



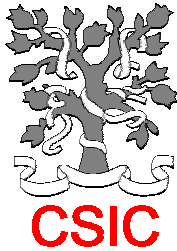
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  
DE FORMAS DE MATERIA ORGÁNICA REFRACTARIA  
EN SEDIMENTOS MARINOS.  
IMPLICACIONES AMBIENTALES**



**TESIS DOCTORAL  
JOSÉ MARÍA DE LA ROSA ARRANZ  
SEVILLA, 2007**





**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE  
 FORMAS DE MATERIA ORGÁNICA  
 REFRACTARIA EN SEDIMENTOS MARINOS.  
 IMPLICACIONES AMBIENTALES**

Memoria presentada por **José María de  
 la Rosa Arranz** para optar al título de  
 Doctor en Química

Sevilla a 22 de Junio de 2007



# **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FORMAS DE MATERIA ORGÁNICA REFRACTARIA EN SEDIMENTOS MARINOS. IMPLICACIONES AMBIENTALES**

Visado en Sevilla, a 22 de Junio de 2007

## **LOS DIRECTORES**

Dr. D. **Francisco Javier González Vila**  
Investigador Científico del C.S.I.C.

Dr. D. **José Antonio González Pérez**  
Científico Titular del C.S.I.C.

## **EL TUTOR**

Dr. D. **José Fuentes Mota**  
Catedrático del departamento  
de Química Orgánica de la  
Universidad de Sevilla

Memoria que presenta  
D. **José María de la Rosa Arranz**  
para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Químicas



EL DOCTOR D. LUÍS CLEMENTE SALAS, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FORMAS DE MATERIA ORGÁNICA REFRACTARIA EN SEDIMENTOS MARINOS. IMPLICACIONES AMBIENTALES", presentada por D. JOSÉ MARÍA DE LA ROSA ARRANZ para optar al grado de Doctor en QUÍMICA, ha sido realizada en el Departamento de BIOQUÍMICA Y GEODINÁMICA, bajo la dirección de los Drs. D. FRANCISCO JAVIER GONZÁLEZ VILA Y D. JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ PÉREZ, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a 22 de Junio de 2007





El presente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto marco del proyecto titulado "Distribución y composición molecular del *Black Carbon* y otras formas de materia orgánica refractaria en sedimentos del litoral Suratlántico. Implicaciones en el secuestro de carbono y el cambio global" (REN 2002-04602-C02) del Plan Nacional de I+D (CYCIT), dentro del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI).



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera dedicar las primeras líneas a expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a que pudiera llevar a cabo este trabajo. Sin su colaboración profesional o apoyo personal no hubiera sido posible.

En primer lugar quiero agradecer a los doctores D. Francisco Javier González Vila y D. José Antonio González Pérez, directores de esta Tesis, por su apoyo, su continua y acertada orientación, marcando las líneas a seguir durante la investigación, estimulando al mismo tiempo mi iniciativa propia, y por brindarme su amistad.

Al Profesor. Dr. D. José Fuentes Mota, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla, por su gentileza al aceptar la tutoría de la presente Tesis Doctoral, y al Profesor Dr. D. Manuel Gómez Guillén, director del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla, por su inestimable ayuda a lo largo del proceso burocrático de presentación de la Tesis.

A los participantes del Proyecto BACH BC (REN 2002-04602-C01-C02) y en especial al Dr. José Ramón de Andrés Alonso (IGME) por su apoyo y por facilitar las muestras utilizadas en esta Tesis.

A la Dra. Heike Knicker profesora de la Universidad Técnica de Munich (TUM), Alemania, por su ayuda en la obtención de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear durante mi estancia en la TUM en el verano del año 2004, y sobre todo por sus acertados consejos y su colaboración desinteresada.

Al Prof. Dr. David A. C. Manning y a la Dra. Elisa López Capel de la School of Civil Engineering and Geosciences de la Universidad de Newcastle, Reino Unido, por su colaboración en la realización de los análisis Termogravimétricos. Desde que tuve la oportunidad de conocerlos durante mi estancia en Newcastle, han mostrado un constante interés en mi trabajo que se ha visto plasmado en diversos proyectos conjuntos y publicaciones científicas.

Al Prof. Dr. Patrick G. Hatcher, director del Departamento de Química Molecular de la Universidad de Columbus (Ohio-USA), por poner a mi disposición todos los medios técnicos y humanos disponibles en su departamento, especialmente por su ayuda en la interpretación de los resultados de RMN de alta resolución y por su asesoramiento durante mi estancia en la Universidad Estatal de Ohio.

A la Dra. Cornelia Rumpel del Centro de Investigación Agraria (INRA) de Versailles-Grignon, Francia, por facilitarme la posibilidad de realizar análisis isotópicos y elementales durante mi estancia en el INRA.

A Trinidad Verdejo Robles, tanto por su profesionalidad y colaboración en la obtención de los resultados de pirólisis analítica de las muestras, como por su calidad humana.

A todos mis compañeros del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), por su amabilidad, su comprensión y su simpatía, muy especialmente quería agradecer a mis compañeros de “despacho” por sus consejos y porque, a pesar del trabajo duro, hemos pasado juntos muchos momentos gratificantes.

A todos mis amigos ajenos al mundo de la investigación, por no olvidarse nunca de mí, a pesar del poco tiempo que les he dedicado últimamente, por enseñarme desde siempre el significado de la palabra amistad y ayudarme a desconectar del laboratorio para disfrutar de otras muchas cosas. A Elisa por ofrecerme siempre su apoyo y comprensión, por encontrar siempre una palabra de aliento y cariño, y por los momentos inolvidables que hemos vivido juntos.

A mi familia se lo debo todo, en ellos he tenido el apoyo continuo e imprescindible para poder llevar a cabo este trabajo. A mis hermanos Araceli y Juan Manuel por estar ahí siempre que necesité su ayuda.

Finalmente quiero destacar de forma especial a mis padres por su comprensión, por su esfuerzo y sacrificio para darme lo mejor durante toda mi vida, por animarme a no tener miedo y a afrontar los retos por difíciles que pudieran parecer, por su cariño incondicional y por tener la certeza de que siempre podré contar con ellos.



*A mis padres...*





## **ABSTRACT**

This work reports a comprehensive characterization study of refractory organic matter forms including the so called Black Carbon (BC) in reference materials and recent marine sediments from the Gulf of Cadiz (South West Iberian Peninsula), by using elemental analysis and spectroscopic and chromatographic techniques. Marine sediment samples were collected in the Southwest Atlantic coast of Spain, a site of geological and environmental interest. A two step procedure, consisting in a chemical oxidation with sodium chlorite of the demineralised sediments followed by integration of the aromatic C region in the remaining residues by solid-state  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, was used to estimate the refractory organic matter (ROM), including BC, in marine sediments of the area under study. Measured contents of BC-like material ranged between 3.0 and 45.7 % of total organic carbon. Higher relative BC contents were found in riverine sediments close to urban areas, showing an input of anthropogenic organic material. The BC-like material content in the offshore marine sediments (5.5-6.1 %) were well in the range to values previously reported for this kind of samples. However, NMR and pyrolysis-GC/MS of the isolated ROM reveals that abundant refractory aliphatic organic material remains in most of the marine

samples after chlorite oxidation. We suggest that this pool of aliphatic carbon may play an important role as a stable carbon pool within the global C cycle. This work also includes a new methodology for BC quantification by using thermogravimetric techniques, which was successfully applied in most of the reference samples.

<b><u>ÍNDICE</u></b>	<b>Pág.</b>
<b><u>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1 EL CAMBIO CLIMÁTICO GLOBAL</b>	<b>3</b>
1.1.1 El efecto invernadero	
1.1.2 Consecuencias ambientales del calentamiento global	
1.1.3 Ciclo del carbono	
<b>1.2 EL SECUESTRO DE CARBONO</b>	<b>9</b>
<b>1.3 FORMAS DE MATERIA ORGÁNICA REFRACTARIA. EL PARADIGMA “BLACK CARBON”</b>	<b>11</b>
1.3.1 Problemas asociados al aislamiento y caracterización de formas de Black Carbon (BC)	
<b>1.4 REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE BC</b>	<b>19</b>
<b><u>CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO</u></b>	<b>27</b>
<b><u>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>33</b>
<b>3.1 DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES ESTUDIADOS</b>	<b>35</b>
3.1.1 Muestras de referencia de Black Carbon	
3.1.2 Sedimentos marinos. Área de estudio	
<b>3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS</b>	<b>45</b>
<b>3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>47</b>
3.3.1 Análisis físico-químicos de las muestras. Determinaciones de carbono orgánico total (TOC), carbono inorgánico total (TIC), materia orgánica oxidable nitrógeno total (TN) y azufre (TS). Medida de isótopos $\delta^{13}\text{C}$ en muestras brutas	
3.3.2 Caracterización estructural	
3.3.2.1 Termogravimetría (TG), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) acoplada a la Espectrometría de relación isotópica de $^{13}\text{C}$ , ( $\delta^{13}\text{C}$ IRMS)	
3.3.2.2 Espectroscopía Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ en estado sólido (CPMAS $^{13}\text{C}$ NMR)	
3.3.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución de $^1\text{H}$ con giro de ángulo mágico (HR-MAS $^1\text{H}$ NMR) TOCSY ( <i>T</i> OTal <i>C</i> ORRELATION <i>S</i> PECTROSCOPY)	
3.3.2.4 Pirólisis flash-cromatografía de gases/espectrometría de masas (Py-GC/MS) y termoquimiólisis (TMAH-Py-GC/MS)	
3.3.3 Aislamiento de formas de materia orgánica refractaria en sedimentos marinos	
<i>i) Aislamiento de MOR mediante extracción secuencial</i>	
<i>ii) Aislamiento de BC mediante degradación oxidativa con Clorito de Sodio y cuantificación de BC mediante el uso de RMN <math>^{13}\text{C}</math></i>	
3.3.4 Análisis estructural de muestras aisladas	

<b><u>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	<b>61</b>
<b>4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA</b>	<b>63</b>
4.1.1 Análisis elemental e isotópico	
4.1.2 Análisis mediante Pirólisis-Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (Py-GC/MS)	
4.1.3 Análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C en estado sólido (CP MAS <sup>13</sup> C NMR)	
4.1.4 Análisis Termogravimétrico (TG-DSC)	
<b>4.2 CONTENIDO EN BLACK CARBON DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA</b>	<b>96</b>
4.2.1 Comparación del Contenido en BC medido mediante otras metodologías de oxidación	
<b>4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SEDIMENTOS BRUTOS</b>	<b>105</b>
4.3.1 Análisis elemental y características globales	
4.3.2 Análisis Termogravimétrico e Isotópico (TG-DSC y TG-IRMS)	
4.3.3 Caracterización estructural de los sedimentos	
i) <i>Pirólisis-Cromatografía de Gases/Espectrometría de masas (Py-GC/MS)</i>	
ii) <i>Resonancia Magnética Nuclear (CP MAS <sup>13</sup>C NMR)</i>	
<b>4.4 CARACTERIZACIÓN DE FORMAS DE MATERIA ORGÁNICA REFRACTARIA AISLADAS DE LOS SEDIMENTOS</b>	<b>133</b>
4.4.1 Análisis Elemental	
4.4.2 Análisis Termogravimétrico (TG-DSC)	
4.4.3 Pirólisis Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (Py-GC/MS) en formas de materia orgánica refractaria	
4.4.4 Resonancia Magnética Nuclear <sup>13</sup> C NMR en MOR	
4.4.5 Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución de <sup>1</sup> H con giro de ángulo mágico (HR-MAS <sup>1</sup> H NMR) TOCSY ( <i>Total Correlation Spectroscopy</i> )	
<b>4.5 CONTENIDO EN BLACK CARBON EN SEDIMENTOS MARINOS</b>	<b>147</b>
4.5.1 Cuantificación de BC mediante oxidación con Clorito de Sodio, <sup>13</sup> C NMR y Py-GC/MS en presencia de sales de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH)	
<b><u>CAPITULO 5. CONCLUSIONES</u></b>	<b>163</b>
<b><u>CAPITULO 6. BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>169</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS UTILIZADOS

BC:	“Black Carbon”
°C:	Grado centígrado
C:	Carbono
CO:	Carbono orgánico
CP-MAS:	Polarización cruzada-rotación de ángulo mágico (“cross polarization- magic angle spinning”)
DSC:	Calorimetría Diferencial de Barrido (“Differential Scanning Calorimetry”)
eV:	Electrón voltio
FT-IR:	Espectroscopía de infrarrojo mediante la transformada de Fourier (“Fourier transformed infrared spectroscopy”)
GC:	Cromatografía de gases (“gas-chromatography”)
GC-MS:	Cromatografía de gases-espectrometría de masas (“gas-chromatography-mass spectrometry”)
IRMS:	Espectrometría de relaciones Isotópicas (“Isotopes Ratio mass spectroscopy”)
Kg:	Kilogramo
KHz:	Kilohercio
M:	Concentración molar
MHz:	Megahercio
MO:	Materia orgánica
MOS:	Materia orgánica sedimentaria
MOR:	Materia orgánica refractaria
MS:	Espectrometría de masas (“mass spectrometry”)
ms:	Milisegundo
N:	Concentración normal
NIST:	National Institute of Standards and Technology
NMR:	Resonancia Magnética Nuclear (“nuclear magnetic resonance”)
pG	Petogramo ( $1 \times 10^{12}$ Kilogramos)
Py:	Pirólisis (“pyrolysis”)
Py/GC-MS:	Pirólisis-cromatografía de gases- espectrometría de masas (“Pyrolysis-gas-chromatography-mass spectrometry”)
r.p.m.:	Revoluciones por minuto
SH:	Sustancias Húmicas
S:	Azufre
TIC:	Cromatograma del ión total (“Total Ion Chromatogram”)
TMAH:	Hidróxido de tetrametil amonio (“Tetramethyl amonium hydroxide”)
TOCSY	Espectroscopía de RMN de Correlación Total $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (“TOtal Correlation SpectroscopY”)
TOC:	Carbono Orgánico Total (“Total Organic Carbon”)
TN:	Nitrógeno Total (“Total Nitrogen”)
TS:	Azufre Total (“Total Sulfur”)
TG:	Temogravimetría (“Thermogravimetric”)
$\mu\text{V}$ :	Microvoltio



## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**





## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 EL CAMBIO CLIMÁTICO GLOBAL**

Con la emisión de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y otros gases, las sociedades industriales vienen modificando la composición química de la atmósfera desde hace más de un siglo. Desde finales de los años 50 del pasado siglo, la sociedad ha ido tomando conciencia de los riesgos asociados a este fenómeno y de sus probables consecuencias desastrosas para la vida sobre este planeta. A pesar de ello, las sucesivas reuniones del comité mundial de expertos del panel para el cambio climático (IPCC) realizadas en Villach (Austria, 1985), Kyoto (1997), Buenos Aires (1998), Bonn (1999) o París (2007) no han conseguido que se adopten acciones globales concretas para enfrentar el problema. Al contrario, actualmente y en la mayoría de los casos, los países pobres con ingresos per cápita anuales de menos de 200 US\$ son los más afectados por el cambio climático a pesar de emitir sólo el 3,2 % de la emisión global de gases de efecto invernadero, frente al 75 % emitido por los países del grupo G7, con un ingreso per cápita anual de 20000 US\$ (Informe de Naciones Unidas, 1999).

Recientemente han aparecido iniciativas importantes para alertar sobre la gravedad de este problema, como el informe “Stern Review on the Economics of Climate Change” (2006) encargado por el Ministerio del Tesoro Británico a Nicholas Stern, en el que se hace especial hincapié sobre las consecuencias económicas y humanitarias del cambio climático. A nivel nacional es de destacar el Plan Nacional de adaptación al cambio climático que fue aprobado por el Consejo de Ministros el 6 de Octubre de 2006, y que ha sido realizado con el consenso y colaboración de los organismos públicos estatales, comunidades autónomas, gobiernos municipales, interlocutores

sociales y ONGs, lo que puede darnos una idea del elevado grado de concienciación que el problema genera también en España.

### **1.1.1 El efecto invernadero**

Parte de los gases presentes en baja concentración en la atmósfera no son sensibles a la iluminación por radiación de onda corta proveniente del Sol, sino que absorben energía en longitudes de onda larga o infrarroja proveniente del sistema terrestre. Esta absorción de radiación de onda larga, se traduce en un aumento de la temperatura en las capas bajas de la atmósfera (Troposfera) que se conoce con el nombre de Efecto Invernadero.

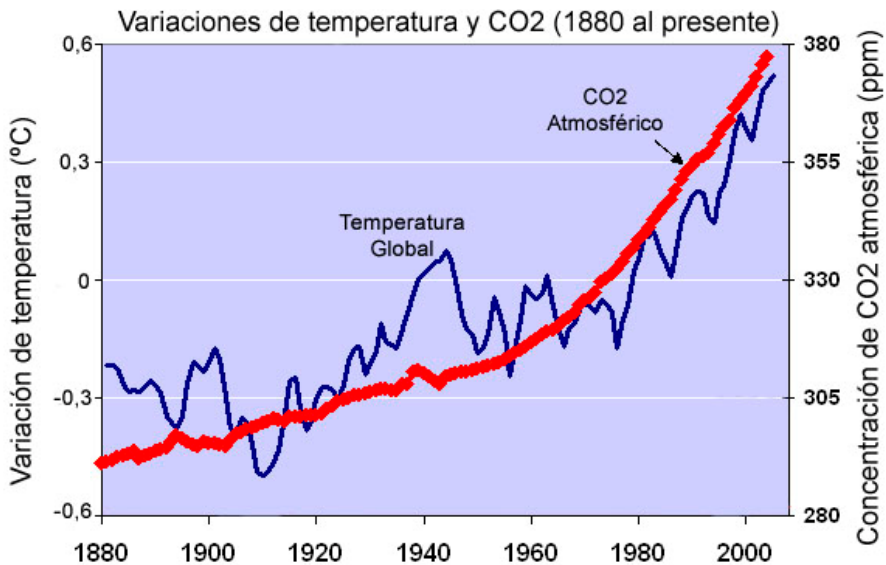
La causa principal del incremento en la concentración de gases de “Efecto Invernadero” corresponde a la quema de combustibles fósiles (50% del total de las emisiones de CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO, CH<sub>4</sub>) asociada al consumo.

La importancia del Efecto Invernadero para el contenido de calor de la atmósfera y, por tanto, para el sistema climático, es tal que puede aumentar la cantidad de energía disponible para calentar la superficie terrestre desde un 70% de la radiación solar incidente (en ausencia de atmósfera) hasta un 133%. Las consecuencias para un planeta con y sin gases invernaderos serían drásticas. Si no hubiera vapor de agua, CO<sub>2</sub> o metano en la atmósfera, la temperatura superficial sería de -18 °C, y los ríos, lagos y océanos estarían congelados.

El problema estriba en que las tasas de emisión de estos gases hacia la atmósfera han aumentado dramáticamente a causa de la intervención del hombre, provocando un desequilibrio en el sistema natural.

La Figura 1.1.1 muestra cómo el ascenso en las anomalías de la temperatura global del planeta (desviación sobre el valor medio) para el período entre 1860 y 2000, ha ido acompañado por un incremento en la

concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico. A partir de medidas directas, se ha estimado que la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera aumenta en una tasa cercana al 0,35 % o 1,2 ppm al año. Gran parte de la investigación del sistema climático de las últimas décadas se ha enfocado a encontrar relaciones causales entre estas dos curvas. Para comprender algunas de estas relaciones es necesario conocer el papel de los océanos y algunas características básicas del ciclo del carbono.



**Figura 1.1.1 Incremento de la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> y temperatura global media desde 1860 (Modificado de Bigg, 1996)**

### **1.1.2 Consecuencias ambientales del calentamiento global**

En la actualidad, se admite que la principal causa de cualquier cambio climático inminente será el incremento en la concentración atmosférica de los gases invernadero producidos por el hombre desde comienzos de la Revolución Industrial del siglo XVIII. La concentración actual de CO<sub>2</sub> atmosférico es de 380 partes por millón (ppm), un 31 % mayor

que la existente en la época preindustrial (280 ppm). Si la tendencia actual de emisión de CO<sub>2</sub> antropogénico a la atmósfera continúa al ritmo actual (escenario conocido como de “negocios como siempre”, “business as usual” o IS92a), llegará a doblar la concentración de CO<sub>2</sub> en el año 2030, de los 7.4 Petagramos ( $10^{15}$  g = 1 Pg) emitidos a la atmósfera en 1997 pasarían a 26 Pg/año hacia 2100. De acuerdo a modelos actuales de interacción océano-atmósfera, esto podría conducir a un incremento entre 1,5 y 4,5 °C en la temperatura superficial media global, especialmente en otoño e invierno. Esto tendría dos consecuencias fundamentales:

1. El nivel del mar puede ascender entre 20 y 140 cm, principalmente debido a una expansión de la columna de agua oceánica y sólo secundariamente debido al derretimiento del hielo glacial.
2. Incremento en la temperatura superficial del mar, con cambios más notorios próximos a los 60 °N, que conduciría a una mayor evaporación y de ahí a un ciclo hidrológico más vigoroso.

Otras consecuencias importantes que previsiblemente tendrían lugar son:

1. Alteración del balance entre precipitación y evaporación. El balance esperado indica que en latitudes medias habría un mayor incremento en la evaporación, con un correspondiente incremento de la precipitación en regiones polares y tropicales. Como resultado de esto, se incrementarían los gradientes meridionales (e.d. norte-sur) en la salinidad superficial, creando condiciones de aguas subtropicales más salinas.
2. El espesor, el área y la duración de la cubierta de hielo disminuirían
3. Un aumento del calentamiento superficial a altas latitudes reducirá los gradientes meridionales de temperatura reduciendo el “*stress*” (esfuerzo) del viento en aproximadamente un 10 % en el Atlántico Norte. Esto podría ralentizar los cinturones de circulación oceánicos

(corrientes del Golfo y de Kuroshio), y esto haría más anóxicas amplias áreas oceánicas (Hotinski et al., 2001; Kidder y Worsley, 2003), lo que podría causar extinciones en masa de especies, resultado que ya ha sido sugerido (Wignall y Twitchett, 1996 y 2002) y modelado (Hotinski et al., 2001; Kidder y Worsley, 2003).

### **1.1.3 Ciclo del Carbono**

El Ciclo Biogeoquímico del C se divide en dos subciclos, el Bioquímico, que comprende los procesos que tienen lugar principalmente en la Atmósfera y en la Biosfera, y el Geoquímico, que tiene lugar en la Litosfera. Una simplificación del subciclo bioquímico podría describirse como la extracción del C que se encuentra en la atmósfera en forma de CO<sub>2</sub> y su utilización en la formación de la biomasa, fundamentalmente mediante procesos de reducción y condensación. Estas transformaciones las realizan los organismos autótrofos, que asimilan la energía solar a través de la fotosíntesis. De forma paralela, los procesos de respiración y fermentación son los responsables del retorno del C a la atmósfera, reponiendo el CO<sub>2</sub> consumido en la fotosíntesis y son llevados a cabo principalmente por organismos heterótrofos. El subciclo Geoquímico produce compuestos orgánicos que se incorporan al medio sedimentario y que pueden preservarse a lo largo de los tiempos geológicos. Como puede observarse en la Figura 1.1.3, el C implicado en el subciclo Geoquímico, presente en combustibles fósiles, rocas energéticas y sedimentos antiguos y recientes, es mucho más abundante que el que participa en el subciclo Bioquímico. Por tanto, para comprender el ciclo global del C es necesario tener un conocimiento detallado de la composición y la dinámica del conjunto de los materiales orgánicos presentes en los diferentes compartimentos de la Litosfera y que

constituyen la Materia Orgánica Sedimentaria (MOS) o fósil. El estudio de la MOS ha dado lugar a la aparición y desarrollo en las últimas décadas de una disciplina científica independiente, que recibe el nombre de “Geoquímica Orgánica”, y que ha sido objeto de numerosas monografías y revisiones en las últimas décadas (Eglinton y Murphy, 1969; Eganhouse y Kaplan, 1988; Johns, 1986; Moldowan et al., 1992; Killips y Killips, 1993; Meyers, 1997).

Para comprender mejor el ciclo global del C y predecir sus posibles desviaciones, es necesario realizar una correcta identificación y cuantificación de las diferentes formas de éste elemento, ya que una parte del C quedaría almacenado de forma estable a lo largo de periodos prolongados de tiempo en suelos y sedimentos, estas formas de C constituirían los llamados sumideros de C, y sabemos que pequeñas desviaciones en el contenido en C de cada compartimento pueden tener consecuencias ambientales impredecibles (González-Pérez et al., 2004, y referencias citadas en el mismo).

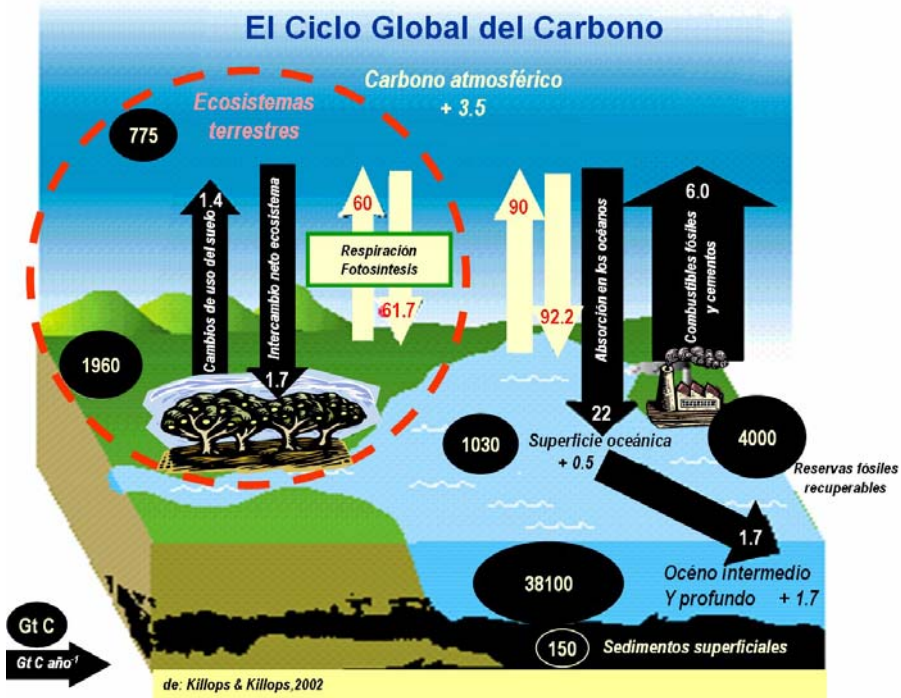


Figura 1.1.3: Ciclo global del C

## 1.2 EL SECUESTRO DE CARBONO

Como hemos comentado el incremento de  $\text{CO}_2$  provocará graves consecuencias ambientales debido al llamado “calentamiento global”, lo que constituye una preocupación fundamental para la sociedad de nuestro siglo (IPCC, 1996). Otro aspecto importante de estudio del Secuestro de C, que está directamente relacionado con el presente trabajo. El llamado “secuestro de carbono”, es la captura y almacenamiento seguro del C emitido del sistema energético global, es la manera más novedosa de manejar el C, las técnicas para el secuestro de C ofrecen un alto potencial para la reducción del  $\text{CO}_2$  atmosférico y se les considera como una de las herramientas principales para la gestión de las emisiones, por ello es

necesario conocer la cantidad de C presente en cada medio, la reactividad de las distintas formas de C y su potencial real de secuestro.

Mediante el Acuerdo de Kioto (1997), los países industrializados se comprometieron a reducir los gases de efecto invernadero en la atmósfera, bien mediante la reducción de las emisiones o mediante su absorción/secuestro en la troposfera. Muchos países están interesados en favorecer esta segunda alternativa, en contraposición a la reducción de emisiones producidas por la utilización de combustibles fósiles,

Está demostrada la capacidad de almacenamiento de CO<sub>2</sub> de los océanos, (Tanhua et al., 2007), se estima que la mitad del CO<sub>2</sub> producido por la actividad humana desde la revolución industrial ha ido a parar a mares y océanos (Doney y Ducklow, 2006). Habría que conocer el efecto que pudiera producir esta actividad en las especies acuáticas que allí se encuentren porque pequeñas desviaciones de las diferentes formas de carbono (C) presentes en los ecosistemas pueden tener un efecto importante en las condiciones globales del medio, por ejemplo se sabe que un aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> podría destruir los esqueletos coralinos.

Las investigaciones dirigidas a conocer los cambios habidos en épocas pasadas, pueden ayudarnos a conocer los mecanismos implicados en la acumulación estable de C y de como los cambios futuros pueden afectar la dinámica del C almacenado.

El secuestro de C es un campo amplio y complejo, tanto en lo que respecta a las diferentes opciones disponibles para el secuestro, como a los principios y las tecnologías implicados. Así, a modo de ejemplo, para el secuestro de C en ecosistemas terrestres y marinos se ha propuesto, entre otros, el uso de estrategias de manejo de vegetación y suelo que favorezcan la acumulación de C y la fertilización de los océanos que aumente su capacidad para acumular C; para el secuestro de C en formaciones geológicas, la



inyección directa de CO<sub>2</sub> y formación de hidratos estables en el fondo de los océanos, la utilización de pozos de gas, petróleo, minas de carbón y formaciones salinas. Por tanto, en el secuestro de C se implican muchas áreas científico-técnicas diferentes, que van desde el desarrollo de procesos químicos y tecnológicos para la captura de CO<sub>2</sub>, hasta la ingeniería genética dirigida a la obtención de organismos capaces de capturar y almacenar C de manera eficiente (USDE, 1999), no hay duda del interés del tema y del importante debate que suscita a niveles político, económico, ambiental y empresarial, de ahí el amplio desarrollo de estrategias y proyectos de investigación dirigidos a tal fin (Cao y Woodward, 1998; Chambers et al., 2001; Cox et al., 2000; Dalton et al., 1999; Sarmiento et al., 1998; Schimel et al., 2000; Sundquist, 1993).

### **1.3 FORMAS DE MATERIA ORGÁNICA REFRACTARIA. EL PARADIGMA “BLACK CARBON”**

El conocimiento y la predicción del tiempo de renovación de la MO es esencial para prever la evolución de los *stocks* y los flujos de C y N ambientales. En los modelos de dinámica del C se distinguen frecuentemente tres compartimentos (*pools*). El C lábil, con un tiempo de residencia de algunos días o algunos años, el C intermedio, con un tiempo de residencia de algunos decenios, y el C estable, con un tiempo de residencia de algunos siglos a millares de años (Parton et al., 1987; Balesdent y Mariotti, 1996).

En términos de almacenaje de C, los *pools* de C estable son particularmente interesantes, ya que favorecer su aumento permitiría reaccionar al aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico, a la espera de que aparezcan nuevas fuentes de energía menos contaminantes. Sin embargo, por ahora, ningún método permite aislar los tres *pools* para que puedan ser cuantificados directamente y caracterizados químicamente.

Los tres procesos principales de estabilización de C son:

1. La recalcitrancia debido a una naturaleza química difícilmente degradable por la actividad microbiana (Derenne y Largeau, 2001), que puede ser intrínseca o adquirida.
2. La protección física, adquirida por la inclusión de la MO en agregados o microporos, los cuales son poco accesibles a los microorganismos (Balesdent et al., 2000; Guggenberger y Kaiser, 2003),
3. La protección fisico-química, debida a la interacción MO-minerales, cationes complejantes y/o otras moléculas orgánicas que cambia la estequiometría de las moléculas que componen la MO y que crean uniones muy fuertes que impiden así un ataque enzimático y su degradación (Baldock y Skjemstad, 2000).

La materia orgánica refractaria (MOR) incluiría a un amplio grupo de formas de materia orgánica que incluiría, entre otras, sustancias húmicas, kerógenos y huminas, que presentan gran diversidad estructural y pueden estar desempeñando un papel muy importante en la estabilización de C, especialmente en ambientes marinos. Una de las formas de MOR más importantes se conoce con el nombre de “*Black Carbon*” (BC), término profusamente utilizado por la comunidad científica para hacer referencia a un grupo amplio y heterogéneo compuesto por formas policondensadas procedentes de procesos de combustión incompletos, el BC ha sido encontrado en muestras de hielo, suelos, sedimentos y aire de todo el planeta, destaca por tratarse de formas de MO de naturaleza recalcitrante, altamente resistentes a la degradación química y microbiana (Goldberg, 1985).

El uso del término BC para hacer referencia a este material compuesto de formas de C condensadas, poliaromáticas y relativamente

inertes, que básicamente tiene su origen en procesos de combustión incompleta de materia orgánica, se ha generalizado desde que en 1985 Goldberg publicara el trabajo titulado “*Black carbon in the Environment*” que influyó de forma determinante en esta expansión, y fortaleció la idea del BC como una sustancia altamente refractaria generada tras la combustión de biomasa que debía tener un tiempo de vida en el medio extremadamente largo y, por tanto, una significativa contribución al “ciclo lento” de Carbono en la Tierra.

Desde entonces las investigaciones en torno al BC han pasado de tener un carácter casi testimonial, restringido a estudios atmosféricos, hasta adquirir una gran importancia y ampliarse a numerosos y variados campos científicos, como Oceanografía, Geoquímica Orgánica, Ciencias del Suelo, Paleoclimatología, Antropología, etc. .

No existe un término científico-técnico en Español que designe este material sin llevarnos a incertidumbres o ambigüedades y la traducción literal no parece resolver el problema, por ello decidimos adoptar el uso de este anglicismo en nuestro trabajo.

El BC está ampliamente distribuido en la naturaleza y puede encontrarse en la atmósfera, hielos, suelos y sedimentos, debido a su resistencia a la alteración química y biológica. La importancia del BC para el ciclo global del C ha sido analizada por Kuhlbusch (1998) y se le considera como un sumidero importante de CO<sub>2</sub> atmosférico que es secuestrado de forma estable en suelos y sedimentos y parte sustancial del “carbono perdido” en el balance global de C afectado por la acción antrópica. Debido a su amplia distribución en el ambiente y a que contribuye de forma significativa al secuestro estable de C en la superficie del planeta, deben ampliarse los esfuerzos dirigidos al estudio de los procesos de formación, transporte y sedimentación de BC y a la caracterización de la estructura

química de las formas carbonosas que contiene (Haumaier y Zech, 1995; Kuhlbusch, 1998; Schmidt et al., 1999).

El estudio del registro sedimentario de BC se ha utilizado para reconstruir la historia de los incendios forestales y emisiones por combustibles fósiles (Smith et al., 1973; Bird y Cali, 1998). Debido a que la presencia de carbones vegetales representa el límite inferior de los niveles de oxígeno atmosférico, también se han utilizado para el estudio de la evolución del oxígeno en la atmósfera (Cope y Chaloner, 1980). Verardo y Ruddiman (1996) propusieron que el registro de BC puede ayudar a mejorar las estimaciones de C orgánico enterrado en sedimentos marinos (“*oceanic burial*”) y proporcionar valiosa información paleoambiental. Por otro lado, la distribución de BC en sedimentos superficiales puede afectar la distribución, especiación y biodisponibilidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Gustafsson et al., 1997; Gustafsson y Gschwend, 1998).

Se estima que la cantidad global de BC que se produce al año puede llegar hasta los 270 Teragramos ( $Tg = 10^{12}$  g) (Kuhlbusch y Crutzen, 1995); entre 50 y 260  $Tg \text{ año}^{-1}$  por la quema de biomasa y entre 12 y 24  $Tg \text{ año}^{-1}$  por las emanaciones de la quema de combustibles fósiles (Masiello y Druffel, 1998). Esto representa 4,7 veces la media anual de las emisiones producidas por la quema de combustibles fósiles de España ( $60,2 Tg C \text{ año}^{-1}$ ) para el periodo 1988-1998 (González et al., 2002).

De los aproximadamente 160 Tg de C orgánico que se depositan anualmente en los sedimentos marinos de todo el planeta, un 6 % aproximadamente corresponde a BC. Las dos fuentes principales del BC en sedimentos marinos son la precipitación de aerosoles en la superficie de mares y océanos (partículas pequeñas  $< 1 \mu m$ , procedentes de la quema de combustibles fósiles y de biomasa) y el transporte por las aguas continentales (partículas mayores procedentes principalmente de la combustión de biomasa).

Se ha estimado que el BC representa entre un 4 y 22 %, del total de carbono orgánico acumulado en los sedimentos marinos (Masiello y Druffel, 1998). La precipitación de BC atmosférico sólo puede explicar entre un 30 y un 40 % de la tasa total de producción de BC observada, por ello, es muy posible que el transporte de BC por ríos y aguas superficiales de escorrentía represente una fuente muy importante de BC, que se acumula en las zonas de estuarios y litoral (Hedges et al., 1999; Kuhlbusch, 1998; Masiello y Druffel, 1998).

La alta estabilidad del BC en sedimentos marinos se refleja en que se ha encontrado en sedimentos de hasta 65 millones de años de antigüedad y a que no existe una tendencia a disminución del tamaño de las partículas con la profundidad de los sedimentos (Herring, 1985). Se ha encontrado que el BC de sedimentos marinos reacciona muy lentamente a la oxidación química (Wolbach y Anders, 1989). Sin embargo estudios recientes (Middelburg et al, 1999) han demostrado que las partículas de BC sí son degradadas, aunque mucho más lentamente que la materia orgánica, en ambientes marinos aeróbicos, existen por tanto evidencias de una degradación selectiva de formas de BC en sedimentos marinos por oxidación, aunque se desconocen los mecanismos químicos o biológicos implicados. No obstante, estas partículas han sido halladas tanto en sedimentos de ambientes tanto anaeróbicos como aeróbicos.

Es de sobra conocido que la emisión de BC, es causa de problemas medioambientales importantes. Las partículas de BC contribuyen al calentamiento global (Hansen y Nazarenko, 2004), llevan en su composición algunos compuestos carcinogénicos que pueden causar serios riesgos a la salud (Armstrong et al., 2004), pero por otra parte recientemente se ha descubierto que podría estar jugando también un papel beneficioso para el medio ambiente que consistiría en su eficiencia para la adsorción de contaminantes orgánicos, especialmente hidrocarburos aromáticos

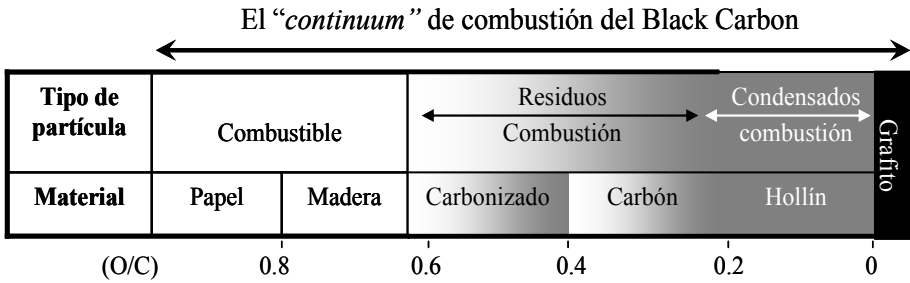
policíclicos, en suelos y sedimentos (Koelmans et al., 2006 y referencias incluidas en el mismo), estos aspectos junto con los mencionados anteriormente hacen imprescindible llevar a cabo una completa caracterización y cuantificación del BC.

### **1.3.1 Problemas asociados al aislamiento y caracterización de formas de Black Carbon (BC)**

Las mediciones de BC realizadas en los años 80 y 90 se han basado en el modelo de considerar el BC como altamente refractario, ejerciendo un importante papel como reserva de C en sedimentos oceánicos y suelos (Gustafsson y Gschwend, 1988; Herring 1985; Massiello y Druffel, 1998; Middelburg et al., 1999; Schmidt y Noack, 2000). Algunos datos nuevos, combinados con reconsideraciones de trabajos previos, apuntan hoy día a un papel más dinámico del BC en el ciclo global del Carbono (Decesari et al., 2002; Kim et al., 2004). Actualmente se sabe muy poco acerca de los agentes bióticos y abióticos que puedan intervenir en los procesos de descomposición del BC así como los mecanismos por los cuales estos procesos tienen lugar.

Se han observado discrepancias muy significativas entre las distintas técnicas analíticas utilizadas para la cuantificación de BC, con variaciones superiores a un factor de 500 en el contenido de BC para la misma muestra medida por distintos métodos (Schmidt et al., 2001). En general esas discrepancias se deben a 4 factores:

1. El complejo posicionamiento del BC dentro del “*continuum*” de productos de combustión, representado gráficamente en la Fig.1.3.1 que hace que cada metodología analice una porción diferente del continuo de BC.



**Fig. 1.3.1: El “continuum” de combustión de BC (adaptado de Massiello y Druffel, 1998)**

Sabemos que los productos de la combustión incompleta de combustibles, conocidos como pirolizados o carbonizados (“chars” en general), varían dependiendo el grado de alteración física o química y de la naturaleza de su precursor natural (Leifeld, 2007). Así los productos de recondensación, formados fuera de la fase gaseosa son clasificados como hollines. Los tipos de BC se diferenciarían en su grado de aromaticidad y composición, y variarían desde estructuras amorfas como los carbonizados vegetales hasta estructuras altamente ordenadas (tipo grafitos). El carácter heterogéneo del BC se pone de manifiesto en la evidente existencia de este “continuum” de combustión (Hedges et al., 2000 y referencias incluidas en el mismo). Como consecuencia de este problema principal aparecen otras dificultades añadidas.

2. La falta de un criterio común sobre la definición de “black carbon”. Que ha llevado a que diferentes métodos aislen y cuantifiquen distintas formas estables de C como BC, obteniendo por tanto valores muy alejados entre si.
3. Infra-estimación del contenido de BC por algunos métodos, por su imposibilidad para detectar todo el material resistente a la

combustión, o por pérdidas durante el tratamiento de las muestras. Este problema llamado por algunos científicos (Gustafsson, O., Schmidt, M., Loucharn, P.; comunicación personal) “*falsos negativos*” está debido en su mayoría de las condiciones del método de oxidación que desestabiliza algunas formas de BC más blandas y de la pérdida de partículas de BC hidrofóbicas y finas durante los pasos de manipulación y manejo durante la vía húmeda (Gelinas et al, 2001; Elmquist et al., 2004). Debemos ser conscientes de nuevo con el hecho de que los distintos métodos pueden estar enfocados en la medida de porciones diferentes del espectro de BC. El método de oxidación termoquímica a 375 °C (CTO-375), por ejemplo fue diseñado para medir hollín-BC. Por eso no es un grave problema para este método que pueda obtener un valor de BC por debajo de los esperados en otro tipo de muestras. Más aún, Nguyen et al., (2004) han demostrado claramente que el BC más resistente (procedente de carbonizados), puede de hecho ser parcialmente recuperado mediante el método CTO-375.

4. Sobre-estimación del contenido, fundamentalmente por la aparición de artefactos, conocidos como “falsos positivos”, que pueden comprender desde material quemado hasta materia orgánica recalcitrante no pirogénica, que no ha sido eliminada debido a condiciones de oxidación demasiado suaves. Para el CTO-375 el primero es más probable, pero la presencia de melanoidinas o carbones estables de alto rango son ejemplos de materia orgánica recalcitrante no pirogénica que deben ser tenidos en cuenta.



## **1.4 REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE BLACK CARBON (BC)**

En respuesta a la complejidad del problema del aislamiento la y cuantificación del BC, distintos laboratorios de todo el mundo han propuesto metodologías diversas, existiendo una amplia gama de protocolos de aislamiento, con únicamente dos aspectos en común, en todos ellos las muestras se someten a un pre-tratamiento (de diversa intensidad y naturaleza) para la eliminación del material que pueda interferir en la detección del BC, seguido de un método de detección de BC.

A lo largo de este estudio hemos realizado una revisión bibliográfica de las distintas metodologías existentes, así como la principal ventaja e inconveniente asociado a cada una de ellas. El resultado de este estudio queda reflejado en las Tablas 1,4a y 1.4b que se muestran en las páginas siguientes.

**Tabla 1.4a: Relación de técnicas utilizadas para el estudio de formas de Black Carbon según el material estudiado**

Material estudiado	Método			Referencia
	Pretratamiento	Oxidación	Determinación	
<b>Técnicas Ópticas</b>				
Suelo			Observación directa	Pessenda et al. (1996); Saldarriaga y West (1986); Sanford et al. (1885)
Aerosol	Filtros recolectores		Microscopía	Schultz (1993)
Sedimento	Capas finas		Microscopía	Clark (1988b) ; Clark y Hussey (1996)
Sedimento	HCl, HF, separación por densidad.		Microscopía	Kruger et al., (1994)
Sedimento	HCl, HF	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Microscopía	Kershaw (1986)
Plantas	HCl, HF		Microscopía (SEM)	Jones y Chaloner (1991); Johnson et al., (1981)
Suelos forestales	HCl, HF	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Microscopía	Wik y Renberg (1987)
<b>Técnicas Térmicas</b>				
Aerosol	Filtrado	100-700°C	Transmitancia	Chylek et al. (1995, 1987)
Plantas, aerosol	HCl, filtración	340°C 2 h	Colorimetría	Cachier et al. (1989)
Plantas, aerosol	Extracción	340°C 2 h	GC + balance de masas	Kuhlbusch (1995)
Suelo	Trat ácido-base amplio	375 °C	Análisis elemental	Gelinas (2001)
Hollín en sedimento	Molido	HCl 375°C 24 h	Análisis elemental	Gustafsson et al., (1997)
Plantas ,suelos	Molido	Combustión	Balance de masas	Fearnside et al.(1993)
<b>Técnicas Químicas</b>				
Sedimento marino	HCl, HF	Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50°C	Balance de masas, tritración	Wolbach y Anders (1989)
Sedimento	HCl, HF	KOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 55°C, 48h	Observación directa	Odegaard (1993); Rose (1990)
Sedimento	HCl,	KOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 20 °C, 24h	Combustión, MS	Emiliani et al.(1991)
Sedimento marino	HCl,	HNO <sub>3</sub> caliente	GC	Verado (1997)
Planta, sustrato	HCl, HF	HNO <sub>3</sub> 170°C	Derivatización, GLC	Glaser et al.(1997)
Sedimento rehecho	Tamizado	KOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	IR	Smith et al. (1975)
Suelo, plantas	HCl, HF	Foto-oxidación UV	<sup>13</sup> C NMR, colorimetría	Skjemstad et al. (1993,1996)
Sedimento	HCl	KOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 25 °C, 24h	IR	Herring (1985)
Sedimento	HCl, HF	HNO <sub>3</sub> caliente	Combustión, MS	Winkler (1985; 1994)
Sedimento marino y lacustre		Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 55°C, 60h	Colorimetría	Lim y Cachier (1996)
Sedimento	NaClO <sub>2</sub> , HF		Análisis elemental, <sup>13</sup> C NMR	Symson y Hatcher (2004); Skjemstad et al (1999)
Suelo con material pirogénico	Fraccionamiento por tamaño y HF		Microscopía, <sup>13</sup> C NMR	Schmidt et al.(1996)
Sedimento, suelo	Molido	30-1000°C atmósfera oxidante	TG, análisis elemental	Lopez-Capel et al (2006)
Sedimento, suelo y planta	HCl, HF	Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 60°C, 72h+ KOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 60°C 8h	Análisis elemental	Bird y Gröcke (1997)
Sedimento	Extracción con solventes		GC-MS, contenido en PAH	Killops y Massound (1992); Venkatesan y Dahl, (1989)
Sedimento	Extracción con solventes		GC-FID, PAH	McGroddy y Farrington (1995); McGroddy et al. (1996)
Sedimento, turba			Susceptibilidad Magnética	Thompson y Oldfield (1986)
Suelo, sedimento	Extr. lípidos, sust. húmicas y HF		Balance de masa y de carbono	Quenea et al. 2005; De la Rosa et al., 2004)
Suelo y material pirogénico		HNO <sub>3</sub> caliente	Transf. de BC en Ac.Bencenopolicarbox ilicos, GC-MS	Glaser (1998)

**Tabla 1.4b: Metodologías utilizadas para la cuantificación de formas de Black Carbon**

Tipo	Método (Autor/es)	Ventajas principales	Desventajas principales
Microscopía	Análisis petrográfico de la materia orgánica aislada mediante su estudio directo al microscopio. (Karapanagioti y Sabatini, 2000; Schmidt y Noack, 2000).	Permite la identificación de distintas fases de BC. Permite buscar evidencias de vegetación quemada.	Pueden perderse pequeños granos durante el pretratamiento, La heterogeneidad del BC vista al microscopio puede llevarnos a errores en la estimación.
	Uso del microscopio electrónico (SEM-TEM). (Goldberg, 1985; Griffin and Goldberg, 1979).	Permite la identificación de distintas fases de BC.	La resolución es demasiado fina para un uso práctico en la cuantificación de BC.
Térmica / Óptica (para aerosoles)	Estimación del CO <sub>2</sub> producido por la combustión del carbono durante un tratamiento térmico bajo He, seguido de He/O <sub>2</sub> . Se estima carbono elemental, inorgánico y orgánico, combinado con medidas de transmitancia. (Chow et al 1993, 2001; Huntzicker et al 1982).	Permite el análisis directo de muestras de aerosoles. Permite el análisis de muestras pequeñas.	Difícil de aplicar a suelos o sedimentos o muestras en general con alto contenido en partículas inorgánicas.
Oxidación Química	Eliminación de No-BC mediante fotoxidación UV, y cuantificación de C aromático por RMN <sup>13</sup> C CPMAS. (Skjennstad et al., 1996).	Evita artefactos por calcinación. Medida directa de los componentes aromáticos.	Limitada precisión para asegurar la eliminación de la fracción No-BC. Tiempos prolongados de análisis e instrumentación cara.
	Eliminación de No-BC mediante oxidación con hipoclorito o ácido trifluoroacético y cuantificación del contenido de carbonos aromáticos residuales por RMN <sup>13</sup> C CPMAS. (Skjennstad et al., 1999; Czimczik et al., 2003; Simpson y Hatcher, 2004).	Presenta las mismas ventajas que la oxidación química anterior. Técnica eficiente que evita la sobreestimación de BC.	Resulta caro. Posible pérdida de BC durante la manipulación en laboratorio (centrifugación, decantación,...). Es necesario probar primero la eficiencia del oxidante con muestras de naturaleza compleja.
	Eliminación de No-BC mediante la extracción previa de material lipídico, sustancias húmicas y material mineral. Cuantificación de BC mediante análisis elemental del material resultante. (Queena et al. 2005; De la Rosa et al., 2004)	Permite el análisis en muestras naturales complejas (suelos y sedimentos) pobres en BC, no requiere equipamiento sofisticado.	Difícil de aplicar a muestras ricas en BC o altamente hidrofílicas. La elevada manipulación de las muestras puede provocar pérdidas en la determinación de BC.
	Oxidación por vía húmeda utilizando HCl, HF y NaOH o HCl, HF y K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Lim & Cachier, 1996; Song et al., 2002; Masiello et al. 2002).	El pretratamiento químico implica la eliminación de la fracción No-BC.	Los mismos problemas que la oxidación anterior.
	Conversión de BC en ácidos benzenocarboxílicos (ABC) utilizando HNO <sub>3</sub> y determinación de los mismos. (Glaser et al., 1998)	Reduce el riesgo de pérdidas por manipulación de las muestras.	Es cuestionable el que todo y únicamente el BC se convierta en ABC. Problemas de sensibilidad con muestras complejas o con bajo contenido en BC.
Oxidación Termo-Química	Pretratamiento con HCl, HNO <sub>3</sub> y NaOH, seguido de oxidación térmica a 340°C 2h en corriente de O <sub>2</sub> . (Kuhlbusch & Crutzen, 1995). Medida de la razón H/C por análisis elemental. (Kuhlbusch et al., 1996).	El pretratamiento químico implica la eliminación de la fracción No-BC.	La elevada manipulación de las muestras puede provocar pérdidas en la determinación de BC. En general todos los procesos de oxidación térmica pueden producir BC.
	Tratamiento térmico 375°C 24h en aire, y tratamiento in situ con HCl. (Gustafsson et al., 1997).	Análiticamente sencillo. Evita pérdidas por manipulación.	Posible sobreestimación de BC por la formación BC durante el calentamiento previo al tratamiento químico.
	Amplio tratamiento ácido-base, seguido de oxidación térmica en aire a 375°C 24h. (Gelinas et al., 2001).	El pretratamiento químico implica la eliminación de la fracción No-BC.	Posible pérdida de BC durante el pretratamiento de las muestras.
Termogravimetría y calorimetría	Análisis elemental (TOC) de las muestras antes y después del tratamiento térmico hasta 900°C, medida continua de la pérdida de peso y separación de los distintos tipos de MO a distintas temperaturas estudiando la curva de calorimetría diferencial de barrido DSC. (López-Capel et al, 2006, De la Rosa et al, en prensa)	Evita pérdidas por manipulación de las muestras, es rápido y preciso con buena reproducibilidad.	Equipamiento caro y sofisticado, se necesita un pretratamiento en muestras complejas para eliminar la fracción mineral y evitar la sobreestimación de BC.
Tratamiento de ignición	Análisis elemental (TOC) y pesada de las muestras antes y después de la ignición. (Fearnside et al., 1993)	Evita pérdidas por manipulación de las muestras, es rápido y preciso.	Difícil distinción del BC dentro de la heterogeneidad de los residuos calcinados. Los componentes minerales pueden producir errores en la estimación.

