



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE FÍSICA Y MATEMÁTICA**

## **“INACTIVACIÓN DE FÓSFORO EN AGUAS EUTRÓFICAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE HIERRO (MAGNETITA)”**

**Trabajo de Titulación**

**Tipo: Trabajo Experimental**

Presentado para obtener el grado académico de:

**BIOFÍSICA**

**AUTORA: PAOLA IVONNE TOALA CADENA**

**DIRECTORA: Biof. ROSA ORMAZA HUGO MsC.**

Riobamba - Ecuador

2019

**© 2019, Paola Ivonne Toala Cadena © 2019,**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE FÍSICA Y MATEMÁTICAS**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo experimental: **“Inactivación de Fósforo en aguas eutróficas mediante la aplicación de nanopartículas magnéticas de Hierro (magnetita)”**, de responsabilidad de la Señorita Paola Ivonne Toala Cadena, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

Firma

Fecha

Biof. Rosa Maricela Ormaza Hugo, MsC

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes, MsC

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Paola Ivonne Toala Cadena, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Paola Ivonne Toala Cadena

## **DEDICATORIA**

El presente Trabajo de Titulación se lo dedico a mi hijo, Christian Elian, porque me convirtió en una mejor persona con su inconmensurable amor y por ser mi inspiración.

Paola Ivonne Toala Cadena

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la vida, ser mi guía y darme la fortaleza para culminar esta carrera profesional; a mis padres Jhonny y Mónica, como testimonio de amor, apoyo, confianza y bendición que diariamente me brindaron, por todo el sacrificio que han hecho para formarme como persona y profesional; a mis hermanos, María Soledad y Timoty, por su apoyo moral, afectivo e incondicional; a mi abuelita Piedad, por siempre tenerme presente en sus bendiciones y oraciones; A Christian y su familia Pérez Paredes, por ser incondicionales con su afecto y apoyo; espero jamás defraudarles y seguir cosechando logros junto a ustedes.

A la Biof. Rosita Ormaza, Directora del trabajo de titulación, y a su esposo, el Ing. Julio Coello, por su constante ayuda y colaboración con sus conocimientos, por todas las recomendaciones y asesorías, lo cual facilitó la elaboración del presente trabajo, Dios les bendiga siempre.

A todas las personas que, de manera directa e indirecta, permitieron que el presente trabajo se realice de la mejor manera, a mis profesores y amigos de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, gracias por impartirme sus conocimientos y por permitir que el desarrollo de la carrera sea ameno.

Paola Ivonne Toala Cadena

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xvi
SUMMARY .....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	18
CAPÍTULO I.....	20
1) MARCO REFERENCIAL .....	20
1.1. Identificación del problema.....	20
1.2. Justificación del problema.....	21
1.3. Antecedentes de la investigación.....	22
1.4. Objetivos .....	24
1.4.1. <i>Objetivo general</i> .....	24
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	24
CAPÍTULO II .....	25
2) MARCO TEÓRICO .....	25
2.1. Ecosistemas Acuáticos .....	25
2.1.1. <i>Sistemas Lénticos</i> .....	25
2.1.2. Localización y descripción del lugar (laguna de San Antonio) .....	27
2.2. Indicadores de Calidad .....	27
2.2.1. <i>Indicadores Biológicos</i> .....	28
2.2.2. <i>Indicadores Físico-Químicos</i> .....	28
2.2.3. <i>Indicadores Hidromorfológicos</i> .....	29
2.3. Restauración de Sistemas Acuáticos.....	29
2.3.1. <i>Restauración de sistemas acuáticos eutrofizados</i> .....	29
2.3.2. <i>Mecanismos para la remediación de contaminantes</i> .....	30
2.3.3. <i>Problemas ambientales por exceso de fósforo: Eutrofización</i> .....	31
2.4. Nanotecnología .....	32

2.4.1.	<i>Nanopartículas</i> .....	32
2.4.2.	<i>Síntesis de nanopartículas de hierro: Ferrofluido</i> .....	32
2.4.3.	<i>Caracterización de nanopartículas</i> .....	33
2.4.3.1.	<i>Microscopía electrónica de barrido</i> .....	33
2.4.3.2.	<i>Espectrometría UV – visible</i> .....	33
<b>CAPITULO III</b> .....		35
<b>3) MARCO METODOLÓGICO</b> .....		35
3.1.	<b>Reactivos</b> .....	35
3.2.	<b>Materiales</b> .....	38
3.3.	<b>Equipos</b> .....	39
3.4.	<b>Metodología Estadística</b> .....	41
3.5.	<b>Métodos</b> .....	43
3.5.1.	<i>Metodología para la Síntesis de NPMs</i> .....	43
3.5.1.1.	<i>Esterilización de Materiales</i> .....	43
3.5.1.2.	<i>Síntesis de NPMs</i> .....	44
3.5.2.	<i>Purificación de las NPMs</i> .....	45
3.5.2.1.	<i>Purificación Física</i> .....	45
3.5.2.2.	<i>Purificación Química</i> .....	45
3.5.3.	<i>Caracterización de las NPMS</i> .....	46
3.5.3.1.	<i>Espectroscopia IR</i> .....	46
3.5.3.2.	<i>Espectroscopia UV-visible</i> .....	46
3.5.3.3.	<i>Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)</i> .....	47
3.5.4.	<i>Análisis de Aguas Eutróficas</i> .....	48
3.5.4.1.	<i>Recolección de la muestra</i> .....	48
3.5.4.2.	<i>Cuantificación de la Clorofila-a</i> .....	48
3.5.4.3.	<i>Análisis de Fósforo Reactivo</i> .....	49
3.5.4.4.	<i>Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)</i> .....	50
3.5.4.5.	<i>Medición de la turbidez</i> .....	50

