

Universidad Internacional Menéndez Pelayo



Centro Superior de Investigaciones Científicas



MÁSTER UNIVERSITARIO EN CAMBIO GLOBAL

Curso 2013-2014

Palma de Mallorca

Optimización metodológica para el análisis de biomarcadores moleculares en sedimentos marinos

Directora del Trabajo de Fin de Máster: Eva Calvo

Autor: Diego Vicente Matías

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Paleoclimatología y biomarcadores moleculares	3
2.2. Extracción de biomarcadores por ultrasonidos	3
2.3. Extracción de biomarcadores por microondas	5
2.4. Biomarcadores de interés	6
3. Material y métodos	9
3.1. Equipo de ultrasonidos SONOREX DIGITAL 10P	9
3.2. Equipo de microondas MARS6	9
3.3. Metodología de extracción de alquenonas	10
3.4. Cromatógrafo de gases con detector de llama de hidrógeno Agilent 7890A	13
4. Resultados	15
4.1. Análisis de biomarcadores	16
4.2. Efectos del tipo de extracción en la estimación de la SST	19
5. Conclusiones	20
6. Agradecimientos	20
7. Bibliografía	21

1. Resumen

La extracción por microondas y la extracción por ultrasonidos son dos técnicas de extracción de biomarcadores del sedimento marino. Estas dos técnicas se utilizarán en este trabajo para la obtención de tres grupos distintos de compuestos: *n*-alcanos, *n*-alcoholes y alquenonas; en este último grupo de compuestos será en el que nos centraremos, en concreto, las alquenonas de 37 átomos de carbono con dos y tres insaturaciones, de gran interés para la reconstrucción de paleotemperaturas. En el trabajo se experimentará con dos condiciones de extracción distintas, por un lado se utilizaran los ultrasonidos, y por el otro se utilizarán las microondas, en este caso se ha utilizado la temperatura de extracción de 100 °C. El objeto del presente trabajo será determinar si alguno de los dos métodos de extracción con los que se ha trabajado proporciona una mayor recuperación de los compuestos de interés y la influencia de las condiciones de extracción en la estimación de la temperatura superficial del agua del mar a través del índice U'_{37} .

2. Introducción

El sistema climático de la Tierra es muy complejo y cada uno de sus componentes (atmósfera, hidrosfera, biosfera, criosfera y litosfera) establece una serie de intrincadas interrelaciones con el resto de componentes (Fig. 1). Es por tanto un sistema caótico y profundamente no lineal y responde tanto a forzamientos externos como internos. Entre los forzamientos externos destacamos el forzamiento orbital, solar o las emisiones volcánicas, estos son denominados forzamientos externos puesto que todos estos elementos están fuera del sistema climático. Forzamientos internos son todos aquellos que cambian el estado del sistema climático actuando desde dentro del propio sistema (por ejemplo, factores antropogénicos, cambios en la composición de la atmósfera, etc.). Por lo tanto el conocimiento del sistema climático y de las diferentes interacciones entre todos los componentes del sistema es una tarea muy difícil en la cual están inmersas muchas disciplinas científicas: física, química, biología y geología principalmente. Conocer el funcionamiento de nuestro sistema climático es clave para poder hacer predicciones sobre el futuro.

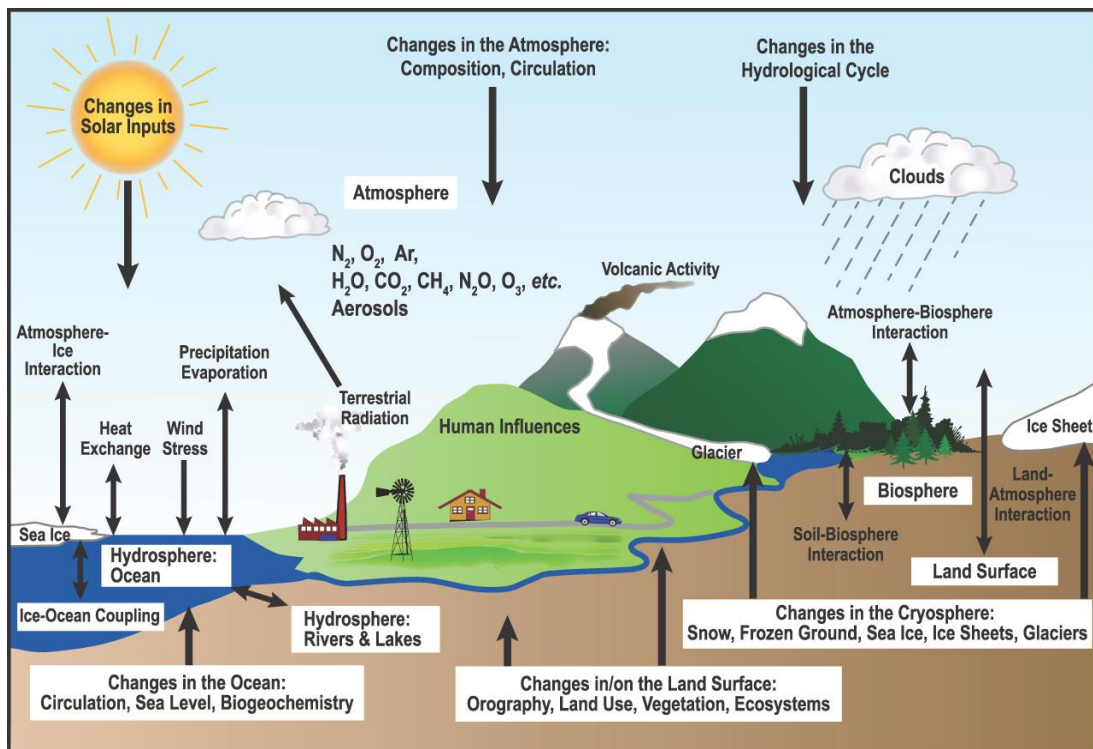


Figura 1. Representación esquemática de los componentes del sistema climático, y de los procesos e interacciones que tienen lugar en el mismo. (Le Treut et al., 2007)

2.1. Paleoclimatología y biomarcadores moleculares

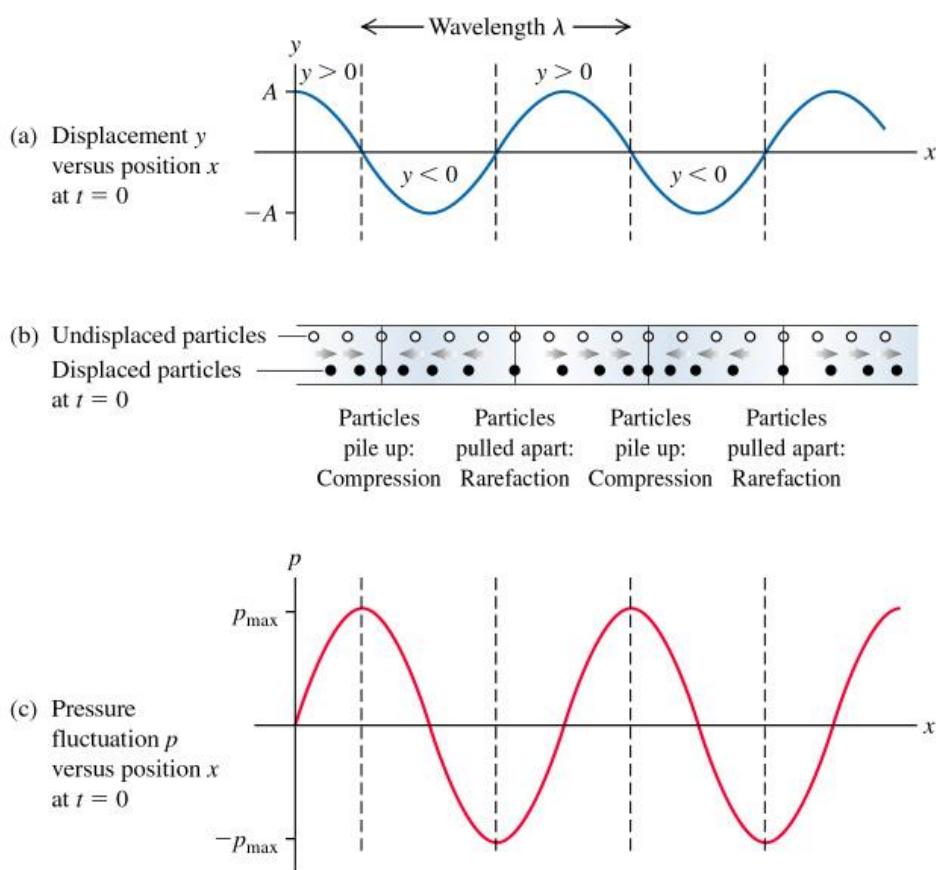
La paleoclimatología, consiste en la reconstrucción del clima pasado. Esto es esencial para el conocimiento del clima y para poder establecer cómo va a evolucionar en el futuro, ya que, la paleoclimatología ayuda a comprender, por ejemplo, ciertos procesos de realimentación entre elementos del sistema climático en escalas de tiempo que van desde centenares a miles de años; esto no se puede hacer con otro tipo de registros que solo nos informan de cambios en escalas de tiempo de decenas a centenares de años. Por ello son tan importantes los estudios paleoclimáticos, para poder hacer reconstrucciones climáticas que nos ayuden a entender cómo opera el clima de la Tierra. (Masson-Delmotte et al., 2013)