Como resumen de la revisión de las metodologías existente para el estudio de BC, que ha quedado reflejada en las Tablas 1.4a-b, nos ha llevado a distinguir cinco tipos de métodos fundamentales:

1. Método de oxidación térmica (CTO-375°). A pesar de la posible creación de BC inherente a la combustión (*charring*), es un método ajustado para formas de BC altamente condensadas, como el hollín. Pero posee también sus artefactos negativos, la oxidación térmica puede destruir los residuos de la combustión como el *charcoal* (carbón pirogénico), con el resultado de la infradetección de BC. Por ejemplo, el contenido en BC muestras de madera quemada fue determinado por este método alrededor de cero. Además CTO-375 puede producir un gran artefacto positivo para muestras con contenido elevado en carbono orgánico como el carbón. Y debido al ligero cambio de peso antes y después del tratamiento térmico, es muy importante medir el peso de la muestra con precisión. En suelos y sedimentos la presencia habitual de minerales inorgánicos diferentes, que pueden actuar como catalizadores y elevar la oxidación de las partículas de BC durante la combustión. Esos catalizadores inorgánicos incluyen CuO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, etc., y por tanto pueden afectar a las medidas de BC.
2. Marcadores moleculares (BPCA)/oxidación química. Este método puede infra-detectar el material de BC, porque no todo el BC sea convertido en el BPCA y por otra parte sobre estimar el contenido porque otra materia orgánica puede ser posible fuente de BPCA. Este método debe ser empleado con cautela cuando sea usado para cuantificar BC. Su aplicación en muestras naturales complejas (suelos y sedimentos fundamentalmente) no ha obtenido aún resultados satisfactorios.

3. Oxidación química. Por un lado se ha observado que el continuo de BC que es detectado mediante este método es en general más amplio al detectado mediante el CTO-375, pero por otra parte la pérdida de pequeñas partículas de BC durante los pasos de centrifugación/decantación pueden llevar a infraestimar el BC, la existencia de materia orgánica derivada de rocas altamente refractarias que no puede ser destruida mediante este método tendrá como resultado la sobre estimación del contenido de BC. Como hemos mencionado este pretratamiento de oxidación química por vía húmeda también tiene sus desventajas, la excesiva manipulación de las muestras en soluciones acuosas puede llevar a pérdidas de partículas de BC, las cuales debido a su carácter hidrofóbico tratan de adsorberse a las superficies internas de los tubos de ensayo y a la interfase agua-aire. Particularmente el hollín (“soot”) puede perderse fácilmente durante la decantación y la posterior transferencia de la solución, otra desventaja es que la intensidad (fuerza) oxidativa es difícil de controlar con precisión, y depende de muchos factores tales como concentración del oxidante químico, tipo de oxidante aplicado, tiempo de reacción, y la coexistencia de geo-macromoléculas como el kerógeno que puede ser un material con una potencial interferencia positiva sustancial, todos estos factores hacen que la separación BC frente al material No-BC sea compleja.
4. Técnicas térmicas-ópticas: Inicialmente los métodos ópticos se utilizaron en el estudio de la ciencia atmosférica, que tiene instrumentos comerciales tales como el analizador de carbono termo-óptico (fabricado por el laboratorio Sunset), debido a eso los datos de BC que fueron medidos por aquellos grupos son comparables entre sí, y hacen que estos métodos hayan sido

ampliamente usados para medir el contenido en BC en partículas de aerosoles. La coexistencia de partículas inorgánicas y materia orgánica son los materiales de interferencia para la cuantificación del BC mediante estas metodologías, especialmente en suelos y sedimentos, debido a que estos pueden contener varios materiales que interfieren tales como catalizadores inorgánicos, materia orgánica polar y materia orgánica resistente a la oxidación, etc.. Otra desventaja es que suelos y sedimentos deben ser extendidos en un filtro de fibra de cuarzo, es difícil extenderlos de forma homogénea, por eso debemos ser cautelosos al aplicar este método al medir BC mediante técnicas ópticas.

5. Técnica termogravimétrica: Novedosa técnica en cuanto a su aplicación al estudio de BC, de fácil aplicación, no requiere manipulación de las muestras, presenta buenos resultados con muestras ricas en BC, es de elevada reproducibilidad, pero requiere un equipamiento sofisticado, realización de ensayos previos para optimizar las condiciones de aplicación y necesitaría ser objeto de mayor estudio para una aplicación efectiva en muestras naturales complejas más pobres en BC, como suelos y sedimentos, que requerirían un pre-tratamiento efectivo para eliminar la fracción mineral y la materia orgánica lábil.

Los resultados a *grosso modo* muestran que los datos de BC medido mediante diferentes métodos no son comparables entre sí. Cada método tiene sus limitaciones, como podemos ver en la Tabla 1.4b y solo son capaces de analizar una porción del continuo de BC, lo que resulta un obstáculo para estimar el balance y pérdida de BC en el ciclo global de C. Partiendo de la base que un único método no es válido para aislar y cuantificar el espectro completo de BC entre otros componentes que contengan C, dentro de una

matriz ambiental, la cuestión que se plantea es de si un único método es suficientemente válido para un propósito concreto dentro del amplio espectro de campos en los que el BC tiene interés, discernir que método es el más adecuado para nuestro propósito será también un objetivo importante de nuestra investigación, como ejemplos ya contrastados, para el estudio del destino medioambiental de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), se ha comprobado como útil la medida de hollín-BC mediante el método CTO-375, mientras que si el interés está en la historia de los incendios locales sucedidos, la cuenta de las partículas grandes de C pirogénico-BC por microscopía parece funcionar.

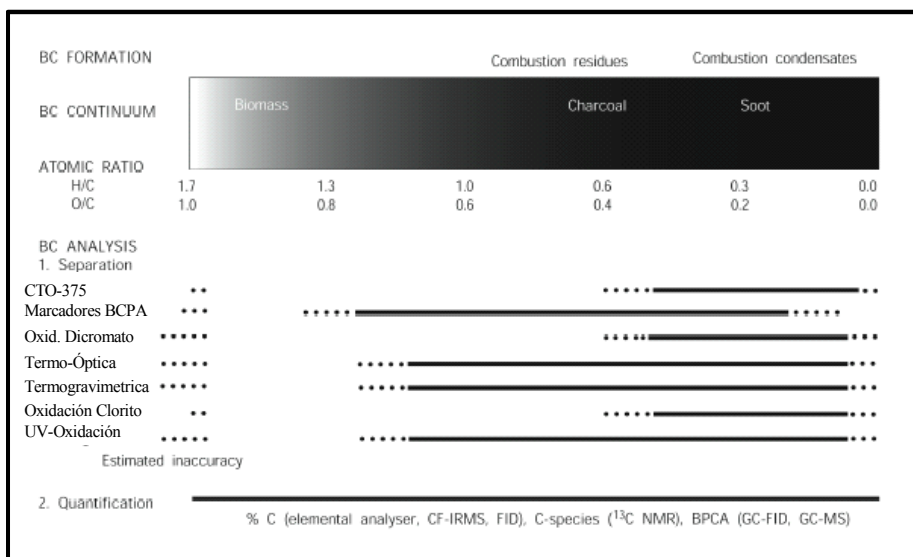
Esta compleja situación sobre la metodología trató de resolverse mediante un proyecto internacional de ensayos inter-laboratorio sobre BC, llamado “*BC-Ring Trial*” (<http://www.geo.unizh.ch/phys/bc/>), en el que ha participado nuestro grupo de investigación del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC).

Los objetivos principales conseguidos hasta ahora por el *BC-Ring Trial* han sido proponer una definición estándar de BC, seleccionar y describir los materiales de referencia de BC, así como los materiales de referencia de sustancias que potencialmente puedan interferir en los análisis de BC y por último promover el desarrollo de las técnicas de análisis y cuantificación de BC.

El uso de materiales de referencia se hace indispensable en un estudio de comparación interdisciplinar (Frimmel y Abt-Braun, 1997; Hammes et al., 2007), más aún, si cabe en este caso si tenemos en cuenta los principales problemas asociados al estudio de BC.

La Figura 1.4 muestra de forma comparativa las diferencias en las características del BC según la zona del “*continuum*” de combustión de C a la pertenezca y la metodología por la que haya sido aislado. Estas

metodologías han sido utilizadas por laboratorios pertenecientes al “*BC-Ring Trial*” pueden diferir enormemente entre sí, lo que explicaría, al menos en parte, el hecho de que los contenidos en BC obtenidos para las mismas muestras sean difícilmente comparables entre sí.



**Figura 1.4 Cuadro comparativo de metodologías de aislamiento de BC dentro del “continuum” de productos de combustión. Adaptado del BC-Ring Trial; (modificado de Hammes et al., *en prensa*)**



**CAPÍTULO 2: PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO**



## **2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO**

El presente trabajo se planteó en base a las siguientes premisas:

**A.** La amenaza del calentamiento global antropogénico ha despertado un enorme interés por conocer los factores y mecanismos determinan la acumulación de formas estables de C y las formas de mitigación de las emisiones de CO<sub>2</sub>.

**B.** El importante papel que juegan las formas de Materia Orgánica Refractaria (MOR) en general, y el BC en particular, en el ciclo del C, nos llevan a la necesidad de avanzar en la cuantificación y en la caracterización estructural de las mismas.

Esta segunda premisa nos conduce necesariamente a la selección y estudio de muestras de referencia de BC por los motivos expuestos anteriormente, como la dificultad de la detección de BC en muestras naturales complejas, la aparición de artefactos o la existencia materiales interferencia, y para poder validar las aproximaciones analíticas llevadas a cabo.

Por otra parte es de especial importancia comprobar la validez de estas técnicas en el estudio de muestras reales. Para ello, junto al estudio de muestras de referencia se ha llevado a cabo la caracterización y cuantificación de formas de MOR en un escenario propicio como son sedimentos pertenecientes a los estuarios y plataforma continental de la costa de Huelva.

Son muy escasos los estudios completos dedicados al estudio del BC en sedimentos marinos, siendo este medio, recipiente último del mismo, menos frecuentes aún son los estudios dedicados a la caracterización de formas de materia orgánica refractaria en matrices naturales complejas como es el caso de

los sedimentos marinos.

Las zonas estuarinas son ambientes ideales para el estudio del origen, procesos y destino de materiales orgánicos sedimentarios (Hedges y Keil, 1999) debido fundamentalmente a dos razones relacionadas entre sí:

1. La acumulación rápida de sedimentos finos que se produce en los estuarios produce una protección de los materiales orgánicos haciéndose más resistentes a la re-mineralización bacteriana.
2. En estos ambientes semicerrados pueden quedar registrados los cambios en las condiciones ambientales, origen de la MO, en las características del C orgánico contenido en los sedimentos.

Teniendo en cuenta la ausencia de estudios concretos sobre BC en el área de la costa de Huelva, están plenamente justificados los esfuerzos dirigidos al estudio de los procesos de formación, transporte y sedimentación de BC y a la caracterización de la estructura química de las formas carbonosas que contiene (Haumaier y Zech, 1995; Kuhlbusch, 1998; Schmidt *et al.*, 1999), más aún si cabe, si tenemos en cuenta el interés ambiental de la zona, en términos generales podemos decir que este estudio permitirá adquirir nuevos conocimientos sobre los mecanismos y procesos que inciden en la acumulación y estabilización de formas de MOR, especialmente BC y contribuirá al mejor conocimiento del ciclo biogeoquímico del C.

A partir de estas premisas y mediante el estudio de las técnicas utilizadas actualmente para la detección de formas de BC, una completa caracterización química de muestras de referencia de BC seleccionadas y el empleo de diversas técnicas analíticas y espectroscópicas se han planteado los objetivos del presente trabajo:

- 1º. Revisión completa de los métodos existentes para la detección de BC, ya expuesta en la introducción y que nos permitirá discernir la/s

técnica/s más adecuada para la detección de formas de MOR y BC en diversos tipos de muestras, incluyendo sedimentos marinos.

- 2º. Caracterización de muestras de referencia de BC mediante diversas técnicas analíticas.
- 3º. Caracterización de formas de MOR y BC aislados en sedimentos recientes de la costa de Huelva.
- 4º. Determinación y cuantificación de BC en sedimentos marinos y muestras de referencia seleccionadas.



**CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS**





### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES ESTUDIADOS

##### 3.1.1 Muestras de referencia de Black Carbon (BC)

Las muestras de referencia de BC se eligieron de entre las seleccionadas por el *BC-Ring-Trial* (Pag. 24). Estas muestras debían cumplir una serie de requisitos específicos:

1. Estar disponibles a nivel global, ser abundantes.
2. Homogéneas.
3. Estables a lo largo del tiempo.
4. Que su obtención fuese barata y no requiera de una técnica sofisticada.
5. Representativas de muestras que puedan encontrarse en el medio real.

Se seleccionaron un total de 12 muestras o materiales de referencia que se pueden clasificar en 3 grupos:

#### 1. Muestras de referencia naturales: Representativas de un amplio rango de matrices ambientales

- **Sedimento Marino (SM):** Se trata de un material de referencia procedente de sedimentos marinos del puerto de Baltimore (USA) en la Bahía de Cheseapeake. Catalogado y disponible en el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST-USA) con la referencia 1941b. Análisis exhaustivos sobre composición en hidrocarburos aromáticos policíclicos esta disponible en [www.nist.gov/srm/](http://www.nist.gov/srm/)

- **Vertisol (VS):** Typic **Pellustert** (USDA)/Pellic **Vertisol** (FAO), se seleccionó por su abundancia en USA, Australia y Eurasia, y por contener una elevada proporción de carbono de origen pirogénico (en torno al 30% del TOC). Concretamente esta muestra se trata de un suelo tomado de 0-10 cm de profundidad en Urrbrae (Sur de Australia) proporcionado por el CSIRO a través del Dr. Jan Skjemstad (*PMB 2, Glen Osmond, SA 5064, Australia*).
- **Mollisol (MS):** Los suelos Chernozémicos contienen una importante cantidad de C pirogénico (casi el 50% del TOC; Schmidt et al., 1999). Este molisol chernozémico fue tomado de 20-60 cm. de profundidad en la región de Hildesheim-Braunschweig (Alemania), y fue proporcionado por el CSIRO (Australia).
- **Materia Orgánica Disuelta (MOD):** MOD procedente del río Suwanee (Georgia, USA) extraída utilizando ósmosis inversa, liofilizada y homogeneizada. Proporcionada por la IHSS, donde se puede solicitar una descripción más amplia del material extraído. (<http://www.ihss.gatech.edu/sales.html>).
- **Aerosol (AS):** Material de referencia estándar de materia particulada atmosférica de un área urbana de Washington DC (USA). Recolectado durante 12 meses y proporcionado por la NIST (SRM 1649a). ([www.nist.gov/srm/](http://www.nist.gov/srm/))

**2. Materiales ricos en BC producidos artificialmente en el laboratorio: Seleccionados para caracterizar formas de BC a lo largo del espectro continuo de BC.**

- **Hollín (Ho):** En estudios sobre BC de origen atmosférico, se venían utilizando unos carbones comerciales tratados sucedáneos de

BC atmosférico que diferían notablemente de las características del BC producido de forma natural, como por ejemplo reactividad de partículas, hidratación, propiedades de radiación, contenido elemental en C, H y O, área superficial, porosidad, densidad de pares de electrones desapareados, etc., por ello después de numerosas pruebas y estudiar la literatura existente se recomendó el uso de hollín producido por una combustión poco eficiente en llama de hexano. Fue proporcionado por Dwight M. Smith. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Denver, Denver, CO 80208 (dwsmith@du.edu). (Goldberg, 1985; Akhter et al., 1985)

– **Madera Carbonizada (MCar):** Las propiedades químicas y físicas del carbon pirogénico preparado a partir de material lignocelulósico en laboratorio, varían significativamente y dependen de múltiples factores, incluyendo material de partida, temperatura, rampas de calentamiento o atmósfera utilizada. Se propuso el uso de pirolizados producidos artificialmente en condiciones controladas y reproducibles. Paa obtener esta muestra se usó un horno pirolítico comercial (300 mm diámetro, 700 mm longitud) en los laboratorios “*Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research, Ceramics Division*” (www.empa.ch), se utilizó un programa de temperatura de 27 °C h<sup>-1</sup> hasta 200 °C seguido de un calentamiento hasta 450 °C a 50°C h<sup>-1</sup> y finalmente se mantuvo el calentamiento a 450°C en atmósfera de N durante 5 horas. Se utilizó madera de castaño (*Castanea sativa*) cortada en pequeños trozos. La muestra fue proporcionada por el Dr. M. Schmidt de la Universidad de Zurich.

– **Planta Carbonizada (PCar):** Se seleccionó la planta de arroz risotto (*Oryza sativa*) por su abundancia y facilidad para ser obtenida en todo el mundo y siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior para la madera de castaño, en el que se carboniza a 450°C en atmósfera de N durante 5 horas. De la misma forma la muestra fue proporcionada por la Universidad de Zurich.

**3. Materiales de interferencia: Seleccionados por su riqueza en formas de materia orgánica refractaria (No-BC) susceptibles de interferir en la detección de BC por los métodos más habituales.**

– **Melanoidina (Mel):** La melanoidina se ha utilizado como representación de un tipo de materiales orgánicos que fácilmente pueden interferir en la separación de BC del resto de material orgánico. La melanoidina fue definida por primera vez por Maillard (1917) pero se han publicado otros protocolos de síntesis (Allard et al., 1997; Olsson et al., 1978), se eligió un procedimiento estándar fácil de llevar a cabo, sin requerimientos técnicos ni excesiva laboriosidad; básicamente la melanoidina fue producida artificialmente mediante reacción entre Urea y Glucosa en agua destilada a 90 °C durante 30 días. El material fue proporcionado por la Universidad de Zurich.

– **Kerógeno (Ker):** Material rico en kerógeno procedente de la zona Mahogany de la formación de rocas productoras de petróleo “Green River” (Utah, USA). En general se trata de un material geológico bituminoso rico en compuestos derivados del petróleo y esquistos ricos en carbonatos. El servicio geológico de los Estados

Unidos de América lo utiliza como material de referencia (código SGR-1) y podemos encontrar algunos resultados del análisis del mismo a través del Dr. Stephen A. Wilson, U.S. Geological Survey, Box 25046, Denver, USA (<http://minerals.cr.usgs.gov>)

– **Lignito (Lig):** Seleccionado como representante típico de la parte final del amplio rango de carbones existentes, la antracita no fue incluida debido a su baja reactividad y escasez. Se trata de un lignito procedente del condado de Mercer (Dakota del Norte, USA) proporcionada por el *Argonne National Laboratory* (USA). (<http://www.anl.gov/>)

– **Hulla Bituminosa (Bit):** Hulla de alto grado de reflexión procedente del condado de Buchanan (Virginia, USA). Proporcionada por el *Argonne National Laboratory* (USA).

**Tabla 3.1.1 Cuadro resumen de muestras de referencia estudiadas**

Muestra	Código	Descripción del material	Fuente
<b>Grupo 1: Muestras de referencia naturales</b>			
Aerosol	AS	Polvo Urbano (SRM 1649a) – muestreado entre 1976-1977 as materia particulada atmosférica del área de Washington DC area (USA)	NIST
Sedimento marino	SM	Sedimento marino (SRM 1941b) – muestreado en el puerto de Baltimore en la bahía Chesapeake (USA)	NIST
Vertisol	VS	Vertisol arenoso muestreado a 0 - 10 cm en Urbrae (Sur Australia)	CSIRO Land and Water, Adelaide
Mollisol	MS	Mollisol ligero, muestreado a 20 – 60 cm de profundidad en Hildesheim-Braunschweig (Harsum, Alemania).	CSIRO Land and Water, Adelaide
Materia orgánica disuelta	MOD	Materia orgánica disuelta del río Suwannee utilizando ósmosis inversa (Georgia, USA)	IHSS
<b>Grupo 2: Materiales ricos en BC producidos artificialmente</b>			
Hollín	Ho	Hollín procedente de una llama de n-Hexano	Dwight M. Smith
Madera Carbonizada	MCar	Madera dura de castaño ( <i>Castanea sativa</i> ) carbonizada a 450 °C durante 5 horas en atmósfera de N (Tessin, Switzerland)	University of Zurich
Planta Carbonizada	PCar	Paja de planta de arroz ( <i>Oryza sativa</i> ) carbonizada a 450 °C durante 5 horas en atmósfera de N (Tessin, Switzerland)	University of Zurich
<b>Grupo 3: Materiales potencialmente interferencia con BC</b>			
Melanoidina	Mel	Residuo formado mediante la reacción de urea con glucosa a 90 °C durante 30 días	University of Zurich
Kerógeno	Ker	Kerógeno procedente de Green River, muestreado en la formación petrolífera Mahogany (Utah, USA)	USGS
Lignito	Lig	Lignito muestreado en el condado Mercer (North Dakota, USA)	Argonne National Laboratory
Hulla Bituminosa	Bit	Hulla bituminosa Pocahontas– muestreada en el condado de Buchanan (Virginia, USA)	Argonne National Laboratory

### **3.1.2 Sedimentos marinos. Área de estudio**

El entorno marino y estuarino del litoral de la costa Sur-atlántica española, donde se encuadra nuestra área de estudio, es una zona geológicamente compleja y muy interesante desde el punto de vista medioambiental, caracterizada por la existencia de un extenso depósito de sedimentos que alcanza una superficie de 90.000 Km<sup>2</sup>. Las corrientes profundas del Mediterráneo afectan significativamente el patrón de sedimentación en el área y son, en parte, responsables de la movilización, transporte y deposición de grandes volúmenes de materiales detríticos a lo largo y ancho de toda la plataforma y talud continental que favorece la formación de turbiditas (Bonnin et al., 1975, Martínez de Olmo et al., 1984, Flinch et al., 1996, Somoza et al., 1994, Berasategui et al., 1998, Battista et al., 2000). Las turbiditas son rocas formadas en el medio marino a partir de sedimentos que se depositan por gravedad en los taludes y borde de la plataforma continental. Se trata de un material de gran interés para estudios de biogeoquímica ambiental y en particular para el estudio de formas de C refractario (Middelburg y De Lange, 1988; Prahl et al., 1989, 1997; Keil et al., 1994; Cowie et al., 1995; Middelburg et al., 1999). Existe un precedente de estudios sobre BC en un área cercana a esta zona, fue llevado a cabo por el equipo del Dr. Jack Middelburg, que cuantificó el C refractario en cinco muestras de sedimentos Mediterráneos y Atlánticos (tomadas entre los 175 y 4909 m de profundidad), encontrando valores que variaban entre un 16 y un 29 % del C orgánico total (TOC).

Las muestras de sedimentos para la realización de este estudio fueron tomadas, en la plataforma continental interna y en los estuarios de la costa onubense, durante cruceros realizados los años 2000 y 2001 en el marco de un proyecto de investigación sobre la “Geoquímica ambiental de los sedimentos

de la costa de Huelva” (BACH-Proyecto BC, REN 2002-04602-C02). En la Figura 3.1.2a se presenta la imagen de los estuarios de la zona estudiada.

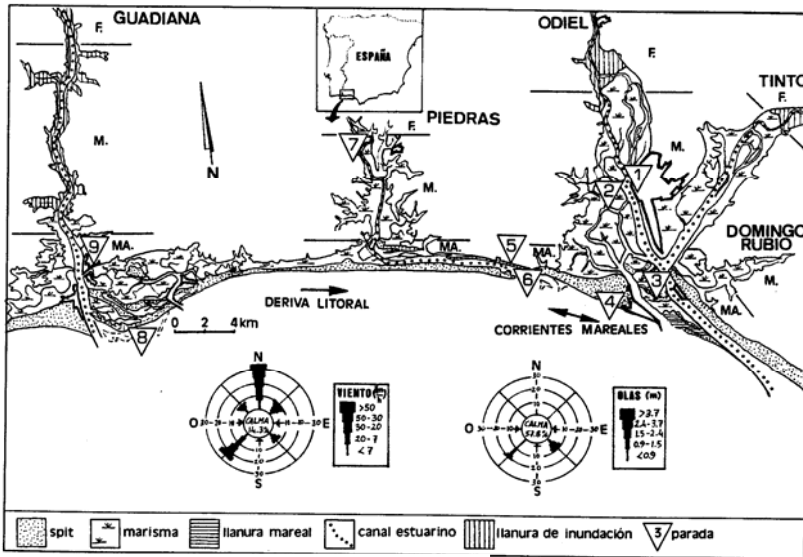


Figura 3.1.2a Esquema de los estuarios del sudoeste de la Península Ibérica

En la zona de estudio existen principalmente dos tipos de estuarios: de llanuras costeras o aluviales, con forma de trompeta y encajado en depósitos cuaternarios como sería el del Guadalquivir, y los formados sobre sustratos rocosos (*rock-bounded estuaries*), cuya forma depende de la secuencia y estructura de los materiales que los confinan, adquiriendo formas irregulares, caso del Guadiana.

El estuario del río Guadiana es el sistema mesotidal fluvio-marino más importante del Sudoeste de la Península Ibérica. Situado sobre un sustrato paleozoico, los efectos de la Transgresión Flandriense suponen, en la desembocadura del río Guadiana, la formación de un canal de estuario sobre un valle fluvial. Este estuario se configura como el único sistema del litoral en el



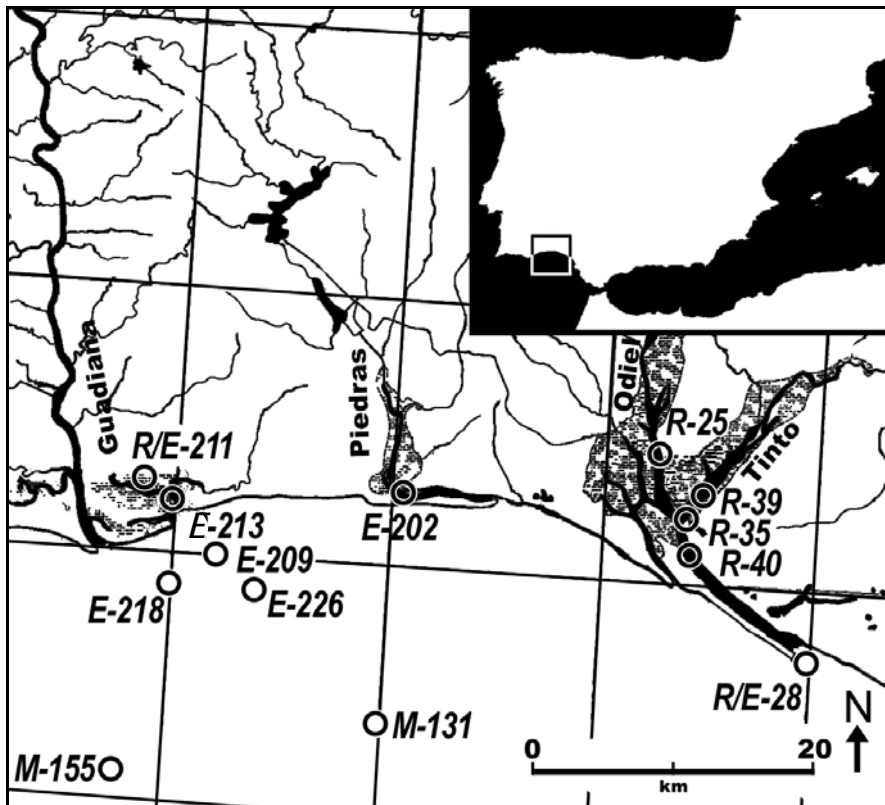
que no se ha producido la colmatación de una amplia bahía, que nunca existió debido al elevado encajonamiento del enclave. En lugar de esta amplia bahía, existió un pequeño entrante costero en el sector más meridional del sistema (Estuario Marino) el cual, y debido precisamente a esta peculiaridad, ha evolucionado de una forma diferente.

El estuario del río Guadalquivir se forma sobre un sustrato clásico neógenocuaternario donde fue posible la formación de una bahía amplia, desarrollándose llanuras mareales extensas en su interior que actualmente muestran un alto grado de colmatación. En una posición intermedia se encuentran los estuarios de los ríos Piedras, Tinto y Odiel, que se disponen sobre un sustrato clásico neógeno-cuaternario y en ellos la contribución fluvial es mucho menor. En estos últimos se producen las descargas fluviales en el interior de los estuarios y aparecen llanuras mareales amplias y con vegetación. Se desarrollan flechas litorales en sus desembocaduras, alimentadas por la deriva litoral del oeste. (Borrego et al., 1993, 1999).

Las características especiales de estos estuarios hacen muy frecuentes, en época de lluvias, la aparición de corrientes de turbidez y los flujos de sedimentos subacuados por gravedad que generalmente son corrientes esporádicas, con mayor densidad debido a la gran cantidad de material sólido que llevan consigo. Estas corrientes son las que depositan las turbiditas y los materiales con fácies afines que se intercalan entre los sedimentos pelágicos. También se producen con frecuencia corrientes de densidad (del mar al río y viceversa), se trata de cambios de masas de agua que intentan amortiguar diferencias de densidad, temperatura o salinidad entre las dos masas acuadas (Morales-Gamboa, 1999) y que podrían hacer variar sensiblemente los valores obtenidos de un período del año a otro.

De entre las más de 200 muestras de sedimentos tomadas, se seleccionaron para nuestro estudio 13 muestras representativas de entornos de

especial interés, en la Tabla 3.1.2 se presentan las coordenadas geográficas, profundidad, localización y código asignado a cada muestra estudiada. Entre ellas incluimos muestras de sedimentos tomadas en la plataforma continental del Golfo de Cádiz en mar abierto (muestras M-131; M-155), muestras tomadas en el tramo final de ríos (R-25 en el Río Odiel, R-39 en el Río Tinto, R-35 y R-40 en la confluencia entre ambos), muestras tomadas en estuarios (E-202 en el estuario del Río Piedras, E-213, E-218, E-226 y E-209 en el estuario del Río Guadiana) y muestras situadas en zonas de transición entre Río y estuario como la R/E-211 (transición al Río Guadiana) y R/E-28 (transición al Río Odiel).



**Figura 3.1.2b** Mapa de la zona de estudio y localización de las muestras

**Tabla 3.1.2 Localización y profundidad de las muestras estudiadas**

<b>Muestra</b>	<b>Latitud N</b>	<b>Longitud W</b>	<b>Localización</b>	<b>Profundidad (m)</b>
R-25	37°14'51.07''	6° 57'35.06''	Río Odiel	7
R/E-28	37° 7'51.89''	6° 49' 55.63''	Desembocadura R. Odiel	3
R-35	37°12'20.74''	6° 56'31.45''	Río Tinto-Odiel	18
R-39	37°12'48.49''	6° 55'49.55''	Río Tinto	4
R-40	37°12'34.20''	6° 56'12.37''	Río Tinto-Odiel	4
E-202	37°12'43.27''	7° 9'27.86''	Estuario Río Piedras	12
E-209	37° 9'23.87''	7° 17'34.51''	Estuario Río Guadiana	4
R/E-211	37°12'17.06''	7° 20'42.83''	Estuario Río Guadiana	5
E-213	37°12'20.74''	7° 20'19.32''	Estuario Río Guadiana	13
E-218	37° 8'48.66''	7° 20' 0.60''	Estuario Río Guadiana	12
E-226	37° 8'48.23''	7° 15'59.58''	Estuario Río Guadiana	17
M-131	37° 4'23.05''	7° 9' 53.10''	Plataforma cont. Marina	36
M-155	37° 1'59.84''	7° 21'58.25''	Plataforma cont. Marina	70

### **3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS**

Los sedimentos marinos fueron divididos en dos partes, una de ella se guardó para mantener el registro en la litoteca del Instituto Geológico y Minero de España y la otra mitad se utilizó para llevar a cabo nuestro estudio. Las muestras se almacenaron en húmedo y se congelaron a una temperatura de -20 °C para evitar el desarrollo microbiano. Antes de los análisis se secaron por liofilización y se homogeneizaron mediante molienda y tamizado (luz de malla < 2 mm).

Todas las muestras fueron almacenadas en lugar seco a 4 °C para evitar posibles desarrollos microbianos.

La escasa riqueza en Carbono Orgánico (TOC) de la mayoría de los sedimentos hizo necesario, en muchos casos, la aplicación de tratamientos previos para concentrar el contenido en C y mejorar la resolución de los análisis realizados con algunas técnicas instrumentales utilizadas. En el caso

particular de la espectroscopía de NMR  $^{13}\text{C}$  en estado sólido es necesaria la eliminación de material paramagnético y mineral, sin este tratamiento previo la posibilidad de obtener espectros de calidad es baja. En la actualidad se aplican varios tratamientos diferentes para minimizar este problema y mejorar de esta forma la calidad de los espectros (Calderoni y Schnitzer, 1984, Arshad et al., 1998 y Skjemstad et al., 1992). Uno de ellos consiste en el uso de ácido fluorhídrico diluido (HF) (Preston et al., 1989, Skjemstad et al., 1994, Schmidt et al., 1997, Dai y Johnson, 1999, Smernik y Oades, 1999 y Smernik y Oades, 2000). Después de tratar varios suelos de Australia con una solución de HF al 2 %, (Skjemstad et al., 1994) se observó un incremento del ratio C/Fe entre 1 y 17 y según datos de Schmidt et al. (1997) utilizando HF al 10 % se obtuvo un incremento del ratio C/Fe entre 140 y 650 en suelos de Alemania. En ambos casos, debido a la eliminación de silicatos y óxidos de hierro, se consiguió un enriquecimiento relativo en el contenido en materia orgánica de hasta 20 veces la proporción inicial. Sin embargo, aunque el tratamiento con HF no produce cambios significativos en la distribución de la materia orgánica ni en la fracción de formas de MO nitrogenadas (Kögel-Knabner, 1995; Knicker et al, 2000), se detectaron pequeñas pérdidas de formas lábiles de carbohidratos y aminoácidos. Estas pérdidas de MO lábil serán discutidas más adelante pero cabe decir aquí que, en el proceso de aislamiento de formas de MOR en sedimentos, no supone problema y contribuye a mejorar la calidad de los espectros obtenidos.

### **3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.3.1 Análisis físico-químico de las muestras. Determinaciones de carbono orgánico total (TOC), carbono inorgánico total (TIC), nitrógeno total (TN) y azufre (TS). Medida de la isotopía $\delta^{13}\text{C}$ en muestras brutas**

La caracterización global del sedimento se llevo a cabo mediante la determinación de los contenidos de carbono orgánico total (TOC), carbono inorgánico total, (TIC), nitrógeno (TN) y azufre (TS).

Las muestras se pesaron en cápsulas de estaño (por duplicado) y se calentaron en el horno de oxidación a 1000°C con flujo de Helio enriquecido en O<sub>2</sub>. Se produce una oxidación catalítica ("combustión flash dinámica") que asegura la oxidación total de la muestra. Los gases de combustión (N<sub>x</sub>O, SO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O) pasan a un horno de CuO a 490 °C donde los diferentes óxidos de nitrógeno se reducen a N<sub>2</sub>. A continuación son transportados por una corriente de He a una columna cromatográfica (Porapak PQS) donde son separados y posteriormente detectados por un detector de conductividad térmica. Para el análisis de TOC se utilizaron dos submuestras de 20 mg de sedimento liofilizado que se pesaron en contenedores de plata y se procedió a su análisis en un analizador elemental CHNS Carlo Erba EA1108. Una de las submuestras se descarbonata mediante tratamiento con una disolución acuosa de HCl (25 %) y la otra se analiza directamente sin pretratamiento. El contenido de TOC se obtiene por la lectura instrumental de la muestra descarbonatada y el TIC se calcula por diferencia entre el C total de la muestra sin tratar y el TOC. El contenido en TN fue medido en el mismo analizador elemental por combustión con oxígeno en horno de inducción (Eltra modelo CS-800). Las medidas se determinaron mediante el análisis

de los gases de combustión ( $\text{NO}_x$ ) haciendo uso de detectores de absorción infrarroja en estado sólido. Los porcentajes de C, N y S se obtienen mediante comparación con los correspondientes valores obtenidos para una sustancia patrón previamente analizada.

### **Medidas isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en muestras brutas**

La medición de las relaciones isotópicas  $\delta^{13}\text{C}$  en muestras brutas se llevó a cabo en sedimentos marinos desmineralizados y en muestras de referencia de BC. Se realizaron en un analizador elemental CHN NA 1500 Carlo Erba (Milán, Italia) en el cual los gases procedentes de la combustión de la muestra son conducidos directamente a un espectrómetro de masas (modelo VG Sira 10) acoplado según Girardin y Mariotti, 1991. Los valores de isótopos de C medidos se expresan en tantos por mil (‰) relativos al estándar de Pee Dee Belemnite (PDB).

En general el ratio isotópico de C para biomasa terrestre procedente de plantas tipo C3 varía entre -23 y -34 ‰ con una media aproximada de -26 ‰ (Meyers, 1997), mientras que los valores  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$  en plantas marinas oscilan entre -18 y -20 ‰, siendo -23 ‰ el valor medio para  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$  en sedimentos marinos (Holtvoeth et al., 2005). El valor de  $\delta^{13}\text{C}$  en carbonatos suele tener valores en torno al 1 ‰. Estos valores quedan reflejados de forma gráfica en la Figura adjunta.

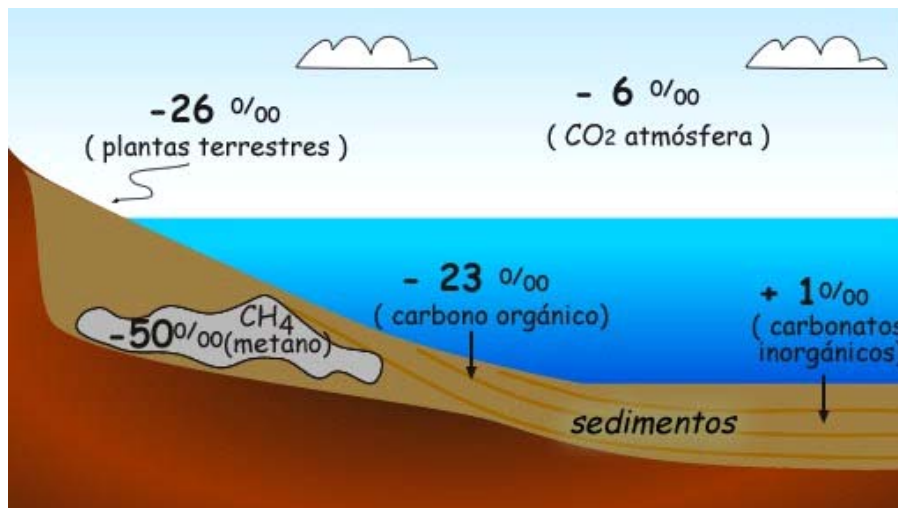


Figura 3.3.1 Valores promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  en diferentes medios

En cuanto a la variación isotópica de la vegetación, en las plantas superiores los valores  $\delta^{13}\text{C}$  varían entre -10 a -30‰, la causa principal de esta variación son las diferencias en el proceso fotosintético de las plantas. Las plantas C3 (vegetales superiores en general) poseen valores más bajos, usualmente de -23 a -34 ‰ (Gröcke, 2002), mientras que las C4 (plantas tropicales no arbóreas y numerosas especies herbáceas) tienen valores más altos entre -10 y -15 ‰ .

### 3.3.2 Caracterización estructural

#### 3.3.2.1 Termogravimetría (TG), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) acoplado a Espectrometría de Relación Isotópica de $^{13}\text{C}$ , ( $\delta^{13}\text{C}$ IRMS)

Los análisis termogravimétricos se realizaron en un aparato Júpiter 449C. Aproximadamente 40mg de sedimentos se pesaron en un crisol de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  de pequeño tamaño, las muestras se calentaron a  $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  desde

temperatura ambiente hasta 650°C con un flujo constante del 20 % de O<sub>2</sub> en He (50 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) y desde 650° a 1000 °C utilizando únicamente flujo de He (para poder detectar la presencia de carbonatos) (López-Capel et al, 2005; López-Capel et al, 2006). Mediante el uso de un capilar auxiliar acoplado, los gases producidos durante el análisis termogravimétrico de las muestras se pasan directamente a un sistema analizador de relaciones isotópicas (IRMS) PDZ Europa 20:20, preparado para medir δ<sup>13</sup>C a distintas temperaturas (López-Capel et al, 2005). Para los análisis IRMS se tomaron 6 muestras del gas emitido y transferido al capilar durante el perfil de calentamiento TG-DSC a temperaturas comprendidas entre 300 y 600 °C. Estas muestras correspondieron a los gases desarrollados a 300, 350, 430, 510, 540 y 596 °C respectivamente, temperaturas que fueron seleccionadas por corresponder con los cambios (reacciones) detectados mediante el DSC. Durante cada análisis se muestreó 6 veces CO<sub>2</sub> de referencia (3 al principio y 3 al final) procedente de un contenedor comercial de CO<sub>2</sub> con valor de δ<sup>13</sup>C acreditado por un laboratorio de referencia (Iso-Analytical, UK) (δ<sup>13</sup>C= -35.24 ‰).

$$\delta = [ (R_{\text{Muestra}} - R_{\text{STD}}) / R_{\text{STD}} ] \times 10^3$$

R<sub>Muestra</sub> es el ratio <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C para cada muestra estudiada y R<sub>STD</sub> es el ratio <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C del estándar de PDB (Coplen, 1996).

### 3.3.2.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C en estado sólido (CPMAS <sup>13</sup>C NMR)

Las muestras de sedimentos marinos fueron tratadas previamente con Ácido Fluorhídrico (10 %) para la eliminación de la fracción mineral y de las sustancias paramagnéticas presentes (Schmidt et al. 1997) y a repetidos lavados con H<sub>2</sub>O. Los espectros se obtuvieron a un campo de 4,7 Tesla con un espectrómetro Bruker DSX 200 (Bruker Analytic GmbH,



Alemania) a 50,32 MHz en  $^{13}\text{C}$ , bajo condiciones de polarización cruzada (CP) ( $90^\circ \text{ } ^1\text{H}$ ) y rotación en el ángulo mágico (MAS). El intervalo entre pulsos fue de 300 ms, y el tiempo de contacto de 1ms. Para cada espectro se acumularon entre  $10^4$  y  $10^5$  FID (*Free Induction Decay*). El tiempo de adquisición fue de 12,8 ms. La frecuencia de rotación en el ángulo mágico fue de 6,8 kHz, empleando un rotor estándar de 7mm de doble cavidad donde se dispusieron aproximadamente 300 mg de muestra. Los desplazamientos químicos fueron referenciados a la señal correspondiente al carboxilo de la glicina, (176,03 ppm) que se utilizó como estándar externo aplicando una secuencia estándar de pulsos de polarización cruzada (CP) (Cook et al., 1996; Dria et al., 2002).

Para la cuantificación de BC aislado de los sedimentos marinos, se utilizó un espectrómetro Bruker Avance 300 (Bruker Analytic GmbH, Alemania) a 75 MHz en  $^{13}\text{C}$ , equipado con un rotor de 4mm para el que solo era necesario utilizar 100 mg de muestra aproximadamente. La frecuencia de rotación en el ángulo mágico fue de 12 kHz, para el resto de parámetros se seleccionaron los mismos valores estándar. Para realizar la cuantificación de las regiones espectrales, los espectros de estado sólido de RMN  $^{13}\text{C}$  se integraron utilizando la rutina de integración del espectrómetro y fueron divididos en 5 regiones de desplazamiento químico, 0-45 ppm (C-alquílico); 45-60 ppm (N-alquílico C, C-metoxilo); 60-110 ppm (O-alkilo-C); 110-160 ppm (C-aromático; C-olefínico); 160-185 ppm (C carboxílico, C amida ) y 185-245 ppm (C-cetonas; C-aldehídos) (Knicker y Lüdemann, 1995).

3.3.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución de  $^1\text{H}$  con giro de ángulo mágico (HR-MAS  $^1\text{H}$  NMR) TOCSY (*T*otal *C*orrelation *S*pectroscop*Y*).

Para el estudio de la MOR en muestras seleccionadas de sedimentos marinos se aplicó también la Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución de  $^1\text{H}$  en con giro de ángulo mágico en 2 dimensiones (TOCSY HR MAS ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) NMR).

En un experimento TOCSY la magnetización fluye a lo largo de toda la red de acoplamientos y se obtienen señales de correlación entre todas las frecuencias de los espines que pertenecen a una misma red de acoplamientos (mismo sistema de espín).

El espectro TOCSY contiene picos diagonales y picos de cruce simétricos. Los picos de la diagonal corresponden al espectro de protón. Todos los picos de cruce aparecen en fase y del mismo signo que los picos diagonales, y, si no se trataría de artefactos. Cualquier conjunto de protones en una cadena de acoplamientos  $J$  que no esté interrumpida por una constante de acoplamiento muy pequeña ( $< 3$  Hz) puede dar lugar a picos de cruce en el experimento TOCSY.

El funcionamiento del experimento TOCSY se basa en que durante el tiempo de mezcla ( $T_m$ ) se aplica una combinación de pulsos que bloquea la magnetización de todos los protones en el plano transversal (plano  $xy$ ) de forma que se elimina la diferencia de desplazamientos químicos entre ellos. En esta situación el sistema de espines se comporta como si estuviera fuertemente acoplado (mezcla isotrópica).

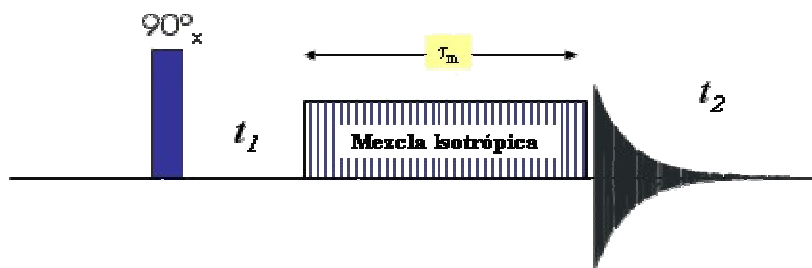
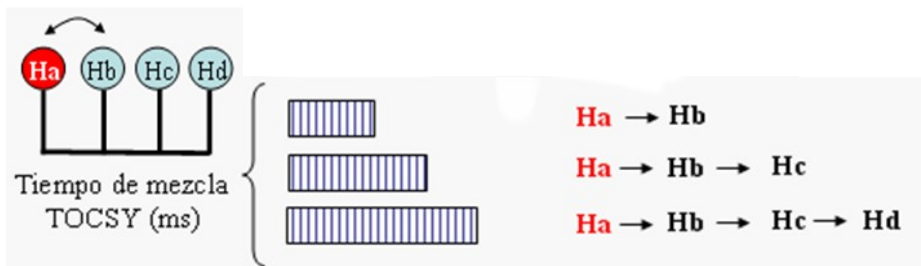


Figura 3.3.2.3a: Secuencia de Pulsos TOCSY

Tras el primer pulso de  $90^\circ$  de excitación y el tiempo de evolución  $t_1$ , la magnetización es sometida a un bloqueo de espines en el plano transversal durante el tiempo de mezcla ( $T_m$ ) del experimento. El bloqueo de espines impide la evolución con el desplazamiento químico y por tanto el sistema se comporta como si todos los núcleos estuvieran fuertemente acoplados. En esta situación el proceso de transferencia de magnetización hacia otros núcleos del sistema de espines acoplados resulta muy eficaz. Esta transferencia es registrada durante el tiempo de adquisición ( $t_2$ ).

La eficacia de la transferencia TOCSY depende de los valores de cada constante de acoplamiento a lo largo de todo el sistema de espines. Esta dependencia tiene una formulación matemática bastante complicada que requiere conocer con precisión todas las constantes de acoplamiento implicadas. En general no es sencillo predecir cuantitativamente las intensidades de los picos de cruce de TOCSY. Experimentalmente el tiempo de mezcla ( $T_m$ ) es el parámetro que controla que haya mayor o menor transferencia TOCSY hacia protones alejados en el sistema de espines desde un protón dado. A tiempos de mezcla cortos sólo aparecen correlaciones con los protones más próximos. A medida que  $T_m$  se aumenta aparecen más correlaciones en el espectro TOCSY. Existe un valor de  $T_m$  por encima del cual ya aparecen en el espectro todas las correlaciones posibles, en nuestras medidas realizamos los experimentos utilizando  $T_m$  de 60 y 100ms, la Figura 3.3.2.3b explica gráficamente este efecto.



**Fig. 3.3.2.3b: Efecto del tiempo de mezcla en la aparición de un mayor o menor número de correlaciones en el experimento TOCSY para una molécula genérica**

Finalmente se incorporó un módulo conocido como “*Watergate*” que, justo después del periodo de bloqueo de espines TOCSY, consigue la supresión de señal del disolvente y mejora la resolución espectral.

Los experimentos fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance 400 a MHz. Aproximadamente 30 mg de muestra fueron empaquetados en capsulas rotatorias de 4 mm de zirconio y bañados por dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*6). El DMSO es utilizado para mejorar la movilidad molecular de la muestra y se deutera para eliminar la señal de los protones correspondientes al solvente. Todos los espectros en 2 dimensiones se adquirieron a una velocidad de giro de 12 kHz bajo giro de ángulo mágico para reducir los efectos de desplazamiento químicos producidos por anisotropía, interacciones dipolo-dipolo y susceptibilidad magnética al ensanchamiento de bandas. Espectros 1D de  $^1\text{H}$  fueron adquiridos utilizando una secuencia de pulsos CPMG y un tiempo de espera (*delay time*) de 60  $\mu\text{s}$ . Posteriormente para los espectros de 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY se aplicó un pulso de presaturación (256 scans) de 25 ppm de ancho de barrido y 2 s de tiempo de espera entre ciclo y ciclo (*recycle delays*) {256 scans, TD (F<sub>1</sub>) 1024, TD (F<sub>2</sub>) 512}. Los datos fueron adquiridos aplicando

un programa de incremento de fase proporcional al tiempo (TPPI) y se utilizaron tiempos de mezcla (*mixing time*) de 60 ms y 100 ms, la secuencia de pulsos consistió en un desplazamiento de fase de 90° en ambas dimensiones (para F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>) que incorporaba justo después del periodo de bloqueo de espines TOCSY un módulo “*watergate*” para la supresión de señales procedentes de protones en el disolvente.

#### 3.3.2.4 Pirólisis-Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (Py-GC/MS) y Termoquimiólisis (TMAH-Py-GC/MS)

Las pirólisis (Py) de las muestras se realizó por calentamiento rápido en ausencia de oxígeno en un pirolizador tipo microhorno “*double shot*” (modelo 2020, Frontier Laboratorios, Fukushima, Japón) conectado a un equipo GC-MS Agilent 6890N.

Se pesaron aprox. 1-2 mg de muestra en una cápsula de platino que se introdujo en el microhorno calentándose a 500 °C durante 30s. El horno del GC se programó de 50 a 100 °C, a 30 °C min<sup>-1</sup> aumentándose después a 300 °C a la velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup>. El inyector y la interfase se programaron a 250 °C y 280 °C respectivamente. Se utilizó una columna capilar de 25 m x 0,25x 0,25 mm. DB5 MS (J&W Scientific) y como gas portador se utilizó He con un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. Las condiciones del MS Agilent 5973 fueron las siguientes: rango de masas: 40-600, scans s<sup>-1</sup>: 0,7; T<sup>a</sup> de la fuente de ionización: 230 °C; voltaje de ionización: 70 eV.

Los productos de pirólisis fueron identificados mediante el análisis de los espectros de masas de cada pico, tiempos de retención cromatográficos y comparación de los espectros de masas con los almacenados en las librerías de la estación de datos (Wiley, NIST -National Institute of Standard and Technology y NBS -National Bureau of Standard),

o con espectros anteriormente publicados. La estimación del área de los picos de los diferentes productos de Py se realizó en forma de abundancias totales, teniendo en cuenta que la suma de las áreas de todos ellos corresponde al 100% del área del cromatograma del ión total (TIC).

Para una completa caracterización de la MO en sedimentos marinos, se realizó una desorción previa a la pirólisis. Durante este primer paso la muestra fue introducida en el horno a 100 °C y la temperatura fue elevada hasta 280 °C a 10 °C min<sup>-1</sup> y se mantuvo a 280 °C durante 1 minuto, mientras que las condiciones de la columna fueron las mismas que las señaladas anteriormente. En general podemos decir que se trata de una técnica con buena reproducibilidad, que requiere poca cantidad de muestra para el análisis, y permite interpretar los resultados tanto cualitativamente como semi-cuantitativamente.

En formas de MOR aisladas de los sedimentos brutos se llevó también a cabo una pirólisis en presencia de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) que es considerada como una “termoquimiólisis” o hidrólisis alcalina asistida térmicamente. Para ello las muestras se mezclaron con una mínima cantidad de TMAH (25% en disolución acuosa), la mezcla resultante se secó en un desecador a vacío a 30 °C antes de proceder de forma similar a la pirólisis convencional.