3.5.4.6.	<i>Determinación del Potencial Hidrógeno en Campo</i> .....	51
3.5.4.7.	<i>Determinación del Potencial Hidrógeno en el Laboratorio</i> .....	51
3.5.5.	<i>Evaluación de la adsorción de Fósforo en Aguas Eutróficas</i> .....	51
<b>CAPÍTULO IV</b> .....		53
<b>4) ANÁLISIS Y RESULTADOS</b> .....		53
<b>4.1.</b>	<b>Resultados de la Síntesis de NPMs</b> .....	53
4.1.1.	<i>Espectroscopia IR</i> .....	53
4.1.2.	<i>Microscopia Electrónica</i> .....	54
<b>4.2.</b>	<b>Condiciones iniciales de las aguas eutróficas</b> .....	55
<b>4.3.</b>	<b>Análisis Estadístico</b> .....	56
<b>4.4.</b>	<b>Evaluación de la adsorción de fósforo</b> .....	61
<b>CONCLUSIONES</b> .....		67
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		69
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-3:</b> a. Agua Regia. b. Materiales dentro de la estufa.....	44
<b>Figura 2-3:</b> a. Proceso de síntesis de NPMs. b. Pipeteado de Ácido Oleico. c. Síntesis de NPMs, después de colocar el Na(OH).....	44
<b>Figura 3-3:</b> a. Antes de la purificación. b. Después de la Purificación. ....	45
<b>Figura 4-3:</b> a. Materiales utilizados en la espectroscopia IR. b. Muestra colocada en espectrofotómetro IR.....	46
<b>Figura 5-3:</b> a. Muestra colocada en el espectrofotómetro. b. Condiciones en las que se realiza el barrido a las NPMs.....	47
<b>Figura 6-3:</b> a. Análisis de la muestra en el MEB. ....	47
<b>Figura 7-3:</b> a. Muestra en el Laboratorio. c. Forma de sostener la muestra para su posterior recolección. d. Sistema de recolección. ....	48
<b>Figura 8-3:</b> a. Colocación de la membrana de microfibra de vidrio. b. Sistema de Filtración. ....	49
<b>Figura 9-3:</b> a. Muestra con PHOSVER 3.....	50
<b>Figura 10-3:</b> A. Medición de turbidez. B. Caja de tubos para encerar.....	51
<b>Figura 11-3:</b> a. Sonicación de las muestras. b. Preparación de las concentraciones. c. Muestras con tres concentraciones, para un tiempo de sonicación de 10 min. ....	52
<b>Figura 12-4:</b> Cristales de Hierro (Magnetita).....	54

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-4:</b> Espectrograma de las NPMs de hierro. ....	53
<b>Gráfico 2-4:</b> Cantidad y tamaños de las NPMs. ....	54
<b>Gráfico 3-4:</b> Fósforo inicial y el fósforo obtenido después de 5 minutos de interacción con las NPMs .....	63
<b>Gráfico 4-4:</b> Fósforo inicial y el fósforo obtenido después de 10 minutos de interacción con las NPMs .....	63
<b>Gráfico 5-4:</b> Comparación entre el pH inicial y el pH obtenido después de 5 minutos de interacción con las NPMs .....	64
<b>Gráfico 6-4:</b> Comparación entre el pH inicial y el pH obtenido después de 10 minutos de interacción con las NPMs .....	64
<b>Gráfico 7-4:</b> Comparación entre la turbidez inicial y la turbidez obtenido después de 5 minutos de interacción con las NPMs.....	65
<b>Gráfico 8-4:</b> Comparación entre la turbidez inicial y la turbidez obtenido después de 10 minutos de interacción con las NPMs.....	65
<b>Gráfico 9-4:</b> Comparación entre la DQO inicial y la DQO obtenida después de 5 minutos de interacción con las NPMs .....	66
<b>Gráfico 10-4:</b> Comparación entre la DQO inicial y la DQO obtenida después de 10 minutos de interacción con las NPMs .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-3:</b> Reactivos usados para la esterilización de materiales, síntesis y purificación de NPMs .....	35
<b>Tabla 2-3:</b> Reactivos para determinar la suspensión de Fósforo Reactivo, cuantificación de clorofila-a y Demanda Química de Oxígeno.....	37
<b>Tabla 3-3:</b> Materiales de Laboratorio usados en la Síntesis de NPMs.....	38
<b>Tabla 4-3:</b> Materiales usados en la recolección de la muestra, determinación de fósforo reactivo y Clorofila-a .....	38
<b>Tabla 5-3:</b> Equipos usados en la síntesis y caracterización de NPMs.....	39
<b>Tabla 6-3:</b> Equipos usados para la determinación de Clorofila-a, Potencial Hidrógeno, Demanda Química de Oxígeno y Turbiedad.....	40
<b>Tabla 7-3:</b> Análisis Factorial Mixto ( $2^3$ ) .....	41
<b>Tabla 8-3:</b> Configuración experimental de los tratamientos de NPMs. ....	52
<b>Tabla 9-4:</b> Resultados de los análisis realizados a la muestra madre.....	55
<b>Tabla 10-4:</b> Límites y determinación del estado trófico del agua de la “Laguna San Antonio de Padua”, según (Diana, Moreno-Arbeláez and Ramírez-Restrepo, 2010).....	55
<b>Tabla 11-4:</b> Pruebas de Normalidad.....	56
<b>Tabla 12-4:</b> Prueba de esfericidad de Mauchly.....	57
<b>Tabla 13-4:</b> Equivalencia de grupos.....	57
<b>Tabla 14-4:</b> Prueba de Levene (supuesto de homogeneidad de varianzas).....	58
<b>Tabla 15-4:</b> Resumen de las pruebas estadísticas .....	58
<b>Tabla 16-4:</b> Efectos de la Suspensión de NPMs sobre cada uno de los valores de los análisis. ....	59
<b>Tabla 17-4:</b> Diferencias por pares en los tratamientos.....	60
<b>Tabla 18-4:</b> Pruebas de efectos intra-sujetos con intervención del tiempo .....	61
<b>Tabla 19-4:</b> Resultados de los análisis de aguas eutróficas sonicados durante 5 y 10 minutos. ....	62

