

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA**



**“DETERMINACIÓN DE LOS PALEOTERMÓMETROS Sr/Ca Y Mg/Ca EN UNA
MUESTRA DE CORAL *MONTASTRAEA ANNULARIS* UTILIZANDO
ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER (LIBS)”**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Joseph Alberto
Hernández Navarro, para optar al
título de Licenciado en Química.

Caracas, Octubre de 2016

Nosotros, **Manuel Caetano y Vincent Piscitelli**, Profesores-Investigadores del Centro de Físico Química de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

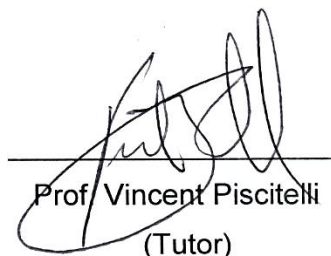
“DETERMINACION DE LOS PALEOTERMÓMETROS Sr/Ca Y Mg/Ca EN UNA MUESTRA DE CORAL *MONTASTRAEA ANNULARIS* UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER (LIBS)”

Que presenta el Br. **Joseph Alberto Hernández Navarro**, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Espectroscopía Láser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante el año 2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Octubre de 2016.



Prof. Manuel Caetano
(Tutor)

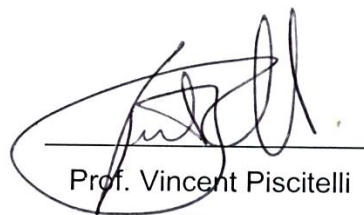


Prof. Vincent Piscitelli
(Tutor)

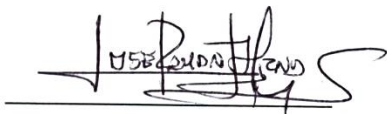
Los abajo firmantes asignado por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **"Determinación de los paleotermómetros Sr/Ca y Mg/Ca en una muestra de coral *Montastraea annularis* utilizando Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS)"**, presentado por el Br. Joseph Alberto Hernández Navarro, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química



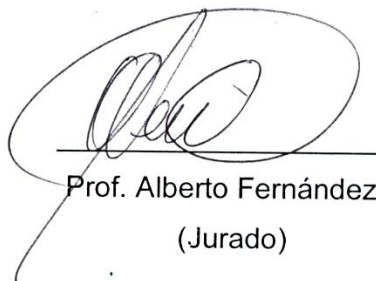
Prof. Manuel Caetano
(Tutor)



Prof. Vincent Piscitelli
(Tutor)



Prof. José Chirinos
(Jurado)



Prof. Alberto Fernández
(Jurado)

DEDICATORIA

Para mi madre y hermano,
con perseverancia y dedicación
se pueden lograr las metas
propuestas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por ser mi guía, por darme salud y fortaleza para seguir adelante con mi carrera y culminarla a pesar de los tantos inconvenientes que surgieron. A mi madre, te agradezco por todas tus palabras de apoyo incondicional, amor, educación, como también de hacer posible todo lo que pudo estar en tus manos para que pudiera cumplir una de mis metas. A mi novia, por tu apoyo incondicional en momentos difíciles, por estar en momentos de alegría y de tristeza, por tus palabras de aliento y por tu amor en estos años juntos. A mi padre, por apoyarme hasta lograr estudiar en la universidad que en mi infancia me enseñó a nadar y que además agradezco enormemente, la Universidad Central de Venezuela. A mi prima y segunda profesora, que desde temprana edad me educó e impulsó mis primeros pasos en esta gran universidad.

A mi tutores, los profesores Manuel Caetano y Vincent Piscitelli, por su atención, dedicación y educación durante la realización de este trabajo y cuando tuve la gran oportunidad de Físico Química I y el Laboratorio de Físico Química cuando ellos la dictaron, respectivamente; y sin sus asesorías este trabajo no hubiera sido posible. A la profesora Lola De Lima, por su asesoramiento, consejos y disposición. A la profesora Estrella Villamizar por la enseñanza sobre corales, como también su disposición y gran interés en ayudarme en culminar este trabajo.

Por último y no menos importante, al componente docente del Laboratorio de Espectroscopía Láser y al Centro de Química Analítica, por su disposición y colaboración en cuanto a asesoramiento, como también en materiales y equipos necesarios para la culminación de este trabajo. A la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) por su gran disposición para proporcionar las Temperaturas Superficiales del Océano (TSO) tan esenciales en esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. Cambio Climático y la Paleoclimatología.	11
2.2. Corales.....	13
2.3. Parámetros paleoclimatológicos en corales.	15
2.4. Antecedentes de estudios de relaciones Paleotermométricas.	18
2.5. Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS).	23
2.5.1. Ablación por Láser.....	23
2.5.2. Plasma Inducido por Láser.	25
2.5.3. Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS).	26
2.5.4. Instrumental LIBS.	29
2.5.5. Variables que afectan el análisis LIBS.....	30
2.5.6. Antecedentes del uso de LIBS para el análisis de relaciones paleotermométricas.....	34
2.6. Análisis Multivariado. Superficies de Respuesta.....	35
2.6.1. Modelos de Segundo Orden.....	36
2.6.2. Diseños para ajustar modelos de segundo orden.....	36
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo General	40
3.2. Objetivos Específicos	40

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	41
4.1. Instrumentación.....	41
4.2. Muestreo.....	45
4.3. Pre-tratamiento de la muestra de coral.....	46
4.4. Preparación de estándares multielementales sólidos.....	48
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	49
5.1. Selección de las líneas de emisión.....	49
5.2. Optimización de las variables experimentales.....	51
5.3. Curvas de calibración.....	60
5.4. Análisis del espécimen <i>Montastraea annularis</i>	67
6. CONCLUSIONES	76
7. BIBLIOGRAFÍA	77
8. APÉNDICES	81
8.1. Gráficas de Barrido de condiciones.....	81
8.2. Código R utilizado para análisis de espectros LIBS.....	84
8.3. Código R utilizado para el análisis del Método de Superficie de Respuesta (MSR).....	90
8.4. Masas pesadas en la elaboración de los patrones multielementales.....	93
8.5. Curvas de calibración.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.2.1. Imagen de Rayos X del núcleo de un coral <i>Monstastreaea</i> proveniente Florida, Estados Unidos, donde se muestran las bandas de crecimiento anuales en el esqueleto calcáreo [19].	16
Figura 2.3.1. Ciclos anuales y su correspondencia con la relación de los metales Mg/Ca (a) y Sr/Ca (b) presentes en el coral y la Temperatura Superficial Oceánica, TSO, de un espécimen de <i>Porites lutea</i> [5].	17
Figura 2.5.1.1. Ablación por Láser. Remoción de una pequeña cantidad de masa por incidencia de un Láser Pulsado de alta energía [26]......	24
Figura 2.5.1.2. Fotografías de plasmas inducidos por láser de una muestra sólida (izquierda), líquida (central) y gaseosa (derecha) [28].	25
Figura 2.5.2.1. Iniciación y expansión de un plasma de alta temperatura (>15.000K) en función del tiempo [29].	26
Figura 2.5.3.1. Esquema del proceso de Plasma inducido por Láser sobre una muestra sólida. a) Absorción de la energía del láser pulsado por el sólido. b) Ablación de la muestra. c) Formación de un plasma por ionización del vapor de la muestra. d) Formación de emisión característica de los elementos en la muestra luego de 1 μ s del pulso de láser [30].	27
Figura 2.5.3.2. Espectros de LIBS a distintos tiempos de demora (t_d) [31].	28
Figura 2.5.3.3. Micrografía de un “cráter” formado por ablación con láser en una superficie de cobre con el uso de un pulso de 30 ps de un láser Nd:YAG a $\lambda = 1064$ nm [26].	29
Figura 2.5.4.1. Instrumentación básica para análisis por LIBS [28]......	30

Figura 2.6.3.1. Diseño Central Compuesto: a) $k = 2$, b) $k = 3$. Los puntos azules pertenecen al diseño factorial 2^k y los puntos rojos al diseño estrella.....	37
Figura 4.1.1. Diagrama de Equipo de LIBS usado [38].	42
Figura 4.1.2. Imágenes de equipo LIBS: a) Fuente y cabeza del láser; b) Sistema de traslación X-Y-Z, óptica para la conducción del haz de láser y para la recolección de la emisión del plasma, y computador; c) Cámara de observación; d) Espectrográfo con revestimiento aislante, sistema de enfriamiento y cámara ICCD.	44
Figura 4.1.3. Caja porta muestra que permitió realizar análisis LIBS a altura constante: a) los trozos de coral; b) los patrones comprimidos multielementales.	45
Figura 4.2.1. Cartografía del Parque Nacional Morrocoy donde se realizó el muestreo [40]......	46
Figura 4.3.1. Secciones del coral muestra y sus bandas de crecimiento marcadas sobre la superficie. Las bandas de crecimiento del coral fueron reveladas bajo Rayos X.	47
Figura 5.2.1. Espectro de sección de coral donde se observan las líneas iónicas de Mg, Ca y Sr. Rango de longitudes de onda: 270-420 nm.	52
Figura 5.2.2. Ampliaciones de espectro de sección de coral donde se observan las líneas iónicas y las zonas usadas para el cálculo de ruido para a) Mg, b) Ca y c) Sr.	53
Figura 5.2.3. Superficies de respuesta obtenidas para las relaciones S/R de Mg/Ca (imágenes superiores) y Sr/Ca (imágenes inferiores) como actividad. En las imágenes de la izquierda, la variable fija fue tiempo de demora (x3); en las imágenes centrales fue ancho de compuerta (x2); y en las imágenes de la derecha fue la ganancia (x1). Los valores de las variables fijas representan las coordenadas codificadas de los puntos estacionarios.	59

Figura 5.3.1. Espectro LIBS del patrón 3 multielemental a 200 ns de tiempo de demora y 4 μ s de ancho de compuerta temporal (condiciones de análisis de la relación Mg/Ca).	63
Figura 5.3.3. Aproximación Lorentziana de las especies utilizadas para los análisis de las relaciones Mg/Ca (figura a y b) y Sr/Ca (figura c y d). Curva del modelo estimado, línea continua; intensidades originales, círculos abiertos.	65
Figura 5.4.1. Imagen de rayos X del espécimen <i>Montastraea annularis</i> con sus respectivas bandas de crecimiento anuales y los años que estas representan.	68
Figura 5.4.2. Espectro LIBS del espécimen <i>Montastraea annularis</i> a 200 ns de tiempo de demora y 4 μ s de ancho de compuerta temporal (condiciones de análisis de la relación Mg/Ca).	71
Figura 5.4.3. Espectro LIBS del espécimen <i>Montastraea annularis</i> a 1000 ns de tiempo de demora y 7 μ s de ancho de compuerta temporal (condiciones de análisis de la relación Sr/Ca).	72
Figura 5.4.4. Regresión Paleotermométrica de la relación metálica Mg/Ca.	75
Figura 5.4.5. Regresión Paleotermométrica de la relación metálica Sr/Ca.	75
Figura 8.1.1. Tendencia en el barrido de la variable de detección tiempo de demora.	81
Figura 8.1.2. Tendencia en el barrido de la variable ancho de compuerta temporal.	82
Figura 8.1.3. Tendencia en el barrido de la variable de detección ganancia.	82
Figura 8.1.4. Tendencia en el barrido de la variable cantidad de pulsos por segundo.	83
Figura 8.1.5. Tendencia en el barrido de la variable velocidad de la base porta muestra.	83
Figura 8.1.6. Tendencia en el barrido de la variable de energía del láser.	84
Figura 8.5.1. Curva de calibración del análisis de la relación metálica Mg/Ca a 100 ns de tiempo de demora y 4 μ s de ancho de compuerta temporal.	94

Figura 8.5.2. Curva de calibración del análisis de la relación metálica Sr/Ca a 1000 ns de tiempo de demora y 7 μ s de ancho de compuerta temporal.95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.6.3.1. Número de puntos experimentales para Diseños Central Compuesto....	38
Tabla 5.1.1. Especies químicas y longitudes de onda (λ) de las correspondientes líneas de emisión identificadas.	49
Tabla 5.2.1. Condiciones experimentales establecidas para cada barrido de variables.	51
Tabla 5.2.2. Secciones del espectro utilizados para el cálculo de la relación S/R para las líneas iónicas de Mg, Ca y Sr.	52
Tabla 5.2.3. Valores óptimos de cada variable experimental obtenido de los barridos de condiciones evaluando la mejor relación S/R para las líneas iónicas de Mg, Ca y Sr.	54
Tabla 5.2.4. Variables codificadas en el Diseño experimental.	57
Tabla 5.2.5. Valores correspondientes a cada variable del Diseño Central Compuesto.	58
Tabla 5.2.6. Puntos estacionarios encontrados por el Método de Superficie de Respuesta (MSR) para las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca.	60
Tabla 5.3.1. Concentraciones de las relaciones metálicas en cada patrón multielemental.	61
Tabla 5.3.2. Condiciones de detección óptimas de cada relación metálica obtenidas de las mejores curvas de calibración con su respectivo coeficiente de determinación, R^2	62
Tabla 5.3.3. Especies químicas y longitudes de onda (λ) de las correspondientes líneas de emisión usadas.	66

Tabla 5.3.4. Parámetros de la regresión lineal de las curvas de calibración de las relaciones metálicas Mg/Ca y Sr/Ca.	66
Tabla 5.4.1. Valores óptimos de cada variable experimental utilizados para el análisis del espécimen <i>Montastraea annularis</i>	67
Tabla 5.4.2. Estadístico del análisis de las relaciones metálicas Mg/Ca en el espécimen <i>Montastraea annularis</i> por cada banda de crecimiento anual.....	69
Tabla 5.4.3. Estadístico del análisis de las relaciones metálicas Sr/Ca en el espécimen <i>Montastraea annularis</i> por cada banda de crecimiento anual.....	70
Tabla 5.4.4. Temperatura Superficial del Océano (TSO) y Concentración correspondiente por año y banda de crecimiento involucradas en la ecuación paleotermométrica de Mg/Ca.	73
Tabla 5.4.5. Temperatura Superficial del Océano (TSO) y Concentración correspondiente por año y banda de crecimiento involucradas en la ecuación paleotermométrica de Sr/Ca.	73
Tabla 5.4.6. Parámetros de las regresiones lineales de las ecuaciones paleotermométricas de Mg/Ca y Sr/Ca.	74
Tabla 8.3.1. Masa pesada de los carbonatos estándar.	93

1. RESUMEN

En este trabajo se determinaron las relaciones metálicas Mg/Ca y Sr/Ca en un espécimen coralino *Montastraea annularis* usando la técnica Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser, LIBS. Los metales alcalinotérreos Mg y Sr disueltos en el océano se incorporan a la estructura coralina en función de la temperatura durante el crecimiento del coral; por lo tanto las relaciones metal/Ca son parámetros que permiten estimar temperaturas, y en conjunto con un análisis esclerocronológico es posible determinar temperaturas del pasado. El espécimen fue muestreado en el arrecife de Playa Mero, Cayo de Animas en el Parque Nacional Morrocoy, Edo. Falcón; se analizaron diez (10) bandas de crecimiento y se determinó que el coral tuvo un crecimiento de (7 ± 1) mm/año, con un rango de crecimiento de 5 a 9 mm/año. El análisis abarcó desde el año 1989 a 1998. Luego, se procedió a obtener las condiciones óptimas de análisis del equipo LIBS mediante un estudio de barrido de condiciones, Método de Superficie de Respuesta (MSR), y mediante la obtención de mejores estadísticos en la elaboración de las curvas de calibración. De esta forma, se obtuvieron que las condiciones óptimas de análisis fueron 2,50 pulsos/s, 0,50 mm/s de la velocidad de la base en el plano horizontal, 26,5 mJ de energía del láser, 150 de ganancia, tiempo de demora de 200 ns para la relación Mg/Ca y 1000 ns para la relación Sr/Ca, y ancho de compuerta de 4 μ s para la relación Mg/Ca y 7 μ s para la relación Sr/Ca. Las líneas de emisión utilizadas para este análisis fueron Mg I (285,213 nm) y Ca II (373,690 nm) para el análisis de la relación Mg/Ca, y Sr I (460,733 nm) y Ca I (445,478 nm) para el análisis de la relación Sr/Ca. Para determinar las concentraciones de las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca se obtuvieron curvas de calibración, de relaciones de área respecto a la concentración de estas relaciones, mediante la elaboración de patrones multielementales comprimidos de sales estándares de MgCO₃, CaCO₃ y SrCO₃. Las concentraciones de los patrones variaron desde 2,5164 a 14,9816 mmol/mol y 5,0001 a 15,0251 mmol/mol para las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca, respectivamente. Se analizaron las bandas de crecimiento

del coral a las condiciones óptimas para cada metal y se obtuvieron concentraciones promedio que variaron en un rango de 6,73-17,42 mmol/mol y 3,61-6,21 mmol/mol, para las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca respectivamente. La precisión del análisis LIBS del coral varió desde 5,46 a 67,46 % para las concentraciones de la relación Mg/Ca; y desde 32,99 a 59,98 % para las concentraciones de la relación Sr/Ca. Esta baja precisión fue debido a la irregularidad de la superficie de esta especie, a la variación de la energía del láser durante el análisis, como también la heterogeneidad de los metales en el coral. Se obtuvieron ecuaciones paleotermométricas para ambas relaciones metálicas; para la relación Mg/Ca: $T (^{\circ}\text{C}) = (0,15579 \pm 0,01712) \text{ Mg/Ca} + (26,02490 \pm 0,17786)$ ($R^2 = 0,9324$); y para la relación Sr/Ca: $T (^{\circ}\text{C}) = (-0,36136 \pm 0,08018) \text{ Sr/Ca} + (29,53717 \pm 0,43979)$ ($R^2 = 0,8025$).

LIBS, Paleoclimatología, Paleotermómetros, Corales, Láser, Carbonatos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cambio Climático y la Paleoclimatología.

Desde la formación del planeta Tierra hace 4.600 millones de años, el clima ha experimentado de forma natural cambios importantes. Sin embargo, a la escala de tiempo de la vida humana, el clima en una zona concreta permanece prácticamente constante [1]. La Organización Meteorológica Mundial (OMM) define el clima como el estado medio de la atmósfera durante un periodo determinado, de meses a años, en temperatura, precipitación, presión atmosférica, insolación y viento. El sistema climático comprende de la atmósfera, los océanos, la criósfera y la biósfera [2]. La actividad humana está produciendo desde el último siglo un incremento sustancial de la concentración de los gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera, provocando un aumento de la temperatura global que está acelerando el proceso de cambio climático. Así lo declaró en el año 2007 el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) en su Cuarto Informe de Evaluación, en el que se afirma que “el calentamiento del sistema climático es inequívoco, como ponen de manifiesto las observaciones de los incrementos en las temperaturas medias del aire y los océanos, la fusión generalizada de hielo y nieve, y el ascenso medio global del nivel del mar”. Este informe también estipula que entre los años 1996-2006 se registraron como unos de los años más calurosos en los registros de la temperatura de superficie instrumentalizados (desde 1850); y además que la tendencia lineal de calentamiento de los últimos 50 años es casi el doble que para los últimos 100 años. Según el mismo informe “la mayor parte del incremento observado desde la mitad del siglo XX en las temperaturas medias, se debe, muy probablemente (con una probabilidad de al menos el 90%), a los aumentos observados en los gases de efecto invernadero antropogénicos”. Esta alteración del clima global es la que recibe actualmente el nombre de Cambio Climático [1].

Un componente importante en el estudio del clima de La Tierra es la búsqueda del entendimiento del Cambio Climático, el cual es el campo de la Paleoclimatología. La Paleoclimatología es el estudio de climas pasados que pueden ser reconstruidos de una gran cantidad de archivos geológicos y biológicos, como sedimentos de lagos y océanos, capas de hielos, corales, anillos de los árboles, y otras fuentes. La Climatología estudia el sistema climático moderno de La Tierra, y tiene mucha relación con la Paleoclimatología, donde en los últimos años cada campo se beneficia uno del otro. La Paleoclimatología tiene subdisciplinas tradicionales como las ciencias geológicas, estratigrafía, geoquímica, glaciología; como también las nuevas subdisciplinas: estudios paleoatmosféricos de testigos de hielo, dendroclimatología (la cual usa anillos de árboles), y escleroclimatología (la cual usa corales trópicos). Los restos orgánicos y procesos biológicos juegan un papel importante tanto en la reconstrucción de los climas del pasado como en la regulación del clima de la Tierra. Por lo tanto, la Paleoclimatología también incorpora aspectos de la evolución orgánica, ecología, y los procesos metabólicos [3].

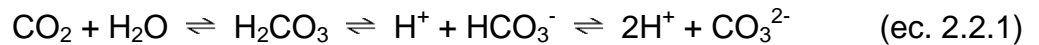
La reconstrucción de la variabilidad climática y ambiental del pasado yace en la tarea fundamental de la búsqueda y obtención de datos que conlleven a resultados de alta resolución. Muchos de estos datos están basados en parámetros geoquímicos, y esta tarea requiere la aplicación de eficientes técnicas analíticas para obtener el registro geológico, paleontológico o arqueológico adecuado [4]. Entre los indicadores utilizados para la investigación de climas pasados de testigos de hielo se encuentran los análisis de gases atrapados en estos, relaciones de isótopos estables en conjunto con sus bandas anuales distintivas; en anillos de árboles, se determina la edad de éste y con el grosor de cada anillo se infieren fluctuaciones en temperatura y precipitación [3]; en corales [5] [6] [7] [8] [9] , esponjas de mar hipercalcificadas [10] y moluscos [4], se determinan relaciones de isótopos estables, relaciones metal/Ca, donde metal= Sr, Mg, U, Cd, Ba, Mn, y así estimar la Temperatura Superficial Oceánica, TSO, a la que estuvo expuesta el ser vivo.

2.2. Corales.

Los corales son tan sensibles al cambio climático que los fósiles de arrecifes son usados para elaborar cronologías muy precisas de las TSO a las que estuvo expuesta durante sus años de vida y reconstruir así climas pasados. Los corales son especies coloniales pertenecientes al reino Animalia, filo Cnidaria y clase Anthozoa y pueden alcanzar grandes dimensiones, dependiendo de la especie de coral (corales pilares alcanzan hasta los 3 m y los corales cerebro hasta 1,8 m de altura), además de formar arrecifes [11]. Los arrecifes de coral son sistemas dinámicos y ecosistemas muy importantes, ya que diversas especies marinas habitan estas colonias, que son encontrados en más de 100 países, y más en regiones tropicales [12]. Los corales se encuentran a profundidades de 15-150 m [3], y el mayor arrecife del planeta es la Gran Barrera de Coral, frente a la costa de Queensland, Australia, y se extiende unos 2.300 Km de longitud [13]. En Venezuela, pueden encontrarse arrecifes de coral, siendo los más importantes los ubicados en el Parque Nacional Morrocoy, Parque Nacional San Esteban, Parque Nacional Archipiélago de Los Roques, Parque Nacional Mochima y Golfo de Cariaco. Además, pueden encontrarse este tipo de ecosistema en las islas Cubagua y Coche, La Tortuga, La Orchila, Isla de Aves, como también en los archipiélagos Las Aves y Los Monjes [14].

Los corales son especies muy importantes en el balance químico de los océanos del mundo. Aproximadamente la mitad del Ca que entra al mar cada año alrededor del mundo es tomado por los arrecifes de coral. Luego, con el CO_2 disuelto en el océano, los corales forman su coraza de CaCO_3 . ¿Qué tanto CO_2 puede estar disuelto en el océano?: depende principalmente de la temperatura y presión. La solubilidad del CO_2 aumenta al disminuir la temperatura, lo cual indica que en aguas más frías hay más CO_2 disuelto. Similarmente, a mayor presión hay más CO_2 en solución. Por esto, las aguas superficiales de los océanos mantienen menos CO_2 en solución que aguas más profundas, como también, las aguas tropicales retienen menos dióxido de carbono que

las aguas polares. Este CO_2 disuelto al hidrolizarse, está en un equilibrio con las especies aniónicas bicarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}), por lo que al estar presente Ca disuelto en el océano, se forma CaCO_3 , el cual también es más soluble en aguas frías [15].



A pesar de que los corales cubren menos de 1% de la superficie de La Tierra, los arrecifes de coral han depositado estructuras de piedra caliza, que son el hogar de un estimado de medio millón a dos millones de especies. La habilidad de los arrecifes de coral para soportar tal producción depende de la relación simbiótica entre los corales y las algas microscópicas, zooxantelas, las cuales viven dentro de los tejidos de los pólipos. Bajo condiciones normales, las zooxantelas realizan el proceso fotosintético y provee compuestos ricos en energía para el coral, proporcionando así más del 90% de los requerimientos energéticos. Para realizar el proceso fotosintético se requiere que el agua donde esté ubicado el arrecife sea clara [15] [16]. Mientras ocurre el proceso fotosintético, como requerimiento, se necesita CO_2 y se produce la precipitación de CaCO_3 , formando así la estructura calcárea de los corales [15].

