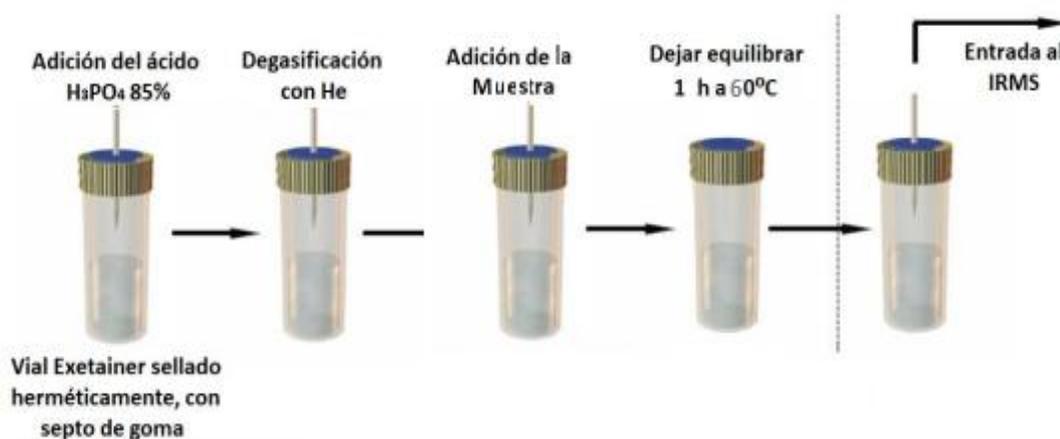


Figura 2 Esquema de extracción del CO<sub>2</sub> (ISOPRIME).

#### 2.1.5. Determinación analítica

El espectrómetro de masas utilizado para las determinaciones es un IRMS (ISOPRIME) en modo Flujo Continuo, en el que se analizaron cada una de las muestras y patrones simultáneamente con un pulso de gas de referencia, en este caso CO<sub>2</sub> (99.998% ALPHAGAZ II). El valor de  $\delta^{13}\text{C}$  obtenido se considera hasta esta etapa como un valor en bruto y se obtiene a partir de los cálculos y correcciones realizadas por el software del instrumento, tal y como se describe en el capítulo 1 (acápito 1.3).

### **2.1.6. Normalización de las muestras a la escala V-PDB**

Las secuencias de datos en bruto obtenidas fueron introducidas en una plantilla de Excel programada para la obtención de los valores reales, la cual normalizó automáticamente tanto los resultados obtenidos para los patrones como para las muestras utilizando la calibración de dos puntos, según (Nelson, 2000) considerando dos estándares en lugar de uno y propaga las incertidumbres de los valores medidos y verdaderos de los materiales de referencia al ajuste de regresión lineal.

## **2.2. Comprobación de la metodología**

### **2.2.1. Análisis de la contribución de los blancos (Prueba 1)**

Se analizaron cinco blancos con agua MiliQ y cinco con agua desionizada para comprobar la calidad del agua utilizada en la preparación de las soluciones patrones y cuantificar la contribución de los blancos de ser necesario corregir durante el ensayo siguiendo la metodología descrita en el (acápito 2.1).

### **2.2.2. Determinación de $\delta^{13}\text{C}$ -CID en patrones internos (Prueba 2)**

Se tomaron ocho réplicas de cada patrón de concentraciones de 30mg/L de carbono y se analizaron siguiendo el protocolo descrito en el acápito 2,1; con el objetivo de comprobar si utilizando concentraciones similares al agua de mar se podían obtener valores de intensidad de la señal  $\delta^{13}\text{C}$ -CID dentro del rango de trabajo del instrumento de (3 - 9nA). También se quiso verificar si los resultados de señal delta obtenidos a partir de este estudio se encuentran dentro del intervalo de incertidumbre real reportado para estos patrones producto de la calibración a la escala VPDB.

A los resultados obtenidos de intensidad y señal delta se le aplicó una prueba de Grubbs para depurar la información, descartando valores erráticos o atípicos producto de algún error técnico al realizar la medición.

### **2.2.3. Determinación de $\delta^{13}\text{C}$ -CID en muestras reales (Prueba 3)**

Se realizó una tercera prueba para comprobar la determinación de la señal  $\delta^{13}\text{C}$ -CID en muestras reales de una matriz de agua de mar, para lo que se efectuó un muestreo en cinco estaciones diferentes en la bahía de Cienfuegos. Se tomó una muestra por cada punto de muestreo y se analizó cada una por duplicado siguiendo el protocolo descrito en el acápite 2.1.

#### **2.2.3.1. Zona de estudio**

El lugar seleccionado para la realización del muestreo fue el área centro-sur de la bahía de Cienfuegos, ubicada al sur de la provincia Cienfuegos. (Ver detalles en la figura 3). Esta zona se caracteriza por ser una bahía semicerrada en forma de bolsa con características estuarinas, en la que se desarrollan actividades de tipo industrial, agrícola y urbano, no solo en sus márgenes sino también en sus afluentes y cuencas tributarias. Ocupa un área de  $90\text{km}^2$  y un volumen medio de  $870\text{m}^3$ , presenta un ancho de 3km en dirección este-oeste y un largo de 22km en dirección norte-sur. Su profundidad media es cercana a los 14m. Además, está unida con el Mar Caribe por un estrecho canal con una longitud de 3,5km, un ancho de 300m y una profundidad de 50m.