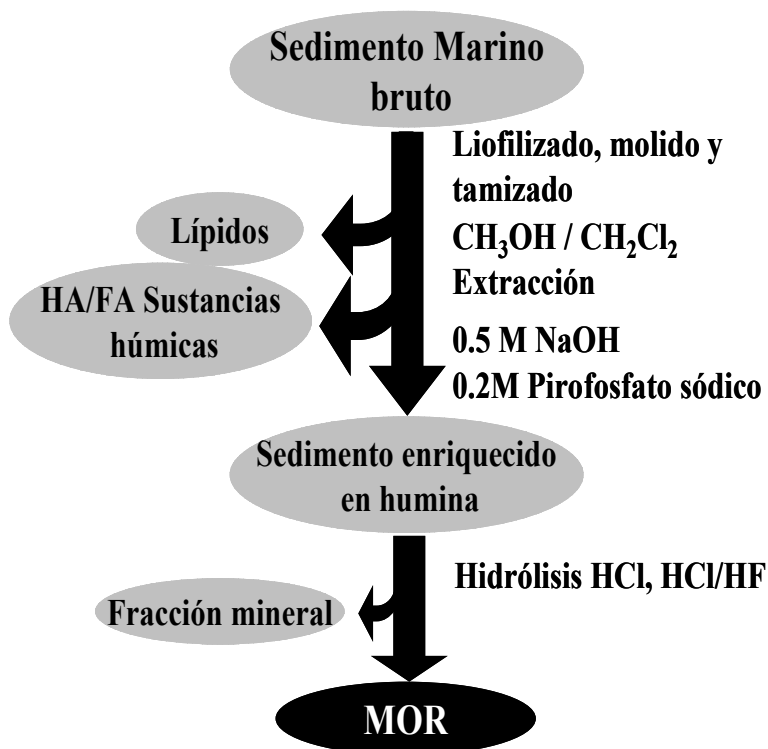
### **3.3.3 Aislamiento de formas de materia orgánica refractaria en sedimentos marinos**

Después de estudiar con detalle las metodologías existentes para el aislamiento y estudio de formas de MOR y BC en muestras naturales complejas como suelos y sedimentos, y teniendo en cuenta los medios técnicos de los que podíamos disponer, decidimos utilizar dos metodologías distintas:

### **i) Aislamiento de MOR mediante extracción secuencial**

Después de preparar las muestras para su análisis se tomaron aproximadamente 200g de cada una, posteriormente fueron sometidas a un tratamiento de extracción en tres pasos que incluyeron:

- 1). Extracción de la fracción lipídica mediante extracción a reflujo en sohxlet con una mezcla de diclorometano y metanol (3:1) durante 12 horas, después de la eliminación de disolventes por secado a vacío se procedió a la extracción de las Sustancias Húmicas (SH) en las muestras de sedimentos.
- 2). Extracción de las SH, las muestras se pusieron en agitación con una solución de NaOH 0.1N durante 24h. La fracción soluble en álcali (extracto húmico total) se separó por centrifugación y filtración, repitiéndose el proceso varias veces hasta que los extractos presentaron poca o nula coloración. Al conjunto de extractos se añadió HCl (al 35%) hasta pH 1, (McCarthy y Malcolm, 1979) precipitando los ácidos húmicos (AH) y quedando en disolución los ácidos fúlvicos (AF). Los AH se recogieron por centrifugación (4500 r.p.m), se redisolviéron en NaOH 0,5M y se volvieron a centrifugar (15000 r.p.m) para eliminar parte del material arcilloso.
- 3). Por último, siguiendo el protocolo descrito por Lim y Cachier (1996), el residuo se sometió a una hidrólisis drástica en medio ácido con Clorhídrico (HCl) (6M) y mezcla de Clorhídrico y Flourhídrico (HCl/HF) 1:1 (6M), que trató de eliminar la fracción mineral de las muestras, posteriormente se le aplicaron lavados con H<sub>2</sub>O destilada hasta pH 7. Un esquema del procedimiento seguido puede verse en la Figura 3.3.3



**Figura 3.3.3** Esquema del proceso de extracción secuencial aplicado para el aislamiento de MOR en sedimentos marinos

ii) Aislamiento de MOR (incluido BC) mediante degradación oxidativa con Clorito de Sodio y cuantificación de BC mediante el uso de RMN <sup>13</sup>C.

En este caso se siguió el procedimiento descrito por Simpson y Hatcher (2004), básicamente el proceso consta de un tratamiento inicial de las muestras (10-15g) con 50 ml de Ácido Fluorhídrico (HF) al 10% (5 veces), para la eliminación de la fracción mineral y de las sustancias paramagnéticas presentes (Schmidt et al. 1997), a continuación se someten a repetidos lavados con H<sub>2</sub>O, liofilizado y por último se realiza un tratamiento oxidativo aproximadamente a 1 g de muestra (pretratada con HF) se le añade Clorito de Sodio (NaClO<sub>2</sub>) (0.5g), agua desionizada (30ml) y ácido acético



(1ml), se agita durante 2 horas, se centrifuga (2000g, 25 min), el proceso se repite 3 veces, después del último paso las muestras son agitadas en agua desionizada repetidas veces y centrifugadas para eliminar el exceso de sales.

El residuo final es congelado y liofilizado. El tratamiento con Clorito de Sodio tiene como objetivos principales la eliminación de la MO lábil y fundamentalmente de los compuestos derivados de lignina, y cuya presencia podría hacernos sobreestimar el contenido en BC, ya que resuenan a frecuencias comprendidas dentro del rango 110-160 ppm en RMN de  $^{13}\text{C}$ , que corresponde con la señal de C-aromático. Así el contenido en BC se determinó, siguiendo el procedimiento descrito por Simpson y Hatcher (2004), en función de la proporción relativa de carbono aromático (señal 110-160 ppm en RMN de estado sólido de  $^{13}\text{C}$ ), la proporción de material que ha resistido el proceso de oxidación completo y el contenido en C orgánico en cada muestra después del proceso de oxidación con Clorito de Sodio ( $\text{TOC}_{\text{final}}$ ).

La proporción de C orgánico total (TOC) de cada muestra que se encuentra en forma de BC se obtiene dividiendo el contenido en BC por el valor de TOC que cada muestra tenía inicialmente, antes del proceso de oxidación. Para testar que la eliminación de compuestos derivados de lignina ha sido efectiva, y que por tanto no se va a sobreestimar el contenido en BC por este motivo, se realizó la pirólisis en presencia de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), que es considerada como una “termoquimiólisis” o hidrólisis alcalina asistida térmicamente. Para ello las muestras se mezclaron íntimamente con una mínima cantidad de TMAH (25% en disolución acuosa), la mezcla resultante se secó en un desecador a vacío a 30°C antes de proceder de forma similar a la pirólisis convencional.

### **3.3.4 Análisis estructural de muestras aisladas**

Así mismo, se llevó a cabo un completo análisis estructural de las muestras aisladas mediante los procedimientos descritos anteriormente, utilizando para ello Análisis Termogravimétrico (TG y TG-DSC), Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  en estado sólido (CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR) y Pirólisis analítica (Py-GC/MS).

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA DE BLACK CARBON**

Con el fin de que las metodologías diseñadas para el análisis de muestras reales fueran ensayadas en un rango de materiales lo más amplio posible, y al mismo tiempo contribuir a resolver el problema de las divergencias en la cuantificación de BC, se han estudiado las muestras de referencia recomendadas por el *BC-Ring Trial*, descritas en las páginas 33 a 37 del capítulo anterior.

#### **4.1.1 Análisis elemental e isotópico**

La Tabla 4.1.1 recoge los valores obtenidos en el análisis elemental e isotópico de las muestras de referencia estudiadas. La heterogeneidad de las mismas no nos permite hacer una comparación directa entre ellas, pero los datos presentados en dicha Tabla nos ayudarán a comprender algunos resultados de estudios posteriores, además de contribuir a una completa caracterización de las muestras.

Es de señalar el elevado contenido en C de los materiales producidos artificialmente, y la variabilidad de valores en los otros dos grupos de muestras. Los contenidos en N son generalmente bajos (<1%), exceptuando los valores del aerosol (2,73 %) y de la melanoidina (8,65 %).



**Tabla 4.1.1: Resultados del análisis elemental e isotópico en las muestras de referencia**

	MUESTRA REFERENCIA	CÓDIGO	TOC (%)	TN (%)	TOC/N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Muestras de referencia naturales	Sedimento Marino	SM	3,01	0,12	25,1	-24,61	6,36
	Vertisol	VS	3,16	0,21	15,0	-22,22	6,16
	Mollisol	MS	1,93	0,10	19,3	-25,86	7,94
	Materia Orgánica Disuelta	MOD	45,47	0,54	84,2	-28,06	3,01
	Aerosol	AS	17,83	2,73	6,5	-25,08	3,59
Materiales ricos en BC producidos artificialmente	Hollín	Ho	92,19	0,44	209,5	-23,05	7,43
	Madera Carbonizada	MCar	73,60	0,12	613,3	-26,37	-3,66
	Planta Carbonizada	PCar	60,14	1,06	56,7	-26,68	3,63
Materiales interferencia	Melanoidina	Mel	54,26	8,65	6,3	-16,58	-3,03
	Kerógeno	Ker	27,23	0,84	32,4	-24,33	17,53
	Lignito	Lig	58,36	1,00	58,4	-23,54	-4,58
	Hulla Bituminosa	Bit	84,67	0,82	103,3	-22,92	3,09

En general todos los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  muestran que la MO procede mayoritariamente de plantas terrestres C3, lo que era esperable particularmente en el caso de las muestras de carbonizados artificiales PCar y VCar ya que proceden de arroz (*Oryza sativa*) y madera de castaño (*Castanea sativa*) respectivamente, plantas de tipo (C3).

Únicamente la melanoidina (Mel) preparada artificialmente mediante la reacción entre urea y glucosa, muestra valores  $\delta^{13}\text{C}$  correspondientes a vegetación C4, lo que podría estar indicando que la glucosa ha sido obtenida a partir de azúcar de caña (*Saccharum officinarum*) y no de remolacha (*Beta vulgaris*) que es de tipo C3.

El resto de los materiales de interferencia presentan valores de  $\delta^{13}\text{C}$  dentro del intervalo de valores típicos para carbones bituminosos, lignitos y kerógenos de -23 a -27 ‰ (Whiticar, 1996; Gröcke, 1998), aunque quizás ligeramente enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ . Este ligero enriquecimiento ha sido asociado por algunos autores a procesos asociados con la coalificación (Jones y Chaloner, 1991; Robinson y Hesselbo, 2004).

El rango de valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , en plantas superiores es más estrecho que en el caso de  $\delta^{13}\text{C}$ , y varía habitualmente entre -5 a +5 ‰. Las plantas fijadoras de  $\text{N}_2$  atmosférico que crecen en condiciones naturales tienen valores habitualmente de -2 a -9 ‰ (Delwiche y Steyn, 1970; Goericke et al., 1994; Beaumont y Robert, 1999), mientras que las plantas que utilizan únicamente N mineral del suelo ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$ ) poseen habitualmente valores positivos. Por ello cambios en los valores  $\delta^{15}\text{N}$  pueden revelar variaciones en productividad, niveles de nutrientes o tipo de vegetación (Altabet y Francois, 1994; Freudenthal et al., 2001).

En cuanto a los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de las muestras de referencia se observa muestran una enorme variabilidad, particularmente en el grupo de materiales interferencia que varían desde -4,58 ‰ obtenido en el lignito (Lig), hasta 17,53 ‰ medido en la muestra de Kerógeno (Ker), valor que prácticamente coincide con el medido para esta muestra de referencia por el Servicio Geológico de Estados Unidos (USGS) que fue  $17,4 \pm 0,4$  ‰ (Dennen et al., 2006) y puede deberse a una gran alteración metamórfica (Beaumont y Robert, 1999). En los otros dos grupos la variabilidad es menor, presentando valores positivos (entre 3 y 8), con excepción de la MCar (-3,66 ‰).

#### **4.1.2 Análisis mediante Pirólisis-Cromatografía de Gases/Espectroscopía de masas (Py-GC/MS)**

La Pirólisis (Py) en conexión con GC-MS ha sido profusamente utilizada para la caracterización directa a nivel molecular de matrices complejas, incluyendo MO disuelta (DOM) en suelos y aguas (Hempfling et al., 1990; Schulten y Gleixner, 1999), MO particulada (Gadel et al., 1993; Da Cunha et al., 2000), MO en suelos, sedimentos, residuos orgánicos y formas de materia orgánica refractaria (Martín et al., 1977, 1994; Zsolnay, 1991; Schulten et al., 1993; Sorge et al., 1994; Schulten y Sorge, 1995; Sáiz-Jiménez et al., 1986a,b; Almendros et al., 1997; Stuczynski et al., 1997; González-Vila et al., 2001; González-Vila y Almendros, 2003; González et al., 2003). Se trata de una técnica de elevada reproducibilidad, que requiere poca cantidad de muestra y que es aplicable directamente sobre la muestra bruta, lo que eliminaría posibles errores que puedan cometerse durante la manipulación, además permite interpretar los resultados tanto cualitativamente como semicuantitativamente.

En condiciones controladas la pirólisis conduce a la rotura no sólo de enlaces de tipo éster y éter, sino también a la de distintas uniones C-C, dando lugar a fragmentos accesibles a las técnicas cromatográficas. Los cromatogramas de ión total (TICs) de los productos de pirólisis o “pirogramas” suministran una información específica de tipo “huella dactilar” (*fingerprint*) para cada tipo de muestra sólida, por muy compleja que sea la matriz, sin necesidad de pre-tratamientos químicos. Por otra parte, muchos de los productos liberados durante la pirólisis son compuestos de diagnóstico de precursores específicos presentes en la matriz estudiada, lo



que permite obtener información sobre la composición del material de partida.

Hoy día, las diversas modalidades de pirólisis que existen tienen un amplio campo de aplicación en disciplinas muy diversas tales como Ciencias del Suelo, Geoquímica Orgánica, Polímeros, Medio Ambiente, etc, en las que es necesario el estudio de materiales orgánicos complejos de elevado peso molecular, y por supuesto también existen algunos precedentes en el estudio de BC mediante pirólisis analítica (Quénéa et al., 2005; González-Pérez, 2004; Poirier et al., 2000).

Sabemos que el porcentaje de material pirolizado y la naturaleza del mismo no tienen que ser proporcionales a la composición total de cada muestra estudiada, siendo ésta una de las limitaciones inherentes a cualquier técnica pirolítica, pero el estudio detallado de los pirogramas nos proporciona una idea de la composición del material pirolizable, sus propiedades globales y, sobre todo, en un estudio como éste, nos permite establecer diferencias significativas entre unas muestras y otras.

Una de las desventajas descritas con frecuencia de la pirólisis analítica es la formación de los llamados “artefactos” durante la pirólisis. La elevada energía transferida durante milisegundos a la muestra, permite la aparición de reacciones secundarias inducidas térmicamente y de fragmentaciones que pueden producir fragmentos diferentes de las estructuras originales. Ejemplos comunes de artefactos son la formación de furanos a partir de carbohidratos, alquilbencenos a partir de ácidos grasos ciclados, y heterociclos nitrogenados a partir de péptidos (Martín et al., 1977; Sáiz-Jimenez et al., 1994; Zang y Hatcher, 2002). Sin embargo, esto no significa necesariamente que esos compuestos no sean genuinamente constituyentes de la MO, ya que aunque su estructura haya sido modificada en muchos casos proceden inequívocamente de un precursor biogénico

conocido. Otra dificultad habitual al trabajar con cromatografía de gases, es que algunos productos de elevado peso molecular pueden que no sean detectados debido a su escasa volatilidad y quedan retenidos en la columna cromatográfica.

De todas formas, como hemos comentado con anterioridad, en condiciones analíticas optimizadas para cada tipo de muestra la pirólisis provee de una valiosa información en la caracterización de MO procedente de muy distintas fuentes.

Los pirogramas obtenidos para las muestras de referencia estudiadas se han agrupado en cinco Figuras (Figuras 4.1.2a, b, c, d y e) para su mejor comprensión, en función del tipo de muestra estudiada y el grado de similitud del los cromatogramas obtenidos. En las Tablas correspondientes a cada una de las Figuras (Tablas 4.1.2a, b, c, d y e) se enumeran los compuestos identificados, la proporción relativa correspondiente al área de cada pico y el posible origen del compuesto identificado.

Se han utilizado los siguientes códigos para señalar el origen de los compuestos identificados:

U: Origen indefinido o múltiple y estructura alifática; U-Ar: Sin origen único y estructura aromática; AL/ALI: Alcanos/alquenos respectivamente; PS: Polisacárido; PR: Proteína; CONT: Contaminante; ART: Artefacto

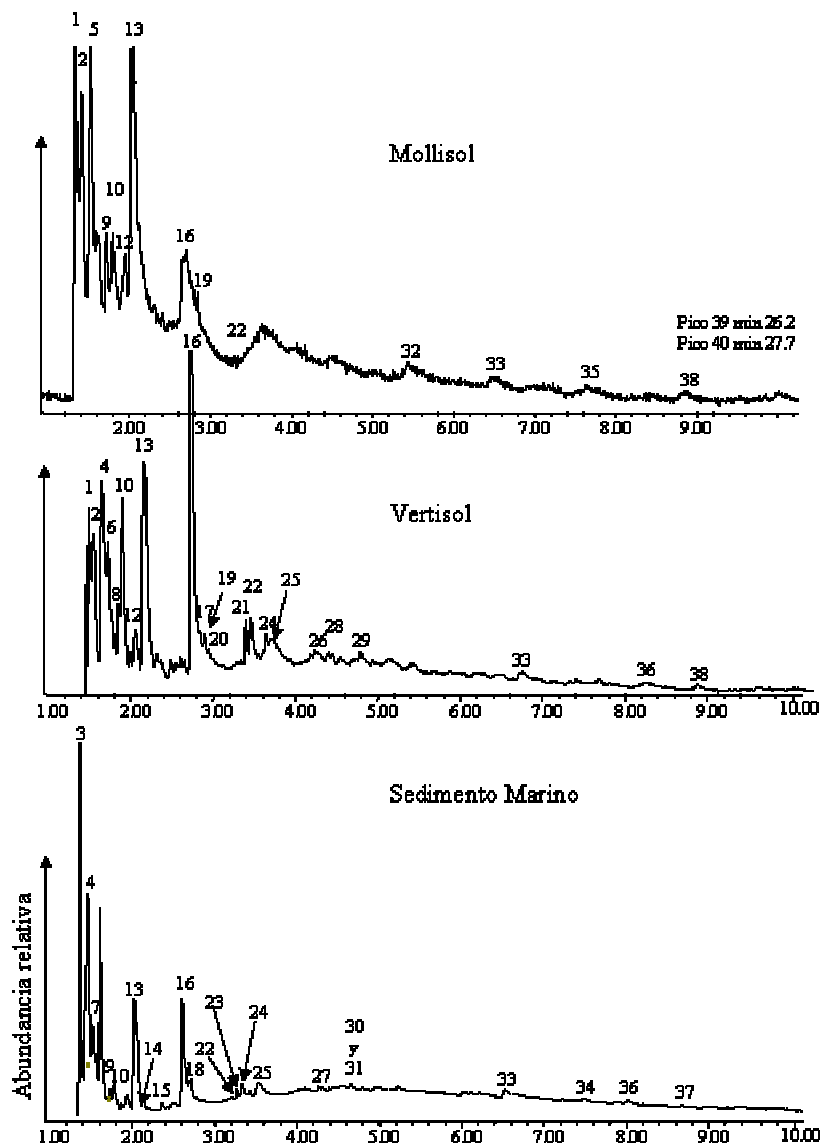


Figura 4.1.2a. Pirólisis en muestras de referencia de origen natural

**Tabla 4.1.2a. Compuestos identificados en la Pirólisis de muestras de referencia de origen natural**

n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra		
			Vertisol	Mollisol	Sedimento Marino
1	Etanol	U	1,51	10,86	0,00
2	2,5dihidrofurano	PS	7,44	9,92	0,00
3	SO2		0,00	0,00	26,10
4	pirazol	U	12,04	0,00	0,00
5	1,2 pentadieno	AL	0,00	10,83	8,56
6	propenitrilo	ART	7,02	0,00	0,00
7	CS2		0,00	0,00	15,35
8	3-metil,2,5dihidrofurano	PS	0,45	0,00	0,00
9	1-hexeno	ALI	2,32	2,50	0,99
10	2-metilfurano	PS	8,33	3,38	1,84
11	2-metilpropanonitrilo	ART	0,00	0,00	0,47
12	ciclohexadieno	U	1,82	2,68	0,00
13	benceno	U-Ar	19,91	21,60	18,89
14	1-hepteno	ALI	0,00	0,00	1,01
15	1-metil-1H-pirrol	PR	0,56	0,00	0,69
16	tolueno	U-Ar	23,35	3,18	12,89
17	piridina	PR	0,27	0,00	1,18
18	2-metiltiofeno	PS	0,00	0,00	1,79
19	1-octeno	ALI	0,68	0,79	0,00
20	2-octeno	ALI	0,28	0,00	0,00
21	etilbenceno	U-Ar	2,04	0,00	0,00
22	o-dimetilbenceno	U-Ar	1,95	17,59	0,16
23	1-noneno	ALI	0,00	0,00	0,39
24	m/p-dimetilbenceno	U-Ar	1,11	0,00	2,30
25	estireno	U/Cont	1,16	0,00	3,30
26	1,3,5-trimetilbenceno	U-Ar	1,72	0,00	0,20
27	1-deceno	ALI	0,00	0,00	0,58
28	1-metil-etilbenceno	U-Ar	0,54	0,00	0,00
29	benzofurano	PS	1,60	0,00	0,00
30	indeno	PP	0,00	0,00	0,27
31	1-dodeceno	ALI	0,00	0,00	0,27
32	bezonitrilo	CONT	0,00	4,19	0,00
33	naftaleno	U-Ar	1,13	2,31	1,49
34	1-trideceno	ALI	0,00	0,00	0,40
35	tetradecano	AL	0,00	4,45	0,00
36	1-metilnaftaleno	U-Ar	2,27	0,00	0,61
37	1-pentadeceno	ALI	0,00	0,00	0,28
38	hexadecano	AL	0,49	1,38	0,00
39	benzo(ghi)perileno	U-Ar	0,00	1,67	0,00
40	4-metil-benzo(ghi)perileno	U-Ar	0,00	2,65	0,00

Resultados en % respecto al área total identificada

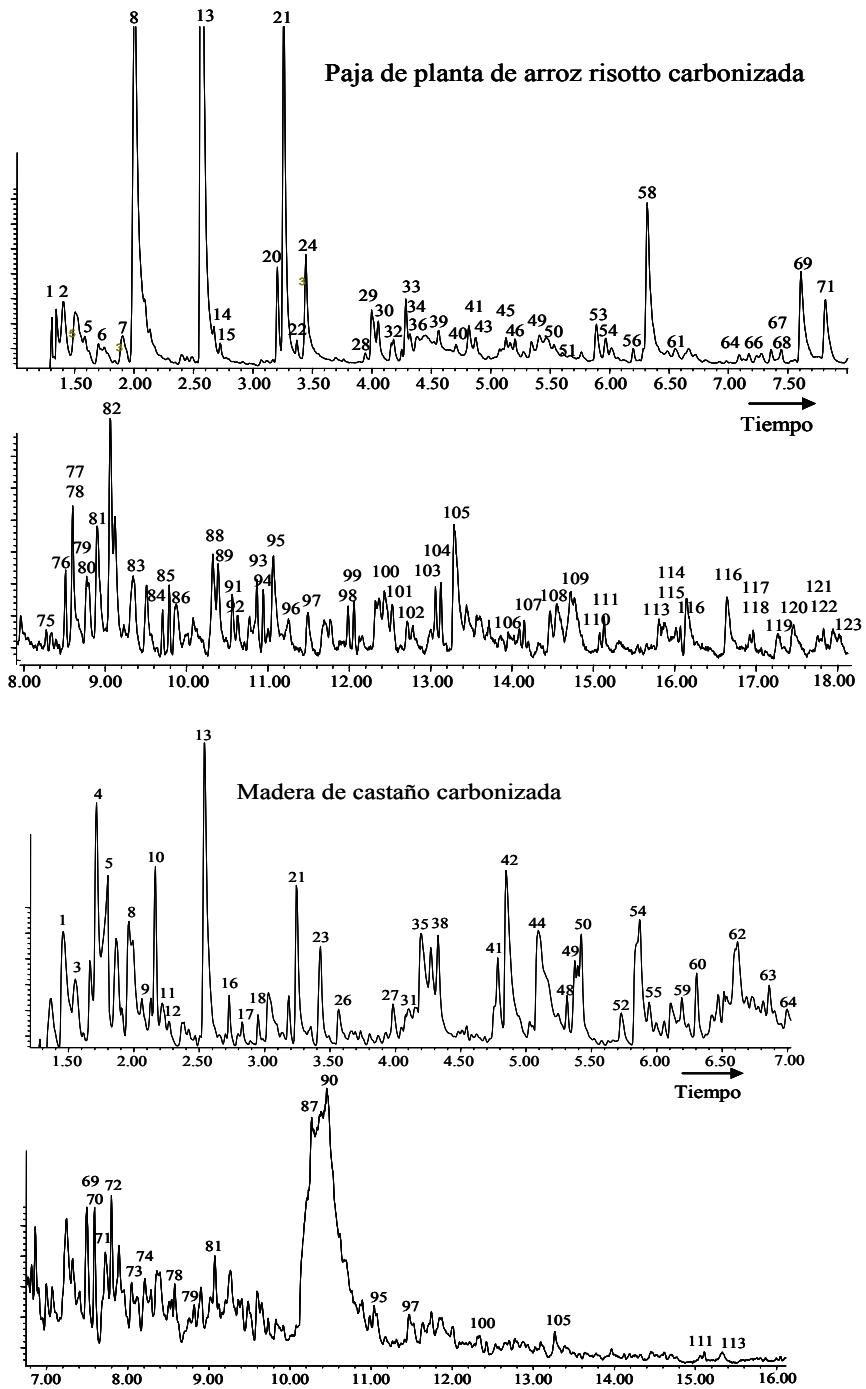


Figura 4.1.2b. Pirólisis de muestras pirogénicas producidas artificialmente

**Tabla 4.1.2b. Compuestos identificados en la Pirólisis de muestras pirogénicas producidas artificialmente**

n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra		n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra	
			Paja de arroz risotto carbonizada	Madera de castaño carbonizada				Paja de arroz risotto carbonizada	Madera de castaño carbonizada
1	1,3-pentadieno	ALI	1,74	1,79	64	1,1-dimetil-1H-Indeno	PR	0,13	0,42
2	2-metil-1-hexeno	AL	2,00	0,00	65	1,3-dimetil-1H-Indeno	PR	0,16	0,00
3	2-butenona	U	0,00	1,54	66	1,1-dimetil-1H-Indeno	PR	0,19	0,00
4	2-metilfuran	PS	0,00	3,82	67	1-trideceno	ALI	0,32	0,00
5	1,3-ciclohexadieno	U	0,44	2,12	68	tridecano	AL	0,25	0,00
6	ácido acético	Lip	5,73	0,00	69	2-metilnaftaleno	U-Ar	3,01	1,14
7	1-hepteno	ALI	0,85	0,00	70	2,4,6-trimetilindano	PR	0,00	1,57
8	benceno	U-Ar	17,41	3,07	71	8-metilnaftaleno	U-Ar	1,85	0,79
9	2-etilfuran	PS	0,00	0,42	72	2-metil-3-metoxifenol	LG	0,00	0,83
10	2,5-dimetilfuran	PS	0,00	2,85	73	metilcoumarina	U-Ar	0,00	0,42
11	3-piridinamina	PR	0,00	0,48	74	3-metil-2-benzopirano-2-ona	PR	0,00	0,65
12	1-metil-1,4-ciclohexadieno	U	0,00	0,55	75	heptil-benceno	U-Ar	0,08	0,00
13	tolueno	U-Ar	20,94	7,03	76	1-tetradeceno	ALI	0,21	0,00
14	1-octeno	ALI	0,54	0,00	77	tetradecano	AL	0,44	0,00
15	octano	AL	0,40	0,00	78	1-1'-bifenilo	U-Ar	0,09	0,70
16	2-etil,5-metilfuran	PS	0,00	0,69	79	1,2-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,44	0,53
17	3-metilfenol	U-Ar	0,00	0,42	80	2,6-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,65	0,00
18	1-ciclopentenona	U	0,00	1,83	81	1,6-dimetilnaftaleno	U-Ar	1,05	0,43
19	etilbenceno	U-Ar	0,00	0,70	82	2,3-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,65	0,00
20	1,3-dimetil benceno (m-xileno)	U-Ar	1,59	0,00	83	1,4-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,52	0,00
21	p-xileno	U-Ar	7,94	2,78	84	1-pentadeceno	ALI	0,13	0,00
22	1-noneno	ALI	0,27	0,00	85	pentadecano	AL	0,16	0,00
23	estireno	U/Cont	0,00	2,03	86	2-metil-1,1'-bifenilo	U-Ar	0,30	0,00
24	o/m-xileno	U-Ar	2,91	0,00	87	d-alosa	PS	0,00	7,41
25	4-acetil-3-metilpirazol	U	0,00	0,12	88	1,4,5-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,59	0,00
26	2-metil-2-ciclopentenona	U	0,00	0,89	89	2,3,6-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,44	0,00
27	3-etilideno-ciclohexano	U	0,00	0,67	90	levoglucosano (1,6 anhidro-beta-D-glucopiranososa)	PS	0,00	17,73
28	propilbenceno	U-Ar	0,20	0,00	91	1,6,7-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,24	0,00
29	1-etil-2-metilbenceno	U-Ar	1,24	0,00	92	1,4,6-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,14	0,00
30	1,3,5-trimetilbenceno	U-Ar	0,89	0,00	93	1-hexadeceno	ALI	0,29	0,00
31	5-metilfurfural	PS	0,00	0,43	94	hexadecano	AL	0,18	0,00
32	1-etil-3-metilbenceno	U-Ar	0,25	0,00	95	9H-fluoreno	U-Ar	0,53	0,48
33	1-deceno	ALI	0,31	0,00	96	9-metil-9H-fluoreno	U-Ar	0,09	0,00
34	decano	AL	0,16	0,00	97	4-metilidbenzofuran	PS	0,45	0,46
35	fenol	U-Ar	0,00	4,57	98	1-heptadeceno	ALI	0,15	0,00
36	1,2,3-trimetil-benceno	U-Ar	1,08	0,00	99	heptadecano	AL	0,18	0,00
37	m-metil-estireno	CONT	0,44	0,00	100	9-metil-9H-fluoreno	U-Ar	0,17	0,00
38	benzofuran	PS	0,00	2,12	101	2-metil-1H-fluoreno	U-Ar	0,93	0,13
39	1,2,4-trimetilbenceno	U-Ar	0,64	0,00	102	antraceno	U-Ar	0,13	0,00
40	1-etil-4-metilbenceno	U-Ar	0,34	0,00	103	1-octadeceno	ALI	0,21	0,00
41	1-H-Indeno	PR	0,79	1,69	104	octadecano	AL	0,19	0,00
42	o-cresol	U-Ar	0,00	4,84	105	fenantreno	U-Ar	1,57	0,41
43	tert-butilbenceno	U-Ar	0,50	0,00	106	1-nonadeceno	ALI	0,06	0,00
44	p/m-cresol	U-Ar	0,00	5,76	107	nonadecano	AL	0,08	0,00
45	1-undeceno	ALI	0,37	0,00	108	2-metilantraceno	U-Ar	0,62	0,00
46	undecano	AL	0,37	0,00	109	9-metilantraceno	U-Ar	0,72	0,00
47	2,6-dimetilstireno	CONT	0,14	0,00	110	1-eicoseno	ALI	0,05	0,00
48	3,5-xileno	U-Ar	0,00	0,99	111	eicosano	AL	0,11	0,07
49	7-metilbenzofuran	PS	0,70	0,49	112	dimetildibenzotiofeno	PR	0,00	0,22
50	2-metilbenzofuran	PS	0,79	2,62	113	2,5-dimetilfenantreno	U-Ar	0,17	0,00
51	1,2,3,5-tetrametilbenceno	U-Ar	0,23	0,48	114	1-heneicoseno	ALI	0,09	0,00
52	2,4-xileno	U-Ar	0,00	2,73	115	heneicosano	AL	0,09	0,00
53	1-metil-1H-Indeno	PR	1,24	0,00	116	pireno	U-Ar	0,67	0,00
54	naftaleno	U-Ar	0,27	1,16	117	1-docoseno	ALI	0,05	0,00
55	2,3-xileno (dimetilfenol)	U-Ar	0,00	0,50	118	docosano	AL	0,06	0,00
56	1-dodeceno	ALI	0,26	0,00	119	1-metilpireno	U-Ar	0,13	0,00
57	dodecano	AL	0,24	0,00	120	benzofluoreno	U-Ar	0,24	0,00
58	naftaleno	U-Ar	4,78	0,00	121	1-tricoseno	ALI	0,05	0,00
59	trimetilfenol	U-Ar	0,00	0,44	122	tricosano	AL	0,08	0,00
60	2-vinil-2,3-dihidrofuran	PS	0,00	0,41	123	metilpireno	U-Ar	0,06	0,00
61	4,7-dimetilbenzofuran	PS	0,38	0,00	124	1-tetracoseno	ALI	0,01	0,00
62	pirocatecol (1,2 bencenediol,3-metil)	PS	0,00	2,08	125	tetracosano	AL	0,04	0,00
63	4-etil-3-metilfenol	U-Ar	0,00	0,48	126	1,3-dimetilpireno	U-Ar	0,07	0,00

Resultados en % respecto al área total de picos identificados

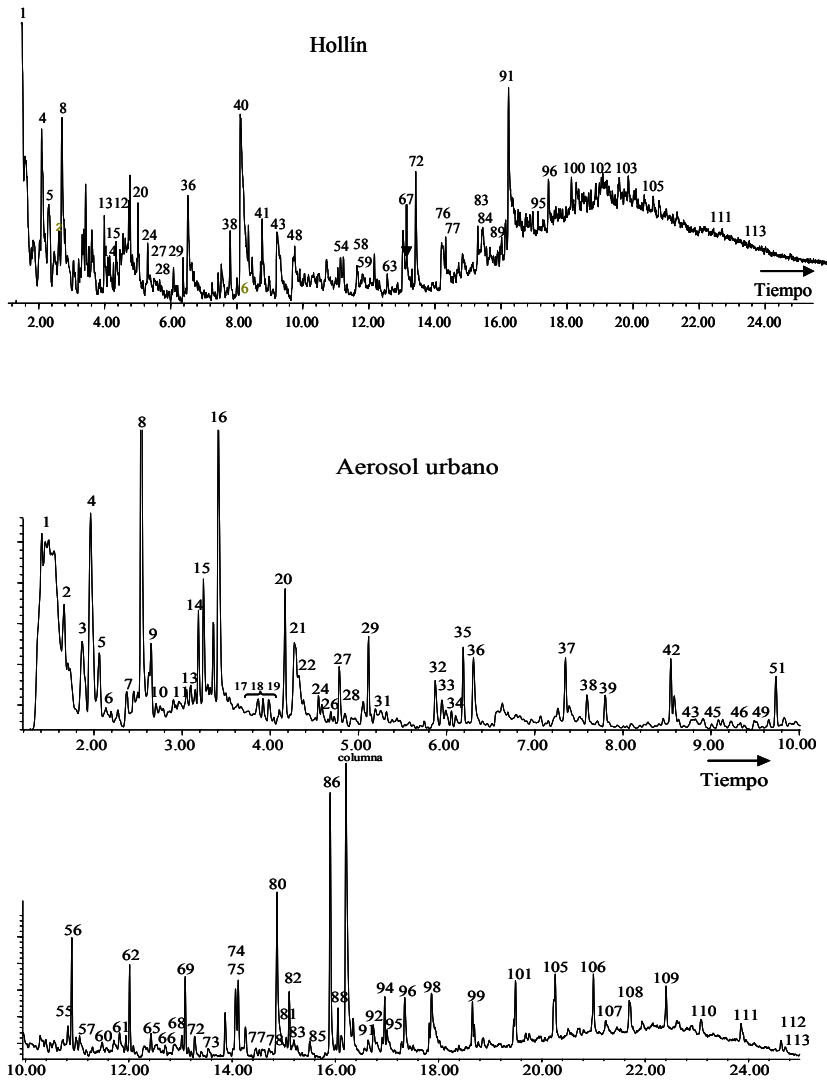


Figura 4.1.2c. Pirólisis de muestras de material particulado atmosférico rico en BC

**Tabla 4.1.2c. Compuestos identificados en la Pirólisis de muestras de material particulado atmosférico rico en BC**

n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra		n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra	
			Aerosol	Hollin				Aerosol	Hollin
1	SO2		25,62	45,04	58	1,3 isobenzofurandiona 4,7 dimetil	CONT	0,00	0,55
2	1-hexeno	ALI	1,96	0,00	59	2 hexil-2-ciclopentanona	U	0,00	0,87
3	1,4-ciclohexadieno	U	2,82	0,00	60	4-metildibenzofurano	PS	0,17	0,00
4	benceno	U-Ar	6,74	3,23	61	1,16-heptadecadieno	ALI	0,13	0,00
5	1-hepteno	ALI	1,59	2,74	62	1-heptadeceno	ALI	0,58	0,00
6	2-metil-2,4-hexadieno	ALI	0,32	0,00	63	2-hexil-tiofeno	U	0,00	0,51
7	piridina	PR	0,71	0,00	64	heptadecano	AL	0,03	0,00
8	tolueno	U-Ar	8,64	3,38	65	2-metil-9H-fluoreno	U-Ar	0,17	0,00
9	1-octeno	ALI	1,94	0,00	66	antraceno	U-Ar	0,10	0,00
10	3-octeno	ALI	0,29	0,00	67	fluorenona	U-Ar	0,00	1,67
11	2-metil-1-octeno	ALI	0,35	0,00	68	1,17-octadecadieno	ALI	0,10	0,00
12	4-acetoxipiridina	LG/PS	0,00	0,98	69	1-octadeceno	ALI	0,54	0,00
13	m-xileno	U-Ar	1,29	0,68	70	dibenzotiofeno	U-Ar	0,00	0,71
14	p-xileno	U-Ar	2,02	1,40	71	octadecano	AL	0,04	0,00
15	1-noneno	ALI	1,14	0,27	72	fenantreno	U-Ar	0,22	2,01
16	estireno	CONT	6,52	0,00	73	2-fenilbenzofurano	PS	0,11	0,00
17	2-propenilbenceno	U-Ar	0,38	0,00	74	2-cloroxanteno	U-Ar	0,60	0,00
18	propilbenceno	U-Ar	0,27	0,00	75	1-nonadeceno	ALI	0,52	0,00
19	1,2,3-trimetilbenceno	U-Ar	0,46	0,00	76	ácido 2,3-naftaleno dicarboxílico	U-Ar	0,00	1,82
20	1-decene	ALI	2,14	0,50	77	nonadecano	AL	0,05	0,65
21	1,3,5-trimetilbenceno	U-Ar	2,54	0,00	78	hexadecanitrilo	ART	0,22	0,00
22	benzofurano	PS	0,66	0,00	79	2-metilantraceno	U-Ar	0,09	0,00
23	benzotriilo	CONT	0,00	0,03	80	ácido palmítico	LIP	1,97	0,00
24	1,2,4-trimetilbenceno	U-Ar	0,43	0,57	81	1,19-eicosadieno	ALI	0,06	0,00
25	indano	PR	0,14	0,00	82	1-eicoseno	ALI	0,42	0,00
26	3-butenilbenceno	U-Ar	0,10	0,00	83	eicosano	AL	0,05	0,65
27	1-H-indeno	PR	0,97	0,02	84	9,10-antracenediona	U-Ar	0,00	1,41
28	n-butilbenceno	U-Ar	0,24	0,01	85	2-fenil-6-clorobenzofurano	PS	0,19	0,00
29	1-undeceno	ALI	1,12	0,71	86	3,6-dicloro-N-metilcarbazol	PR	2,30	0,00
30	undecano	AL	0,36	0,00	87	1,20-heneicosadieno	ALI	0,05	0,00
31	2,6-dimetilestireno	CONT	0,37	0,00	88	1-heneicoseno	ALI	0,31	0,00
32	1-metil-1H-indeno	PR	0,92	0,00	89	heneicosano	AL	0,23	0,41
33	2-metil-1H-indeno	PR	0,57	0,00	90	ciclopenta(def)fenantrenona	U-Ar	0,00	0,73
34	1,2,4,5-tetrametilbenceno	U-Ar	0,39	0,60	91	pireno	U-Ar	0,23	3,99
35	1-dodeceno	ALI	1,18	0,51	92	ácido esteárico	LIP	0,33	0,00
36	naftaleno	U-Ar	1,70	1,89	93	1,21-docosadieno	ALI	0,12	0,00
37	1-trideceno	ALI	1,11	0,00	94	1-docoseno	ALI	0,40	0,00
38	2-metilnaftaleno	U-Ar	0,65	1,25	95	docosano	AL	0,21	0,28
39	1-metilnaftaleno	U-Ar	0,69	0,00	96	alcano ramificado	AL	0,60	0,96
40	1,3 isobenzofurandiona (anhidrido ftálico)	CONT	0,00	9,80	97	1-tricoseno	ALI	0,19	0,00
41	éster 1,2 bencenodicarboxílico	CONT	0,00	0,61	98	tricosano	AL	0,66	0,00
42	1-tetradeceno	ALI	1,03	0,00	99	1-tetracoseno	ALI	0,35	0,00
43	1,1'-bifenilo	U-Ar	0,39	1,03	100	tetracosano	AL	0,15	0,75
44	tetradecano	AL	0,17	0,00	101	1-pentacoseno	ALI	0,18	0,00
45	1,2-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,36	0,00	102	pentacosano	AL	0,42	1,26
46	1,6-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,15	0,00	103	alcano ramificado	AL	0,00	0,90
47	1,5-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,10	0,00	104	1-hexacoseno	ALI	0,23	0,00
48	1,3 isobenzofurandiona, 4 metil(anhidrido ftálico, 3 metil)	CONT	0,00	2,28	105	hexacosano	AL	0,38	0,54
49	dimetilnaftaleno	U-Ar	0,13	0,00	106	1-heptacoseno	ALI	0,45	0,00
50	1,14-pentadecadieno	ALI	0,16	0,00	107	heptacosano	AL	0,33	0,00
51	1-pentadeceno	ALI	0,87	0,00	108	1-octacoseno	ALI	0,47	0,00
52	pentadecano	AL	0,19	0,00	109	nonacoseno	ALI	0,37	0,00
53	1,4,5-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,15	0,00	110	triacontano	AL	0,21	0,00
54	1,3 isobenzofurandiona 5,6 dimetil	CONT	0,00	0,82	111	henetriacontano	AL	0,21	0,37
55	1,15-hexadecadieno	ALI	0,10	0,00	112	1-dotriaconteno	ALI	0,13	0,00
56	1-hexadeceno	ALI	0,76	0,00	113	dotriacontano	AL	0,07	0,42

Resultados en % respecto al área total identificada



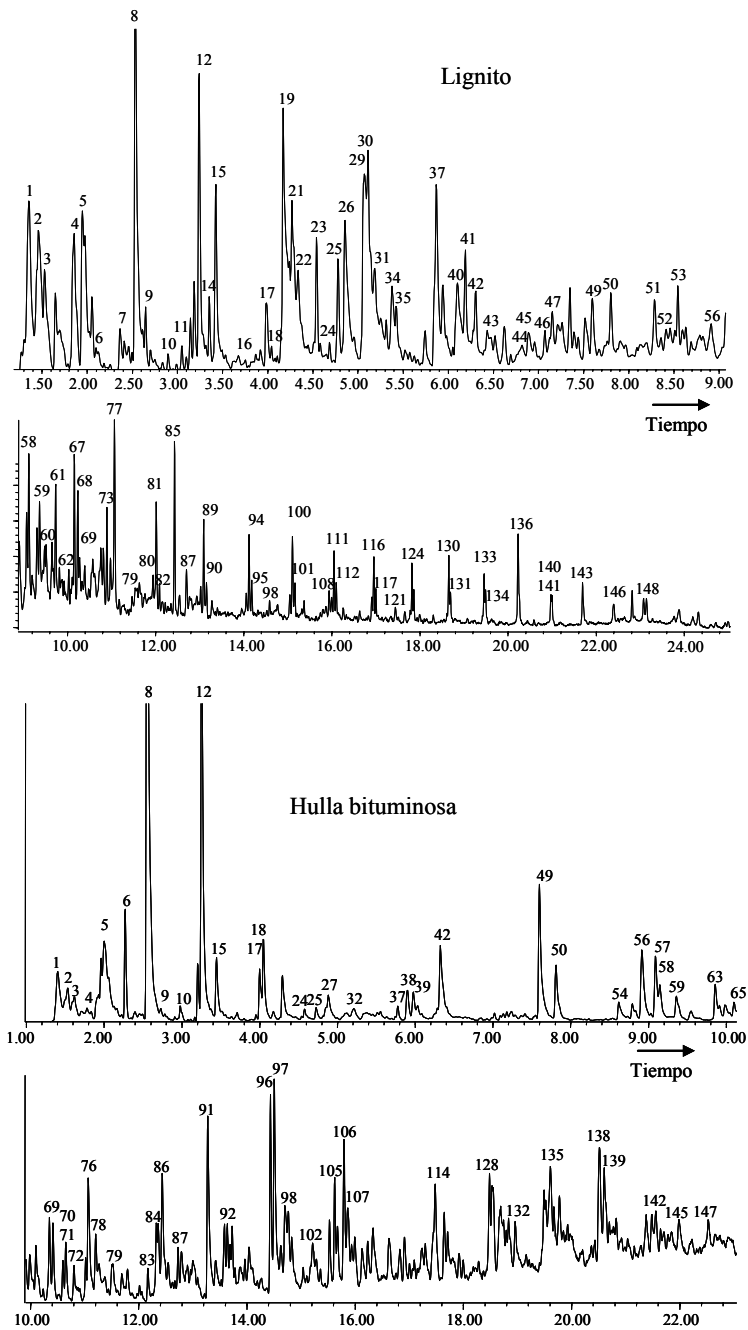


Figura 4.1.2d. Pirólisis de muestras de material bituminoso

**Tabla 4.1.2d. Compuestos identificados en la Pirólisis de muestras de material bituminoso**

n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra		n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra	
			Lignito	Hulla Bituminosa				Lignito	Hulla Bituminosa
1	SO2		3,26	2,26	75	3,4-dimetil-4,4'-bifenilo	U-Ar	0,00	0,25
2	1,3-pentadieno	ALI	3,34	1,56	76	dimetil-bifenilo	U-Ar	0,00	1,14
3	1-hexeno	ALI	1,11	0,15	77	1,6,7-trimetilnaftaleno	U-Ar	1,57	0,00
4	1,3-hexadieno	ALI	3,46	0,34	78	3,3'-dimetil-1,1'-bifenilo	U-Ar	0,00	0,51
5	benceno	U-Ar	4,01	4,37	79	4-metil-dibenzofurano	PS	0,25	0,26
6	1-hepteno	ALI	0,74	2,05	80	1,16-heptadecadieno	ALI	0,25	0,00
7	1,3,5-heptatrieno	ALI	0,64	0,22	81	1-heptadeceno	ALI	0,77	0,00
8	tolueno	U-Ar	7,42	17,54	82	heptadecano	AL	0,17	0,00
9	1-octeno	ALI	0,65	0,24	83	2-metil-9H-fluoreno	U-Ar	0,00	0,53
10	2-metil-1-octeno	ALI	0,30	0,26	84	1-metil-9H-fluoreno	U-Ar	0,00	1,11
11	o-xileno	U-Ar	0,90	1,10	85	2-metil-1H-heptadecano	U-Ar	1,06	0,00
12	p-xileno	U-Ar	3,83	9,72	86	2-metil-9H-fluoreno	U-Ar	0,21	0,55
13	2,4-dimetiltiofeno	PS	0,08	0,00	87	antraceno	U-Ar	0,43	0,39
14	1-noneno	ALI	0,63	0,00	88	1,17-octadecadieno	ALI	0,17	0,00
15	m-xileno	U-Ar	2,61	1,47	89	1-octadeceno	ALI	0,60	0,00
16	2-propilbenceno	U-Ar	0,12	0,07	90	1-octadeceno	ALI	0,15	0,00
17	1,2,3-trimetilbenceno	U-Ar	1,14	1,14	91	fenantreno	U-Ar	0,14	2,06
18	1,3,5-trimetilbenceno	U-Ar	0,17	3,19	92	2,3-dimetil-9H-fluoreno	U-Ar	0,00	0,48
19	fenol	U-Ar	5,79	0,00	93	1,18-nonadecadieno	ALI	0,14	0,00
20	decano	AL	0,52	0,00	94	1-nonadeceno	ALI	0,49	0,00
21	trimetilbenceno	U-Ar	3,31	0,00	95	nonadecano	AL	0,21	0,00
22	benzofurano	PS	1,64	0,00	96	2-metilntraceno	U-Ar	0,00	1,62
23	1,2,4-trimetilbenceno	U-Ar	1,20	0,00	97	1-metilntraceno	U-Ar	0,00	0,35
24	indano	PR	0,21	0,31	98	2-metilfenantreno	U-Ar	0,13	2,50
25	indeno	PR	1,53	0,32	99	1,19-eicosadieno	ALI	0,15	0,00
26	o-cresol	U-Ar	3,37	0,32	101	1-eicoseno	ALI	0,53	0,00
27	4-etil-1,2-dimetilbenceno	U-Ar	0,00	0,77	101	3-eicoseno	ALI	0,21	0,00
28	n-butilbenceno	U-Ar	0,20	0,00	102	2-fenilnaftaleno	U-Ar	0,00	0,44
29	p-cresol	U-Ar	4,41	0,00	103	1,4-dimetilntraceno	U-Ar	0,00	0,10
30	1-undeceno	ALI	3,56	0,00	104	3,6-dimetilfenantreno	U-Ar	0,00	0,54
31	dimetilestireno	CONT	1,09	0,00	105	2,7-dimetilfenantreno	U-Ar	0,00	0,82
32	n-butilbenceno	CONT	0,00	0,46	106	dimetilfenantreno	U-Ar	0,00	1,09
33	7-metilbenzofurano	PS	0,31	0,00	107	2,5-dimetilfenantreno	U-Ar	0,00	0,80
34	2-metilbenzofurano	PS	1,38	0,00	108	eicosano	AL	0,21	0,00
35	metilbenzofurano	PS	0,92	0,00	109	dimetilfenantreno	U-Ar	0,00	0,21
36	1,2,4,5-tetrametilbenceno	U-Ar	0,12	0,00	110	1,20-heneicosadieno	ALI	0,09	0,00
37	5-metil-indano	PR	4,17	0,38	111	1-heneicoseno	ALI	0,37	0,00
38	2-metil-1H-indeno	PR	0,12	0,91	112	heneicosano	AL	0,19	0,00
39	azuleno	U-Ar	0,21	0,53	113	pireno	U-Ar	0,11	0,00
40	3-etilfenol	U-Ar	2,14	0,00	114	2,3,5-trimetilfenantreno	U-Ar	0,00	0,79
41	1-dodeceno	ALI	1,20	0,00	115	1,21-docosadieno	ALI	0,15	0,00
42	naftaleno	U-Ar	0,88	2,89	116	1-docoseno	ALI	0,45	0,00
43	4,7-dimetilbenzofurano	PS	0,71	0,00	117	docosano	AL	0,19	0,00
44	2-etil-1H-indeno	PR	0,20	0,00	118	2,3,5-trimetilfenantreno	U-Ar	0,00	0,10
45	1,3-dimetil-1H-indeno	PR	0,26	0,14	119	11H-benzofluoreno	U-Ar	0,00	0,36
46	2,3-dimetil-1H-indeno	PR	0,42	0,23	120	4,8-dimetil-6-fenilazuleno	U-Ar	0,00	0,30
47	1-trideceno	ALI	0,86	0,00	121	2,4,5,7-tetrametilfenantreno	U-Ar	0,16	0,00
48	tridecano	AL	0,18	0,00	122	benzofluoreno	U-Ar	0,00	1,64
49	1-metilnaftaleno	U-Ar	0,96	4,35	123	1,22-tricosadieno	ALI	0,06	0,00
50	2-metilnaftaleno	U-Ar	0,88	1,75	124	1-tricoseno	ALI	0,32	0,00
51	1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetilnaftaleno	U-Ar	1,00	0,00	125	tricosano	AL	0,20	0,00
52	1,13-tetradecadieno	ALI	0,22	0,00	126	1-metilpireno	U-Ar	0,00	0,38
53	1-tetradeceno	ALI	0,63	0,00	127	1,3-dimetilpireno	U-Ar	0,00	0,91
54	1,1'-bifenilo	U-Ar	0,00	0,55	128	dimetilpireno	U-Ar	0,00	2,08
55	tetradecano	AL	0,18	0,00	129	1,23-tetracosadieno	ALI	0,06	0,00
56	2,7-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,94	2,55	130	1-tetracoseno	ALI	0,41	0,00
57	1,2-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,58	1,66	131	tetracosano	AL	0,17	0,00
58	1,6-dimetilnaftaleno	U-Ar	1,07	0,97	132	benzo(b)nafto (2,3-d)tiofeno	U-Ar	0,00	0,48
59	2,3-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,61	1,01	133	1-pentacoseno	ALI	0,38	0,00
60	dimetilnaftaleno	U-Ar	0,32	0,33	134	pentacosano	AL	0,26	0,00
61	1-pentadeceno	ALI	0,73	0,00	135	criseno	U-Ar	0,00	1,16
62	pentadecano	AL	0,16	0,00	136	1-hexacoseno	ALI	0,68	0,00
63	4-metil-1,1'-bifenilo	U-Ar	0,00	0,95	137	hexacosano	AL	0,22	0,00
64	1-isopropilnaftaleno	U-Ar	0,00	0,32	138	2-metilcriseno	U-Ar	0,00	1,44
65	2-metil-1,1'-bifenilo	U-Ar	0,00	0,37	139	5-metilcriseno	U-Ar	0,00	0,91
66	isopropilnaftaleno	U-Ar	0,00	0,39	140	1-heptacoseno	ALI	0,27	0,00
67	valenceno/alfa-pachuleno	U-Ar	1,02	0,00	141	heptacosano	AL	0,21	0,00
68	dibenzofurano	PS	0,23	0,00	142	dimetilbenzo(c)fenantreno	U-Ar	0,00	2,08
69	2,3,6-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,24	0,72	143	1-octacoseno	ALI	0,29	0,00
70	1,4,7-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,31	0,61	144	octacosano	ALI	0,13	0,00
71	1,6,7-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,00	0,33	145	benzo(K)luoranteno	U-Ar	0,00	0,46
72	1,4,6-trimetilnaftaleno	U-Ar	0,00	0,48	146	nonacosano	AL	0,28	0,00
73	1-hexadeceno	ALI	0,62	0,00	147	benzo(a)pireno	U-Ar	0,00	0,39
74	hexadecano	AL	0,23	0,00	148	tricosano	AL	0,27	0,00