La perturbación del ecosistema de los arrecifes de coral puede producir factores impredecibles o eventos infrecuentes. La estabilidad de ese ecosistema es regulado por un gran número de agentes, incluido fluctuaciones de salinidad, disponibilidad de nutrientes, interacciones con especies, patógenos, corrientes, patrones de las mareas, temperaturas extremas y eventos climáticos como huracanes. Los huracanes son elementos críticos que desencadenan daño e inclusive mortandad. También son importantes los vientos de tormentas y lluvias fuertes, los cuales pueden generar una caída repentina de la salinidad [16]. La TSO tiene un rol importante en la vida de los arrecifes de coral, debido a que están restringidos a un rango de temperatura del agua entre 18°C y 36°C . Dentro de este rango, ciertos corales crecerán más rápido o más

lento, dependiendo de la temperatura a la que estén sometidas; y un cambio drástico térmico puede resultar hasta en la total destrucción de un sistema de arrecife [17]. Todos estos de eventos desencadenan la interrupción simbiótica entre la zooxantela y el coral; y el alga se degenera en el tejido, o se libera del tejido. Como consecuencia, el coral pierde pigmentación y se observa un esqueleto brillante blanco del coral. Este “blanqueamiento” puede causar la muerte del coral si el evento estresante es severo o persistente. En muchos casos, los eventos de blanqueamiento han causado una mortandad significativa de corales (más del 90% de corales muertos) [16].

Los corales poseen un gran potencial para proveer registros detallados de la TSO. Sus esqueletos preservan largos registros de cambios, ya que estos están continuamente en crecimiento. Además, estos corales exhiben bandas de crecimientos anuales distintivas por Rayos X (Véase Figura 2.2.1.), lo que permite una supervisión temporal precisa orientada para un análisis químico anual y subanual [5] [6] [7] [9].

2.3. Parámetros paleoclimatológicos en corales.

Las bandas de crecimiento anuales se producen por ciclos de formación del esqueleto calcáreo los cuales son útiles en la recolección de datos y la correlación de la secuencia climática. El conteo simple de cada banda de crecimiento indica que la banda más externa es la del presente o la del evento que causó la muerte del coral, y luego se cuentan regresivamente éstas para determinar los años. El estudio de estas periodicidades en los esqueletos de animales extintos se le llama esclerocronología [18]. Los corales al formar su esqueleto calcáreo de aragonita (CaCO_3) incorporan en ella algunos metales como Sr, Mg, Cd, Ba, Mn y U que se encuentran en el mar, mediante la coprecipitación de los carbonatos de estos metales por sustitución del Ca y en función de la TSO [3] [5] [19] [20]. Por tanto, las determinaciones precisas de las relaciones de estos metales respecto a Ca en los corales permiten construir registros de

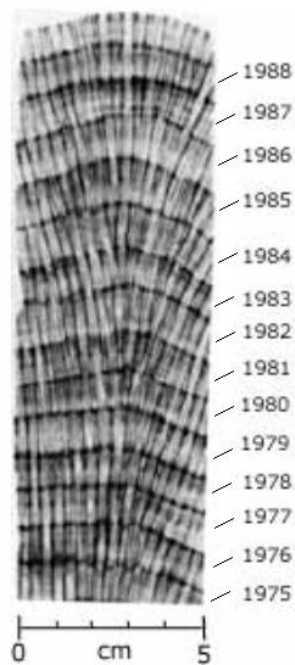


Figura 2.2.1. Imagen de Rayos X del núcleo de un coral *Monstaraea* proveniente Florida, Estados Unidos, donde se muestran las bandas de crecimiento anuales en el esqueleto calcáreo [19].

estas temperaturas. Estas relaciones metálicas son parámetros paleotermométricos que además exhiben clara variación estacional de forma sincronizada [5] [7] [8] [21] [22], como se observa en la Figura 2.3.1. Estos elementos se encuentran en distintas proporciones en el coral: Ca es un elemento mayoritario; Sr y Mg son elementos minoritarios; y Cd, Ba, Mn y U son elementos trazas [20]. Los elementos mayoritarios en una muestra se encuentran en concentraciones entre 1-100 %, los minoritarios entre 0,01% (100 ppm) y 1% (10.000 ppm), los elementos trazas entre 1 ppb y 100 ppm, y los ultra trazas se encuentran en concentraciones menores de 1 ppb [23].

El Sr que se incorpora en la estructura calcárea al momento de la formación de este esqueleto de aragonita proviene mayormente de la celestita, la cual está mayormente disuelta en el mar a profundidades menores de 1000m [24].

Análogamente, el Mg disuelto en el mar se incorpora a la estructura calcárea de los corales. Estos metales, como ya se mencionó anteriormente, se incorporan como función de la TSO, donde la relación Sr/Ca del esqueleto coralino ha mostrado una inversa proporcionalidad con la TSO [6], mientras que la relación Mg/Ca del esqueleto coralino ha mostrado una directa proporcionalidad con la TSO [21]. Como se puede ver en la Figura 2.3.1. a principio de año corresponde a TSO mínimas, que a su vez corres-

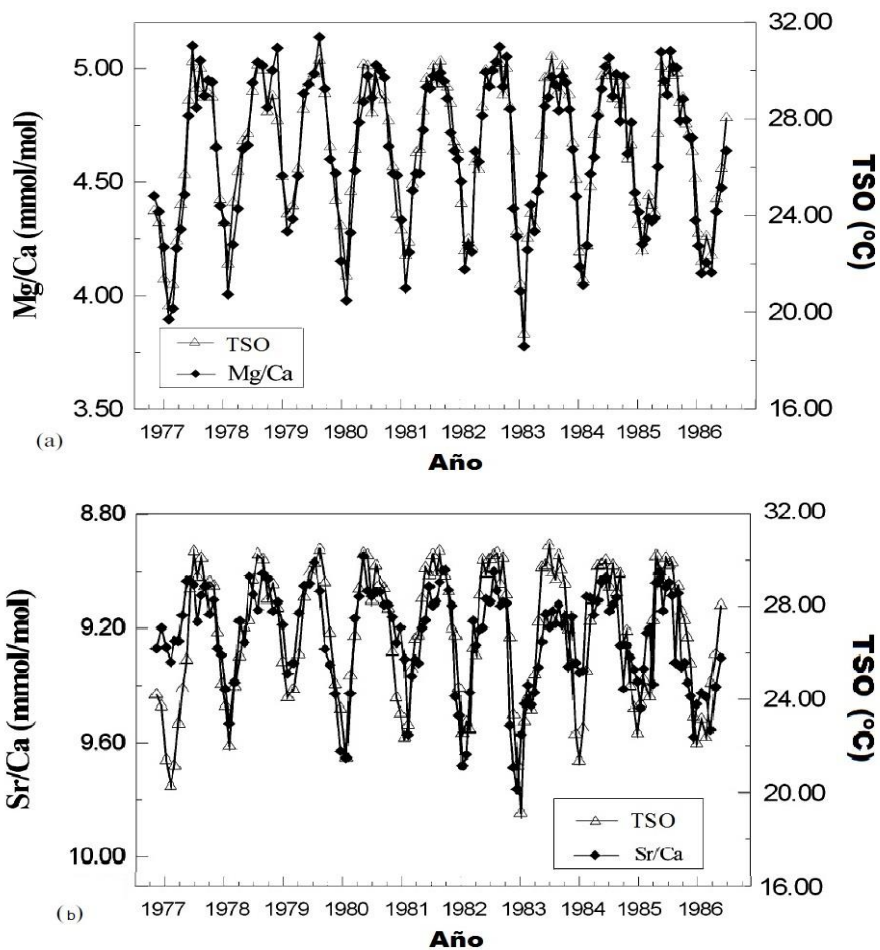


Figura 2.3.1. Ciclos anuales y su correspondencia con la relación de los metales Mg/Ca (a) y Sr/Ca (b) presentes en el coral y la Temperatura Superficial Oceánica, TSO, de un espécimen de *Porites lutea* [5].

ponde a relaciones Mg/Ca mínimas y Sr/Ca máximas; luego a medida que aumenta la TSO por la llegada de una estación más caliente, va aumentando la relación Mg/Ca y disminuye la relación Sr/Ca. Estas variaciones de las relaciones paleotermométricas coinciden con las estaciones del año y a su vez con una banda anual de crecimiento del coral [5], lo que permite el control preciso necesario para reconstruir climas pasados en el estudio del Cambio Climático.

2.4. Antecedentes de estudios de relaciones Paleotermométricas.

Diversos autores han publicado la dependencia entre las relaciones paleotermométricas y distintas especies de corales. Muchos de estos análisis se realizan con técnicas que permiten bajos límites de detección, lo que se traduce como alta sensibilidad para el desarrollo de paleotermómetros, los cuales son ecuaciones, obtenidas mediante regresiones lineales, que permiten estimar las TSO a partir de la determinación de las relaciones metal/Ca. Los autores construyen estas ecuaciones al usar máximos valores de TSO – máximos valores de relación metal/Ca y mínimos valores de TSO – mínimos valores de relación metal/Ca, cuando metal = Mg; cuando metal = Sr utilizan mínimos valores de TSO – máximos valores de relación metal/Ca y máximos valores de TSO – mínimos valores de relación metal/Ca. Las ecuaciones paleotermométricas son rectas de la forma:

$$\text{Metal/Ca (mmol/mol)} = a + b \cdot T(^{\circ}\text{C}) \quad (\text{ec. 2.4.1.})$$

En el año 2000, Wei, G. y otros, estudiaron las relaciones Mg/Ca, Sr/Ca y U/Ca en un espécimen de *Porites lutea* proveniente de la Bahía Sanya, Isla Hainan en el Mar del Sur de China, y sus relaciones con la TSO, mediante la técnica Plasma Acoplado Inductivamente – Espectrometría de Masas combinado con la técnica de Dilución Isotópica (ICP–MS–ID). Estos autores extrajeron una fina placa, del eje de crecimiento mayor, tratada con diversos agentes químicos para remover la materia orgánica y

contaminantes adherentes, y luego cortaron cubos de 1 mm³ paralelos a lo largo del borde de la placa. Cada cubo fue disuelto para posteriormente ser analizado. Utilizaron patrones multielementales de Mg (en un rango de 10-75 ppb), Sr (en un rango de 30-200 ppb), Ca (en un rango de 1 a 10 ppm), Sc (10 ppb) e Y (10 ppb), para elaborar las curvas de calibración de ²⁴Mg/⁴⁵Sc para Mg, ⁴⁸Ca/⁴⁵Sc para Ca y ⁸⁶Sr/⁸⁹Y para Sr, mediante el método de estándar externo, donde obtuvieron coeficientes de correlación, R², mayores a 0,9995. El contenido de U fue medido usando la técnica de Dilución Isotópica, usando el pico de ²³⁵U y una solución de 1 ppb. Se comparó este último resultado con el análisis de la misma solución por Espectrometría de Masas - Ionización Térmica (TIMS). Las temperaturas usadas para las curvas de calibración fueron determinadas localmente por la Estación Hidrométrica de Yinggenhai. Determinaron que el espécimen *Porites lutea* tenía una velocidad de crecimiento de 14,5 mm/año, 10 años de intervalo de análisis, y obtuvieron que el comportamiento de las relaciones metálicas siguen las tendencias mencionadas anteriormente con la TSO para Sr y Mg, y para U sigue una tendencia similar que el Sr (inversamente proporcional a la TSO). Las ecuaciones paleotermométricas obtenidas fueron:

$$T(^{\circ}\text{C}) = (-14,13 \pm 0,31) + (8,846 \pm 0,068) * 10^3 \text{ Mg/Ca con } r=0,97 \quad (\text{ec 2.4.2.})$$

$$T(^{\circ}\text{C}) = (210,2 \pm 2,4) - (19,83 \pm 0,26) * 10^3 \text{ Sr/Ca con } r=0,75 \quad (\text{ec 2.4.3.})$$

$$T(^{\circ}\text{C}) = (81,15 \pm 0,57) - (48,14 \pm 0,48) * 10^6 \text{ U/Ca con } r=0,85 \quad (\text{ec 2.4.4.})$$

Los autores infieren que la baja correlación para el Sr fue debido a que la relación Sr/Ca en el mar de la costa de la Isla Hainan no era tan constante como los reportados para ambientes marinos abiertos; además que las ecuaciones termométricas de Sr/Ca y U/Ca no son válidas para reconstruir TSO del pasado, al menos no en esa área. El termómetro de Mg/Ca es consistente con otro termómetro de Mg/Ca para un espécimen de *Porites lutea* reportada en el mismo trabajo, por lo que afirman los autores que el termómetro de Mg/Ca es una herramienta versátil y de confianza para la reconstrucción de paleo-TSO [5]. Aunque mediante ésta técnica alcanzan precisiones

analíticas y reproducibilidad de 0,5-1,0, 0,2-0,5 y 0,5-1,0% para Mg/Ca, Sr/Ca y U/Ca, respectivamente, esta técnica involucra mucho tiempo analítico, disoluciones, generación de desechos, requerimiento de tratamiento de muestra, y alto costo de la técnica.

En el año 2002, Swart, P. y otros, publicaron los resultados de su estudio de “una calibración de alta resolución del termómetro Sr/Ca usando un coral caribeño *Montastraea annularis*”, mediante la técnica Espectrometría de Masas combinado con método de Dilución Isotópica (MS-ID). La muestra fue recolectada en el Arrecife de Alina, Parque Nacional Biscayne, Florida, Estados Unidos. Doce pequeñas colonias de *M. annularis*, cada uno de 10-15 cm de altura por 8-10 cm de diámetro fueron colocados en una plataforma en cámaras de incubación individuales y se sellaron durante el procedimiento experimental. Cada dos a tres meses, después de las mediciones fisiológicas, los corales fueron manchados con Alizarina. Luego concluyeron que los corales muestras revelaron velocidades de crecimiento y calcificación comparables a los otros corales del mismo arrecife, y ser aparentemente no afectados por el trauma de trasplante. Luego los corales fueron movidos de la plataforma al laboratorio. El tejido de los corales fue removido, y los esqueletos fueron sometidos a Rayos X, y muestreadas para análisis de isotopos estables de Oxígeno y Carbono. Un espécimen fue analizado para la relación Sr/Ca. La temperatura fue medida localmente desde 1990 en el Parque Nacional Biscayne cerca del Arrecife de Alina y a la misma altura de la plataforma. La salinidad fue periódicamente medida en conjunto con la composición isotópica del agua, donde los datos revelaron pequeños cambios en la salinidad durante el periodo experimental. La muestra coralina, para determinación de la relación Sr/Ca, fue cortada, con un taladro con punta de diamante, en dos partes paralelo al eje de mayor crecimiento, y cortado posteriormente en trozos del tamaño de cada coralita (base del pólipo, aproximadamente 5 mm) y 0,5-1,0 mm de alto. A partir de estos trozos pequeños, se obtuvieron micro-muestras mediante un taladro de baja velocidad con punta de diamante, una base con movimiento computarizado en X-Y-Z, lo

que le permitió a los autores pasos de 170 μm y profundidades de 0,34 mm. Las muestras reducidas a polvo fueron disueltas en 0,5 mL de HCl a 0,5 M. Las relaciones Sr/Ca fueron determinado por ID antes mezclando con una solución de ^{42}Ca - ^{44}Ca - ^{84}Sr (calibrado con una solución de Ca-Sr diluida gravimétricamente de estándares de CaCO_3 y SrCO_3). La ecuación obtenida por los autores fue la siguiente:

$$\text{Sr/Ca (mmol/mol)} = 9,994 - 0,0377 \cdot T(^{\circ}\text{C}) \text{ y } R^2=0,62 \quad (\text{ec. 2.4.5.})$$

Los autores separaron los datos por años, debido a las líneas de alizarina, y realizaron dos ecuaciones anuales:

$$\text{Para 1989: } \text{Sr/Ca (mmol/mol)} = 10,110 - 0,0449 \cdot T(^{\circ}\text{C}) \text{ y } R^2=0,83 \quad (\text{ec. 2.4.6.})$$

$$\text{Para 1990: } \text{Sr/Ca (mmol/mol)} = 10,089 - 0,0406 \cdot T(^{\circ}\text{C}) \text{ y } R^2=0,68 \quad (\text{ec. 2.4.7.})$$

Al usar como medida o guía temporal la marca de alizarina cada cierto tiempo se creó bandas temporales, pero no tomaron en cuenta que el crecimiento del coral es en tres dimensiones, no dos, lo que indujo errores en los datos [6]. Aunque ésta técnica es muy sensible, tiene un alto costo de la técnica, disoluciones, generación de desechos y requerimiento de consumibles.

En el año 2010, Deng, W. y otros, publicaron los resultados del análisis de las relaciones Sr/Ca y Mg/Ca en la especie moderna *Porites lutea*, obtenida de la Isla Weizhou, en el norte del Mar de la China en el año 2007, mediante la técnica Ablación por Láser – Plasma Acoplado Inductivamente – Espectrometría de Emisión Óptica (LA-ICP-OES), utilizando un detector CCD. Utilizaron como calibración el método de estándar externo, una mezcla de estándar sólido (disco de vidrio producto de la fusión de polvo de coral, SiO_2 y $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ en una relación 1:1:1) y una solución acuosa como estándar externo de Ca, Sr y Mg a distintas concentraciones, muy similares a las presentes en los corales, donde el sólido ableado se mezcla, en una cámara distinta, con un aerosol de la solución, que luego son transportadas al ICP. La muestra fue

cortada en distintos trozos pequeños (5 mm de grosor, 27 mm de ancho y 50 mm de largo) a lo largo del eje de mayor crecimiento. Cada trozo fue sometido a procedimientos químicos para eliminar la materia orgánica y contaminantes adherentes. Ca, Sr y Mg fueron detectados a 318,127 nm, 407,771 nm y 279,553 nm, respectivamente. Los autores reportan, además de una resolución espacial de 80 μm , que debido a la composición heterogénea y estructura del coral, esta técnica puede permitir determinar variaciones de las relaciones metálicas diarias, y por ende, TSO diarias. Determinaron que las relaciones metálicas en la muestra coralina varían para Sr/Ca de 8,63-9,59 mmol/mol, con un promedio de 9.004 mmol/mol; y para Mg/Ca varían 2,86-4,31 mmol/mol, con un promedio de 3,639 mmol/mol [7]. Aunque ésta técnica tenga mucha sensibilidad, posee desventajas como alto costo de la técnica, necesidad de disoluciones, requiere mucho tiempo analítico y genera desechos.

En el año 2013, Flannery, J.; y Poore, R., usaron la técnica espectroscópica Plasma Acoplado Inductivamente – Espectrometría de Emisión Óptica (ICP-OES) en la determinación de la relación Sr/Ca como herramienta para reconstrucción de TSO en especies *Montastraea faveolata* modernas y de la era del Holoceno, obtenidas del Parque Nacional Tortugas Secas, Florida, Estados Unidos. Determinaron las bandas de crecimiento por Rayos X, y cortaron los corales, con un microtaladro triaxial computarizado, paralelo al eje de mayor crecimiento, obteniendo así dos piezas coralinas de 0,5 mm de grosor de cada espécimen. Cortaron en cada banda de crecimiento, trozos de 0,5 mm de diámetro y 1,5 mm de profundidad, dando un promedio de 15 muestras por año. Cada coral fue pulverizado y pesado (88-237 μg) y disuelto en 2% de HNO_3 , grado metales en trazas, para obtener aproximadamente 20 ppm de Ca. El análisis elemental fue realizado usando una solución gravimétrica de estándar interno, medido para Sr/Ca antes y después de cada muestra de coral disuelta para obtener una mejor relación señal/fondo (S/F) por corrección de la deriva instrumental, como reportó Schrag (1999) [25]. Las bandas de crecimiento mostraron que el coral de edad moderna tuvo un rango de edad de 1961-2008, muestras que el

coral del holoceno tuvo 7 bandas de crecimiento. Las temperaturas utilizadas para la elaboración del paleotermómetro fueron medidas localmente para cierto intervalo de tiempo, y otras suministradas por la International Comprehensive Ocean-Atmosphere Data Set (ICOADS) compilada por la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). La ecuación paleotermométrica obtenida fue la siguiente:

$$\text{Sr/Ca (mmol/mol)} = 10,205 - 0,0392 \cdot T(^{\circ}\text{C}) \text{ y } R^2=0,97 \quad (\text{ec. 2.4.8.})$$

Los autores comparan su ecuación paleotermométrica con las obtenidas por otros autores con otros corales *Montastraea*, donde Smith, J. y otros (2006) y DeLong, K. y otros (2011) obtienen ecuaciones muy similares, utilizando un distinto espécimen de *Montastraea annularis* y el mismo espécimen, respectivamente [9].

2.5. Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS).

La Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser, LIBS, es una técnica que permite realizar análisis de muestras gaseosas, líquidas y sólidas, y en tiempo real; requiere poco tratamiento de muestra; genera poco o ningún desecho y tiene relativo bajo costo. Permite hacer “mapeos” sobre la superficie de las muestras, sin necesidad de disolverlas. Por estas razones podemos considerar LIBS como una técnica con gran potencial para el análisis de los paleotermómetros, Mg/Ca y Sr/Ca en corales.

2.5.1. Ablación por Láser.

La ablación por láser es el nombre que describe la interacción explosiva de un láser con un material. Esta técnica remueve una pequeña cantidad de materia de una muestra con el uso de un haz de láser pulsado (véase Figura 2.5.1.1.), produciendo un

vapor que sirve de fuente para análisis elemental por espectroscopia atómica al ionizarse y formarse el plasma. Esta interacción entre el láser y la muestra produce, además de la vaporización, expulsión de fragmentos de especies moleculares, atomización e ionización [26]. El láser, de cierta energía, al incidir sobre la superficie puede sufrir reflexión parcial o dispersa a la misma longitud de onda, re-emitirse a diferentes longitudes de onda o transmitirse a través de la superficie [27].

Cuando la duración del pulso del láser es de microsegundos o mayor, y la irradiación es menor de 1 MW/cm^2 , la vaporización es el proceso dominante sobre la muestra. A irradiaciones de mayores de 1 GW/cm^2 , con pulsos de nanosegundos y más cortos enfocados sobre cualquier material, ocurre un calentamiento instantáneo producto de la absorción multifotónica, descomposición dieléctrica, formación de electrones libres, colisiones electrón-átomo, electrón-molécula y otros mecanismos aun no definidos, lo que produce que la temperatura superficial exceda la temperatura de vaporización dentro de una fracción de la duración del pulso del láser, causando una explosión de especies atómicas, iónicas, moleculares, y fragmentos. Durante esta interacción ablativa, se forma un plasma de la muestra [26]. En la Figura 2.5.1.2. se pueden observar plasmas inducidos por láser de una muestra sólida, líquida y gaseosa

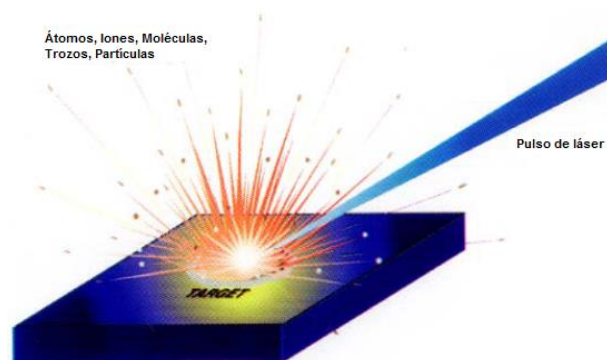


Figura 2.5.1.1. Ablación por Láser. Remoción de una pequeña cantidad de masa por incidencia de un Láser Pulsado de alta energía [26].

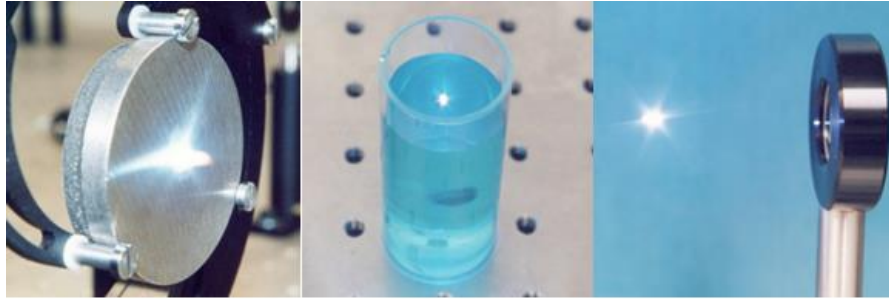


Figura 2.5.1.2. Fotografías de plasmas inducidos por láser de una muestra sólida (izquierda), líquida (central) y gaseosa (derecha) [28].

2.5.2. Plasma Inducido por Láser.

Un pulso de láser de 10 ns y 1 mJ de energía, enfocado en un radio de 10 μm , tiene una irradiación de aproximadamente 40 GW/cm^2 lo que produce un plasma de la muestra [26]. La formación de este plasma involucra distintos procesos como: fusión superficial con flujo hidrodinámico, vaporización, ionización del vapor, aceleración de electrones libres dentro de la nube evaporada, calentamiento del plasma. Luego de unos nanosegundos que se forma el plasma y se expande (véase Figura 2.5.2.1.), este sufre un decaimiento debido a los diversos procesos que ocurren en el seno del plasma como: formación y propagación de ondas de choque, desaceleración de electrones libres, colisiones en la nube de gas con excitación y relajación de los átomos/iones, recombinación química. La temperatura inicial del plasma es muy alta, con un valor típico de más de 20.000 K, y está acompañada de un espectro de emisión continuo [27]. La vida del plasma está en el orden de los microsegundos, y este tiempo es largo en comparación con la duración del pulso del láser. La profundidad del cráter y cantidad de material removido dependen de las propiedades ópticas (absorción y reflexión) y térmicas del material [26].