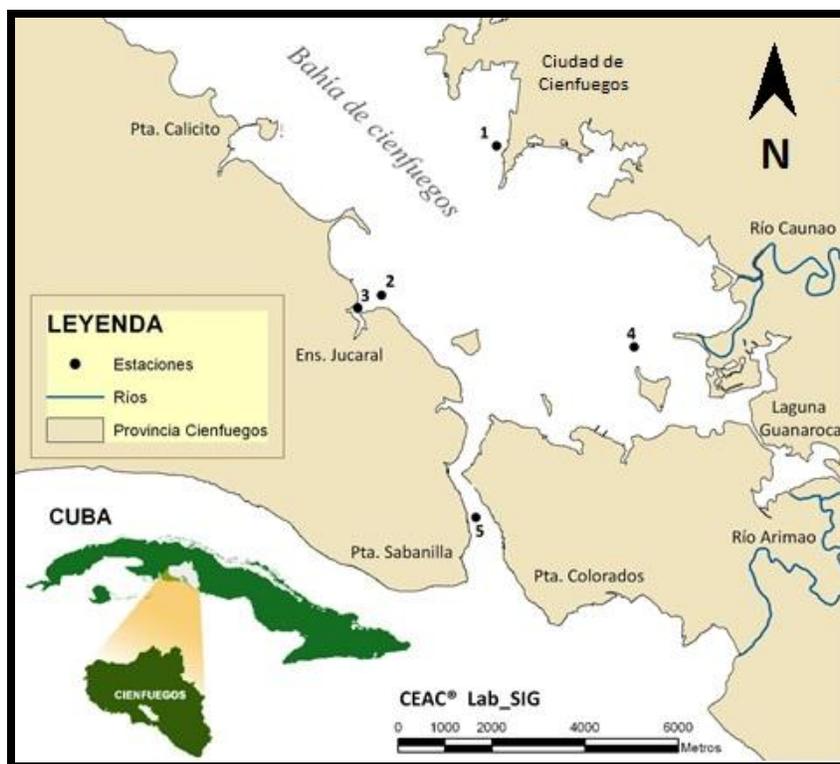


Figura 3. Zona de estudio, bahía de Cienfuegos.

Tabla 2. Estaciones para la toma de muestras reales de agua de mar.

Estaciones	Nombre	Coordenadas (WGS84; grados decimales)		Profundidad total (m)	Profundidad de muestreo (m)
		Latitud Norte	Longitud Oeste		
1	Punta Gorda	22,13012	-80,45447	6,0	3,0
2	Jucaral	22,09431	-80,48163	9,3	4,5
3	Manantiales	22,09381	-80,48556	3,0	1,5
4	Lóbulo Sur	22,09202	-80,42701	10,6	5,3
5	Castillo de Jagua	22,06360	-80,46287	11,0	5,5

**2.2.3.2. Colecta de las muestras**

La toma de muestras se realizó utilizando una botella Niskin de 5L a una profundidad media respecto a la profundidad total en cada punto. Las muestras de agua se tomaron por duplicado, cuidando evitar el burbujeo de las mismas durante su manipulación. Cada réplica se filtró utilizando filtros de punta de jeringuilla de 0,45µm de tamaño de poro para eliminar todo el material en suspensión, incluyendo microorganismos, detrito u otra fuente de carbono, las muestras se pasaron a frascos de cristal de 25mL, los cuales fueron sellados cuidadosamente para evitar el contacto con el aire. Seguidamente se almacenaron protegiéndolas de la luz y se pusieron en frío para su posterior transporte al CEAC, donde serían analizadas.

**2.2.3.3. Determinaciones *in situ***

Se utilizó una sonda multiparámetros (HI98194 HANNA); la cual se introdujo en un cubo de muestra para medir *in situ* pH, temperatura y salinidad. Es necesario medir estos parámetros ya que las concentraciones de carbonato, bicarbonato y dióxido de carbono presentes en la columna de agua van a cambiar con la variación de estos parámetros.

Para la medición de la AT se utilizó un Test Kit HI3811 (Hanna), el cual se suministra con indicador de fenolftaleína 10mL e indicador azul bromocresol de 10ml, valorante de alcalinidad (HI3811-0) de 120mL, vaso calibrado de 20mL y 50mL y jeringuilla calibrada de 1mL con punta. Se basa en una valoración colorimétrica visual (Pelejero and Fernández-Guallart, 2012).

CAPÍTULO 3  
PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS  
DE LOS RESULTADOS

### **CAPÍTULO 3. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

#### **3.1. Comprobación del protocolo para la determinación del $\delta^{13}\text{C}$ del Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar**

##### **3.1.1. Resultados de la contribución de los blancos (Prueba 1)**

Se analizaron cinco réplicas para cada uno de los blancos, obteniendo valores de intensidad de la señal que oscilan para el agua MiliQ entre (0,05 - 0,08nA) con un promedio de  $0,06 \pm 0,01$  y para el agua desionizada oscilan entre (0,09 - 0,11nA) con un promedio de  $0,10 \pm 0,01$ . Los resultados de señal delta para el agua MiliQ se encuentran entre -24,31 y -21,09‰, con un promedio de  $-22,29 \pm 1,30\%$  y para el agua desionizada se obtuvieron entre -20,32 y -17,50‰, con un promedio de  $-18,79 \pm 1,33\%$ .

Tabla 3. Resultados del análisis de los blancos.

<b>Réplicas</b>	<b>Agua MiliQ</b>		<b>Agua Desionizada</b>	
	<b>Intensidad masa 44 (nA)</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math>-CID (‰)</b>	<b>Intensidad masa 44 (nA)</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math>-CID (‰)</b>
1	0,06	-21,09	0,10	-20,32
2	0,07	-24,31	0,10	-17,55
3	0,05	-22,03	0,09	-20,00
4	0,05	-21,30	0,11	-18,56
5	0,08	-22,70	0,09	-17,50

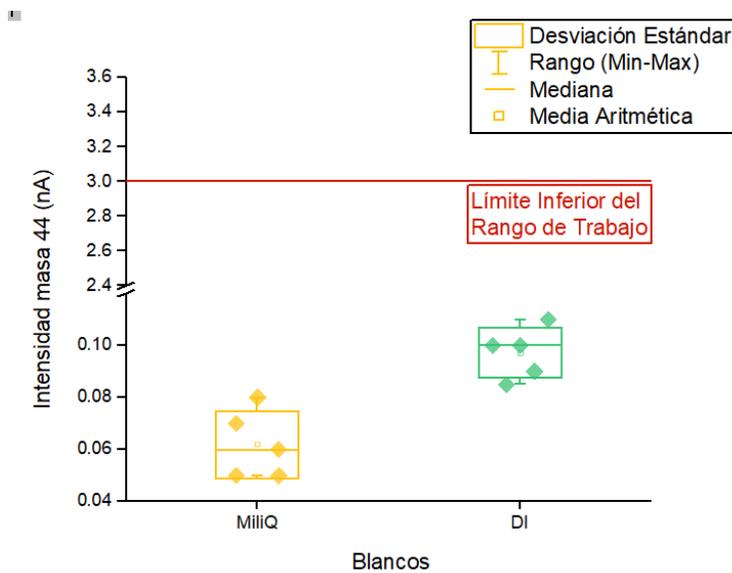


Figura 4. Resultados de la intensidad de la señal analítica en nA para la masa 44 del CO<sub>2</sub> en blancos de agua ultrapura (MiliQ) y desionizada (DI).

