

PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE ABSORCIÓN POR MATERIA ORGÁNICA CROMOFÓRICA DISUELTA (CDOM) POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Katherine Bombi Haedo¹ y Fernanda Maciel²

¹Sección Limnología, Facultad de Ciencias, UdelaR,

²IMFIA, Facultad de Ingeniería, UdelaR

Junio de 2021

INTRODUCCIÓN

Para los propósitos de este protocolo, "CDOM" se define operativamente como material que pasa a través de un filtro con un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 μm y absorbe luz en longitudes de onda superiores a 250 nm. Este material está compuesto predominantemente por moléculas orgánicas (de ahí la nomenclatura CDOM). La característica principal de los espectros de absorción CDOM típicos es una disminución aproximadamente exponencial con el aumento de la longitud de onda. La absorción a 300 nm puede ser un factor cincuenta más alta que a 500 nm. El protocolo se adapta del documento elaborado por Mannino et al. 2019.

MATERIALES Y EQUIPAMIENTO

- Botellas de vidrio ámbar con tapas revestidas de teflón o botellas de plástico opaco¹.
- Filtros de fibra de vidrio tipo GF/C o GF/F de 47 mm de diámetro.
- Sistema de filtración por vacío con portafiltro para filtros de 47 mm de diámetro.
- Jeringa de 5-10 ml (puede ser mayor).
- Portafiltro y filtros de Nylon² para jeringas de 0,22 μm de tamaño efectivo de poro.

¹ Ver Sección 1.1 por especificaciones del material de las botellas de muestreo.

² Otros materiales de filtro que pueden ser utilizados: PES, GHP (*Hydrophilic Polypropylene*) y policarbonato.

- Cubetas de cuarzo³ y/o borosilicato⁴ de paso óptico 1 a 10 cm⁵.
- Espectrofotómetro con rango de longitud de hasta 800 nm, resolución de 1 nm, definición igual o mayor a 0,0001 unidades de absorbancia y capacidad para celdas con un trayecto óptico de 1 a 10 cm.
- Agua destilada.
- Papel absorbente.

PROCEDIMIENTO

Al medir trazas orgánicas, es necesario minimizar la contaminación orgánica de las muestras durante todo el proceso de recolección y medición. Es deseable preparar blancos de agua ultrapura durante el procedimiento para monitorear la contaminación potencial a través de cada paso del procedimiento de muestreo⁶, filtración y almacenamiento, para lograr una cuantificación de incertidumbre de extremo a extremo.

1. – Previo al análisis (muestreo)

1.1 – Preparación del material

Las botellas de muestra que se utilizan para recolectar muestras de CDOM o para almacenar agua de referencia estándar ultrapura deben limpiarse a fondo para eliminar cualquier posible contaminante orgánico o de partículas. El procedimiento recomendado de limpieza de la botella y la tapa implica remojos y enjuagues secuenciales en detergente diluido, agua purificada (desionizada Tipo II) y, cuando sea posible, HCl al 10%, seguidos

³ Rango óptico óptimo de 190 a 2500 nm. Se deben usar cubetas de cuarzo si la longitud de onda mínima de barrido es menor a 340 nm.

⁴ Rango óptico óptimo de 340 a 2500 nm.

⁵ La longitud de trayectoria particular requerida depende de la señal de absorbancia bruta de la muestra en comparación con el límite de detección y el rango dinámico lineal del espectrofotómetro. Consideraciones a tener en cuenta:

- Las muestras de agua que tienen un color visible para el ojo humano probablemente requerirán una cubeta de 1 cm o 5 cm para su análisis con un espectrofotómetro de barrido.
- Las muestras de agua oceánica posiblemente requerirán celdas de 10 cm de longitud de trayectoria.
- Inspeccione el escaneo dentro de la región de 650-700 nm. El valor de absorbancia debe estar dentro del umbral de ruido del instrumento (el ruido puede asociarse con las fluctuaciones en la medición del blanco). Si el valor no alcanza el umbral (típicamente dentro de ± 0.0010 UA), la muestra debe prepararse nuevamente para escanear.

⁶ La preparación de blancos durante el muestreo cobra mayor importancia para la medición en ambientes con bajos o muy bajos contenidos de materia orgánica (por ej. aguas oceánicas).

de enjuagues copiosos finales con agua ultrapura (5 o más enjuagues). Se recomienda el uso de botellas de vidrio ámbar con tapas revestidas de teflón. Se pueden usar botellas alternativas, pero deben evaluarse antes de su uso para cada aplicación específica (por ejemplo, agua oligotrófica del océano, agua de río, etc.)⁷. Para el caso de agua de río se comprobó que botellas blancas de plástico opacas no alteran las lecturas de las muestras.

1.2 – Muestreo

Las botellas de muestra deben enjuagarse tres veces *in situ* con el agua de muestreo antes de su llenado. Se deben recolectar muestras por triplicado.