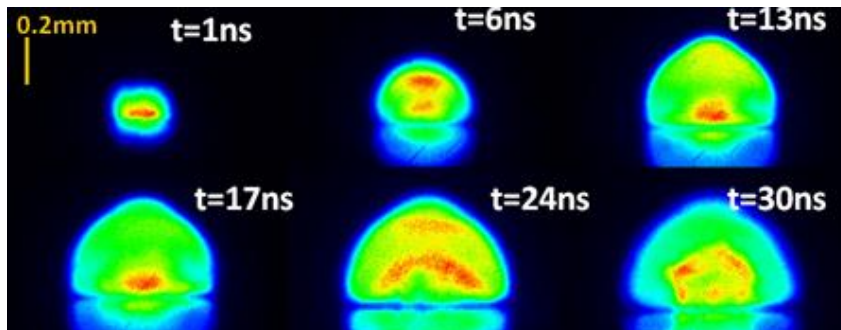


Figura 2.5.2.1. Iniciación y expansión de un plasma de alta temperatura ($>15.000\text{K}$) en función del tiempo [29].

2.5.3. Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS).

Cuando el plasma inicial empieza a enfriarse, disminuye la emisión continua de radiación, y se obtienen las líneas de emisión características de las especies atómicas e iónicas al regresar a su estado fundamental. La radiación emitida por el plasma es recolectada en un espectrógrafo acoplado a un detector modulado para análisis espectral por LIBS. Cada elemento en la tabla periódica está asociado con un pico espectral por LIBS y la intensidad o área de éstas puede ser usado para cuantificar la concentración de especies en la muestra [29]. La figura 2.5.3.1. muestra un esquema de los eventos involucrados en cada etapa de la formación de un plasma inducido por láser, en este caso, de una muestra sólida. Las líneas de emisión características de las especies presente en la muestra se analizan luego de la disminución de la intensa emisión continua del plasma inicial (0-100 ns), a la cual se le denomina tiempo de demora (t_d). A pequeños tiempos de demora se observa emisión de las especies ionizadas (por ejemplo, Mg II), y a medida que se aumenta este parámetro de detección muchas de estas líneas iónicas decaen hasta estar ausentes del espectro; sin embargo, predominan las líneas de emisión de las especies neutras (por ejemplo, Sr I) a medida que aumenta este parámetro. Además, a bajos tiempos de demora se observan líneas

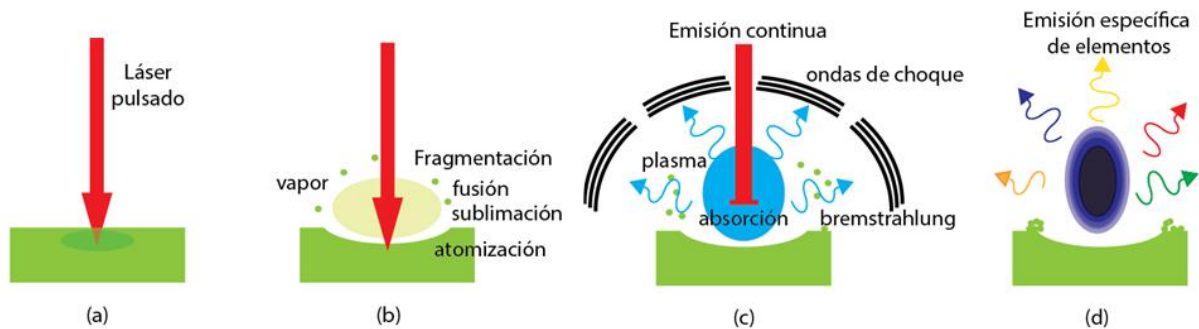


Figura 2.5.3.1. Esquema del proceso de Plasma inducido por Láser sobre una muestra sólida. a) Absorción de la energía del láser pulsado por el sólido. b) Ablación de la muestra. c) Formación de un plasma por ionización del vapor de la muestra. d) Formación de emisión característica de los elementos en la muestra luego de 1 μ s del pulso de láser [30].

muy intensas pero menos resueltas; al aumentar este parámetro de detección disminuye las intensidades de las líneas de emisión, pero estas se encontrarán más resueltas (Véase Figura 2.5.3.2.). En conjunto con el tiempo de demora, se utiliza también el ancho de la compuerta del detector, el cual es el tiempo que permanece abierta la ventana temporal de observación del plasma para su análisis [31]. Estos parámetros de detección de la ventana temporal de los espectrógrafos permiten obtener espectros con líneas resueltas y mejor relación S/R.

LIBS no puede ser considerada una técnica no destructiva ya que parte de la muestra a ser analizada es vaporizada y perdida. Sin embargo, los volúmenes muestreados son muy pequeños, del orden de 10^{-8} a 10^{-5} cm^3 dependiendo del material, longitud de onda del láser y potencia. Dichos volúmenes corresponden a masas de rango entre ng y μ g. Es muy versátil esta técnica ya que la muestra puede ser gaseosa, líquida o sólida. En caso de muestras sólidas, las zonas afectadas por el láser pueden ser de un diámetro de 0,5 mm, y tan pequeños como 1 μ m (véase figura 2.5.3.3.). Además, la profundidad de incidencia del láser sobre el sólido es del orden de

los nanómetros, y permite realizar perfiles de profundidad de los materiales mediante el análisis separado de sucesivos eventos de ablación por láser en la misma posición en dicho sólido [32] [33]. Los límites de detección típicos son del orden de mg/Kg (ppm), y puede aumentar la sensibilidad del análisis si se utiliza una atmósfera de He [31].

Para cuantificar mediante LIBS se pueden realizar diversos métodos que involucran curvas de calibración. El primero consiste en obtener la variación del área del pico analítico en función de la concentración de un estándar (Estándar Externo). El segundo consiste en calcular la relación entre el área del pico analítico respecto al área del pico de un elemento con concentración constante (Estándar Interno), y determinar la variación de esta relación en función de la concentración de un estándar. Luego de obtener la curva de calibración por Estándar Interno o Externo, se determina la concentración de la muestra por comparación del área de pico analítico del analito en la muestra [34]. Cuando se utilizan relaciones de señales o de áreas, se aumenta la relación S/R, además compensar la posible fluctuación del láser, por lo que se obtienen valores más precisos [8].

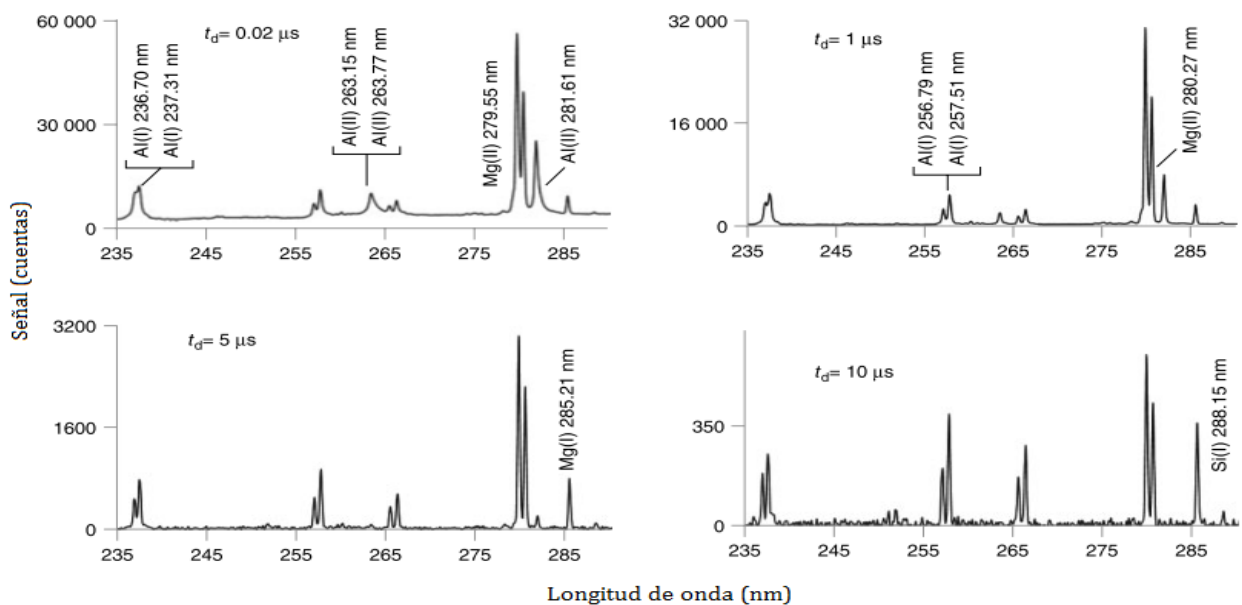


Figura 2.5.3.2. Espectros de LIBS a distintos tiempos de demora (t_d) [31].



Figura 2.5.3.3. Micrografía de un “cráter” formado por ablación con láser en una superficie de cobre con el uso de un pulso de 30 ps de un láser Nd:YAG a $\lambda = 1064$ nm [26].

2.5.4. Instrumental LIBS.

Los principales constituyentes de un equipo para LIBS son: una fuente de laser pulsado, espectrógrafo, detector, sistema óptico (lentes para enfoques y lentes colectores), gatillo, generador de retraso, y un computador para recolección y tratamiento de los datos obtenidos en el análisis. El láser es enfocado por los lentes a la muestra, luego la emisión del plasma es enfocada a una fibra óptica que envía ésta a un espectrógrafo para separar las distintas longitudes de onda que luego pasan al detector, el cual a su vez transforma la información de las longitudes de onda en señal eléctrica; la señal es amplificada y almacenada en un computador [27] [28]. La figura 2.5.4.1. muestra la instrumentación básica para un análisis LIBS.

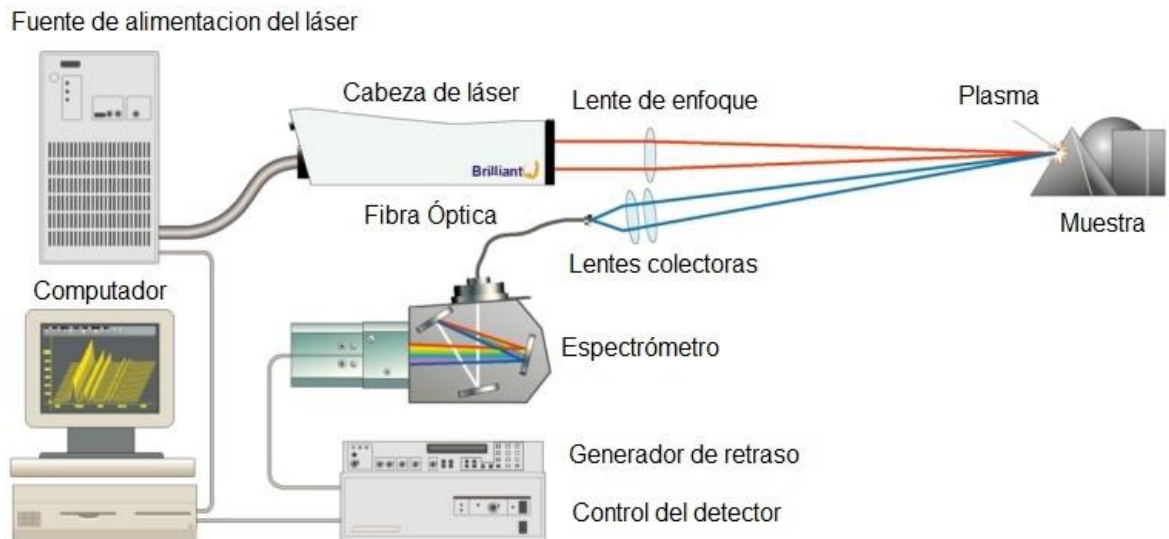


Figura 2.5.4.1. Instrumentación básica para análisis por LIBS [28].

2.5.5. Variables que afectan el análisis LIBS.

Como se ha mencionado anteriormente, hay distintas variables que influyen enormemente en las mediciones y análisis LIBS; estas son: propiedades del pulso de láser (longitud de onda, energía del pulso, duración y fluctuaciones en la energía entre pulsos), tamaño del sitio de incidencia del haz de láser enfocado, condiciones de ambiente, propiedades físicas de la muestra, y ventana de detección (tiempo de demora y ancho de compuerta) [31]. Cómo estas variables afectan la precisión y exactitud de LIBS se menciona a continuación.

2.5.5.1. Parámetros del láser.

Las propiedades del láser influyen fuertemente en las cualidades analíticas de una medición ya que el láser atomiza y excita la muestra simultáneamente. Si la

irradiación es muy cercana a la necesaria para formar el plasma, denominado umbral de rompimiento (orden de GW/cm^2), las fluctuaciones de energía entre pulsos en el proceso de ablación y excitación afectará la reproducibilidad de la señal resultando una pobre precisión en la medición. Cuando la energía del pulso es muy grande, produce un plasma muy caliente con aumento de la absorción por el plasma del resto de la energía del pulso de láser incidente; y como la masa del material abledo incrementa con la energía del pulso del láser, ciertas líneas de emisión pueden exhibir autoabsorción. También, como resultado hay un incremento en la emisión continua de radiación y disminución de la intensidad de la señal del analito. La longitud de onda del láser también puede afectar el proceso de formación del plasma. Longitudes de onda largas producen, como proceso dominante en la formación del plasma, ionización inducida por colisiones. A medida que la longitud de onda disminuye, la ionización inducida por colisiones disminuye, y el proceso multifotónico se torna más importante. Este parámetro del láser también puede afectar acoplamiento de energía entre el pulso de láser y la muestra; estudios han demostrado que el uso de una longitud de onda ultravioleta (UV) puede mejorar la eficiencia de acoplamiento de energía debido a su baja reflectividad para la mayoría de los metales [31].

2.5.5.2. Propiedades físicas de la muestra.

Todos los tipos de materiales pueden ser analizados mediante LIBS y las propiedades físicas de la muestra (por ejemplo, la reflectividad de la superficie, densidad, calor específico, y el punto de ebullición) pueden tener una influencia considerable en el espectro resultante. La reflectividad de la superficie determina la fracción de la energía del láser que es absorbida por la muestra y, por lo tanto, la masa del material abledo. Si la energía del impulso de láser es suficientemente elevada, sin embargo, el pulso de láser puede todavía eficazmente acoplarse a la muestra con alta

reflectividad. Esto se produce porque, durante el pulso del láser, la energía absorbida provoca un rápido calentamiento de la muestra resultando en un cambio de fase que puede reducir significativamente la reflectividad. El láser calienta la muestra produciendo vaporización y la atomización del material. La cantidad de material vaporizado depende de las propiedades térmicas de la muestra (es decir, la conductividad, el calor específico, y punto de ebullición). A irradiaciones bajas, la conductividad térmica es el parámetro más importante que gobierna la vaporización del material. Si el material tiene una alta conductividad térmica, el calor absorbido se disipa con rapidez y se vaporiza menos material. A irradiaciones altas el calor se deposita en la muestra con mayor rapidez, y por lo tanto, el calor latente de vaporización se vuelve un factor más importante en la vaporización [31].

2.5.5.3. Enfoque del haz de láser.

Para formar un plasma de muestras en distintos estados de la materia es necesario enfocar el haz de láser. La distancia lente a superficie es un parámetro crítico para una medición de LIBS de una muestra sólida. Si el haz láser está estrechamente enfocada en la superficie, un cambio en la distancia lente superficie de unos pocos milímetros puede afectar a la intensidad analito. Estudios han demostrado que al desenfocar el haz de láser en la superficie de la muestra, se puede obtener una señal de LIBS más reproducible, mejorando así la precisión de la medición LIBS [31].

2.5.5.4. Ventana temporal. Tiempo de observación.

En LIBS, las señales de emisión atómica deseadas están acompañadas de un fondo continuo, que puede ser muy intenso inmediatamente después de la formación de

plasma. Como la intensidad de fondo decae mucho más rápido que la señal del analito, es posible utilizar la detección resuelta en función del tiempo para discriminar contra la fuerte radiación continua y también evitar la interferencia espectral entre las especies que emiten en diferentes momentos durante el decaimiento de plasma (véase figura 2.5.3.2.). Entonces, la ventana de detección se selecciona para obtener una óptima relación señal/fondo (S/F) y generalmente se puede lograr en tiempos de demora más largos. En general, la relación S/R y los valores de relación S/F siguen la misma tendencia al aumentar el tiempo de demora [31]. La ventana de detección está constituida por el tiempo de demora y el ancho de la compuerta temporal.

2.5.5.5. Condiciones ambientales.

El plasma caliente interacciona con el gas que lo rodea por expansión, conduciendo una onda de choque a la atmósfera y transfiriendo energía a esta como calor. El tamaño y forma del plasma dependen en gran medida de las condiciones del ambiente como la presión. Se ha encontrado que el plasma se vuelve más denso y caliente al incrementar la presión de gas debido a un efecto de confinamiento, el cual puede causar un incremento en el periodo de emisión e intensidad de emisión. De esta manera, a bajas presiones el plasma se expande rápidamente, volviéndose menos denso y resultando en la disminución de la intensidad de emisión. A presiones moderadas, se generan plasmas de alta temperatura, la intensidad de emisión continua de fondo es alta; también, puede ocurrir autoabsorción dependiendo de la concentración de los elementos [31].

Los gases tienen distintos efectos sobre el plasma. Gases inertes previenen la rápida oxidación de los átomos libres en el plasma. El plasma formado en Ar tiene alta temperatura y mayor periodo de emisión debido a la baja conductividad térmica de este gas. La atmósfera de Ar puede mejorar la señal analítica por la re-excitación de átomos,

debido a las colisiones con átomos de Ar excitados. Las grandes temperaturas del plasma en atmósfera de Ar también producen un fondo más intenso. Las emisiones del plasma formado en aire son similares al formado en atmósfera de Ar, pero el fondo es aproximadamente la mitad del observado en Ar. El He tiene una conductividad térmica y potencial de ionización mayor que N₂ o Ar y por lo tanto el plasma formado en una atmósfera de este gas tiene menor fondo y es menos sensible a cambios en la energía del láser y presión [31].

Debido a todo lo mencionado, la búsqueda de las mejores relaciones S/R o S/F en función de todas estas variables mencionadas es trabajo fundamental de todo análisis LIBS, y sus valores óptimos dependen de la muestra a analizar.

2.5.6. Antecedentes del uso de LIBS para el análisis de relaciones paleotermométricas.

En el año 2007, Fabre, C.; y Lathuiliere, B utilizaron LIBS en el análisis de las relaciones Sr/Ca y Mg/Ca en esponjas de mar hipercalcificadas. Reportan el uso de vidrios de silicato como estándar externo para elaborar la curva de calibración de la relación metálica Mg/Ca. No elaboraron estándar de Sr por la poca cantidad de éste metal en la calcita. Mediante un punto de incidencia del láser de 4-5 μm , pudieron obtener un mapa de relaciones Mg/Ca sobre toda la muestra, lo que le permitió a los autores resaltar a escala micrométrica la variación de relaciones metálicas a lo largo de su crecimiento. Obtuvieron valores de Mg/Ca alrededor de 300-600 mmol/mol [10].

En el año 2015, García-Escárzaga, A. y otros, utilizaron LIBS en la medición de la relación Mg/Ca sobre conchas de especímenes de caracoles de mar. Obtienen coeficientes de correlación menores de 0,5, e indican que esta baja correlación de Mg/Ca y la temperatura depende de otros factores como salinidad, cantidad y calidad

de comida, ciclos reproductivos, entre otros, a pesar de que la información obtenida no permite conocer las causas que están involucrados en el proceso de formación de la cáscara.

2.6. Análisis Multivariado. Superficies de Respuesta.

Debido a las cantidades de variables involucradas en un análisis LIBS, se puede utilizar un análisis multivariado para hallar las mejores condiciones mediante la realización de una serie de observaciones. El método usual de optimizar cualquier montaje experimental es ajustar un parámetro a la vez, manteniendo constantes todos los demás, hasta que se encuentren las condiciones de trabajo óptimas. Ajustar un parámetro a la vez requiere de mucho tiempo y no puede revelar todas las interacciones entre los parámetros. Con el fin de describir completamente la respuesta y las interacciones de cualquier sistema complejo un estudio multivariado debe llevarse a cabo [35]. Un diseño de Superficie de Respuesta es un conjunto de técnicas estadísticas de Diseño de Experimentos (DOE) que ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta mediante la descripción del comportamiento de los experimentos. La técnica de Superficie de Respuesta (MSR) suele utilizarse para refinar los modelos después de determinar los factores importantes utilizando los diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la Superficie de Respuesta.

2.6.1. Modelos de Segundo Orden.

Dos de los objetivos del MSR son: encontrar una función de respuesta y determinar los valores de los factores que optimizan la función de respuesta. Para aproximar una función de respuesta a los datos experimentales, suponemos que existe una función que relaciona la respuesta a los k factores. Esta función “verdadera” generalmente es desconocida y podría ser complicada, involucrando factores cuantitativos y cualitativos. Pero, se podría utilizar un polinomio de bajo orden para aproximar la función verdadera, en la región de interés. Un modelo de aproximación de segundo orden podría tener la forma:

$$E(y) = \beta_0 + \sum_{h=1}^k \beta_h x_h + \sum_{h=1}^k \beta_{hh} x_h^2 + \sum_{h=1}^k \beta_{hj} x_h x_j \quad (\text{ec. 2.6.1})$$

donde k es el número de factores o variables, β_0 es un término constante, β_h representa los coeficientes de los parámetros lineales, x_h representa las variables, β_{hh} constituye los coeficientes del parámetro cuadrático, y β_{hj} representa los coeficientes de los parámetros de interacción [36].

Antes de aplicar el MSR, es necesario elegir primero un diseño experimental que definirá cuales experimentos deberán ser llevados a cabo en la región de estudio.

2.6.2. Diseños para ajustar modelos de segundo orden.

Un diseño experimental construido para estimar coeficientes para un modelo aproximado debería satisfacer los siguientes criterios de diseño:

- Proveer estimados para todos los coeficientes en el modelo aproximado.
- Requerir un número pequeño de unidades experimentales.

- Proveer una prueba de bondad de ajuste.
- Permitir que los experimentos se corran en bloques.
- Permitir que se encuentren valores de varianza especificados para los coeficientes estimados y las respuestas estimadas.

2.6.3. Diseños Central Compuesto.

Estos diseños están compuestos de un diseño factorial 2^k , el cual proporciona los datos necesarios para la estimación de los efectos de primer orden de cada factor y las interacciones de primer orden entre los factores, y un diseño estrella que consiste en $2k + 1$ puntos, que proporciona datos para la estimación de los efectos de segundo orden y con una o más unidades experimentales en el origen o puntos centrales. La forma general de un Diseño Central Compuesto (DCC) está integrada por $N_c = 2^k$ puntos cúbicos (puntos factoriales o factoriales fraccionales), $N_a = 2k$ puntos axiales (puntos estrella) y N_0 puntos centrales para un total de $N = N_c + N_a + N_0$ puntos experimentales [36].

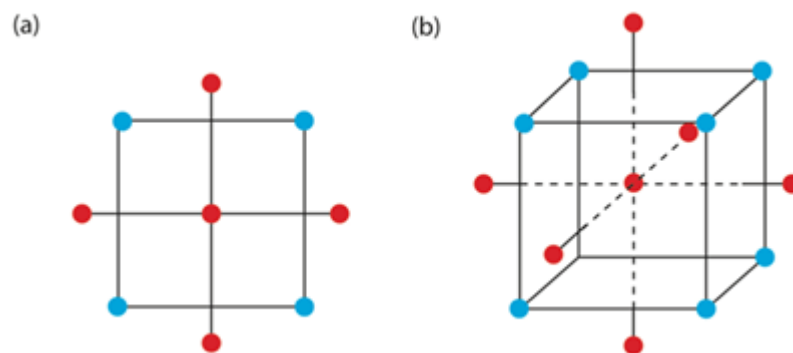


Figura 2.6.3.1. Diseño Central Compuesto: a) $k = 2$, b) $k = 3$. Los puntos azules pertenecen al diseño factorial 2^k y los puntos rojos al diseño estrella.

Tabla 2.6.3.1. Número de puntos experimentales para Diseños Central Compuesto.

Tipo de puntos	Coordenadas	Número de puntos
Cúbicos	$(\pm 1, \pm 1 \dots \pm 1)$	$N_c = 2^k$
Axiales	$(\pm a, 0, \dots, 0)$ $(0, 0, \dots, \pm a)$	$N_a = 2k$
Centrales	$(0, 0, \dots, 0)$	N_0

Para construir un Diseño Compuesto Central es necesario determinar los valores de N_c , N_a , N_0 y a , siendo este último una constante del diseño rotatorio [37].

2.6.4. Diseños rotatorios.

La ortogonalidad es una condición que elimina covarianzas entre los coeficientes de segundo orden puros estimados. Los diseños que tienen una varianza de respuestas predichas constante en todos los puntos que son equidistantes del centro del diseño, son denominados diseños rotatorios. Este criterio indica que la varianza $\text{Var}(y)$ depende solamente sobre la distancia desde el centro del diseño y no de la dirección. Box & Hunter dieron una condición necesaria y suficiente para que un diseño sea rotatorio:

$$a^4 = N_c \quad (\text{ec. 2.6.4.1.})$$

donde a es la constante de rotación.

Se pueden adoptar dos estrategias para alcanzar un compromiso entre capacidad de rotación y ortogonalidad:

1. Utilizar espacios axiales para alcanzar ortogonalidad y añadir tantos puntos centrales como sea posible para alcanzar capacidad de rotación;
2. Fijar el espacio axial para hacer el diseño rotatorio y añadir tantos puntos centrales como sea posible para alcanzar ortogonalidad.