Los resultados de los blancos se encuentran muy por debajo del rango inferior de trabajo del equipo (3nA) por lo que su contribución no es significativa y puede manejarse dentro del rango de incertidumbre reportado para el método, por lo que no es necesario realizar la corrección de su contribución a la señal.

Los blancos preparados con agua MiliQ arrojaron valores de señal  $\delta^{13}\text{C}$  similares a los obtenidos con agua destilada, estos resultados evidencian que es posible emplear el agua desionizada común para la preparación de las soluciones patrones, siempre y cuando se mantenga un control riguroso y periódico (para cada corrida de muestras) de estos valores.

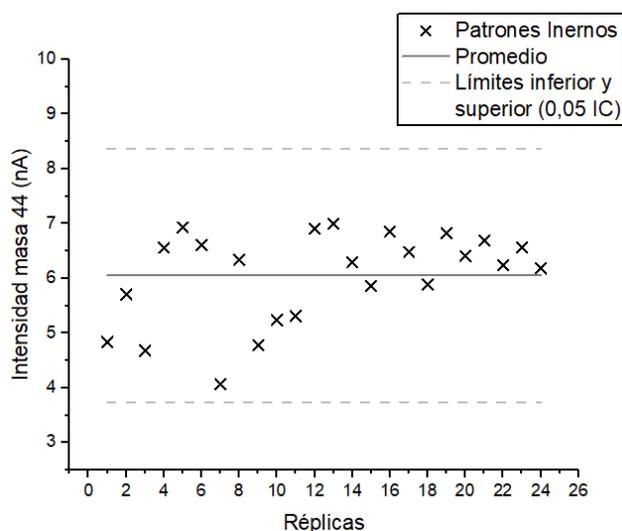
**3.1.2. Resultados de la determinación de  $\delta^{13}\text{C}$ -CID en patrones internos (Prueba 2)**

De cada uno de los patrones internos se analizaron ocho réplicas. Los datos obtenidos de intensidad de la señal para el patrón NC se encontraron entre (4,07- 6,93nA) con un promedio de  $5,72 \pm 1,06$ , para AH se obtuvieron resultados entre (4,78 – 7,00nA) con un promedio de  $6,03 \pm 0,86$  y CB brindó resultados entre (5,89-6,83nA) con un promedio de  $6,41 \pm 0,48$ . Los resultados de señal delta  $^{13}\text{C}$  obtenidos respectivamente se encuentran entre -7,36 y -4,66‰, con promedio de  $-5,64 \pm 0,89\%$  para NC, entre -20,45 y 20,13‰, con promedio de  $-20,30 \pm 0,12\%$  para AH y entre -15,83 y -14,73‰ con promedio de  $15,33 \pm 0,48\%$  para CB.

Tabla 4. Resultados en bruto del análisis de los patrones.

Parámetros Descriptivos	NC		AH		CB	
	Intensidad masa 44 (nA)	$\delta^{13}\text{C}$ -CID (‰)	Intensidad masa 44 (nA)	$\delta^{13}\text{C}$ -CID (‰)	Intensidad masa 44 (nA)	$\delta^{13}\text{C}$ -CID (‰)
<b>Promedio</b>	5,72	-5,64	6,03	-20,30	6,41	-15,33
<b>Mínimo</b>	4,07	-7,36	4,78	-20,45	5,89	-15,83
<b>Máximo</b>	6,93	-4,66	7,00	-20,13	6,83	-14,73
<b><math>\sigma</math></b>	1,06	0,87	0,86	0,12	0,30	0,48

En el análisis de intensidad de la señal (nA) para la masa 44, el valor crítico establecido para un nivel de significación de  $\alpha = 5\%$  en 24 resultados fue de 2,80 y el valor calculado del estadígrafo (G) fue de 2,40. Por tanto, todos los valores son aceptados como correctos. (Ver detalles en la figura 5).



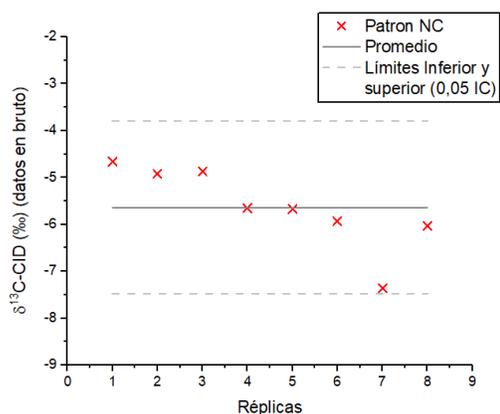
Valor de G	Valor Crítico	Probabilidad
2,40	2,80	0,25

Figura 5. Prueba de Grubbs para la intensidad de la señal del conjunto de 24 valores de los patrones internos.

El valor crítico resultante para un nivel de significación de  $\alpha = 5\%$  para el análisis de ocho resultados de señal delta para cada patrón fue de 2,13. El estadígrafo obtenido para NC es igual a 1,99, para AH fue de 1,40 y para CB de 1,26. Estos resultados son menores que su valor crítico de 5%, por lo que son aceptados todos como correctos. (Ver más detalles en la figura 6).

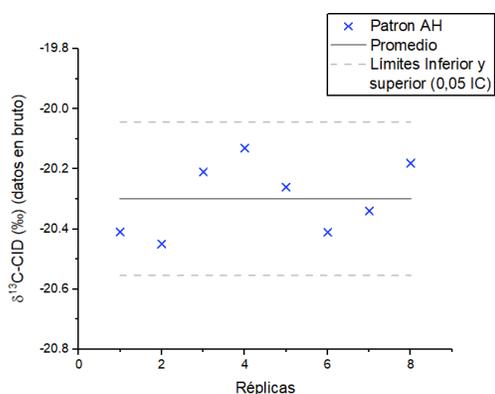
En la figura 7, se presentan los resultados obtenidos para las soluciones patrones, preparados en concentraciones de 30mg/L de carbono. Específicamente los resultados de intensidad de la señal en nA para la masa 44, estuvieron dentro del rango de trabajo del equipo, por lo que se corroboró que la metodología utilizada es válida para analizar concentraciones similares al agua de mar.