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo A:** Norma Técnica Ecuatoriana (INEN) para el agua, calidad de agua, muestreo, manejo y conservación de la muestra, en el literal 4

**Anexo B:** Protocolo Analítico de Clorofila a que se encuentra en la primera versión del “PROTOCOLO DE ANÁLISIS Y CÁLCULO DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES”, código: MFIT- 2013 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España, aprobado el 22 de noviembre del 2013

## ABREVIATURA

1.	<b>NPs</b>	Nanopartículas
2.	<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxígeno
3.	<b>P</b>	Phosphato (Fosfato)
4.	<b>NPMs</b>	Nanopartículas Magnéticas
5.	<b>Si</b>	Silicio
6.	<b>Fe</b>	Hierro
7.	<b>Al</b>	Aluminio
8.	<b>Mg</b>	Magnesio
9.	<b>Na</b>	Sodio
10.	<b>K</b>	Potasio
11.	<b>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato
12.	<b>Cl</b>	Cloro
13.	<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitrato
14.	<b>NH<sub>4</sub></b>	Amonio
15.	<b>Ca</b>	Calcio
16.	<b>HA</b>	Ácidos Húmicos
17.	<b>m</b>	metros
18.	<b>Kg</b>	Kilogramo
19.	<b>Hg</b>	Mercurio
20.	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
21.	<b>L</b>	litros
22.	<b>QP</b>	Químicamente Puro
23.	<b>MEB</b>	Microscopio Electrónico de Barrido

24.	<b>pH</b>	Potencial Hidrógeno
25.	<b>HNO<sub>3</sub></b>	Ácido Nítrico
26.	<b>HCl</b>	Ácido Clorhídrico
27.	<b>cm</b>	centímetro
28.	<b>T</b>	teslas
29.	<b>s</b>	segundos
30.	<b>gl</b>	Grados de Libertad
31.	<b>Sig</b>	Significancia
32.	<b>N</b>	Número
33.	<b>F</b>	Cuantil de la prueba de distribución

## RESUMEN

El objetivo general de esta investigación es aplicar nanopartículas magnéticas de hierro (magnetita) para la inactivación de fósforo en aguas con características eutróficas, convirtiéndose en un método de restauración de la calidad del agua, mediante el uso de la técnica de separación magnética de alto gradiente. El presente trabajo de titulación, informa acerca de la efectividad de usar las nanopartículas magnéticas de hierro (NPMs) en la eliminación de fósforo de muestras de agua extraídas de la Laguna de San Antonio de Padua (Chimborazo – Riobamba), con un estado trófico alto. Se consideró una muestra de agua sometida a un conjunto de tres tratamientos, basados en tres diferentes suspensiones de nanopartículas magnéticas, cada una sometida a dos periodos de interacción. Se encontraron altas eficiencias de inactivación de fósforo, obteniendo una reducción del 90,6%. La comparación entre diferentes tratamientos, ha demostrado que al aumentar las suspensiones de NPMs y el tiempo de interacción, muestra una mayor eficiencia en la inactivación de fósforo en aguas eutróficas. Los resultados evidencian una reducción importante de fósforo reactivo disuelto y particulado; adicionalmente, un descenso en el pH y turbidez; y un aumento en la demanda química de oxígeno en las muestras de agua que interaccionaron con las NPMs.