Esta segunda estrategia es considerada la mejor, ya que se puede alcanzar una varianza promedio estandarizada menor, sin añadir muchos puntos centrales [37]. En el caso de tres variables, $k = 3$, se obtienen $N_c = 8$ puntos cúbicos, $N_a = 6$ puntos axiales; además, si se utilizan $N_0 = 8$ puntos centrales, obteniendo un $a = 1,682$, permite obtener $N = 22$ puntos experimentales.

Basados en la información presentada, se utilizó la técnica Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS) para el estudio de relaciones paleotermométricas Mg/Ca y Sr/Ca sobre una muestra de coral *Montastraea annularis*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

El objetivo principal de toda investigación paleoclimática es el de desarrollar reconstrucciones climáticas fechadas con una exactitud confiable, conocida, cuantificable y consistente.

El presente trabajo pretende contribuir a este objetivo mediante la evaluación de la técnica Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser, LIBS, como herramienta eficiente para la determinación de indicadores paleoclimatológicos en el esqueleto de un coral *Montastraea annularis*.

3.2. Objetivos Específicos

- Optimizar las condiciones experimentales del sistema LIBS en términos de máxima relación señal/ruido.
- Medir las relaciones Sr/Ca y Mg/Ca temporales asociadas a la superficie de un espécimen *Montastraea annularis*.
- Estimar la Temperatura Superficial Oceánica (TSO) durante los años de vida de la especie coralina mediante su correspondencia con las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Instrumentación.

Para realizar el análisis de los elementos metálicos en el espécimen coralino *Montastraea annularis* y sobre los comprimidos patrones, se utilizó la técnica Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS). Como fuente de ablación se empleó un Láser Nd-YAG (Surelite II, Continuum) Q-Switched, con energía del pulso de aproximadamente 26 mJ a la longitud de onda de trabajo de 355 nm. El haz de láser fue dirigido con la ayuda de espejos dicróicos y enfocado sobre un punto en el espacio con una lente de 50 μm de distancia focal. La muestra fue colocada sobre un sistema de traslación X-Y-Z (PI Micos ES-100, PI Micos LS-65). El sistema de traslación fue controlado vía software y con ayuda de un computador personal. La superficie de la muestra fue llevada a la altura donde el haz fue enfocado utilizando el ajuste vertical. El movimiento horizontal en dos dimensiones fue programado permitiendo elegir la forma y velocidad de movimiento en el plano horizontal. El análisis LIBS fue realizado a presión atmosférica. La radiación emitida por el plasma fue recolectada axialmente por una fibra óptica con un núcleo de 50 μm . La fibra óptica transmitió la luz a un espectrógrafo Echelle (Andor Mechelle 5000), con capacidad para adquirir simultáneamente el espectro de emisión del plasma en el rango de 200-975 nm. El espectrógrafo tuvo equipado con una cámara digital, integrada por un dispositivo de carga acoplada, CCD, con 1024 \times 1024 píxeles activos y un tubo intensificador de imagen que permitió alcanzar compuertas temporales ajustables extremadamente rápidas (Andor DH734-18F-03). Esta cámara ICCD tenía incorporado un sistema de enfriamiento interno que permitió operar a una temperatura de -15 °C. El uso de un divisor de haces permitió utilizar una cámara de observación enfocada sobre la muestra, utilizando la misma lente de focalización del láser. Este montaje facilitó el enfoque del haz láser sobre la muestra.

Adicionalmente, se utilizó un computador para la adquisición y tratamiento de los datos obtenidos. Un diagrama del equipo que se utilizó se muestra en la Figura 4.1.1.

Se elaboró un sistema de enfriamiento y control de temperatura para el espectrógrafo. La figura 4.1.2. muestra imágenes del espectrógrafo con el sistema de enfriamiento. El sistema consta de dos celdas Peltier, alimentadas con una fuente de 12 voltios. Las celdas fueron colocadas entre la pared superior del espectrógrafo y un dispersor de calor, con su cara fría adherida al primero y la caliente al segundo. La temperatura se controló mediante un termostato que interrumpió la alimentación de las celdas permitiendo regular la temperatura a 25 ± 1 °C. Además, se colocó un revestimiento de goma-espuma de alta densidad alrededor del espectrógrafo para que

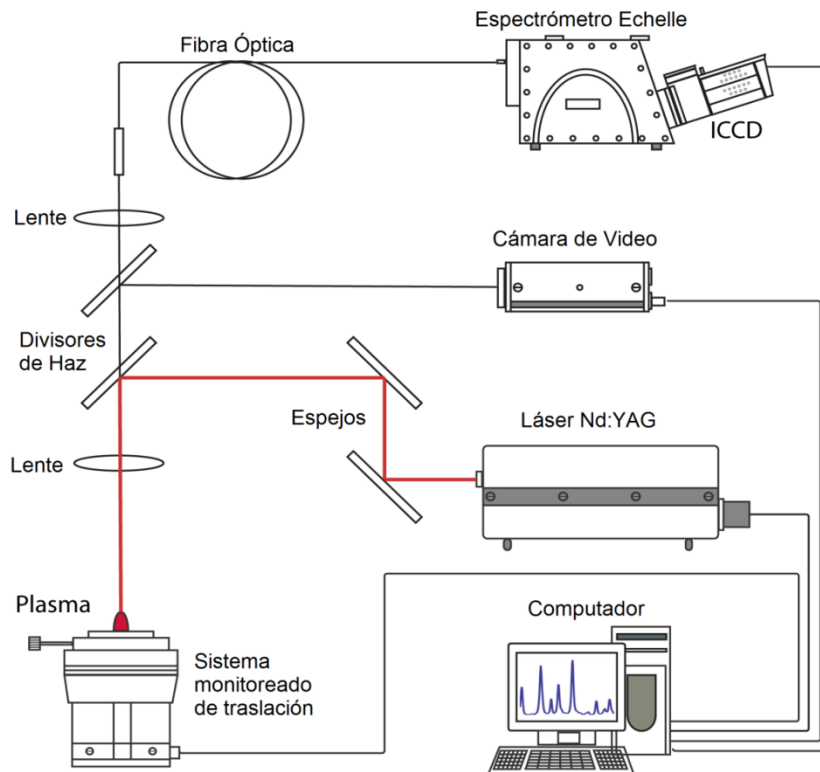


Figura 4.1.1. Diagrama de Equipo de LIBS usado [38].

actuara como aislante térmico. El espectrógrafo se recalibró en dos etapas. En la primera se reconstruyó la curva de calibración del espectrógrafo utilizando como patrón el espectro de emisión de una lámpara de vapor de Hg/Ar. En la segunda se llevó a cabo la corrección de la eficiencia relativa de la red echelle, utilizando para ello una fuente calibrada de Halógeno-Deuterio con un rango espectral de 215-2500 nm, modelo DH-2000 de la casa fabricante Ocean-Optics.

Para conocer la energía del haz de láser se utilizó un medidor de potencia y energía Field Max II Top de la casa Coherent, equipado con un sensor o cabezal J50MB de la misma casa. Adicionalmente, el medidor tuvo acoplado un expansor de haz que disminuye la posibilidad de daño superficial sobre el sensor.

Como la altura es un criterio fundamental en cada análisis LIBS y la muestra no era totalmente plana, se dispuso de una pequeña caja de plástico cerrada a la que se le abrió un agujero de forma cuadrada en la superficie, de un tamaño más pequeño que la muestra para que esta no saliera por dicho orificio. Se colocó un trozo de goma espuma de las mismas dimensiones de la caja de plástico dentro de la última que permitió llevar a altura constante la superficie de la sección de coral a utilizar (figura 4.1.3.a.). De la misma forma, se elaboró también una pequeña caja de plástico para el análisis a altura constante de los patrones comprimidos multielementales de distinto grosor (véase figura 4.1.3.b.).



Figura 4.1.2. Imágenes de equipo LIBS: a) Fuente y cabeza del láser; b) Sistema de traslación X-Y-Z, óptica para la conducción del haz de láser y para la recolección de la emisión del plasma, y computador; c) Cámara de observación; d) Espectrográfo con revestimiento aislante, sistema de enfriamiento y cámara ICCD.

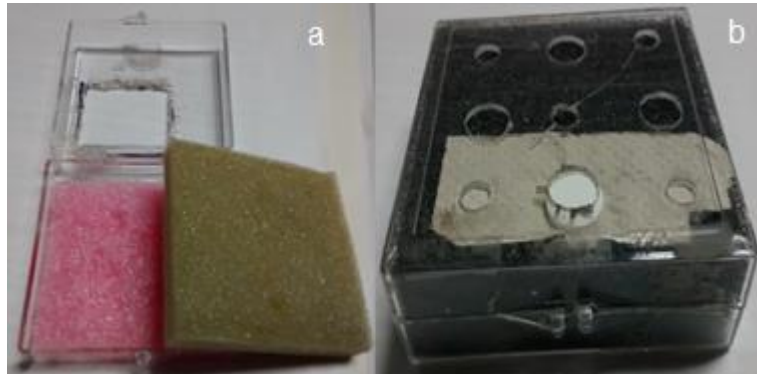


Figura 4.1.3. Caja porta muestra que permitió realizar análisis LIBS a altura constante: a) los trozos de coral; b) los patrones comprimidos multielementales.

4.2. Muestreo.

El espécimen de coral *Montastraea annularis* fue suministrado por el Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. El muestreo se realizó el arrecife de Playa Mero, Cayo de Animas (10° 59' 12" N, 68° 15' 02" O) en el Parque Nacional Morrocoy, Edo. Falcón (véase figura 4.2.1.), Este Parque Nacional consta de 320,9 Km² y está localizado en la costa oeste de Venezuela. La muestra coralina fue recolectada en el año 2001 [39] en una colonia de esta especie que probablemente murieron en el año 1999.

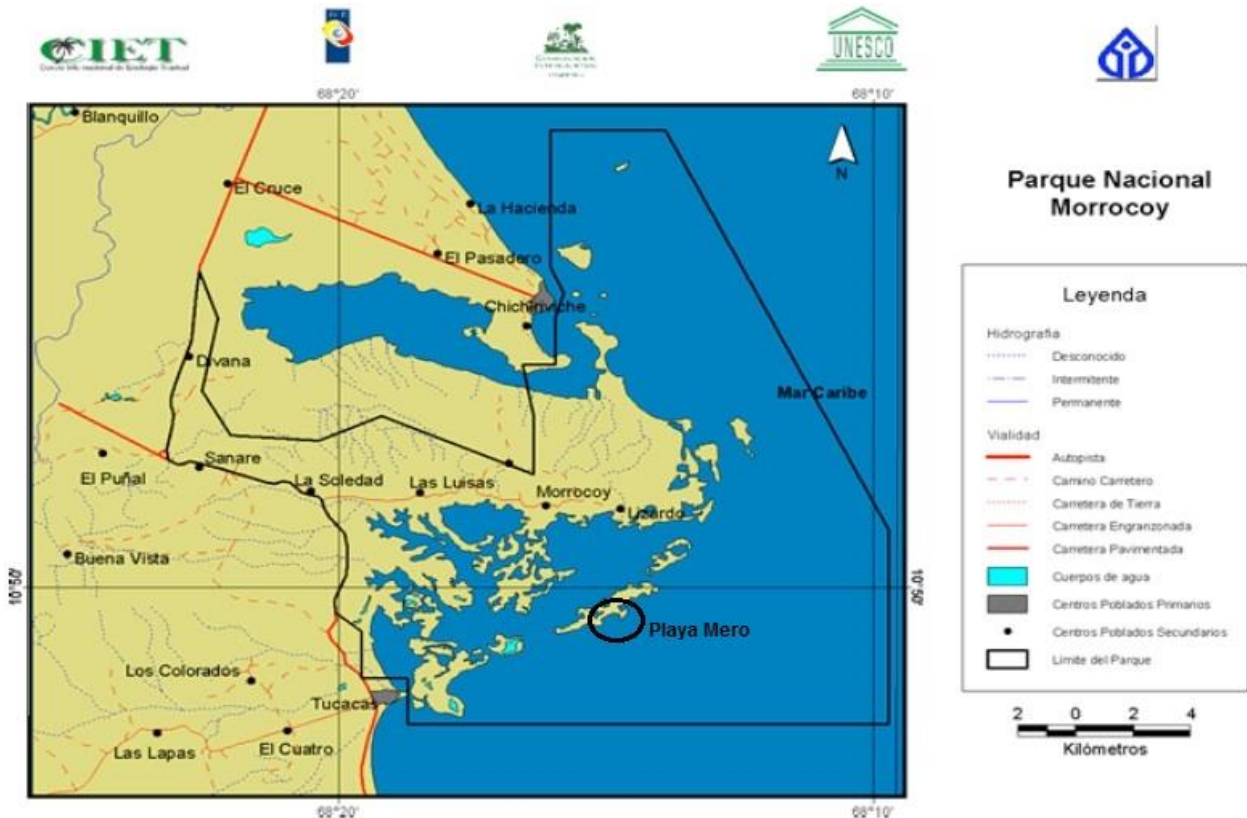


Figura 4.2.1. Cartografía del Parque Nacional Morrocoy donde se realizó el muestreo [40].

4.3. Pre-tratamiento de la muestra de coral.

La muestra de coral se encontraba cortada a lo largo de su eje de mayor crecimiento en una lámina de alrededor de 6 mm de espesor y 19 cm de altura, con un disco de diamante de alta velocidad, para evitar incrustaciones metálicas durante el corte. Después, para eliminar la materia orgánica sobre esta lámina, se sumergió completamente en 900 mL de una mezcla agua destilada - 10% NaOH - 1% H₂O₂, y se colocó en ultrasonido por 1 hora. Esto permitió además retirar contaminantes sin afectar las relaciones elementales en el coral. Se retiró luego del ultrasonido y se dejó reposar

esta muestra de coral en la mezcla por 24 horas. Se realizaron lavados sucesivos con agua destilada en ultrasonido y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una imagen de rayos X de tamaño real de la muestra para revelar sus distintas bandas de crecimiento anual. Se marcaron sobre la superficie de la lámina las bandas de crecimiento claramente visibles en la radiografía y se cortó la muestra en distintos trozos de aproximadamente 6 cm x 6 cm, adecuados para las dimensiones de la base porta muestra del sistema, como se muestra en la Figura 4.3.1.



Figura 4.3.1. Secciones del coral muestra y sus bandas de crecimiento marcadas sobre la superficie. Las bandas de crecimiento del coral fueron reveladas bajo Rayos X.

4.4. Preparación de estándares multielementales sólidos.

Se prepararon estándares multielementales sólidos, fabricando comprimidos que poseían distintas proporciones de las relaciones molares Mg/Ca y Sr/Ca en un rango de 2,5 a 15,0 mmol/mol y de 5,0 a 15,0 mmol/mol, respectivamente. La preparación de los comprimidos se realizó primero pesando estándares de MgCO_3 y SrCO_3 en cantidades que permitieron que cada mezcla tuviera la proporción adecuada de cada relación metálica, en base a 5 g de CaCO_3 estándar. Las sales MgCO_3 , CaCO_3 y SrCO_3 tenían purzas de 99,8%, 99,8% y 99,2%, respectivamente, y fueron colocadas en la estufa por una noche a 90°C para eliminar agua de estas, y fueron almacenadas en un desecador. Luego, se homogenizó cada mezcla de sales en un molino de bolas por 10 min a 875 ciclos/minuto. Por último, se elaboraron los comprimidos multielementales, soportados en H_2BO_3 , en una prensa neumática a una presión de 2.700 psi por 20 min. Esta prensa estaba dotada de un troquel que permitió soportar el molde de la pastilla, de 1,5 cm de diámetro. Los intervalos de concentraciones, mencionados al inicio de este párrafo, se obtuvieron de las ecuaciones de Wei, G., y otros, para Mg/Ca (ec. 2.4.5), y Flannery, J., y Poore, R., para Sr/Ca (ec. 2.4.8), al colocar un rango mayor al rango estimado de las temperaturas a las que pudo estar sometido el coral durante sus años de vida. La concentración real de estos estándares fue determinada por pesada.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Selección de las líneas de emisión.

Como se mencionó anteriormente, las bandas de crecimiento anuales de los corales se producen por ciclos de formación del esqueleto calcáreo debido a la precipitación de aragonita (CaCO_3). Además, metales disueltos en el océano como Mg y Sr coprecipitan con la aragonita como carbonatos en función de la temperatura [19]. Para cuantificar estos elementos en cada banda de crecimiento de la muestra y en los patrones multielementales, se utilizaron las líneas de emisión reportadas en la literatura [4] [10], y otras fueron tomadas de la base de datos de la NIST [41]. Las líneas de emisión seleccionadas se muestran en la tabla 5.1.1.

Tabla 5.1.1. Especies químicas y longitudes de onda (λ) de las correspondientes líneas de emisión identificadas.

Línea espectral	Longitud de onda, λ (nm)
Mg I	285,213
Mg II	279,553
Ca I	445,478
Ca I	585,745
Ca I	714,815
Ca II	373,690
Sr I	460,733
Sr II	407,771

Los criterios para la selección de las líneas iónicas (líneas II, tabla 5.1.1) de los tres metales alcalinotérreos se basaron en la intensidad, la resolución y la ausencia de autoabsorción. Las líneas de emisión de Ca 393,36 y 396,84 nm, las cuales se reportan como las líneas más intensas en los espectros LIBS, presentaron autoabsorción, como se muestra en la figura 5.1.1. El fenómeno de autoabsorción se presenta por una alta concentración de las especies en la región más caliente del plasma y su emisión es absorbida por átomos ubicados en regiones más frías del plasma. Esto se observó en el espectro como una inversión en el centro del perfil de emisión [31]. La línea de Ca I, 422,67 nm, presentó interferencia con la línea de Sr a 422,470 nm. De esta manera, se descartó el uso de estas líneas.

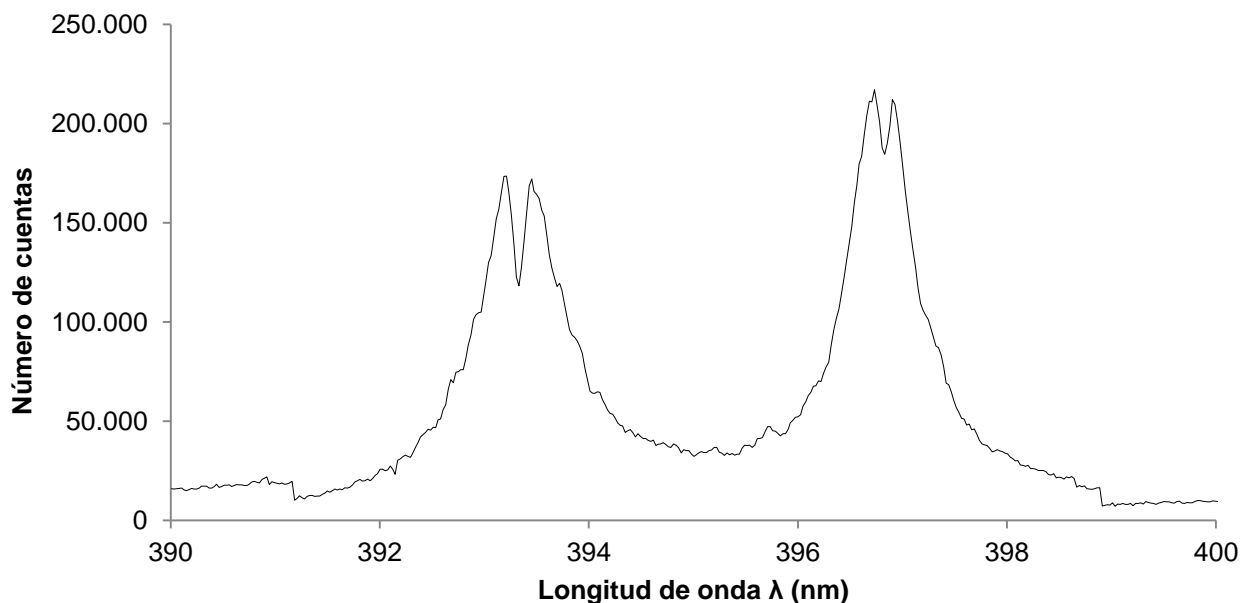


Figura 5.1.1. Espectro de sección del coral que muestra autoabsorción de átomos de Ca en las líneas iónicas más intensas a longitudes de onda de 393,36 y 396,84 nm. Coordenadas de la gráfica: intensidad de emisión en número de cuentas vs longitud de onda en nm.

5.2. Optimización de las variables experimentales.

Para obtener el rango de trabajo de las distintas variables de operación del sistema se realizaron barridos de cada variable manteniendo fijos los restantes parámetros y se tomaron los espectros LIBS. Se utilizó como muestra una sección del coral (distinta de la lámina muestra seccionada). Las condiciones de trabajo se muestran en la tabla 5.2.1. A partir de los espectros obtenidos en estos barridos se aprovechó para realizar un análisis univariado preliminar de la relación S/R con respecto a las variables estudiadas. Los valores seleccionados sirvieron como punto de partida para un análisis multivariado posterior.

Tabla 5.2.1. Condiciones experimentales establecidas para cada barrido de variables.

Variable	Valores utilizados en el barrido	Valor fijo para el estudio de las otras variables
Tiempo de demora (ns)	50, 75, 100, 200, 500, 800, 1000	200
Ancho de compuerta (μ s)	1 - 6	4
Ganancia	125, 150, 175, 200	175
Pulsos por segundo (1/s)	1,67; 2,00; 2,50; 3,33; 5,00; 10,00	10,00
Velocidad de base (plano horizontal) (mm/s)	0,20; 0,35; 0,50; 0,65; 0,80; 1,00	0,50
Energía del láser (mJ)	20 - 33	32,8

Las líneas utilizadas fueron Mg II a 279,553 nm, Ca II a 373,690 nm y Sr II a 407,771 nm, elegidas por su alta intensidad. Las intensidades de las líneas fueron corregidas restando el fondo del espectro. El fondo se calculó aplicando el promedio de

la intensidad en regiones cercanas a las líneas de interés donde no se observaron señales, como se describe en la tabla 5.2.2. La relación S/R se calculó como la relación entre la razón de las intensidades corregidas Sr/Ca y Mg/Ca sobre dos veces la desviación estándar de las intensidades en las regiones de la tabla 5.2.2. Se utilizó el programa Microsoft Excel para los cálculos. En la figura 5.2.1. se muestra uno de los espectros LIBS utilizados, y las figuras 5.2.2.a, b y c reflejan las zonas usadas para el cálculo de ruido de las líneas iónicas de Mg, Ca y Sr, respectivamente.

Tabla 5.2.2. Secciones del espectro utilizados para el cálculo de la relación S/R para las líneas iónicas de Mg, Ca y Sr.

Línea de emisión	Mg II a 279,553 nm	Ca II a 373,690 nm	Sr II a 407,771 nm
Rango de longitudes de onda para cálculo de S/R	(278,5 – 279,0) nm	(368,0 – 368,5) nm	(408,5 – 409,0) nm

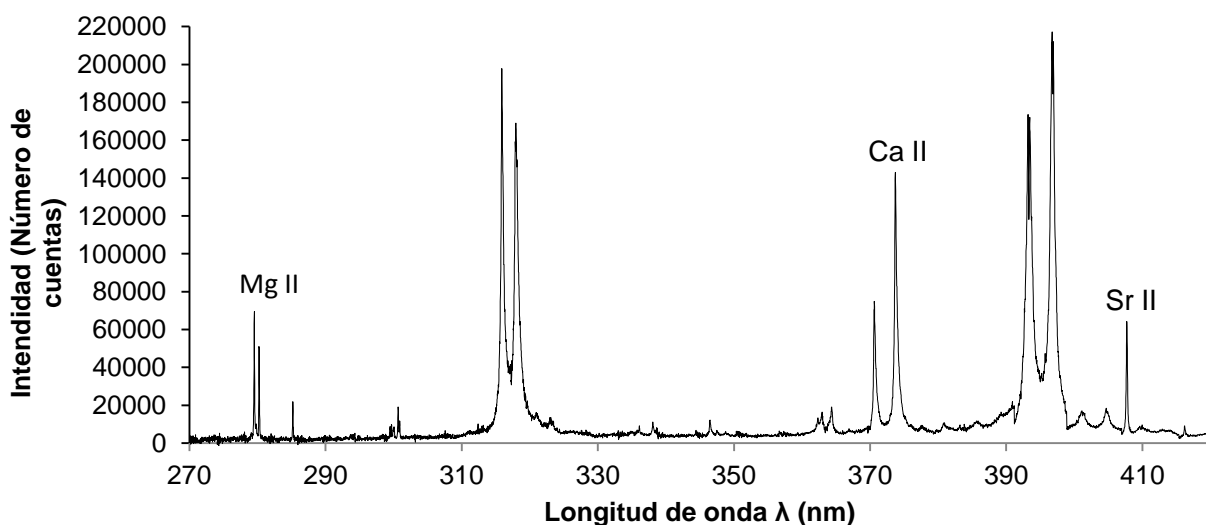


Figura 5.2.1. Espectro de sección de coral donde se observan las líneas iónicas de Mg, Ca y Sr. Rango de longitudes de onda: 270-420 nm.