Uno de los métodos utilizados para la reconstrucción paleoclimática es el estudio de biomarcadores moleculares de los sedimentos marinos. Los biomarcadores son moléculas orgánicas sintetizadas por organismos, cuya síntesis depende a su vez de las condiciones ambientales en las que se desarrolla dicho organismo. Por lo tanto, si estos compuestos son capaces de sedimentar y de ser resistentes a procesos de degradación de la materia orgánica, pueden ser preservados en el sedimento. El estudio de estos compuestos, por tanto, nos revela información sobre las condiciones ambientales en el momento de formación de dichos compuestos. Son varios los tipos de moléculas que se pueden utilizar como biomarcadores, por ejemplo, *n*-alcanos, *n*-alcoholes o alquenonas. (Pelejero et al., 1997)

El estudio de estos biomarcadores implica la extracción de testigos sedimentarios, recolección de las muestras individuales, preparación y análisis de la muestra y finalmente tratar los datos obtenidos. El paso más crítico es la preparación de la muestra, aquí es donde se realiza la extracción del sedimento de las sustancias para su posterior análisis. La extracción de los compuestos se realiza a través de tres procesos consecutivos: desorción del compuesto de la superficie, difusión del mismo en la capa orgánica hacia el disolvente y finalmente la disolución en el disolvente. La capacidad extractiva puede verse limitada por uno o varios de estos procesos (Letellier and Budzinski, 1999). Los dos tipos de extracciones que se van a utilizar a lo largo de este trabajo son la extracción por ultrasonidos y la extracción por microondas.

2.2. Extracción de biomarcadores por ultrasonidos

La extracción por ultrasonidos es la que se utiliza normalmente en la preparación de muestras en estudios paleoclimáticos. La aplicación de los ultrasonidos facilita la disolución de los compuestos orgánicos presentes en el sedimento en el disolvente orgánico. Los ultrasonidos son ondas sonoras, por lo tanto ondas de presión, que tienen una frecuencia por encima de la máxima frecuencia audible por el oído humano (frecuencia superior a 18-20 kHz). Este tipo de ondas son ondas mecánicas, por lo que solo se pueden propagar en medios materiales, no en el vacío. Las variaciones de presión asociadas a la perturbación producida por la onda hacen que en el medio en el que se están propagando se produzcan zonas en las que las partículas del medio se juntan más (aumenta la presión) y zonas en las que se separan más (descenso de presión), esto es, se produce en el medio compresión y rarefacción (Sears et al., 2004).



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Addison Wesley.

Figura 2. Al igual que el sonido, los ultrasonidos son ondas de presión y sufren fenómenos de compresión y rarefacción. (Sears et al., 2004)

Debido a que las ondas utilizadas tienen una alta frecuencia de vibración, cuando estas se propagan en un líquido (por ejemplo, el disolvente orgánico) causan el fenómeno de cavitación (Fig. 3), esto es, aparecen pequeñas burbujas de gas en el interior del líquido producto de la acción mecánica de la onda que ayuda a debilitar las fuerzas atractivas en las moléculas del líquido, la formación de estas pequeñas burbujas gaseosas ocurre en la fase de rarefacción cuando la presión disminuye en el líquido, estas burbujas crecen hasta que alcanzan un tamaño en el que la inestabilidad de la propia burbuja hace que esta colapse violentamente (<http://www.organicchemistry.org/topics/sonochemistry.shtm>).

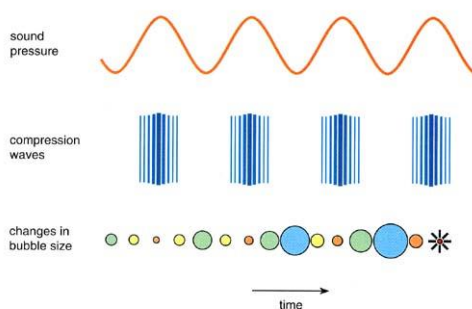


Figura 3. Formación y colapso de burbuja de gas formada por cavitación. (<http://www.scs.illinois.edu/suslick/sonochembrittanica.html>)

En el fenómeno de cavitación se produce un incremento muy local de temperatura (las temperaturas pueden llegar a ser del orden de 10^3 °C), lo cual favorece la solubilidad del sedimento en el disolvente en el entorno donde colapsa la burbuja, favoreciendo la extracción de los compuestos orgánicos del sedimento. Las ondas de ultrasonidos pueden aplicarse a través de un baño de agua en el que se colocan las muestras para realizar la extracción o pueden aplicarse a través de una sonda que se introduce directamente en la muestra. En el presente trabajo se utilizará el baño de ultrasonidos para la extracción.

2.3. Extracción de biomarcadores por microondas

La extracción por microondas se basa en la aplicación de microondas. Las microondas son un tipo de onda electromagnética (Fig. 4), cuyos campos eléctricos y magnéticos son perpendiculares entre sí y también a la dirección en la que se propaga la onda. Este tipo de ondas, al contrario que ocurriría con los ultrasonidos, no necesitan de un medio material para su propagación, pueden también transmitirse a través del vacío. Las microondas son ondas de longitud de onda larga y baja frecuencia (300 MHz – 300 GHz).

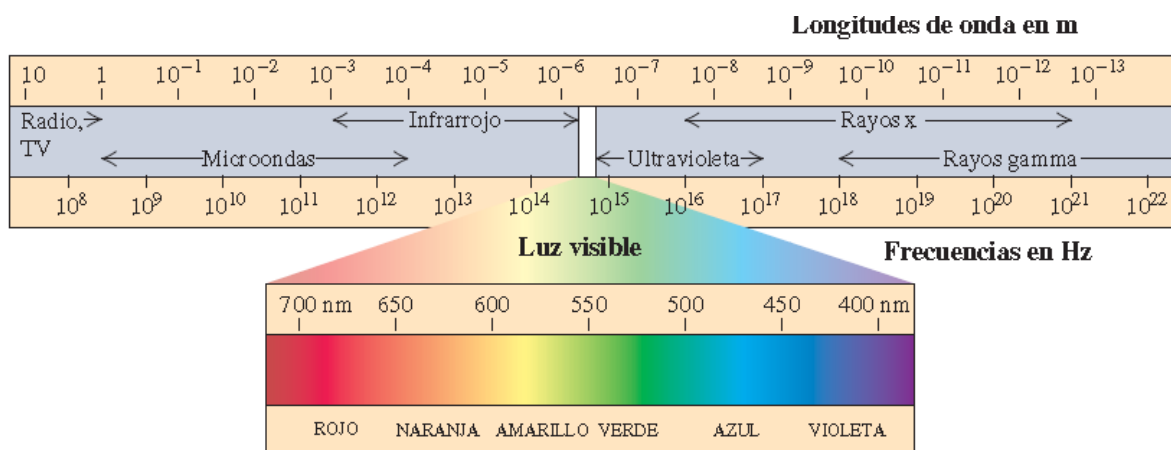


Figura 4. Representación del espectro electromagnético (Sears et al., 2004).