Palabras clave: <BIOFÍSICA>, <NANOTECNOLOGÍA>, <NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS>, <AGUAS EUTRÓFICAS>, <TRATAMIENTOS DE AGUAS>, <FÓSFORO>, <POTENCIAL HIDRÓGENO (pH)>, <CLOROFILA-A>, <TURBIDEZ>, <DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO>, <ANÁLISIS FACTORIAL MIXTO>

## SUMMARY

The objective of this research is to apply magnetic iron nanoparticles (magnetite) for phosphorus inactivation in eutrophic waters, becoming a method of restoring water quality, by using the high gradient magnetic separation technique. The present work degree was informed about the effectiveness of using the magnetic nanoparticles of iron (NPMs) in the elimination of phosphorus from water samples extracted from the Laguna de San Antonio de Padua (Chimborazo – Riobamba), with a high trophic state. A water sample was considered to be subjected to a set of three treatments, based on three different suspensions of magnetic nanoparticles, each subject to two periods of interaction. High phosphorus inactivation efficiencies were found, resulting in a 90% reduction. The comparison between different treatments has shown that by increasing the suspensions of NPMs and the interaction time, shows a greater efficiency in the inactivation of phosphorus in eutrophic waters. The result was showed a significant reduction in dissolved and particulate reagent phosphorus; additionally, a decrease in pH and turbidity; and an increase in the chemical oxygen demand in water samples that interacted with NPMs.

**Key words:** BIOPHYSICS, NANOTECHNOLOGY, NANOPARTICLES, MAGNETICS, EUTROPHICAL WATERS, WATER TREATMENTS, FORUM, HYDROGEN POTENTIAL (pH), CLOROFILA-A TURBIDEZ, DEMANAGEMENT, MIXYFACTION, NO MIXYCHRY OX.

## INTRODUCCIÓN

El origen del detrimento de la calidad del agua se debe a que los cuerpos de agua naturales son expuestos a contaminación, ya sea por aguas de lluvia sin tratamiento, basura, o por fluidos eliminados por los seres humanos; provocando la pérdida de diversidad biótica, un exceso de nutrientes que a su vez ocasionan ciclos descontrolados y que originan una suspensión anómala de carbonatos, fosfatos y nitratos, produciendo eutrofización (1).

La eutrofización, es uno de los problemas que abarca alrededor del 30 al 40 % de los lagos y embalses de todo el mundo (de Vicente *et al.*, 2011), causado por la incorporación de nutrientes extras en los cuerpos de agua. Este fenómeno provoca cambios en la composición de las especies, florecimiento de algas perjudiciales o anoxia de fondo. Siendo los responsables, el fósforo y el nitrógeno los que inducen el crecimiento de plantas acuáticas, debido a su aumento desmedido. No obstante, las algas y otras plantas acuáticas son primordiales para la cadena alimenticia de algunas especies, pero, su crecimiento desbordante en condiciones eutróficas, conducen al deterioro de la masa de agua (Boeykens *et al.*, 2017)

En el Ecuador, la laguna de San Antonio de Padua, ubicada al noroeste de la ciudad de Riobamba, tiene un sistema de tratamiento basado en limpieza de escombros y el retiro de totora (2), sin realizarse un análisis del grado de contaminación y la cantidad de carbonatos, nitratos y fosfatos, siendo un punto clave para el análisis de este estudio.

Entre los métodos más satisfactorios para la restauración de la calidad del agua, Merino-Martos, et al., en el 2015 propusieron la reducción de fosfatos (P) en aguas de entrada enriquecidas con nutrientes por medio de nanopartículas magnéticas (NPs), ya que por medio de separación magnética de alto gradiente permite manejar grandes masas de agua con concentraciones altas de P, además los óxidos de hierro magnéticos han sido utilizados anteriormente para eliminar el color, turbidez y los metales para la clarificación del agua, reconociendo una aplicación completa para la mejora de la calidad química (3), permitiendo también la recuperación potencial y la reutilización de nanopartículas magnéticas, siendo una técnica de bajo costo y fácil manipulación (Johannsen *et al.*, 2007).

Por todo lo antes mencionado, ésta investigación busca aplicar nanopartículas magnéticas de hierro (Magnetita), para la inactivación de fósforo en aguas eutróficas extraídas de la laguna de San Antonio de Padua, en busca de verificar si existe o no adsorción de fósforo reactivo después de interactuar en diferentes tiempos y concentraciones de nanopartículas magnéticas,

analizando a su vez los cambios en cuatro parámetros establecidos: clorofila-a, turbidez, pH y demanda química de Oxígeno.

## CAPÍTULO I

### 1) MARCO REFERENCIAL

#### 1.1. Identificación del problema

Los ecosistemas de aguas lénticas como lagunas y lagos, suministran un medio de subsistencia a animales y plantas acuáticas, aportando agua dulce a criaturas terrestres e inclusive al ser humano (Gautam *et al.*, 2017); además de, poseer un alto potencial biológico por su retención de agua y contaminantes, convirtiéndose en un punto caliente (hot spot) de biodiversidad. Generalmente, la ubicación de éste tipo de ecosistemas es adyacente a campos agrícolas, grandes ciudades y poblaciones, que provocan el uso diario de pesticidas, basura, fluidos corporales y productos de fertilización de tierras (Ulrich *et al.*, 2018) (Britanica, 2016).

En el Ecuador existen más de 72 lagunas, la mayoría con mantenimiento deficiente o escaso (Adés and Graham, 2016). Los problemas de este tipo de ecosistemas se deben; al crecimiento poblacional de las comunidades aledañas y su creciente demanda de agua; al incumplimiento de normas; a la ausencia de aplicación de sanciones rigurosas a los causantes de impactos ambientales adversos; e incluso por la idiosincrasia de los pueblos indígenas.