## Presentación y Análisis de los Resultados



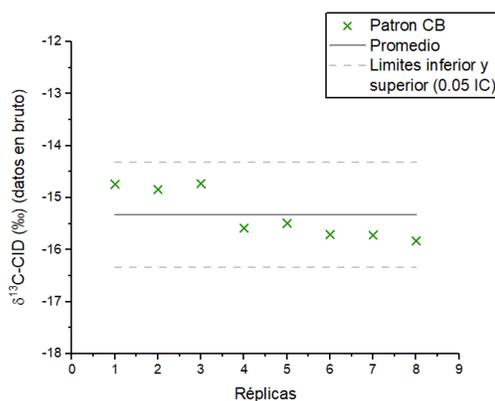
a

Valor de G	Valor Crítico	Probabilidad
1,99	2,13	0,13



b

Valor de G	Valor Crítico	Probabilidad
1,40	2,13	1,14



c

Valor de G	Valor Crítico	Probabilidad
1,26	2,13	1,57

Figura 6. Resultados de la prueba de Grubbs aplicada a los valores de señal delta obtenidos de cada patrón.

a) Patrón interno de normalización (NC).

b) Patrón interno de normalización (AH).

c) Patrón interno de control (CB).

## Presentación y Análisis de los Resultados

La mayor dispersión se obtuvo en el patrón NC, con una desviación estándar de  $\pm 1,06$ , esto puede atribuirse a la presencia de errores aleatorios durante la preparación de las soluciones patrones, la dosificación del ácido o en la inyección de la muestra.

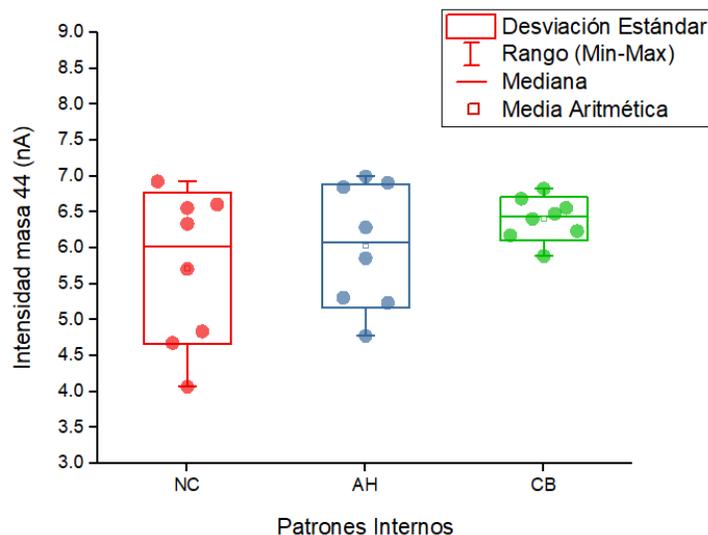


Figura 7. Resultados de la intensidad de la señal analítica en nA para la masa 44 del  $\text{CO}_2$  en los patrones.

La figura 8, muestra los resultados de señal delta sin corregir de los patrones internos. La metodología y la instrumentación empleadas permitieron distinguir las diferentes composiciones isotópicas de cada uno de ellos. La dispersión observada de los datos estuvo en el orden de  $\pm 0,87\%$  para NC;  $\pm 0,12\%$  para AH; y de  $\pm 0,48\%$  para CB. Estas dispersiones pese a ser bien pequeñas, no se corresponden con las reportadas en la caracterización por el laboratorio Geotop-UQAM para los patrones NC y AH ( $0,06\%$ ), lo que indica que es necesario hacer un estudio más profundo sobre elementos como la estabilidad, repetibilidad y reproducibilidad de los patrones y del método, respectivamente.

## Presentación y Análisis de los Resultados

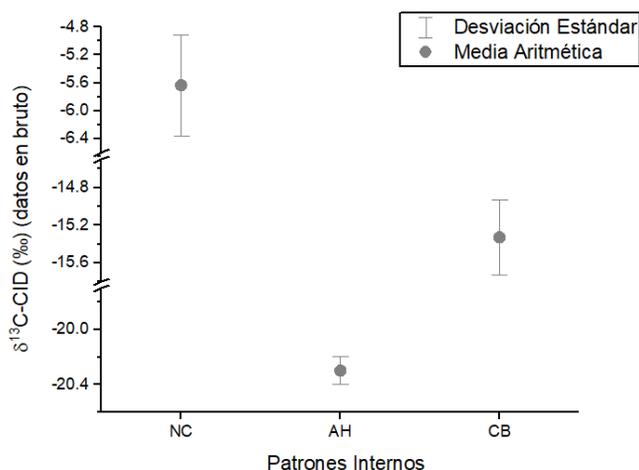


Figura 8. Resultados de la señal delta de los patrones.

Con la intención de demostrar si existía o no dependencia entre las variables: intensidad de la señal (nA) de la masa 44 y composición isotópica  $\delta^{13}\text{C}$ , se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson. (Ver detalles en la figura 9). Los resultados de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron de: 0,09, 0,63, y 0,11 para NC, AH y CB respectivamente. Esto evidencia que no existe correlación significativa entre estas variables; fenómeno esperado pues la determinación de  $\delta^{13}\text{C}$  es a partir de la integración de la señal de las diferentes masas 44, 45 y 46 y esta no debería verse afectada siempre que las determinaciones se encuentren en el rango de linealidad del equipo o rango de trabajo.

## Presentación y Análisis de los Resultados

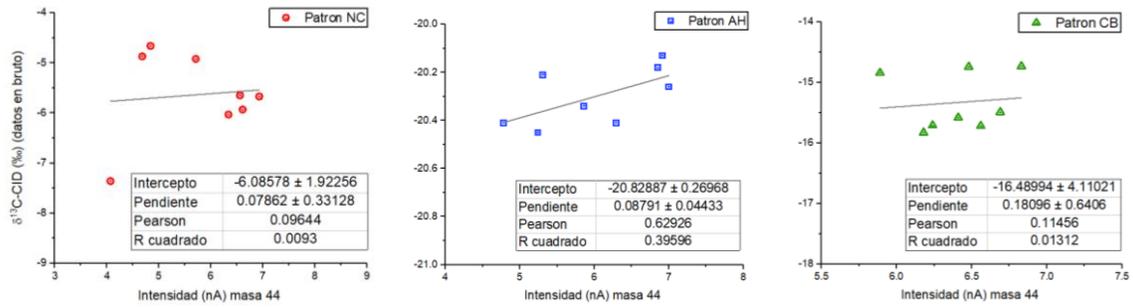


Figura 9. Resultados de las pruebas de correlación de la intensidad y señal delta para los patrones.