El efecto de las microondas es el de calentar el medio en el que se propagan a través de la transmisión de la energía electromagnética a las partículas que tienen carga eléctrica en el medio, esto hace que estas moléculas sean capaces de oscilar con el campo electromagnético de la onda y a causa de este movimiento de agitación desorganizado se transmite en forma de calor al medio. Los dos mecanismos básicos en los que se produce esta transferencia de calor al medio a través de la energía electromagnética de las microondas son: la conducción iónica (los iones disueltos colisionan con el resto de moléculas al moverse gracias al cambio de dirección debido a la variación del campo electromagnético) y la rotación de los dipolos (debido al movimiento de las moléculas polares al intentar alinearse con el campo eléctrico de la onda). La principal ventaja del calentamiento a través de las microondas es que el calentamiento se produce a la vez en todo el volumen, el calentamiento y la temperatura del medio, por tanto, es homogéneo (Letellier and Budzinski, 1999).

2.4. Biomarcadores de interés

El análisis de distintos biomarcadores nos proporciona diferente tipo de información. En el análisis de sedimentos marinos profundos se encuentran, entre otros, *n*-alcanos y *n*-alcoholes de cadena larga de origen terrestre cuyas fuentes son ceras epicuticulares de plantas superiores, los cuales nos pueden dar información de paleoaridez, intensidad de viento y escorrentía. También encontramos alquenonas de cadena larga que será el principal grupo de compuestos en los que nos centraremos a lo largo de este trabajo (Calvo et al., 2003). Se trata de cetonas de cadena lineal larga que tienen entre 37 y 39 átomos de carbono y presentan 2, 3 o 4 insaturaciones (enlaces dobles)(Marlowe et al., 1984). Las alquenonas son sintetizadas por algas Haptofitas, en particular el alga cocolitoforal *Emiliana huxleyi* (Fig. 5) que se encuentran prácticamente en todos los océanos y son las principales productoras de alquenonas en mar abierto. (Volkman et al., 1980).



Figura 5. Alga cocolitoforal *Emiliana huxleyi* (<http://www.ifg.uni-kiel.de/595.html>).

Las alquenonas han sido de gran utilidad en paleoceanografía ya que nos permiten reconstruir la temperatura superficial del agua del mar en el pasado. Esto es así, porque la síntesis de estos compuestos, en concreto el grado de insaturación de estas alquenonas está determinado por la temperatura del agua donde crecen estas algas (Brassell et al., 1986; Prah and Wakeham, 1987). Esto permite el índice de insaturación de las alquenonas de 37 átomos (C_{37}) de carbono:

$$U_{37}^K = \frac{[C_{37:2}] - [C_{37:4}]}{[C_{37:2}] + [C_{37:3}] + [C_{37:4}]}$$

Dónde: $C_{37:2}$ es la alquenona con dos dobles enlaces (heptatriaconta-(15E,22E)-dien-2-ona), $C_{37:3}$ es la alquenona con tres dobles enlaces (heptatriaconta-(8E,15E,22E)-trien-2-ona), y $C_{37:4}$ es la alquenona con cuatro dobles enlaces (heptatriaconta-(8E,15E,22E,29E)-tetraen-2-ona) (Fig. 6).



C_{37:2} Alkenone: Heptatriaconta-15E, 22E-dien-2-one



C_{37:3} Alkenone: Heptatriaconta-8E, 15E, 22E-trien-2-one



C_{37:4} Alkenone: Heptatriaconta-8E, 15E, 22E, 29E-tetraen-2-one

Figura 6. Notación abreviada de las alquenonas de 37 átomos de carbono.
(<http://www.ifg.uni-kiel.de/595.html>)

Dado que las alquenonas tetrainsaturadas son muy poco abundantes en los sedimentos marinos, se hace una simplificación del índice inicial:

$$U_{37}^{K'} = \frac{[C_{37:2}]}{[C_{37:2}] + [C_{37:3}]}$$

Este es el índice que utilizaremos durante el trabajo, el cual presenta una relación lineal con la temperatura (SST), tal y como se ha observado a partir de cultivos (Prahl and Wakeham, 1987; Volkman et al., 1995) y en una calibración global a partir del análisis de sedimentos superficiales marinos de todos los océanos (Müller et al., 1998) (Fig. 7):

$$U_{37}^{K'} = 0,033 \cdot \text{SST}(\text{°C}) + 0,044$$

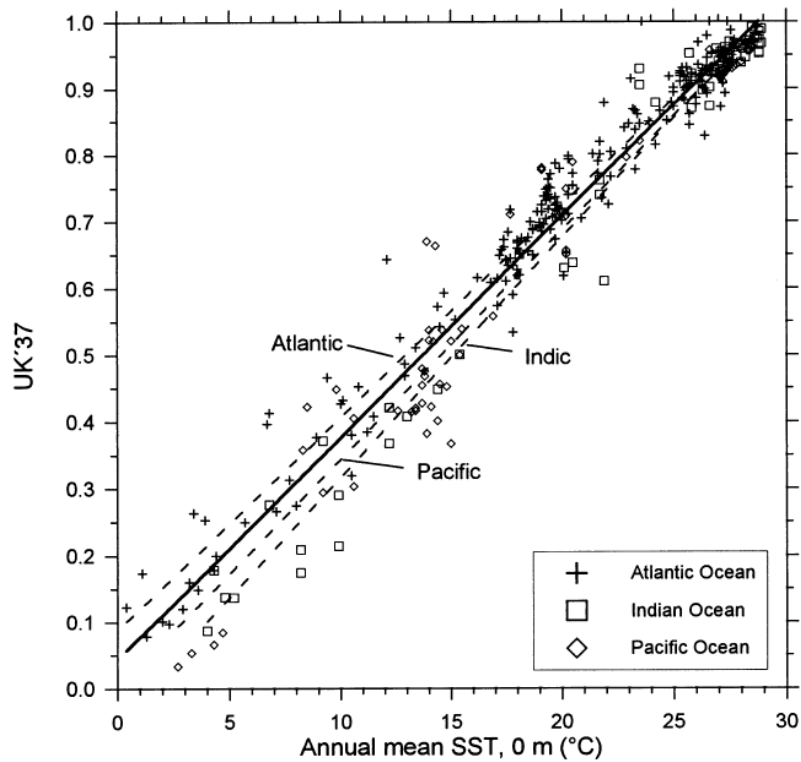


Fig. 7. Relationships between $U_{37}^{K'}$ and annual mean SST (0 m) for surface sediments from the global ocean between 60°S and 60°N . The $U_{37}^{K'}$ data were compiled from the literature (for references see Table 1) and the present study (Appendix) and the temperature data are from Levitus and Boyer (1994) and the COADS archive. The regression parameters for the three oceans (dashed lines) and the global ocean (thick solid line) are given in Table 1. The obtained global core-top calibration ($U_{37}^{K'} = 0.033 \text{ SST} + 0.044$) is absolutely identical to the *E. huxleyi* equation of Prahl and Wakeham (1987) ($U_{37}^{K'} = 0.033 T + 0.043$) confirming its general applicability.

Figura 7. Müller et al. (1998): Relación entre $U_{37}^{K'}$ y SST que confirma la aplicabilidad del índice $U_{37}^{K'}$ en gran parte de los océanos el planeta

Por lo tanto, el objeto de este trabajo será el estudio de la eficiencia de recuperación de alquenonas de los dos métodos de extracción introducidos: ultrasonidos y microondas, y el efecto de estos sistemas de extracción en las estimas de SST.

3. Material y métodos

3.1. Equipo de ultrasonidos SONOREX DIGITAL 10P

El dispositivo utilizado para realizar la extracción consiste en un baño de ultrasonidos (Fig. 8). Las ondas de ultrasonidos ayudan a la extracción gracias al fenómeno de la cavitación. La frecuencia de las ondas de ultrasonidos proporcionada por el sistema es de 35 KHz. La cantidad de sedimento seco utilizado en el caso de la extracción por ultrasonidos variaba entre 2-3 gr.



Figura 8. Dispositivo de ultrasonidos SONOREX DIGITAL 10P y tubos de vidrio utilizados en la extracción.