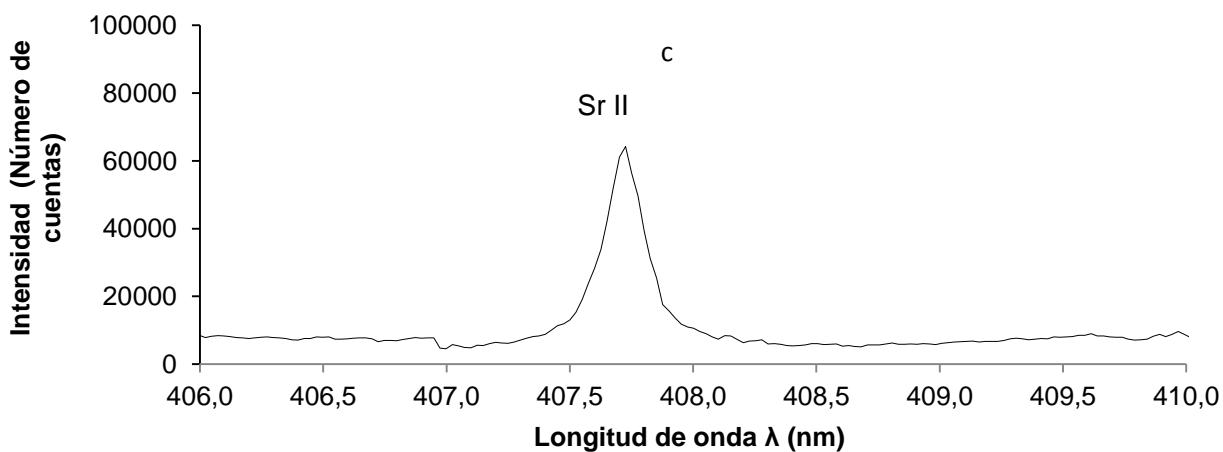
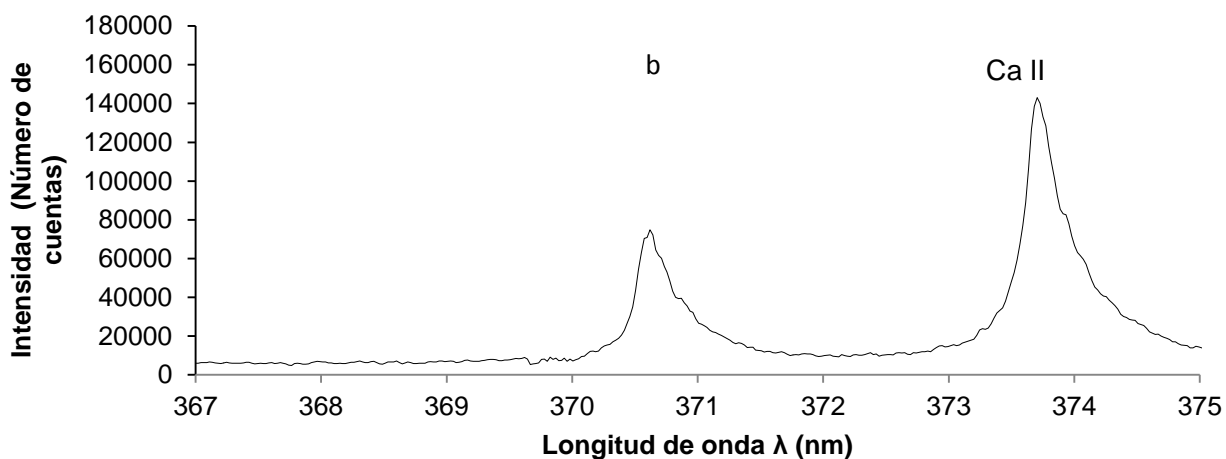
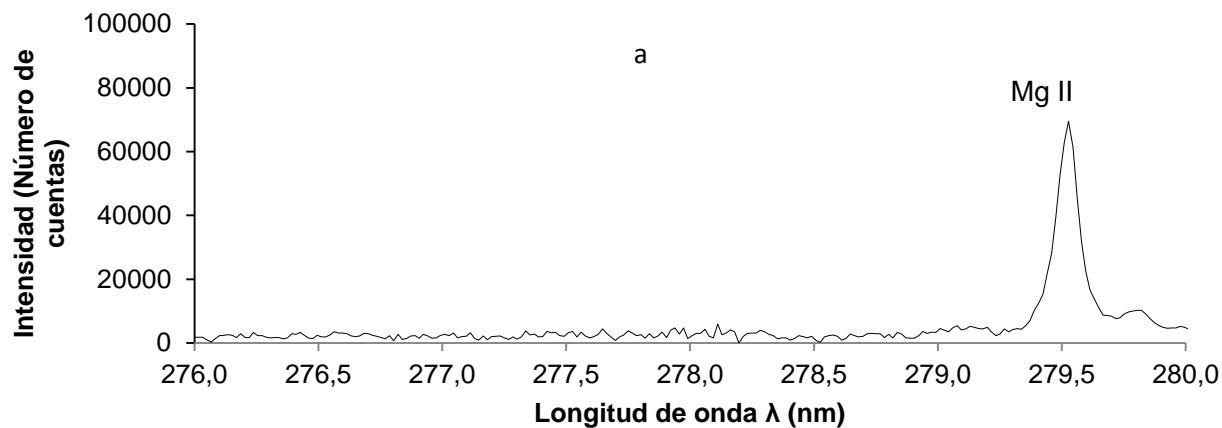


Figura 5.2.2. Ampliaciones de espectro de sección de coral donde se observan las líneas iónicas y las zonas usadas para el cálculo de ruido para a) Mg, b) Ca y c) Sr.

El estudio mostró que independientemente de las condiciones utilizadas las relaciones S/R presentaron la siguiente tendencia $Ca > Sr > Mg$. Las gráficas de la relación S/R en función de las variables que muestran este comportamiento mencionado se anexan en el Apéndice 8.1. Los resultados arrojados de la mejor relación S/R para el barrido de tiempo de demora indicaron que no podía encontrarse un valor en común de este parámetro para el análisis simultáneo de las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca usando estas líneas de emisión. Se establecieron como tiempos de demora óptimos a 100 ns y 500 ns para el análisis de las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca, respectivamente. Se seleccionó como ancho de compuerta temporal óptimo 4 μ s. Para el barrido de ganancia se eligió 150 de ganancia. La frecuencia de pulsos del láser se eligió el valor de 2,50 pulsos por segundo para evitar ocasionar daño a los patrones y al coral. Para la velocidad del barrido de ablación sobre la superficie (velocidad de raster), se tomó como óptimo 0,50 mm/s. Por último, el valor de energía del láser óptimo fue de 26,5 mJ, tomando en cuenta para su selección el ocasionar el menor daño posible a los patrones y al coral. Los valores reportados de energía se determinaron promediando la energía de 100 pulsos de láser. En la tabla 5.2.3. se presentan los valores seleccionados.

Tabla 5.2.3. Valores óptimos de cada variable experimental obtenido de los barridos de condiciones evaluando la mejor relación S/R para las líneas iónicas de Mg, Ca y Sr.

Variable experimental	Valor óptimo
Tiempo de demora (ns)	100 (Mg/Ca) y 500 (Sr/Ca)
Ancho de compuerta (μ s)	4
Ganancia	150
Pulsos por segundo (1/s)	2,50
Velocidad de base (plano horizontal) (mm/s)	0,50
Energía del láser (mJ)	26,5

Como se describió en la sección instrumental, los focos del haz del láser y la fibra óptica coinciden en un lugar en el espacio. Así que la superficie de la muestra debe ser transportada hasta ese punto. El diámetro del haz de láser sobre la superficie es ajustado utilizando el control horizontal de la base de traslación. El valor de altura que arrojó el mejor valor de relación S/R se definió como la altura óptima y se asignó como cero (0) en las coordenadas relativas del software controlador de dicha base. Gracias al uso del porta muestra y con este valor de origen siempre se alcanzaba el mismo valor de diámetro del haz sobre la superficie a muestrear

Luego de obtener las condiciones óptimas de análisis mediante el barrido de condiciones, el aire acondicionado del Laboratorio de Espectroscopía Láser se dañó. La temperatura de análisis es un factor muy importante en el análisis LIBS debido a la sensibilidad del material óptico a los cambios de temperatura; y el no control de esta conlleva a errores analíticos. Por esto, el espectrógrafo usado requirió de una calibración a 25 °C, y permitió realizar análisis con esa calibración siempre y cuando no excediera los límites del rango de la temperatura de calibración ± 4 °C.

Seguidamente de la nueva calibración del espectrógrafo, se decidió hallar nuevamente condiciones óptimas para análisis del coral muestra y para la elaboración de la curva de calibración utilizando distintos patrones multielementales, pero a esta nueva calibración y utilizando la técnica de Superficie de Respuesta (MSR) para indicar tendencias de sistemas complejos multivariados como lo fue este caso. El diseño experimental se aplicó a las variables de detección (tiempo de demora, ancho de compuerta temporal y ganancia); se mantuvieron fijas la velocidad de barrido del plano horizontal de la base porta muestra del sistema, la cantidad de pulsos de láser por segundo y la energía del láser, a los valores óptimos hallados anteriormente con los barridos de condiciones, mostrados en la tabla 5.2.3., para mantener una velocidad adecuada para el análisis, como también para ocasionar el menor daño al coral y a los patrones. Se utilizó como muestra un patrón multielemental previamente homogenizado

de composición 4,4385 mmol Mg/mol Ca, 9,3098 mmol Sr/mol Ca. Para facilitar el análisis de los resultados, las tres variables fueron codificadas utilizando los valores +1 y -1 como los niveles del diseño factorial y +1,68 y -1,68 para los valores del diseño en estrella. Las 22 combinaciones de valores de condiciones experimentales que constituyeron el Diseño Compuesto Central, se muestran en la tabla 5.2.4. Estas 22 combinaciones incluyeron 8 para el diseño factorial, 6 para el diseño en estrella y 8 puntos centrales. En la tabla 5.2.5 se muestran los valores de las variables en su métrica original. La respuesta a optimizar fue la relación S/R de las razones de la intensidad corregida de Mg/Ca y Sr/Ca. Se utilizó el ambiente R para desarrollar el programa de diseño y análisis de los resultados y se muestra en el apéndice 8.2. y 8.3. Los rangos de cada variable se establecieron en función de los puntos centrales asignados como 100 de ganancia, 5 μ s de ancho de compuerta y 500 ns de tiempo de demora; y los rangos implementados fueron 20 de ganancia, 1 μ s de ancho de compuerta y 250 ns de tiempo de demora.

Las 22 corridas experimentales se realizaron de manera aleatoria. Las superficies de respuestas obtenidas tenían k+1 dimensiones, esto fue 4, por lo que se muestran distintas superficies de 3 dimensiones manteniendo una variable fija en la figura 5.2.3. Las superficies obtenidas para ambas relaciones Mg/Ca y Sr/Ca y para las combinaciones ganancia-ancho de compuerta, ganancia-tiempo de demora y ancho de compuerta-tiempo de demora, mostraron una alta interacción entre ambas variables. Los modelos sin embargo presentaron una falta de ajuste significativa. Esto fue debido a que las diferencias observadas entre los valores extremos fueron pequeñas (10% <) para la precisión del método. Los resultados no permitieron obtener condiciones óptimas para las dos relaciones elementales.

Tabla 5.2.4. Variables codificadas en el Diseño experimental.

Puntos experimentales	Ganancia	Ancho de compuerta	Tiempo de demora
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	-1,68	0	0
14	1,68	0	0
15	0	-1,68	0
16	0	1,68	0
17	0	0	-1,68
18	0	0	1,68
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0

Tabla 5.2.5. Valores correspondientes a cada variable del Diseño Central Compuesto.

Puntos experimentales	Ganancia	Ancho de compuerta (μ s)	Tiempo de demora (ns)
1	80	4	250
2	120	4	250
3	80	6	250
4	120	6	250
5	80	4	750
6	120	4	750
7	80	6	750
8	120	6	750
9	100	5	500
10	100	5	500
11	100	5	500
12	100	5	500
13	66	5	500
14	134	5	500
15	100	3,32	500
16	100	6,68	500
17	100	5	80
18	100	5	920
19	100	5	500
20	100	5	500
21	100	5	500
22	100	5	500

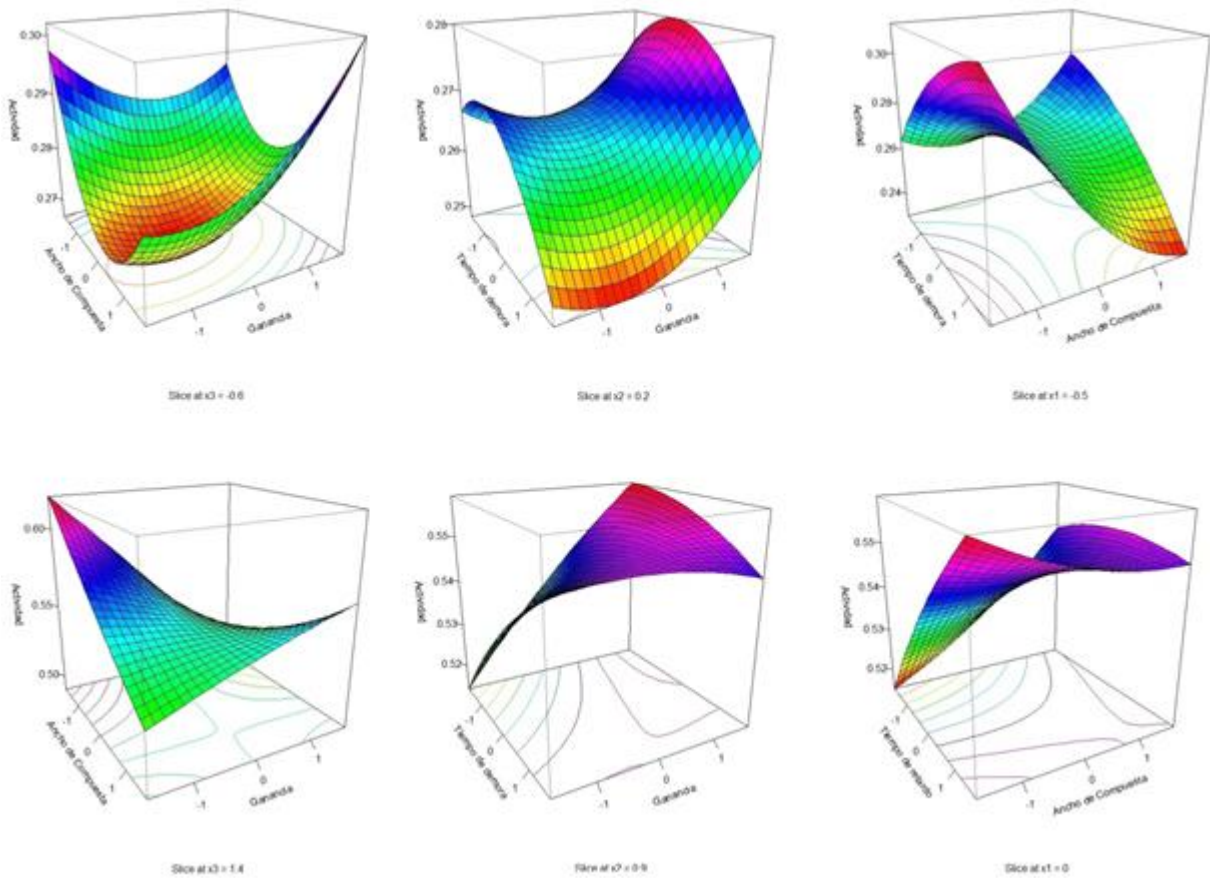


Figura 5.2.3. Superficies de respuesta obtenidas para las relaciones S/R de Mg/Ca (imágenes superiores) y Sr/Ca (imágenes inferiores) como actividad. En las imágenes de la izquierda, la variable fija fue tiempo de demora (x_3); en las imágenes centrales fue ancho de compuerta (x_2); y en las imágenes de la derecha fue la ganancia (x_1). Los valores de las variables fijas representan las coordenadas codificadas de los puntos estacionarios.

Aunque el programa arrojó un punto estacionario para cada relación metálica representando los puntos de críticos hallados por el método, los cuales se muestran en la tabla 5.2.6., estos no pudieron ser utilizados por la falta de ajuste del modelo. Sin embargo, hubo una coincidencia entre la tendencia obtenida con este método y con la conseguida mediante los barridos de condiciones, los valores de tiempo de demora

mostraron valores muy distintos para cada relación metálica, lo que indicó que se necesitaban dos condiciones de análisis distintas para cada relación. Cuando los valores óptimos para cada respuesta se localizan en diferentes regiones, es más difícil encontrar las condiciones que cumplan simultáneamente todas las respuestas, y se dificulta más mientras se hagan más distantes [36]. Probablemente, para este análisis las superficies no encontraron su óptima relación con el mismo conjunto de condiciones experimentales debido a que las relaciones óptimas estaban muy distantes una de las otras.

Tabla 5.2.6. Puntos estacionarios encontrados por el Método de Superficie de Respuesta (MSR) para las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca.

Relación metálica	Ganancia	Ancho de compuerta (μ s)	Tiempo de demora (ns)
Mg/Ca	89	5	353
Sr/Ca	100	6	859

Dados estos resultados se decidió buscar, para cada relación metálica, las condiciones experimentales que permitieran obtener las curvas de calibración con mejores parámetros estadísticos y analíticos.

5.3. Curvas de calibración

Para elaborar las curvas de calibración se utilizaron los patrones presentados en la tabla 5.3.1. Los valores marcados con un asterisco tuvieron que ser preparados luego de observar los valores de relaciones obtenidos en la muestra de coral. Este punto se considerará más adelante. La concentración de estos comprimidos fue determinada

gravimétricamente. En el apéndice 8.4. se encuentran las masas pesadas de cada estándar utilizado para la preparación de los patrones multielementales. Se prepararon varios comprimidos de cada patrón para reemplazar aquellos comprimidos que su superficie estuviese muy ableadada, debido a que esto influía en la formación de plasmas a la altura constante establecida como óptima con el porta muestra, influyendo de esta manera en la disminución de la relación S/R. Los espectros de estos comprimidos mostraron características muy similares a las presentes en los espectros de la muestra de coral usada previamente, especialmente la presencia y forma de las señales de emisión (picos) correspondientes a los metales de interés, requisito indispensable para utilizar los patrones en la calibración

Tabla 5.3.1. Concentraciones de las relaciones metálicas en cada patrón multielemental.

Patrón	Concentración Mg/Ca (mmol/mol)	Concentración Sr/Ca (mmol/mol)
0	2,5164 *	15,0251 *
1	3,2758	9,5535
2	3,8456	9,4055
3	4,4385	9,3098
4	4,9609	9,0140
5	5,5079	8,8539
6	14,9816 *	5,0001 *

* Patrones preparados a posteriori fuera del rango determinado por las ecuaciones paleotermométricas.

Luego de disponer de todos los patrones, se procedió a realizar nuevos barridos de tiempo de demora y ancho de compuerta temporal, manteniendo fijo la ganancia a 150 y los valores óptimos hallados anteriormente de velocidad de barrido del plano horizontal de la base porta muestra del sistema, la cantidad de pulsos de láser por

segundo y la energía del láser, a 0,50 mm/s, 2,5 y 26,5 mJ, respectivamente. Para determinar las condiciones óptimas de análisis de Mg se realizó un barrido variando el tiempo de demora desde 100 ns a 500 ns, manteniendo fijo el ancho de compuerta a 4 μ s; y para determinar las condiciones óptimas de análisis de Sr se mantuvo fijo el ancho de compuerta a 7 μ s, y se varió el tiempo de demora entre 100 ns y 1000 ns. Cada patrón se midió por triplicado y de forma aleatoria. El código R utilizado para este análisis se muestra en el apéndice 8.2. Este código permitió monitorear las distintas líneas de emisión (véase tabla 5.1.1.), determinar ruido, fondo y efectuar una aproximación Lorentziana para simular la forma de cada línea de emisión y así determinar el área de cada línea. Finalmente, con estos datos obtenidos de los espectros, se procedió a realizar las curvas de calibración para cada valor de barrido, utilizando relaciones de áreas de distintas líneas de emisión, en función de la concentración de los patrones. Los valores de tiempo de demora y ancho de compuerta obtenidos de las mejores rectas logradas por el método de mínimos cuadrados fueron los establecidos como óptimos para el análisis de los patrones y del coral, como se muestran en la tabla 5.3.2.

Tabla 5.3.2. Condiciones de detección óptimas de cada relación metálica obtenidas de las mejores curvas de calibración con su respectivo coeficiente de determinación, R^2 .

Relación metálica	Tiempo de demora (ns)	Ancho de compuerta (μ s)	Coficiente de determinación R^2
Mg/Ca	200	4	0,9682
Sr/Ca	1000	7	0,6868

A estas condiciones halladas se pudo observar que a medida que aumenta el tiempo de demora disminuyeron las intensidades generales en el espectro, y las líneas iónicas mostraron este comportamiento más pronunciado, como era de esperar. Por esto, a tiempo de demoras grandes las líneas atómicas se vuelven más importantes

para un análisis LIBS. En las figuras 5.3.1. y 5.3.2. se muestran los espectros LIBS de un mismo patrón multielemental (patrón 3) a las condiciones óptimas del análisis de Mg y a las condiciones óptimas del análisis de Sr, respectivamente, donde se evidencia el comportamiento mencionado, además de la forma del espectro de los comprimidos a distintos tiempos de demora y ancho de compuerta temporal. Además, este estudio arrojó que los barridos realizados mostraron a 100 ns de tiempo de demora una disminución considerable en la relación S/R en comparación a las mejores relaciones S/R halladas a los 200 y 1000 ns para Mg y Sr, respectivamente. Esto fue debido a que a tiempos menores de 100 ns de tiempo de demora aún se observó emisión de radiación continua, lo que disminuye considerablemente la relación S/R e inclusive no permite observar las líneas de interés a tiempos más pequeños [31].

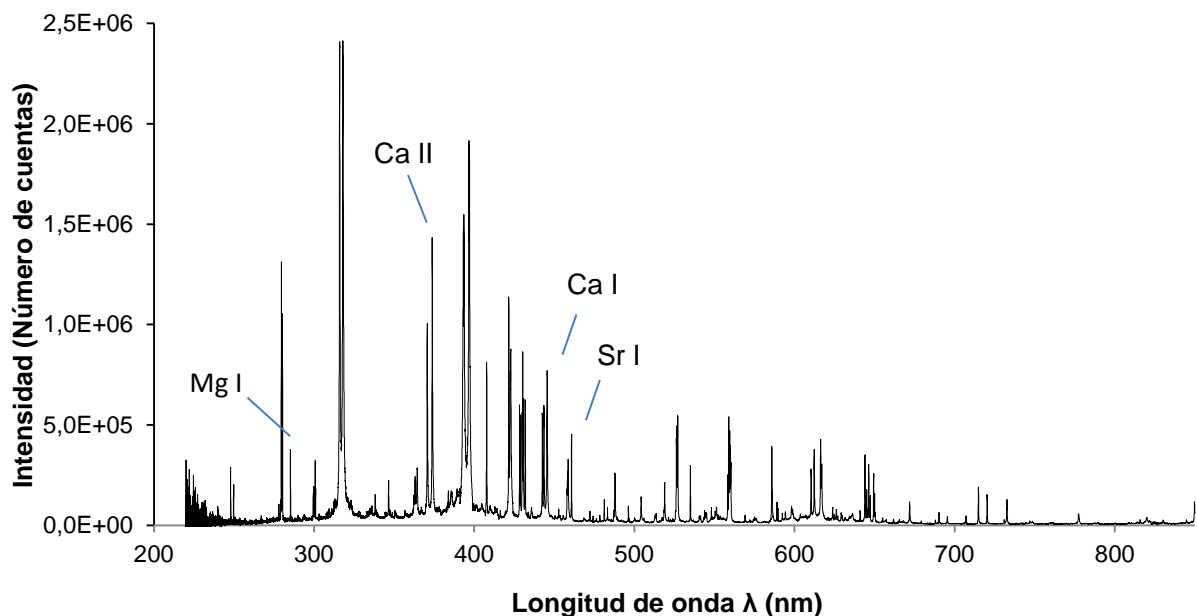


Figura 5.3.1. Espectro LIBS del patrón 3 multielemental a 200 ns de tiempo de demora y 4 μ s de ancho de compuerta temporal (condiciones de análisis de la relación Mg/Ca). Coordenadas de la gráfica: intensidad de emisión en número de cuentas vs longitud de onda en nm.

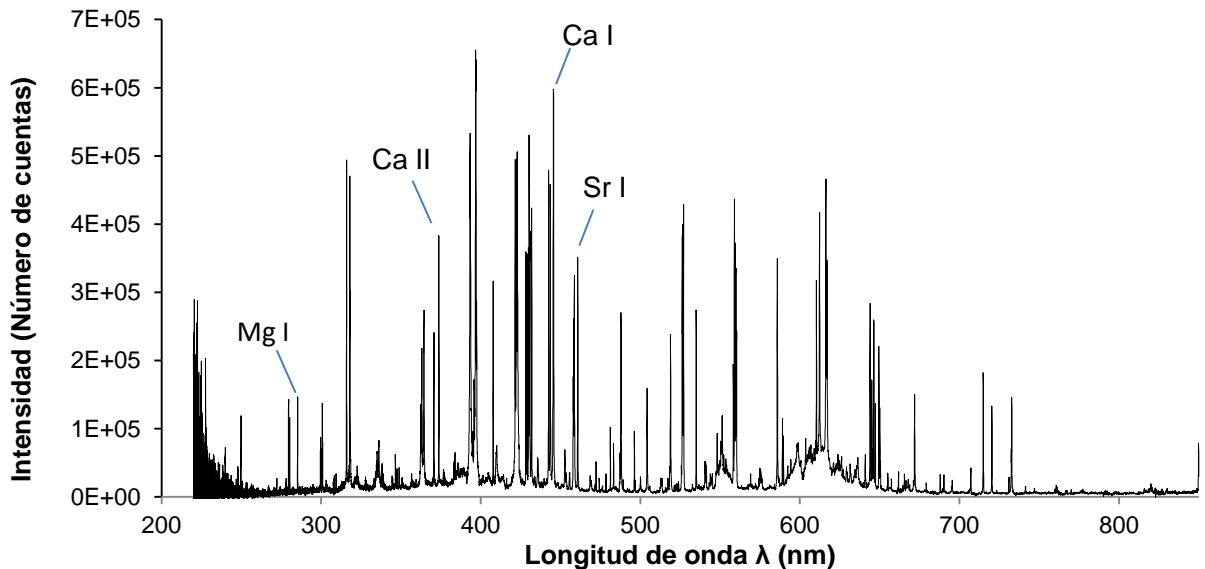


Figura 5.3.2. Espectro LIBS del patrón 3 multielemental a 1000 ns de tiempo de demora y 7 μ s de ancho de compuerta temporal (condiciones de análisis de la relación Sr/Ca). Coordenadas de la gráfica: intensidad de emisión en número de cuentas vs. longitud de onda en nm.