La calidad del agua de los ecosistemas acuáticos lénticos se ve alterada por el vertimiento de aguas residuales, la disposición final de residuos sólidos, agroquímicos y nutrientes que por escorrentía se desplazan hacia los cuerpos de agua; permitiendo que estas aguas se enriquezcan de nutrientes, generalmente nitrógeno y fósforo, induciendo a una sobrepoblación de plantas y organismos (Proceso de eutrofización). El fósforo es de gran importancia para las plantas y conducen al crecimiento de algas en aguas superficiales. Cuando estos organismos acuáticos cumplen su ciclo vital, consumen una gran cantidad de oxígeno disuelto, provocando que estas aguas eutrofizadas no sean idóneas para la mayor parte de los seres vivos (Williams, 1985).

Varios estudios presentan como los óxidos de Fe (Hierro) y Al (Aluminio) pueden interaccionar de manera indirecta con varios iones presentes en el agua; en el caso del Al, existen documentos que aseveran la capacidad de disminuir iones como Si (Silicio) y P (Fósforo), además de descartar efectos tóxicos en plantas de agua dulce y peces; en el caso del Fe, existe información sobre efectos más directos recopilados a la adsorción de diferentes aniones orgánicos y cationes,

principalmente metales pesados, mejorando la calidad del agua y aportando con un elemento limitante para las masas de agua dulce (Funes *et al.*, 2015).

Por las características magnetizables de las NPs de hierro y su capacidad de adsorción de fosfatos, es relevante identificar una técnica adecuada que permita determinar la suspensión y tiempos apropiados, haciendo uso de la técnica de separación magnética de alto gradiente; permitiéndonos verificar la inactivación de fósforo en aguas de características eutróficas, en búsqueda de mejorar la calidad de las aguas lénticas (Funes *et al.*, 2015), además de dar un gran paso para que próximamente se pueda reutilizar el fósforo extraído mediante un proceso con superconductores magnéticos; ya que es uno de los recursos más preciados en la actualidad por su escasez en la naturaleza (Gregori, 2014).

## **1.2. Justificación del problema**

Este proyecto busca identificar la capacidad de adsorción de fósforo en aguas eutróficas, a través de la aplicación de nanopartículas magnéticas de hierro, que permitan mejorar la calidad de las muestras de agua extraídas de la laguna de San Antonio de Padua. Con el fin de establecer si el uso de NPM's de hierro en ecosistemas acuáticos eutrofizados permiten su restauración, trabajando ampliamente en: la síntesis de nanopartículas magnéticas de hierro; la caracterización físico-química de las muestras de aguas lénticas, permitiéndonos conocer el estado de eutrofización, estableciendo las variables físico-químicas que inciden en la inactivación de fósforo luego de la aplicación de las NPMs y; en los períodos y concentraciones óptimas en que las NPM's son capaces de absorber el fósforo.

Se busca aportar teóricamente los estudios realizados por nuestros antecesores en este tipo de estudios, en aplicaciones a gran escala en lagunas o lagos eutrofizados o en proceso de eutrofización, con el objeto de obtener un mejoramiento ecológico del ecosistema, que permita un control sobre los nutrientes, resolver problemas hidrológicos, evitando además la pérdida faunística.

En el Ecuador, no se han realizado estudios de la aplicación de NPMs en aguas lénticas, lo cual fomentará el interés en este tipo de estudios y permitirá tener antecedentes importantes para el desarrollo de nuevas investigaciones. Además, es posible su realización ya que la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial docentes y estudiantes de la Facultad de Ciencias y de la carrera de Biofísica han iniciado estudios relacionados con procesos de síntesis y

caracterización de NPMs; y según la revisión bibliográfica desarrollada, llega a ser factible investigar nuevas aplicaciones que involucren pruebas a nivel de sistemas acuáticos.

Cumpliendo con el objetivo tres del Plan Nacional de Desarrollo, el cual se propone “*garantizar los derechos de la naturaleza para actuales y futuras generaciones*”, como estipula la Constitución del 2008 (Constitución del Ecuador, artículos 10 y 71-74), en la que las personas “*tomamos a la naturaleza como sujeto de derechos, implicando respetar su existencia, mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales y, su restauración en caso de degradación o contaminación*”. De manera prioritaria se busca conservar los ecosistemas generadores de agua considerando humedales, sistemas acuíferos, entre otros, ya que son las principales fuentes para el consumo y riego (Asamblea de la República del Ecuador, 2008)

### **1.3. Antecedentes de la investigación**

El potencial ecológico de las masas pequeñas de aguas lénticas, es el almacenamiento de agua, indispensable en la supervivencia de los seres vivos, aunque por consecuencias humanas también acopia contaminantes, provocando que se conviertan en punto caliente para la biodiversidad (Lürling, Waajen and van Oosterhout, 2014). Ulrich y sus colaboradores, en el 2018, realizaron un estudio, en el cual, se analizaron los cuerpos de agua pequeños lenticulares, enfocándose específicamente en la variabilidad del transporte de plaguicidas y patrones de transformación, (Ulrich *et al.*, 2018), complementándose con el estudio de Kuehn y su colaborador, en el 2016, el cuál determinó que los principales hongos pHyla, importantes en la mediación del flujo de nutrientes a niveles tróficos altos, que habitan en sistemas de agua dulce lenticos, descomponen la materia vegetal, la hojarasca, la cual es un recurso básico en las redes alimentarias, (Kuehn and Kevin, 2016).