3.2. Equipo de microondas MARS6

El dispositivo que se usa para este fin es el MARS 6 (Fig. 9). Este sistema utiliza energía de microondas para calentar las muestras durante la extracción. La frecuencia de las microondas proporcionadas por este sistema es de 2450 Mhz. Gracias al calentamiento rápido y homogéneo, provoca una rápida disolución de los compuestos orgánicos en el disolvente orgánico. La cantidad de sedimento seco utilizada en este caso varía entre 2-4 gr.

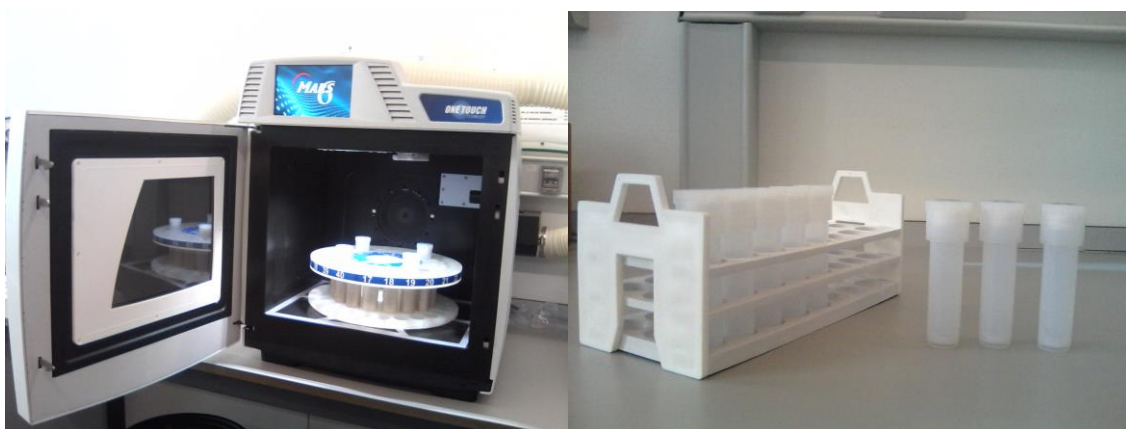


Figura 9. Dispositivo de microondas MARS 6 y tubos de teflón utilizados en la extracción.

3.3. Metodología de extracción de alquenonas

En esta sección se describen y detallan los dos métodos analíticos utilizados para la extracción de las alquenonas: ultrasonidos y microondas. El análisis y cuantificación de los biomarcadores de interés se realiza según los pasos detallados a continuación.

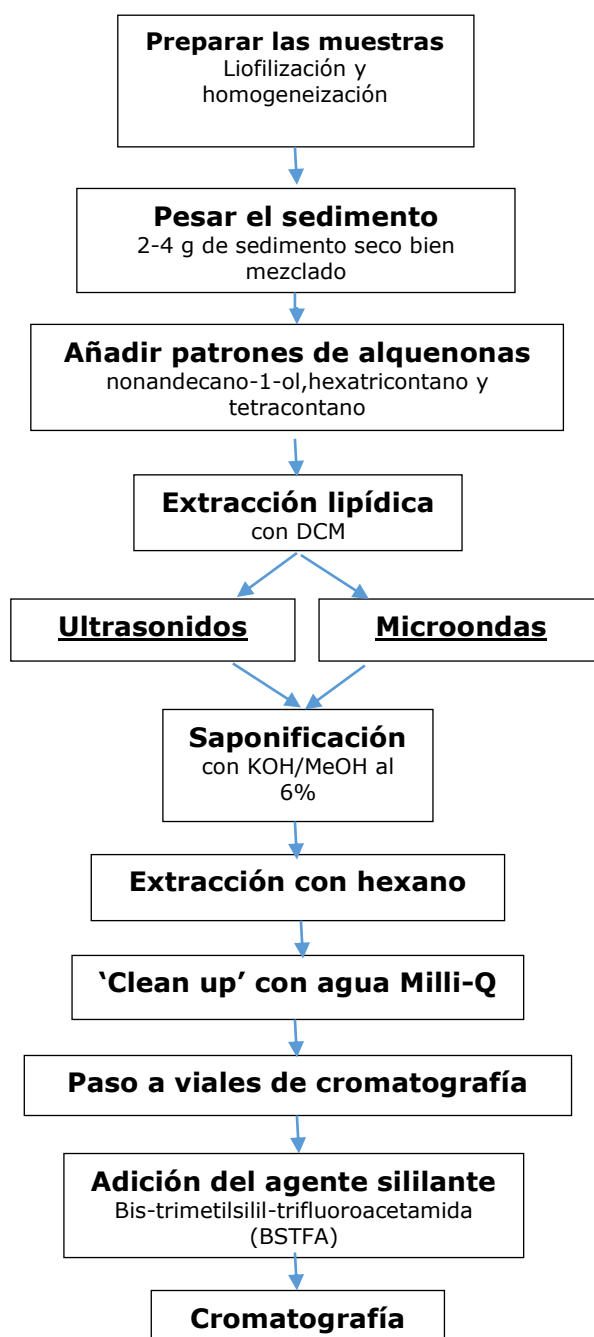


Fig. 10. Esquema del método seguido para la extracción de biomarcadores.

1) Preparación de las muestras

Liofilización del sedimento: Este paso se realiza para secar el sedimento correctamente, eliminando la humedad que este posea.

Homogeneización del sedimento: Con este paso se consigue que el sedimento quede perfectamente mezclado.

Pesada del sedimento: La cantidad de sedimento seco utilizado en este experimento varía de 2 a 4 gramos, dicha cantidad se coloca en un tubo de vidrio limpio (Fig. 8) (en el caso de la extracción por ultrasonidos) o en un tubo de teflón (Fig. 9) (en la extracción por microondas).

Adición de patrones internos: Una vez realizado el paso anterior, se añade a cada muestra un volumen conocido de los patrones: 1-nonadecano ($C_{19}OH$), hexatricontano (C_{36}) y tetracontano (C_{40}), en este caso se añaden 50 μ l. Estos patrones se utilizan para cuantificar nuestros compuestos de interés (alquenonas, n -alcanos y n -alcoholes), corrigiendo cualquier posible pérdida parcial de la muestra durante los procesos de extracción y purificación.

2) Extracción lipídica

Se han utilizado dos métodos de extracción, para poder comparar el rendimiento de recuperación de las alquenonas de cada uno.

- a. Extracción con ultrasonidos: Se añaden unos 10 ml de diclorometano (DCM) en cada tubo de vidrio, se coloca el tapón y se agita en el vórtex durante 1-2 minutos. A continuación, las muestras se extraen en un baño de ultrasonidos (Fig. 8) durante 20 minutos. A continuación, volvemos a agitar las muestras en el vórtex, centrifugamos durante 3 minutos a 4000 rpm y finalmente decantamos el líquido de extracción en un tubo limpio. Este paso de extracción de la muestra se realiza 3 veces. Para terminar, recogemos todas las fracciones y las evaporamos hasta sequedad bajo una corriente suave de N_2 .
- b. Extracción con microondas: Se añaden unos 15ml de DCM a cada tubo de teflón. En cada uno de los tubos se introduce una mosca magnética que facilita la interacción entre el sedimento y el disolvente. Antes de la extracción en el equipo de microondas los tubos se agitan en el vórtex durante 30 segundos. Se introducen en el equipo de microondas (Fig. 9) y se selecciona la potencia y la temperatura deseadas. En este experimento la potencia se fijó en 700 W para todos los experimentos y se seleccionó la temperatura de extracción a 100°C.; además se fijó una rampa de calentamiento hasta la temperatura de extracción de 7 minutos, tras los cuales se mantiene la temperatura de extracción constante durante 5 minutos más. Después de la extracción los tubos se dejan enfriar durante unos 20 minutos. Finalmente, cada tubo se vuelve a agitar en el vórtex durante 30 segundos y el extracto es recogido en un tubo de vidrio y evaporado hasta sequedad bajo un flujo suave de N_2 .

A partir de aquí, el protocolo de extracción es el mismo para todas las muestras.

3) Saponificación

Una vez las muestras se han evaporado se añaden 1-2 ml de KOH/MeOH (potasa metanólica) al 6%. Este paso permite purificar la muestra y eliminar compuestos no deseados como ésteres o ácidos de cadena larga. Se dejan las muestras tapadas toda la noche a temperatura ambiente.