### 3.1.3. Resultados de la determinación de $\delta^{13}\text{C}$ -CID en muestras reales (Prueba 3)

La figura 10 contiene los resultados de las mediciones *in situ* del pH, temperatura, salinidad y AT obtenidos en cada punto de muestreo.

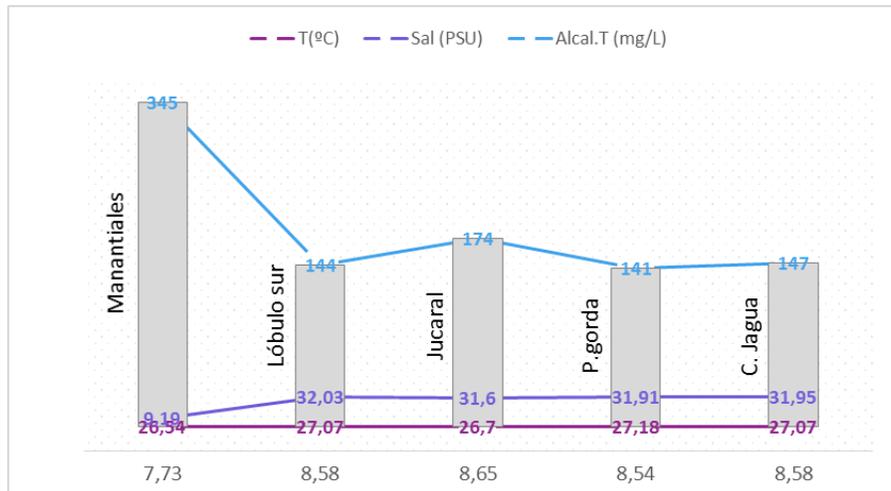


Figura 10. Resultados de las mediciones *in situ* del pH, temperatura, salinidad y AT.

En todas las estaciones se obtuvieron valores de pH, temperatura, salinidad y AT similares excepto en la estación Manantiales donde se obtuvieron valores diferentes de pH (7,73), temperatura (26,54°C), salinidad (9,19mg/L) y AT (345mg/L). Estos

## ***Presentación y Análisis de los Resultados***

resultados sugieren la presencia de una mezcla de aguas en esta estación con características físico-químicas diferentes afectando directamente las concentraciones del CID.

Para la determinación de  $\delta^{13}\text{C}$ -CID fue necesario estimar las concentraciones del CID para cada muestra a partir de introducir los resultados de las mediciones *in situ* de (pH, temperatura, salinidad y AT) en una hoja de cálculo de Excel, programada según las ecuaciones que se presentan y discuten en (François Hélie and Hillaire Marcel, 2005);(François Hélie and Marcel, 2006) y (François Hélie and Marcel, 2007). Se obtuvieron resultados de CID = 85,9mg/L en los Manantiales, 34,1mg/L en el lóbulo sur, 41,1mg/L en Jucaral, 33,5mg/L en Punta Gorda y 34,8mg/L en el Castillo de Jagua. Todos los resultados se encuentran alrededor de los 30mg/L, excepto la estación Manantiales, la cual presentó el doble de la concentración requerida para este análisis por lo que se hizo un reajuste del volumen para la determinación de  $\delta^{13}\text{C}$ , tomando solo la mitad (0,5mL) respecto al resto de las muestras.

En la figura 11, se muestra la secuencia analítica en la que se realizaron las determinaciones de las muestras reales. De acuerdo con la metodología propuesta, se incluye en la secuencia: blancos, patrones internos de normalización, patrones internos de control y muestras; ordenados de forma tal que se garantice la comprobación de errores durante el proceso de determinación analítica, desviaciones y otros cambios que puedan afectar el valor de  $\delta^{13}\text{C}$ . (Ver más detalles en la tabla 6 - anexos 2).

Los resultados de intensidad en toda la secuencia ( $5,32 \pm 1,80\text{nA}$ ), estuvieron dentro del rango de trabajo del equipo (3 - 9nA). Adicionalmente, los valores de intensidad

## Presentación y Análisis de los Resultados

para las muestras reales se comportaron muy similares a los obtenidos en los patrones internos, esto demuestra la validez del protocolo para trabajar con muestras de agua de mar (aproximadamente 30mg/L de carbono en el CID, con una salinidad aproximada de 35mg/L).

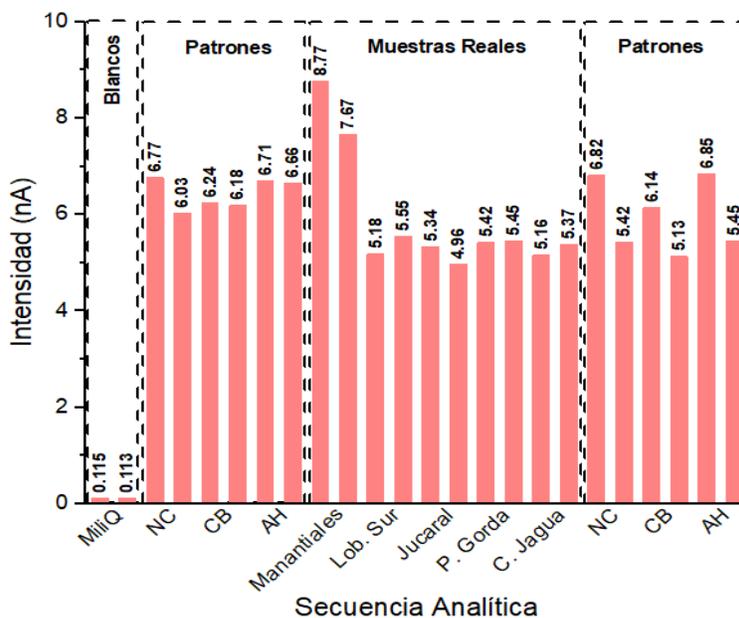


Figura 11. Resultados de intensidad de la señal para la secuencia analítica.

Los valores de intensidad obtenidos para la estación Manantiales fueron superiores ( $8,22 \pm 0,78\text{nA}$ ). No obstante, estuvieron al igual que el resto de las muestras, dentro del rango de trabajo del equipo; corroborando la importancia de la medición de la AT a las muestras como una manera de estimar el contenido de CID y realizar el ajuste apropiado del volumen de muestra a analizar.