Resultados en % respecto al área total identificada

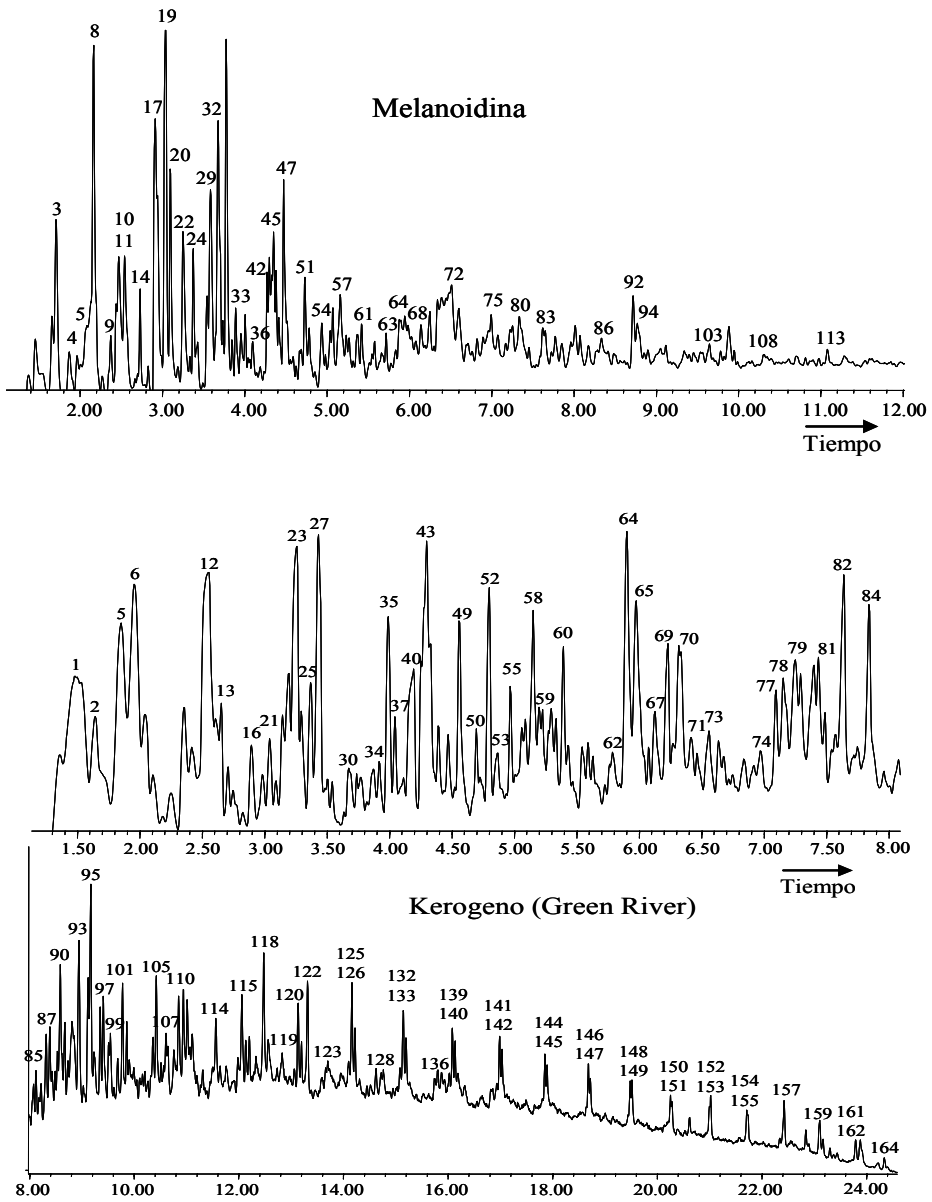


Figura 4.1.2e. Pirólisis de muestras de material que podría interferir en la detección de BC

Tabla 4.1.2e. Compuestos identificados en la pirólisis de muestras de material de referencia que podrían interferir en la detección de BC

n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra		n°	Nombre del compuesto	Origen	Muestra	
			Kerógeno (Green River)	Melanoidina				Kerógeno (Green River)	Melanoidina
1	1,3-pentadieno	ALI	4,77	0,00	84	1-metilnaftaleno	U-Ar	2,25	0,00
2	1-hexeno	ALI	2,15	0,00	85	tetradecadieno	ALI	0,32	0,00
3	2-metilfurano	PS	0,00	4,65	86	8-metilquinolina	U	0,00	0,90
4	1-metil,1,3-ciclopentadieno	U	0,00	1,63	87	tetradecano	AL	0,76	0,00
5	benceno	U-Ar	5,15	0,80	88	tetradecadieno	ALI	0,26	0,00
6	1-hepteno	ALI	1,27	0,00	89	1,2,3-trimetilindeno	PR	0,37	0,00
7	ácido acético	LIP	0,00	0,89	90	1-tetradeceno	ALI	0,99	0,00
8	2,5-dimetilfurano	PS	0,00	8,28	91	4,6-dimetilidodecano	AL	0,60	0,00
9	vinilfurano	PS	0,00	0,48	92	dimetilindol	PR	0,00	1,67
10	3-metil,1H-pirrol	PR	0,00	1,57	93	1,2-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,84	0,00
11	pirridina	PR	0,00	3,50	94	2,3-dimetilnaftaleno	U-Ar	0,45	0,26
12	tolueno	U-Ar	5,31	3,89	95	1,3-dimetilnaftaleno	U-Ar	1,75	0,00
13	1-octeno	ALI	0,89	0,00	96	1,5-dimetilnaftaleno	U-Ar	1,14	0,33
14	2-etil,5-metilfurano	PS	0,00	1,31	97	dimetilnaftaleno	U-Ar	2,38	0,00
15	2,3,5-trimetilfurano	PS	0,00	0,50	98	bifenilo	U-Ar	0,42	0,00
16	3,5-dimetilciclohexeno	PS	0,78	0,00	99	7-metiltetradecano	AL	0,72	0,00
17	4-metilpiridina	PR	0,00	7,30	100	11,13-pentadecadieno	ALI	0,35	0,00
18	3-metilfenol	U-Ar	0,00	1,67	101	1-pentadeceno	ALI	0,81	0,00
19	1-metil,1H-pirrol	PR	0,00	7,85	102	pentadecano	AL	0,38	0,00
20	3-metil,1H-pirrol	PR	0,00	3,64	103	2,5-dimetilindol	PR	0,00	0,85
21	etilbenceno	U-Ar	1,35	0,00	104	1,4,5-trimetilnaftaleno	PR	0,36	0,00
22	2-metilpiridina	PR	0,00	3,95	105	2,3,6-trimetilnaftaleno	PR	0,79	0,00
23	1,3-dimetilbenceno	U-Ar	3,35	0,00	106	1,6,7-trimetilnaftaleno	PR	0,32	0,00
24	2-metil-5-propilfurano	PS	0,00	0,41	107	trimetilnaftaleno	PR	0,36	0,00
25	1-noneno	ALI	1,17	0,00	108	1,2,3-trimetil-1H-indol	PR	0,00	0,26
26	2,6-dimetilpiridina	PR	0,00	2,18	109	hexadecadieno	ALI	0,78	0,00
27	estireno	CONT	3,30	0,00	110	1-hexadeceno	ALI	0,90	0,00
28	2-etilpiridina	PR	0,00	1,78	111	hexadecano	AL	0,67	0,00
29	2,6-dimetilpirazina	PR	0,00	4,90	112	9-H-fluoreno	U-Ar	0,35	0,00
30	2,3-dimetil-1H-pirrol	PR	0,56	0,00	113	2,3,5-trimetil-1H-indol	PR	0,00	0,34
31	etenilpirazina	PR	0,00	0,80	114	3-metilhexadecano	AL	0,56	0,00
32	3,5-dimetil-1H-pirrol	PR	0,31	6,35	115	1-heptadeceno	ALI	0,82	0,00
33	3-etil-1H-pirrol	PR	0,00	0,51	116	heptadecano	ALI	0,41	0,00
34	n-propilbenceno	U-Ar	0,44	0,00	117	9-metil-9-H-fluoreno	U-Ar	0,23	0,00
35	1-etil,2-metilbenceno	U-Ar	2,05	0,00	118	2-metil-9-H-fluoreno	U-Ar	0,60	0,00
36	2-etil,6-metilpiridina	PR	0,00	0,67	119	1-metil-9-H-fluoreno	U-Ar	0,33	0,00
37	1,3,5-trimetilbenceno	U-Ar	0,56	0,00	120	1-octadeceno	ALI	0,65	0,00
38	1-etil,3-metilbenceno	U-Ar	1,15	0,00	121	octadecano	AL	0,26	0,00
39	1-deceno	ALI	0,88	0,00	122	pristano	AL	0,83	0,00
40	2,3,5-trimetilpiridina	PR	1,12	0,00	123	2,3-dimetil-9-H-fluoreno	U-Ar	0,20	0,00
41	2,3,6-trimetilpiridina	PR	0,00	1,25	124	nonadecadieno	ALI	0,21	0,00
42	2-etil-6-metilpirazina	PR	0,00	1,53	125	1-nonadeceno	ALI	0,93	0,00
43	p-metil estireno	CONT	1,44	0,00	126	nonadecano	AL	0,45	0,00
44	fenol	U-Ar	0,00	0,93	127	1-metilnitraceno	U-Ar	0,12	0,00
45	2,3,5-trimetilpirazina	PR	0,00	1,73	128	2-metilnitraceno	U-Ar	0,18	0,00
46	4-etil-2-metilpirrol	PR	0,00	0,83	129	metilfenantreno	U-Ar	0,32	0,00
47	2,3,4-trimetilpirrol	PR	0,00	3,34	130	metilnitraceno	U-Ar	0,47	0,00
48	2-etil,5-metilpirazina	PR	0,00	0,33	131	eicosadieno	AL	0,22	0,00
49	1,3,5-trimetilbenceno	U-Ar	1,89	0,00	132	1-eicoseno	ALI	0,74	0,00
50	indano	PR	0,54	0,00	133	eicosano	AL	0,46	0,00
51	2,3-dimetil-2-ciclopenten-1-ona	U	0,00	1,99	134	2-etilnitraceno	U-Ar	0,17	0,00
52	indeno	PR	1,91	1,03	135	isocopalina	U-Ar	0,19	0,00
53	m-isopropilbenceno	U-Ar	0,46	0,00	136	2,5-dimetilfenantreno	U-Ar	0,29	0,00
54	m-cresol	U-Ar	0,00	1,69	137	2,7-dimetilfenantreno	U-Ar	0,29	0,00
55	1,2,4,5-tetrametilbenceno	U-Ar	0,40	0,00	138	heneicosadieno	ALI	0,12	0,00
56	p-oxitolueno	U-Ar	0,00	0,99	139	1-heneicoseno	ALI	0,47	0,00
57	p-cresol	U-Ar	0,00	2,41	140	heneicosano	AL	0,36	0,00
58	2-metil,1-propenilbenceno	U-Ar	0,51	0,00	141	1-docoseno	ALI	0,59	0,00
59	undecano	ALI	0,44	0,00	142	docosano	AL	0,45	0,00
60	2,6-dimetilestireno	CONT	0,42	0,00	143	benzofluoreno	U-Ar	0,17	0,00
61	2-metilbenzofurano	PS	0,00	1,10	144	1-tricoseno	ALI	0,31	0,00
62	2,4-dimetilestireno	CONT	0,33	0,00	145	tricosano	AL	0,32	0,00
63	indol	PR	0,00	0,61	146	1-tetracoseno	ALI	0,38	0,00
64	1-metil-1H-indeno	PR	3,60	0,58	147	tetracosano	AL	0,27	0,00
65	2-metil-1H-indeno	PR	2,81	0,00	148	1-pentacoseno	ALI	0,35	0,00
66	2,5-xileno	U-Ar	0,00	0,60	149	pentacosano	AL	0,35	0,00
67	dodecano	ALI	1,49	0,00	150	1-hexacoseno	ALI	0,25	0,00
68	4-metoxibenzamina	PR	0,00	0,75	151	hexacosano	AL	0,17	0,00
69	azuleno (naftaleno)	U-Ar	0,92	0,00	152	1-heptacosano	ALI	0,16	0,00
70	naftaleno	U-Ar	0,81	0,00	153	heptacosano	AL	0,26	0,00
71	metil-undecano	ALI	0,16	0,00	154	1-octacoseno	ALI	0,19	0,00
72	2-H-1-benzopirano-2-ona	PR	0,00	1,76	155	octacosano	AL	0,17	0,00
73	2,4,6-trimetilfenol	U-Ar	0,47	0,00	156	α-colestano	LIP	0,07	0,00
74	2,3,5-trimetilfenol	U-Ar	0,53	0,00	157	nonacosano	AL	0,45	0,00
75	3-metil-indol	PR	0,00	1,23	158	triacontano	LIP	0,35	0,00
76	1,3-dimetil-1H-indeno	PR	1,01	0,00	159	hopano	LIP	0,12	0,00
77	2,3-dimetil-1H-indeno	PR	1,05	0,00	160	5α-estigmastano	LIP	0,13	0,00
78	1,1-dimetil-1H-indeno	PR	0,86	0,00	161	5α-estigmastano	LIP	0,19	0,00
79	1-trideceno	ALI	1,21	0,00	162	heneτριαcontano	AL	0,16	0,00
80	2,3-dihidro-1H-inden-1-ona	PR	0,00	0,44	163	28-Nor-17β(H) hopano	LIP	0,11	0,00
81	tridecano	AL	0,49	0,00	164	(17α H2)1β(H) hopano	LIP	0,42	0,00
82	2-metilnaftaleno	U-Ar	2,58	0,00	165	dotriacontano	AL	0,06	0,00
83	dimetilindol	PR	0,00	0,76					

Los resultados representan el porcentaje (%) de cada compuesto respecto al área total de compuestos identificados

A simple vista se observan notables diferencias en los pirogramas de las distintas muestras de referencia, lo que su utilidad en la caracterización molecular de las muestras.

Para facilitar la discusión en la Tabla 4.1.2f se muestran agrupados en las familias señaladas los productos de pirólisis de todas las muestras, excepto los compuestos considerados artefactos (ART), la Tabla muestra los valores globales correspondientes al área identificada para cada familia de compuestos, separado según su precursor biogénico conocido.

**Tabla 4.1.2f Valores globales de áreas correspondientes a cada tipo de compuesto identificado**

	MUESTRA	CONTENIDO EN CADA TIPO DE COMPUESTO						
		PS	AL	ALI	AL + ALI	PR	U-Ar	CONT
Muestras de origen natural	Vertisol	17,82	0,49	0,69	1,45	0,83	54,03	1,16
	Mollisol	13,31	16,67	0,79	17,46	0	49,01	4,19
	Sedimento Marino	3,63	8,56	2,93	11,49	2,93	39,54	3,30
	Aerosol urbano	1,13	2,96	21,67	24,62	5,48	29,24	6,90
Material producido en BC	Hollín	0	5,84	4,72	10,65	0,02	26,39	14,09
	Paja de arroz carbonizada	2,32	5,04	5,98	11,03	1,28	77,49	0,57
	Madera de castaño carbonizada	41,54	0,07	1,79	1,86	5,03	40,99	2,03
Material potencialmente interferente	Lignito	5,52	3,96	26,09	30,05	6,92	53,58	1,09
	Hulla bituminosa	0,26	0	4,83	4,83	2,29	89,38	0,46
	Kerógeno (Green River)	0,78	8,51	25,42	33,94	14,07	41,08	5,50
	Melanoidina	15,15	0	0	0	59,98	13,57	0

PS: Polisacáridos; AL: Alcanos; ALI: Alquenos; PR: Proteínas; U-Ar: Sin precursor único y estructura aromática; CONT: Contaminantes

*Muestras de suelos y sedimento marino*

En general presentan elevado contenido en compuestos derivados del benceno (U-Ar), lo que sugiere la importancia de la fracción aromática en el conjunto de la matriz. La variedad y cantidad de material pirolizado menor que en el resto de las muestras, no obstante destaca la presencia de alcanos en el Mollisol, mientras que la muestra de Vertisol presentó una mayor riqueza en compuestos derivados de polisacáridos (18,82%). En la muestra de sedimento marino cabe señalar la presencia importante de alquenos y compuestos derivados de material proteico, abundantes

generalmente en la MO marina y que apenas aparecen en las muestras de suelos estudiados, así como la presencia de compuestos azufrados, que representan más de un 40 % del total de material pirolizado en el sedimento marino.

*Muestras pirogénicas producidas artificialmente y material particulado atmosférico rico en BC*

En este grupo de cuatro muestras, constituido por dos materiales producidos artificialmente, una muestra de Madera de Castaño y otra de Planta de Arroz Risotto carbonizados, y dos muestras constituidas por material de pequeño tamaño de partícula ricas en BC como son Aerosol-polvo recolectado en un área urbana y Hollín de un motor de combustión diesel, también se observa diferencias significativas entre los pirogramas.

Ross et al. (2005) y Mendiara et al. (2005) ya realizaron una caracterización detallada mediante pirólisis analítica de muestras de hollín obtenido de diferentes combustibles. En general observamos abundancia de compuestos azufrados y contaminantes (> 14 %), junto a la presencia de compuestos aromáticos y a la ausencia total de compuestos derivados de polisacáridos. Este comportamiento pirolítico es muy diferente al observado para la muestra obtenida a partir de madera, que se caracteriza por la riqueza en compuestos derivados de polisacáridos tanto en número como en abundancia (>41 % del área total). Por contra, el material pirolizado de la planta de arroz presentó una importante contribución de alcanos y alquenos (11 %) y una pobre presencia de polisacáridos. En la muestra de Aerosol es reseñable la liberación de compuestos azufrados y alquenos de elevado peso molecular.

*Muestras de carbones de diferente rango*

Las muestras de Lignito y Hulla dan lugar a comportamientos pirolíticos bien diferenciados. Además de la abundancia esperada en

compuestos aromáticos, el lignito mostró una gran riqueza en material alifático, observándose la presencia de una familia de pares de alcanos y alquenos, junto a algunos compuestos derivados de polisacáridos y proteínas.

La muestra de Hulla bituminosa, por otra parte, muestra un pirograma compuesto casi exclusivamente por compuestos aromáticos (>89 %), mientras que la contribución de compuestos derivados de polisacáridos y compuestos alifáticos es prácticamente testimonial.

*Materiales de referencia que podrían interferir en la detección de BC*

Las pirólisis realizadas sobre muestras de Kerógeno y Melanoidina mostraron diferencias significativas. Se observa una serie de compuestos de pirólisis que podrían ser utilizados como marcadores específicos de estas muestras, como es el caso de la aparición en la Melanoidina de furanos (derivados de polisacáridos), pirroles e indoles (derivados de polipéptidos) (van der Kaaden et al., 1983; Pouwels et al., 1989) y la liberación de indanos (derivados de polipéptidos) y hopanos en la muestra de Kerógeno.

La presencia de Nor-hopanoides, provenientes de la degradación del petróleo (Bennett et al., 2006), es consecuente con el origen de esta muestra.

No se detectó la presencia de alcanos, alquenos o contaminantes en la muestra de Melanoidina, y liberó los mismos productos de pirólisis que fueron identificados en estudios anteriores sobre melanoidinas sintéticas (Boon et al., 1984),

No pudieron identificarse compuestos derivados inequívocamente de la lignina en las pirólisis directas de las muestras de referencia, pero ello no significa que no estén presentes en las muestras estudiadas. Debemos tener en cuenta que la pirólisis a temperaturas elevadas impide la detección de aquellas estructuras funcionalizadas propensas a ser modificadas drásticamente y, por tanto, puede llevarnos a interpretaciones erróneas de

los resultados. Este es el caso de los compuestos derivados de la lignina, que suelen sufrir descarboxilaciones en condiciones de pirólisis directa (Martín et al., 1994; 1995). Como veremos más adelante estos productos se detectan con facilidad mediante pirólisis analítica en presencia de sales de TMAH.

No obstante, aunque parte de los compuestos fenólicos, muy abundantes en casi todas las muestras estudiadas, pueden tener una procedencia muy variada, como la celulosa para el fenol (Pastorova et al., 1994; Pouwels et al., 1989), la tirosina de las proteínas para *p*-cresol y fenol (Stankiewicz et al., 1996; Tsuge y Matsubara, 1985), macromoléculas como taninos (Galletti, 1991; Galletti y Reeves, 1992; Zhang, 1993), quitina (Stankiewicz et al., 1996), para otros autores (Saiz-Jimenez y de Leeuw; 1986b, Hatcher y Spiker; 1988 y Filley et al., 2002) la mayor parte de los productos fenólicos derivaría de restos de lignina severamente alterados. Así, la presencia de compuestos como el pirocatecol (aparece en el pirograma de la muestra MCar) es reconocida como indicativa de unidades des-metiladas formadas a partir de la degradación microbiana de lignina (Hatcher et al., 1988; Saiz-Jimenez y de Leeuw, 1986b; Stout et al., 1988), o bien representa un producto secundario de la degradación térmica de lignina (Murwanashyaka et al., 2001, Saiz-Jimenez, 1994; Sigleo, 1978).

#### **4.1.3 Análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ en estado sólido (CP MAS $^{13}\text{C}$ NMR)**

La espectroscopía de NMR de  $^{13}\text{C}$  es una poderosa herramienta para la caracterización estructural de matrices naturales complejas, ya que suministra información cualitativa y cuantitativa de los diferentes constituyentes de las mismas que contienen átomos de C. En las últimas décadas ha sido profusamente aplicada en estudios básicos y aplicados sobre diferentes formas de MO de suelos, aguas y sedimentos, dando lugar a una



gran abundancia de información bibliográfica (González Vila et al., 1976; 1983; Preston y Ripmeester, 1982; Hatcher et al., 1983; Preston, 1996; Skjemstad et al., 1997; González et al., 2003; Garcette-Lepecq et al., 2000).

Las asignaciones de las distintas bandas de los espectros en estado sólido de MO en matrices complejas (Wilson, 1987) se presentan en la Tabla 4.1.3a.

**Tabla 4.1.3.a: Asignaciones estructurales para los principales desplazamientos químicos en los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR**

<b>Desplazamientos químicos (ppm)</b>	<b>Asignaciones</b>
<b>185-245</b>	Carbonos de quinonas, cetonas y aldehídos
<b>185-160</b>	Carbonos de carbonilos, carboxilos, ésteres y amidas (péptidos)
<b>160-140</b>	Carbonos aromáticos sustituidos por grupos funcionales con O ó N, enlaces $\text{C}_{\text{ar}}-\text{C}$ sustituido a C-alifático excepto $\text{CH}_3$ , sub-unidades fenólicas y aril-éter de la lignina y taninos
<b>140-110</b>	$\text{C}_{\text{ar}}$ sustituido por grupos alquílicos y formando puentes C-H; carbonos internos de $\text{C}_{\text{ar}}$ condensado, $\text{C}_{\text{ar}}$ no sustituido; carbonos en $\text{C}_{\text{ar}}-\text{H}$ orto a $\text{C}_{\text{ar}}-\text{O}$ estructuras aromáticas (ligninas, taninos ) y olefinas
<b>110-60</b>	Carbonos anoméricos de polisacaridos ; Carbonos alifáticos sustituidos; C sustituidos por OH, O y N en polisacaridos y aminoácidos ; éteres alifáticos distintos a grupos metoxi o etoxi
<b>60-45</b>	Carbonos de los sustituyentes de la lignina, aminoácidos y aminoazúcares
<b>45-0</b>	Carbonos alifáticos no sustituidos; C en $\text{CH}_2$ en hidrocarburos de cadena larga saturados; C en CH y $\text{CH}_2$ unidos a anillos aromáticos; C en $\text{CH}_2$ en grupos alicíclicos y etilo, C alifático de péptidos, C en $\text{CH}_3$

$\text{C}_{\text{ar}}$  = Carbono aromático

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR en estado sólido de las 12 muestras de referencia se presentan en las Figuras 4.1.3a, b y c, mientras que la Tabla 4.1.3b recoge los valores de integración (%) de las principales regiones en las que se subdividen los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR.

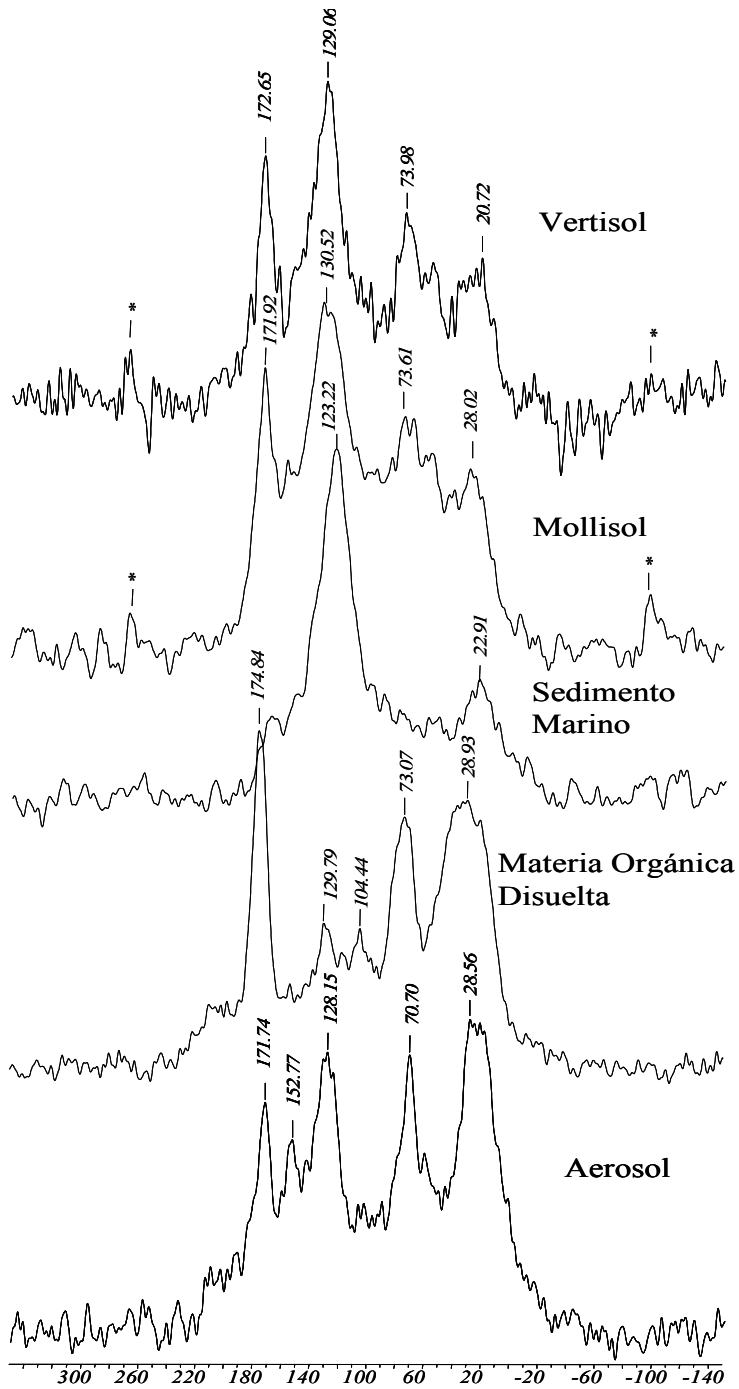


Figura 4.1.3a; Espectros CP MAS  $^{13}\text{C}$  NMR de muestras de referencia de origen natural

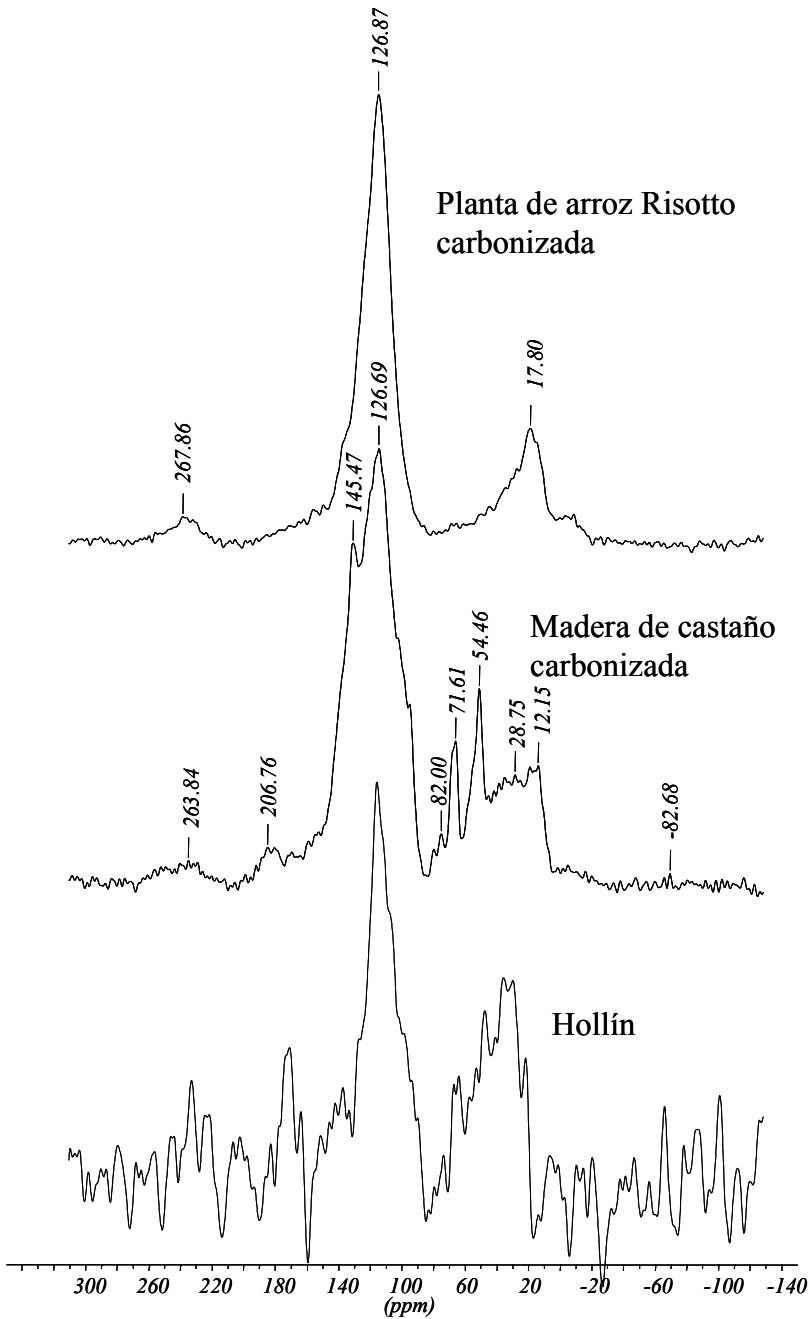


Figura 4.1.3b; Espectros CP MAS  $^{13}\text{C}$  NMR de muestras de materiales ricos en BC producidos artificialmente

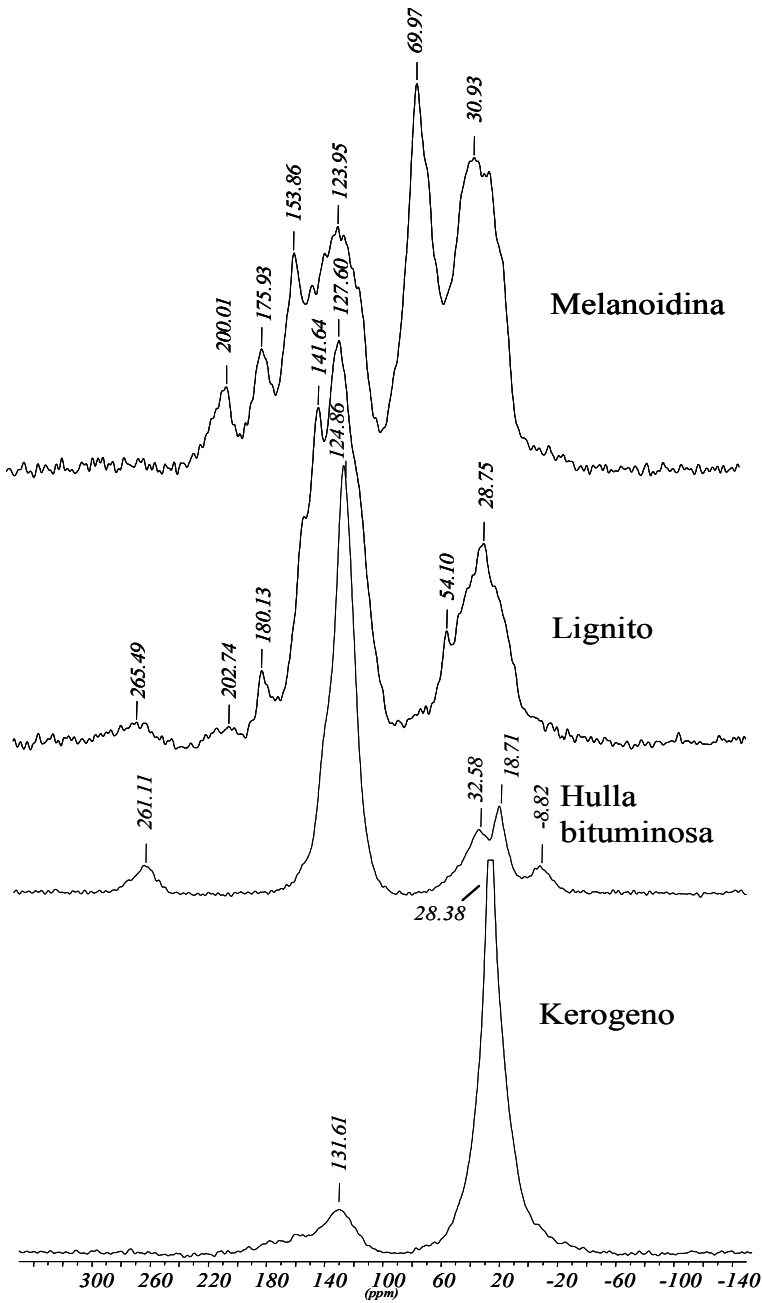


Figura 4.1.3b; Espectros CP MAS  $^{13}\text{C}$  NMR de muestras de materiales que pueden interferir en la detección de BC

**Tabla 4.1.3b; Integración (%) por regiones de los espectros CP MAS <sup>13</sup>C NMR de materiales de referencia de BC**

Muestra	C aldehídos y cetonas	C carboxílico y amidas	C aromático	O-alquil C	N-alquil y metoxil C	alquil-C
	ppm 245-185	185-160	160-110	110-60	60-45	45-0
Vertisol	3,67	13,52	37,16	21,41	6,67	17,58
Mollisol	2,10	12,87	36,34	26,09	7,12	15,49
Sedimento Marino	0,87	7,43	49,80	21,18	4,97	15,76
MO Disuelta	6,84	15,83	18,83	23,52	7,07	27,92
Aerosol	5,53	10,93	30,78	20,59	5,77	26,41
Planta arroz carbonizada	1,94	4,70	68,66	6,45	2,26	16,00
Madera castaño carbonizada	3,48	5,09	57,49	13,42	6,47	14,05
Hollín*	7,39	6,42	38,34	16,33	9,30	22,28
Melanoidina	4,68	6,60	29,81	23,04	7,54	28,32
Lignito	1,68	6,19	56,54	9,05	5,22	21,33
Hulla bituminosa	-0,35	0,97	77,06	3,14	2,03	17,16
Kerógeno	-0,13	1,94	14,88	4,18	6,76	72,38

\*El área medida para cada región en este espectro es meramente estimativa debido a la baja resolución espectral

En general, los espectros de las muestras de referencia de origen natural (Figura 4.1.3a) presentan una mayor variedad de formas carbonosas diferentes, confirmando la complejidad de estas muestras. Se observa presencia abundante de C aromático (110-160 ppm) en las muestras de suelos y sedimentos marinos, lo que justifica su elección para el análisis de BC. También se observa la presencia de C alquílicos (picos 20-29 ppm) que representan entre el 15 y el 28 % del total de formas carbonosas. La señal a 152 ppm en la muestra de Aerosol, que también aparece como un pequeño hombro a 146-151 ppm en las muestras de suelos, puede ser atribuida a carbonos C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> de moléculas de Guayacilo. La señal de C de grupos

metoxilo en la lignina suele aparecer a 56 ppm, y en estas muestras se observa un pequeño hombro en esa posición, aunque esta región solapa con la región de N-alquil C.

La muestra de MOD destaca por su riqueza alifática (27,9 % de C alquílico). También se observa un pico bien resuelto a 73 ppm, que corresponde a C unidos a átomos de Oxígeno (O). Este pico suele ser el más abundante en espectros de polisacáridos y refleja la contribución de carbohidratos a esta MOD fluvial. A 174 ppm aparece otro pico bien resuelto debido a la presencia de grupos carboxílicos. Este pico aparece en todas las muestras de origen natural (picos a 171-175 ppm), excepto en el sedimento marino, se asocia habitualmente a hemicelulosa aunque puede reflejar también la presencia de ácidos grasos esterificados dentro de una estructura macromolecular (Templier et al., 2005).

Los espectro de muestras ricas en BC producidas artificialmente se muestran en la Figura 4.1.3b. Antes de su interpretación debemos señalar que en la muestra de Hollín, la “escasez” de protones con respecto a la abundancia de C (ratio H/C=0,041 y TOC >92 %), hacen imposible obtener un espectro CP-MAS aceptable para esta muestra (Fernandes et al., 2003). En general el material carbonoso producido a temperaturas por encima de 800 °C es difícil de analizar mediante  $^{13}\text{C}$  NMR (Freitas et al., 1999) debido a que las capas aromáticas de conductividad elevada pueden producir un campo magnético al girar la muestra, llevándonos en general a una reducción de la señal obtenida y haciendo imposible afinar el rotor.

Experimentos comparativos de “*spin counting*” en polarización directa, es decir que sin aplicar la polarización cruzada  $^1\text{H-C}$ , que necesitan acumular una gran cantidad de “scans”, y permiten una cuantificación real de cada tipo de C en el espectro, han demostrado que solo el 29% del C aromático se observa mediante polarización cruzada (Smernik y Oades,

2000). Esto supondría que en muestras de estructuras aromáticas policondensadas como sería el caso de la muestra de Hollín la polarización cruzada infra-estima el contenido en C aromático, sobre-estimando por tanto el resto de formas de C.

Hecha esta importante anotación, los tres espectros de la Figura 4.1.3b están dominados por picos en la región de C aromático (110-160 ppm), centrados a 126-127 ppm. Ambos materiales carbonizados presentan en torno a un 15 % de señal en la región de C alquílico. En la muestra de planta carbonizada aparece un único pico en esta zona (17,8 ppm) atribuible a la presencia de estructuras alquílicas de cadena corta, que aparecieron también en los resultados de Py, mientras que en la muestra de madera carbonizada aparecen picos importantes en las regiones O- y N- alquílica (>20 %), apareciendo tres señales bien resueltas a 54,5, 71,6 y 82 ppm respectivamente, atribuidas a carbohidratos que están ausentes en la muestra de planta de arroz. Este resultado se muestra acorde con la fuerte presencia de picos derivados de carbohidratos observados mediante Py-GC/MS de la muestra, lo que indicaría que en la muestra de madera carbonizada una parte del C no ha sido transformado en estructuras condensadas aromáticas.

La Figura 4.1.3c muestra los espectros de NMR  $^{13}\text{C}$  de muestras de materiales que *a priori* podrían interferir en la detección de BC. Se observan claras diferencias que caracterizan a cada una de ellas.

El espectro obtenido para la muestra de Melanoidina artificial es similar a otros obtenidos para melanoidinas de este tipo (Allard et al., 1997), presenta dos picos de mayor importancia, el primero en una franja de 20-45 ppm que corresponde a C alifáticos no sustituidos, presenta un máximo a 31 ppm, que en este caso difícilmente podría asignarse a C de cadenas alquílicas, ya que esta muestra no contiene cadenas alquílicas largas en su composición. Por tanto, parte del área de este pico sería atribuible a formas

peptídicas (C-N). El segundo pico importante aparece centrado alrededor de 70 ppm y se atribuye generalmente a uniones C-O en unidades de pirano, reflejando en general la presencia importante de polisacáridos (Pastorova et al., 1994). También se observa un pico destacado centrado en 124 ppm característico de C aromáticos. El pico a 175 ppm correspondería a C de grupos carboxilo y con más probabilidad a amidas (péptidos) debido a la composición inicial de esta muestra artificial y al alto contenido en N. Por último a unos 200 ppm aparece un pico menor, que correspondería con la presencia de aldehídos o cetonas en la muestra.

Los espectros de Lignito y Hulla bituminosa presentan ciertas semejanzas, como por ejemplo la elevada abundancia de estructuras aromáticas condensadas, (picos a 127,6 y 124,8 ppm respectivamente), y la presencia de picos a 28,8 y 32 ppm característicos de cadenas de C metílicos. Como diferencias más importantes cabe destacar la presencia en la muestra de lignito de picos a 54 y 142 ppm que podrían indicar la presencia de grupos metoxilo presentes en la lignina. También aparece un pequeño pico sobre 180 ppm, que podría ser atribuido a carboxilos unidos a anillos aromáticos, ésteres o amidas.

El espectro de la muestra de Kerógeno es de gran sencillez. Apareciendo únicamente dos picos, uno centrado a 28,4 ppm que representa el 72 % del área total y corresponde a C alquílicos, y un segundo pico a 131 ppm que representa un 15 % del total y corresponde a C de anillos aromáticos. Este resultado confirma el comportamiento pirolítico de esta muestra de Kerógeno, que libera mayoritariamente cadenas lineales de alcanos y alquenos, y estructuras aromáticas condensadas.

En general, salvo los problemas ya mencionados para la detección de compuestos derivados de la lignina mediante pirólisis directa, se observa un



claro paralelismo entre los resultados de NMR  $^{13}\text{C}$  y los análisis pirolíticos realizados.

#### **4.1.4 Análisis Termogravimétrico (TG-DSC)**

Se ha aplicado el análisis termogravimétrico (TG) acoplado a Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para avanzar en la caracterización de las muestras de referencia de BC.

El análisis TG se caracteriza por ser un método térmico dinámico, que permite utilizar diferentes programas de calentamiento para observar la reactividad de las muestras en un amplio rango de temperatura y obtener mayor información de una sola vez. Otras ventajas de la técnica son que se necesita muy poca, o ninguna, preparación de la muestra y es de una elevada reproducibilidad. DSC mide las variaciones en el flujo de calor (W) de una muestra respecto a una muestra de referencia en función de la temperatura, el flujo de W es medido por un termopar y transformado en  $\mu\text{V}$ .

La Termogravimetría (TG) acoplada a la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se ha utilizado en la caracterización de cambios químicos en la materia orgánica de suelos y sedimentos, tejidos de plantas y compost (Dell' Abate et al 2000, 2002, 2003; López-Capel et al, 2005a,b, 2006a,b.). TG-DSC también se ha utilizado en la clasificación de carbones (Kök, 2001) y para distinguir entre fracciones lábiles y estables en MO de suelos y sedimentos (López-Capel et al., 2005a; 2006a; Plante et al., 2005; Leifeld et al., 2006). Medidas hechas sobre carbones y hollines indicaron que la estabilidad térmica de esos compuestos era completamente diferente a la MO biogénica reciente (García et al., 1999; Boehman et al., 2005)

Después de un minucioso estudio y la selección del programa de calentamiento más adecuado para nuestro trabajo, se llevó a cabo la TG de

las muestras de referencia. Los resultados de TG se muestran en las Figuras 4.1.4<sub>T</sub> (a, b y c), mientras que en las Figuras 4.1.4<sub>C</sub> (d, e y f) se muestran los diagramas DSC obtenidos sobre las mismas muestras.

Los TGs muestran diferentes comportamientos en cada una de las muestras frente a la oxidación térmica y la mejor forma de interpretarlos es estudiarlos conjuntamente con los diagramas de DSC, teniendo presente el contenido en TOC de cada muestra.

En los diagramas de DSC se observan distintos picos (1 a 4 por muestra) a diferentes temperaturas, que corresponderían con la oxidación de distintas formas de MO. Se admite que a medida que aumenta la temperatura del pico, la MO oxidada tendrá una mayor refractoriedad térmica (Dell'Abate, 2000; López-Capel et al., 2005a).

En la mayoría de los diagramas DSC se observa un pico endotérmico, que aparece entre 50-200 °C, que correspondería con la eliminación de la humedad y agua de hidratación presente en las muestras, la parte final de este pico solapa parcialmente con el inicio de la combustión de la MO más lábil.

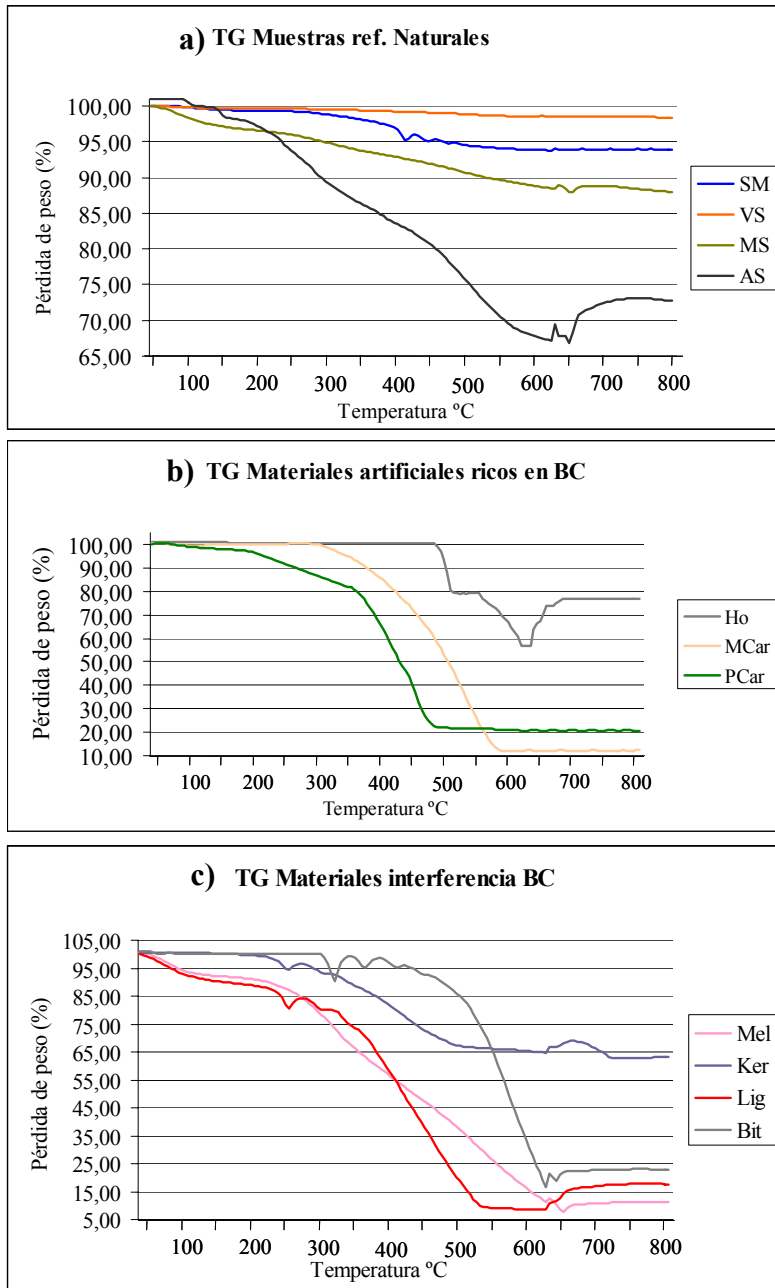


Figura 4.1.4<sub>T</sub>: TG en muestras de referencia de origen natural (a); TG en materiales producidos artificialmente ricos en BC (b); TG en muestras susceptibles de interferir en la detección de BC (c)

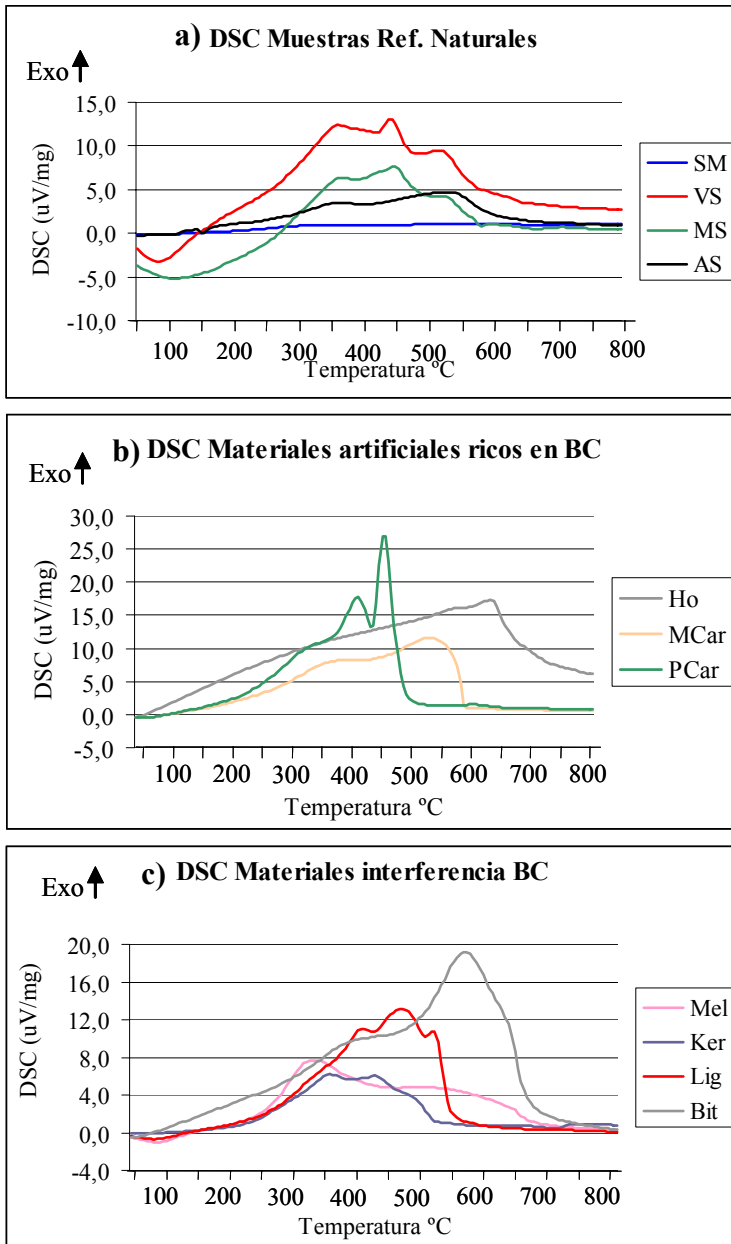


Figura 4.1.4c: DSC en muestras de referencia de origen natural (a); DSC en materiales producidos artificialmente ricos en BC (b); DSC en muestras susceptibles de interferir en la detección de BC (c).

Los resultados obtenidos mediante TG-DSC pueden agruparse según el tipo de material de referencia estudiado de la siguiente manera:

1. *Muestras de Referencia de Origen Natural*

Tanto en los suelos (VS y MS) como en el aerosol (AS) se observan tres tipos de MO según el comportamiento frente a la oxidación térmica, que podrían corresponder con: 1° la oxidación térmica de MO lábil (alrededor de 350 °C aprox.), constituida generalmente por restos vegetales (celulosas), material lipídico y polisacáridos libres, 2° Oxidación de MO recalcitrante (400-500 °C), que estaría constituida por MO aromática, restos de lignina en general y 3° MOR, en la que estaría incluido el BC y formada por formas de MO policondensadas estables térmicamente (500-650 °C aprox.) (Dell' Abate et al, 2000; López-Capel et al 2005, 2006). En la muestra AS se observa una riqueza importante en MOR.

En el sedimento marino (SM) no se muestran distintos picos, en el DSC, que pudieran interpretarse como distintas formas de MO, es posible que en este caso la MO se encuentre protegida por la matriz mineral y al tratarse de una matriz extremadamente compleja sería necesario aplicar un pre-tratamiento anterior a la TG.

En general no muestran picos bien definidos y podría ser recomendable la aplicación de un tratamiento previo que simplificará la complejidad de la matriz a estudiar y desligará la MO de la fracción mineral.

2. *Materiales producidos artificialmente ricos en BC*

Se observan tres comportamientos diferenciados para las tres muestras estudiadas, en las muestras de vegetación carbonizada (PCar y MCar) se observan grandes pérdidas de peso, en PCar corresponderían con pérdidas de MO lábil y recalcitrante, mientras

que en MCar corresponderían con MO recalcitrante y MOR (tipo BC), se observa pues una mayor refractoriedad en esta última, por otra parte la muestra de Hollín (Ho) estaría formada casi exclusivamente por MOR.