4) Extracción con hexano

En este paso se recuperan de la fase metanólica los compuestos más apolares. En primer lugar, los tubos se abren después de estar toda la noche con la potasa metanólica. Después se añaden unos 10 ml de hexano a cada tubo. Se introducen durante 3 minutos en el baño de ultrasonidos; antes y después de este baño, se han agitado en el vórtex durante 1 minuto. Ahora ya se puede extraer la fase hexánica con una pipeta y colocarla en un nuevo tubo. Este proceso hay que realizarlo dos veces más, pero ya no hay que introducir las muestras en el baño de ultrasonidos. Al final de las 3 extracciones con hexano, las muestras se evaporan con N₂ hasta medio tubo.

5) 'Clean-up' con agua Milli-Q

En este paso se retira cualquier traza de potasa metanólica que haya podido quedar en la fase hexánica. Se añade media pipeta pasteur de agua Milli-Q a cada tubo. Luego, cada tubo se agita brevemente en el vórtex y finalmente se recupera la fase hexánica, teniendo cuidado de no capturar agua. Los tubos con la fase hexánica se evaporan hasta sequedad bajo corriente de N₂.

6) Transferencia a los viales de cromatografía de gases (GC)

Se recuperan las muestras de cada tubo añadiendo un pequeño volumen de DCM, que se transfieren al vial de cromatografía de gases (Fig. 14). Este paso se realiza 3 veces.

7) Sililación de las muestras

Antes de inyectar las muestras en el cromatógrafo de gases, se realiza la derivatización de la muestra. Para ello, los viales se evaporan a sequedad y se añaden 20 µl de bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) que es el agente sililante utilizado para evitar que compuestos polares, como los alcoholes, se adsorban a las paredes de la columna del cromatógrafo; y 80 µl de DCM. Al terminar, cada vial se tapa y se deja a temperatura ambiente durante toda la noche para dejar actuar al agente sililante.

8) Inyección por Cromatografía de Gases con detector de llama de H₂

Se elimina el sililante evaporando a sequedad la muestra y redisolviendo en 50 µl de tolueno. Finalmente, los viales con cada muestra están listos para analizar en el cromatógrafo. Hasta que llegue el momento de inyectar la muestra en el cromatógrafo (Fig. 11), los viales se cierran y se guardan en el frigorífico.

3.4. Cromatógrafo de gases con detector de llama de hidrógeno Agilent 7890A

Una vez realizada la extracción en el sedimento, la muestra ha de ser analizada en un cromatógrafo de gases para conocer los compuestos que se han extraído previamente.

Esta técnica consiste en la volatilización de la muestra en la cabeza de una columna capilar y posterior separación de los diferentes compuestos. La muestra es transportada a través de la columna mediante un flujo de un gas inerte, en nuestro caso H_2 . La separación se realiza a través de un mecanismo de adsorción con la fase estacionaria de la columna, la cual se encuentra en un horno termostaticado. Los componentes una vez separados llegan al sistema de detección de ionización de llama que recoge los iones generadores y mide la corriente eléctrica. El resultado obtenido es un cromatograma en el que se muestra la señal eléctrica correspondiente a cada compuesto y que es proporcional a la cantidad de compuesto presente en la muestra.

En el cromatograma se van identificando los distintos compuestos que vienen determinado por un aumento de la señal que se obtiene en el cromatograma. El objetivo, será, una vez identificado cada compuesto, obtener la concentración del mismo en el sedimento a través de la comparación del área del pico de cada compuesto con el área del patrón interno, del cual si sabemos cuál es la cantidad que hemos introducido en cada muestra. Cada compuesto se puede identificar gracias al diferente tiempo de retención que tiene cada compuesto (esto es, el tiempo que tarda en salir de la columna del cromatógrafo cada compuesto es diferente puesto que cada sustancia tiene un peso molecular distinto).

El cromatógrafo utilizado en nuestro caso es un cromatógrafo de gases con detector de llama de H_2 Agilent GC 7890A (Fig. 11). La cromatografía nos permite la detección y cuantificación de los compuestos previamente extraídos de la muestra de sedimento. Por lo tanto, una vez que termina el proceso de extracción y el contenido está recogido en los viales de cromatografía, se procede a la inyección de los viales en el cromatógrafo para el análisis.

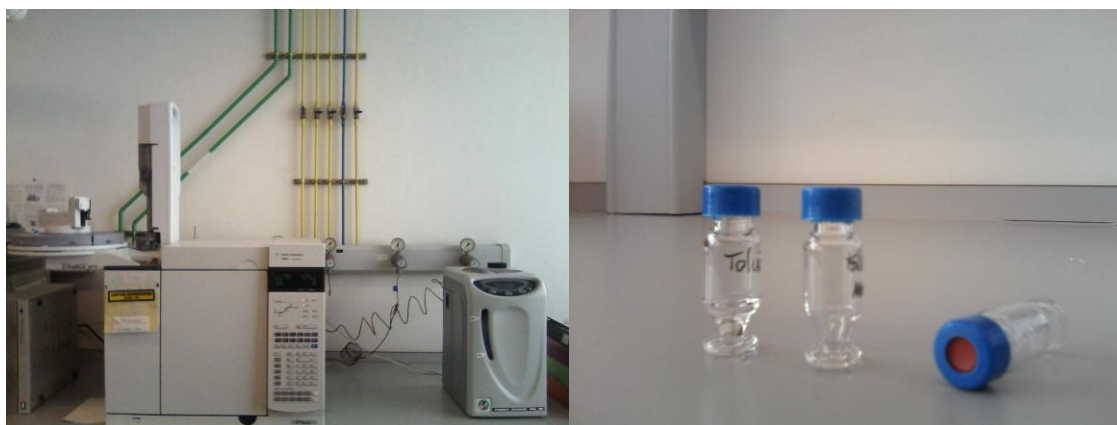


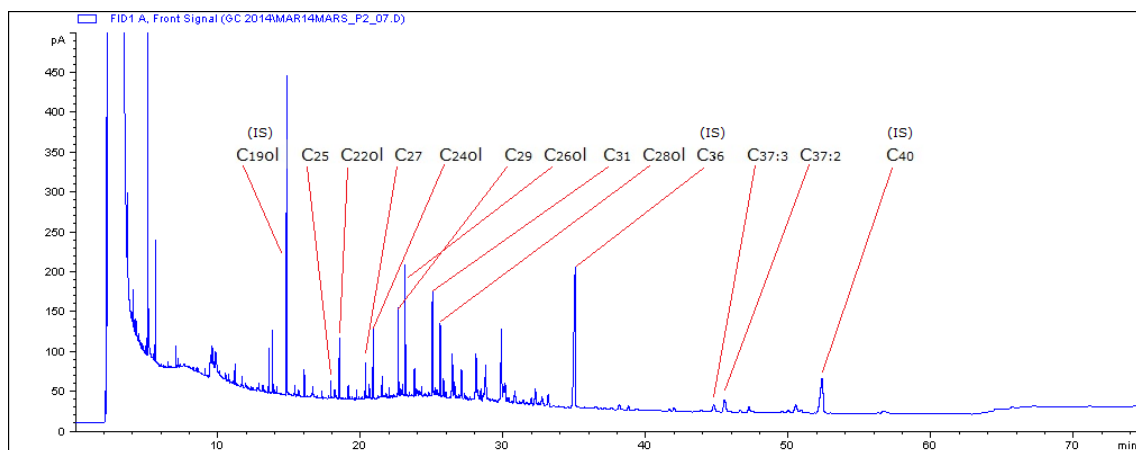
Figura 11. Dispositivo de Cromatografía Agilent 7890A y viales de cromatografía.

En el cromatógrafo se colocan los viales siguiendo una secuencia que se ha programado previamente. Por lo general estas secuencias comienzan con un vial en el que se introduce tolueno únicamente, esto se realiza para limpiar las columnas del cromatógrafo previamente a la introducción de las muestras. A continuación, se colocan los viales con las muestras; dependiendo de la cantidad de muestras que se vayan a analizar, será conveniente introducir otro vial con tolueno (en nuestro

caso, aproximadamente cada 4 o 5 muestras analizadas se introducía el vial de tolueno). El análisis de cada muestra dura unos 70 minutos.