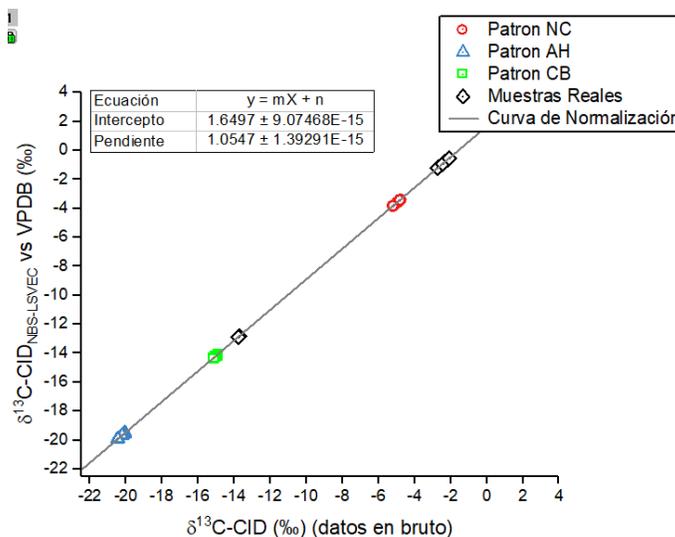


Figura 12. Resultados de la normalización de las muestras reales.

En esta figura se muestran los resultados de la normalización de las muestras reales. Los valores de señal delta en bruto obtenidos para todas las muestras se encuentran fuera del rango de normalización establecido por los patrones internos excepto las tomadas en la estación Manantiales, a pesar de esto todas las muestras fueron normalizadas; pero se evidencia la necesidad de trabajar con un patrón interno superior de mayor escala. A partir de la interpretación de estos resultados se pudiera sugerir la utilización de estos patrones internos en el análisis de matrices de agua dulce.

Los resultados de  $\delta^{13}\text{C}$  en muestras reales de agua de mar demuestran que la metodología propuesta permite distinguir entre aguas con aportes de CID de diferentes fuentes. (Ver más detalles en la figura 13).

En la estación Manantiales se obtuvo un valor promedio de  $-12,85\text{‰}$  este resultado corresponde con los reportados por la literatura para zonas con presencia de

## Presentación y Análisis de los Resultados

macrófitos y se encuentra dentro del intervalo reportado para el agua dulce, esto se corrobora con los bajos resultados de salinidad obtenidos, por lo que se pudiera decir que esta estación presenta una mezcla de aguas diferentes. Las restantes muestras se encuentran entre -1,23 y -0,91‰, correspondiendo con los valores reportados para los carbonatos marinos (IAEA/UNESCO, 2000).

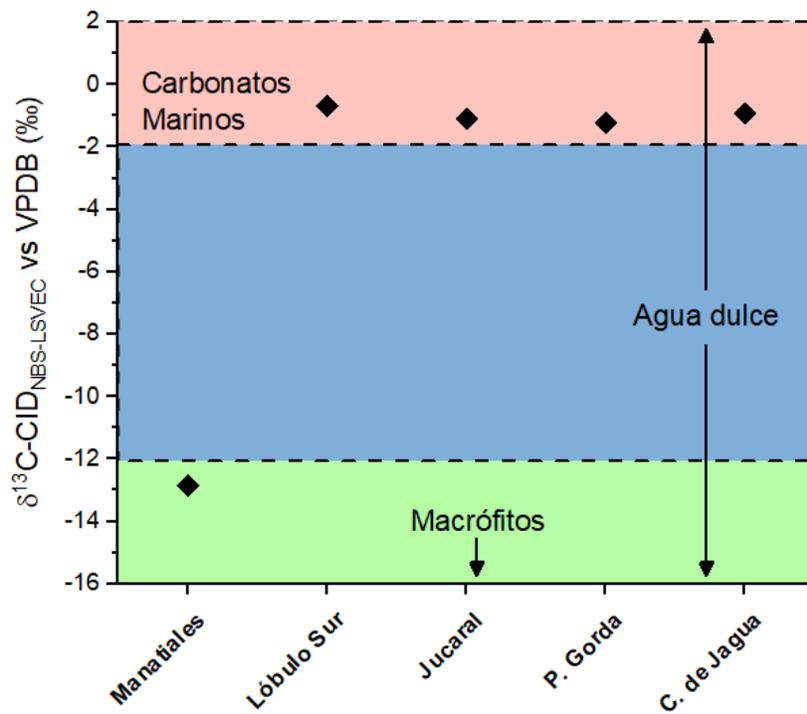


Figura 13. Muestras y fuentes de carbono en ecosistemas marino-costeros.

**CONCLUSIONES**

1. La metodología analítica utilizada es eficiente para la determinación de  $\delta^{13}\text{C}$  del Carbono Inorgánico Disuelto en agua de mar.
2. La señal de  $\delta^{13}\text{C}$  del Carbono Inorgánico Disuelto en las muestras de agua de mar colectadas estuvo entre  $-12,87\text{‰}$  y  $-0,65\text{‰}$ , con un valor promedio de  $-3,35 \pm 5,01\text{‰}$ .
3. Los resultados de  $\delta^{13}\text{C}$  en muestras reales de agua de mar demuestran que la metodología propuesta permite distinguir entre aguas con aportes de Carbono Inorgánico Disuelto de diferentes fuentes.

**RECOMENDACIONES**

- Realizar un estudio completo de validación de este método, incluyendo las concentraciones de Carbono Inorgánico Disuelto en el rango de las aguas dulces superficiales y subterráneas.
- Obtener un Patrón Interno de Normalización con un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  superior al de NC, para asegurar que las muestras de agua de mar estén dentro del rango de normalización de los patrones.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALARCÓN, E., VALDÉS, N. & TORRES, R. 2015. Saturación del carbonato de calcio en un área de cultivo de mitílidos en el Seno Reloncaví, Patagonia norte, Chile.

BROADGATE, W., IGBP & RIEBESELL, U. 2013. La acidificación del océano. Resumen para responsables de políticas. Tercer simposio “El océano en un mundo con altos niveles de CO<sub>2</sub>.”

CDISSOAMRIA, OSB & DELS 2010. *Ocean Acidification: A National Strategy to Meet the Challenges of a Changing Ocean*, Washington, D.C, National Academy of Sciences.

COLEMAN, D. C. & FRY, B. 1991. *Isotopic Techniques in Plant, Soil, and Aquatic Biology* San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Toronto Academic Press Limited.

COOLEY, S., MATHIS, J., YATES, K. & TURLEY, C. 2012. Frequently asked questions about ocean acidification. OCB;UKOA.