3. *Materiales que pueden interferir en la detección de BC*

La muestra de Lignito (Lig) es la única que presenta tres picos, siendo el 3º, que sería atribuible a formas de MOR afines al BC el de menor área. En las muestras de material rico en Kerógeno (Ker) y Melanoidina (Mel) se observa un pico ancho cuyo máximo estaría situado entre el final de la zona asignada a MO lábil y el principio de la MO recalcitrante, el área correspondiente a la reacción en la zona de MOR es prácticamente nula en ambos casos. La muestra de material Bituminoso (Bit) estaría formada por MO recalcitrante y mayoritariamente por MOR de elevada estabilidad térmica (pico MOR obtenido  $T^a > 550$  °C).

#### **4.2 CONTENIDO EN BLACK CARBON DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA**

El estudio TG-DSC de las muestras de referencia recomendadas por el BC “*Ring trial*” permitió su caracterización y distinción de forma satisfactoria, el siguiente paso fue llevar a cabo la cuantificación de BC en las mismas mediante esta técnica. Para el cálculo del contenido en BC utilizamos una serie de valores obtenidos del estudio detallado de los diagramas TG y DSC, que quedan recogidos en la Tabla 4.2.

El BC se cuantificó como el porcentaje de muestra perdida en el intervalo correspondiente al último pico aparecido en DSC (% pérdida de peso en TG), este pico será considerado como MOR-BC solo en el caso de

que cuando aparezca por encima de 500 °C o se trate de un 3<sup>er</sup> pico en la misma muestra en el diagrama DSC, es decir, ya hayan aparecido en esa muestra otros dos picos que corresponderían a MO lábil y recalcitrante. Para un exhaustivo análisis de los resultados y una mejor caracterización de las muestras se han utilizado también otros parámetros como son: TOC, T<sup>a</sup> a la que se registra el último pico detectado por DSC y contribución (% área) de este último pico detectado respecto al total, parámetros que también se recogen en la Tabla 4.2, que se presenta en la página siguiente.

La T<sup>a</sup> a la que se registra el último pico por DSC así como el área de este pico, nos aportan información acerca del grado de refractoriedad de la MO de cada muestra, así la muestra de hollín (Ho) prácticamente formada por MO gráfica es considerada la forma más inerte de MO, detrás estarían por este orden las muestras Bit, AS y MCar que son también altamente refractarias y posiblemente ricas en BC.

**Tabla 4.2: Presencia de MOR y contenido en BC en muestras de referencia mediante TG-DSC**

	MUESTRA REFERENCIA	CÓDIGO	TOC (%)	T <sup>a</sup> último pico (°C)	Contribución al área total <sup>a</sup> (%)	Presencia pico MOR-BC en DSC	Peso perdido último pico <sup>b</sup> (°C) (%)	BC (g/Kg)	BC/TOC (%)
Muestras de referencia naturales	Sedimento Marino	SM	3,01	505	23	si	1,97	19,7	65,45
	Vertisol	VS	3,16	510	24	si	1,5	15,0	47,47
	Mollisol	MS	1,93	515	19	si	1,1	11,0	56,99
	Materia Orgánica Disuelta	MOD	45,47	504	2	leve	n.d.	n.d.	n.d.
	Aerosol	AS	17,83	530	60	si	11,6	116,0	65,06
Materiales ricos en BC producidos artificialmente	Hollín	Ho	92,19	630	100	si	84,15	841,5	91,28
	Madera Carbonizada	MCar	73,6	525	25	si	70,95	709,5	96,40
	Planta Carbonizada	PCar	60,14	450	40	si	34,42	344,2	57,23
Materiales interferencia	Melanoidina	Mel	54,26	490	46	no	0,27	0	0
	Kerógeno	Ker	27,23	420	2	no	10,34	0	0
	Lignito	Lig	58,36	510	20	si	11,2	112,0	19,19
	Hulla Bituminosa	Bit	84,67	570	80	si	78,23	782,3	92,39

a) Calculado como el área del pico obtenido a la T<sup>a</sup> más alta dividido por la suma de las áreas del resto de los picos (en %)

b) Calculado como la pérdida de peso correspondiente a las temperaturas intervalo del pico registrado a mayor temperatura

n.d.) Dato no disponible debido a problemas técnicos durante en análisis de esta muestra



En las muestras de Kerógeno (Ker) y Melanoidina (Mel) (materiales interferencia) no se observó el pico que corresponde con la MOR en los diagramas de DSC, por lo que desde el punto de vista de la TG-DSC no contienen MOR, y por tanto la presencia de estos materiales no supondría un problema para el análisis y detección de BC mediante esta técnica.

El contenido en BC en las muestras de referencia medido mediante TG y que se muestra en la Tabla anterior, ha presentado una gran variación de unas muestras a otras y encontrándose valores desde 841,5 gBC/Kg en la muestra Ho hasta 0 gBC/Kg medidos en las muestras Mel y Ker. No se encuentran grandes problemas en la aplicación de la metodología para los materiales producidos artificialmente, que han resultado en general los más ricos en BC. En el caso de los materiales de referencia susceptibles de interferir en las mediciones de BC, los resultados han sido muy satisfactorios en las muestras de Mel y Ker, aunque debemos constatar que la muestra de Lignito (Lig) y sobre todo de hulla Bituminosa (Bit) parecen tener un alto contenido en BC, resultado que ya había sido reflejado por otros autores previamente (Leifeld, 2007; Hammes et al., *en prensa*).

En las muestras de referencia de origen natural (MS, VS, SM y AS) es posible que los resultados obtenidos sobreestimen el contenido en BC, sobre todo si comparamos los valores de % BC/TOC con el contenido en  $C_{ar}$  presente en cada muestra (señal 110-160 ppm en NMR  $^{13}C$ ), que aparece reflejado en el apartado 4.1.2 del presente capítulo, y en cualquier caso los resultados son manifiestamente superiores al contenido habitual de BC en sedimentos, estimado 15-30 % BC/TOC para sedimentos marinos mediterráneos (Middelburg et al., 1999) y suelos, estimado de hasta un 45% en suelos chernozémicos (Schmidt et al., 1999). Como hemos comentado anteriormente en muestras procedentes de matrices naturales complejas, como suelos y sedimentos marinos, con bajo contenido inicial en TOC sería

recomendable aplicar un pretratamiento antes de la TG para conseguir por un lado un enriquecimiento en MO y por otro liberar a la MO de la protección mineral.

#### **4.2.1 Comparación del contenido en BC medido mediante otras metodologías de oxidación**

La Tabla 4.2.1 muestra los resultados de la cuantificación de BC utilizando distintas metodologías disponibles para las muestras de referencia, trabajo que ha sido llevado a cabo por diversos laboratorios (*BC Ring Trial*).

A simple vista los resultados pueden parecer heterogéneos, su interpretación debe hacerse con precaución, sin olvidar que las muestras estudiadas son de naturaleza y complejidad estructural muy variada.

Teniendo en cuenta los aspectos enumerados anteriormente y que las metodologías utilizadas en el estudio difieren entre sí de manera considerable (ver Tabla 1.3b, Capítulo 1), debemos constatar que no existiría un resultado mejor que otro, sino que todos contribuirían a este estudio global del “*continuum*” de productos de combustión a los que pertenece el BC.

**Tabla 4.2.1 Cuadro comparativo de contenido en BC en las muestras de referencia utilizando distintas metodologías. (BC-Ring Trial)**

MUESTRAS DE REFERENCIA (BC-Ring-Trial)		Contenido en BC por metodología aplicada (g BC/Kg muestra)						
		BPCA <sup>a</sup>	Oxid. Dicromato <sup>b</sup>	CTO 375°C <sup>c</sup>	Oxid. UV <sup>d</sup>	Reflectancia Térmica TOR/TOT <sup>e</sup>	TG-DSC <sup>f</sup>	Oxid. Clorito <sup>g</sup>
Muestras de referencia naturales	Sedimento Marino	0,6-2,8	3,7-19,9	4,1-7,4	14,8	3,2-16,4	19,7	n.d.
	Vertisol	2,9-6,8	1,1-5,7	0,1-1,3	10,4	7,4-10,9	15	3,0
	Mollisol	2,7-4,4	0,6-2,2	0,2-1,6	4,7	0,0-6,3	11	6,1
	Materia Orgánica Disuelta	2,8-38,2	0,0	0,0-4,4	0,0	0,0-309,8	n.d.	n.d.
	Aerosol	11,2-17,6	72,1-79,4	6,4-25,9	54,0	62,6-89,2	116,0	n.d.
Materiales ricos en BC producidos artificialmente	Hollín	160,9-474,2	400,7-539,0	325,0-439,6	788,9	865,5-904,1	841,5	641,3
	Madera Carbonizada	72,9-250,6	371,7-620,0	0	705,2	511,3-731,7	709,5	0,0
	Planta Carbonizada	142,5-175,7	200,5-270,0	2,5-21,0	454,2	388,3-575,2	344,2	62,5
Materiales interferencia	Melanoidina	4,5-5,8	0,0	0,7-25,5	0,0	86,0-370,8	0,0	0,0
	Kerógeno	10,7-17,4	11,9-41,2	0,1-29,9	15,8	0,0-39,5	0,0	0,0
	Lignito	60,1-170,7	31,0-69,8	0,0-14,3	196,3	109,9-333,6	112	29,8
	Hulla Bituminosa	139,0-222,7	720,0-805,8	0,3-41,9	859	442,3-733,2	782,3	n.d.

n.d.) No disponible. a) Método de cuantificación de ácidos benzenopolicarboxílicos (BCPA); realizado en 3 laboratorios (Glaser et al., 1998; Brodowski et al., 2005). b) Oxidación con dicromato; realizado en 4 laboratorios (Wolbach y Anders, 1989; Lim y Cachier, 1996; Song et al., 2002). c) Método de oxidación química seguido de una oxidación térmica a 375 °C; realizado en 6 laboratorios (Gustafsson et al., 1997; Gélinas et al., 2001). d) Método de foto-oxidación ultravioleta, seguido de análisis mediante NMR <sup>13</sup>C, realizado en 1 laboratorio (Skjemstad et al., 1999). e) Métodos termo-ópticos de transmitancia o reflectancia láser; realizado por 5 laboratorios (Schauer et al., 2003; Huebert et al., 2004; Chen et al., 2005). f) Método de oxidación termogravimétrica, realizado en 1 laboratorio (Hammes et al., *en prensa*). g) Método de oxidación con Clorito de Sodio, realizado en 1 laboratorio (Sympson y Hatcher, 2004).

Los resultados obtenidos para cada uno de los métodos utilizados se pueden resumir brevemente de la siguiente manera:

Método BCPA:

Este método trata de aislar estructuras aromáticas y transformarlas en ácidos benceno policarboxílicos (*BCPAs* o *ABCs*) mediante el tratamiento del las muestras con  $\text{HNO}_3$  a alta temperatura, (Glaser et al., 1998; Brodowski et al., 2005). Como se comentó en la introducción, el hecho de que todo y solo el BC se transforme en BCPAs sería un supuesto aún por demostrar.

Si nos fijamos en los valores obtenidos, parecen encontrarse dentro de la media para las muestras de referencia de origen natural. Podrían considerarse satisfactorios para las muestras interferencia de melanoidina, kerógeno y lignito, mientras que para los materiales ricos en BC producidos artificialmente, especialmente hollín y madera carbonizada, los resultados están muy por debajo de la media del resto de los métodos estudiados, y podrían sugerir que la técnica no detecta de forma cuantitativa los componentes del BC mayores y más condensados.

Método de Oxidación con Dicromato:

Se utiliza dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ ) como agente oxidante junto a otros pretratamientos, el BC se define como el C orgánico que “*sobrevive*” a la oxidación (Lim y Cachier, 1996; Song et al., 2002). Este método no requiere de equipamiento especializado y posee una elevada reproducibilidad en la mayoría de las muestras, excepto en los suelos y sedimentos estudiados. Este método asume que todo el carbono que “*sobrevive*” al tratamiento oxidativo es BC, presunción que ya ha sido demostrada en varios artículos recientes (Massiello, 2004; Song et al., 2002), este problema podría ser resuelto mediante la caracterización del residuo final mediante espectroscopía de

NMR, pero encarecería notablemente el proceso. Los resultados numéricos obtenidos pueden considerarse, en general dentro del rango esperado.

Método CTO-375 °C:

Este método distintos pretratamientos ácidos seguidos de una oxidación a 375° C, permite estimar el contenido en BC en una muestra frente un material de referencia de contenido en BC conocido (material hollín SRM-2975) (Gustafsson et al., 1997; Gélinas et al., 2001). Este método permite una buena diferenciación entre el hollín y los materiales carbonizados, podríamos decir que estaría especializado en la detección de las formas más condensadas o grafiticas de BC, por ello los resultados obtenidos son en general muy bajos si los comparamos con el resto de metodologías, existiría además el problema de la aparición de *artefactos positivos*, ya comentados en la introducción, y que se reflejan en la detección de hasta 25g Kg<sup>-1</sup> de BC en la muestra de melanoidina en lugar de cero, ese problema especialmente importante en muestras con bajo contenido en BC altamente condensado, podría ser minimizado con la eliminación previa de MO lábil.

Método de oxidación Ultra-Violeta:

Este método lleva a cabo una foto oxidación de alta energía con luz ultravioleta del material, previamente suspendido en agua saturada de oxígeno, por último se somete el residuo a análisis mediante NMR <sup>13</sup>C (Skemstad et al., 1996). Este método parece obtener resultados satisfactorios en todo tipo de materiales pero requiere tiempo y necesita de equipos altamente sofisticados y caros, lo que hace difícil su aplicación.

Métodos de Reflectancia Térmica TOR/TOT:

Estos métodos utilizan diferentes programas de temperatura y tiempos de retención para medir (FID) la transmitancia (o reflectancia) de un láser que es aplicado sobre la muestra a estudiar (Chen et al., 2005; Huang et

al., 2006; Huebert et al., 2004). Los resultados presentaron escasa variabilidad entre cada laboratorio y alta reproducibilidad en general, pero a juzgar por los resultados obtenidos para la melanoidina (hasta 370 gBC Kg<sup>-1</sup>) y MOD (hasta 307 gBC Kg<sup>-1</sup>) parece no distinguir de forma adecuada entre material BC y no-BC, las muestras deben ser tomadas “*in situ*” en papel de filtro, lo cual no se hizo para este estudio y parece que las muestras de color oscuro crean problemas en los procedimientos de corrección ópticos, cuando la absorción inicial es tan alta que un ennegrecimiento adicional debido a la calcinación del material pirogénico, no puede ser distinguida de la absorción del material original (Schmidt et al., 2001).

Método de oxidación Termogravimétrica:

Como ya se ha descrito previamente (Capítulos 3 y 4.1) este método utiliza la termogravimetría (TG) acoplada a calorimetría diferencial de barrido (DSC) para registrar las pérdidas de peso de muestras durante su oxidación térmica (López-Capel et al., 2005; De la Rosa et al., *en prensa*). Los resultados obtenidos parecen razonablemente satisfactorios en las muestras ricas en BC y los materiales potencialmente interferencia, obteniendo un contenido cero de BC en la melanoidina y kerógeno. Para las muestras de referencia de origen natural (suelos, sedimento y aerosol) los resultados obtenidos están por encima del resto de los grupos, como se comentó en la introducción (Tabla 1.3b) este método podría sobreestimar el contenido en BC en muestras complejas en determinados casos, por ejemplo el material arcilloso puede proteger a la MO de la oxidación térmica y hacer que este parezca (a los ojos de la TG) más refractario de lo que realmente es, la presencia de carbonatos o restos minerales pueden contribuir a este problema, sería aconsejable aplicar un pre-tratamiento destinado a minimizar estos problemas, que sería especialmente necesario en suelos y sedimentos para aumentar la concentración de MO en la muestra.

#### Método de oxidación con Clorito de Sodio:

Este método se basa en la oxidación con Clorito de Sodio seguida de NMR  $^{13}\text{C}$  y análisis elemental del residuo obtenido (Simpson y Hatcher, 2004). Permite detectar específicamente el hollín de otros materiales pirogénicos, el tratamiento con clorito de sodio en medio ácido está diseñado especialmente para la eliminación de restos de lignina que junto al enriquecimiento en C, la caracterización de los residuos obtenidos mediante NMR  $^{13}\text{C}$  y el análisis elemental aplicado, minimizan las posibilidades de sobre-estimar el contenido en BC en muestras pobres en MO, sería por tanto un método muy recomendable para este tipo de muestras. Por otra parte se trata de una metodología que requiere el uso de costosos medios técnicos (NMR estado sólido) y solo se han presentado resultados para 8 de las muestras de referencia, luego se desconoce cual será su comportamiento en el resto de los casos.

### **4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SEDIMENTOS BRUTOS**

#### **4.3.1 Análisis elemental y características globales**

En la Tabla 4.3.1 se muestran los valores de C orgánico total (TOC), C inorgánico total (TIC), los contenidos totales de N (TN), S (TS), lípidos (TL) y las relaciones atómicas C/N y C/S de los sedimentos estudiados. Además, se incluye la localización de los puntos de muestreo, los códigos en la numeración de cada muestra corresponden a sedimentos de río (R), de estuario (E), de zonas de interfase río-estuario (R/E), y sedimentos marinos (M).

**Tabla 4.3.1: Análisis elemental, contenido en lípidos y localización de los sedimentos**

Muestra	TC	TN	TOC	TIC	Corg/N	TS	Corg/S	TL	Localización
<b>R-25</b>	1,84	0,13	1,77	0,07	13,6	0,41	4,3	0,33	Río Odiel
<b>R/E-28</b>	2,97	0,13	1,80	1,17	13,8	0,45	4,0	n.d.	Desembocadura R. Odiel
<b>R-35</b>	1,53	0,14	1,10	0,43	7,9	1,13	1,0	0,30	Río Tinto-Odiel
<b>R-39</b>	1,28	0,08	1,04	0,24	13,0	0,97	1,1	0,14	Río Tinto
<b>R-40</b>	1,26	0,10	1,10	0,16	10,7	1,35	0,8	n.d.	Río Tinto-Odiel
<b>E-202</b>	1,52	0,14	1,17	0,36	8,3	0,44	2,7	0,17	Estuario Río Piedras
<b>E-209</b>	1,69	0,16	0,77	0,92	4,8	0,27	2,9	0,16	Estuario Río Guadiana
<b>R/E-211</b>	2,21	0,10	1,07	1,14	10,7	0,22	4,9	0,14	Trans. Río-Est. Guadiana
<b>E-213</b>	3,06	0,13	1,22	1,84	9,4	0,44	2,8	0,23	Estuario Río Guadiana
<b>E-218</b>	2,09	0,20	1,76	0,34	8,8	0,26	6,8	0,23	Estuario Río Guadiana
<b>E-226</b>	1,74	0,13	1,16	0,58	8,9	0,44	2,6	0,12	Estuario Río Guadiana
<b>M-131</b>	3,11	0,16	1,17	1,94	7,3	0,18	6,5	0,07	Plataforma cont. Marina
<b>M-155</b>	3,11	0,15	1,09	2,02	7,3	0,30	3,6	0,07	Plataforma cont. Marina
<b>Mínimo</b>	1,26	0,08	0,77	0,07	4,8	0,18	0,8	0,07	
<b>Máximo</b>	3,11	0,20	1,80	2,02	13,8	1,35	6,8	0,33	
<b>Media</b>	2,11	0,13	1,25	0,86	9,6	0,53	3,4	0,17	

El contenido en TOC varía entre el 0,77 %, encontrado en la muestra E-209 situada en el estuario del Río Guadiana, y 1,80 %, valor encontrado en la desembocadura del Río Odiel (R/E-28). Estos valores se encuentran dentro del rango típico encontrado para sedimentos costeros (Nieuwenhuize et al., 1994). Las muestras de sedimentos marinos de la plataforma continental (M-131; M-155) muestran valores de TOC y de contenido en material lipídico (TL) inferiores a la media, mientras que los valores más altos se encuentran en muestras situadas en zonas fluviales y de estuario, (muestras R-25; R/E-28 y E-218) indicando una acumulación y/o preservación de la MO sensiblemente mayor en estos ambientes.

La relación C/N es un parámetro ampliamente utilizado para distinguir el origen de la MO en sedimentos (Prahl et al., 1980, 1994; Premuzic et al., 1982; Ishiwatari y Uzaki, 1987; Siliman et al., 1996) y en particular se ha utilizado para distinguir entre los diferentes aportes de MO



en estuarios. Los valores típicos de C/N en organismos marinos se encuentran entre 4-10, mucho más bajos que los encontrados para plantas terrestres ( $\geq 20$ ). Esto se atribuye a la mayor abundancia proteica en la MO de origen marino y a su bajo contenido en materiales celulósicos (Kawamura e Ishiwatari, 1981; Meyers et al., 1984; Uzaki e Ishiwatari, 1986; Meyers, 1994).

Los valores de la relación C/N varían entre 13,8 y 4,8. En general estos valores son similares a los encontrados en sapropeles marinos, en los que la MO procede de una mezcla de restos vegetales de plantas, algas y bacterias (Meyers, 1994). La variabilidad de la relación C/N en muestras de estuarios (E) (4,8-10,7), indicaría una mezcla de MO de origen terrestre y marino, con una mayor contribución relativa de esta última. En la muestra E-209, situada en el estuario del Guadiana se observa un valor sensiblemente inferior a los demás (4,8) que podría indicar una zona de reciente acumulación de MO de origen marino o mayor erosión y transporte (por tanto menor deposición) de la MO terrestre. Estas variaciones son consecuencia entre otros factores del balance entre influjo fluvial y mareal, época del año y régimen de lluvias, corrientes de deriva existentes o distancia al cauce de los ríos. Este valor también podría ser debido a una utilización preferencial de C junto a la inmovilización de N por parte de bacterias.

En las muestras tomadas en el cauce de los ríos (R) se observó un incremento en la relación C/N como correspondería con un mayor aporte de MO de origen terrestre, aunque los valores (8-14) indican una contribución importante de MO de origen marino.

Las dos muestras tomadas en la plataforma continental (M) menos afectadas por cambios temporales en el flujo de MO fluvial o mareal,

régimen de lluvias, o corrientes de deriva mostraron el mismo valor para la relación C/N (7,3).

El contenido en azufre total (TS) va disminuyendo en el sentido R-E-M, encontrándose los valores más elevados en muestras tomadas en los lechos de los ríos Tinto y Odiel. Este gradiente se explicaría por el transporte y deposición de sedimentos ricos en pirita provenientes de las sierras de Huelva y Sevilla (localizadas en la parte occidental de la faja pirítica de Huelva). La presencia de azufre molecular, detectado en los extractos lipídicos y en la pirólisis directa de los sedimentos, como veremos más adelante, podría indicar que mediante reacciones de sulfato-reducción, que ocurren en ausencia de oxígeno, se estaría incorporando S a los productos de las primeras etapas de diagénesis (piritización) en ambientes de deposición predominantemente anóxicos (Leventhal, 1983; Hadas et al., 2001).

La relación C/S presenta valores entre 0,8 y 6,8. En trabajos anteriores se observó que las zonas con mayor contribución de MO de origen marino presentaban valores más bajos de C/S (Hofmann et al., 2001). En nuestro caso no se observa este comportamiento en las muestras estudiadas, lo que puede ser debido a la ocurrencia de fenómenos de piritización en condiciones anóxicas, ya que no hay limitación de MO reactiva y el Fe es abundante en la zona. Esto unido a la deposición de material rico en pirita puede tener como efecto una elevación de los valores de la relación C/S por encima de los típicos para MO de origen marino.

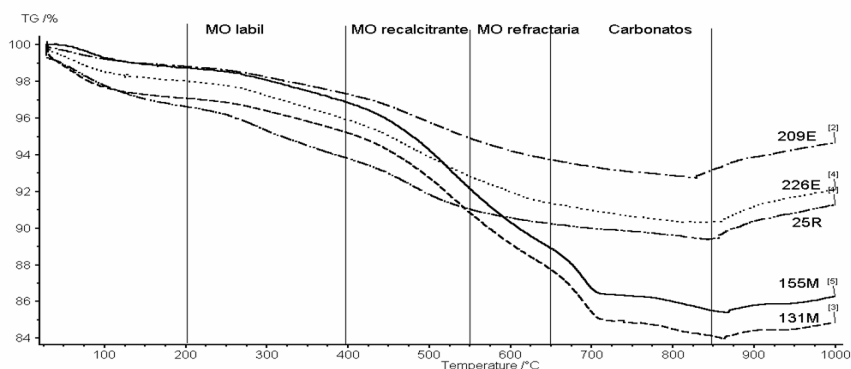
Existen numerosos factores como, distintas fuentes de MO, diferentes tiempos de exposición a condiciones oxidantes de los sedimentos superficiales, la existencia de procesos de erosión, corrientes de deriva, influjos mareales, etc., que harían muy difícil poder predecir los depocentros de MOR y justificar diferencias cualitativas importantes en esta MO. Por ello el análisis elemental solo nos permite trazar a grandes rasgos las

características generales de la MO en cada punto. Para profundizar en su caracterización debemos apoyarnos en otras técnicas de análisis.

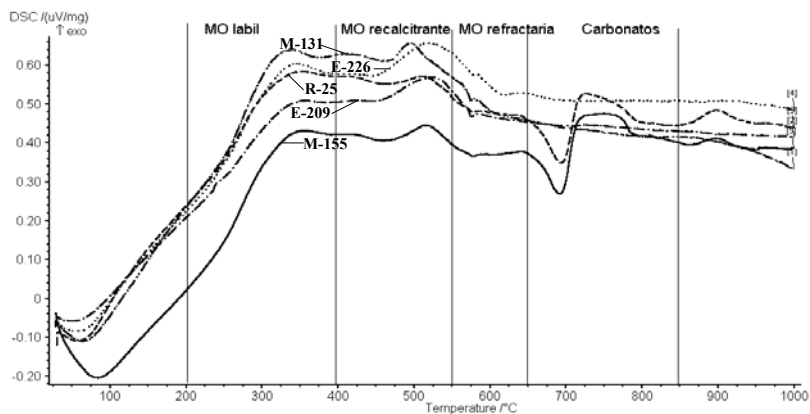
### **4.3.2 Análisis Termogravimétrico e Isotópico (TG-DSC y TG-IRMS)**

Se seleccionaron muestras representativas de cada entorno (fluvial, estuarino y marino) para un análisis termogravimétrico completo (TG-DSC). Para ampliar las posibilidades del análisis térmico, se utilizó un espectrómetro isotópico (IRMS) acoplado al sistema de análisis térmico, permitiéndonos realizar un análisis en continuo de los ratios de isótopos estables de C junto al perfil termogravimétrico en un único experimento. La posibilidad de distinguir entre valores isotópicos de componentes lábiles y refractarios puede ayudar al entendimiento de la compleja dinámica de la MO en sedimentos.

Las Figuras 4.3.2 a-b presentan las pérdidas de peso (TG) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) respectivamente, realizados sobre muestras de sedimento bruto, mientras que la Tabla 4.3.2a muestra los datos correspondientes a estas pérdidas de peso.



**Figura 4.3.2a: Termogravimetría (TG) en sedimentos**



**Figura 4.3.2b: Calorimetría diferencial de barrido (DSC) en sedimentos**

La calorimetría diferencial de barrido muestra las temperaturas o rangos de temperaturas donde tienen lugar las reacciones de combustión o de descomposición de la MO presente en cada muestra. Su estudio nos permite seleccionar las temperaturas para el estudio acoplado a la termogravimetría de la evolución de los valores de isotopía de  $^{13}\text{C}$  (TG-IRMS).

**Tabla 4.3.2a: Pérdidas de peso (%) medidas mediante Termogravimetría (TG) en sedimentos**

Rango de temperaturas (°C)	R-25	E-209	E-226	M-131	M-155
20-200 °C	2,68	1,08	1,78	2,93	1,25
200-400 °C	2,83	1,51	2,12	1,89	1,89
400-550 °C	2,76	2,40	3,07	4,33	4,66
550-650 °C	0,81	1,17	1,48	3,11	3,27
650-850 °C	0,81	0,54	1,04	3,63	3,42
Total (20-850 °C)	9,88	6,71	9,48	15,90	14,49
<b>H<sub>2</sub>O + MO lábil</b>	27,1	16,1	18,8	18,5	8,6
<b>MO lábil</b>	28,6	22,6	22,3	11,9	13,1
<b>MO recalcitrante</b>	28,0	35,7	32,4	27,3	32,1
<b>MO refractaria</b>	8,1	17,5	15,6	19,6	22,6
<b>Carbonatos</b>	8,2	8,1	10,9	22,8	23,6

Porcentajes de pérdida de peso en sedimentos brutos por rango de temperaturas y tipo de material, medidos mediante termogravimetría

Basándonos en la literatura existente (López-Capel et al., 2005a; Manning et al., 2005; Plante et al., 2005; Dell' Abate et al., 2003, Kaloustian., 2001) las pérdidas de peso han sido asociadas con la descomposición de las distintas formas de MO de la manera siguiente: MO lábil (200-400 °C), MO recalcitrante (400-550 °C), MO refractaria (550-650 °C) y carbonatos (650-850 °C) (Figs. 4.3.2 a-b). En la Tabla 4.3.2a se muestran los resultados correspondientes a cada una de las formas de MO para cada sedimento estudiado, las mayores pérdidas de peso corresponden a la fracción de MO recalcitrante (hasta un 36%) y se observa una variabilidad menor en los valores que en las otras fracciones. Los resultados muestran que al pasar de muestras fluviales (R-25) a las marinas el porcentaje de MO lábil disminuye mientras que el de MO refractaria aumenta. Esto parece

indicar un enriquecimiento en formas de MOR a medida que aumenta la contribución de MO de origen marino. El contenido en carbonatos fue marcadamente mayor en las muestras marinas.

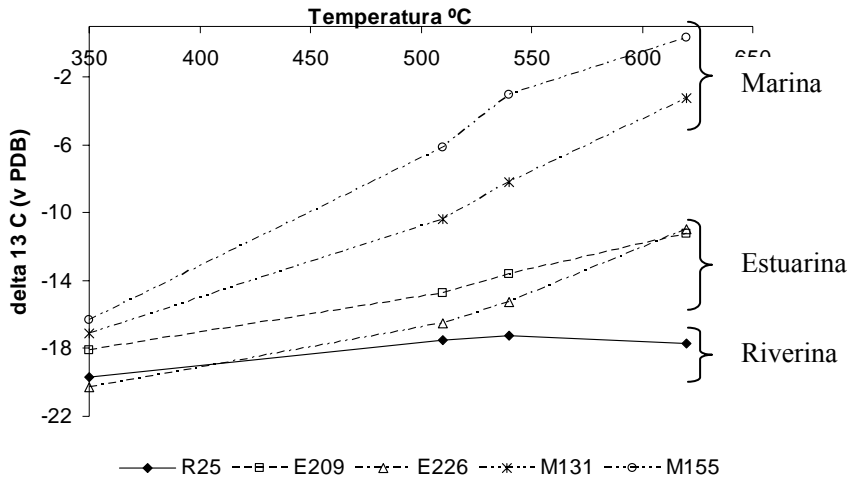


Figura 4.3.2c. Evolución de los valores  $\delta^{13}\text{C}$  con la temperatura en sedimentos

Tabla 4.3.2c. Evolución de los valores  $\delta^{13}\text{C}$  en sedimentos con la temperatura y valores  $\delta^{13}\text{C}$  en sedimento bruto

Muestra	350 °C	510 °C	540 °C	620 °C	700 °C	720 °C	$\delta^{13}\text{C}$ Sed Bruto
R-25	-19,7	-17,5	-17,2	-17,7	-21,0	-20,9	-23,8
E-209	-18,1	-14,8	-13,6	-11,3	-11,9	-13,6	-20,0
E-226	-20,3	-16,5	-15,3	-10,9	-15,9	-16,5	-20,7
M-155	-17,1	-10,4	-8,2	-3,2	-2,0	-2,0	-9,8
M-131	-16,3	-6,1	-3,0	0,3	-6,2	-7,2	-9,7

Valores  $\delta^{13}\text{C}$  en sedimentos medidos a diversas temperaturas durante degradación térmica ( $\pm 0.04\text{‰}$  medido mediante TG-DSC-IRMS), y valores  $\delta^{13}\text{C}$  en sedimento bruto ( $\pm 0.05\text{‰}$  medidos por Isoanalytical-IRMS)

La Figura 4.3.2c muestra la evolución de los valores  $\delta^{13}\text{C}$  en sedimentos durante la TG. La tabla correspondiente muestra los valores  $\delta^{13}\text{C}$  en sedimentos representativos tomados durante la TG a las temperaturas de 350, 510, 540, 620, 700 y 720 °C respectivamente. Estas temperaturas fueron seleccionadas mediante el estudio de las curvas obtenidas por DSC y ser susceptibles de corresponder con las temperaturas de descomposición o combustión de distintas formas de MO. Durante el estudio se utilizó  $\text{CO}_2$  de elevada pureza como gas de referencia ( $\delta^{13}\text{C} -29.88$ ) que fue muestreado 3 veces al principio y al final de cada medida.

Se observa un enriquecimiento progresivo en  $^{13}\text{C}$  conforme se incrementa la influencia marina en las muestras, en general los valores  $\delta^{13}\text{C}$  del sedimento bruto son un 4 ‰ más negativos que aquellos determinados para la materia orgánica usando TG-DSC-IRMS, debido a las diferencias metodológicas entre ambos procesos de medición (López-Capel et al, 2005b).

Teniendo en cuenta la diferencia sistemática de un 4‰ en la medición de  $\delta^{13}\text{C}$  entre las metodologías, se observa una gran variabilidad en los valores obtenidos, así la muestra R-25 muestra valores típicamente terrestres, las muestras M-131 y M-155 marinos y las muestras E-209 y E-226 una mezcla de ambos. Según Glaser et al., (2005) los valores  $\delta^{13}\text{C}$  para BC antropogénico y productos naturales de la combustión en sedimentos estarían comprendidos en el rango  $-22,5 - -26.5$  ‰, por lo que en la muestra R-25 podría estar incluida una importante contribución de estas formas de MOR.

Los valores  $\delta^{13}\text{C}$  en las muestras marinas están claramente influenciados por la presencia de carbonatos. A 350°C los datos muestran un enriquecimiento en  $\delta^{13}\text{C}$  según aumenta la influencia marina, que podría deberse a un aumento de la contribución de algas, macrofitas alóctonas y

aporte mineral (Middelburg et al., 1997). Los valores en las muestras marinas (M-131, M-155) a 350°C podrían atribuirse a algas (-17‰) y material planctónico (Middelburg et al., 1997).

El enriquecimiento isotópico  $\delta^{13}\text{C}$  observado en muestras marinas es considerable, teniendo en cuenta la presencia de carbonatos, podría estar debido además a la existencia de procesos microbianos de metanogénesis en la MOR, en kerógenos. Clayton (1991) describió diferentes comportamientos isotópicos de C durante la formación de metano a partir de MO lábil y kerógeno recalcitrante. Cuando la formación de metano tiene lugar durante la oxidación de la MO, durante este proceso metabólico, controlado cinéticamente, ocurre un enriquecimiento de  $^{13}\text{C}$  en el  $\text{CH}_4$  residual, y del  $^{12}\text{C}$  en el  $\text{CO}_2$  emitido (efecto opuesto que en la generación de  $\text{CH}_4$ ).

De 700 a 720 °C se observan valores derivados de la contribución de carbonatos en las muestras marinas (-2.0 ‰ en M-131 y -6.2 ‰ para M-155), que están dentro del rango asociado a los carbonatos marinos (Gawenda et al 1999).

Para eliminar la influencia del contenido en carbonatos en el comportamiento isotópico se realizó la medida de los valores  $\delta^{13}\text{C}$  a los sedimentos desmineralizados.

En la Figura adjunta 4.3.2d se representan los valores  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$  frente al contenido en TOC (%) de los sedimentos marinos en muestras desmineralizadas. En ella se observan valores típicos para sedimentos marinos (Middelburg, 1991) y tres comportamientos diferentes según la localización de la muestra estudiada. Así las muestras marinas muestran un mayor enriquecimiento en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  ( $> -23$  ‰), resultado acorde con lo que cabría esperar para MO de origen marino y ya habíamos observado en los datos isotópicos medidos durante la termogravimetría, por



otra parte las muestras localizadas en el lecho de los ríos tienen valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  intermedios y alto contenido en TOC, mientras que las muestras localizadas en zonas de estuario toman valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  más bajos, lo que podría indicar una mayor preservación (o acumulación) de la MO terrestre en muestras estuarinas. La muestra R/E-28, localizada en la desembocadura del río Odiel muestra un comportamiento claramente diferenciado del resto de más muestras de entorno, su localización en un área sometida a corrientes de distinta procedencia (mareal, rivereñas y de deriva litoral), continua deposición de sedimentos y erosión pueden ser parte responsable de este comportamiento diferenciado.

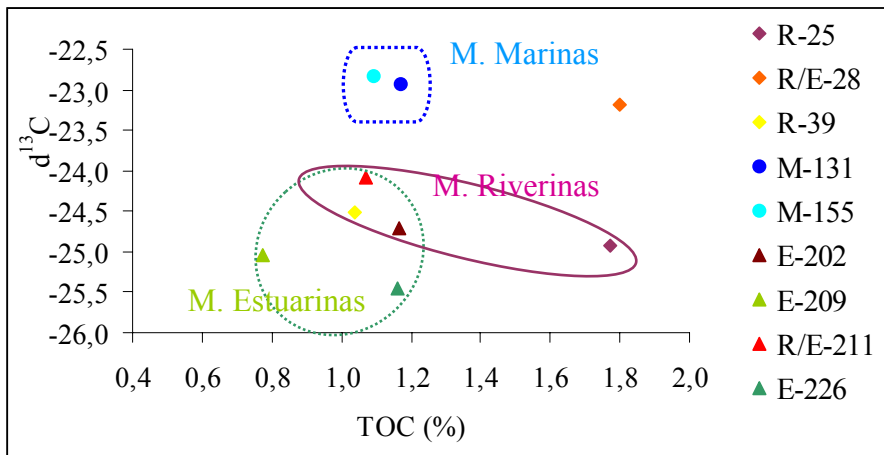


Figura 4.3.2d: Valores  $\delta^{13}\text{C}$  Vs TOC en sedimentos desmineralizados

En general las muestras fluviales y estuarinas tienen valores isotópicos muy similares, resultado lógico si tenemos en cuenta las características de los estuarios donde se localizan las muestras.

### **4.3.3 Caracterización estructural de los sedimentos**

#### 4.3.3.1 Pirólisis-Cromatografía de Gases/Espectrometría de masas (Py-GC/MS)

Como hemos comentado anteriormente la pirólisis analítica (Py-GC/MS) ha sido ampliamente utilizada con éxito en numerosos estudios dedicados a la caracterización a nivel molecular de matrices complejas poliméricas.

Sabemos que muchos de los productos liberados durante la pirólisis son compuestos de diagnóstico de precursores específicos presentes en la matriz estudiada, y en cualquier caso, la principal información suministrada por la pirólisis es una “huella dactilar” (*fingerprint*) específica para cada muestra.

En las Figuras 4.3.3a-b se presentan los pirogramas de sedimentos representativos de la zona de estudio. Algunos pirogramas tuvieron que ser descartados del estudio por estar dominados por de picos de gran área, de  $S_8$  y  $SO_2$  fundamentalmente, que enmascaraban la presencia de otros compuestos de pirólisis lo que hacía que fueran inservibles para cualquier estudio de caracterización cualitativa o cuantitativa. En general, a pesar de la complejidad de los pirogramas, la mayoría de los productos de pirólisis pudieron ser identificados. El estudio pormenorizado reveló que la gran similitud observada entre las distribuciones de picos en los pirogramas de los se daba también en la naturaleza química de los productos.

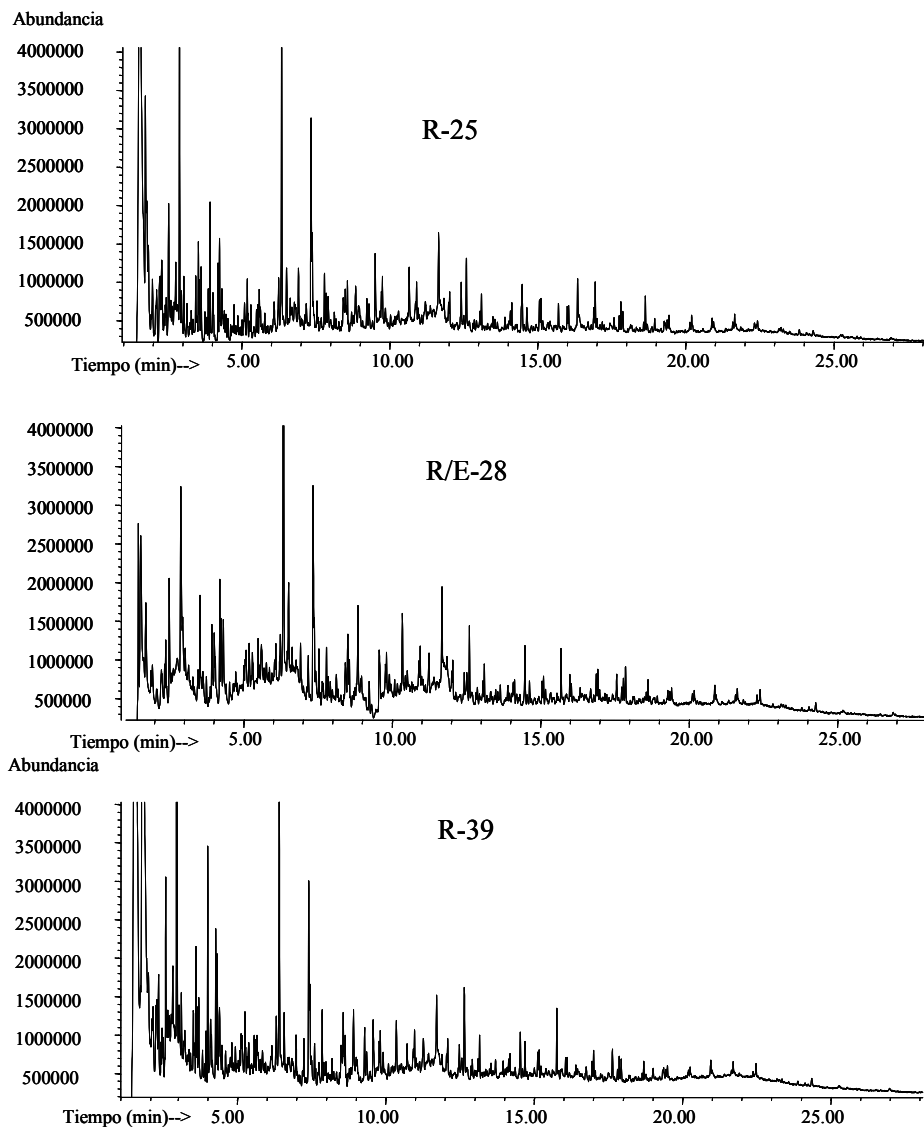


Figura 4.3.3a: Cromatogramas de ión total (TIC) de los productos de pirólisis a 500°C (pirogramas) de muestras estudiadas de sedimentos fluviales.

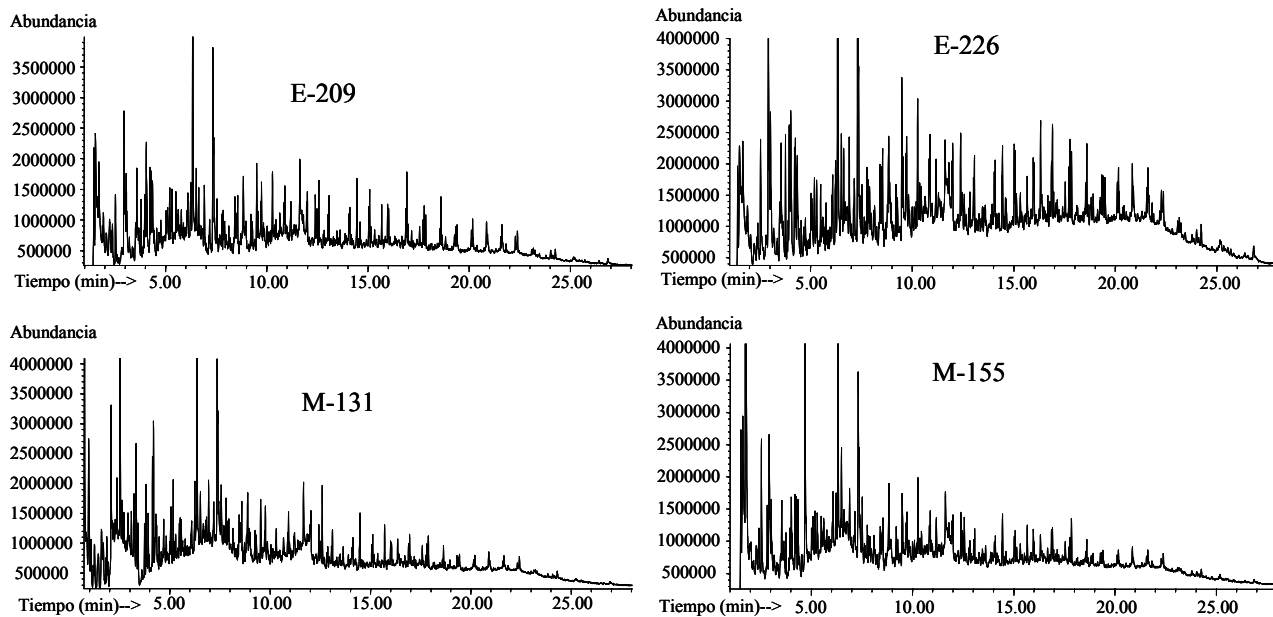


Figura 4.3.3b: Cromatogramas de ión total (TIC) de los productos de pirólisis a 500°C (pirogramas) de muestras seleccionadas de sedimentos de estuarios y de la plataforma marina.

Como se puede observar en las Figuras 4.33a-b, los pirogramas a simple vista presentan una gran similitud entre sí, los resultados cuantitativos correspondientes a todas las muestras de sedimentos estudiadas se presentan en la Tabla 4.3.3, la abundancia relativa de cada compuesto identificado por pirólisis (%) ha sido calculada como el área del pico correspondiente a ese compuesto con respecto al área total de los picos de compuestos identificados. En la integración se descartaron los picos no resueltos, los correspondientes a SO<sub>2</sub> y aquellos de área < 0,04 %.

Por otra parte para una mejor observación de la distribución de cada uno de los compuestos identificados y sus familias mediante pirólisis, en la Figura 4.3.3c y la Tabla 4.3.3c se presenta con detalle el pirograma y los productos de pirólisis identificados para la muestra R-25.