En la figura 5.3.3 se muestran a modo de ejemplo señales de Mg I a 285,213; Ca II a 373,690; Sr I a 470,633 y Ca I a 445,478 y superpuesta sobre ellas la aproximación Lorentziana. Las imágenes a y b reflejan las líneas utilizadas para el análisis de la relación Mg/Ca, y las imágenes c y d muestran las utilizadas para el análisis de la relación Sr/Ca. Se utilizó regresión no lineal como método de ajuste. Las dos líneas de Ca (b y d) utilizadas mostraron un desvío de la forma de la curva, mayormente pronunciado para la especie Ca II; sin embargo, este comportamiento se compensó para ambas líneas debido a que el área entre las curvas y los puntos experimentales por encima y por debajo de la Lorentziana fueron aproximadamente iguales, permitiendo de esta manera no descartar estas líneas. Mientras tanto, el ruido se estimó como la desviación estándar de la señal en una región aislada, como lo fue la zona de 465,0 a 467,0 nm; no se utilizó esta vez las zonas de ruido cercanas a cada pico de in-

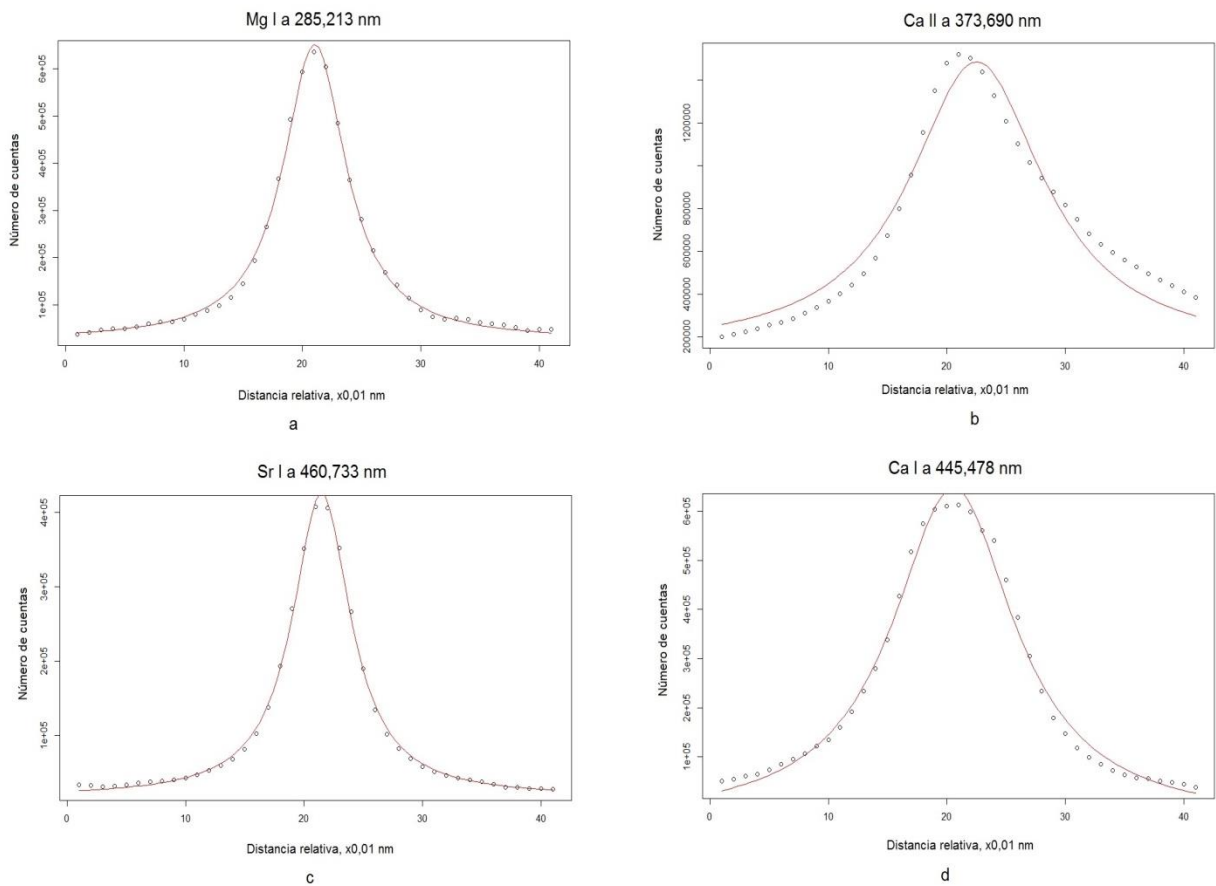


Figura 5.3.3. Aproximación Lorentziana de las especies utilizadas para los análisis de las relaciones Mg/Ca (figura a y b) y Sr/Ca (figura c y d). Curva del modelo estimado, línea continua; intensidades originales, círculos abiertos.

terés, como se realizó anteriormente, debido a que el ruido de esta nueva zona seleccionada se aproximó bastante al ruido cercano de cada línea de interés.

Las líneas de emisión que permitieron obtener curvas de calibración con los estándares externos con el mayor coeficiente de determinación, R^2 , se muestran en la tabla 5.3.3. denotadas con los superíndices a y b para las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca, respectivamente. Con los parámetros de la regresión lineal (véase tabla 5.3.4.) se pudo estipular que las curvas de calibración con estándares externos fue muy buena para el

análisis de Mg y un poco pobre para el análisis de Sr. Las curvas de calibración de los estándares externos obtenidas mediante el método de mínimos cuadrados se muestran en el apéndice 8.5.

Tabla 5.3.3. Especies químicas y longitudes de onda (λ) de las correspondientes líneas de emisión usadas.

Línea espectral	Longitud de onda, λ (nm)
Mg I ^a	285,213
Ca I ^b	445,478
Ca II ^a	373,690
Sr I ^b	460,733

^aMg/Ca

^bSr/Ca

Tabla 5.3.4. Parámetros de la regresión lineal de las curvas de calibración de las relaciones metálicas Mg/Ca y Sr/Ca.

Relación metálica	Pendiente	Error de la Pendiente	Punto de Corte	Error del Punto de Corte	Coefficiente de determinación R ²
Mg/Ca	0,009275	0,000385	0,100724	0,002650	0,9682
Sr/Ca	0,009488	0,001470	0,211752	0,014453	0,6868

Ya con las curvas de calibración realizadas, el siguiente paso realizado fue el análisis del espécimen *Montastraea annularis*.

5.4. Análisis del espécimen *Montastraea annularis*

Con los valores óptimos obtenidos anteriormente para las curvas de calibración, los cuales se resumen en la tabla 5.4.1., se procedió a determinar las relaciones de áreas de las bandas de crecimiento del espécimen coralino *Montastraea annularis*.

Tabla 5.4.1. Valores óptimos de cada variable experimental utilizados para el análisis del espécimen *Montastraea annularis*.

Variable experimental	Valor óptimo
Tiempo de demora (ns)	200 (Mg/Ca) y 1000 (Sr/Ca)
Ancho de compuerta (μ s)	4 (Mg/Ca) y 7 (Sr/Ca)
Ganancia	150
Pulsos por segundo (1/s)	2,50
Velocidad de base (plano horizontal) (mm/s)	0,50
Energía del láser (mJ)	26,5

La imagen de rayos X reveló distintas bandas de crecimiento que se pudieron observar como zonas de color oscuro (zonas de alta densidad) que fueron separadas por finas curvas de color blanco (zonas de baja densidad), como se puede observar en la figura 5.4.1., que se hicieron más difíciles de visualizar para las bandas de crecimiento más antiguas. También se observó una pequeña banda que estaba en crecimiento al momento de la muerte del coral. De esta manera, solo se pudieron marcar sobre la superficie del coral diez (10) bandas de crecimiento, donde no se incluyó la banda más nueva ya que no permitiría determinar las relaciones de áreas metálicas promedio correspondiente a todo el año. Además, el conteo de todas las bandas de crecimiento anuales definidas y poco definidas permitió estimar que la edad del coral fue de 12-14 años. Mediante las bandas definidas se determinó que el coral tuvo un crecimiento de (7 ± 1) mm/año, y un rango de crecimiento de 5 a 9 mm/año.

Asimismo, las diferencias que reveló la imagen de rayos X se deben a la ubicación mayoritaria de dos formas cristalinas de CaCO_3 , la aragonita y la calcita, las cuales se observan como las zonas de alta densidad y de baja densidad, respectivamente [42]. Las bandas fueron numeradas en orden de edad, siendo la banda uno la más antigua y por lo tanto la más cercana a la base del coral, mientras la banda diez es la más joven y extrema.

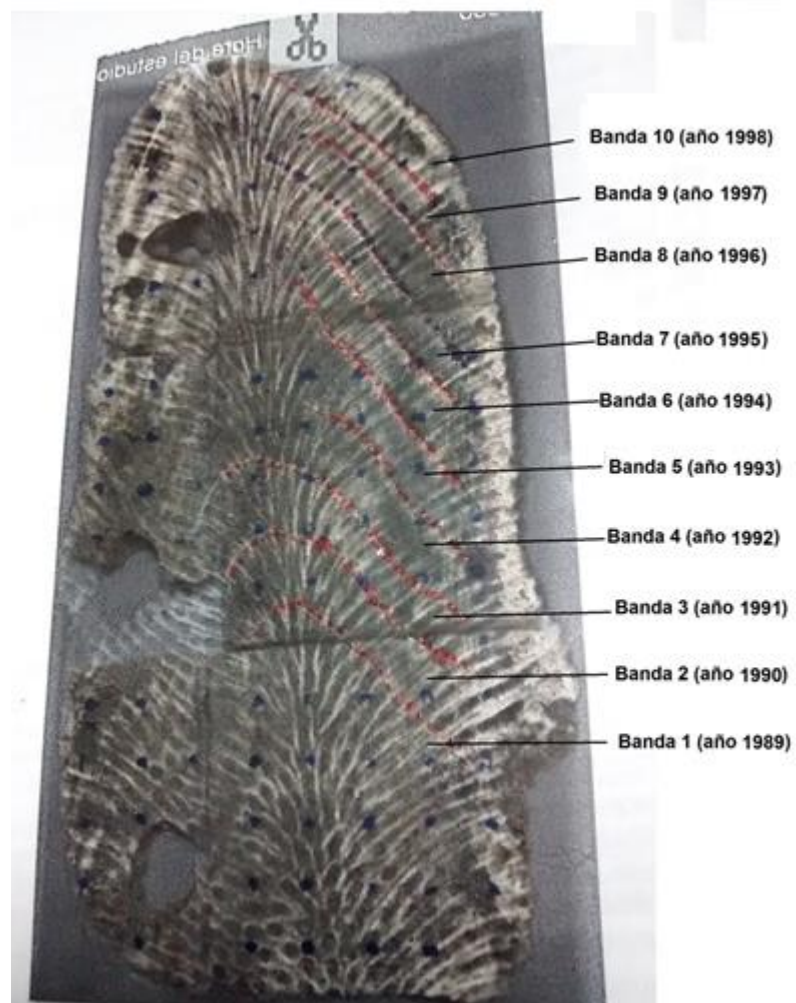


Figura 5.4.1. Imagen de rayos X del espécimen *Montastraea annularis* con sus respectivas bandas de crecimiento anuales y los años que estas representan.

El análisis de las diez (10) bandas de crecimiento se realizó de manera aleatoria, se realizaron réplicas, y también se midió un mismo patrón luego de cada análisis de una banda, para que la variación de la energía del láser no marcara una tendencia sobre los resultados de bandas consecutivas y aumentar así la precisión de la medida. Este método de medida de muestra-patrón-muestra descrito por Schrag (1999) permitió normalizar la respuesta del coral para compensar la fluctuación de las señales, mediante el uso de las relaciones de áreas metálicas del patrón multivariado 3 medido entre el promedio de las relaciones de áreas metálicas del patrón usado [25]. Las tablas 5.4.2. y 5.4.3. muestran las concentraciones determinadas para cada banda de crecimiento y su perteneciente año para las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca, respectivamente. Debido a que en algunas bandas de crecimiento la concentración excedía los límites de las curvas de calibración, se prepararon patrones multielementales que permitieron obtener rangos mayores de concentraciones en la curva de calibración (patrones 0 y 6), como se mencionó en la sección 5.3. y mostró en la tabla 5.3.1.

Tabla 5.4.2. Estadístico del análisis de las relaciones metálicas Mg/Ca en el espécimen *Montastraea annularis* por cada banda de crecimiento anual.

Banda de crecimiento del coral	Año	Concentración promedio de la relación Mg/Ca (mmol/mol)	Desviación estándar de la relación Mg/Ca (mmol/mol)	Coefficiente de varianza (%)
1	1989	8,44	1,28	15,14
2	1990	10,13	1,67	16,46
3	1991	6,73	2,62	39,01
4	1992	8,76	5,91	67,46
5	1993	9,34	0,61	6,52
7	1995	17,42	5,01	28,76
8	1996	9,95	0,54	5,46
9	1997	8,83	0,56	6,35

Tabla 5.4.3. Estadístico del análisis de las relaciones metálicas Sr/Ca en el espécimen *Montastraea annularis* por cada banda de crecimiento anual.

Banda de crecimiento del coral	Año	Concentración promedio de la relación Sr/Ca (mmol/mol)	Desviación estándar de la relación Sr/Ca (mmol/mol)	Coefficiente de varianza (%)
1	1989	6,21	2,03	32,75
2	1990	5,39	2,07	38,40
4	1992	6,17	2,03	32,99
6	1994	5,98	2,04	34,16
8	1996	5,47	2,06	37,74
9	1997	5,13	2,08	40,58
10	1998	3,61	2,17	59,98

Los resultados obtenidos, reflejados en las tablas 5.4.2 y 5.4.3., muestran que la precisión del análisis LIBS varió desde 5,46 a 67,46 % para las concentraciones de la relación Mg/Ca; y desde 32,99 a 59,98 % para las concentraciones de la relación Sr/Ca. Esta gran variación de la precisión para la mayoría de las bandas se debió a la irregularidad de la superficie del coral como factor determinante de esta, además de la variación de la energía del láser durante el análisis, heterogeneidad de los metales en el coral, como también del corte realizado al coral, el cual no fue totalmente plano, causando más irregularidades sobre la superficie del esqueleto calcáreo. Naturalmente, este tipo de muestra tiene una superficie no homogénea debido a la ubicación de las coralitas, que son la base de los pólipos, parte viva de este animal. Además, el análisis de las relaciones molares Mg/Ca y Sr/Ca arrojó valores muy desviados con respecto al ajuste en las bandas 6 y 10, como en las bandas 3, 5 y 7, respectivamente, producto de los causantes de la dispersión mencionados anteriormente, por lo cual se descartó estas bandas. También, el análisis de las concentraciones de las relaciones Sr/Ca fue menos precisa que el análisis realizado para Mg/Ca debido a que la mejor curva de

calibración hallada para Sr arrojó un R^2 de 0,6868 reflejando de esta manera la incertidumbre de la regresión es grande, introduciendo así más error en el análisis. Sin embargo, se pudieron obtener coeficientes de varianzas dentro del rango esperado (hasta 10%) para algunas bandas analizadas; lo cual indica que es posible determinar con buena precisión relaciones paleotermométricas con esta técnica contemplando de mejor manera lo mencionado en este párrafo.

Al tomar los espectros LIBS de los corales a las dos condiciones de análisis (véanse figuras 5.4.2 y 5.4.3) se pudo observar diferencias de intensidades, donde esta disminuyó considerablemente un orden de magnitud en el análisis de la relación Mg/Ca para el coral respecto al patrón; y disminuyó aproximadamente a la mitad en el análisis de la relación Sr/Ca para el coral respecto al patrón. Esto fue debido a la irregularidad

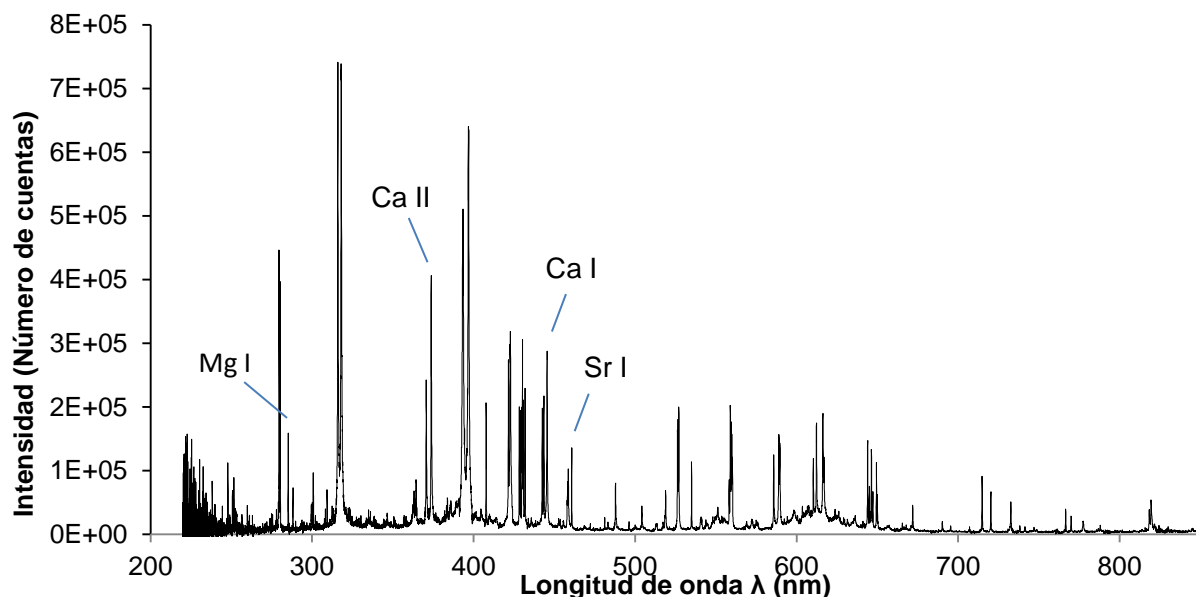


Figura 5.4.2. Espectro LIBS del espécimen *Montastraea annularis* a 200 ns de tiempo de demora y 4 μ s de ancho de compuerta temporal (condiciones de análisis de la relación Mg/Ca).

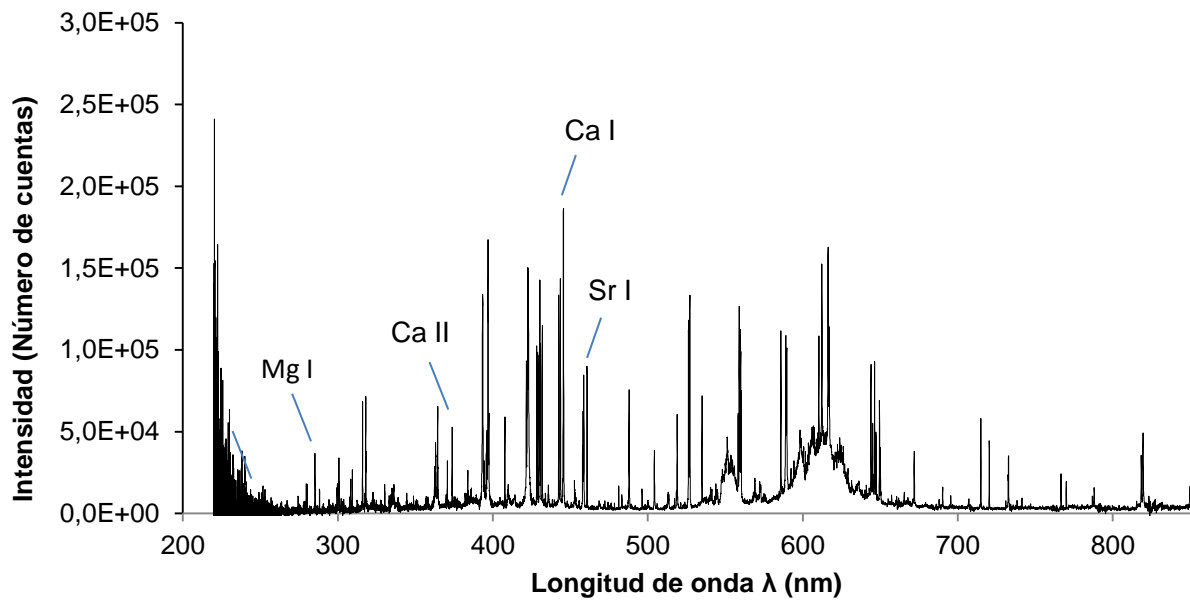


Figura 5.4.3. Espectro LIBS del espécimen *Montastraea annularis* a 1000 ns de tiempo de demora y 7 μ s de ancho de compuerta temporal (condiciones de análisis de la relación Sr/Ca).

de la superficie del coral ya que los plasmas de la muestra fueron formados en la superficie de esta muestra, como también en muchas ocasiones dentro de las coralitas, lo que no permitió acumular todos espectros LIBS a la altura óptima reduciendo así las señales finales.

Finalmente, con los datos de concentración de las relaciones metálicas mostrados y las TSO obtenidas vía satelital suministradas por la NOAA por año, como se muestran en las tablas 5.4.4. y 5.4.5., se procedió a correlacionarlas para así obtener las ecuaciones paleotermométricas de Mg/Ca y Sr/Ca, como se muestran en las figuras 5.4.4. y 5.4.5., respectivamente. La tabla 5.4.6. muestra los parámetros de las dos regresiones. Ambas ecuaciones siguieron la tendencia esperada de pendiente positiva para la relación Mg/Ca y pendiente negativa para la relación Sr/Ca. Esto signi-

Tabla 5.4.4. Temperatura Superficial del Océano (TSO) y Concentración correspondiente por año y banda de crecimiento involucradas en la ecuación paleotermométrica de Mg/Ca.

Banda de crecimiento	Año	TSO promedio anual (°C)	Concentración promedio de la relación Mg/Ca (mmol/mol)
1	1989	27,096	8,44
2	1990	27,697	10,13
3	1991	26,971	6,73
4	1992	27,430	8,76
5	1993	27,523	9,34
7	1995	28,663	17,42
8	1996	27,760	9,95
9	1997	27,459	8,83

Tabla 5.4.5. Temperatura Superficial del Océano (TSO) y Concentración correspondiente por año y banda de crecimiento involucradas en la ecuación paleotermométrica de Sr/Ca.

Banda de crecimiento	Año	TSO promedio anual (°C)	Concentración promedio de la relación Sr/Ca (mmol/mol)
1	1989	27,096	6,21
2	1990	27,697	5,39
4	1992	27,430	6,17
6	1994	27,371	5,98
8	1996	27,760	5,47
9	1997	27,459	5,13
10	1998	28,233	3,61

fica que el Mg se incorpora al coral de manera proporcional con la TSO, y el Sr se incorpora a la estructura calcárea con relación inversamente proporcional a la TSO. Las dos regresiones arrojaron valores de coeficiente de determinación satisfactorios para este tipo de muestra, donde se obtuvo el menor R^2 para la relación metálica Sr/Ca debido a que la incertidumbre se propaga en todo el análisis. Para los 10 años analizados, la TSO promedio anual varió en un intervalo de 26,971 - 28,663 °C.

Tabla 5.4.6. Parámetros de las regresiones lineales de las ecuaciones paleotermométricas de Mg/Ca y Sr/Ca.

Relación metálica	Pendiente	Error de la Pendiente	Punto de Corte	Error del Punto de Corte	Coeficiente de determinación R ²
Mg/Ca	0,15579	0,01712	26,02490	0,17786	0,9324
Sr/Ca	-0,36136	0,08018	29,53717	0,43979	0,8025

Las ecuaciones paleotermométricas determinadas mediante este trabajo fueron:

- $T (^{\circ}\text{C}) = (0,15579 \pm 0,01712) \text{ Mg/Ca} + (26,02490 \pm 0,17786) (R^2 = 0,9324)$
- $T (^{\circ}\text{C}) = (-0,36136 \pm 0,08018) \text{ Sr/Ca} + (29,53717 \pm 0,43979) (R^2 = 0,8025).$

Estas ecuaciones difieren de las ecuaciones reportadas en la literatura ya que la concentración de los metales analizados difiere en los distintos arrecifes debido a su localización y la química de estas especies localmente.