Las aguas lénticas, por su exceso de nutrientes y descomposición de sus habitantes, sufren de un proceso llamado eutrofización, que es el descenso de la relación en el ciclo Nitrógeno/Fósforo que, por su interacción y acoplamiento, es la causa mas importante para la perdida del hábitat; disminuyendo la oxigenación y el hierro, acrecentando su proceso de putrefacción (Zhang *et al.*, 2018), agravando el impacto del calentamiento climático en la emisión de metano del lago. Esto fue estudiado por Sepulveda-Jauregui y sus colaboradores, en el 2018, por medio de un análisis de procesos antagónicos, la metanogénesis y la metanotrofia, probando que la eutrofización severa de los lagos provoca un impacto en el calentamiento global, debido a la emisión de metano en grandes cantidades, por la disponibilidad de nutrientes como el Nitrógeno y Fósforo (Sepulveda-Jauregui *et al.*, 2018)

Procesos de remediación menos costosos han sido desarrollados y estudiados por Inmaculada de Vicente y sus colaboradores en los últimos años, en el 2008, identificaron los factores que afectan la adsorción de fosfato al aluminio en el agua del lago, realizando dos experimentos de iones individuales, adicionando un análisis de sistemas cruzados en 30 lagos. Evidenciaron que los iones tienen influencias significativas en la efectividad de eliminación del fosfato en aguas de lagos por medio de NPs de Aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ). Si la concentración de Si (Silicio), Mg (Magnesio) e iones orgánicos es baja, la concentración de fósforo aumenta, suprimiendo la eliminación de fósforo; los iones  $\text{Na}^+$  (Sodio),  $\text{Cl}^-$  (Cloro) y  $(\text{SO}_4)_2$  (Sulfatos) no influyen en la eliminación de fósforo, aunque con consecuencias irremediables ya que aumentó la importancia de color y la demanda química de Oxígeno al buscar un control en las soluciones (de Vicente, Jensen and Andersen, 2008).

Por esta razón, Inmaculada de Vicente y sus colaboradores, continuaron documentando investigaciones que, en este caso, aplican NPMs de hierro, en búsqueda de variaciones en la adsorción de nutrientes en aguas generadas en laboratorio. En el 2010, proporcionaron una estimación cuantitativa, que, muestra lo conveniente de usar partículas de hierro y magnetita para la eliminación de fósforo en soluciones; verificando la biocompatibilidad y la baja toxicidad de los materiales magnéticos como el hierro y la magnetita; y concluyendo que, la magnetita mayor capacidad de adsorción de fósforo que las partículas ferrosas (de Vicente *et al.*, 2010). En el año 2011, realizaron una aplicación más exhaustiva, encontrando las interferencias químicas que se presentan al utilizar la separación magnética de alto gradiente para la eliminación de fosfatos; evidenciaron una fuerte dependencia de la fuerza iónica, estableciendo que los cationes  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (Potasio) y los aniones  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{Cl}^-$ , controlan la eliminación de fosfatos; determinaron que no existen cambios significativos en el pH (Potencial Hidrógeno); demostraron que las NPMs reducen la demanda química de oxígeno (DQO) en presencia del anión  $\text{NO}_3^-$  (Nitrato) y el catión  $\text{NH}_4^+$  (Amonio); además, que la concentración del catión  $\text{Ca}^{+2}$  (Calcio) es inversamente relacionada a la eliminación de P, con una cantidad de NPMs menor, y que, al aumentar la cantidad de NPMs no se observó efecto del catión  $\text{Ca}^{+2}$ ; y que las NPMs de hierro producen un cambio de color del agua en menor cantidad que las NPs de aluminio (de Vicente *et al.*, 2011).

Funes A. y sus colaboradores, en el 2015, analizaron micropartículas magnéticas como una nueva herramienta para la restauración de lagos, evaluando el impacto en los flujos de fósforo y las reservas de fósforo sedimentario. En su estudio, evidenciaron que durante el período anóxico, la carga interna del fósforo favorece a la mitad de la concentración media anual en una parte puntual del lago en estudio. Los óxidos de hierro presentes naturalmente en los sedimentos del agua son suficientes para absorber fósforo de la columna de agua y las micropartículas en este caso no muestran efectos sobre los flujos de fósforo, además, se identificó que en condiciones oxóxicas

las micropartículas reducen la concentración de P móvil, reduciendo el flujo de salida del P a largo plazo (Funes *et al.*, 2015).

En el 2015, Merino-Martos y sus colaboradores, identificaron las interferencias de ion único cuando se usan micropartículas magnéticas para la eliminación de fósforo en ecosistemas acuáticos, mostrando que los iones individuales en concentraciones altas de HA (Ácidos Húmicos) (35.5 mg/L) ayudaban significativamente en la eliminación de fósforo por adsorción en micropartículas de hierro carbonilo magnético y que al contrario, el Si suprimió la adsorción de fósforo a varias concentraciones altas (10, 25 y 50 mg / L), pero en concentraciones bajas no representó efecto alguno (5mg/L) (de Vicente *et al.*, 2011; Merino-Martos *et al.*, 2015) demostrando que el uso de esta técnica es eficiente en la remediación de aguas eutróficas y efectiva en la inactivación del fósforo.