Tabla 4.3.3: Integración de los productos de pirólisis y separación por origen del compuesto identificado

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Código (origen)	R-25	R/E-28	R-39	M-131	M-155	E-209	E-226
2-metilfurano	1,97	PS-1	1,28	1,30	1,66	1,05	0,43	0,68	0,86
benzeno	2,28	U-1	2,22	1,56	1,77	1,92	1,25	1,22	2,09
2-metilbutanal	2,38	PS-2		0,79	0,34	0,49	1,09	0,30	0,45
2-vinilfurano	2,81	PS-3	0,65	0,67	0,47	0,30	0,31	0,42	0,18
1-octeno	2,92	Al In-1	0,92		0,75		1,14	0,69	0,89
tolueno	3,02	U-2	9,15	6,19	7,52	5,31	4,20	5,10	0,97
piridina	3,54	PR-1	0,97	0,56	0,82	0,39	0,72	0,93	1,51
pirrol	3,76	PR-2	1,18	1,65	1,28	1,42	1,12	0,95	0,83
o-Xileno	3,90	U-3	1,43	0,64	0,34	0,65	1,16	1,43	0,89
estireno	3,94	U-4	2,25	1,83	2,36	1,55	1,27	2,17	2,79
furfural	4,02	PS-4	1,44	1,04	0,93	0,81	1,15	1,16	0,74
2-metilpirrol	4,20	PR-3	1,17	1,98	1,66	1,54	1,16	1,04	1,96
1-deceno	4,25	Al In-2	1,82	2,14	1,73	2,57	1,95	1,66	2,05
o-etiltolueno	4,42	U-5	0,30	0,20	0,30	0,93	1,88	0,14	
2,4-dimetilfurano	4,54	PS-5	0,31	0,43	0,25	0,89	8,02	0,60	0,36
5 metilfuran-2-ona	5,02	PS-6	0,22	0,36	0,17	0,36	0,43	0,71	0,28
2-etilpirrol	5,05	PR-4	0,32	0,41	0,49			0,27	0,42
3-etilpirrol	5,09	PR-5	0,67	1,07	0,50	1,35		0,25	0,60
1-undeceno	5,19	Al In-3	1,04	1,21	0,77	1,57	1,13	1,10	0,91
5-metilfurfural	5,30	PS-7	0,34	1,03	0,55	1,04	1,15	0,55	0,51
tolueno	5,49	U-6	0,53	0,82	0,38	0,59	0,66	0,58	0,65
benzonitrilo	5,61	PR-6	0,90	1,10	0,55	1,02	0,77	0,45	0,64
1,3-bencenodiol	5,77	PS-8	0,44	0,62	0,39	0,59	0,54	0,76	0,41
x,x,x-trimetilpirrol	5,84	PR-7	0,08	0,19	0,09	0,13	0,13	0,24	0,08
x-etil-x-metilpirrol	5,87	PR-8	0,33	0,23	0,13	0,34	0,24	0,23	0,17
benzenoacetaldhído	6,09	PS-9			0,22	1,20	0,66		0,29
1-dodeceno	6,24	Al In-4	1,18	0,98	0,77	0,90	1,29	1,44	0,91
fenol	6,34	U-7	6,49	7,61	5,06	6,71	6,71	7,42	5,98
maleimida	6,52	PR-9	1,23		0,87	2,33	1,55		1,03
guaiacol	6,63	LG-1	0,41	0,43	0,24	0,34	0,43	0,65	0,18
o-cresol	6,91	U-8	0,85	0,67	0,76	0,92	1,14	1,36	0,65
trideceno	7,01	Al In-5		0,09	0,09	0,15	0,35	0,26	0,12
3-acetoxypiridina	7,13	PR-10		0,16	0,19	0,16	0,41	0,56	0,27
piridina-carbonitrilo	7,17	PR-11	0,43	0,81	0,54	0,84	1,03	0,73	0,67
p/m cresol	7,33	U-9	4,81	6,51	3,68	6,22	4,87	6,18	4,31
naftaleno	7,38	U-10							0,96
4-amino pirimidina	7,65	PR-12	0,15	0,44	0,22	0,46		0,41	0,22
2 metil benzonitrilo	7,79	PR-13	0,99	1,11	0,95	0,92	0,67	0,78	1,12
3 metil benzonitrilo	7,84	PR-14		0,56	0,24	0,69	0,60	0,55	0,19
2,4 dimetil fenol	7,92	U-11	0,50	0,44	0,33	0,59	0,47	0,50	0,30
1,1dimetil indeno	8,12	U-12	0,27	0,61	0,38	0,64	0,61	0,39	0,34
comp. azufrado	8,27	U-13	0,19	0,19	0,18	0,22	0,39	0,37	0,13
4-etilfenol	8,43	U-14	0,93	1,23	0,76	1,40	1,05	1,35	0,66
tetradecano	8,52	AL-1	0,42	2,09	1,35	0,22	0,55	0,44	0,92
1-tetradeceno	8,56	Al In-6	0,55	0,56	0,37	0,70		0,73	0,42
1-metilnaftaleno	8,70	U-15	0,24	0,12	0,12	0,54	0,28	0,12	0,12
pirrolidin-2,5-diona	8,86	PR-15	0,86	2,21	0,99	2,43	1,59	1,34	1,17
2-metil naftaleno	8,98	U-16	0,30	0,40	0,17	0,77	0,51	0,26	0,22
ácido 2,6-dimetilbenzoico	9,21	U-17	0,65	0,32	0,56	0,89	0,55	0,71	0,61
4-vinilfenol	9,28	U-18	2,03	0,06	1,29	2,57	2,29	2,90	1,53
4-vinil-2-metoxifenol	9,51	LG-2	0,15	2,45				0,67	0,16
o-aminofenol	9,57	U-19		0,06		0,18	0,11	0,06	0,05
pentadecano	9,62	AL-2	0,62	0,53	0,42	0,44	0,59	0,70	0,34
1-pentadeceno	9,70	Al In-7	0,66	0,76	0,50	0,81	0,65	1,17	0,52
isoquinolina	9,73	U-20	0,38	0,54	0,36	0,31	0,50	0,42	0,38
x,x-dimetilnaftaleno	9,83	U-21	0,29	0,38	0,22	0,50	0,36	0,32	0,24
x-y-dimetilnaftaleno	10,01	U-22	0,32	0,28	0,07	0,43	0,24	0,14	0,12
indol	10,20	PR-16	0,30	1,42	0,75	1,37	1,28	1,81	0,88
acetamidofurano	10,28	PS-10		0,44	0,20	0,60	0,52	0,63	0,28
anhídrido o-ftálico	10,46	CT-1	1,16		0,07	0,56	0,15	0,13	0,08
hexadecano	10,72	AL-3	0,28	0,71	0,35	0,68	0,66	0,68	0,43
1-hexadeceno	10,85	Al In-8	0,75	0,67	0,49	0,63	0,68	0,86	0,52
2,3-dihidro-2metil-1H-Inden-1-ona	10,89	PR-17	0,24	0,16	0,12	0,21	0,38	0,15	0,10
x-metil-1H-Indol	10,99	PR-18	0,89	1,05	0,80	1,52	1,23	1,05	1,01

Tabla 4.3.3: Continuación

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Código (origen)	R-25	R/E-28	R-39	M-131	M-155	E-209	E-226
heptadecano	11.19	AL-4	0,37	0,40	0,28	0,61	0,72	0,51	0,28
1-heptadeceno	11.96	Al In-9	0,64	0,76	0,44	0,80	0,76	0,86	0,50
ácido 2-cianobenzoico	12.00	PR-19	1,60	1,53	1,37	2,09	0,92	0,45	1,62
4,6-dimetilbenzotriazol	12.58	CT-2	0,18	0,22	0,27	0,39	0,36	0,36	0,23
octadecano	12.80	AL-3	0,36	0,38	0,25	0,46	0,51	0,39	0,40
1-octadeceno	13.03	Al In-10	0,70	0,74	0,49	0,68	0,60	0,88	0,64
ácido indol-2-carboxílico	13.08	PR-20	0,12	0,24	0,10	0,35	0,36	0,38	0,15
undecilbenceno	13.30	CT-3	0,29	0,30	0,17	0,35	0,30	0,35	0,20
dodecanitrilo	13.47	ART-1	0,13	0,46	0,25	0,39	0,35	0,24	0,32
ácido pentadecanoico	13.51	AG-1			0,18		0,17	0,09	
nonadecano	13.67	AL-6	0,26	0,28	0,23	0,35	0,38	0,58	0,26
1-nonadeceno	14.06	Al In-11	0,46	0,39	0,76	0,45	0,43	0,66	0,25
fenoxifenol	14.10	LG-3	1,41	1,34	0,15	1,40	1,47	1,64	0,92
docecilbenceno	14.46	CT-4	0,17	0,24	0,51	0,27	0,28	0,22	0,20
2-octilfurano	14.52	PS-11	0,57	0,53	0,32	0,33	0,37	0,40	0,58
eicosano	14.60	AL-7	0,75	0,41	0,43	0,37	0,47	1,11	0,45
1-eicoseno	15.04	Al In-12	0,62	0,55	0,18	0,61	0,56	0,89	0,47
2-nonadecanona	15.08	U-23	0,25	0,24			0,33	0,61	0,20
éster fenilbutanoico	15.15	LG-4	0,26	0,43	0,24	0,56	0,45	0,56	0,24
ftalato	15.34	CT-5	0,10	0,17		0,19	0,14	0,22	
hexadecanonitrilo	15.59	ART-2	0,48	1,01	0,86	0,75	0,69	0,73	1,01
éster fenilpentanoico	15.67	LG-5		0,34		0,17	0,30	0,31	0,13
heneicosano	15.86	AL-8	0,50	0,55	0,25	0,61	0,61	1,02	0,26
1-heneicoseno	15.98	Al In-13	0,49	0,35	0,23	0,39	0,34	0,68	0,27
ácido palmítico	16.02	AG-2	1,09	0,35	0,15	0,07	0,54	1,53	0,22
2-(1-hexenil)-tiofeno	16.34	U-24	0,11	0,19	0,10	0,20	0,22	0,18	0,14
docosano	16.80	AL-9	0,43	0,50	0,24	0,41	0,65	0,74	0,31
1-docoseno	16.87	Al In-13	0,82	0,54	0,39	0,53	0,52	1,18	0,47
ácido esteárico	16.92	AG-3	0,16	0,19	0,14	0,16	0,18	0,30	0,15
cicloglicilvalina	16.98	PR-21	0,03	0,00	0,04	0,04	0,06	0,11	
nonadecanamida	17.03	PR-22	0,14	0,14	0,08	0,21	0,16	0,25	0,09
3,5-dimetoxi phenol	17.16	LG-6	0,12	0,18	0,12	0,15	0,17	0,22	0,10
pentadecil-benceno	17.24	CT-6	0,28	0,21	0,30	0,26	0,24	0,26	0,26
octadecanonitrilo	17.42	ART-3	0,28	0,47	0,43	0,56	0,46	0,46	0,52
tricosano	17.55	AL-10	0,28	0,22	0,18	0,25	0,29	0,55	0,22
1-tricoseno	17.73	Al In-14	0,47	0,43	0,29	0,35	0,43	0,92	0,32
ciclo (L-prolil-L-prolil)	17.78	PR-23	0,45	0,88	0,35	1,03	0,88	0,99	0,38
nonadecanonitrilo	17.86	ART-4	0,18	0,10	0,05	0,10	0,12	0,13	0,06
tetracosano	18.43	AL-11	0,58	0,16	0,09	0,12	0,22	0,38	0,13
1-tetracoseno	18.55	Al In-15	0,27	0,39	0,23	0,35	0,46	0,84	0,28
ácido araquídico	18.61	AG-4	0,00	0,24	0,00	0,22	0,27	0,13	0,13
eicosanodecanamida	18.66	PR-24	0,29	0,18	0,23	0,16	0,21		0,25
nonadecanitrilo	18.95	ART-5			0,14	0,46	0,29		0,21
pentacosano	19.28	AL-12	0,16	0,16	0,09	0,24	0,24	0,48	0,16
1-pentacoseno	19.35	Al In-16	0,27	0,28	0,19	0,39	0,24	0,95	0,20
ácido heneicosanoico	19.40	AG-5						0,05	0,07
hexacosano	19.51	AL-13	0,22	0,23	0,15	0,27	0,24	0,59	0,19
1-hexacoseno	20.11	Al In-17	0,27	0,24	0,11	0,24	0,26	0,56	0,14
ácido behénico	20.17	AG-6	0,07		0,06	0,06	0,08	0,23	
heptacosano	20.20	AL-14	0,39	0,38	0,28	0,56	0,42	0,70	0,34
1-heptacoseno	20.86	Al In-18	0,24	0,26	0,13	0,24	0,25	0,24	0,13
ácido tricosanoico	20.91	AG-7				0,07	0,05	0,05	
octacosano	20.94	AL-15	0,21	0,21	0,08	0,23	0,22	0,41	0,09
1-octacoseno	21.57	Al In-19	0,26	0,44	0,19	0,25	0,32	0,55	0,20
ácido lignocérico	21.62	AG-8	0,15				0,07	0,11	0,05
21-nor-5- $\alpha$ -colest-24-eno	21.66	AG-9			0,05		0,08	0,16	0,06
nonacosano	21.90	AL-16	0,18	0,19	0,07	0,13	0,21	0,43	0,09
1-nonacoseno	22.29	Al In-20	0,07	0,45	0,22	0,26	0,27	0,54	0,31
ácido pentacosanoico	22.34	AG-10						0,09	0,03
triacontano	22.39	AL-17	0,18	0,11	0,04		0,10	0,23	0,07
1-triaconteno	22.46	Al In-21	0,11	0,08	0,04		0,10	0,28	0,12
ácido hexacosanoico	23.10	AG-11	0,07	0,07	0,09		0,07	0,22	0,09
henetriacontano	23.18	AL-18	0,09	0,13	0,07		0,14	0,36	0,06
1-henetriaconteno	23.26	Al In-22	0,08	0,20	0,16		0,07	0,18	0,17
ácido octacosanoico	24.03	AG-12					0,10	0,11	0,13

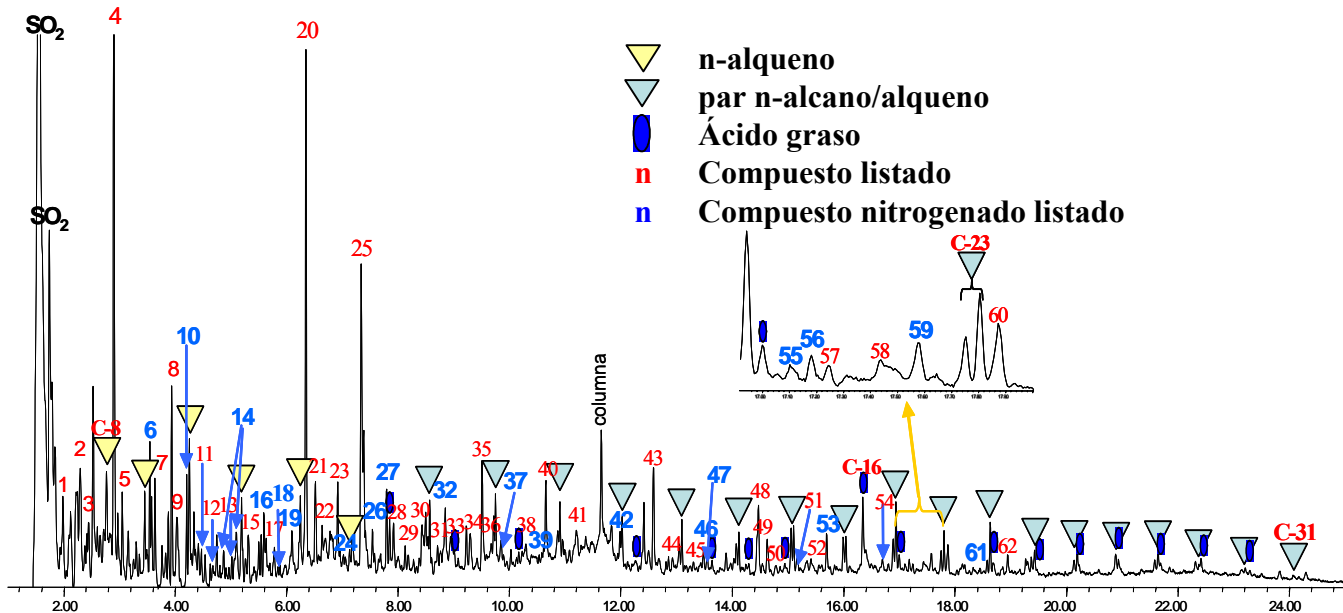


Figura 4.3.3c: Cromatograma de ión total de los productos de pirólisis de la muestra R-25



**Tabla 4.3.3c: Lista de compuestos numerados correspondiente al cromatograma de ión total de los productos de pirólisis de la muestra R-25**

Nº Compuesto	Nº Compuesto	Nº Compuesto	Nº Compuesto	Nº Compuesto
1 2-metilfurano	14 2-etil-1-H-pirrol	27 2-metilbenzocnitrilo	40 anhídrido oftálico	53 hexadecanitrilo
2 benceno	15 5-metilfurfural	28 2,4-dimetilfenol	41 2,3-dihidro-2-metil-1-indenona	54 2-(1hexenil)tiofeno
3 2-vinilfurano	16 benzonitrilo	29 1,1-dimetil-1H-indeno	42 x-metil-1H-indol	55 cicloglicilvalina
4 tolueno	17 1,3-bencenodiol	30 4-etilfenol	43 ácido 2-cianobenzoico	56 nonadecanamida
5 piridina	18 x,x,x-trimetilpirrol	31 1-metilnaftaleno	44 4,6-dimetilbenzotriazol	57 3,5-dimetoxifenol
6 1-H-pirrol	19 x-etil-x-metilpirrol	32 2,5-pirrolidinadiona	45 ácido 2-indolcarboxílico	58 pentadecilbenceno
7 o-xileno	20 fenol	33 2-metilnaftaleno	46 undecilbenceno	59 octadecanitrilo
8 estireno	21 maleimida	34 ácido 2,6-dimetilbenzoico	47 dodecanitrilo	60 ciclo L-prolil-L-prolil
9 furfural	22 guaiacol	35 4-vinilfenol	48 fenolfenoxi	61 nonadecanonitrilo
10 3-metil-1-H-pirrol	23 o-cresol	36 4-vinil-2-metoxifenol	49 dodecilbenceno	62 eicosano decanamida
11 o-etiltolueno	24 piridinacarbonitrilo	37 isoquinolina	50 2-octilfurano	
12 2,4-dimetilfurano	25 p/m-cresol	38 x,x-dimetilnaftaleno	51 2-nonadecanona	
13 5-metil-2-furanona	26 4-aminopiridina	39 1H-indol	52 ácido butanoico fenilester	

Como se puede observar en la figura anterior, el sedimento R-25 libera por pirólisis dos series de productos de pirólisis bien definidos como son los dobletes alcanos/alquenos ( $C_8-C_{31}$ ) y los ácidos grasos. La presencia de estos dobletes en el sedimento sugiere la existencia de un importante dominio alquílico (o una fracción alquílica fácilmente pirolizable) en la MO de los sedimentos del área de estudio. Los pares alcanos/alquenos también han sido detectados como típicos productos de la pirólisis de AH (Tissot y Welte, 1984; Saiz-Jiménez y de Leeuw, 1987), así como de biopolímeros alifáticos no saponificables altamente resistentes y recalcitrantes presentes en cutículas de plantas actuales y fósiles (Nip et al., 1986a,b), y en las paredes celulares de algas (Largeau et al., 1986; Augris et al., 1998).

Una característica común a todos los pirogramas y que se refleja en las Figura 4.3.3a-b es la presencia de 2 picos de  $SO_2$  con una abundancia relativa muy elevada. Exceptuando estos compuestos, los productos de pirólisis más abundantes (en todos los pirogramas de las muestras de sedimentos) son los compuestos aromáticos Tolueno, Fenol y *p/m*-Cresol, que corresponden a los picos 4, 20 y 25 respectivamente.

En conjunto, se han identificado 129 compuestos diferentes, que se muestran en la Tabla 4.3.3, la mayoría similares a los encontrados por otros autores en trabajos recientes (Coban-Yildiz et al., 2000 a,b; Deshmuck et al., 2001; Ergin et al., 1996; Fabbri et al., 1998; Fabbri et al., 2005; González-Vila et al., 2001a;b, y referencias incluidas en los mismos). Los compuestos se han agrupado en familias en función de su precursor biológico, así por ejemplo los furanos, son productos típicos de la degradación térmica de carbohidratos y polisacáridos en general (PS), mientras benzonitrilos, indoles, metil-indoles proceden de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina) y son indicadores de material de origen proteico (PR). Son comunes algunos compuestos de origen terrestre con estructura Guayacilo y

Syringilo que se atribuyen a la degradación aeróbica de compuestos derivados de la lignina (LG).

Alquilbencenos y ftalatos en general se han considerado provenientes de contaminantes (CT), mientras que la mayoría de los hidrocarburos aromáticos y fenoles no poseen un origen biogénico único (U). Se identificaron así mismo compuestos de origen lipídico, diferenciándolos entre derivados de ácidos grasos (AG), alcanos (AL) y alquenos (AL In), por último se detectaron algunos compuestos que podrían ser considerados como artefactos (ART) inherentes al proceso de pirólisis, como pueden ser los alcanonitrilos.

En la Tabla 4.3.3d se presentan los resultados de la integración de compuestos identificados por pirólisis, agrupados en las familias mencionadas anteriormente.

La resolución espectral varió sensiblemente de unas muestras a otras, así para la muestra E-209 se identificaron más del 92 % de los picos aparecidos, mientras que en la muestra R-39 solo pudieron identificarse poco más del 64 %.

El grupo más abundante de compuestos identificados es el de aquellos sin un origen único o sin origen específico (U) en el que se encontraron 24 compuestos diferentes, destacando en número y contenido los hidrocarburos aromáticos tales como el benceno y los fenoles no lignínicos.

El siguiente grupo por orden de abundancia es el formado por alcanos y alquenos (AL + AL In), cuya presencia varía entre el 21 % en la muestra M-131 y más del 30 % en la muestra E-209. Se identificaron 18 alcanos ( $C_{14}$ - $C_{31}$ ) y 23 alquenos diferentes entre  $C_8$  y  $C_{31}$ , siendo estos últimos más abundantes en todas las muestras, como indica la razón AL /AL In. En general son más abundantes los homólogos de menor peso molecular

(<C<sub>20</sub>). Su presencia es sensiblemente más baja en las muestras más alejadas de la costa, tendencia que puede estar influenciada por múltiples factores que afectan de forma significativa a los marcadores de origen lipídico (Colombo et al., 1997; Keil et al., 1998; Grossi et al., 2003).

**Tabla 4.3.3d: Valores globales de la integración de compuestos identificados por pirólisis analítica (%)**

Tipo de compuesto	Código	R-25	R/E-28	R-39	M-131	M-155	E-209	E-226
<b>Polisacáridos</b>	PS	6,65	8,42	8,53	8,57	16,48	6,71	7,47
<b>Sin origen único</b>	U	43,54	36,27	41,48	38,57	34,85	36,58	36,73
<b>Proteínas</b>	PR	16,86	21,09	20,70	23,47	17,38	15,03	23,16
<b>Contaminantes</b>	CT	2,75	1,32	2,04	2,26	1,65	1,66	1,47
<b>Lignina</b>	LG	2,97	6,03	1,15	2,92	3,18	4,37	2,63
<b>Alcanos + Alquenos</b>	AL + AL In	23,92	23,50	22,35	21,05	22,50	30,65	23,88
<b>Ratio (AL/ AL In)</b>	AL / AL In	0,49	0,61	0,51	0,46	0,56	0,57	0,46
<b>Ácidos grasos</b>	AG	1,95	0,99	1,05	0,64	1,81	3,31	1,43
<b>Artefactos</b>	ART	1,35	2,38	2,69	2,52	2,16	1,69	3,23
<b>% Compuestos identificados</b>		79,17	85,74	64,46	89,46	89,04	92,74	66,22

Resultados en %; Valores relativos normalizados al 100%

Esta divergencia de resultados nos da una idea de la complejidad y variedad de procesos diferentes que pueden estar interactuando entre sí, y que hacen cada escenario de estudio diferente del resto.

En cuanto a las muestras de origen proteico (PR), se identificaron 24 compuestos diferentes, siendo los más abundantes los derivados del pirrol. La muestra más rica en este tipo de compuestos fue la M-131 con más del 23 %, resultado que cabría esperar si tenemos en cuenta que los marcadores proteicos, son representativos del “*input*” de MO de microorganismos acuáticos, debido a la baja abundancia relativa de proteínas en plantas terrestres superiores (Fabbri et al., 2005). Por el contrario la muestra M-155

presenta un contenido relativo en compuestos proteicos pirolizados muy inferior, lo que podría indicar una mayor contribución relativa de MO de origen terrestre.

Los ácidos grasos (AG) están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se han utilizado como marcadores biológicos en todo tipo de sedimentos para inferir la contribución de organismos específicos (Johns et al., 1966; Cranwell, 1973). En este grupo se identificaron 12 compuestos, entre ellos 11 ácidos grasos saturados de cadena lineal (C<sub>15</sub>-C<sub>28</sub>) siendo los de cadena corta (< C<sub>22</sub>) y de entre ellos el palmítico (C<sub>16</sub>) los que presentan una mayor abundancia relativa, este resultado podrá indicar una mayor contribución global de MO procedente de algas y microorganismos (Volkman et al., 1980; Kawamura e Ishiwatari, 1984). La muestra E-209 mostró la mayor riqueza en compuestos de este grupo, resultado que contribuiría también a la idea de un menor grado de alteración en la misma.

Se encontraron 6 compuestos derivados de la lignina (LG), siendo la muestra R/E-28 (situada en la desembocadura del río Odiel) la más rica en este tipo de compuestos. No obstante, si tenemos en cuenta la transformación que los grupos metoxilo sufren durante la pirólisis analítica, sería necesario proteger este grupo funcional para poder hacer una identificación efectiva de los productos derivados de la lignina mediante pirólisis analítica, este proceso, que implica la metilación de las muestras con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), se aplicará posteriormente en el apartado 4.3 de este Capítulo a las formas de MOR aisladas de los sedimentos marinos.

Se han identificado 11 compuestos derivados de polisacáridos (PS), destacando la presencia de furfural, siendo su abundancia sensiblemente mayor en las muestras más alejadas de la costa (M-131 y M-155).

Se encontraron 6 compuestos susceptibles de tener una procedencia de origen antrópico como pueden ser derivados plásticos y aditivos

industriales, que hemos considerado como contaminantes del entorno (CT). Las series más abundantes son alquilbencenos (típicos componentes de detergentes) que son más abundantes en la muestra R-25 que está situada junto al puerto de Huelva, aunque fueron detectados en todas las muestras estudiadas.

También se detectaron en todas las muestras artefactos típicos de la pirólisis (ART), como los alcanonitrilos. Algunas particularidades relevantes del comportamiento pirolítico de las muestras se resume a continuación:

La muestra R-25 situada en el puerto de Huelva, posee el mayor contenido en estireno con un 2,25 % (ver Tabla 4.3.3), este compuesto es considerado generalmente de origen antropogénico, (residuos de poliestireno), lo que podría indicar la presencia de contaminantes plásticos en la zona. Por otro lado, el hecho de que se haya encontrado estireno como marcador de compuestos típicos de lignina degradada y como producto típico de la pirólisis de turba (van Smeerdijk y Boon, 1987) nos llevó a excluirlo del grupo de contaminantes (CT). Incluso haciendo esta exclusión la muestra R-25 sigue presentando los valores relativos más elevados en contenido de CT, y en compuestos aromáticos sin origen biogénico único (U), lo que indica una elevada presencia de contaminantes antropogénicos y hace que esa muestra sea susceptible de poseer un elevado contenido en MOR aromática, en la que estaría incluida el BC.

La muestra R-39 localizada en el Río Tinto, posee los contenidos más bajos en compuestos de origen lipídico (AG + AL +AL In) y en compuestos protéicos, valores que podrían indicar una menor contribución (*input*) de MO de origen marino a este entorno, y una mayor alteración de la MO, si tenemos en cuenta su bajo contenido en TOC, en torno al 1 % (Tabla 4.3.1), el elevado contenido en S y las drásticas condiciones (pH ácido, elevada presencia de metales pesados, etc., etc.), que tienen lugar en el Río

Tinto, otra posible explicación sería la escasa capacidad productiva de los microorganismos del entorno o incluso la falta de organismos productores, que habría que confirmar mediante estudios microbiológicos en la zona.

La muestra E-209, situada en el estuario del Río Guadiana, libera por pirólisis el mayor contenido y variedad de compuestos de origen lipídico (AG + AL +AL In), pudiendo indicar una doble contribución de MO (marina + terrestre), además presenta el mayor contenido en alcanos y alquenos (superior al 30 %) de todas las muestras, resultado que podría indicar un menor grado de biodegradación, o una mayor deposición de MO reciente, probablemente favorecido por la localización estuarina de la muestra.

La muestra M-131, localizada en la plataforma marina, contiene los valores más elevados de PS y PR, típicos de MO procedente de organismos acuáticos. Los resultados de los productos liberados en la pirólisis de los sedimentos M-155, R/E-28 y E-226, mostrados globalmente en la Tabla 4.3.3d, no permiten diferenciar con claridad un comportamiento característico o diferenciado para los mismos, lo que contribuye a la idea de la complejidad y variedad de mecanismos que interactúan en la zona.

#### 4.3.3.2 Resonancia Magnética nuclear (CP MAS $^{13}\text{C}$ NMR)

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR en estado sólido de los sedimentos después de ser tratados con HF al 10% (Schmidt et al., 1997) se presentan en la Figura 4.3.3d., mientras que la Tabla 4.3.3d muestra los valores de integración (%) correspondientes a las principales regiones de los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR en los sedimentos.

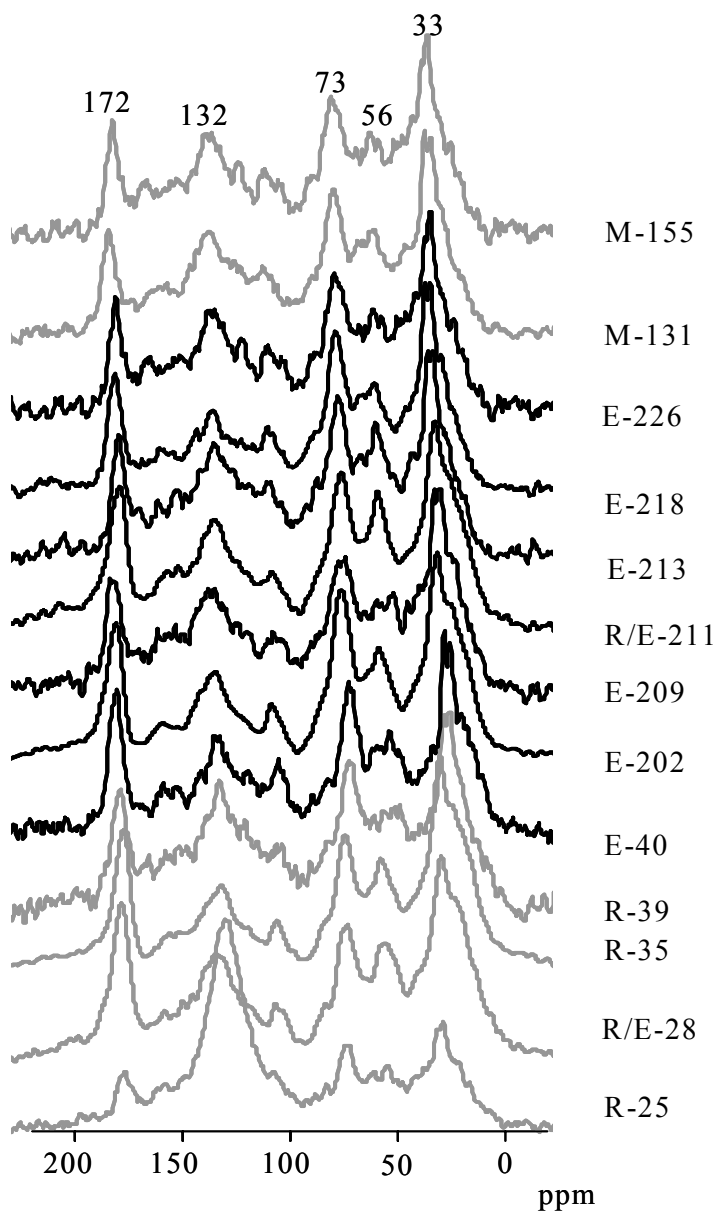


Figura 4.3.3d: Espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR (CP MAS) de sedimentos desmineralizados



**Tabla 4.3.3d: Integración (%) de las principales regiones de los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR en sedimentos desmineralizados y relaciones entre áreas de las principales regiones**

Muestra	Región 245- 185 ppm	Región 185- 160 ppm	Región 160- 140 ppm	Región 140- 110 ppm	Región 110-60 ppm	Región 60-45 ppm	Región 45-0 ppm	O- Al/Al	Al/Ar
<b>R-25</b>	2,93	10,35	10,33	38,36	14,50	5,65	17,87	1,13	0,37
<b>R/E-28</b>	3,97	12,95	7,06	17,04	19,24	9,48	30,26	0,95	1,26
<b>R-35</b>	3,15	12,69	5,51	15,21	19,08	9,67	34,70	0,83	1,67
<b>R-39</b>	3,34	12,33	6,94	18,69	18,77	9,33	30,59	0,92	1,19
<b>E-40</b>	3,92	12,10	6,73	16,63	18,94	9,31	32,37	0,87	1,39
<b>E-202</b>	3,78	11,94	5,54	15,36	23,07	9,41	30,89	1,05	1,48
<b>E-209</b>	5,39	11,60	7,60	16,97	22,77	9,11	26,55	1,20	1,08
<b>R/E-211</b>	4,88	12,61	7,39	16,86	21,20	9,40	27,65	1,11	1,14
<b>E-213</b>	2,39	10,09	7,21	18,52	23,25	10,53	28,02	1,21	1,09
<b>E-218</b>	3,36	11,56	5,44	13,65	26,60	10,45	28,93	1,28	1,52
<b>E-226</b>	3,75	11,46	5,78	15,92	25,81	9,77	27,52	1,29	1,27
<b>M-131</b>	3,30	11,62	6,38	15,84	22,53	9,53	30,78	1,04	1,39
<b>M-155</b>	4,73	12,56	6,37	16,25	21,76	9,03	29,29	1,05	1,29

Al= C alquílico (0-45 ppm); O-Al= C O-alquílico (45-90 ppm); Ar= C aromático (110-160 ppm)

Aunque no se observan grandes diferencias en general entre los espectros NMR  $^{13}\text{C}$  de las muestras estudiadas, si se observan algunos comportamientos específicos destacables.

La señal de C en la región alquílica (0-45 ppm) puede provenir de hidrocarburos saturados, ácidos grasos, ceras, resinas, cutinas suberinas, sustituyentes alquílicos de compuestos aromáticos, grupos alquilo en aminoácidos, etc, compuestos habituales en sedimentos, pero a esta región también puede contribuir la MO de biopolímeros insolubles, no hidrolizables altamente alifáticos, que están presentes en diversas algas y plantas superiores (Nip et al., 1986a, b; 1986; Tegelaar et al., 1989b; de Leeuw et al., 1991) cuya presencia sería muy importante de cara a la caracterización

de las formas de MOR en sedimentos marinos del área estudiada. Esta banda domina en general todos los espectros de los sedimentos marinos estudiados, a excepción de la muestra R-25 dominada por la presencia de la señal de C aromático ( $C_{ar}$ ).

En la región O-alquílica del espectro (45-110 ppm) aparecen las señales procedentes de los C de carbohidratos. La señal mayoritaria se encuentra en la región 60-90 ppm (centrada a 73 ppm) y podría corresponder a alcoholes secundarios y primarios de carbohidratos. En la región 46-60 ppm (centrada a 56 ppm) existe un solapamiento de señales correspondientes al C de grupos metoxilos y el  $C_{\alpha}$  de aminoácidos. En la región entre 90-110 ppm (centrada en 103 ppm) también se solapan señales, las procedentes del C anomérico ( $C_1$ ) de los carbohidratos y las correspondientes a los C cuaternarios ( $C_{4a}$ ) de taninos condensados (Preston, 1996). Como se observa en la Tabla 4.1.3f, la contribución del carbono O-alquílico es sensiblemente mayor en la zona estuarina de los ríos Piedras y Guadiana (muestras R/E-211, E-213 y E-226) que en las zonas del Tinto y el Odiel (R-25, R/E-28, R-35, R-39, R-40).

En la zona del espectro entre 110-160 ppm que corresponde a la región aromática, aparecen las señales correspondientes a  $C_{ar-H}$  y a  $C_{ar}$  sustituidos por grupos alquílicos (pico centrado en 133 ppm) y  $C_{ar}$  heterosustituidos (140-160 ppm). Se observa en todas las muestras una contribución destacada de estructuras de C derivadas de la lignina, aunque se hace más destacada en las muestras R/E-28 y especialmente R-25, observándose picos entre 145-150 ppm procedentes de los  $C_3$  y  $C_4$  en estructuras tipo Guayacilo, entre 150-153 ppm procedentes de los  $C_3$  y  $C_5$  en estructuras de tipo Syringilo, alrededor de 135 ppm procedentes de  $C_1$  alquil sustituido y próximos a 120 ppm el resto de los C aromáticos (Maciel et al., 1981). La contribución de C aromático es notablemente mayor en la muestra

R-25 (> 48%) y se encuentra en todas las muestras en valores similares (excepto en R-25) y significativos, siempre por encima del 18 %.

La región de C carbonílicos, C de aldehídos y cetonas (región > 160 ppm) no presenta gran variabilidad permaneciendo en torno al 15%, es de escasa intensidad en los espectros. Aparece en el espectro como un pico relativamente agudo y no es posible distinguir entre la contribución de las amidas y los ácidos carboxílicos. Los aldehídos y las cetonas aparecen como señales de poca intensidad cercanas a 200 ppm.

La relación O-Al/Al, propuesta por Baldock et al. (1997) nos indicaría el grado de biodegradación de carbohidratos o su degradación de forma preferencial respecto a las biomacromoléculas lipídicas, indicando una mayor degradación de este tipo de compuestos en las muestras situadas en el entorno de los ríos Tinto y Odiel, observándose los valores más bajos en las muestras R/E-28, R-35, R-39 y R-40, y una mejor preservación de los carbohidratos en las muestras pertenecientes al estuario del Guadiana (muestras E-209, E-218 y E-226). Los valores de la relación Al/Ar por su parte (>1) nos indican un elevado grado de alifaticidad en la mayoría de las muestras estudiadas, a excepción de la muestra R-25 situada en el puerto de Huelva. Estos datos confirmarían los resultados obtenidos mediante pirólisis analítica en cuanto al grado de biodegradación de las muestras y la alifaticidad de las mismas.

#### **4.4 CARACTERIZACIÓN DE FORMAS DE MATERIA ORGÁNICA REFRACTARIA AISLADAS DE LOS SEDIMENTOS**

Las formas de MOR procedentes de sedimentos representativos se aislaron mediante un proceso que incluía la extracción secuencial del

material lipídico, las sustancias húmicas y la fracción mineral del sedimento, siguiendo el esquema que se mostró en la Figura 3.3.3, y cuyos detalles técnicos quedaron recogidos en el tercer Capítulo, a continuación se recogen los análisis y resultados que fueron practicados sobre estas formas de MOR aisladas.

#### **4.4.1 Análisis Elemental**

La Tabla 4.4.1 recoge los resultados del análisis elemental (C y N) y la relación C/N medidos sobre la MOR aislada de sedimentos representativos del área de estudio.

**Tabla 4.4.1: Análisis elemental (C y N) y ratio C/N en MOR procedente de sedimentos**

<b>MOR</b>	<b>C (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>C/N<sub>MOR</sub></b>	<b>C/N<sub>0</sub></b>
<b>R-25</b>	5,43	0,20	27,2	13,6
<b>R-39</b>	0,83	0,07	11,9	13,0
<b>E-209</b>	0,68	0,07	9,7	4,8
<b>E-218</b>	1,14	0,11	10,4	8,8
<b>E-226</b>	0,93	0,11	8,5	8,9
<b>M-155</b>	3,45	0,25	13,8	7,3

C/N<sub>0</sub> Medido en sedimento bruto; C/N<sub>MOR</sub> Medido sobre MOR aislada

Los resultados del análisis elemental muestran que la extracción secuencial afectó de formas muy diversas a cada muestra. Así, en términos absolutos, las muestras R-39, E-209, E-218 y E-226 disminuyeron su contenido en N y TOC, aunque no todas en la misma medida, ya que mientras en las muestras R-39 y E-226 se producía una disminución de la razón C/N que podría indicar una degradación más acusada de la MO de origen terrestre, en las muestras E-209 y E-218 el ratio C/N evolucionó de forma inversa indicando quizás una mayor labilidad en la MO marina de

estas muestras (Meyers, 1984). La MOR de las muestras R-25 y M-155 respecto a la muestra bruta original enriqueció notablemente su contenido en C y N, si bien el valor  $C/N_{MOR}$  en la muestra R-25 (27,2) mostró una naturaleza inequívocamente terrestre.

#### 4.4.2 Análisis Termogravimétrico (TG-DSC)

La aplicación del análisis termogravimétrico (TG-DSC) a MOR aislada de sedimentos tenía como misión principal demostrar la refractoricidad térmica de este material y discernir la existencia de posibles diferencias en la naturaleza de la MOR aislada dependiendo del origen de la muestra.

La Figura 4.4.2 muestra el resultado de los análisis termogravimétricos (TG-DSC) a MOR aisladas a partir de sedimentos brutos.

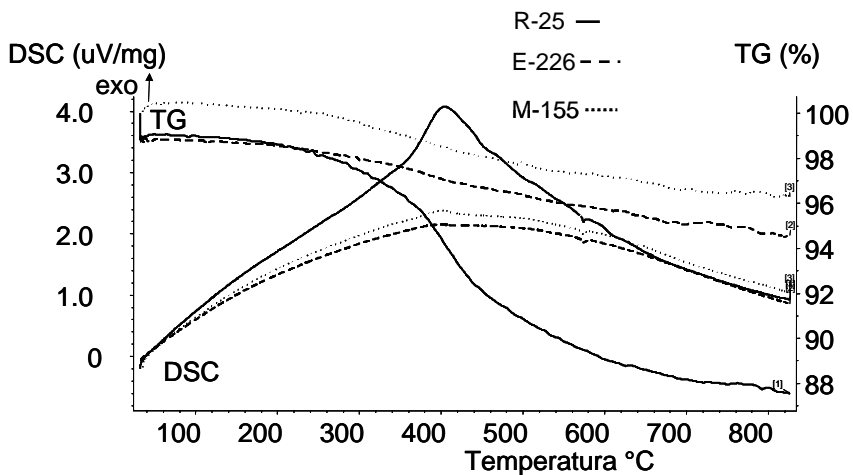


Figura 4.4.2: TG-DSC aplicado a MOR aislada

En la Figura 4.4.2 se observa cómo la descomposición térmica de las muestras se inicia en el intervalo de temperaturas 380-400 °C, demostrándose así la elevada recalcitrancia del material aislado. Aunque las pérdidas de peso (TG) muestran sensibles diferencias (4 al 12 % del peso total), los perfiles que siguen (DSC) son prácticamente idénticos, por lo que no es posible discernir diferencias en la naturaleza de la MOR de las muestras estudiadas mediante estas técnicas.

#### **4.4.3 Pirólisis Cromatografía de Gases/Espectrometría de masas (*Py-GC/MS*) en formas de materia orgánica refractaria**

La pirólisis analítica ya ha sido anteriormente aplicada a la caracterización de MOR aislada de matrices naturales complejas, tales como suelos (Quénéa et al., 2005; Poirier et al., 2000; 2003; Kögel-Knabner, 2000) y sedimentos (Simpson et al., 2005; Nguyen et al., 2003; Zang y Hatcher, 2003; Freudenthal et al., 2001; Zegouagh et al., 1999). Las Figuras 4.4.3 (a,b y c) muestran los cromatogramas de ión total (TIC) de los productos de pirólisis de muestras representativas de cada escenario estudiado.

Según se observa en las Figuras 4.4.3 a, b y c, los productos de pirólisis liberados son series de pares n-alcano/alqueno (C<sub>7</sub>-C<sub>31</sub>), ésteres metílicos de ácidos grasos (C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>) (FAMEs), algunos compuestos aromáticos derivados del benceno (fenoles y bencenos alquil-sustituidos fundamentalmente) y un grupo muy reducido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, derivados del naftaleno y antraceno).

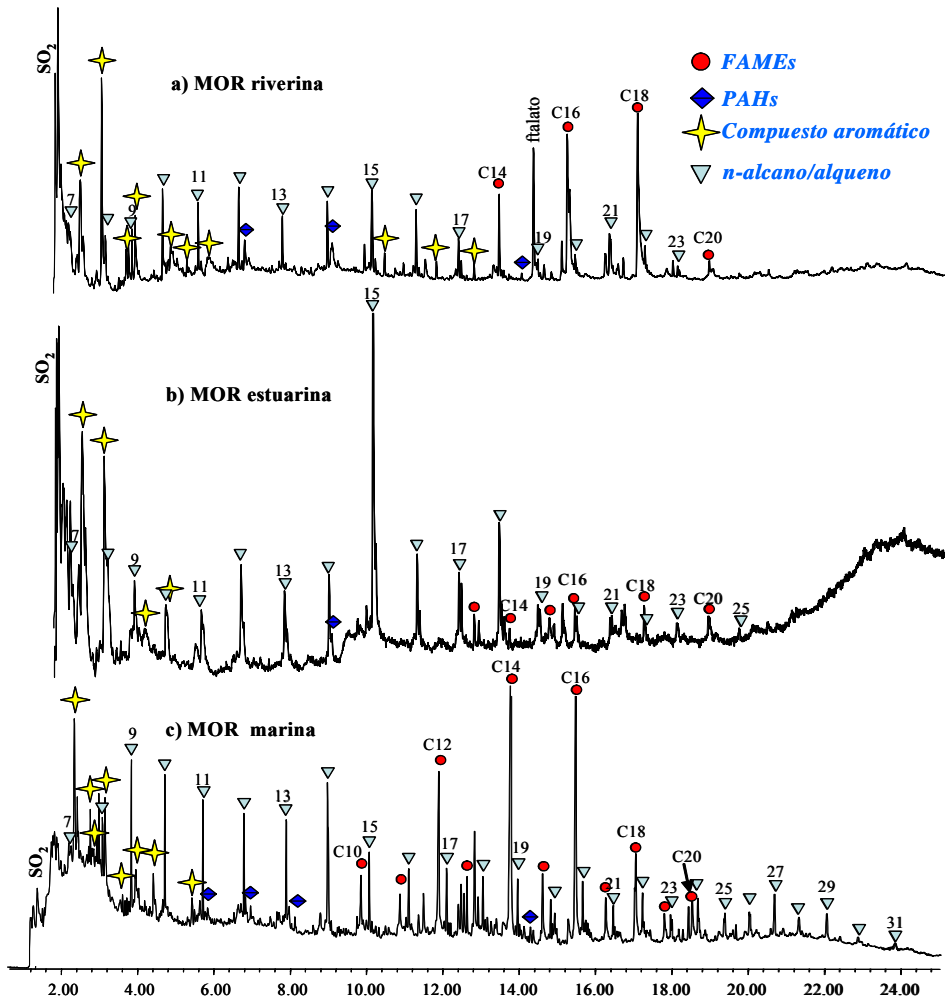


Figura 4.4.3 a/b/c: Cromatograma de ión total de los productos de pirólisis (pirogramas) de MOR de sedimentos procedentes de sedimentos fluviales (a), estuarinos (b) y marinos (c)

Los pirogramas de la MOR muestran notables diferencias respecto a los obtenidos a partir de la Py directa de los sedimentos desmineralizados, las más importantes son:

1. Sensible reducción en el número de compuestos pirolizables.
2. Desaparición de los compuestos derivados de polisacáridos.

3. Disminución drástica de los compuestos de origen peptídico.
4. Dominio de los compuestos alquílicos en la MOR.

Estos cambios parecen indicar que durante el procedimiento secuencial de aislamiento de MOR se ha preservado la fracción alquímica de la oxidación química, mientras que polisacáridos y compuestos peptídicos lábiles se oxidan. No obstante, estos resultados deben tomarse con cautela, ya que la fracción de compuestos pirolizables y susceptibles de ser posteriormente identificados, como hemos señalado con anterioridad, no es constante en cada muestra y puede existir una importante fracción de MO “invisible” para la pirólisis analítica.

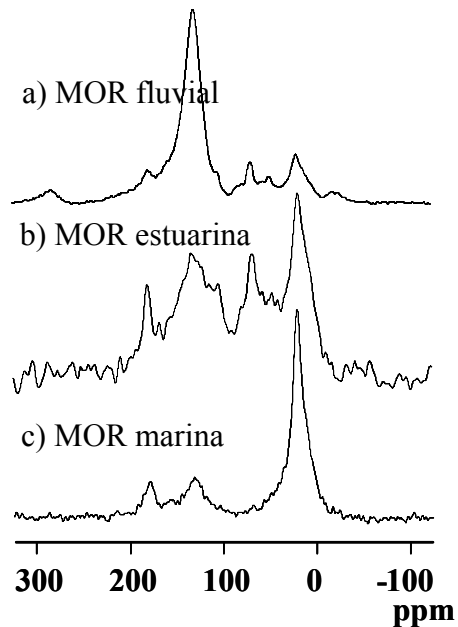
Por último, si comparamos los pirogramas obtenidos sobre la MOR procedente de los tres escenarios estudiados, observamos que aparecen pocas diferencias en el contenido en compuestos aromáticos, que son más abundantes en la MOR fluvial, existe además una mayor riqueza y variedad en las series de alcanos/alquenos y FAMES en la MOR marina, series muy características de biomacromoléculas alifáticas derivadas de cutina, suberina, algas y macromoléculas microbianas en suelos y sedimentos (Hatcher y Spiker, 1988; Tegelaar et al., 1989).

#### **4.4.4 Resonancia Magnética Nuclear (CP MAS) $^{13}\text{C}$ NMR en MOR**

La  $^{13}\text{C}$ -NMR también ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de formas de MOR en suelos y sedimentos en los últimos años (Quénéa et al., 2005; Nguyen et al., 2003; Zang et al., 2003; Zang y Hatcher, 2002; Knicker y Hatcher, 2001), siendo de especial relevancia los estudios destinados a la comprensión de los mecanismos y procesos envueltos en la estabilización de N y C (Knicker y Hatcher, 1997; Hedges y Keil, 1995; Nguyen y Harvey, 2001).



Los espectros de NMR  $^{13}\text{C}$  de MOR representativas aisladas de muestras fluviales, estuarinas y marinas del área de estudio están recogidos en la Figura 4.4.4. Hay que señalar que no se pudieron realizar los espectros de algunas muestras de MOR estudiadas, ya que su bajo contenido en C impidió obtenerlos con una resolución aceptable. Los espectros obtenidos para MOR estuarina y marina son similares a otros publicados recientemente (Zegouagh et al., 1999).



**Figura 4.4.4:** (CP MAS) NMR  $^{13}\text{C}$  de muestras de MOR

Las características más destacadas de los espectros de NMR  $^{13}\text{C}$  de MOR en comparación con los sedimentos brutos son (comparar Fig. 4.4.4 Vs Fig. 4.3.3f):

- 1) Reducción general de la señal C O-alquílica del espectro (45-110 ppm) correspondiente a los C de carbohidratos.
- 2) Notable disminución de la señal C-alquílica (0-45 ppm) del espectro en la MOR fluvial, señal correspondiente a hidrocarburos lineales saturados, ácidos grasos, ceras, resinas, cutinas suberinas,

sustituyentes alquílicos de compuestos aromáticos, grupos alquilo en aminoácidos, que pueden proceder de la degradación de microorganismos, algas y/o vegetales superiores. Esta señal se mantiene en la MOR estuarina y aumenta considerablemente en la ROM de la plataforma marina, resultado que podría indicar una elevada refractoriedad de la MO alifática en determinados sedimentos marinos.

- 3) Al contrario que lo ocurrido en la MOR marina, en la MOR fluvial se mantiene la señal correspondiente a C aromático (110-160 ppm) (Fig. 4.4.4a), indicando posiblemente un contenido importante de BC en este escenario.

Numerosos estudios espectroscópicos ya habían señalado que la MO sedimentaria contiene estructuras alifáticas asociadas a carbohidratos, proteínas y grupos funcionales carboxílicos (Hertkorn et al., 2006; Deshmukh et al., 2001; Zegouagh et al., 1999; Ergin et al., 1996; Peulve et al., 1996; Hatcher et al., 1980; 1983). Los resultados de estos estudios sugieren que la composición de la MO sedimentaria tiene una gran relación con la fuente de la misma, así tal y como ocurre en general con nuestras muestras, la MO mostrará alta alifaticidad en sistemas de elevada riqueza en algas, mientras que crecerá la aromaticidad en sistemas con un “*input*” substancial de MO terrestre, especialmente debido a la presencia de material derivado de la lignina. En nuestro caso además esta MOR de naturaleza alifática es mayoritaria en ciertas muestras (las más alejadas de la costa).

Previsiblemente se trata de biomacromoléculas alifáticas no hidrolizables producidas por microalgas (algænanos) o macromoléculas tipo melanoidina formadas a partir de la condensación de material protéico degradado, y posiblemente también haya contribuido un aporte reciente de material lipídico procedente de algas, en general este material posee baja

biodisponibilidad, elevada refractoriedad y contribuiría significativamente a la MO sedimentaria (Tegelaar et al., 1989; Gelin et al., 1996). Esta MOR probablemente se ha formado mediante el clásico mecanismo de degradación-recondensación descrito por Tissot y Welte (1984) y/o el mecanismo de preservación vía protección por adsorción a la fracción mineral (Keil et al., 1994a,b; Mayer, 1994; Hedges y Keil, 1995), también se ha demostrado recientemente que la protección mediante este mecanismo llamado de protección por adsorción puede favorecer la aparición de reacciones de condensación (Collins et al., 1995).

El hecho de que los resultados obtenidos mediante RMN  $^{13}\text{C}$  en las muestras de MOR estén en sintonía con los resultados de la Py, que ya indicaban carácter alquílico en la MOR marina frente a la aromaticidad de la MOR fluvial, confirman la validez de estas técnicas analíticas para el estudio de formas refractarias de MO, incluso en matrices naturales complejas como es el caso de los sedimentos, y nos lleva a pensar que la utilización conjunta de la Py-GC/MS y la NMR  $^{13}\text{C}$  es una herramienta válida para calcular el contenido en BC en los sedimentos de la costa de Huelva.

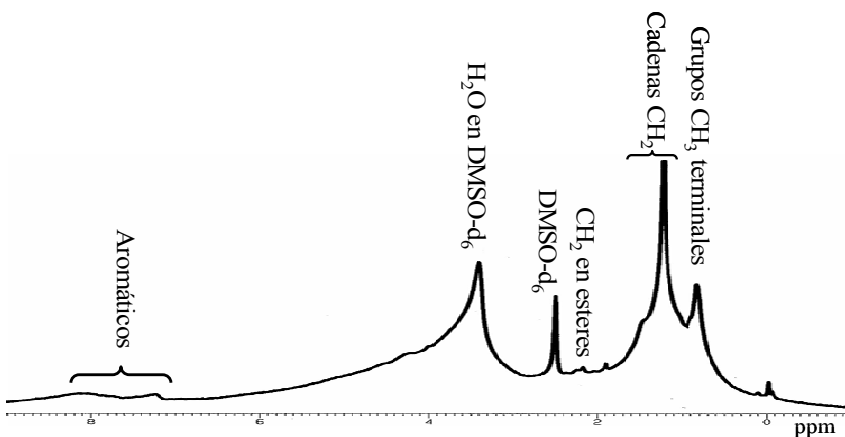
#### **4.4.5 Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución de $^1\text{H}$ con giro de ángulo mágico (HR-MAS $^1\text{H}$ NMR) TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)**

La caracterización de la MOR aislada también se ha realizado empleando medidas espectroscópicas de NMR de alta resolución en 1 y 2 dimensiones (D). Los detalles técnicos de la técnica se describen en el apartado 3.3.2.3. El objetivo perseguido era llegar a conocer un poco más sobre las estructuras y tipos de moléculas que habían resistido al proceso oxidativo, para ello utilizamos experimentos de alta resolución TOCSY (*Total Correlation*

*Spectroscopy*) en tres muestras de MOR aisladas en tres sedimentos marinos estudiados, que fueron las muestras R-25, E-226 y M-155 respectivamente.

Los experimentos TOCSY 2-D han sido recientemente utilizados en la caracterización de macromoléculas complejas en plantas (Deshmukh et al., 2005; 2003), polímeros (Gallop y Fitch, 1997), polipéptidos (Anderson et al., 1995) algas y algas (Zang et al., 2001; Simpson et al., 2002), ácidos húmicos y fúlvicos de turbas (Hertkorn et al., 2002) y materia orgánica disuelta (DOM) de agua de río (Kim et al., 2003; Hertkorn et al., 2006) pero no habían sido aplicados hasta ahora para el estudio directo de MOR en sedimentos marinos.

La Figura 4.4.5a muestra el espectro de NMR 1-D  $^1\text{H}$  HRMAS de la MOR procedente de la muestra R-25.



**Figura 4.4.5a: Espectro NMR 1-D  $^1\text{H}$  HRMAS de MOR**

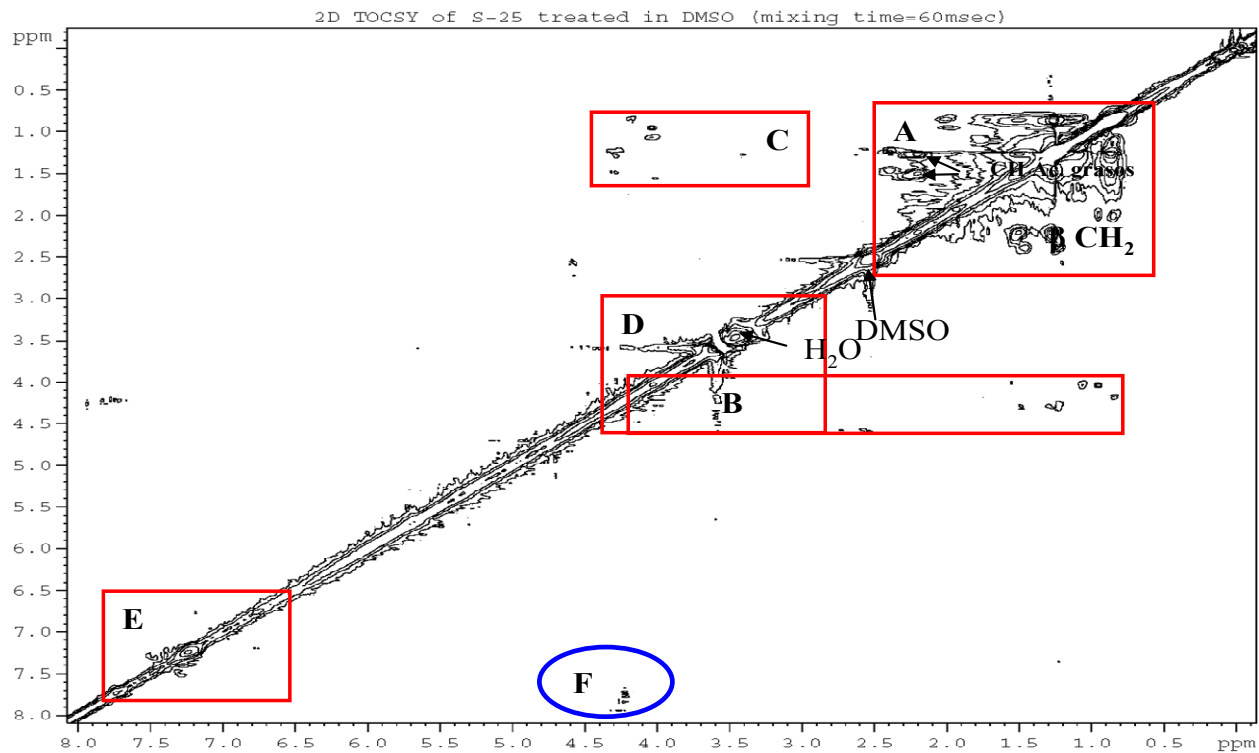


Figura 4.4.5b: 2-D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  HRMAS (TOCSY)

**Tabla 4.4.5b. Asignación de estructuras tipo para  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  HRMAS (TOCSY)**

REGIÓN	ASIGNACIÓN	ESTRUCTURA TIPO
A	-CHn-CHn-CHn-CHm	H de cadenas intra-alifáticas
B	-(C=O)NH-CH-CH-	H $\alpha$ -H $\beta$ en péptidos
C	-O-CH-CH-C	H en desoxiazúcares, éteres y ésteres
D	-CH(O)-CH(O)-	H intracarbohidratos sin C anoméricos
E	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -	H de anillos aromáticos
F	$\begin{array}{c} \text{Ar-N-CH}_2\text{-C=O-} \\   \\ \text{R-C=O} \end{array}$	H unido a enlaces peptídicos en un entorno aromático

Asignaciones A, B, C, D y E fueron realizadas según Hertkorn et al., 2002

Los espectros TOCSY de 1D se caracterizaron por su sencillez y en nuestro caso resultaron ser prácticamente idénticos en los tres casos estudiados. A pesar de no mostrar información demasiado específica, se observan con claridad picos agudos correspondientes a protones pertenecientes a grupos metilo terminales, CH<sub>2</sub> de cadena y de ésteres, con picos menos definidos alrededor de 7,4-8 ppm aparecen los protones pertenecientes a compuestos aromáticos, a pesar de la aplicación del filtro “*watergate*” aparece además un pico correspondiente al disolvente utilizado DMSO deuterado y otro debido al H<sub>2</sub>O.