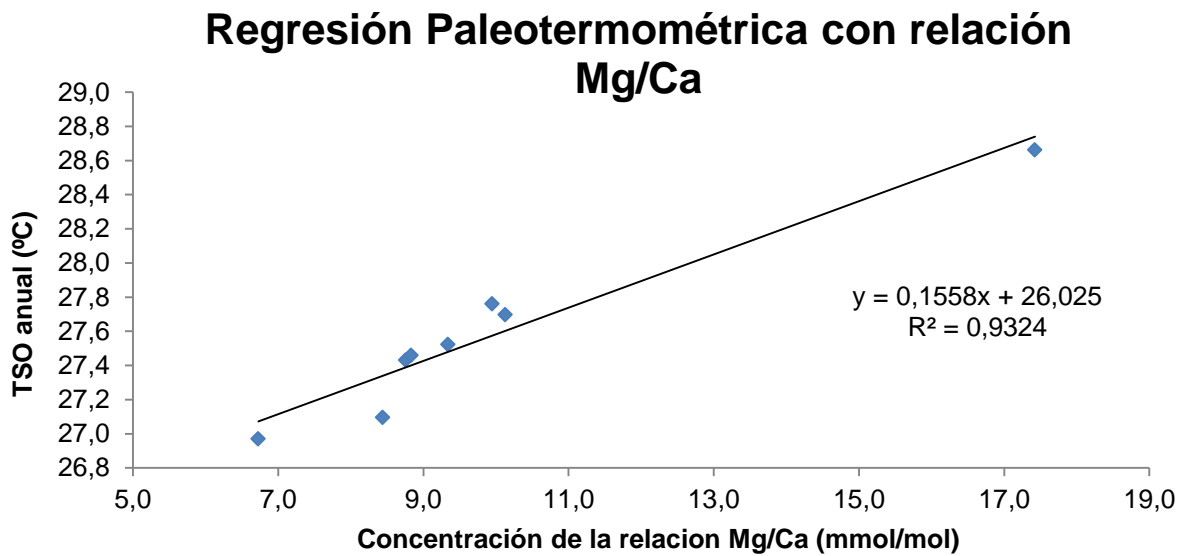


Figura 5.4.4. Regresión Paleotermométrica de la relación metálica Mg/Ca.

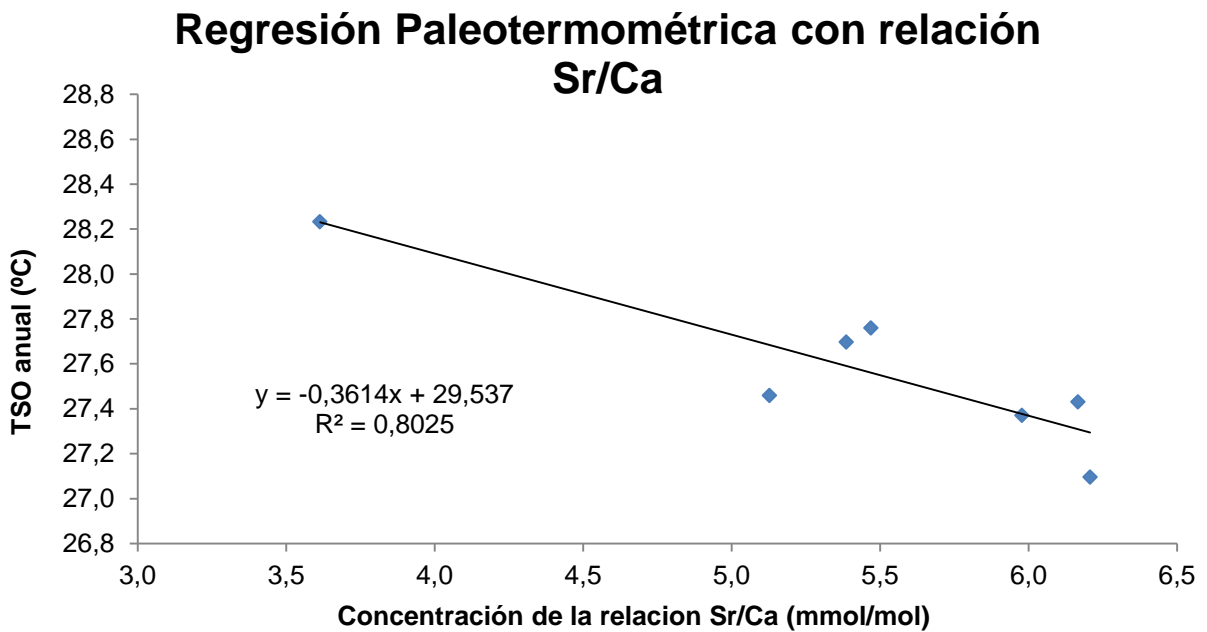


Figura 5.4.5. Regresión Paleotermométrica de la relación metálica Sr/Ca.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron dos condiciones distintas de análisis óptimas de las variables de detección tiempo de retardo y ancho de compuerta, una para la relación Mg/Ca y otra para la relación Sr/Ca.
- Los valores óptimos de análisis de la cantidad de pulsos por segundo y la energía del láser fueron elegidas tomando como criterio de selección el ocasionar el menor daño posible al coral y los patrones.
- Las líneas de emisión que permitieron obtener las mejores curvas de calibración fueron Mg I (285,213 nm) y Ca II (373,690 nm) para el análisis de la relación Mg/Ca, y Sr I (460,733 nm) y Ca I (445,478 nm) para el análisis de la relación Sr/Ca.
- El espécimen *Montastraea annularis* tenía una edad de 12-14 años. Se analizaron diez (10) bandas de crecimiento definidas que abarcó un intervalo de años de 1989 – 1998.
- La precisión del análisis LIBS sobre el coral varió desde 5,46 a 67,46 % para las concentraciones de la relación Mg/Ca; y desde 32,99 a 59,98 % para las concentraciones de la relación Sr/Ca.
- La baja precisión en el análisis de las bandas de crecimiento del coral se debió a la irregularidad de la superficie del coral, a la variación de la energía del láser durante el análisis, como también la heterogeneidad de los metales en el coral.
- Se pudieron obtener las ecuaciones paleotermométricas de las relaciones Mg/Ca y Sr/Ca, con coeficiente de determinación aceptable. Por esto, LIBS es una técnica adecuada para este tipo de análisis paleotermométricos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] **J. M. Pernía Llera and J. M. Fornés Azcoiti**, *Cambio Climático y Agua Subterránea. Visión para los próximos decenios*. 2008.
- [2] **M. Schoijet**, *Límites del crecimiento y cambio climático*. México: Siglo XXI, 2008.
- [3] **T. M. Cronin**, *Principles of paleoclimatology*. New York, Estados Unidos: Columbia University Press, 1999.
- [4] **A. García-Escárzaga, S. Moncayo, I. Gutiérrez-Zugasti, M. R. González-Morales, J. Martín-Chivelet, and J. O. Cáceres**, “Mg/Ca ratios measured by Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): a new approach to decipher environmental conditions,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 30, no. 9, pp. 1913–1919, 2015.
- [5] **G. Wei, M. Sun, X. Li, and B. Nie**, “Mg/Ca, Sr/Ca and U/Ca ratios of a porites coral from Sanya Bay, Hainan Island, South China Sea and their relationships to sea surface temperature,” *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, vol. 162, no. 1–2, pp. 59–74, 2000.
- [6] **P. K. Swart, H. Elderfield, and M. J. Greaves**, “A high-resolution calibration of Sr/Ca thermometry using the Caribbean coral *Montastraea annularis*,” *Geochemistry, Geophys. Geosystems*, vol. 3, no. 11, pp. 1–11, 2002.
- [7] **W. Deng, Y. Liu, G. Wei, X. Li, X. Tu, L. Xie, H. Zhang, and W. Sun**, “High-precision analysis of Sr/Ca and Mg/Ca ratios in corals by laser ablation inductively coupled plasma optical emission spectrometry,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 25, no. 1, pp. 84–87, 2010.
- [8] **A. C. Gagnon, J. F. Adkins, D. P. Fernandez, and L. F. Robinson**, “Sr/Ca and Mg/Ca vital effects correlated with skeletal architecture in a scleractinian deep-sea coral and the role of Rayleigh fractionation,” *Earth Planet. Sci. Lett.*, vol. 261, no. 1, pp. 280–295, 2007.
- [9] **J. A. Flannery and R. Z. Poore**, “Sr/Ca Proxy Sea-Surface Temperature Reconstructions from Modern and Holocene *Montastraea faveolata* Specimens from the Dry Tortugas National Park, Florida, U.S.A.,” *J. Coast. Res.*, vol. 63, no. sp1, pp. 20–31, 2013.
- [10] **C. Fabre and B. Lathuiliere**, “Relationships between growth-bands and paleoenvironmental proxies Sr/Ca and Mg/Ca in hypercalcified sponge: A micro-laser induced breakdown spectroscopy approach,” *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 62, no. 12, pp. 1537–1545, 2007.
- [11] **S. D. Cairns**, “Species richness of recent Scleractinia,” *Atoll Res. Bull.*, vol. 459,

pp. 1–46, 1999.

- [12] **C. Birkeland**, “Introduction,” in *Life and Death of Coral Reefs*, C. Birkeland, Ed. Springer Science & Business Media, 1997, pp. 1–12.
- [13] **Great Barrier Reef Marine Park Authority**, “Facts about the Great Barrier Reef.” [Online]. Available: <http://www.gbrmpa.gov.au/about-the-reef/facts-about-the-great-barrier-reef>. [Accessed: 19-Sep-2016].
- [14] **J. Cortés**, *Latin American Coral Reefs*. Ed. Elsevier. 2003, pp. 497.
- [15] **P. Hallock**, “Reefs and Reef Limestones in Earth History,” in *Life and Death of Coral Reefs*, C. Birkeland, Ed. Springer Science & Business Media, 1997, pp. 13–42.
- [16] **P. Marshall and H. Schuttenberg**, *Reef Manager’s Guide to Coral Bleaching*. Townsville, Australia: Great Barrier Reef Marine Park Authority, 2006.
- [17] **D. Hubbard**, “Reefs as Dynamic Systems,” in *Life and Death of Coral Reefs*, C. Birkeland, Ed. Springer Science & Business Media, 1997, p. 50.
- [18] **E. Weil**, “The corals and coral reefs of Venezuela,” in *Latin American Coral Reefs*, J. Cortés, Ed. Elsevier, 2003, pp. 303–330.
- [19] **C. M. Eakin and A. Grottoli**, “Coral Reef Records of Past Climatic Change,” in *Coastal and Estuarine Studies 61: Coral Reefs and Climate Changes: Science and Management*, J. Phinney, W. Skirving, J. Kleypas, O. Hoegh-Guldberg, and S. A. E., Eds. Washington, DC: American Geophysical Union, 2006, pp. 33–54.
- [20] **G. E. Webb, L. D. Nothdurft, B. S. Kamber, J. T. Kloprogge, and J. X. Zhao**, “Rare earth element geochemistry of scleractinian coral skeleton during meteoric diagenesis: A sequence through neomorphism of aragonite to calcite,” *Sedimentology*, vol. 56, no. 5, pp. 1433–1463, 2009.
- [21] **S. Reynaud, C. Ferrier-Pagès, A. Meibom, S. Mostefaoui, R. Mortlock, R. Fairbanks, and D. Allemand**, “Light and temperature effects on Sr/Ca and Mg/Ca ratios in the scleractinian coral *Acropora* sp.,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 71, pp. 354–362, 2007.
- [22] **T. Mitsuguchi, E. Matsumoto, O. Abe, T. Uchida, and P. J. Isdale**, “Mg/Ca Thermometry in Coral Skeletons,” *Science (80-)*, vol. 274, no. 5289, pp. 961–963, 1996.
- [23] **D. Skoog, D. West, F. Holler, and S. Crouch**, *Fundamentos de Química Analítica*, 8va ed. Thomson, 2005.
- [24] **S. de Villiers, G. T. Shen, and B. K. Nelson**, “The Sr/Ca-temperature relationship in coralline aragonite: Influence of variability in (Sr/Ca)Seawater and skeletal growth parameters,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 58, no. 1, pp. 197–208,

1994.

- [25] **D. P. Schrag**, "Rapid analysis of high-precision Sr/Ca ratios in corals and other marine carbonates," *Paleoceanography*, vol. 14, no. 2, pp. 97–102, 1999.
- [26] **R. E. Russo**, "Laser Ablation," *Appl. Spectrosc.*, vol. 49, no. 9, p. 14A–28A, 1995.
- [27] **R. Fantoni, L. Caneve, F. Colao, L. Fornarini, V. Lasic, and V. Spizzichino**, "Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)," in *Advances in Spectroscopy for Lasers and Sensing*, B. Di Bartolo and O. Forte, Eds. Springer, 2006, pp. 229–254.
- [28] **Ameasol**, "An introduction to Laser-Induced Breakdown Spectroscopy," *Remote Materials Identification & Analysis: LIBS Technology*. [Online]. Available: http://www.ameasol.com/ameasol_006.htm. [Accessed: 23-May-2015].
- [29] **Applied Spectra Inc**, "LIBS." [Online]. Available: <http://www.appliedspectra.com/technology/LIBS.html>. [Accessed: 23-May-2015].
- [30] **S. Rehse**, "What is LIBS?," *University of Windsor*. [Online]. Available: <http://www1.uwindsor.ca/people/rehse/15/what-is-libs>. [Accessed: 31-May-2015].
- [31] **D. A. Cremers, F.-Y. Yueh, J. P. Singh, and H. Zhang**, "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, Elemental Analysis," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Lds, 2012.
- [32] **M. Sabsabi, L. St-Onge, V. Detalle, and J. M. Lucas**, "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: a New Tool for Process Control," in *16th World Conference on Nondestructive Testing (WCNDT 2004)*, 2004, pp. 644–651.
- [33] **Applied Spectra Inc**, "LIBS Depth Profiling." [Online]. Available: <http://www.appliedspectra.com/technology/depth-profiling.html>. [Accessed: 31-May-2015].
- [34] **R. C. Chinni**, "A Simple LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy) Laboratory Experiment To Introduce Undergraduates to Calibration Functions and Atomic Spectroscopy," *J. Chem. Educ.*, vol. 89, no. 5, pp. 678–680, 2012.
- [35] **J. S. Cowpe, J. S. Astin, R. D. Pilkington, and A. E. Hill**, "Application of Response Surface Methodology to laser-induced breakdown spectroscopy: Influences of hardware configuration," *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 62, no. 12, pp. 1335–1342, 2007.
- [36] **M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, and L. A. Escaleira**, "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry," *Talanta*, vol. 76, no. 5, pp. 965–977, 2008.
- [37] **G. Box, J. S. Hunter, and W. Hunter**, *Statistics for Experimenters*, 2^o Ed. Wiley Interscience, 2005.

- [38] **M. Martínez, R. Lobinski, B. Bouyssiere, V. Piscitelli, J. Chirinos, and M. Caetano**, “Determination of Ni and V in Crude Oil Samples Encapsulated in Zr Xerogels by Laser Induced Breakdown Spectroscopy,” *Energy & Fuels*, vol. 29, no. 9, pp. 5573–5577, 2015.
- [39] **P. Manuitt**, “Estudio del Proceso de Bioerosión en *Montastraea annularis* (Scleractinia: Faviidae) en un Arrecife del Parque Nacional Morrocoy, Edo. Falcón,” Universidad Central de Venezuela, 2002.
- [40] **I. Arellano**, “Optimización de una metodología para la determinación de relaciones Sr/Ca y Mg/Ca en la especie de coral *Montastraea annularis* empleando Espectroscopía de Plasma Inducido por Láser (LIBS),” Universidad Central de Venezuela, 2008.
- [41] **Departamento de Comercio de E.E. U.U.**, “NIST Atomic Spectra Database,” *National Institute of Standards and Technology (NIST)*. [Online]. Available: http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html. [Accessed: 19-Feb-2016].
- [42] **G. Wei, W. Deng, K. Yu, X. H. Li, W. Sun, and J. X. Zhao**, “Sea surface temperature records in the northern South China Sea from mid-Holocene coral Sr/Ca ratios,” *Paleoceanography*, vol. 22, no. 3, pp. 1–13, 2007.

8. APÉNDICES

8.1. Gráficas de Barrido de condiciones.

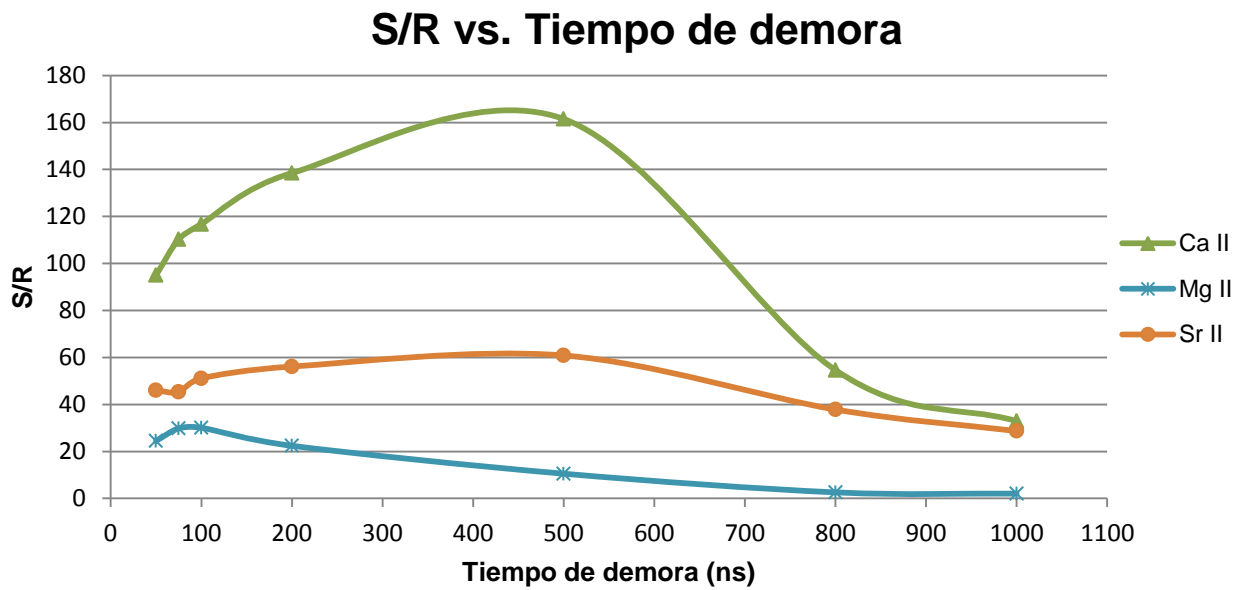


Figura 8.1.1. Tendencia en el barrido de la variable de detección tiempo de demora.

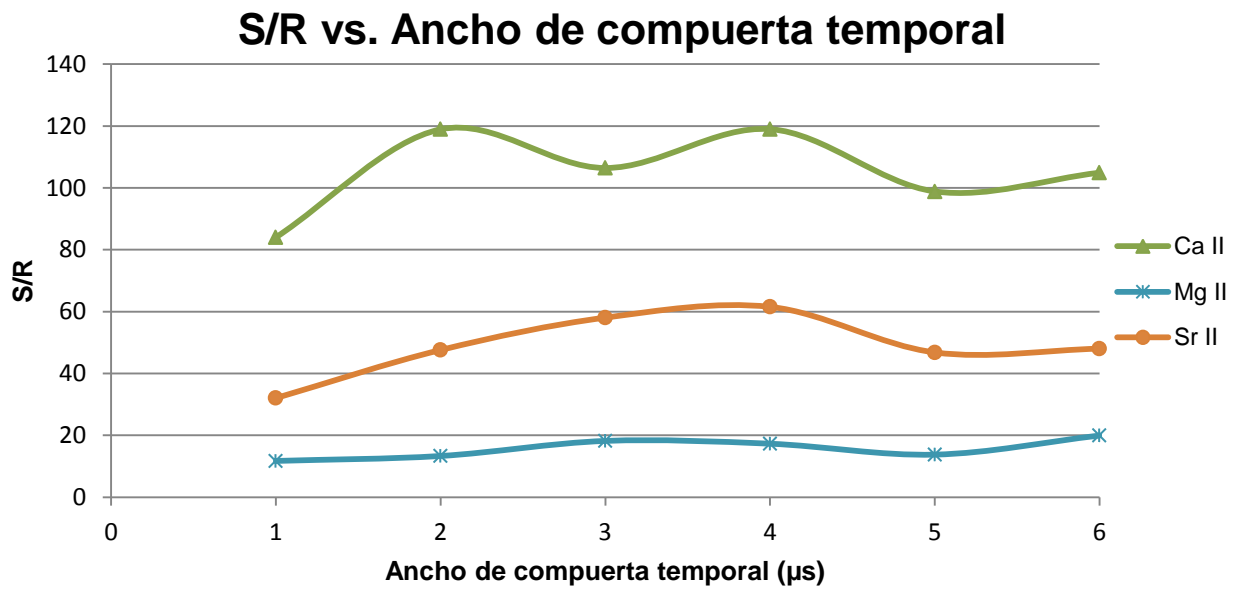


Figura 8.1.2. Tendencia en el barrido de la variable ancho de compuerta temporal.

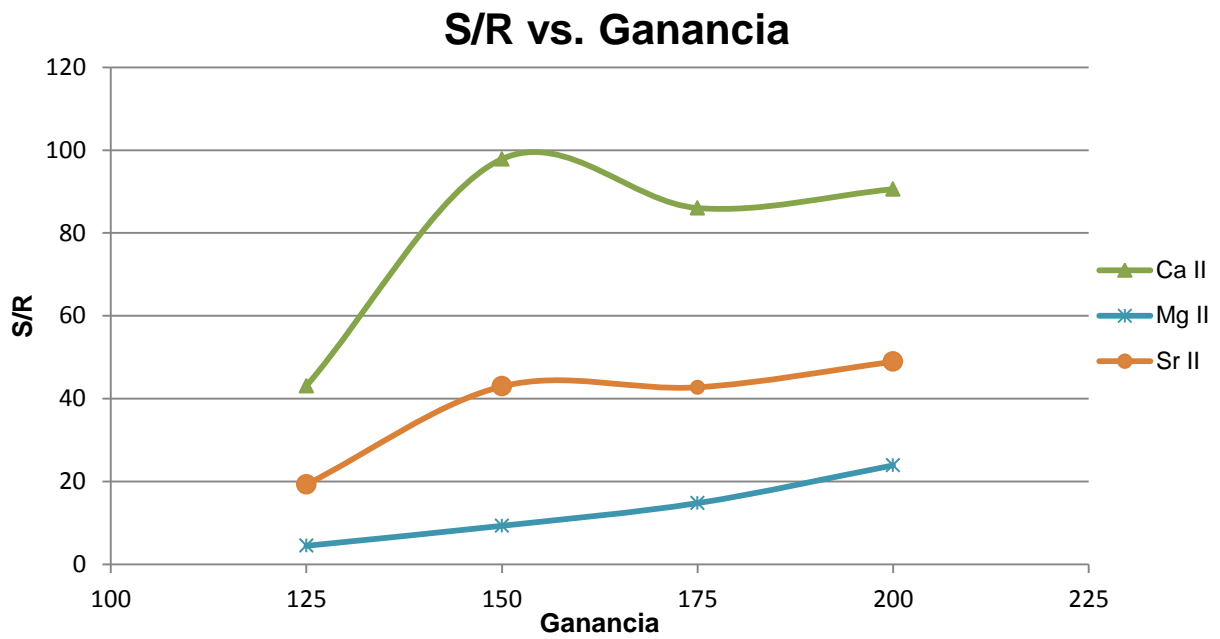


Figura 8.1.3. Tendencia en el barrido de la variable de detección ganancia.

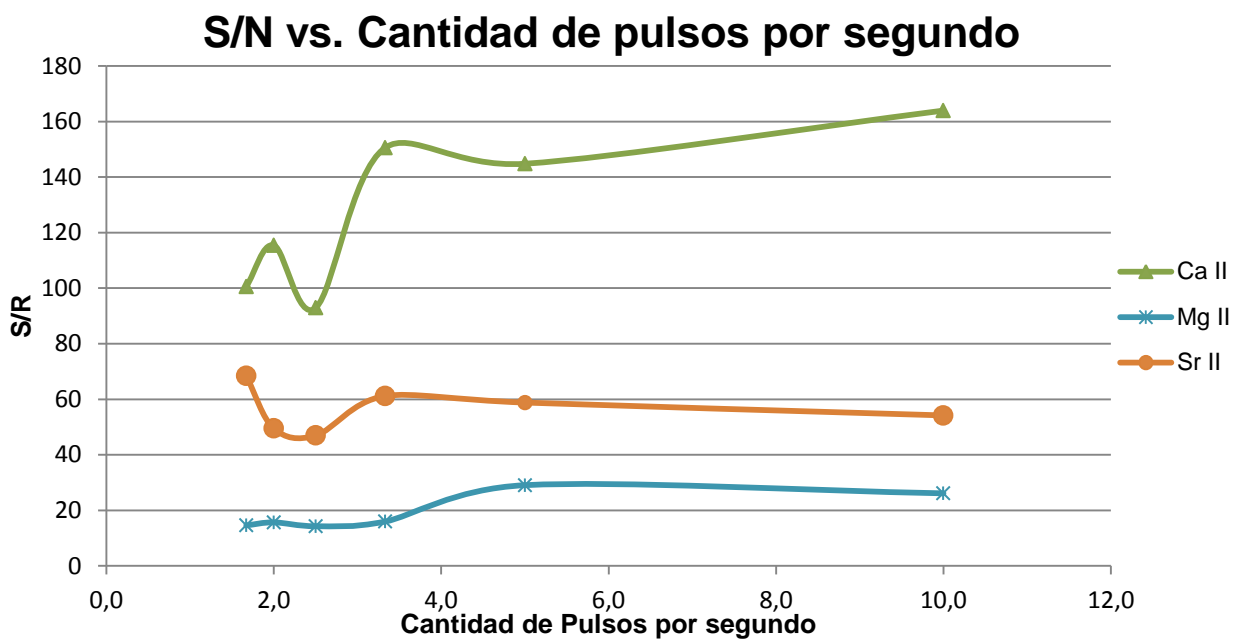


Figura 8.1.4. Tendencia en el barrido de la variable cantidad de pulsos por segundo.