DE GROOT, P. A. 2004. *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques*, Amsterdam - Boston - Heidelberg - London - New York - Oxford.

DICKSON, A. G. 2015. Certificate of Analysis Reference material for oceanic CO<sub>2</sub> measurements.

DONEY, S. C., FABRY, V. J., FEELY, R. A. & KLEYPAS, J. A. 2009. Ocean Acidification: The Other CO<sub>2</sub> Problem. *The Annual Review of Marine Science* online at marine.

EISLER, R. 2012. *Oceanic acidification. A comprehensive overview*, British Isles, Jersey New Hampshire, Enfield.

## *Referencias Bibliográficas*

- FRANÇOIS HÉLIE, J. & HILLAIRES MARCEL, C. 2005. 14 Diffusive CO<sub>2</sub> Flux at the Air-Water Interface of the Robert-Bourassa Hydroelectric Reservoir in Northern Québec : Isotopic Approach (<sup>13</sup>C).
- FRANÇOIS HÉLIE, J. & MARCEL, C. H. 2006. Sources of particulate and dissolved organic carbon in the St Lawrence River: isotopic approach.
- FRANÇOIS HÉLIE, J. & MARCEL, C. H. 2007. Sources and fluxes of carbon in a large boreal hydroelectric reservoir of eastern Canada: an isotopic approach.
- FRY, B. 2006. *Stable Isotope Ecology*.
- GE, C., CHAI, Y., WANG, H. & KAN, M. 2017. Ocean acidification: One potential driver of phosphorus eutrophication. *Marine Pollution Bulletin*.
- GUERRERO, R. & BERLANGA, M. 2000. Isótopos estables: Fundamento y aplicaciones.
- HEMMING, N. G. & HONISCH, B. 2007. Boron Isotopes in Marine Carbonate Sediments and the pH of the Ocean.
- HENDRIKS, I. E. & DUARTE, C. M. 2010. Ocean acidification: Separating evidence from judgment e A reply to Dupont et al.
- HUMPHREYS, M. P., ACHTERBERG, E. P., GRIFFITHS, A. M., MCDONALD, A. & BOYCE, A. J. 2015. Measurements of the stable carbon isotope composition of dissolved inorganic carbon in the northeastern Atlantic and Nordic Seas during summer 2012.
- IAEA/UNESCO 2000. *Environmental isotopes in the hydrological cycle: Principles and Applications*.
- IGBP, COI & SCOR 2013. La acidificación del océano. Resumen para responsables de políticas. Tercer simposio “El océano en un mundo con altos niveles de CO<sub>2</sub>. Estocolmo (Suecia): Programa Internacional Geosfera – Biosfera.

- ISOPRIME 2009a. IsoPrime User Guide.
- ISOPRIME 2009b. Multiflow User Guide. *Isoprime Ltd.* Manchester, United Kindom.
- JEAN, G. S. 2002. Automated quantitative and isotopic ( $1^3\text{C}$ ) analysis of dissolved inorganic carbon and dissolved organic carbon in continuous-flow using a total organic carbon analyser.
- KERRISON, P., HALL SPENCER, J. M., SUGGETT, D., HEPBURN, L. J. & STEINKE, M. 2011. Assessment of pH variability at a coastal CO<sub>2</sub> vent for ocean acidification studies. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.
- LEFÉVRE, N., VELEDA, D., ARAUJO, M. & CANIAUX, G. 2016. Variability and trends of carbon parameters at a time series in the eastern tropical Atlantic.
- NELSON, S. T. 2000. A simple, practical methodology for routine VSMOW/SLAP normalization of water samples analyzed by continuous flow methods.
- NEWTON, J. A., FEELY, R. A., JEWETT, E. B. & WILLIAMSON, M. J. 2015. Global Ocean Acidification Observing Network: Requirements and Governance Plan. Second Edition ed.: GOA-ON, OCB-OA, OA-ICC, NOAA, WSG & EPOCA 2014. 20 hechos acerca de la acidificación de los océanos.
- OCEÁNICA, G. D. U. D. R. S. A. 2009. Una guía introductoria especial para asesores y gestores. Laffoley, D Baxter, J.M ed.: EPOCA.
- PELEJERO, C., CALVO, E. & GULDBERG, O. H. 2010. Paleo-perspectives on ocean acidification.
- PELEJERO, C. C., E.; FERNÁNDEZ-VALLEJO, P.; MOVILLA, J.; LÓPEZ SANZ, A.; & FERNÁNDEZ-GUALLART, E. H., B.; COMPANYS, B.; ÁLVAREZ, M. 2012. Determinación de la alcalinidad mediante valoración rápida a doble punto final.

## *Referencias Bibliográficas*

- PLANAUSKY, N., PARTIN, C. & BEKKER, A. 2014. Carbon Isotopes as a Geochemical Tracer.
- REDONDO ORTEGA, R. 2008. Fundamentos teóricos y técnicos de los isótopos estables.
- REYES, E. 2004. Geoquímica de Isótopos Estables: Fundamentos, Técnicas y Aplicaciones. *Geoquímica Isotópica Aplicada al Medioambiente, Seminarios de la Sociedad Española de Mineralogía.*
- RIES, J. B. 2011. A physicochemical framework for interpreting the biological calcification response to CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification.
- SEVERICHE SIERRA, C. A., CASTILLO BERTEL, M. E. & ACEVEDO BARRIOS, R. L. 2013. Manual de Métodos Analíticos para la Determinación de Parámetros Fisicoquímicos Básicos en Aguas.
- SHARP, Z. D. 2014. Stable Isotope Techniques for Gas Source Mass Spectrometry.
- SINGLETON, G. L., RÉVÉSZ, K. & COPLEN, T. B. 2012. *Determination of the  $\delta^{13}\text{C}$  of Dissolved Inorganic Carbon in Water.*
- WERNER, R. A. & BRAND, W. A. 2001. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis.

## ANEXOS

## Anexo 1. Resultados en bruto del análisis de los patrones

Tabla 5. Resultados en bruto del análisis de los patrones.