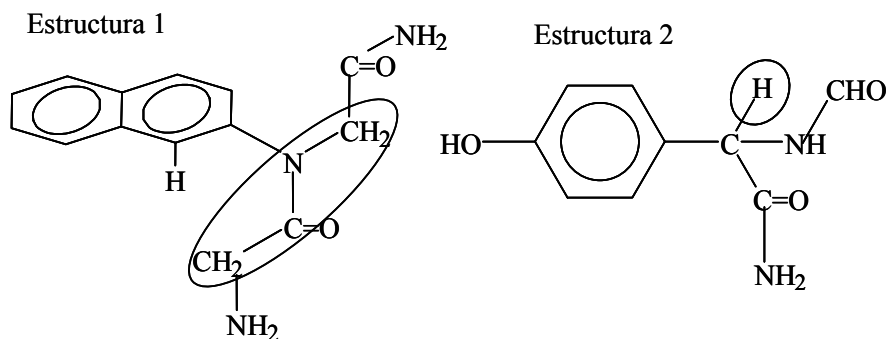
Los espectros TOCSY obtenidos en 2-D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  como el que se muestra en la Figura 4.4.5b, mostrado en la página anterior, aportaron mayor información acerca de la estructura de las moléculas que componen la MOR en sedimentos marinos, (ver Tabla 4.4.5b), las muestras no se diferenciaron en la naturaleza de los picos aparecidos, aunque si en la intensidad de los mismos, especialmente en el pico de cruce (*cross peak*) F, que apareció con mayor intensidad en la muestra R-25.

Los resultados de NMR 2-D muestran picos característicos de las unidades estructurales más abundantes en las muestras estudiadas. Destaca la variada y abundante presencia de  $^1\text{H}$  procedentes de grupos metilo terminales y de cadenas alifáticas (región A), la presencia de  $^1\text{H}$  de carbohidratos y péptidos (regiones D y B respectivamente) también es de destacar, aunque estas regiones se hayan solapadas con la presencia de protones de  $\text{H}_2\text{O}$ . Aparecen varios picos de menor intensidad correspondientes a  $^1\text{H}$  de desoxiazúcares, éteres y esterés, mientras que la presencia de  $^1\text{H}$  de origen aromático queda reflejada en la señal de cruce de la región E.

La presencia de estas familias de compuestos en la MOR de los sedimentos estudiados ya había sido confirmada tanto mediante Py-GC/MS como mediante NMR  $^{13}\text{C}$ , resalta de nuevo una importante contribución de las estructuras alifáticas a la MOR. Teniendo en cuenta que los picos observados mediante TOCSY 2-D representan en realidad a la media de todas las estructuras presentes en la muestra, podemos decir que estos resultados corroboran los obtenidos mediante las técnicas espectroscópicas mencionadas anteriormente.

La complejidad de análisis de los espectros 2-D NMR, unida a la ingente variedad de posibilidades por la combinación entre grupos funcionales o la localización de los sustituyentes, hacen muy difícil una interpretación detallada de los mismos y en la mayoría de los casos resulta imposible llegar a predecir una estructura para cada pico observado, no obstante, mediante la aplicación de un software específico para este fin (Chemdraw 3D ©), para determinados picos es viable al menos acercarnos a una posible estructura que corresponda con la resonancia encontrada para esos picos.

La señal más intensa correspondiente a la región F que aparece a 4.25-7.69 ppm se observa en la MOR de las tres muestras estudiadas, aunque es en la muestra R-25 donde aparece con mayor intensidad. Esta señal según la bibliografía consultada es la primera vez que se registra en estudios TOCSY sobre sedimentos marinos. Existen numerosas estructuras posibles que corresponderían con  $^1\text{H}$  que resuenan a esa frecuencia, en la Figura 4.4.5c se muestran dos de ellas.



**Figura 4.4.5c: Ejemplos de estructuras posibles correspondientes a la señal de la región F**

Para poder confirmar la estructura serían necesarios otros estudios, como por ejemplo estudios NMR 2D HETCOR  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  de los que no disponemos, pero lo que si podemos observar es que la gran mayoría de las estructuras posibles tienen en común la presencia de enlaces peptídicos, o en su defecto grupos NH y grupos carboxilo en un entorno aromático.

El Nitrógeno (N) en la MO sedimentaria proviene fundamentalmente de organismos vivos. Proteínas y péptidos, las estructuras más abundantes que contienen N en sedimentos, han sido consideradas tradicionalmente parte de la fracción lábil del medio, aunque recientes estudios han mostrado que el material proteico puede resistir la degradación microbiana en ambientes sedimentarios y como consecuencia una porción del mismo puede ser incorporado al material biológicamente refractario y eliminado del



“pool” de N activo (Knicker et al, 1996, Pantoja y Lee, 1999; Nguyen y Harvey, 2001; Knicker y Hatcher, 1997, 2001; Zang et al, 2001).

Se han propuestos diversos mecanismos para explicar esta preservación de N:

- 1). Asociaciones órgano-minerales (Keil et al., 1994).
- 2). Mecanismos de degradación-recondensación, que llevan a la formación de kerógenos resistentes mediante condensación al azar y polimerización de compuestos de bajo peso molecular que proceden de macromoléculas degradadas de forma natural (Tissot y Welte, 1984; Patience et al., 1992)
- 3). Encapsulación y protección de la hidrólisis bacteriana de proteínas dentro de la matriz macromolecular de la MO sedimentaria (Knicker y Hatcher, 1997; Nguyen y Harvey, 2001).
- 4). Protección de los compuestos proteicos durante la degradación del fitoplancton en sistemas marinos mediante enlaces covalentes con MO macromolecular (Kirchman et al., 1989)

La presencia de este tipo de estructuras podría confirmar la estabilización de N en formas de MOR en sedimentos marinos mediante formación de enlaces covalentes con estructuras aromáticas estables.

#### **4.5 CONTENIDO EN BLACK CARBON EN SEDIMENTOS MARINOS**

Una vez revisada la metodología existente para la cuantificación de BC, (Tablas 1.3 a,b) y teniendo en cuenta la idoneidad del uso combinado de las técnicas de Py-GC/MS y <sup>13</sup>C NMR para el estudio nuestras muestras, decidimos cuantificar el BC en los sedimentos mediante una adaptación del método diseñado por Simpson y Hatcher (2004) cuyo desarrollo se describió con detalle en el apartado 3.3.3 del presente estudio.

#### **4.5.1 Cuantificación de BC mediante oxidación con Clorito de Sodio, $^{13}\text{C}$ NMR y Py-GC/MS en presencia de sales de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH)**

El proceso completo de oxidación de los sedimentos constó de tres fases, un primer tratamiento ácido (HCl/HF) para la eliminación del material mineral (carbonatos y silicatos principalmente), MO lábil y liberar la MO ligada a la fracción mineral, tratamiento que de paso, permitió eliminar la presencia de material paramagnético mejorando de manera considerable la resolución de los espectros de NMR  $^{13}\text{C}$ . La oxidación siguiente con Clorito de Sodio y acético tenía como objetivos la eliminación de restos de MO lábil y principalmente la eliminación de compuestos derivados de la lignina, que habitualmente resuenan en NMR  $^{13}\text{C}$  en la región 110-160 ppm. Según este procedimiento el contenido en BC se mide como la fracción de  $C_{ar}$  (110-160 ppm) presente al final de todo el proceso, por ello es muy importante verificar que la eliminación de restos de lignina ha sido efectiva y no estamos sobre-estimando el contenido en BC, para ello por último se llevó a cabo la Py de los digeridos en presencia de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) técnica que ha sido aplicada en el pasado en la caracterización de sedimentos marinos (Pulchan et al., 1997) y reconocida como útil para monitorizar la presencia de lignina y de productos derivados de la degradación de lignina en suelos y sedimentos (Martín et al., 1995; Clifford et al., 1995; Del Río et al., 1998, Simpson y Hatcher, 2004).

La pirólisis realizada en presencia de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) evita la descarboxilación de los ácidos bencenocarboxílicos y facilita el análisis de la estructura molecular de geopolímeros orgánicos (Anderson y Winans, 1991; Challinor, 1989, 1991a,b; de Leeuw y Baas,

1993; Martín et al., 1994, 1995; Hatcher y Clifford, 1994). La Py en presencia de TMAH produce ésteres metílicos de los ácidos carboxílicos y de los grupos fenólicos. Por el contrario, los alcoholes alifáticos se metilan sólo parcialmente. De esta forma, este tipo de pirólisis puede considerarse como una quimiólisis asistida térmicamente (de Leeuw y Baas, 1993; Martín et al., 1994, 1995).

La Figura 4.5.1a muestra la pirólisis en presencia de TMAH (Py-TMAH-GC/MS) para la muestra R-25 antes y después de la oxidación química con Clorito de Sodio, los pirogramas obtenidos para el resto de los sedimentos fueron muy similares excepto por la ausencia casi total de compuestos de lignina en los pirolizados de las muestras marinas. La variación en cada muestra de la presencia de compuestos derivados de lignina está reflejada con detalle en la Tabla 4.5.1a, mientras que en la Tabla 4.5.1b se enumeran el resto de compuestos pirolizados.

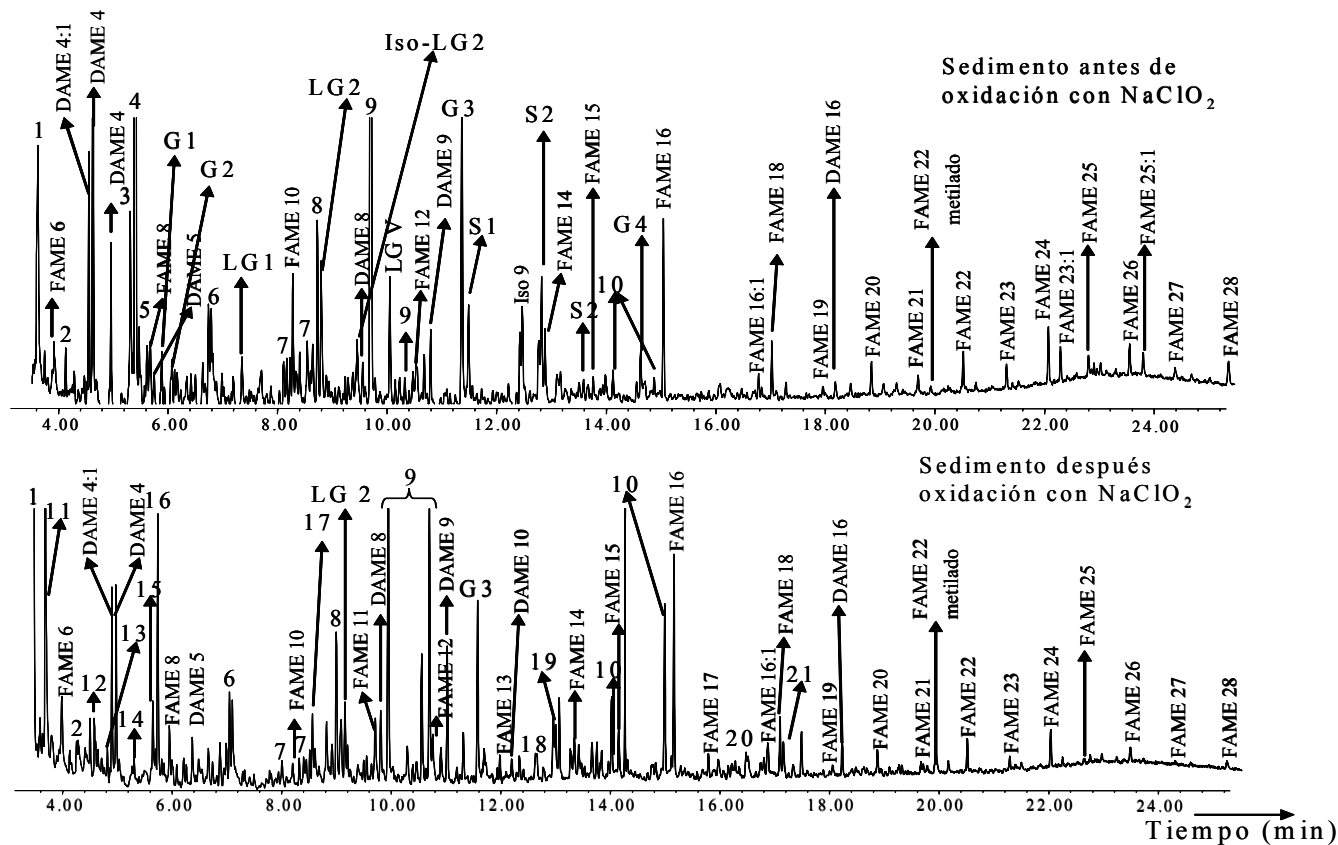


Figura 4.5.1a. Cromatograma de ión total de la Py-TMAH-GC/MS de la muestra R-25 antes y después de la oxidación con Clorito de Sodio

**Tabla 4.5.1a. Presencia de compuestos derivados de lignina antes y después de la pirólisis (Py-TMAH-GC/MS) en sedimentos antes y después de la oxidación con NaClO<sub>2</sub>**

Referencia	Compuesto derivado de lignina	R-25		R/E-28		R-35		R-39		R-40		E-202		E-209		R/E-211		E-213		E-218		E-226		M-131		M-155					
		a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d		
	<i>Compuestos derivados del Guayacilo</i>	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d	a	d
G1	<i>o</i> -dimetoxibenceno (Veratrol)	X		X		X	X	X		X		X		X		X		X		X		X		X							
G2	<i>p</i> -dimetoxibenceno	X				X		X						X		X		X													
G3	ácido 3,4-dimetoxibenzoico, dimetil ester	X				X		X		X		X		X						X											
G4	ácido 3,4-dimetoxicinámico, metil ester	X	X	X	X	X		X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X			
	<i>Compuestos derivados del Syringilo</i>																														
S1	3,4,5-trimetoxibenzaldehido, metil ester	X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X							
S2	ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, metil ester	X						X		X		X		X														X		X	
	<i>Compuestos derivados del Hidroxifenilo</i>																														
LG1	<i>p</i> -metoxibenzaldehido	X		X				X		X		X				X		X		X		X		X							
LG2	ácido 4-methoxibenzoico, metil ester	X	X					X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
LG-V	metilvanillina	X		X	X			X	X	X	X	X		X		X		X		X		X		X							
a: Compuesto liberado antes del tratamiento con NaClO <sub>2</sub>																															
d: Compuesto liberado después del tratamiento con NaClO <sub>2</sub>																															

**Tabla 4.5.1b: Lista de compuestos obtenidos mediante Py-GC/MS en presencia de TMAH excluyendo a los derivados de lignina y a los pertenecientes al grupo de ésteres metílicos de ácidos carboxílicos**

---

<b>Ref. Compuestos no lignínicos obtenidos mediante Py-GC/MS</b>	
1	dimetil sulfona
2	N,N-dimetil-t-butilamina
3	glicina-N-acetil, metil ester
4	ácido benzoico, metil ester
5	trimetilfumarato
6	ácido 3-metilbenzoico, metil ester
7	2-metilnaftaleno
8	1,3,5-triazina-2,4,6 (1H,3H,5H)-trimetil-triona
9	ácido 1,2-benzenodicarboxílico, dimetil ester
10	ácido 1,2,4-benzenetricarboxílico, trimetil ester
11	N,N-dimetil-propanamida
12	fenol
13	1,2,3-trimetilbenceno
14	m-cresol
15	N (2-metoxi-2-oxoetil)-glicina, metil ester
16	ácido 3-metilbenzoico, metil ester
17	ácido N-metilpiroglutamico, metil ester
18	ácido 2-naftalenocarboxílico, metil ester
19	2,4,6-trimetoxibenzonitrilo
20	ácido 2,6-naftalenodicarboxílico, dimetil ester
21	ácido 1,2,4,5-benzenotetracarboxílico, tetrametil ester

---

Los pirogramas de las muestras antes de la oxidación con clorito de sodio están dominados por dos series de ésteres metílicos de ácidos carboxílicos C<sub>6</sub>-C<sub>28</sub> (FAMES) y dicarboxílicos (DAMES) C<sub>4</sub>-C<sub>16</sub>, aparecen además varios compuestos aromáticos (picos 4, 6, 7 y 9) y compuestos derivados de la lignina con estructura tipo Guayacilo (G).

El cambio más importante que se observa en los pirogramas después del tratamiento oxidativo es la eliminación de la mayoría de los picos correspondientes a compuestos derivados de la lignina (Fig. 4.5.1a), no obstante en las muestras estuarinas y fluviales, especialmente del entorno de los ríos Tinto y Odiel, se mantiene la presencia de algunos compuestos derivados de lignina. Se detecta un aumento en el número de compuestos aromáticos (picos 13, 15, 18, 20 y 21 de la Tabla 4.5.1b), mientras que la presencia de FAMES y DAMEs permanece prácticamente inalterada.

Los pirogramas muestran que la abundancia de marcadores de lignina en los sedimentos disminuye de forma muy acusada según aumenta la distancia a la costa y la profundidad, acorde con la disminución de MO terrestre. La oxidación química consiguió eliminar la mayoría de los compuestos derivados de lignina, sin variaciones importantes en el contenido del resto de formas de C.

El hecho de que algunos de estos compuestos derivados de lignina permanezcan después del tratamiento oxidativo, fundamentalmente en las muestras fluviales, más ricas en lignina, nos lleva a tomar con precaución los valores de contenido en BC que se obtengan mediante este método, ya que como hemos mencionado está basado en la integración de la señal de la región de C aromático, quizás sería necesaria aplicación del  $\text{NaClO}_2$  en condiciones más drásticas o de forma más prolongada en estas muestras ricas en lignina, a el fin de conseguir una completa eliminación de la misma.

En la Figura 4.5.1b se comparan los espectros NMR  $^{13}\text{C}$  obtenidos antes y después de la oxidación con Clorito de Sodio, mostrando los efectos de este tratamiento en las muestras, estos resultados están reflejados en la Tabla 4.5.1c que muestra los valores de integración por regiones en el espectro NMR de  $^{13}\text{C}$ .

Los espectros de los sedimentos desmineralizados ya fueron comentados durante la caracterización global de los sedimentos marinos (Aptdo. 4.3.3), en general están dominados por una señal de C alquílico (0-45 ppm), la señal correspondiente a C aromático (110-160 ppm) también es de importancia (valor de integración >19 %) especialmente en las muestras fluviales, junto a la señal correspondiente a C carboxílico y C de amidas (185-160 ppm) con una abundancia relativa aproximada del 10 al 12 %.

En comparación con los sedimentos desmineralizados, el tratamiento posterior con Clorito de Sodio produjo un aumento en la abundancia relativa de O-alquil-C (110-60 ppm) en todas las muestras y en la región de C alquílico (0-45 ppm), mientras que se redujo la abundancia relativa de la señal correspondiente a C carboxílico-amidas (185-160) en las muestras de estuario y fluviales. También se redujo la abundancia correspondiente a las regiones de C=O (245-185 ppm) y N-alquil/metoxil C (60-45 ppm).

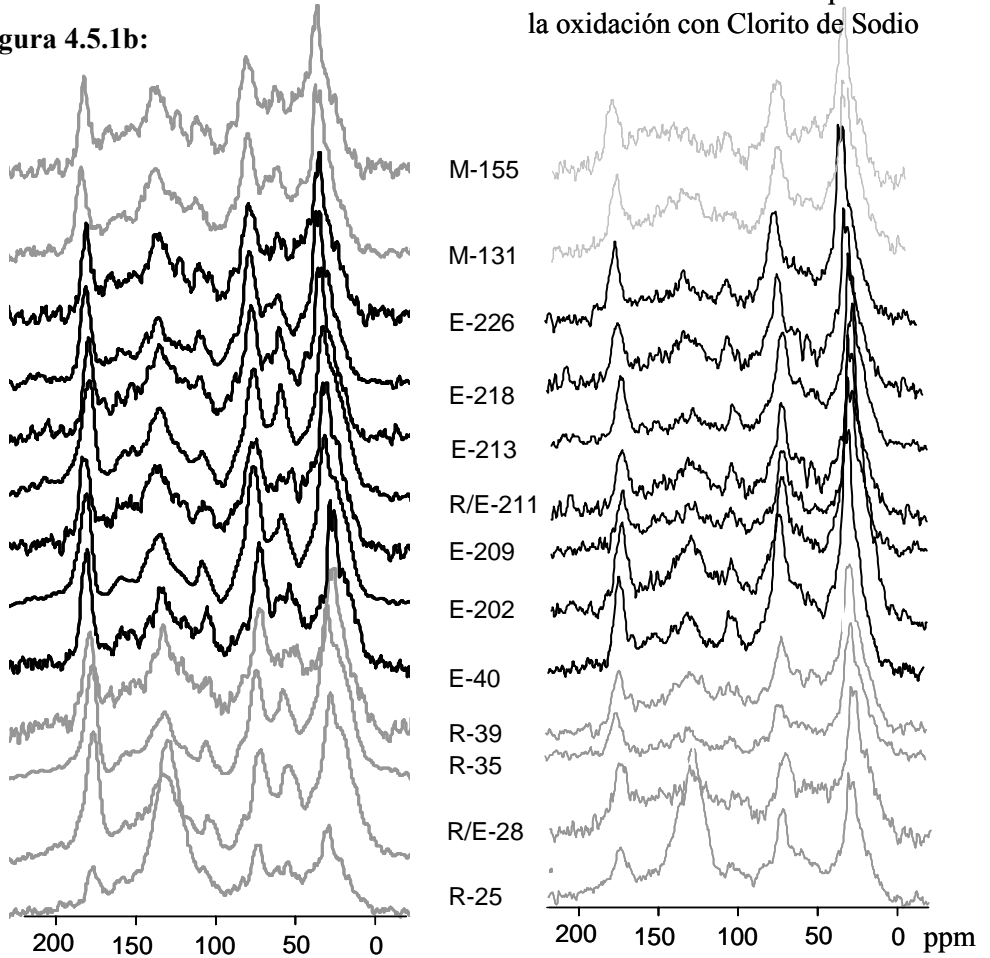
Se observó que la muestra R/E-28 apenas sufrió modificación por el tratamiento químico con Clorito de Sodio, una razón posible a este comportamiento puede encontrarse en que debido a su especial localización (Figura 3.1.2b) pueda estar sometida a continua erosión y a condiciones de oxidación durante períodos prolongados, que hubieran contribuido a una oxidación natural de la muestra que la harían más resistente a procesos oxidativos posteriores.

Se observó una disminución en el contenido de C aromático en todas las muestras (excepto R/E-28), lo que podría ser indicativo de la eliminación efectiva de lignina, todavía se encuentra una importante presencia de C aromático, (>14 % en todas las muestras), lo que podría indicar una acumulación de C pirogénico.



NMR  $^{13}\text{C}$  Sedimentos desmineralizados

Figura 4.5.1b:



Comparación de los espectros NMR  $^{13}\text{C}$  obtenidos antes y después de la oxidación con  $\text{NaClO}_2$

**Tabla 4.5.1c: Comparación de la integración por regiones del espectro NMR de <sup>13</sup>C después de los procesos de desmineralización y oxidación con Clorito de Sodio**

Muestra	C aldehídos y cetonas	C carboxílico y amidas	C aromático	O-alquil C	N-alquil y metoxil C	Alquil-C	Material resistente	Tratamiento
	245-185 ppm	185-160 ppm	160-110 ppm	110-60 ppm	60-45 ppm	45-0 ppm	%	
R-25	2,93	10,35	48,69	14,5	5,65	17,87	16,89	1
	2,15	9,32	37,82	23,63	5,24	21,81	12,95	1 + 2
	-0,78	-1,03	-10,87	9,13	-0,41	3,94	-3,94	Diferencia
R/E-28	3,97	12,95	24,1	19,24	9,48	30,26	26,87	1
	2,02	13,37	24,39	24,46	7,18	28,55	24,65	1 + 2
	-1,95	0,42	0,29	5,22	-2,3	-1,71	-2,22	Diferencia
R-35	3,15	12,69	20,72	19,08	9,67	34,7	20,52	1
	3,18	10,31	15,45	23,14	7,36	40,56	11,31	1 + 2
	0,03	-2,38	-5,28	4,06	-2,31	5,86	-9,21	Diferencia
R-39	3,34	12,33	25,63	18,77	9,33	30,59	14,49	1
	1,29	8,89	22,38	27,67	8,11	31,71	11,56	1 + 2
	-2,05	-3,44	-3,25	8,91	-1,22	1,12	-2,93	Diferencia
R-40	3,92	12,1	23,36	18,94	9,31	32,37	14,6	1
	3,03	9,28	18,98	25	7,45	36,24	11	1 + 2
	-0,89	-2,82	-4,38	6,06	-1,86	3,87	-3,6	Diferencia
E-202	3,78	11,94	20,9	23,07	9,41	30,89	13,6	1
	1,04	9,48	16,91	31,56	8,21	32,8	12,05	1 + 2
	-2,74	-2,46	-3,99	8,49	-1,2	1,91	-1,55	Diferencia
E-209	5,39	11,6	24,57	22,77	9,11	26,55	16,64	1
	0,79	9,14	20,93	30,02	7,32	31,81	14,85	1 + 2
	-4,6	-2,46	-3,64	7,25	-1,79	5,26	-1,79	Diferencia
R/E-211	4,88	12,61	24,25	21,2	9,4	27,65	25,65	1
	0,81	10,89	22,29	28,12	7,01	30,86	23,52	1 + 2
	-4,07	-1,72	-1,97	6,92	-2,39	3,21	-2,13	Diferencia
E-213	2,39	10,09	25,73	23,25	10,53	28,02	27,64	1
	2,79	10,28	21,17	29,81	6,21	29,72	25,5	1 + 2
	0,4	0,19	-4,56	6,56	-4,32	1,7	-2,14	Diferencia
E-218	3,36	11,56	19,09	26,6	10,45	28,93	18,83	1
	2,01	9,85	14,09	31,46	8,46	34,14	16,5	1 + 2
	-1,35	-1,71	-5	4,86	-2	5,21	-2,33	Diferencia
E-226	3,75	11,46	21,7	25,81	9,77	27,52	18,63	1
	0,87	10,07	16,69	28,6	7,7	36,05	16,63	1 + 2
	-2,88	-1,39	-5,01	2,79	-2,08	8,54	-2	Diferencia
M-131	3,3	11,62	22,22	22,53	9,53	30,78	30,33	1
	0,45	10,26	23,26	26,72	7,14	32,18	28,46	1 + 2
	-2,85	-1,36	1,04	4,19	-2,39	1,4	-1,87	Diferencia
M-155	4,73	12,56	22,62	21,76	9,03	29,29	29,14	1
	2,47	11,55	22,68	27,02	7,82	28,45	27,02	1 + 2
	-2,26	-1,01	0,06	5,26	-1,21	-0,84	-2,12	Diferencia

Valores dados en %; 1) Pretratamiento con HCl/ HF; 2) Oxidación con NaClO<sub>2</sub>;

Entre un 70 y un 86 % del material fue eliminado con el tratamiento HCl/HF, las mayores pérdidas tuvieron lugar (85 %) en las muestras de estuario (E-202 y E-209) y algunas fluviales (R-39 y R-40). Las muestras situadas en el estuario del Gadiana (R/E-211 y E-213) mostraron mayor resistencia que el resto de las muestras estuarinas. El porcentaje de material resistente a la oxidación con Clorito de Sodio varió ampliamente entre un 55

y un 93 % (w/w). Las mayores pérdidas de peso durante este procedimiento oxidativo tuvieron lugar en las muestras fluviales (R-35, R-40, R-25 y R-39) en contraste con lo ocurrido en las muestras marinas (M-131 y M-155). Se observa una relación directa entre las pérdidas de material durante el tratamiento oxidativo con Clorito de Sodio, la presencia de compuestos derivados de lignina en el material original y la disminución de la señal de C aromático mediante NMR  $^{13}\text{C}$ , confirmando que este tratamiento sería especialmente adecuado para la eliminación de compuestos derivados de lignina.

La aplicación de este procedimiento nos permitió cuantificar el BC almacenado en cada sedimento estudiada, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.5.1d.

**Tabla 4.5.1d: Resultados obtenidos para la cuantificación de BC en sedimentos marinos de la costa de Huelva**

Sedimento Bruto				Contenido en BC				
Muestra	Análisis Elemental			Señal C aromático <sup>1</sup> RMN $^{13}\text{C}$ (%)	TC <sub>final</sub> (%)	Material resistente final (%)	gBC/Kg	BC/TOC <sub>i</sub> (%)
	TC	TN	TOC <sub>i</sub>					
<b>R-25</b>	1,84	0,13	1,77	37,82	16,52	12,95	8,09	45,7
<b>R/E-28</b>	2,97	0,13	1,80	24,39	1,30	24,65	0,78	4,3
<b>R-35</b>	1,53	0,14	1,10	15,45	5,17	11,31	0,90	8,2
<b>R-39</b>	1,28	0,08	1,04	22,38	3,14	11,56	0,81	7,8
<b>R-40</b>	1,26	0,10	1,10	18,98	4,15	11,00	0,87	7,9
<b>E-202</b>	1,52	0,14	1,17	16,91	0,97	12,05	0,47	4,1
<b>E-209</b>	1,69	0,09	0,77	20,93	1,09	14,85	0,47	6,1
<b>R/E-211</b>	2,21	0,10	1,07	22,29	2,32	23,52	1,76	16,5
<b>E-213</b>	3,06	0,13	1,22	21,17	1,50	25,50	1,87	15,3
<b>E-218</b>	2,09	0,20	1,76	14,09	3,36	16,50	0,52	3,0
<b>E-226</b>	1,74	0,13	1,16	16,69	3,47	16,63	0,59	5,0
<b>M-131</b>	3,11	0,16	1,17	23,26	2,26	28,46	0,64	5,5
<b>M-155</b>	3,11	0,15	1,09	22,68	2,11	27,02	0,67	6,1

<sup>1</sup> Valor correspondiente con la integración de la señal de 110-160 ppm en NMR  $^{13}\text{C}$ ; i Valor medido en el sedimento bruto

La Tabla 4.5.1d nos muestra los porcentajes de material resistente a los tratamientos con HCl/HF y NaClO<sub>2</sub>, así como los contenidos en BC calculados en función del porcentaje de carbono aromático resistente a los procesos de oxidación (Simpson y Hatcher, 2004). Los valores de BC estuvieron comprendidos entre 0.47 gBC/Kg<sub>seco</sub> obtenido en las muestras E-202 y R/E-209 y 8.09 gBC/Kg<sub>seco</sub> medido en la muestra R-25, localizada en el río Odiel. Esta muestra se localiza en un área protegida de las corrientes marinas y cercana a una importante fuente de MO antrópica como es el puerto de Huelva (Fig. 3.1.2b). Este punto se ve afectado por el tráfico continuo de barcos del puerto de Huelva, que se sitúa como uno de los puertos españoles de mayor actividad, competitividad y crecimiento (Cámara de comercio de Huelva). La otra fuente de BC que debemos considerar es el transporte río abajo de la MO pirogénica procedente de los numerosos incendios forestales que asolan frecuentemente los bosques de las Sierras de Huelva y Sevilla (Knicker et al., 2005; González et al., 2004), que serían de esta manera transportados hasta el Golfo de Cádiz.

El resto de valores de obtenidos de BC están dentro de los considerados como habituales para BC en sedimentos marinos (Gustafsson y Gschwend, 1997; Middelburg et al., 1999) encontrándose entre el 3.0 % (BC/TOC) medido en la muestra E-218 localizada en el límite del estuario del río Guadiana y el 16.5 % de la muestra R/E-211 localizada en la desembocadura del mismo río.

En esta región tienen lugar fuertes corrientes marinas, cuyo efecto en la acumulación de MO terrestre preferentemente en unas zonas respecto a otras es importante (Morales, 1995), estas corrientes afectan particularmente al estuario del río Piedras, lo que podría ser la causa de una menor acumulación de sedimentos y valores menores en el contenido en BC. En

este río, de características típicamente mediterráneas, con un régimen de lluvias claramente estacionario la MO puede estar sometida a condiciones prolongadas de degradación aeróbica tanto durante el transporte como en su deposición en el horizonte superficial, por lo que el C orgánico en estas muestras podría estar ya altamente alterado (Hedges et al., 1999; Keil et al., 2004).

En la Tabla 4.5.1e se presenta el contenido en BC por grupos de muestras y una estimación del contenido medio en BC. Estos valores de contenido medio en BC calculados deben tomarse a título meramente informativo ya que aunque en general el contenido en BC disminuye al alejarnos de la costa, como hemos mencionado anteriormente, los valores varían sensiblemente de un punto a otro y no sería correcto matemáticamente realizar una media aritmética simple, como hemos comentado anteriormente somos conscientes de que existen multitud de factores y procesos que hacen que el estudio de la acumulación de BC en la zona sea muy complejo, sería necesario un estudio mucho más amplio para poder obtener un valor fiable, por ello este sencillo cálculo solo será utilizado para hacer una estimación grosera del contenido en BC en la costa de Huelva.

**Tabla 4.5.1e: Contenido en BC por muestra, grupo de muestras y contenido medio**

Muestra	gBC/Kg	BC/TOC (%)	gBC/Kg	BC/TOC (%)
<b>R-25</b>	8,09	45,7	MR= 2,29	MR=10,4
<b>R/E-28</b>	0,78	4,3		
<b>R-35</b>	0,90	8,2		
<b>R-39</b>	0,81	7,8		
<b>R-40</b>	0,87	7,9		
<b>E-202</b>	0,47	4,1	ME= 0,95	ME= 8,3
<b>E-209</b>	0,47	6,1		
<b>R/E-211</b>	1,76	16,5		
<b>E-213</b>	1,87	15,3		
<b>E-218</b>	0,52	3,0		
<b>E-226</b>	0,59	5,0	MM= 0,66	MM= 5,8
<b>M-131</b>	0,64	5,5		
<b>M-155</b>	0,67	6,1	MP= 1,3	MP= 9,6

MR= Media muestras R; ME= Media muestras E; MM= Media muestras M; MP= Media ponderada tomando 1/3 como contribución de cada grupo de muestras

Teniendo en cuenta estos valores, que la densidad promedio de los sedimentos se encuentra en el rango de 1,8 a 2,1 g/cm<sup>3</sup> y considerando únicamente la capa correspondiente a los sedimentos recientes (capa superficial 0-20 cm), podemos estimar que la cantidad de BC almacenado en el área estudiada sería aproximadamente de 5,5 T BC/km<sup>2</sup>. La zona de estudio representa unos 90.000 km<sup>2</sup> de superficie con lo cual habría acumulados en torno a 4,9 x 10<sup>5</sup> tm de BC. Este valor equivaldría en promedio a todo el combustible fósil consumido en España por un millón de habitantes durante el año 2005, al gasto energético del área metropolitana de ciudades españolas del tamaño de Sevilla, Valencia o Zaragoza, o a la gasolina promedio consumida durante ese año por tres millones de Españoles (www.ine.es; Boletín Trimestral de Coyuntura Energética.

Ministerio de Industria, Turismo y Comercio). Este valor es aproximadamente un 20 % superior a las  $4,2 \times 10^5$  tm de CO<sub>2</sub> que la UE exige a España que reduzca sus emisiones anuales en el período 2008-2012 (Plan Español de asignación de Emisiones, 2007).

Y si estos datos, pueden por si mismos ser ya suficientemente significativos, debemos tener en cuenta además que se ha detectado mediante Py y NMR, la presencia abundante de MOR de naturaleza alifática en todos los sedimentos, especialmente en los más alejados de la costa.

Teniendo en cuenta que estas formas de MOR quedan excluidas de la cuantificación de BC anterior, ya que la metodología seguida (Simpson y Hatcher, 2004) por definición solo considera BC la MOR de naturaleza aromática, debe ser tenido en cuenta porque es previsible que este material alifático pueda estar desempeñando un importante papel en los procesos de acumulación de formas de C estable en sedimentos marinos.





**CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones del estudio realizado sobre el **Aislamiento y caracterización de Formas de Materia Orgánica Refractaria en Sedimentos Marinos y sus implicaciones ambientales** se resumen en los siguientes puntos:

1. La revisión de los numerosos métodos propuestos para el aislamiento y cuantificación del *Black Carbon* (BC) confirma que no existe un único método que incluya el espectro completo (*continuum*) de formas de BC presentes en la naturaleza. Cada método tiene sus limitaciones, y solo son capaces de analizar una fracción del continuo de BC. No obstante, sí existen metodologías preferibles para el estudio específico de determinados tipos de muestras. Para el caso concreto de análisis de BC en matrices ambientales complejas, como son los sedimentos marinos, es imprescindible la aplicación de algún pre-tratamiento oxidativo que minimice la aparición de artefactos, así como el uso de una técnica de detección que también caracterice el residuo final, para evitar sobreestimaciones del contenido en BC. Teniendo en cuenta esto, se ha comprobado que el método de oxidación con Clorito de Sodio, seguido del uso de la Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -NMR) propuesto por Simpson y Hatcher (2004), es adecuado para la cuantificación de BC en los sedimentos marinos estudiados.

2. Dada la complejidad estructural de la materia orgánica refractaria (MOR), y más aún si cabe del estudio de BC, es necesario abordar su estudio mediante el uso combinado de técnicas espectroscópicas y degradativas. En este trabajo se ha comprobado que la pirólisis (Py-GC/MS) y la  $^{13}\text{C}$ -NMR son herramientas válidas y complementarias para la caracterización molecular de muestras de referencia ricas en BC. Ambas técnicas son capaces incluso de discriminar materiales que suelen interferir en la detección de BC por otras técnicas, y por primera vez han sido aplicadas conjuntamente para la caracterización y cuantificación de BC en sedimentos marinos Atlánticos.
  
3. Los estudios termogravimétricos y calorimétricos son adecuados para el estudio de materiales orgánicos complejos, permitiendo distinguir con facilidad la materia orgánica lábil de la estable. Ambas técnicas utilizadas conjuntamente, permiten la cuantificación de BC en muestras de referencia de naturaleza muy diversa de forma rápida y reproducible. En el caso de los suelos y sedimentos de referencia los resultados obtenidos sobreestimaron el contenido esperado en BC, por lo que se recomienda el uso de tratamientos de desmineralización y extracción de la MO lábil previos a la cuantificación de BC en estas matrices ambientales complejas.

4. El contenido en BC en los sedimentos estudiados del área de los estuarios y de la costa de Huelva varía dentro de un amplio rango de 0,47 a 8,09 gBC/Kg de sedimento, lo que significa que entre el 3 y el 45 % del carbono orgánico total (TOC) de esos sedimentos está en forma de BC. Según estos datos el área estudiada acumula aproximadamente más de medio millón de toneladas de BC, lo que equivale a todo el combustible fósil consumido anualmente en España por un millón de habitantes. Estos valores indican que los sedimentos marinos son un sumidero importante de C, que queda secuestrado de forma estable. Este hecho tiene una especial relevancia en el balance de C, dentro del ciclo biogeoquímico del C y por tanto puede tener importantes implicaciones en el fenómeno del cambio global.
  
5. Se ha confirmado mediante pirólisis analítica y espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -NMR, que existe una importante contribución alifática a la MOR en la mayoría de los sedimentos estudiados, especialmente los más alejados de la costa. Se sugiere que se trata de biomacromoléculas alifáticas no hidrolizables, este material altamente refractario desempeñaría un importante papel en los procesos implicados en la acumulación de formas de C estable en sedimentos marinos. Como estas formas carbonosas quedan excluidas de la cuantificación de BC por la metodología seguida, (Simpson y Hatcher, 2004), los valores reales de C estable serían superiores a los señalados en el punto anterior.

6. Mediante la aplicación de NMR de alta resolución en 2 dimensiones (experimentos TOCSY), se ha detectado por primera vez en la materia orgánica refractaria aislada de sedimentos, la posible presencia de estructuras formadas por grupos carboxilo y enlaces peptídicos, o en su defecto grupos NH, unidos a anillos aromáticos. La presencia de este tipo de estructuras podría confirmar la estabilización de N en formas de materia orgánica refractaria en sedimentos marinos mediante la formación de enlaces covalentes con estructuras aromáticas estables.

**CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA**





## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Akhter, M.S., Chughtai, A.R. and Smith, D.M., 1985. The structure of hexane soot I: Spectroscopic studies. *Appl. Spectrosc.* 39(1): 143-153
2. Allard, B., Templier J., Largeau, C., 1997. Artifactual origin of mycobacterial bacteran. Formation of melanoidin-like artifact macromolecular material during the usual isolation process. *Org. Geochem.* 26: 691-703
3. Almendros, G., Dorado, J., Gonzalez-Vila, F.J., Martin, F., 1997. Pyrolysis of carbohydrate-derived macromolecules: its potential in monitoring the carbohydrate signature of geopolymers, *J. Anal. and Appl. Pyrol.* 40-41: 599-610
4. Altabet, M.A., Francois, R., 1994. Sedimentary nitrogen isotopic ratio as a recorder for surface ocean nitrate utilization. *Glob. Biogeochem. Cycles* 8: 103-116
5. Anderson, K., Winans, R., 1991. Nature and fate of natural resins in the Geosphere. I. Evaluation of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry for the analysis of natural resins and resinites. *Anal. Chem.* 63: 2901-2908
6. Anderson, R.C., Stokes, J.P., Shapiro, M.J., 1995. Structure determination in combinatorial chemistry: Utilization of Magic Angle Spinning HMQC and TOCSY NMR spectra in the structure determination of Wang-bound lysine. *Tetrahedron Letters* 36: 5311-5314
7. Armstrong; B., Hutchinson, E., Unwin, J., Fletcher, T., 2004. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review and meta-analysis: *Environ. Health Perspect.* 112: 970-978
8. Arshad, M.A., Ripmeester J.A., Schnitzer, M., 1998. Attempts to improve solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of whole mineral soils. *Can. J. Soil Sci.* 68: 593-602
9. Augris, N., Balesdent, J., Mariotti, A., Derenne, S., Largeau, C., 1998. Structure and origin of insoluble and non-hydrolyzable, aliphatic organic matter in a forest soil. *Org. Geochem.* 28: 119-124
10. Baldock, J.A., Oades, J.M., Nelson, P.N, Skene, T.M., Golchin, A., Clarke, P., 1997. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using soil-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Aust. J. Soil Res.* 35: 1061-1083
11. Baldock, J.A., Skjemstad, J.O., 2000. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Org. Geochem.* 31: 697-710

12. Balesdent, J., Mariotti, A., 1996. Measurement of soil organic matter turnover using  $^{13}\text{C}$  natural abundance. In: Boutton, T.W., Yamasaki, S.I. (Eds.), *Mass spectrometry of soils*, Marcel Dekker Inc., New York USA, pp.83-111
13. Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research*, 53: 215-230
14. Battista, B.M., Lowrie, A., Makarov, V., Moffett, S.J., Somoza, L., 2000. Lateral tectonics in the Gulf of Mexico, Gulf of Cadiz, and the Middle America Trench: Impacts on hydrocarbon accumulations. *Proceedings of the AAPG Annual Meeting*, New Orleans, USA.
15. Beaumont, V., Robert, F., 1999. Nitrogen isotope ratios of kerogens in Precambrian cherts: a record of the evolution of atmosphere chemistry, *Precambrian Res.* 96: 63-82
16. Bennett, B.; Fustic, M.; Farrimond, P.; Huang, H.; Larter, S.R., 2006. 25-Norhopanes: Formation during biodegradation of petroleum in the subsurface. *Org. Geochem.* 37: 787-797
17. Berasategui, X., Banks, C.J., Puig, C., Taberner, C.; Waltham, D., Fernández, M., 1998. Lateral diapiric emplacement of Triassic evaporates at the southern margin of the Guadalquivir Basin, Spain. In: Mascle, A., Puigdefabregas, C., Luterbacher, H.P. and Fernández, M., eds., *Cenozoic Foreland Basins of Western Europe*. Geological Society Special Publications, 134: 49-68
18. Bigg, G.R., 1996. *The Oceans and Climate*. Cambridge University Press. pp. 266
19. Bird, M., Cali, E., 1998. A million-year record of fire in sub-saharan Africa. *Nature* 394: 767-769
20. Bird, M., Gröcke, D.R., 1997. Determination of the abundance and carbon isotope composition of elemental carbon in sediments, *Geochim. Cosmochim. Acta* 61(16): 3413-3423
21. Boehman, A.L., Song, J., Alam, M., 2005. Impact of biodiesel blending on diesel soot and the regeneration of particulate filters. *Energy and Fuels* 19: 1857-1864
22. Bonnin, J., Olivet, J.L., Auzende, J.M., 1975. Structure en nappe a l'ouest de Gibraltar. *C.R. Academy of Science* 280: 559-562
23. Boon, J.J, de Leeuw, J.W, Rubinsztain, Y, Aizenshtat, Z., Ioselis P., Ikan, R., 1984. Thermal evaluation of some model melanoidins by Curie point pyrolysis-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Org. Geochem.* 6: 805-81

24. Borrego, J., Morales, J.A., Pendón, J.G., 1993. Holocene filling of an estuarine lagoon along the mesotidal coast of Huelva: The Piedras River mouth, Southwestern Spain. *J. Coastal Res.* 9: 242-254
25. Borrego, J., Ruiz, J., Gonzalez-Regalado, F.M., Pendón, L.J.G., Morales, J.A., 1999. The Holocene transgression into the estuarine central basin of the Odiel River mouth (Cadiz Gulf, SW, Spain): lithology and faunal assemblages. *Quaternary Sci. Rev.* 18: 769-788
26. Brodowski, S., Rodionov, A., Haumaier, L., Glaser, B., Amelung, W., 2005. Revised black carbon assessment using benzene polycarboxylic acids. *Org. Geochem.* 36: 1299-1310
27. Cachier, H., Bremond, M.P., Buat-Menard, P., 1989. Carbonaceous aerosols from different tropical biomass burning sources. *Nature* 340: 371-373
28. Calderoni, G., Schnitzer, M., 1984. Effects of age on the chemical structure of paleosol humic acids and fulvic acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48: 2045-2051
29. Cao, M., Woodward, F.I. 1998. Dynamic responses of terrestrial ecosystem carbon cycling to global climate change. *Nature* 393: 249-252
30. Challinor, I.M., 1989. A pyrolysis-derivatisation-gas chromatography-mass spectrometry technique for the structural elucidation of some synthetic polymers. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 16: 323-333
31. Challinor, I.M., 1991a. Structure determination of alkyl resins by simultaneous pyrolysis methylation. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 18: 233-244
32. Challinor, I.M., 1991b. The scope of pyrolysis methylation reactions. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 20: 15-24
33. Chambers, J.Q., Higuchi, N., Tribuzy, E.S., Trumbore, S.E., 2001. Carbon sink for a century. *Nature* 410: 429
34. Chen, Y., Sheng, G., Bi, X., Feng, Y., Mai, B., Fu, B., 2005. Emission factors for carbonaceous particles and polycyclic aromatic hydrocarbons from residential coal combustion in China. *Environ. Sci. Technol.* 39: 1861-1867
35. Chilik, P., Johnson, B., Damiano, P.A., 1995. Biomass burning and black carbon in the GISP2 ice core, *Geophys. Res. Lett.* 22: 89-92
36. Chilik, P., Stivastava, V., Cabenzli, L., Pimnick, R.G., Ded, R.L., Novakov, T., Cook, T.L., Hinds, B.D., 1987. Aerosol and graphitic carbon content of snow. *J. Geophys. Res.* 92: 9801-9809
37. Chow, J.C., Watson, J.G., 2001. Zones of representation for PM<sub>10</sub> measurements along the US/Mexico border. *The Science of The Total Environment* 276: 49-68

38. Chow, J.C., Watson, J.G., Pritchett, L.C., Pierson, W.R., Frazier C.A., Purcell, R.G., 1993. The dri thermal/optical reflectance carbon analysis system: description, evaluation and applications in U.S. Air quality studies. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics* 27: 1185-1201
39. Clark, J.S. 1988. Stratigraphic charcoal analysis on petrographic thin sections: application to fire history in northwestern Minnesota. *Quaternary Res.* 30: 81-91
40. Clark, J.S., Hussey, T.C., 1996. Estimating the mass flux of charcoal from sedimentary records: Effects of particle size, morphology and orientation. *Holocene* 6: 129-144
41. Clayton, C., 1991. Carbon isotope fractionation during natural gas generation from kerogen, *Marine and Petroleum Geology* 8: 232-240
42. Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, J.M. and Hatcher, P.G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: Thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 23:169-175
43. Coban-Yıldız, Y., Fabbri, D., Tartari, D., Tuğrul S., Gaines, A.F., 2000b Application of pyrolysis-GC/MS for the characterisation of suspended particulate organic matter in the Mediterranean Sea: a comparison with the Black Sea, *Org. Geochem.* 31: 1627-1639
44. Coban-Yıldız, Y., Tuğrul, S., Ediger, D., Yılmaz A., Polat, S.C., 2000a. A comparative study on the abundance and elemental composition of SPOM in three interconnected basins: the Black, the Marmara and the Mediterranean Seas, *Medit. Mar. Sci.* 1: 51-63
45. Collins, M.J., Bishop, A.N. and Farrimond, P., 1995. Sorption by mineral surfaces: rebirth of the classical condensation pathway for kerogen formation?. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 59: 2387-2393
46. Colombo, J.C., Silverberg N., Gearing, J.N., 1997. Lipid biogeochemistry in the Laurentian Trough—II. Changes in composition of fatty acids, sterols and aliphatic hydrocarbons during early diagenesis. *Org. Geochem.* 26: 257-274
47. Cook, R.L., Langford, C.H., Yamdagni, R., Preston, C.M., 1996. A modified cross-polarisation magic angle spinning <sup>13</sup>C NMR procedure for the study of humic materials. *Anal. Chem.*, 68: 3979-3986
48. Cope, M.J., Chaloner, W.G., 1980. Fossil charcoal as evidence of past atmospheric composition. *Nature* 283: 647-649
49. Coplen, T.B., 1996. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon, and oxygen isotope-ratio data. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60: 3359-3360

50. Cowie, G.L., Hedges, J.I., Prahel F.G., de Grange G.J., 1995. Elemental and major biochemical changes across an oxidation front in a relict turbidite: an oxygen effect. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 59: 33-46
51. Cox, P.M., Betts, R.A., Jones, C.D., Spall, S.A., Totterdell, I.J., 2000. Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature* 408: 184-186
52. Cranwell, P.A., 1973. Chain-length distribution of n-alkanes from lake sediments in relation to post-glacial environmental change. *Freshwater Biol.* 3: 259-265
53. Czimczik, C.I., Preston, C.M., Schmidt, M.W.I., Werner, R.A., Schulze, E.D., 2002. Effect of charring on mass, organic carbon, and stable carbon isotope composition of wood, *Org. Geochem.* 33: 1207-1223
54. Da Cunha, L.C., Serve, L., Gadel, F., Blazi, J.L., 2000. Characterisation of riverine particulate organic matter by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Scien. Total Environ.* 256: 191-204
55. Dai, K.H., Johnson, C.E., 1999. Applicability of solid-state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. *Geoderma* 93: 289-310
56. Dalton, R. 1999. US warms to carbon sequestration research. *Nature* 401: 315
57. De la Rosa, J.M., González-Vila, F.J., Polvillo, O., González-Pérez, J.A., De Andrés, J.R., 2005. Strategies for the Isolation and Molecular Characterization of Black Carbon. 9<sup>th</sup> Latinoamerican Meeting on Organic Geochemistry. Book of abstracts, Mérida (México) pp. 41-42
58. De la Rosa, J.M., Knicker, H., López-Capel, E., Manning, D.A.C., González-Pérez J.A., González-Vila, F.J., 2007. Direct detection of black carbon in soils by Py-GC/MS,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and thermogravimetric techniques. *Am. J. Soil. Sci. Soc.* Aceptado
59. De Leeuw, J.W., Baas M., 1993. The behaviour of esters in the presence of tetramethylammonium salts at elevated temperatures: flash-pyrolysis or flash-chemolysis? *J. Anal. Appl. Pyrol.* 26: 175-184
60. De Leeuw, J.W., van Bergen, P.F., van Aarssen, B.G.K., Gatellier, J.P., Sinninghe Damste, J.S., Collinson, M.E., 1991. Resistant biomacromolecules as major contributors to kerogen. *Phil. Trans. Roy. Soc. London* 33: 329-337
61. Decesari, E., Facchini, M.C., Matta, E., Mircea, M., Fuzzi, S., Chughtai A. R., Smith, D. M., 2002. Water soluble organic compounds formed by oxidation of soot. *Atmospheric Environment* 36 (11): 1827-1832