## **1.4. Objetivos**

### ***1.4.1. Objetivo general***

Aplicar nanopartículas magnéticas de hierro para la inactivación de fósforo en aguas eutróficas.

### ***1.4.2. Objetivos específicos***

- Sintetizar nanopartículas magnéticas (magnetita).
- Realizar la caracterización físico-química de muestras de agua eutróficas.
- Establecer las variables físico-químicas que inciden en la inactivación de fósforo.
- Determinar la capacidad de las nanopartículas magnéticas para adsorber el fósforo.

## CAPÍTULO II

### 2) MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Ecosistemas Acuáticos

Los ecosistemas acuáticos, son un medio que está compuesto a su vez por dos medios.

El marino, la ingente masa de agua que está constituida por mares y océanos, permitiéndole abarcar un gran número de especies habitantes y que pese a las variaciones lumínicas, térmicas y de salinidad es el medio más estable; la luz solar es capaz de penetrar la región aproximadamente a una profundidad de 200 metros (m) hasta la zona eufótica (*lugar donde ingresa el 1% de luz para permitir la fotosíntesis, además en su límite inferior ya no se producirá*), sobre ella se encuentra la zona nerítica y por debajo la zona afótica, dándose diferentes formas de vida características.

El medio dulceacuícola, constituido por las aguas dulces, los lóticos o también llamados ríos y los lagos o lénticos; los sistemas lénticos están compuestos de dos grandes submedios, en el que, su diferencia principal es el movimiento de las aguas; los sistemas lóticos, son aquellas aguas procedentes de las lluvias, de los manantiales y la fusión de las nieves y los hielos, completando su ciclo en el mar, lugar donde estas aguas superficiales terminan, y en definitiva son corrientes constantes de agua (Marrero, 1971).

##### 2.1.1. Sistemas Lénticos

Cuando las aguas se depositan en las depresiones del relieve, forman pequeñas masas de agua, las cuales se denominan aguas lénticas, estas varían en extensión y profundidad, pero tienen en común que manantiales y ríos los alimentan, y casi todos desaguan a través de los ríos denominados emisarios, formando parte de la red de drenaje de las regiones en las que se hallan. Uno de los factores importantes es su grado de saturación de oxígeno, el cual le impone barreras fisiológicas enormes (Marrero, 1971b; Williams, 1985; Kuehn and Kevin, 2016).

Existen varias zonas en los ecosistemas lénticos, pero los más importantes son tres. La primera es llamada zona litoral, se caracteriza por ser poco profunda cerca de la costa, lugar en donde ocurren las plantas de humedales enraizadas. La segunda se llama zona de aguas abiertas o fótica, en la cual la luz solar permite que algunas especies presentes en dichas zonas se puedan alimentar de algas fotosintéticas. La tercera, es la zona de aguas profundas, en la cual no hay disponibilidad de

luz solar y la red alimenticia se basa en el detritus. Un sistema léntico, resulta del crecimiento de plantas en la zona litoral y de la producción de plancton en aguas abiertas; los humedales, dependen de su ancho, de la cantidad de cambios naturales producidos en sus aguas y la zona de la pendiente del litoral, para ser considerados como sistemas lénticos (Williams, 1985; Bardier and Zerbino, 2005; Kuehn and Kevin, 2016; Moustakas & Karakassis, 2005).

Estos realizan funciones importantes en beneficio del hombre y en relación a la circulación de las aguas, permiten que los ríos que los crucen, depositen sus sedimentos teniendo como consecuencia aguas muy limpias, además de actuar como un regulador de sus crecidas, impidiendo inundaciones en las poblaciones aledañas. Además, cuando la extensión de las aguas lénticas es mayor, moderan el clima de la región y para el hombre es una reserva de agua útil para los riegos, pesca, como represas usadas potencialmente para generar energía eléctrica, como centro turístico o como vías de comunicación y sobre todo su consumo (Kirtley F, Julivert and Zamarreño, 1966; Marrero, 1971b).

En los ecosistemas acuáticos lénticos, las especies cuentan con tres dimensiones o zonas para establecerse: el litoral, la limnética y la profunda; la zona del litoral es aquella que tiene vegetación enraizada, llamada también, orilla; la zona limnética, son las denominadas aguas abiertas que contienen el mayor porcentaje de fitoplancton; y la más importante, la zona profunda, la cual, permite que se adapten, discriminen el uso del espacio, eviten la competencia y depredación en el desarrollo de sus funciones vitales, haciendo que el flujo de energía, el ciclo de la materia y el proceso de delimitar el ecosistema en su interior se vuelvan más complejos.