Réplicas	NC		AH		CB	
	Intensidad	$\delta^{13}\text{C}$ -CID	Intensidad	$\delta^{13}\text{C}$ -	Intensidad	$\delta^{13}\text{C}$ -
	masa 44 (nA)	(‰)	masa 44 (nA)	CID (‰)	masa 44 (nA)	CID (‰)
1	4,84	-4,66	4,78	-20,41	6,48	-14,74
2	5,71	-4,92	5,24	-20,45	5,89	-14,84
3	4,68	-4,87	5,31	-20,21	6,83	-14,73
4	6,56	-5,65	6,91	-20,13	6,41	-15,58
5	6,93	-5,67	7,00	-20,26	6,69	-15,49
6	6,61	-5,93	6,29	-20,41	6,24	-15,71
7	4,07	-7,36	5,86	-20,34	6,56	-15,72
8	6,34	-6,03	6,85	-20,18	6,18	-15,83

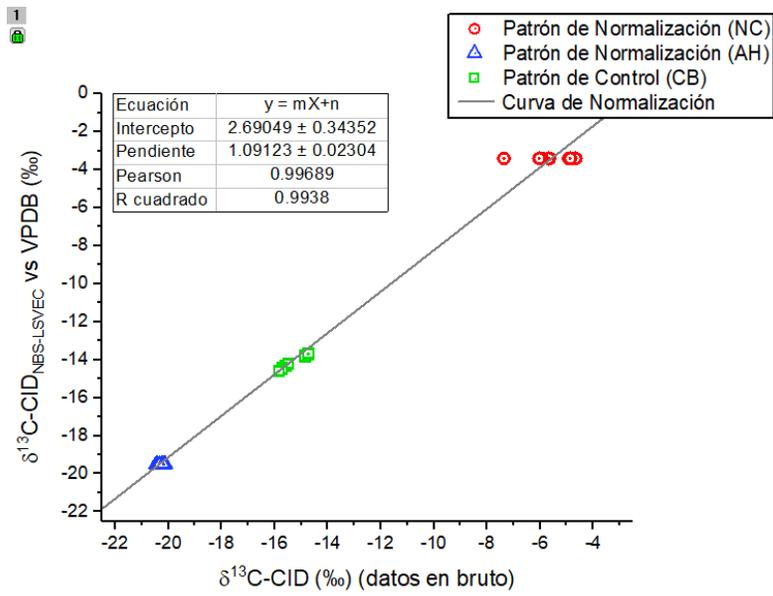


Figura 14. Normalización de los patrones internos (Prueba 2).

## Anexo 2. Resultados en bruto del análisis de la secuencia analítica

Tabla 6. Resultados en bruto de la Secuencia analítica.

Muestras	Intensidad masa 44 (nA)	$\delta^{13}\text{C-CID}$
MiliQ	0,12	-17,31
MiliQ	0,11	-14,47
NC	6,77	-4,80
NC	6,03	-4,96
CB	6,24	-14,93
CB	6,18	-15,02
AH	6,71	-20,06
AH	6,66	-20,16
Manantiales	8,77	-13,71
Manantiales	7,67	-13,77
Lób Sur	5,18	-2,18
Lób Sur	5,55	-2,24
Jucaral	5,34	-2,59
Jucaral	4,96	-2,60
P Gorda	5,42	-2,72
P, Gorda	5,45	-2,75
C, Jagua	5,16	-2,41

C Jagua	5,37	-2,44
NC	6,82	-4,82
NC	5,42	-5,20
CB	6,14	-15,04
CB	5,13	-15,16
AH	6,85	-20,22
AH	5,45	-20,45

---

Anexo 3. Resultados de  $\delta^{13}\text{C-CID}_{\text{NBS-LSVEC}}$  vs VPDB de muestras reales de agua de mar

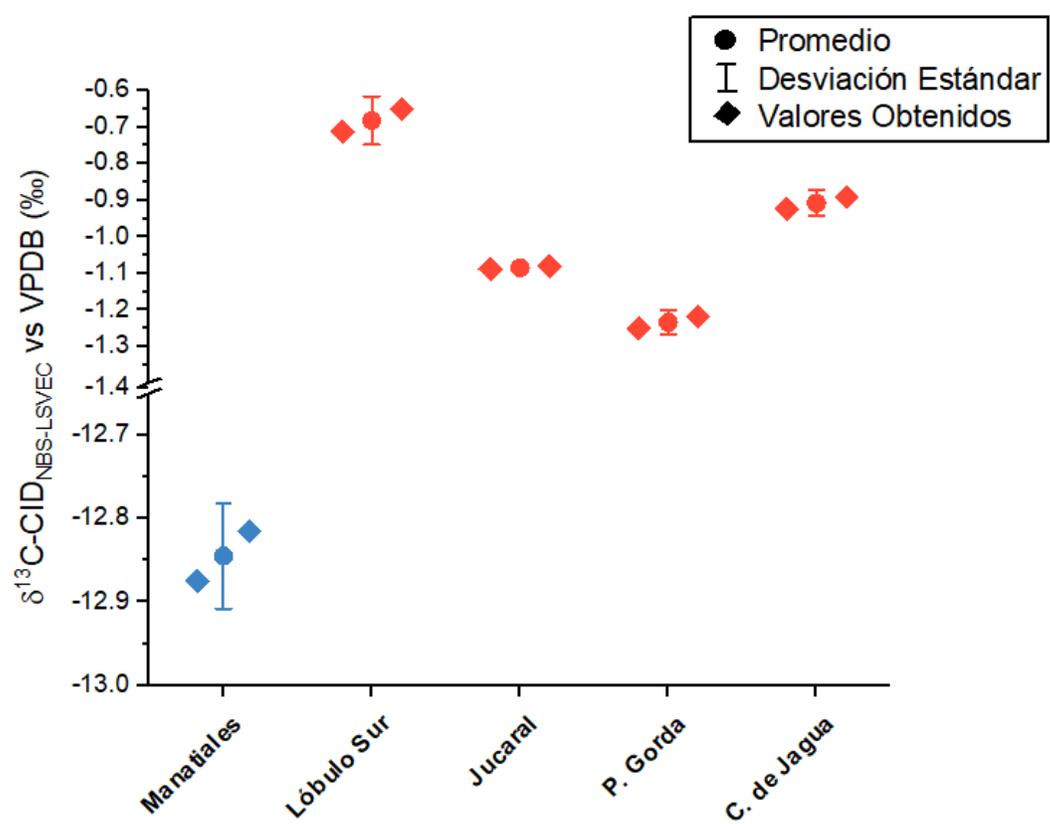


Figura 15. Distribución de valores de  $\delta^{13}\text{C-CID}$  en las muestras reales de agua de mar de la bahía de Cienfuegos (Prueba 3).