62. Del Rio, J.C., McKinney, D.E., Knicker, H., Nanny, M.A., Minard, R.D. and Hatcher, P.G., 1998. Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Chromat. A* 823: 433-448
63. Dell'Abate, M.T., Canali, S., Trinchera, A., Benedetti, A., Sequi, P., 2000. Thermal methods of organic matter maturation monitoring during a composting process. *J. Ther. Anal. & Cal.* 61: 389-396
64. Dell'abate, M.T., Benedetti, A., Brookes, P.C., 2003. Hyphenated techniques of thermal analysis for characterisation of soil humic substances. *J. of Sep. Sci.* 26: 433-440
65. Dell'Abate, M.T., Benedetti, A., Trinchera, A., Dazzi, C., 2002. Humic substances along the profile of two Typic Haploxerert. *Geoderma* 107: 281-296
66. Delwiche, C.C., Steyn, P.L., 1970. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Environment. Sci. and Tech.* 4: 929-935
67. Dennen, K., Burns, W., Burruss, R., Hatcher, K., 2006. *Geochemical Analyses of Oils and Gases, Naval Petroleum Reserve No. 3, Teapot Dome Field, Natrona County, Wyoming.* Publicaciones del US National Survey (<http://pubs.usgs.gov/of/2005/1275/of2005-1275.pdf>)
68. Derenne, S., Largeau, C., 2001. A review of some important families of refractory macromolecules: composition, origin, and fate in soils and sediments. *Soil Sci.* 166 (11): 1-15
69. Deshmukh, A. P., Chefetz, B., Hatcher, P. G., 2001. Characterization of organic matter in pristine and contaminated coastal marine sediments using solid-state <sup>13</sup>C NMR, pyrolytic and thermochemolytic methods: A case study in the San Diego harbor area. *Chemosphere* 45: 1007-1022
70. Deshmukh, A.P. Simpson, A.J., Hatcher, P.G. 2003. Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy, *Phytochem.* 64: 1163-1170
71. Doney S. C., Ducklow H.W., 2006 A decade of synthesis and modeling in the US Joint Global Ocean Flux Study Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, pp. 451-458
72. Dria, K.J., Sachleben, J.R., Hatcher, P.G., 2002. Solid-state <sup>13</sup>C NMR of humic acids at high magnetic field strengths. *J. Environment. Qual.* 31: 393-401.
73. Eganhouse, R.P., Kaplan, I.R., 1988. Depositional history of recent sediments from San Pedro shelf, California: reconstruction using elemental abundances, isotopic composition and molecular markers. *Mar. Chem.* 24: 163-191

74. Eglinton, G., Murphy, M.T.J., 1969. *Organic Geochemistry: Methods and Results*. Springer Verlag, Heidelberg. pp. 828
75. Elmquist, M., Ö, Gustafsson, and P. Andersson, 2004. Quantification of sedimentary black carbon using the chemothermal oxidation method: an evaluation of ex situ pretreatments and standard additions approach, *Limnol. Oceanogr.* 2: 417-427
76. Emiliani, C., Price, D.A., Seipp, D.J., 1991. Is the post glacial artificial?. *Spec. Publ. Geochem. Soc.* 3: 229-231
77. Ergin, M., Gaines, A., Galletti, G.C., Chiavari, G., Fabbri, D., Yücesoy-Eryılmaz, F., 1996. Early diagenesis of organic matter in marine sediments: characterisation and source assessment, *Appl. Geochem.* 11: 711-720
78. Fabbri, D., Chiavari G., Galletti, G.C., 1996. Characterisation of soil humin by pyrolysis (/methylation)—gas chromatography/mass spectrometry: structural relationships with humic acids, *J. Anal. and Appl. Pyrol.* 37: 161-172
79. Fabbri, D., Sangiorgi, F., Vassura, I., 2005. Pyrolysis-GC/MS to trace terrigenous organic matter in marine sediments: a comparison between pyrolytic and lipid markers in the Adriatic Sea. *Analyt. Chim. Acta*, 530: 253-261
80. Fearnside, P.M., Leal, L., Fernandes, F.M., 1993. Rainforest burning and the global carbon budget: Biomass, combustion efficiency and charcoal formation in the Brazilian Amazon. *J. Geophys. Res.* 98: 16.733-16.743
81. Fernández, M.B., Skjemstad, J.O., Johnson, B.B., Wells J.D., Brooks, P., 2003. Characterization of carbonaceous combustion residues. I: Morphological, elemental and spectroscopic features, *Chemosphere* 51: 785-795
82. Filley, T.R., Cody, G.D, Goodell, B., Jellison, J., Noser, C., Ostrofsky, A., 2002. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi, *Org. Geochem.* 33: 111-124
83. Flinch, J., Bally, A., Wu, S., 1996. Emplacement of a passive-margin evaporitic allochthon in the Betic Cordillera of Spain. *Geology* 24: 67-70
84. Freitas, C.C., Bonagamba, T.J., Emmerich, F.G., 1999. <sup>13</sup>C High-resolution solid-state NMR study of peat carbonization. *Energy and Fuels* 13: 53-59
85. Freudenthal, T., Wagner, T., Wenzhffer, F., Zabel, M., Wefer, G., 2001. Early diagenesis of OM from sediments of the eastern subtropical Atlantic: evidence from stable nitrogen and carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65: 1795-1808

86. Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G., 1997. Refractory Organic Substances in the environment. (Eds) Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G., Veröffentlichungen des Lehrstuhls für Wasserchemie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe. Alemania
87. Gadel, F., Charrière, B., Serve, L., 1993. Chemical characterization of suspended particulate organic matter by pyrolysis–gas chromatography coupled with mass spectrometry and high performance liquid chromatography in the bottom nepheloid layer of the Rhône Delta. *Estuar. Coastal Shelf S.* 37: 221-236
88. Galletti, G.C., 1991. Py-GC-ion trap detection of sorgum grain polyphenols: preliminary results. *American Chemical Society – Fuel Chemistry Division* 36: 691-697
89. Galletti, G.C., Reeves, J.B., 1992. Pyrolysis/gas chromatography/ion trap detection of polyphenols (vegetable tannins): preliminary results. *Org. Mass Spectrom.* 27: 226-234
90. Gallop, M.A., Fitch, W.L., 1997. New methods for analyzing compounds on polymeric supports. *Current Opinion in Chemical Biology* 1: 94-100
91. Garcette-Lepecq, A., Derenne, S., Largeau, C., Bouloubassi I., Saliot, A., 2000. Origin and formation pathway of kerogen-like organic matter in recent sediments off the Danube delta (northwestern Black Sea), *Org. Geochem.* 31: 1663-1683
92. Garcia, P., Hall, P.J., Mondragon, F., 1999. The use of differential scanning calorimetry to identify coals susceptible to spontaneous combustion. *Thermochimica Acta* 336: 41-46
93. Gawenda, P., Winkler, W., Schmitz, B., Adatte, T., 1999. Climate and bioproductivity control on carbonate turbidite sedimentation (Paleocene to earliest Eocene, Gulf of Biscay, Zumaia, Spain, *J. of Sed. Research* 69: 1253-1261
94. Gelin, F., 1996. Isolation and chemical characterisation of resistant macromolecular constituents in microalgae and marine sediments. PhD. Thesis, Utrecht University, Utrecht. Pp. 147
95. Gelin Y., Prentice K.M., Baldock J.A., Hedges J.I., 2001. An improved thermal oxidation method for the quantification of soot/graphitic black carbon in sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3519-3525
96. Gélinas, Y., Prentice, K.M., Baldock, J.A., Hedges J.I., 2001. An improved thermal oxidation method for the quantification of soot/graphitic black carbon in sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 35(17): 3519-3525



97. Girardin, C., Mariotti, A., 1991. Analyse isotopique du  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle dans le carbone organique: un système automatique avec robot préparateur, Cahiers ORSTOM, Série Pédologie 26 : 371-380
98. Glaser, B., Dreyer, A., Bock, M., Fiedler, S., Mehring M., Heitmann, T., 2005. Environ. Sci. Technol. 11: 3911-3917
99. Glaser, B., Haumaier, L., Guggenberger, G., Zech, W., 1998. Black carbon in soils: the use of benzenecarboxylic acids as specific markers. Org. Geochem. 29(49): 811-819
100. Goericke, R., Montoya J.P., Fry, B., 1994. Physiology of isotopic fractionation in algae and cyanobacteria. In: K. Lajtha and H. Michener, Editors, Stable isotopes in ecology and environmental science, Blackwell Scientific Publication, Oxford 187-221
101. Goldberg, E.D., 1985. Black Carbon in the Environment: Properties and Distribution. John Wiley & Sons, New York
102. González, J.A., González-Vila F.J., Almendros G., Knicker H., Polvillo O., Salas F., Costa J.C., 2002. Wildfire and black carbon production in Andalusian Mediterranean forest. Conference Proceedings. IV International Conference on Forest Fire Research, 2002 Wildland Fire Safety Summit. Coimbra, Portugal.
103. Gonzalez, J.A., Gonzalez-Vila, F.J., Almendros, G., Zancada, M.C., Polvillo, O., Martin, F., 2003. Preferential accumulation of selectively preserved biomacromolecules in the humus fractions from a peat deposit as seen by analytical pyrolysis and spectroscopic techniques. J. Anal. Appl. Pyrol. 68-69: 287-298
104. González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Almendros G., Knicker, H., 2004. The effect of fire on soil organic matter—a review, Env. Int. 30 (6): 855-87
105. González-Vila, F.J., Almendros G. 2003. Thermal transformation of soil organic matter by natural fires and laboratory-controlled heatings. In: Ikan R, editor. Natural and laboratory simulated thermal geochemical processes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishing, pp. 153-200
106. González-Vila, F.J., Amblès, A., del Río, J.C., Grasset, L., 2001. Characterisation and differentiation of kerogens by pyrolytic and chemical degradation techniques. J. Anal. Appl. Pyrol. 58/59: 315-328
107. González-Vila, F.J., Lentz, H., Lüdeman, H.D., 1976. FT- $^{13}\text{C}$  NMR spectra of natural humic substances. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72: 1063-1069
108. González-Vila, F.J., Lentz, H., Lüdeman, H.D., Martín, F., 1983.  $^{13}\text{C}$  NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives. Geoderma 31: 3-15

109. Griffin, J.J., Goldberg, E.D., 1979. Morphologies and origin of elemental carbon in the environment. *Science* 206: 563-565
110. Gröcke, D.R., 2002. The carbon isotope composition of ancient CO<sub>2</sub> based on higher-plant organic matter. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 360: 633-658
111. Grossi, V., Caradec, S., Gilbert, F., 2003. Burial and reactivity of sedimentary microalgal lipids in bioturbated Mediterranean coastal sediments *Mar. Chem.* 81: 57-69
112. Guggenberger, G., Kaiser, K., 2003. Dissolved organic matter in soil: challenging the paradigm of sorptive preservation. *Geoderma* 113: 293-310
113. Gustafsson Ö., Haghseta F., Chan C., Macfarlane J. Gschwend P.M., 1997. Quantification of the dilute sedimentary soot-phase: implications for PAH speciation and bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 31: 203-209
114. Gustafsson, Ö., Gschwend, P.M., 1998. The flux of black carbon to surface sediment on the New England continental shelf. *Geochim. et Cosmochim. Acta.* 62: 465-472
115. Gustafsson, Ö., Haghseta, F., Chan, C., Macfarlane, J., Gschwend, P.M., 1997. Quantification of the dilute sedimentary soot phase: Implications for PAH speciation and bioavailability. *Env. Sci. Technol.* 24: 1687-1693
116. Hadas, O., Pinkas, R., Malinsky-Rushansky, N., Markel, D., Lazar, B., 2001. Sulfate-reduction in lake Agmon, Israel. *Sci. Total Environ.* 266: 202-209
117. Hammes, K., Schmidt, M.W.I. Currie, L.I.A., González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A., De la Rosa, J.M., y otros 36 autores. 2007 Comparison of black carbon quantification methods using reference materials from soil, water, sediment and the atmosphere, and implications for the global carbon cycle. *Env. Sci. Technol.* Aceptado
118. Hammes, K., Smernik, R.J., Skjemstad, J.O., Herzog, A., Vogt, U.F., Schmidt, M.W.I., 2006. Synthesis and characterisation of laboratory-charred grass straw (*Oryza sativa*) and chestnut wood (*Castanea sativa*) as reference materials for black carbon quantification. *Org. Geochem.* 37: 1629-1633
119. Hansen, J., Nazarenko, L., 2004. Soot climate forcing via snow and ice albedos. *PNAS* 101: 423-428
120. Hatcher P.G., Spiker, E.C., 1988. Selective degradation of plant biomolecules. In: F.H. Frimmel and R.F. Christman, Editors, *Humic Substances and their Role in the Environment*, Wiley, New York, pp. 59-74

121. Hatcher, P.G., Breger, I.A., Dennis, L.W., Maciel, G.E., 1983. Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR of sedimentary humic substances; new revelations on their chemical composition, *En Aquatic and Terrestrial Humic Material*. Eds. R.F. Christman y E.T. Gjessing. Cap. 3, Ann Arbor. Michigan.
122. Hatcher, P.G., Clifford, D.J., 1994. Flah pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil. *Org. Geochem.* 21: 1081-1092
123. Hatcher, P.G., Lerch H.E., Kotra, R.K. Verheyen, T.V., 1988. Pyrolysis g.c.-m.s. of a series of degraded woods and coalified logs that increase in rank from peat to subbituminous coal. *Fuel* 67: 1069-1075
124. Haumaier, L., Zech, W., 1995. Black carbon-possible source of highly aromatic components of soil humic acids. *Org. Geochem.* 23: 191-196
125. Hedges, J.I., Eglinton, G., Hatcher, P.G., Kirchman, D.L., Arnosti, C., Derenne, S., Evershed, R.P., Kögel-Knabner, I., De Leeuw, J.W., Littke, R., Michaelis, W., Rullkotter, J., 2000. The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. *Org. Geochem.* 31: 945-958
126. Hedges, J.I., Hu, F.S., Devol, A.H., Hartnett, H.E., Tsamakidis, E., Keil, R., 1999. Sedimentary organic matter preservation: a test for selective degradation under oxic conditions. *Am. J. Sci.* 299: 529-555
127. Hedges, J.I., Keil, R.G., 1995. Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis, *Mar. Chem.* 49: 81-115
128. Hedges, J.I., Keil, R.G., 1999. Organic geochemical perspectives on estuarine processes: sorption reactions and consequences. *Mar. Chem.* 65: 55-65
129. Hedges, J.I., Keil, R.G., Benner, R., 1997. What happens to terrestrial organic matter in the ocean?. *Org. Geochem.* 27: 195-212.
130. Hempfling, R., Schulten, H.R., Horn, R., 1990. Relevance of humus composition to the physical/mechanical stability of agricultural soils: a study by direct pyrolysis-mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 17: 275-281
131. Herring, J.R., 1985. Charcoal fluxes into sediments of the North Pacific Cocean: the Cenozoic record of burning. In: Sundquist, E.T., Broecker, W.S. (Eds.), *The Carbon Cycle and Atmospheric CO<sub>2</sub>: Natural Variations Archean to Present*. AGU, Washington DC pp. 419-442
132. Hertkorn, N., Benner, R., Frommberger, M., Schmitt-Kopplin, P., UIT, M., Kaiser, K., Kettrup, A., Hedges, J.I., 2006. Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 70: 2990-3010

133. Hofmann, P., Ricken, W., Schwark, L., Leythaeuser D., 2001. Geochemical signature and related climatic-oceanographic processes for early Albian black shales: Site 417D, North Atlantic Ocean. *Cretaceous Res.* 22: 243-257
134. Holtvoeth, J., Kolonic S., Wagner, T., 2005. Soil organic matter as an important contributor to late Quaternary sediments of the tropical West African continental margin, *Geochim. et Cosmochim. Acta* 69: 2031-2041
135. Hotinski et al., 2001 R.M. Hotinski, K.L. Bice, L.R. Kump, R.G. Najjar and M.A. Arthur, 2001. Ocean stagnation and end-Permian anoxia, *Geology* 29, 7-10
136. [http://unfccc.int/ghg\\_emissions\\_data/items/3800.php](http://unfccc.int/ghg_emissions_data/items/3800.php). Naciones Unidas., 1999. Informe Publicado por el Departamento de Información al Público de las Naciones Unidas DPI/1939/ Rev.2.
137. <http://www.empa.ch>
138. <http://www.geo.unizh.ch/phys/bc/>
139. <http://www.ihss.gatech.edu/sales.html>
140. <http://www.ine.es>; Boletín Trimestral de Coyuntura Energética. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio; Resultados sobre energía
141. [http://www.mma.es/portal/secciones/cambio\\_climatico/areas\\_tematicas/impactos\\_cc/pnacc.htm](http://www.mma.es/portal/secciones/cambio_climatico/areas_tematicas/impactos_cc/pnacc.htm). Plan Nacional de adaptación al cambio climático
142. [http://www.mma.es/secciones/cambio\\_climatico/pdf/rd\\_1370\\_2006\\_pna.pdf](http://www.mma.es/secciones/cambio_climatico/pdf/rd_1370_2006_pna.pdf). Plan Español de asignación de derechos de emisión
143. <http://www.nist.gov/srm/>
144. Huang, L., Brook, J.R., Zhang, W., Li, S.M., Graham, L., Ernst, D., Chiculescu, A., Lu G., 2006. Stable isotope measurements of carbon fractions (OC/EC) in airborne particulate: A new dimension for source characterization and apportionment. *Atmos. Environ.* 40(15): 2690-2705
145. Huebert, B.J., Bertram, T., Kline, Howell, S.J., Eatough, D., Blomquist B., 2004. Measurements of organic and elemental carbon in Asian outflow during ACE-Asia from the NSF/NCAR C-130, *J. Geophys. Res.* 109, D19S11, doi:10.1029/2004JD004700.
146. Huntzicker, J.J., Johnson R.L., et al., 1982. Analysis of organic and elemental carbon in ambient aerosols by a thermal-optical method, *Particulate Carbon: Atmospheric Lifestyle*. G.T. Wolff and R.L. Klimisch (Eds)

147. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 1996. Climate Change 1995. The Science of Climate Change. J.T. Houghton, L.G. Meira Filho, B.A. Collander, N. Harris, A. Kattenberg & K. Maskell, eds. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
148. Ishiwatari, R., Uzaki, M., 1987. Diagenetic changes of lignin compounds in a more than 0.6 million-year-old lacustrine sediment (Lake Biwa, Japan). *Geochim. Cosmochim. Acta* 51: 321-328
149. Johns, R.B., 1986. Biological Markers in the Sedimentary Record. *Methods in Geochemistry and Geophysics* 24. Elsevier Science, Amsterdam
150. Johns, R.B., Belsky, T., McCarthy, E.D., Burlingame, A.L., Haug, P., Schnoes, H.K., Richter, W. and Calvin, M., 1966. The organic geochemistry of ancient sediments. II. *Geochim. Cosmochim. Acta* 30: 1191-1222
151. Johnson, R.L., Shah, J.J., Cary, R.A., Huntzicker, J.J., 1981. An automated thermal-optical method for the analysis of carbonaceous aerosol. *Atmospheric Aerosol: Source/Air Quality Relationships*, Macias & Hopke (Eds). American Chemical Society, Washington, DC 223-233
152. Jones, T.P., Chaloner, W.G., 1991. Fossil charcoal, its recognition and palaeoatmospheric significance. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 97: 39-50
153. Kaloustian, J., Pauli, A.M., Pastor, J., 2001. Kinetic study of the thermal decompositions of biopolymers extracted from various plants. *J. Therm. Anal. & Cal.* 63: 7-20
154. Karapanagioti, H.K., Sabatini, D.A., 2000. Impacts of heterogeneous organic matter on phenanthrene sorption: different aquifer depths. *Environ. Sci. Technol.* 34: 2453-2460
155. Kawamura, K., Ishiwatari, R., 1981. Polyunsaturated fatty acids in a lacustrine sediment as a possible indicator of paleoclimate. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45: 149-155
156. Kawamura, K., Ishiwatari, R., 1984. Fatty acid geochemistry of a 200m sediment core from Lake Biwa Japan. Early diagenesis and paleoenvironmental information. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48: 251-266
157. Keil, R.G., Hu, F.H., Tsamakis, E.C., Hedges, J.I., 1994. Pollen in marine sediments as an indicator of oxidation of organic matter. *Nature.* 369: 639-641
158. Keil, R.G., Tsamakis, E., Giddings J., Hedges, J.J., 1998. Biochemical distributions (amino acids, neutral sugars and lignin phenols) among size-classes of modern marine sediments from the Washington coast, *Geochim. et Cosmochim. Acta* 62: 1347-1361

159. Keil, R.G., Dickens, A.F., Arnarson, T., Nunn, B.L., Devol, A.H., 2004. What is the oxygen exposure time of laterally transported organic matter along the Washington margin?. *Mar. Chem.* 92: 157-165
160. Keil, R.G., Montluçon, D.B., Prahl, F.G. and Hedges, J.I., 1994b. Sorptive protection of labile organic matter in marine sediments. *Nature* 370: 549-551
161. Keil, R.G., Tsamakis, E., Fuh, C.B., Giddings, J.C. and Hedges, J.I., 1994a. Mineralogic and textural controls on the organic composition of coastal marine sediments: hydrodynamic separation using SPLITT-fractionation. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 58: 879-895
162. Kelleher, B.P., Simpson, M.J., Simpson, A.J. 2006. Assessing the fate and transformation of plant residues in the terrestrial environment using HR-MAS NMR spectroscopy. *Geochim. et Cosmochim. Acta.* 70: 4080-4094
163. Kershaw, A.P., 1986. Climatic change and aboriginal burning in northeast Australia during the last two glacial/interglacial cycles. *Nature* 322: 47-49
164. Kidder, D.L. and D.R. Worsley, 2003. Causes and consequences of extreme Permo–Triassic warming to globally equable climate and relation to the Permo–Triassic extinction and recovery, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 203: 207-237
165. Killops, S.D., Killops, V.J., 1993. *An Introduction to Organic Geochemistry*. Longman Scientific & Technical. Harlow
166. Killops, S.D., Massoud, M.S., 1992. Polycyclic aromatic hydrocarbons of pyrolytic origin in ancient sediments: evidence for Jurassic fires. *Org. Geochem.* 18: 1-7
167. Kim, S., Kaplan, L.A., Benner, R., Hatcher, P.G., 2004. Hydrogen deficient molecules in natural riverine water samples-evidence for existence of black carbon in DOM. *Mar. Chem.* 92(1-4): 225-239
168. Kirchman D. L., Henry D. L., and Dexter S. C., 1989. Adsorption of proteins to surfaces in seawater. *Mar. Chem.* 27: 201-217
169. Knicker H, Scaroni A.W. and Hatcher P.G., 1996.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopic investigation on the formation of fossil algal residues. *Org. Geochem.* 24: 661-669
170. Knicker, H., González-Vila, F.J., Polvillo, O., González J.A., Almendros, G., 2005. Fire-induced transformation of C- and N- forms in different organic soil fractions from a Dystric Cambisol under a Mediterranean pine forest (*Pinus pinaster*). *Soil Biol. and Biochem.* 37: 701-718

171. Knicker, H., Hatcher, P.G., 1997. Survival of protein in an organic-rich sediment. Possible protection by encapsulation in organic matter. *Naturwissenschaften* 84: 231-234
172. Knicker, H., Hatcher, P.G., 2001. Sequestration of organic nitrogen in the sapropel from Mangrove lake, Bermuda. *Org. Geochem.* 32: 733-744
173. Knicker, H., Lüdemann, H.D. 1995. N-15 and C-13 CPMAS and solution NMR studies of N-15 enriched plant material during 600 days of microbial degradation. *Org. Geochem.* 23: 329-341
174. Knicker, H., Schmidt M.W.I., Kögel-Knabner, I., 2000. Nature of organic nitrogen in fine particle size separates of sandy soils of highly industrialized areas as revealed by NMR spectroscopy. *Soil Biol. & Biochem.* 32: 241-252
175. Koelmans, A.A., Jonker, M.T.O., Cornelissen, G., Bucheli, T., Van Noort, P.C.M., Gustafsson, Ö., 2006. Black Carbon: The reverse of its dark side, *Chemosphere* 63: 365-377
176. Kögel-Knabner, I., 1995. Composition of soil organic matter. In: Nannipieri, P. and Alef, K. Editors, 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* Academic Press, New York, pp. 66-78
177. Kögel-Knabner, I., 2000. Analytical approaches for characterizing soil organic matter, *Org. Geochem.* 31: 609-625
178. Kök, M.V., 2001. An investigation into the combustion curves of lignites. *J. of Ther. Anal and Cal.* 64: 1319-1323
179. Kruge, M.A., Stankiewicz, A.B., Crellung, J.C., Montanan, A., Bensley, D.F., 1994. Fossil charcoal in cretaceous Tertiary boundary strata: Evidence for catastrophic firestorm and megawave. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58: 1393-1397
180. Kuhlbusch, T.A.J., Andreae, M.O., Cachier, H., Goldammer, J.G., Lacaux, J.-P., Shea, R., Crutzen, P.J., 1996. Black carbon formation by savanna fires: Measurements and implications for the global carbon cycle, *J. Geophys. Res.* 101: 23651-23665
181. Kuhlbusch T. A. J., Crutzen P.J. 1995. Toward a global estimate of black carbon residues of vegetation fires representing a sink of atmospheric CO<sub>2</sub> and a source of O<sub>2</sub>. *Global Biogeochem Cycles* 9: 491-501
182. Kuhlbusch, T. A. J., 1998. Black carbon and the carbon cycle. *Science* 280: 1903-1904
183. Kuhlbusch, T.A.J., 1995. Method for determining black carbon in residues of vegetation fires. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2695-2702

184. Largeau, C., Derenne, S., Casadevall, E., Kadouri, A., Sellier, N., 1986. Pyrolysis of immature Torbanite and of the resistant biopolymer (PRB A) isolated from extant alga *Botryococcus Braunii*. Mechanism of formation and structure of Torbanite. *Org. Geochem.* 10: 1023-1032
185. Leifeld, J., 2007. Thermal stability of black carbon characterised by oxidative differential scanning calorimetry. *Org. Geochem.* 38: 112-127
186. Leifeld, J., Franko, U., Schulz, E., 2006. Thermal stability responses of soil organic matter to long-term fertilization practices. *Biogeosciences* 3: 371-374
187. Leventhal, J., 1983. Interpretation of C and S relationships in Black Sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 47: 133-137
188. Lim, B., Cachier, H., 1996. Determination of black carbon by chemical oxidation and thermal treatment in recent marine and lake sediments and Cretaceous-Tertiary clays, *Chem. Geol* 131: 143-154
189. Lopez-Capel E., de la Rosa Arranz, J.M., Gonzalez-Vila, F.J., Gonzalez-Perez, J.A., Manning, D.A.C., 2006b. Elucidation of different forms of organic carbon in marine sediments from the Atlantic coast of Spain using thermal analysis coupled to isotope ratio and quadrupole mass spectrometry. *Org. Geochem.* 37: 1983-1994
190. Lopez-Capel, E., Abbott, G.D., Thomas K.M., Manning, D.A.C., 2006a. Coupling of thermal analysis with quadrupole mass spectrometry and isotope ratio mass spectrometry for simultaneous determination of evolved gases and their carbon isotopic composition. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 75 (2): 82-89
191. Lopez-Capel, E., Bol, R., Manning, D.A.C., 2005b. Application of simultaneous thermal analysis mass spectrometry and stable carbon isotope analysis in a carbon sequestration study. *Rapid Comm. Mass Spect.* 19: 3192-3198
192. Lopez-Capel, E., Sohi, S.P., Gaunt J.L., Manning, D.A.C., 2005a. Use of thermogravimetry–differential scanning calorimetry to characterize modelable soil organic matter fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69: 136-140
193. Maciel, G.E., O'Donnell, D.J., Ackerman, J.J.H., Hawkins, B.J., Bartuska, V.J., 1981. A  $^{13}\text{C}$  NMR study of four lignins in the oil and solution states. *Makromol. Chem.* 182: 2297-2304
194. Maillard, L.C. 1917. Identite des metieres humiques de synthese avec les matieres humiques naturelles. *Annales de chimie (Paris)* 7: 113-152
195. Manning, D.A.C., Lopez-Capel, E., Barker, S., 2005. Seeing soil carbon: use of thermal analysis in the characterization of soil C reservoirs of differing stability, *Mineralogical* 69: 425-435



196. Martín, F., Almendros, G., Gonzalez-Vila, F.J., Verdejo, T., 2001. Experimental reappraisal of flash pyrolysis and low-temperature thermally assisted hydrolysis and methylation using tetramethylammonium hydroxide for the molecular characterization of humic acids, *J. of Anal. Appl. Pyrol.* 61:133-145
197. Martín, F., del Río, J.C., González-Vila, F.J., Verdejo, T., 1995. Pyrolysis derivatization of humic substances. II. Pyrolysis of soil humic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *J. Anal. Appl. Pyrol.* 31: 75-83
198. Martín, F., González-Vila, F.J., del Río, J.C., Verdejo, T., 1994. Pyrolysis derivatization of humic substances. I. Pyrolysis of fulvic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 28: 71-80
199. Martín, F., Saiz-Jimenez, C, Cert, A.I., 1977. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of soil humic fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 1114-1118
200. Martínez de Olmo, W., García-Mallo, J., Leret, G., Serrano, A., Suárez, J., 1984. Modelo tectosedimentario del Bajo Guadalquivir. *Proceedings del I Congreso Español de Geología* 1: 199-213
201. Masiello C.A., Druffel E.R.M., 1998. Black carbon in deep-sea sediments. *Science* 280: 1911-1913
202. Masiello, C.A., 2004. New directions in black carbon organic geochemistry. *Mar. Chem.* 92: 201-213
203. Masiello, C.A., Druffel, E.R.M., Currie, L.A., 2002. Radiocarbon measurements of black carbon in aerosols and ocean sediments. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 66: 1025-1036
204. McCarthy, P., Malcolm, R.L., 1979. The need to establish a reference collection of humic substances. In: S.N. Chesier and H.S. Hertz, Editors, *Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry*, US National Bureau of Standards 519-793
205. McGroddy, S.E., Farrington, J.W., 1995. Sediment porewater partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in three cores from Boston Harbor, Massachusetts. *Env. Sci. Technol.* 29: 1542-1550
206. McGroddy, S.E., Farrington, J.W., Gschwend, P.M., 1996. Comparison of the in situ and desorption sediment—Water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Env. Sic. Technol.* 30: 172-177
207. Mendiara, T., Domene, M.P., Millera, A, Bilbao R., Alzueta, M.U., 2005. An experimental study of the soot formed in the pyrolysis of acetylene. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74: 486-493

208. Meyers, P.A., 1994. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chem. Geol.* 144: 289-302
209. Meyers, P.A., 1997. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic and paleoclimatic processes. *Org. Geochem.* 27: 213-250
210. Meyers, P.A., Leenheer, M.J., Eadie, B.J., Maule, S.J., 1984. Organic geochemistry of suspended and settling particulate matter in Lake Michigan. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48: 443-452
211. Middelburg, J.J., de Lange, G.J., 1988. Geochemical characteristics as indicators of the provenience of Madeira Abyssal Plain turbidites. A statistical approach. *Oceanol. Acta* 11: 159-165
212. Middelburg, J.J., Nieuwenhuize, J., Breugel, P., 1999. Black carbon in marine sediments, *Mar. Chem.* 65:245-252
213. Middelburg, J.J., Nieuwenhuize, J., Lubberts, R.K., Van de Plassche, O., 1997. Organic carbon isotope systematics of coastal marshes, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 45: 681-687
214. Ministerio de Medio Ambiente (2005). Evaluación Preliminar de los Impactos en España por Efecto del Cambio Climático. Centro de Publicaciones de la Secretaría General Técnica del Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, España. 846pp.
215. Moldowan, J.M., Albrecht, P., Philp, R.P., 1992. *Biological Markers in Sediments and Petroleum*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey
216. Morales, J.A., 1997. Evolution and facies architecture of the mesotidal Guadiana River delta (S.W. Spain – Portugal). *Mar. Geol.* 138: 127-148
217. Morales, J.A., Borrego, J., Jimenez, I., Monterde, J., Gil, N., 2001. Morphostratigraphy of an ebb-tidal delta system associated with a large spit in the Piedras Estuary mouth (Huelva Coast, Southwestern Spain). *Mar. Geol.* 172: 225-241
218. Morales-Gamboa, E., 1999. *Sedimentos Marinos. Los Procesos Sedimentarios*. Cap 1. Ed. POSEIDON. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
219. Murwanashyaka, J.N., Pakdel H., Roy, C., 2001. Step-wise and one-step vacuum pyrolysis of birch-derived biomass to monitor the evolution of phenols. *J. of Anal. Appl. Pyr.* 60: 219-231
220. Nguyen, R. T., Harvey, H. R., 2001. Preservation of protein in marine systems: Hydrophobic and other noncovalent associations as major stabilizing forces. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 65: 1467-1480

221. Nguyen, T.H., Brown, R.A. & Ball, W.P. 2004. An evaluation of thermal resistance as a measure of black carbon content in diesel soot, wood char, and sediment. *Org. Geochem.*35(3): 217-234
222. Nieuwenhuize, J., Maas, Y.E.M., Middelburg, J.J., 1994. Rapid analysis of organic carbon and nitrogen in particulate materials. *Mar. Chem.* 45: 217-224
223. Nip, M., Tegelaar, E.W., Briukhuis, H., de Leeuw, J.W., Schenk, P.A., Holloway, P.J., 1986b. Analysis of modern and fossil plant cuticles by Curie point Py-GC and Curie point Py-GC-MS: Recognition of a new, highly aliphatic and resistant biopolymer. *Org. Geochem.* 10: 769-778
224. Nip, M., Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., Schenk, P.A., Holloway, S.P.J., 1986a. A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. Evidence from pyrolysis and <sup>13</sup>C NMR analysis of present day and fossil plants. *Naturwissenschaften* 73: 579-585
225. Odegaard, B.V., 1993. The sedimentary record of spheroidal carbonaceous flyash particles in shallow Danish lakes. *J. Paleolimnology* 8: 171-187
226. Olsson, K., Pernemalm P.A., Theander, O., 1978. Formation of aromatic compounds from carbohydrates. VII. Reaction of D-glucose and glycine in slightly acidic, aqueous solution. *Acta Chem. Scandinavica* B32: 249-256
227. Pantoja, S. and Lee, C., 1999. Molecular weight distribution of proteinaceous material in Long Island Sound sediments. *Limnol. and Oceanogr.* 44: 1323-1330
228. Parton, W.J., Schimel, C.V., Cole, C.V., Ojima, D.S., 1987. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in great plain grasslands. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51: 1173-1179
229. Pastorova, I., Botto, R.E., Arisz P.W., Boon, J.J., 1994. Cellulose char structure: a combined analytical Py-GC-MS, FTIR, and NMR study. *Carbohydrate Research* 26: 27-47
230. Patience R.L., Baxby, M., Bartle, K.D., Perry, D.L., Rees, A.G.W. and Rowland, S.J., 1992. The functionality of organic nitrogen in some recent sediments from the Peru upwelling region. *Org. Geochem.* 18: 161-169
231. Pessenda, L.C.R., Aravena, R., Molfi, A.J., Tellex, E.C.C., Boulet, R., Valencia, E.P.E., Tomazello, M., 1996. The use of carbon isotopes (<sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C) in soil to evaluate vegetation changes during the Holocene in central Brazil. *Radiocarbon* 38: 191-201
232. Plante, A.F., Pernes, M., Chenu, C., 2005. Changes in clay associated organic matter quality in a C depletion sequence as measured by differential thermal analyses. *Geoderma* 129: 186-199

233. Poirier, N., Derenne, S., Balesdent, J., Mariotti, A., Massiot, D., Largeau, C., 2003. Isolation and analysis of the non-hydrolysable fraction of a forest soil and an arable soil (Lacadée, south-west France). *Europ. Jour. of Soil Sci.* 54: 243-255
234. Poirier, N., Derenne, S., Rouzaud, J.N, Largeau, C., Mariotti, A., Balesdent, J., Maquet, J., 2000. Chemical structure and sources of the macromolecular, resistant, organic fraction isolated from a forest soil (Lacadée, south-west France). *Org. Geochem.* 31: 813-827.
235. Pouwels, A.D., Eijkel G.B, Boon, J.J., 1989. Curie point pyrolysis–capillary gas chromatography–high-resolution mass spectrometry of microcrystalline cellulose, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 14: 237-280
236. Prahl, F.G., Bennett, J.T., Carpenter, R., 1980. The early diagenesis of aliphatic hydrocarbons and organic matter in sedimentary particules from dabob Bay, Washington. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 44: 1967-1976
237. Prahl, F.G., Ertel, J.R., Goñi, M.A., Sparrow, M.A., Eversmeyer, B., 1994. Terrestrial organic carbon contributions to sediments on the Washington margin. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58: 3048-3055
238. Prahl, FG., de Lange, G.J., Lyle, M., Sparrow, M.A., 1989. Post-depositional stability of long-chain alkenones under contrasting redox conditions. *Nature* 341: 434-437
239. Prahl, FG., de Lange, G.J., Scholten, S., Cowie, G.L., 1997. A case of post-depositional degradation of terrestrial organic matter in turbidite deosits from Madeira abyssal Plain. *Org. Geochem.* 27: 141-152
240. Premuzic, E.T., Benkovitz, C.M., Gaffney, J.S., Walsh, J.J., 1982. The nature and distribution of organic matter in the surface sediments of world oceans and seas. *Org. Geochem.* 4: 63-77
241. Preston, C.M., Riepmeester, J.A., 1982. Application of solution and solid-state <sup>13</sup>C NMR to four organic soils, their humic acids fulvic acids, humins and hydrolysis residues. *Can. J. Spectroscopy* 27: 99-105
242. Preston, C.M., Schnitzer, M., Ripmeester, J.A., 1989. A spectroscopic and chemical investigation on the deashing of a humin. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53: 1142-1147
243. Pulchan, K., Abrajano, T.A., Helleur, R.J., 1997. Characterization of tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis products of near-shore marine sediments using gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/combustion/ isotope ratio mass spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 42: 135-150

244. Quéneá, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, Mariotti, A., 2005. Spectroscopic and pyrolytic features and abundance of the macromolecular refractory fraction in a sandy acid forest soil (Landes de Gascogne, France). *Org. Geochem.* 36: 349-362
245. Robinson S.A., Hesselbo, S.P., 2004. Fossil-wood carbon-isotope stratigraphy of the non-marine Wealden Group (Lower Cretaceous, southern England), *J. of the Geol. Soc. (London)* 161: 133-145
246. Rose, N.L., 1990. A method for the extraction of carbonaceous particles from lake sediment. *J. Paleolimnology* 3: 45-53
247. Ross, A.B., Junyapoon, S., Jones, J.M., Williams A., Bartl, K.D., 2005. A study of different soots using pyrolysis-GC-MS and comparison with solvent extractable material, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 74: 494-501
248. Saiz-Jimenez, C., 1994. Analytical pyrolysis of humic substances: pitfalls, limitations and possible solutions. *Env. Sci. Tech.* 28: 1773-1780
249. Saiz-Jiménez, C., de Leeuw, J.W., 1986a. Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 9: 99-119
250. Saiz-Jimenez, C., de Leeuw, J.W., 1986b. Lignin pyrolysis products, their structures and their significance as biomarkers. *Org. Geochem.* 10: 869-876
251. Saiz-Jiménez, C., de Leeuw, J.W., 1987. Nature of plant components identified in soil humic acids. *Sci. Total Environ.* 62: 115-119
252. Saiz-Jimenez, C., Hermosin, B., Guggenberger, G., Zech, W., 1996. Land use effects on the composition of organic matter in soil particle size separates: III. Analytical pyrolysis. *Europ. J. of Soil Sci.* 47:61-69
253. Saldariaga, J.G., West, D.C., 1986. Holocene fires in the northern Amazon Basin. *Quat. Res.* 26: 358-366
254. Sanford, R.L., Saldariaga, J., Clarck, K.E., Uhl, C., Herrera, R., Amazon rain-forest fires, *Science* 227: 53-55
255. Sarmiento, J.L., Hughes, T.M.C., Stouffer, R.J. y Manabe, S. 1998. Simulated response of the ocean carbon cycle to anthropogenic climate warming. *Nature* 393: 245-249
256. Schauer, J.J., Mader, B.T., Deminter, J.T., Heidemann, G., Bae, M.S. Seinfeld, J.H., Flagan, R.C., Cary, R.A., Smith, D., Huebert, B.J., Bertram, T., Howell, S., Kline, J.T., Quinn, P., Bates, T., Turpin, B., Lim, H.Z., Yu, J.Z., Yang, H., Keywood, M.D., 2003. ACE-Asia intercomparison of a thermal-optical method for the determination of particle-phase organic and elemental carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37: 993-1001

257. Schimel, D., Melillo, J., Tian, H., McGuire, A.D., Kicklighter, D., Kittel, T., Rosembloom N., Running, S., Thornton, P., Ojima, D., Parton, W., Kelly, R., Sykes, M., Neilson, R., Rizzo, B. 2000. Contribution of increasing CO<sub>2</sub> and climate to carbon storage by ecosystems in the United States. *Science* 287: 2004-2006
258. Schmidt, M., Knicker, H., Hatcher, P., Kögel-Knabner, I., 1997. Improvement of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with 10% hydrofluoric acid. *Eur. J. of Soil Sci.* 48: 319-328
259. Schmidt, M.W.I., Skjemstad, J.O., Gehrt, E., Kögel-Knabner, I., 1999. Charred organic carbon in German chernozemic soils. *Europ. J. Soil Sci.* 50: 351-365
260. Schmidt, M.W.I., Noack, A.G., 2000. Black carbon in soils and sediments: analysis, distribution, implications, and current challenges. *Glob. Biogeochem. Cycles* 14 (3):777-793
261. Schmidt, M.W.I., Knicker, H., Hatcher, P.G., Kögel-Knabner, I., 1996. Impact of brown coal dust on the organic matter in particle-size fractions of a mollisol. *Org. Geochem.* 25: 29-39
262. Schmidt, M.W.I., Knicker, H., Hatcher, P.G., Kögel-Knabner, I., 1997. Improvement of <sup>13</sup>C and N<sup>15</sup> CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with hydrofluoric acid (10%). *Europ. J. of Soil Sci.* 48: 319-328
263. Schmidt, M.W.I., Skjemstad, J.O., Czimeczik, C.I., Glaser, B., Prentice, K.M., Gélinas Y. and Kuhlbusch, T.A.J., 2001. Comparative analysis of black carbon in soils, *Glob. Biogeochem. Cycles.* 15 (1): 163-167
264. Schmidt, M.W.I., Skjemstad, J.O., Gehrt, E., Kögel-Knabner, I., 1999. Charred organic carbon in German chernozemic soils. *Europ. J. of Soil Sci.* 50: 351-365
265. Schulten, H.R., Gleixner, G., 1999. Analytical pyrolysis of humic substances and dissolved organic matter in aquatic systems: structure and origin. *Water Res.* 33: 2489-2498
266. Schulten, H.R., Schitzer, M., 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften* 80: 29-30
267. Schulten, H.R., Sorge, C., 1995. Structural studies on soil nitrogen by Curie-point pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry with nitrogen-selective detection. *Biol. Fertil. Soils* 20: 174-184
268. Schultz, E., 1993. Size-fractionated measurement of coarse black carbon particles in deposition samples, *Atmos. Environ. Part A* 27: 1241-1249

269. Sigleo, A.C., 1978. Organic geochemistry of silicified wood, Petrified Forest National Park, Arizona. *Geochim. Cosmochim. Acta* 42: 1397-1405
270. Silliman, J.E., Meyers, P.A., Bourbonniere, R.A., 1996. Record of postglacial organic matter delivery and burial in sediments of Lake Ontario. *Org. Geochem.* 24: 463–472
271. Simpson, A.J., Kingery, W.L., Hayes, M.H.B., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Godejohann, N., Hofmann, M., 2002. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* 89: 84-88
272. Simpson, M., Hatcher, P.G., 2004. Determination of Black Carbon in natural organic matter by chemical oxidation and solid-state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Org. Geochem.* 35: 923-935
273. Simpson, M.J., Chefetz, B., Deshmukh, A.P., Hatcher, P.G., 2005. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon distributions and sedimentary organic matter characteristics in contaminated, coastal sediments from Pensacola Bay, Florida. *Mar. Env. Research* 59: 139-163
274. Skjemstad, J.O., Clarke, P., Golchin, A., Oades, J.M., 1997. Characterization of soil organic matter by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *En Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. Vol. 20* (Eds) Cadisch, G, Giller, K. E., CAB. International. Wallingford. UK. 253-271
275. Skjemstad, J.O., Clarke, P., Taylor, J.A., Oades, J.M., Newman, R.H., 1994. The removal of magnetic materials from surface soils. A solid-state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS N.M.R. study. *Aust. J. Soil Res.* 32: 1215-1229
276. Skjemstad, J.O., Clarke, P., Taylor, J.A., Oades, J.M., McClure, S.G., 1996. The chemistry and nature of protected carbon in soil, *Aust. J. Soil Res.* 34:251-271
277. Skjemstad, J.O., Janik, L.J., Head, M.J., MacClure, S.G., 1993. High energy ultraviolet photo-oxidation: a novel technique for studying physically protected organic matter in clay- and silt-sized aggregates. *J. Soil. Sci.* 44: 485-499
278. Skjemstad, J.O., Taylor, J.A. Smernik, R.J., 1999. Estimation of charcoal (char) in soils. *Commun. Soil Sci. Plan*, 30: 2283-2298
279. Skjemstad, J.O., Waters, A.G., Hanna, J.V., Oades, J.M., 1992. Genesis of podzols on coastal dunes in southern Queensland: IV. Nature of the organic fraction as seen by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Aust. J. Soil Res.* 30: 667-681
280. Smernik, R.J., Oades, J.M., 2001. Background signal in solid state C-13 NMR spectra of soil organic matter (SOM) – quantification and minimization. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 20: 74-84

281. Smith D.M., Griffin J.J., Goldberg E.D., 1973. Elemental carbon in marine sediments: a baseline study for burning. *Nature* 241: 268-270
282. Smith, D.W., Griffin J.J., Goldberg, E.D., 1975. A spectroscopic method for the quantitative determination of elemental carbon, *Anal. Chem.* 47:233-238
283. Somoza, L., de Andres, J.R., Rey, J., Hernandez-Molina, J., Rodriguez-Vidal, J., Clemente, L., Rodriguez-Ramirez, A. & Diaz-del-Rio, V., 1994. Morpho-depositional evolution of the Cadiz Gulf continental shelf: Golca project. Proceedings del 1<sup>er</sup> Simpósio Sobre A Margem Continental Ibérica Atlántica, Lisboa, Portugal
284. Song, J., Peng, P., Huang, W., 2002. Black carbon and kerogen in soils and sediments. 1. Quantification and characterization, *Environ. Sci. Technol.* 36: 3960-3967
285. Sorge, C., Schnitzer, M., Leinweber, P., Schulten, H.R., 1994. Molecular –chemical composition of organic matter in whole soil and particle –size fractions of a Spodosol by pyrolysis- field ionization mass spectrometry. *Soil Science* 158: 189-203
286. Stankiewicz, B.A., van Bergen, P.F., Duncan, I.J., Carter, J.F., Briggs, D.E.G., Evershed, R., 1996. Recognition of chitin and proteins in invertebrate cuticles using analytical pyrolysis/gas chromatography and pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.* 10: 1747-1757
287. Stern N., 2006. Review on the Economics of Climate Change. Informe del Tesoro del Gobierno del Reino Unido. (<http://www.hm-treasury.gov.uk>)
288. Stout, S.A., Boon, J.J. and Spackman, W., 1988. Molecular aspects of the peatification and early coalification of angiosperm and gymnosperm woods. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 52: 405-414
289. Stuczynski, T.I., Mccarty, G.W., Reeves, J.B., Wright, J., 1997. Use of pyrolysis GC/MS for assessing changes in soil organic matter quality. *Soil Science* 162: 97-105
290. Sundquist, E. 1993. The global carbon dioxide budget. *Science* 259: 934.
291. Tanhua T., Olsson, A.K., Jeansson, E., 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences, advance online publication. doi:10.1073/pnas.0606574104
292. Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., Saiz-Jiménez, C., 1989b. Possible origin of aliphatic moieties in humic substances. *Sci. Total Environ.* 81/82: 1-17



293. Templier, J., Derenne, S., Croué, J.P., Largeau, C., 2005. Comparative study of two fractions of riverine dissolved organic matter using various analytical pyrolytic methods and a  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR approach. *Org. Geochem.* 36: 1418-1442
294. Thompson, R., Oldfield, F., 1986. *Environmental Magnetism*. Allen and Unwin (Eds), Winchester, Mass.
295. Tissot, B., Welte, D.H., 1984. *Petroleum Formation and Occurrence* (2<sup>nd</sup> Edition). Springer Verlag, Berlin. p. 699
296. Tsuge, S., Matsubara, H., 1985. High-resolution pyrolysis-gas chromatography of proteins and related materials. *J. of Anal. and Appl. Pyrol.* 8: 49-64
297. USDE, 1999. *Carbon Sequestration, Research and Development*. Report for US Department of Energy (12/99), Office of Science. Office of Fossil Energy
298. Uzaki, M., Ishiwatari, R., 1986. Carbohydrates in the sediment of lake Yunoko: Vertical distribution and implication to their origin. *Japan J. Limn.* 47: 257-267
299. Van Der Kaaden, A., Haverkamp, J., Boon, J.J., De Leuw, J.W., 1983. Analytical pyrolysis of carbohydrates I. Chemical interpretation of matrix influences on pyrolysis-mass spectra of amylose using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Anal. and Appl. Pyrol.* 5: 199-220
300. Van Smeerdijk, D.G., Boon, J.J., 1987. Characterisation of subfossil Sphagnum leaves, rootlets of ericaceae and their peat by pyrolysis-high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Anal. and Appl. Pyrol.* 11: 377-402
301. Venkatesan, M.I., Dahl, J., 1989. Organic geochemical evidence for global fires at the Cretaceous/Tertiary boundary. *Nature*, 338: 57-60
302. Verardo, D.J., 1997. Charcoal analysis in marine sediment, *Limnol Oceanogr.* 42: 192-197
303. Verardo, D., Ruddiman, W., 1996. Late Pleistocene charcoal in Tropical Atlantic deep-sea sediments: climate and geochemical significance. *Geology* 24: 855-857
304. Volkman, J.K., Johns, R.B., Gillan, F.T., Perry, G.J., Bavor Jr, H.J., 1980b. Microbial lipids of an intertidal sediment –I. Fatty acids and hydrocarbons. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44: 1133-1143
305. Whiticar, M.J., 1996. Stable isotope geochemistry of coals, humic kerogens and related natural gases, *Int. J. of Coal Geol.* 32:191-215
306. Wignall, P.B., Twitchett, R.J., 1996. Oceanic anoxia and the end Permian mass extinction, *Science* 272: 1155-1158

307. Wignall, P.B., Twitchett, R.J., 2002. Extent, duration and nature of the Permian–Triassic superanoxic event. In: C. Koeberl and K.G. MacLeod, Editors, *Catastrophic Events and Mass Extinctions: Impacts and Beyond*, GSA Special Paper 356: 395-413
308. Wik, M., Renberg, I., 1987. Distribution of forest soils of carbonaceous particles from fossil fuel combustions. *Water Air Soil Pollut.* 33: 125-129
309. Wilson, M.A., 1987. *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry*. Pergamon Press. New York
310. Winkler, M.G., 1985. Charcoal analysis for palaeoenvironmental interpretation: A chemical assay. *Quat. Res.* 23: 313-326
311. Winkler, M.G., 1994. Sensing plant community and climate change by charcoal-isotope analysis. *Ecoscience* 1: 340-345
312. Wolbach, W.S., Anders, E., 1989. Elemental carbon in sediments: determination and isotopic analysis in the presence of kerogen. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53: 1637-1647
313. Zang, X., Nguyen, R.T., Harvey, H.R., Knicker, H., Hatcher, P.G., 2001. Preservation of proteinaceous material during the degradation of the green alga *Botryococcus braunii*: A solid-state 2D  $^{15}\text{N}$   $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy study. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65: 3299-3305
314. Zang, X., Hatcher, P.G., 2002. A Py–GC–MS and NMR spectroscopy study of organic nitrogen in Mangrove Lake sediments. *Org. Geochem.* 33: 201-211
315. Zegouagh, Y., Derenne, S., Largeau, C., Bertrand, P., Sicre, M.A., Saliot, A., Rousseau, B., 1999. Refractory organic matter in sediments from the North-West upwelling system: abundance, chemical structure and origin. *Org. Geochem.* 30: 101-117
316. Zhang, H., 1993. The analysis of organic constituents in leaves by pyrolysis-gas chromatography and its application to selected environmental effects on plants. M.Sc. Thesis, University of Newfoundland. Canada
317. Zsolnay, A., 1991. Pyrolysis-mass spectrometry and multivariate data analysis of Venezuela Basin sediments. *Chem. Geol.* 92: 355-362