En el cromatograma (Fig. 12) se van separando los distintos compuestos, indicado por un aumento de la señal eléctrica. El objetivo, será, una vez identificado cada compuesto, obtener la concentración del mismo en el sedimento a través de la comparación del área bajo el pico de cada compuesto con el área del compuesto patrón interno (IS), del cual si sabemos la cantidad que hemos introducido en cada muestra.

A)



B)

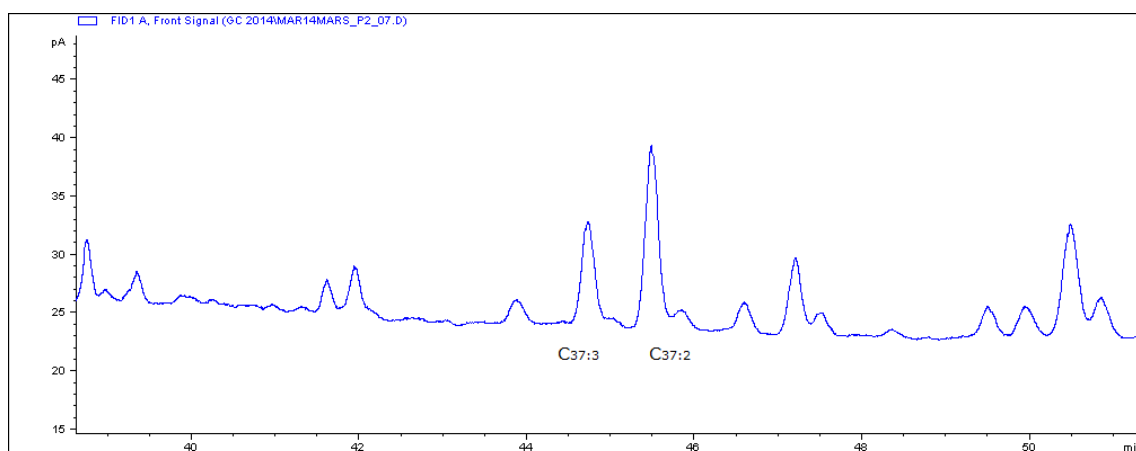


Figura 12. A) Cromatograma de la extracción con microondas de los *n*-alcanos, *n*-alcoholes y alquenonas (C_{37:2} y C_{37:3}) identificados; B) Ampliación de la zona donde eluyen las alquenonas (C_{37:2} y C_{37:3})

4. Resultados

Para comparar la eficiencia de los dos métodos de extracción en la recuperación de diferentes biomarcadores se han realizado diferentes pruebas. Hemos diseñado 4 pruebas distintas realizadas en Marzo de 2014. En cada prueba se extraen varias réplicas del mismo sedimento marino. El protocolo de extracción seguido para cada método de extracción es el que se ha detallado en la sección anterior. A continuación se muestra una tabla en la cual se detallan las características experimentales:

Tabla 1. Pruebas y métodos de extracción utilizados.

Prueba	Método de extracción	Replicas utilizadas en cada prueba
Prueba 1 (3 Marzo) (P1)	Microondas $T_{\text{extracción}}=100^{\circ}\text{C}$	8
Prueba 2 (5 Marzo) (P2)	Microondas $T_{\text{extracción}}=100^{\circ}\text{C}$	8
Prueba 3 (10 Marzo) (P3)	Microondas $T_{\text{extracción}}=100^{\circ}\text{C}$	8
	Ultrasonidos	4
Prueba 4 (17 Marzo) (P4)	Microondas $T_{\text{extracción}}=100^{\circ}\text{C}$	8
	Ultrasonidos	6

En cada una de estas pruebas se realiza uno o varios tipos de extracciones de los compuestos de interés del sedimento a analizar. Finalizada la extracción y purificación de la muestra, ésta es analizada por cromatografía de gases, obteniendo así las concentraciones de los compuestos de interés preservados en el sedimento (a través de la comparación de las áreas de cada compuesto con el área del patrón, que en nuestro caso ha sido C_{36} (Fig. 12)). Con este diseño experimental podremos comparar la eficacia de extracción del sistema microondas con el sistema tradicional de ultrasonidos. Como ya hemos comentado, una vez la muestra ha sido extraída, los pasos siguientes son comunes a todas las muestras, con lo que la única característica que influye en la concentración recuperada de dichos compuestos es la eficiencia del método de extracción.

Fundamentalmente prestaremos más atención al análisis de las alquenonas, ya que queremos observar si el método de extracción utilizado influye en la posterior determinación de parámetros de interés ambiental, en particular la temperatura superficial del agua del mar (SST, por sus siglas en inglés). También, evaluaremos la recuperación de *n*-alcanos y *n*-alcoholes de número impar y par de átomos de carbono, respectivamente

En estudios previos se han estudiado diversos factores clave que pueden influir en la eficiencia de extracción, tales como, temperatura (en la extracción por microondas), volumen de disolvente y tiempo de extracción. En la mayor parte se observa que la temperatura es un factor clave en la eficiencia de recuperación del analito, aumenta la solubilidad del analito (Kornilova and Rosell-Melé, 2003; Lopez-Avila et al., 1995, Chee et al., 1996; Llompарт et al., 1997). Kornilova and Rosell-Melé (2003) concluyen que la temperatura (en la extracción por microondas) es un factor determinante en la eficiencia de extracción de los biomarcadores. Por otra parte, en cuanto a la utilización del índice $U^{K'}_{37}$ como un indicador de paelotemperaturas fiable y robusto, tanto en Kornilova and Rosell-Melé (2003) como en Calvo et al. (2003) se observa que este índice es independiente del

método de extracción utilizado, por lo tanto la cantidad relativa de alquenonas C_{37:2} y C_{37:3} no se ve afectada por el método de extracción. Finalmente, también se han estudiado las ventajas de la extracción por microondas respecto a los métodos convencionales, estas son: mayor recuperación de analito, menor tiempo de extracción y menor cantidad utilizada de disolvente (Kornilova and Rosell-Melé, 2003; Pastor et al., 1997; Blanco et al., 2000; Jayaraman et al., 2001).

4.1. Análisis de biomarcadores

A continuación se muestran en una tabla los resultados de los biomarcadores extraídos y la SST en cada prueba y los resultados finales para cada tipo de extracción:

Tabla 2. Valores de concentración de *n*-alcanos, *n*-alcoholes y alquenonas y la estimación de SST correspondientes a cada condición de extracción acompañados de la desviación estándar asociada. Al final se incluye la media de los dos tipos de experimentos: Microondas y Ultrasonidos

	Concentración de <i>n</i>-alcanos (ng/g)	Concentración de <i>n</i>-alcoholes (ng/g)
Microondas P1	416 ± 18	492 ± 12
Microondas P2	432 ± 13	540 ± 9
Microondas P3	353 ± 6	559 ± 6
Microondas P4	322 ± 3	512 ± 16
Ultrasonidos P3	242 ± 8	472 ± 17
Ultrasonidos P4	228 ± 6	412 ± 10

Microondas	381 ± 52	526 ± 30
Ultrasonidos	235 ± 10	442 ± 42

	Concentración de Alquenonas (ng/g)	SST (°C)
Microondas P1	70 ± 2	18.96 ± 0.06
Microondas P2	104 ± 2	18.21 ± 0.04
Microondas P3	113 ± 3	18.10 ± 0.04
Microondas P4	95 ± 2	17.97 ± 0.02
Ultrasonidos P3	108 ± 8	18.47 ± 0.01
Ultrasonidos P4	94 ± 18	17.98 ± 0.16

Microondas	96 ± 18	18.31 ± 0.44
Ultrasonidos	101 ± 10	18.22 ± 0.35

En primer lugar, en la siguiente grafica se muestran los resultados de las extracciones por microondas realizadas en el mes de Marzo en el ICM utilizando el nuevo equipo de extracción por microondas MARS 6:

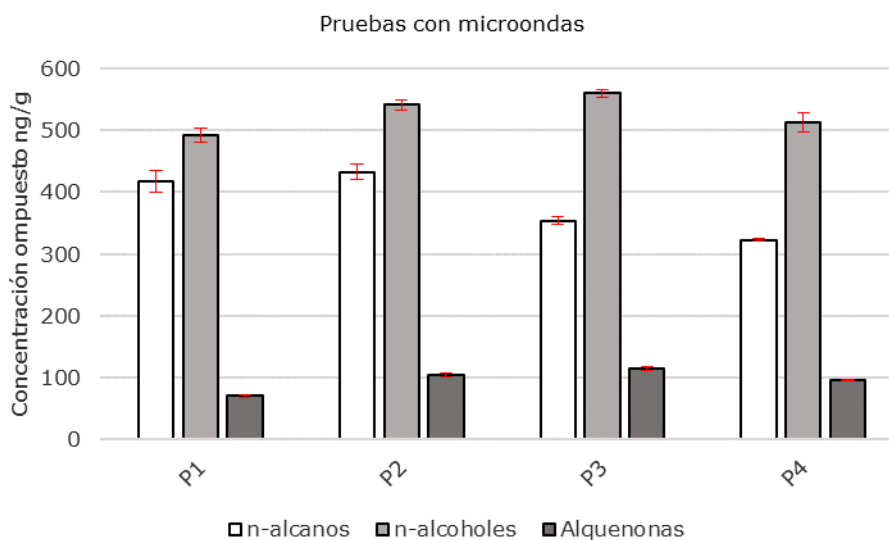


Figura 13. Concentración de *n*-alcános, *n*-alcoholes y alquenonas obtenidas en las distintas pruebas de extracción por microondas a 100 °C. Se ha representado la desviación estandar asociada a cada prueba. *n*-alcános: suma de alcános con número impar de átomos de carbono, *n*-alcoholes: suma de alcoholes con número par de átomos de carbono, Alquenonas: suma de las alquenonas diinsaturada y triinsaturada.

En todas las pruebas realizadas con microondas a 100 °C se utilizaron el mismo número de réplicas (Tabla 1). Como podemos apreciar en las Fig. 13, las diferentes pruebas de extracción por microondas muestran cantidades recuperadas de los biomarcadores ligeramente diferentes. Esta diferencia se debe a la propia variabilidad del equipo puesto que las pruebas se realizaron en días distintos, además se aprecia que la incertidumbre asociada a cada prueba va disminuyendo en cada experimento a lo largo del tiempo (es menor en P3 y P4 (no para los alcoholes) que en P1 y P2). Como es de esperar, la variabilidad en un mismo día de las réplicas analizadas es menor que la variabilidad entre pruebas realizadas en distintos días.

A continuación analizaremos los resultados de las pruebas con ultrasonidos:

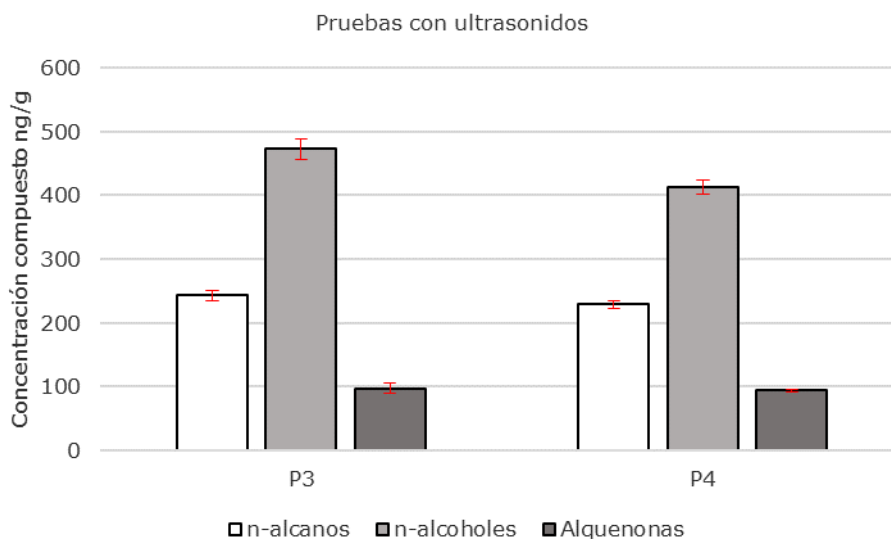


Figura 14. Concentración de *n*-alcános, *n*-alcoholes y alquenonas extraída en las distintas pruebas de extracción por ultrasonidos. Se ha representado la desviación estandar asociada a cada prueba.

En las pruebas realizadas utilizando la extracción por ultrasonidos se ha utilizado distinto número de réplicas (4 réplicas en P3 y 6 réplicas en P4) (Tabla 1).

A la vista de la Fig. 14 podemos decir que la diferencia que se aprecia entre las distintas pruebas esta reflejando la variabilidad propia del equipo, además del número de réplicas utilizadas en cada prueba. Las incertidumbres asociadas son muy bajas en todas las pruebas, pero se aprecia que son algo menores en la prueba en la que se utilizaron mas réplicas (Tabla 2). En la extracción por ultrasonidos tambien se aprecia que las cantidades recuperadas de los biomarcadores son muy parecidas.

Si prestamos atención a los distintos biomarcadores analizados comparándolos entre los dos tipos de extracción vemos que: para los *n*-alcános y los *n*-alcoholes las concentraciones recuperadas en la extracción por microondas son más elevadas, por el contrario para las alquenonas se ve que la recuperación con ambos metodos es prácticamente similar, no hay mucha diferencia (Fig. 13 y Fig. 14).

En general, las incertidumbres asociadas a las extracciones realizadas por microondas son menores que las asociadas a las extracciones realizadas por ultrasonidos; por lo tanto la extracción por microondas reduce la variabilidad interna dentro de una misma prueba, aunque a lo largo del tiempo es menos consistente.

4.2. Efectos del tipo de extracción en la estimación de la SST

A partir de los resultados obtenidos de las concentraciones de las alquenonas diinsaturada y triinsaturada, vamos a evaluar el índice de instauración de alquenonas que nos permite estimar la SST. De este modo podremos ver si el método de extracción utilizado tiene alguna influencia en la determinación de este parámetro.

Para obtener esta estimación de la SST, vamos a calcular previamente el índice modificado de instauración $U^{K_{37}}$. Este índice establece la relación entre la cantidad de los dos tipos de alquenonas analizados, y tendrá un valor mayor cuanto mayor sea la concentración obtenida de la alquenona diinsaturada.

Una vez calculado el índice de instauración, realizaremos la estimación de la SST para cada muestra analizada. Se utilizará la siguiente calibración entre $U^{K_{37}}$ y la SST: $U^{K_{37}} = 0,033 \times SST (^{\circ}C) + 0,044$. Esta es la calibración más general aplicable a los testigos obtenidos en todos los océanos (Fig. 7) (Müller et al., 1998).

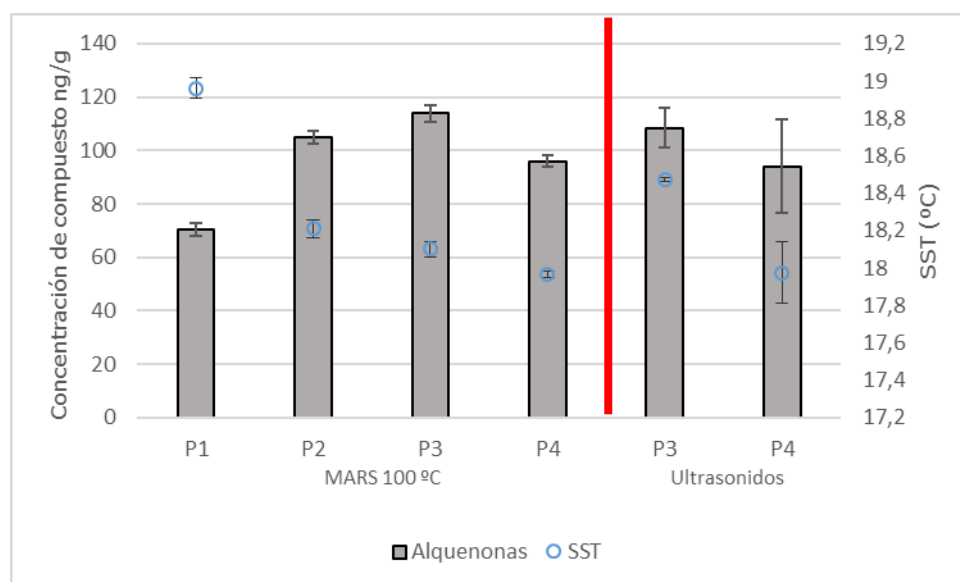


Figura 15. Concentración de alquenonas y estimación de SST en todas las condiciones de extracción analizadas. Se ha representado la desviación estándar de cada variable asociada a tipo de extracción.