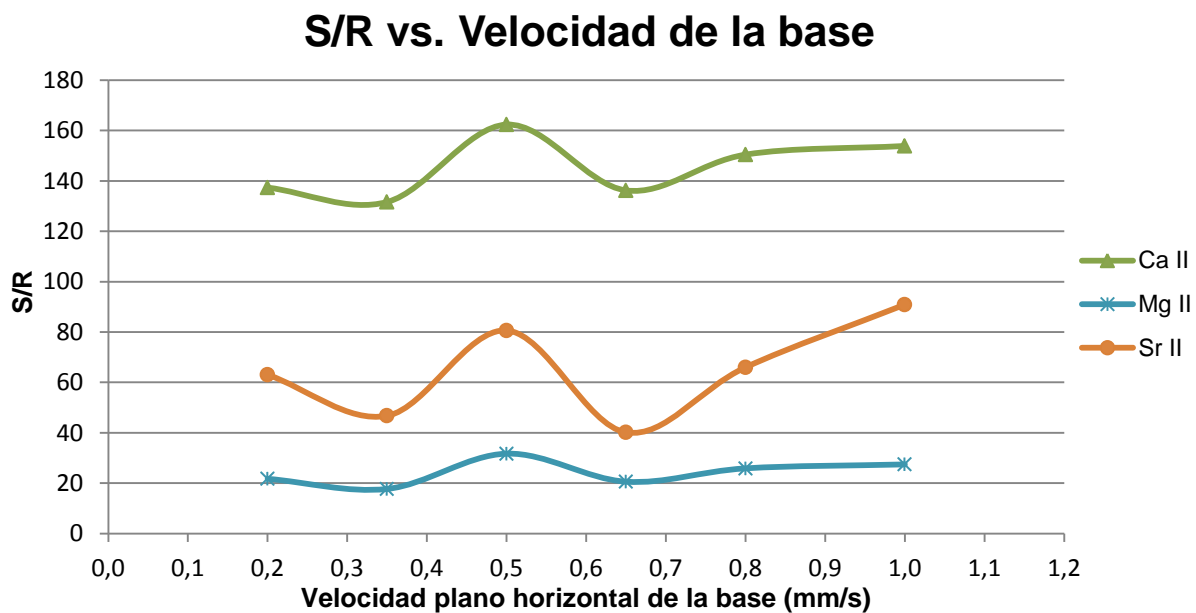


Figura 8.1.5. Tendencia en el barrido de la variable velocidad de la base porta muestra.

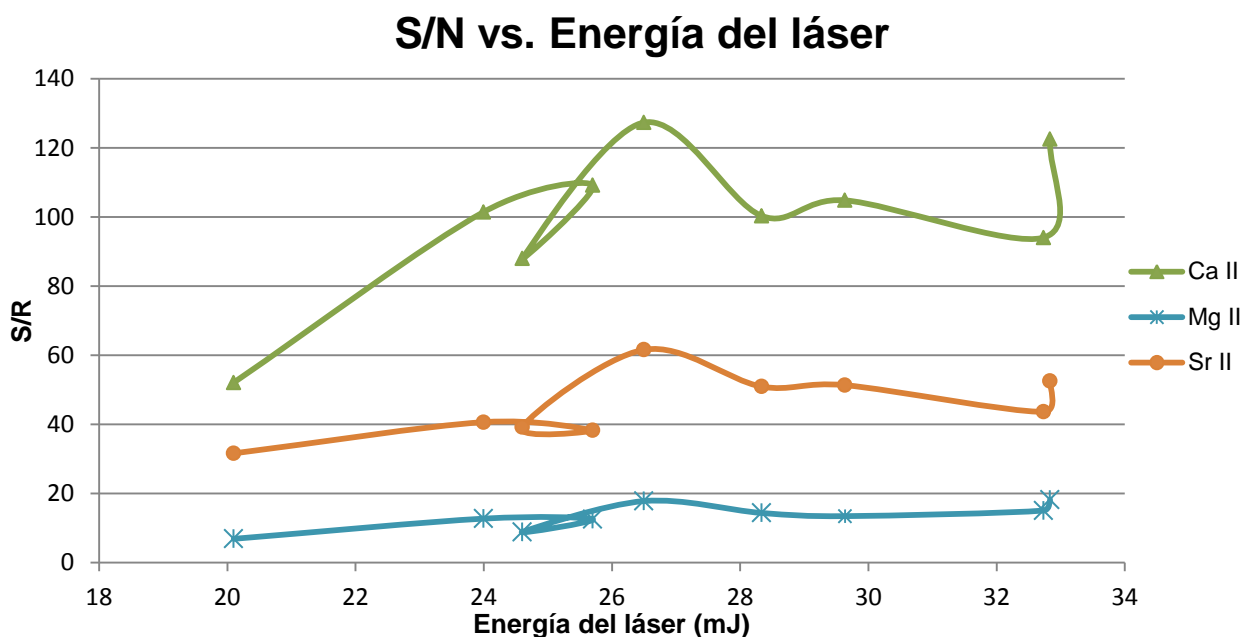


Figura 8.1.6. Tendencia en el barrido de la variable de energía del láser.

8.2. Código R utilizado para análisis de espectros LIBS.

El código en este programa estuvo diseñado para analizar los archivos salvados en ASCII provenientes del monocromador Mechelle 5000. Estos archivos consistieron en matrices de dos columnas, una para las intensidades en número de cuentas y otra para las longitudes de onda en nm y un número de filas que dependió del rango espectral considerado.

- **Lectura de los archivos con los datos.**

Inicialmente, se estableció la dirección del directorio donde se encontraban los archivos. Seguidamente, se creó una lista con los nombres de los archivos incluyendo

la dirección del directorio (path). Se utilizó `*asc` para indicar que la extensión de los archivos es `.asc` y `full.names = T` para que incluyera la dirección en el nombre.

```
> startingDir <- "mi_directorio"  
> lista.files <- list.files(path = startingDir, pattern = "*asc", full.names = T)
```

Seguido de esto, el uso de `lapply` permitió aplicar la función `read.table` sobre la lista completa de archivos. La función `read.table` generó una estructura de datos (data frame en inglés), y la función `lapply` regresó una lista. Cada elemento de la lista contenía una estructura de datos con los datos del espectro respectivo. La instrucción `header = F` indicó al programa que las columnas del archivo `ascii` original no tenían nombres, y `dec=","` indicó que la separación decimal estaba representada por comas. Los archivos usados tenían 21.777 filas, que abarcaron el espectro desde 220 hasta 850 nm.

```
> files <- lapply(lista.files, function(x) read.table(x, header = F, dec = ",", nrow = 21777,  
col.names = c("lambda", "intensidad")))  
> l.files <- length(files)  
> seq.files <- seq(1, l.files)
```

- **Grafica de los espectros.**

Para graficar todos los espectros (intensidad vs longitud de onda) en la lista "files", se escribió una función que llamamos `plotg` y nuevamente utilizamos `lapply`. Los espectros se mostraron numerados en el orden en que fueron guardados los archivos.

```
> plotg <- function(i, X, Y) {plot(X[[i]]$intensidad ~ Y[[i]]$lambda, type = "l", main = i, xlab  
= "nm", ylab = "cuentas") }  
> lapply(seq_along(files), files, FUN = plotg)
```

- **Cálculo de intensidad de líneas de emisión del plasma.**

- **Identificación de líneas y sus respectivas intensidades.**

Primero, se especificaron las líneas dentro del espectro serán utilizadas (véase tabla 5.1.1.).

```
> lambda.interes <- c(279.553, 285.213, 373.690, 407.771, 445.478, 460.733, 585.745, 714.815)
```

Para identificar exactamente el índice (el número de la fila en la estructura de datos) que se correspondía con la línea en el espectro, se identificó este número que contenía el valor de longitud de onda más cercano al valor introducido y se estableció un rango alrededor de él. El sistema luego buscó el valor de intensidad máximo dentro de este rango y el índice correspondiente. Se creó la función `x.function` que permitió encontrar el valor de longitud de onda más cercano al valor introducido, en un rango de longitudes de onda especificado por la variable `k` (longitud de onda de interés + `k`, longitud de onda de interés - `k`). Se utilizó la función `sapply` dentro de un ciclo `for`, para aplicar `x.function` para cada línea propuesta y a todas la lista de estructura de datos (espectros). Esto permitió obtener dos listas de vectores, una lista que contenía los vectores de los índices superiores `x1` y otra de los inferiores `x2` que definieron los rangos identificados para cada línea. Se declararon las variables antes del ciclo.

```
> x1 <- list()
> x2 <- list()
> for (k in seq_along(lambda.interes)) {x.function <- function(i,j)
{which.min(abs(files[[i]]$lambda - (lambda.interes[k] + j)))}
+ x1[[k]] <- sapply(seq.files,-1, FUN = x.function)
```

```
+ x2[[k]] <- sapply(seq.files, 1, FUN = x.function) }
> names(x1) <- names(x2) <- as.character(lambda.interes)
```

Con los índices inferior y superior se pudo identificar los valores de longitud de onda y sus respectivas intensidades contenidas en el rango. El procedimiento fue similar al utilizado anteriormente, pero las funciones L.function e int.function fueron responsables de identificar las longitudes de onda y las intensidades, respectivamente.

```
> L <- list()
> int <- list()
> for (k in seq_along(lambda.interes)) {L.function <- function(i)
{files[[i]]$lambda[x1[[k]][i]:x2[[k]][i]]}
+ L[[k]] <- sapply(seq(1,length(files)),L.function)
+ int.function <- function(j) {files[[j]]$intensidad[x1[[k]][j]:x2[[k]][j]]}
+ int[[k]] <- sapply(seq.files,int.function)}
> names(L) <- names(int) <- as.character(lambda.interes)
```

- **Búsqueda del máximo del pico.**

La función function.max buscó el máximo de intensidad en el rango de índices establecido para cada línea. Nuevamente, el uso de sapply permitió generar una lista de vectores conteniendo los máximos de intensidad para cada línea en cada espectro.

```
> max.peak <- list()
> for (k in seq_along(lambda.interes)) {function.max <- function(i)
{max(files[[i]]$intensidad[x1[[k]][i]:x2[[k]][i]])}
+ max.peak[[k]] <- sapply(seq_along(files),function.max)}
> names(max.peak) <- as.character(lambda.interes)
```

Luego, se identificó el índice correspondiente al máximo.

```
> max.ind <- list()
> for (k in seq_along(lambda.interes)) {function.indmax <- function(i)
{which(files[[i]]$intensidad == max.peak[[k]][i])}
+ max.ind[[k]] <- sapply(seq.files,function.indmax)}
> names(max.ind) <- as.character(lambda.interes)
```

○ Aproximación Lorentziana

Para simular la forma de cada línea se utilizó una aproximación Lorentziana, la cual tiene la forma:

$$F(x) = L_o + \frac{2A}{\pi} \left(\frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2} \right) \quad (2)$$

Donde A es la altura de la línea de emisión, w es el ancho completo a la mitad del máximo (FWHM), x es la longitud de onda variable, y x_c es la posición máximo. Se declararon las variables como listas y se estableció su tamaño de acuerdo al número de líneas que utilizó.

```
> w.vector <- offset.vector <- areas <- lapply(seq_along(lambda.interes), function(x)
c(seq_along(files)))
```

Se utilizó la función nls la cual permitió realizar un estimado de los parámetros de un modelo no lineal, mínimos cuadrados no lineales (ponderados). La fórmula que se utilizó fue una expresión de la ecuación (2). Los parámetros $y_0 = L_o$, $A = A$, $w = w$, $x_c = x_c$ fueron estimados por el algoritmo. Los valores de partida o “semilla” fueron indicados en el vector start. Los datos fueron arreglados en una estructura de datos (tab). El estimado

de los parámetros fue guardado en el vector v. Las curvas de los modelos estimados fueron graficadas sobre las intensidades originales.

```

> xc <- 20
> r <- 0
> tab <- 0
> for (k in seq_along(lambda.interes)) {for (i in 1:length(files)) {
+ r <- files[[i]]$intensidad[(unlist(max.ind[[k]][i])-xc):(unlist(max.ind[[k]][i])+xc)]
+ tab <- data.frame(x=seq_along(r), r=r)
+ res3 <- nls(r ~ y0 + ((2*A/pi)*w/(4*(x-xc)^2+w^2)),
+ start = c(y0 = r[1], w = 7, xc=xc, A = 25*(unlist(max.peak[[k]][i])), control =
list(warnOnly = TRUE), data = tab)
+ v <- summary(res3)$parameters["Estimate"]##vector con parámetros
+ integrand <- function(x) {v[1] + ((2 * v[4]/pi) * v[2]/(4 * (x - v[3])^2 + v[2]^2))}
+ area <-integrate(integrand,lower = 0, upper = 2*xc)
+ areas[[k]][i] <-area$value
+ offset.vector[[k]][i] <- v[1]
+ w.vector[[k]][i] <- v[2]
+ plot(r~x, data=tab, main = paste(i, as.character(lambda.interes)[k], sep = " "))
+ plot(function(x) v[1] + ((2*v[4]/pi)*v[2]/(4*(x-v[3])^2+v[2]^2)),col=2,add=T,
+ xlim=range(tab$x))}

```

- **Cálculo del ruido**

Un estimado del ruido en el espectro fue calculado en una región aislada (entre 465-467 nm). El ruido fue estimado como la desviación estándar de la señal en esa zona.

```

> lambda1.ruido <- 465
> lambda2.ruido <- 467
> indice1.ruido <- which.min(abs(files[[1]]$lambda - lambda1.ruido))
> indice2.ruido <- which.min(abs(files[[1]]$lambda - lambda2.ruido))
>
      ruido.function                                <-                                function(i)
{sd(c(files[[i]]$intensidad[indice1.ruido]:files[[i]]$intensidad[indice2.ruido]))}
> ruido <- lapply(seq.files, ruido.function)

```

Los resultados fueron escritos en un archivo denominado resultados.txt, el cual incluyó el ancho de la línea de emisión, la línea base, el máximo y el área de las líneas, además del estimado del ruido. Primero se simplificó las listas utilizando la función unlist la cual las convirtió en vectores lineales.

```

> w.vector <- unlist(w.vector)
> offset.vector <- unlist(offset.vector)
> max.vector <- unlist(max.peak)
> ruido.vector <- unlist(ruido)
> area.vector <- unlist(areas)
> lambdas <- as.vector(sapply(lambda.interes,function(x) rep(x,length(files))))
> resultados <- data.frame(max.vector, ruido.vector, w.vector, offset.vector, area.vector,
lambdas)
> write.table(resultados, "mi_directorio/resultados.txt", row.names = F)

```

8.3. Código R utilizado para el análisis del Método de Superficie de Respuesta (MSR).

Inicialmente, se estableció la dirección del directorio donde se encontraban los archivos a usar. Seguidamente, se utilizó la librería RSM que proporcionó funciones útiles para el diseño y análisis de experimentos que se realizan secuencialmente con la esperanza de optimizar una superficie de respuesta. La función `ccd.pick` se utilizó para identificar las mejores opciones de valores de parámetros en el diseño central – compuesto, donde se asignó k el número de factores en el diseño, $n.c$ el número de puntos factoriales, $n0.c$ el número de puntos centrales en el bloque factorial y $n0.s$ el número de puntos centrales en el bloque estrella.

```
>getwd()
>library(rsm)
>ccd.pick(k = 3, n.c = 8, n0.c = 4, n0.s = 4)
>DCC <- ccd(basis = 3, alpha = 1681793, randomize = F, n0 = c(4,4))
> write.table(DCC, "DDC sin aleatorizar.txt", row.names = F)
```

El valor α que hizo el diseño rotatable fue 1,681793, emitido por la función `ccd.pick`. Se utilizó la función `ccd` para generar el Diseño Central Compuesto, sin aleatorizar en este caso y especificando los puntos centrales y el α rotatorio. El Diseño Central Compuesto emitido por R fue guardado en R como la variable “DCC” y exportado en formato de texto, txt (véase tabla 5.2.4.).

Con el Diseño Central Compuesto, se establecieron los valores de las variables codificadas con los puntos centrales y al estipular el rango de los valores del análisis. Al asignar estos valores, se aleatorizó el diseño y se realizaron los análisis LIBS. Con el código R mostrado en el apéndice 8.2. y a partir de los archivos en formato ASCII provenientes del monocromador Mechelle 5000, se obtuvieron los anchos de las líneas de emisión de interés, línea base, el máximo y el área de las líneas, además del estimado del ruido correspondiente a cada línea de emisión, y fueron escritos en un archivo denominado ResultadosDCC.txt. Este archivo contenía información de las líneas de interés y su respectiva intensidad; con estas se elaboró una tabla en formato de

texto txt, con los valores de las tres variables (sin aleatorizar) y los valores respectivos de la cuarta variable actividad; todas con el encabezado (header) respectivo “Ganancia”, “Compuerta”, “Demora” y “Actividad”, con tabulaciones como separadores de columnas y con comas como separadores decimales. Luego, se creó en R esta tabla en la variable llamada “TablaParaMSR”.

```
>TablaParaMSR<- read.table("Datos para MSR.txt", header= T, sep = "\t", dec = ",")
```

Para transformar la tabla anterior a variables codificadas se utilizó la función coded.data, colocando los rangos utilizados de cada variable como función de su propia variable. Las variables x1, x2 y x3 fueron establecidas como la ganancia, ancho de compuerta y tiempo de demora, respectivamente. Luego se utilizó la función as.data.frame sobre la tabla de datos codificada para observar la nueva tabla de las variables codificadas y los valores de actividad.

```
>TablaCoded <- coded.data(TablaParaMSR, x1 ~ ((Ganancia - 100)/20),  
                          x2 ~ ((Compuerta - 5)/1), x3 ~ ((Demora - 500)/250))  
> as.data.frame(TablaCoded)
```

Se llamó la variable MSR a los datos que regresa la función rsm, los cuales permitieron analizar el diseño de segundo orden (SO) mediante el uso de la función summary. El resumen del análisis indicó cuáles de los términos son significativos, si existía alguna interacción significativa entre estas, como también mostró el coeficiente de determinación R^2 , y los puntos estacionarios obtenidos mediante la aplicación de MSR, tanto en valores codificados como en los valores reales. Estos puntos estacionarios del MSR son los valores que maximizan en valor de actividad.

```
>MSR <- rsm(Actividad ~ SO(x1, x2, x3), data = TablaCoded)  
>summary(MSR)
```

Finalmente, para observar las superficies de respuesta se usó la función `persp`, que permitió graficar cada superficie en tres dimensiones. Como las superficies que representan el comportamiento de las distintas variables en función de la actividad tienen $n+1$ dimensiones, donde n es el número de variables, se obtuvieron distintas superficies de 3 dimensiones manteniendo una variable fija

```
>persp(MSR, x1, x2 o x3 ~ x1, x2 o x3, theta = 60, r = 3, d = 1, col=rainbow(50), border
= NULL, col.axis=37, font.lab=1,col.lab=33, contour=("colors"), xlabs = c("Ancho de
Compuesta","Tiempo de demora"), ticktype = "detailed", zlab="\n\nActividad", at= list(x1,
x2 o x3 = algún valor codificado))
```

8.4. Masas pesadas en la elaboración de los patrones multielementales.

Tabla 8.3.1. Masa pesada de los carbonatos estándar.

Patrón	Masa MgCO ₃ (mg)	Masa SrCO ₃ (mg)	Masa CaCO ₃ (g)
0	10,6	111,5	5,0007
1	13,8	70,9	5,0010
2	16,2	69,8	5,0009
3	18,7	69,1	5,0016
4	20,9	66,9	5,0013
5	23,2	65,7	5,0004
6	63,1	37,1	5,0000

8.5. Curvas de calibración.

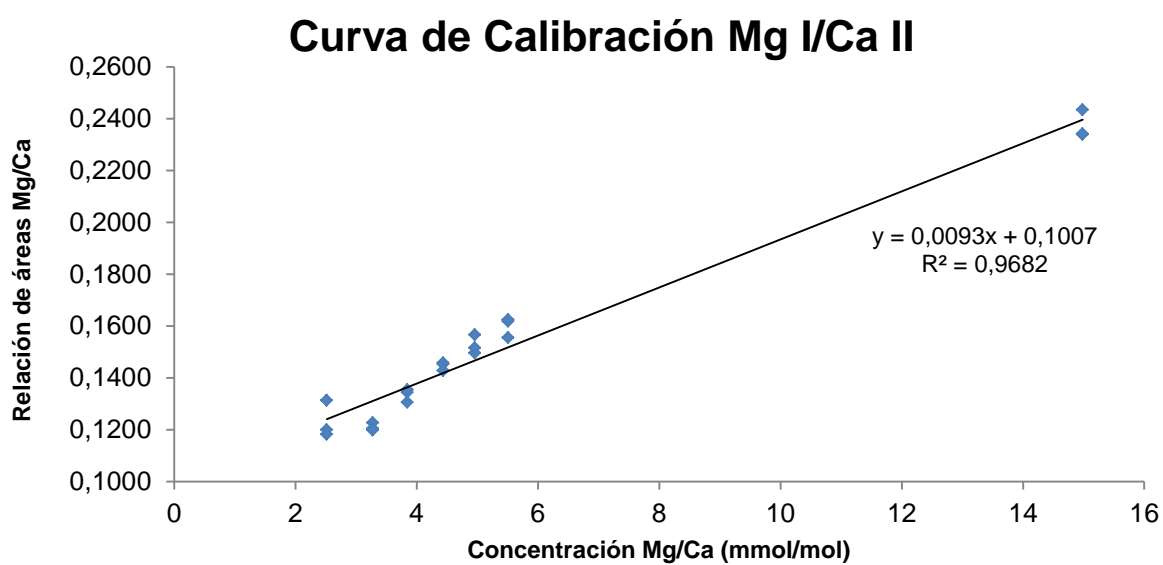


Figura 8.5.1. Curva de calibración del análisis de la relación metálica Mg/Ca a 100 ns de tiempo de demora y 4 μ s de ancho de compuerta temporal.

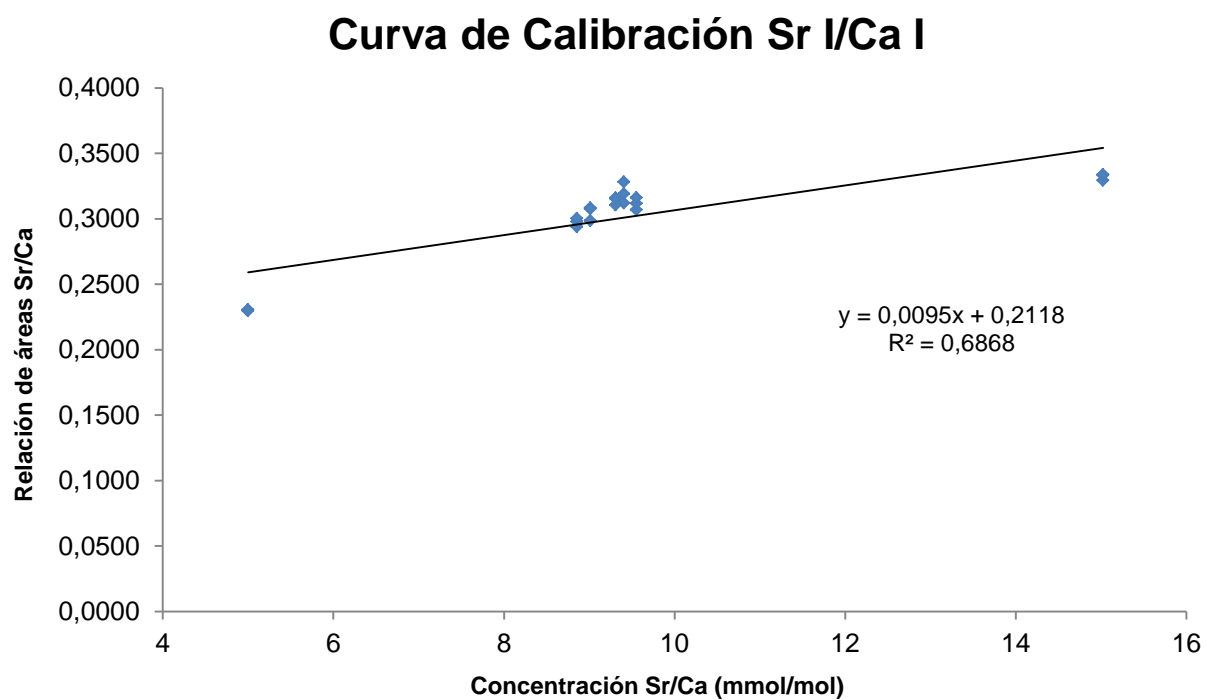


Figura 8.5.2. Curva de calibración del análisis de la relación metálica Sr/Ca a 1000 ns de tiempo de demora y 7 μ s de ancho de compuerta temporal.