2. – Análisis de CDOM en laboratorio

2.1 – Prefiltrado y acondicionamiento de las muestras

Una vez en el laboratorio, las muestras deben prefiltrarse por vacío, por filtros GF/C o GF/F (tamaño de poro de 0,7 μm)⁸. El tiempo entre la toma de la muestra y el filtrado debe ser el menor posible, ya que el impacto en los coeficientes de absorción de CDOM por retrasos en la filtración podría ser importantes. El aparato de filtrado debe ser lavado con detergente diluido y enjuagado varias veces con agua destilada antes de cada muestra (no es necesario entre réplicas), para evitar la contaminación. Los filtrados de cada muestra (y cada réplica) deben recolectarse en botellas de vidrio ámbar (o del material alternativo definido) limpias (ver Sección 1.1). Estas botellas deben enjuagarse con la muestra (o réplica) filtrada tres veces antes de llenarlas.

Antes de la filtración y después de la instalación en el aparato de filtración, los filtros deben enjuagarse primero con agua ultrapura y luego con la muestra. Se recomienda un volumen total mínimo de enjuague de 150 a 200 ml para filtros de disco de 47 mm de diámetro. El agua de enjuague de los filtros debe desecharse antes de la filtración de las réplicas. El filtro debe cambiarse y repetirse el enjuague entre muestras.

⁷ Se comprobó que botellas de plástico blanco opaco (no transparente) no afectan la lectura de muestras de agua de río (ensayo realizado con muestras del Río de la Plata en la zona de Punta del Tigre con valores de absorbancia en el orden de 0.03 a 350 nm).

⁸ El prefiltrado no es necesario para muestras con bajo contenido de material en suspensión. Es necesario típicamente para muestras de ríos, estuarios y embalses para evitar la casi inmediata saturación de los filtros de $\sim 0,2 \mu\text{m}$.

Las muestras filtradas que no sean medidas inmediatamente deben almacenarse en la oscuridad en frascos sellados a $\sim 4^{\circ}\text{C}$, y analizarse lo antes posible, preferiblemente dentro de las 4 a 24 horas, pero no después de los 6 meses posteriores a la recolección.

2.2 – Filtrado y medición de la absorbancia

Todas las muestras, blancos y material de referencia deben equilibrarse a una temperatura ambiente constante ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) antes del análisis. La estabilidad de la temperatura ambiente y la diferencia de temperatura entre la muestra y el blanco de agua de referencia son los factores críticos, ya que podrían afectar la lectura.

El agua ultrapura sirve como blanco de agua de referencia estándar en el análisis de absorción CDOM, y ésta también debe filtrarse (por $\sim 0,2\ \mu\text{m}$) antes de su uso.

A continuación, se detallan los pasos a seguir para la medición del CDOM por espectrofotometría:

1. Encienda el espectrofotómetro de doble haz para calentar y estabilizar durante 1 hora, o no menos de media hora.
2. Durante el período de estabilización, es necesario preparar el material y las muestras, verificando que tanto éstas como el blanco estén a temperatura ambiente.
3. Configure el espectrofotómetro con las siguientes especificaciones:
 - a. Abra el *software* VISIONLITE 4.0 y seleccione la opción “Scan” en la pantalla inicial.
 - b. Seleccione el método “CDOM”
 - c. En la opción “Rango”, verifique que esté “350” (o “250”)⁹ como mínimo y “800” como máximo.
 - d. Intervalo de escaneo: 1 nm
 - e. Velocidad de escaneo: lenta
4. Enjuague la jeringa, el filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ y la cubeta con agua ultrapura. Descarte toda el agua del enjuague.
5. Cargue nuevamente la jeringa con agua ultrapura y filtre, esta vez llenando la cubeta. Inspeccione el contenido de la cubeta en busca de partículas y burbujas o microburbujas. Si observa alguna de estas, deseche el contenido y vuelva a llenar la cubeta.
6. Lleve la cubeta al espectrofotómetro y marque en el *software* “Línea de base”.
7. Una vez realizada la línea de base, utilice esa misma cubeta de agua ultrapura filtrada para correrla como un blanco (blanco cero).
8. Deseche el agua en la cubeta, agite suavemente para eliminar toda el agua.

⁹ Si se selecciona 250 las cubetas deben ser de cuarzo. Si se selecciona 350 las cubetas pueden ser alternativamente de borosilicato. El rango a seleccionar depende de la aplicación (por ej. para calibración/validación de aplicaciones típicas de teledetección la medición en el rango visible $>350\ \text{nm}$ es suficiente). Como buena práctica es recomendable abarcar el mayor rango posible (de 250 a 800 nm), siempre que se cuente con cubetas de material adecuado (cuarzo). Sin embargo, se debe tener presente que para el rango UV ($<350\ \text{nm}$), Mannino et al. (2019) reportan mayor contaminación de los propios filtros.