En primer lugar, podemos observar a partir de la Fig. 15 si nos fijamos en los experimentos realizados con microondas a 100 °C, que la SST y la concentración de alquenonas extraída en cada experimento parecen tener una relación inversa (excepto P4), esto es, cuanto mayor es la concentración de alquenonas extraída menor es la SST estimada a través del índice $U^{K_{37}}$; por el contrario, para el caso de los ultrasonidos ocurre que una menor concentración de alquenona extraída se corresponde con un dato de SST mayor. Por lo tanto, no hay una relación entre la cantidad de alquenonas extraída y la SST, como era esperable.

Por otro lado, en la Fig. 15 las incertidumbres asociadas a las estimaciones de SST son bastante pequeñas en la mayoría de las extracciones, excepto en la extracción por ultrasonidos realizada en la P4.

En la Tabla 2 podemos ver (al igual que en la Fig. 15) que los valores de SST son ligeramente distintos en cada prueba para los dos métodos de extracción, pero esta diferencia no es muy grande. Por lo tanto los resultados obtenidos en esta tanda de 4 experimentos son muy coherentes.

Las estimaciones de SST realizadas individualmente tienen incertidumbres muy bajas (en ningún caso se llega a sobrepasar los ± 0.16 °C).

Comparando los resultados de los dos tipos de extracción para la SST vemos que los valores obtenidos son prácticamente iguales (difieren en menos de una décima de grado centígrado), por lo que, teniendo en cuenta que la incertidumbre asociada a la SST en esta calibración es de ± 1.5 °C (o ± 0.050 en $U^{K'_{37}}$) (Müller et al., 1998) se concluye que la estimación proporcionada es bastante buena y el método de extracción utilizado no afecta a la SST.

En escalas de cientos a miles de años la temperatura de la superficie del mar, puede variar entre 1 y varios grados centígrados, por lo tanto, a la vista de los resultados y teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a la calibración utilizada, podemos concluir que los dos tipos de extracción analizados proporcionan estimaciones adecuadas para la correcta determinación de la SST.

5. Conclusiones

A lo largo de este trabajo hemos utilizado dos métodos de extracción de biomarcadores del sedimento marino que son la extracción por ultrasonidos y la extracción por microondas a 100 °C. Comparando los 2 tipos de extracción realizados podemos decir que para los *n*-alcanos y los *n*-alcoholes la recuperación utilizando microondas en la extracción es mayor que la recuperación utilizando ultrasonidos; y que para las alquenonas no hay un tipo de extracción que mejore significativamente la recuperación de alquenonas en los sedimentos marinos.

El índice de instauración $U^{K'_{37}}$ es muy robusto, puesto que éste se basa en las concentraciones relativas de las alquenonas diinsaturada y triinsaturada, y hemos visto que los valores obtenidos con los dos métodos de extracción son similares. Además la incertidumbre asociadas a los valores del índice son muy pequeños, esto es deseable para poder obtener una buena estimación de la SST.

La SST estimada utilizando las concentraciones de las alquenonas extraídas por los dos métodos es bastante similar, lo que nos indica que la SST no sufre alteración por utilizar uno u otro de estos dos métodos de extracción.

Finalmente, hemos comprobado en este trabajo que la extracción por microondas es un método muy bueno para la extracción de los biomarcadores analizados, especialmente para *n*-alcanos y *n*-alcoholes, donde ha mostrado recuperar mayor cantidad de compuesto, para las alquenonas no muestra una mejora significativa respecto al método más usado que son los ultrasonidos. Además, hemos comprobado la eficacia de ambos sistemas de extracción a la hora de estimar la SST, puesto que ambos métodos nos dan una SST prácticamente igual y dentro del margen de incertidumbre. La extracción por microondas ha demostrado ser un método de extracción que utiliza menos disolvente, mejora la recuperación de algunos biomarcadores y es más rápido que la extracción por ultrasonidos.

6. Agradecimientos

A todas las personas que han hecho posible la realización y finalización de este trabajo con su esfuerzo y dedicación.

7. Bibliografía

- Blanco, E. V., Mahía, P. L., Lorenzo, S. M., Rodríguez, D. P., & Fernández, E. F. (2000). Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 366(3), 283-288.
- Brassell, S. C., Eglinton, G., Marlowe, I. T., Pflaumann, U., & Sarnthein, M. (1986). Molecular stratigraphy: a new tool for climatic assessment. *Nature*, 320(6058), 129-133.
- Calvo, E., Pelejero, C., & Logan, G. A. (2003). Pressurized liquid extraction of selected molecular biomarkers in deep sea sediments used as proxies in paleoceanography. *Journal of Chromatography A*, 989(2), 197-205.
- Chee, K. K., Wong, M. K., & Lee, H. K. (1996). Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 723(2), 259-271.
- Jayaraman, S., Pruell, R. J., & McKinney, R. (2001). Extraction of organic contaminants from marine sediments and tissues using microwave energy. *Chemosphere*, 44(2), 181-191.
- Kornilova, O., & Rosell-Melé, A. (2003). Application of microwave-assisted extraction to the analysis of biomarker climate proxies in marine sediments. *Organic Geochemistry*, 34(11), 1517-1523.
- Letellier, M., & Budzinski, H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), 259-271.
- Le Treut, H., R. Somerville, U. Cubasch, Y. Ding, C. Mauritzen, A. Mokssit, T. Peterson and M. Prather (2007): Historical Overview of Climate Change. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Llompart, M. A. P., Lorenzo, R. A., Cela, R., Li, K., Bélanger, J. M., & Pare, J. R. (1997). Evaluation of supercritical fluid extraction, microwave-assisted extraction and sonication in the determination of some phenolic compounds from various soil matrices. *Journal of Chromatography A*, 774(1-2), 243-251.
- Lopez-Avila, V., Young, R., Kim, R., & Beckert, W. F. (1995). Accelerated extraction of organic pollutants using microwave energy. *Journal of chromatographic science*, 33(9), 481-484.
- Marlowe, I.T., Green, J.C., Neal, A.C., Brassell, S.C., Eglinton, G. and Course, P.A. (1984). Long-chain (n-C37-C39) alkenones in the Prymnesiophyceae. Distribution of alkenones and other lipids and their taxonomic significance. *British Phycological Journal* 19, 203-216.

Masson-Delmotte, V., M. Schulz, A. Abe-Ouchi, J. Beer, A. Ganopolski, J.F. González Rouco, E. Jansen, K. Lambeck, J. Luterbacher, T. Naish, T. Osborn, B. Otto-Bliesner, T. Quinn, R. Ramesh, M. Rojas, X. Shao and A. Timmermann (2013): Information from Paleoclimate Archives. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Müller, P. J., Kirst, G., Ruhland, G., von Storch, I., & Rosell-Melé, A. (1998). Calibration of the alkenone paleotemperature index $U^{K'_{37}}$ based on core-tops from the eastern South Atlantic and the global ocean (60° N-60° S). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62(10), 1757-1772.

Pastor, A., Vázquez, E., Ciscar, R., & De la Guardia, M. (1997). Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments. *Analytica Chimica Acta*, 344(3), 241-249.

Pelejero, C., Grimalt, J. O., & Cacho, I. (1997). Aplicaciones de los biomarcadores moleculares en estudios paleoclimáticos: las alquenonas y el índice Uk37. *Thalassas: An international journal of marine sciences*, 13(1), 49-58.

Prahl, F. G., & Wakeham, S. G. (1987). Calibration of unsaturation patterns in long-chain ketone compositions for palaeotemperature assessment. *Nature* 330, 367-369.

Sears, Z., Young & Freedman (2004). Física Universitaria. Volumen II. Ed. *Pearson Education*.

Volkman, J. K., Eglinton, G., Corner, E. D., & Forsberg, T. E. V. (1980). Long-chain alkenes and alkenones in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Phytochemistry*, 19(12), 2619-2622.

<http://www.organicchemistry.org/topics/sonochemistry.shtm>

<http://www.scs.illinois.edu/suslick/sonochembrittanica.html>

<http://www.ifg.uni-kiel.de/595.html>