9. Enjuague la jeringa con la muestra prefiltrada. Filtrar la muestra por el filtro de jeringa (~0,2 μm) y utilizarla para enjuagar la cubeta al menos tres veces antes de llenarla.
10. Verifique la presencia de microburbujas mirando la muestra en la cubeta a contraluz. En caso que se detecten se debe desechar el agua de la cubeta y volver a llenarla.
11. Realice el barrido en el espectrofotómetro.
12. Exporte los datos del barrido siguiendo en el *software*: Archivo > guardar espectro como (seleccione *csv* y guarde con el nombre de la muestra).
13. En caso de que solo se cuente con trayecto óptico de 1 cm para muestras que no presentan claro color al ojo humano es conveniente repetir al menos dos veces el filtrado y barrido de esta misma muestra¹⁰ (no es necesario el enjuague) y utilizar una única cubeta o alternar entre dos cubetas y medir blancos en ambas (ver punto 16.).
14. Repita el procedimiento detallado en los puntos 9. a 13. para cada réplica del muestreo. Cambie el filtro si detecta saturación del mismo.
15. Repita el procedimiento detallado en los puntos 9. a 14. para cada muestra (con su set de réplicas) que se vaya a analizar. Recuerde utilizar un filtro nuevo para cada muestra.
16. Correr al menos un blanco (agua ultrapura filtrada por ~0,2 μm) en cada cubeta utilizada entre muestras y al final de todas las lecturas¹¹. Enjuagar la jeringa y cubetas abundantemente con agua ultrapura antes de la medición de cada blanco. Realizar el procedimiento de enjuague detallado en los puntos 4. y 5. Recuerde utilizar un filtro nuevo para los blancos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los softwares de los espectrofotómetros típicamente exportan los datos en absorbancia decadal (A) en unidades adimensionales (UA; también referida como densidad óptica) definida como:

$$A(\lambda) = \log_{10}([I(\lambda) - DC(\lambda)]/[I_0(\lambda)] - DC(\lambda)),$$

donde I e I_0 son la intensidad de luz en el detector (en *counts* o volts) para la longitud de onda λ , DC son los *dark counts*. Los valores de absorbancia deben ser reportados con un mínimo de cuatro dígitos decimales.

La absorbancia adimensional A se convierte a valores de coeficiente de absorción lineal (*a*) en unidades de m^{-1} con la siguiente expresión:

$$a(\lambda) = \ln(10) * \frac{A(\lambda)}{l},$$

donde *l* es el trayecto óptico en m (para cubetas de 1 cm, $l=0.01$ m).

¹⁰ El posterior promedio de las lecturas disminuye su incertidumbre.

¹¹ La lectura de blancos permite evaluar la estabilidad del equipo durante las mediciones y cuantificar su nivel de ruido.

El valor de a se debe reportar con tres dígitos decimales. Restar a cada lectura el promedio de los blancos medidos¹²:

$$a_i(\lambda) = a_{ic}(\lambda) - \bar{a}_b(\lambda),$$

donde el subíndice i indica la lectura de cada réplica (y repetición de réplicas, ver punto 13. en la Sección 2.2) para una muestra, el subíndice c indica la medición cruda (antes de la resta del blanco) y $\bar{a}_b(\lambda)$ indica el promedio de las lecturas de los blancos para cada longitud de onda. Finalmente, para cada λ de interés se debe reportar el promedio ($\bar{a}_i(\lambda)$) y desviación estándar ($\Delta a_i(\lambda)$).

Por otro lado, para determinar el coeficiente de decaimiento espectral (S) se debe ajustar una única curva exponencial no lineal a $\bar{a}_i(\lambda)$:

$$\bar{a}_i(\lambda) = \bar{a}_i(\lambda_0) * e^{-S(\lambda-\lambda_0)},$$

donde λ_0 es una longitud de onda de referencia. Se aconseja realizar el ajuste sin fijar el valor para λ_0 y ponderar los datos por su incertidumbre ($1/\Delta a_i(\lambda)$). El valor de S se reporta en nm^{-1} y se debe reportar el rango de longitudes de onda que se utilizó para el ajuste (por ejemplo 275-295, 350-400, 300-600, **350-700** nm).

BIBLIOGRAFÍA

Mannino, A., M. G. Novak, N. B. Nelson, M. Belz, J. F. Berthon, N. V. Blough, E. Boss, A. Bricaud, J. Chaves, C. Del Castillo, R. Del Vecchio, E. J. D'Sa, S. Freeman, A. Matsuoka, R. L. Miller, A. R. Neeley, R. Röttgers, M. Tzortziou, and P. J. Werdell (2019). Measurement protocol of absorption by chromophoric dissolved organic matter (CDOM) and other dissolved materials, In *Inherent Optical Property Measurements and Protocols: Absorption Coefficient*, Mannino, A. and Novak, M. G. (eds.), *IOCCG Ocean Optics and Biogeochemistry Protocols for Satellite Ocean Colour Sensor Validation*, IOCCG, Dartmouth, NS, Canada.

¹² Esto mejora los resultados cuando el espectrofotómetro utiliza distintas celdas (tambor rotativo) entre la línea de base y la medición de las muestras, especialmente si el trayecto óptico utilizado es de 1 cm para muestras que no presentan claro color al ojo humano.