Los sistemas lénticos se subdividen en dos tipos, dependiendo de la cantidad de nutrientes que poseen; cuando un lago o sistema léntico tiene sus aguas claras permitiendo que la luz penetre normalmente y el crecimiento de flora y fauna característicos de aguas bien oxigenadas es pequeño, estamos hablando de un sistema oligotrófico o pobre en nutrientes. Su contrario, el sistema léntico eutrófico, es aquel que posee una alta cantidad de nutrientes, en el cual crecen algas en gran cantidad provocando mayor turbiedad, un déficit de luz solar e impidiendo la fotosíntesis. Cuando estos organismos acuáticos mueren, su descomposición inducida por una alta actividad de bacterias, produce gasto elevado de oxígeno disuelto, por esta razón la fauna marina es escasa y se basa en barbos, percas y organismos de aguas poco ventiladas. En algunos lagos y lagunas, existen malos olores producidos por las putrefacciones anaeróbicas, haciendo que estas aguas de baja calidad no sean apropiadas para el consumo humano y sus actividades deportivas, Generalmente en estos sistemas lénticos con el paso del tiempo su profundidad disminuye ya que se va llenando de sedimentos, puesto que el fósforo es absorbido con más facilidad por las partículas del suelo o es disuelto por las aguas de escorrentía superficiales (Hendrik Ávila, Carmen Tudares, Miriam Sánquiz, María Araujo, Nerva Morales, 2007).

Los nutrientes que influyen en el proceso de eutrofización son los fosfatos y nitratos, en la mayoría de los lagos de agua dulce el factor limitante es el fósforo, y en muchos mares el factor limitante es el nitrógeno.

En un sistema acuático léntico eutrofizado, ingresa menos de 1 Kg de fósforo por hectárea y año, aunque con las sustancias vertidas por los seres humanos, como jabones y detergentes que contienen más del 16% en peso de fósforo, este se triplica por hectárea, permitiendo que estos lagos pierdan su potencial ecológico y terminen siendo suelo común y corriente (Rodríguez, Silvia C. - Martínez, 2009).

### **2.1.2. Localización y descripción del lugar (laguna de San Antonio)**

La Laguna San Antonio, se encuentra en la Región Sierra Central Ecuatoriana, Provincia de Chimborazo, Cantón Riobamba, Parroquia Velasco, barrio San Antonio de Padua. La laguna no pertenece al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), los terrenos colindantes a la laguna pertenecen al INDA (Instituto Nacional de Desarrollo Agrario) y otros son de propiedad privada; además, este reservorio natural de agua no tiene definido sus orillas y cada vez pierde superficie por los rellenos irresponsables que se realizan para producir asentamientos.



**Figura 1-2:** Laguna de San Antonio de Padua  
Elaborado por: Paola Toala, 2019

## **2.2. Indicadores de Calidad**

Se refiere a las características químicas, físicas y biológicas del agua. (Agencia de Protección Ambiental, 2007). Para evaluar la calidad del agua con referencia a la salud de los ecosistemas, a la seguridad para el contacto humano y que esta sea potable, se usa un conjunto de estándares, los cuales son:

### ***2.2.1. Indicadores Biológicos***

Es un parámetro que informa el estado salubre del medio acuático en el desarrollo del ciclo biológico, considerando la presencia y abundancia de una especie o comunidad indicadora en el proceso o estado del sistema en el cual habita (Herbas Antezana, Rivero Ostoic and Gonzales Ramos, 2006).

- PH
- Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)
- Demanda química de oxígeno (DQO)
- Oxígeno disuelto (DO)
- Dureza Total (TH)
- Metales pesados
- Nitrato
- Ortofosfatos
- Pesticidas
- Tensioactivos

### ***2.2.2. Indicadores Físico-Químicos***

Los indicadores físico químicos determinan la posible existencia de sustancias químicas que puedan afectar a la salud de los seres vivos; si existe un cambio en estos parámetros reflejará una actividad microbiológica en su crecimiento, proliferación o muerte (Zhen Wu, 2009).

- Temperatura del agua
- Conductancia Específica (EC)
- Conductancia eléctrica
- Conductividad
- Total de sólidos en suspensión
- Transparencia o turbidez
- Total de sólidos disueltos (TDS)
- Olor del agua
- Color del agua
- Sabor del agua

### **2.2.3. Indicadores Hidromorfológicos**

Evalúan las características hidrológicas y geomorfológicas tanto naturales como con alteraciones humanas, garantizando el funcionamiento del ecosistema fluvial (Martín Aparicio *et al.*, 2015).

- Volúmenes e hidrodinámica del lago
- Tiempo de permanencia
- Conexión con masas de agua subterránea
- Variación de la profundidad del lago
- Cantidad de agua
- Estructura del agua
- Sustrato del lecho del lago
- Estructura de la zona ribereña

### **2.3. Restauración de Sistemas Acuáticos**

Las perturbaciones ambientales de múltiple escala y las presiones antropogénicas amenazan y alteran los ecosistemas mundiales, acrecentando al pasar del tiempo las formas de restauración de ecosistemas acuáticos, debido a su importancia vital en los seres vivos (4) .

Por esto, generalmente es necesaria una gestión que sea sostenible, compatible con los procesos ecológicos, con la naturaleza del medio hídrico, el conocimiento y planificación del recurso ecológico, basándose en marcos socioeconómicos y demográficos claros permitiendo la conservación del territorio. Para lograr esto, se debe:

- Analizar cada punto de conexión del medio, tanto terrestre, acuático y todo lo que se encuentre cerca de él, sus conexiones hidrográficas, sus requisitos mínimos para su funcionamiento y su uso.
- Empezar un modelo de gestión sostenible del recurso, educando ambientalmente a las personas aledañas.
- Discutir mediante un foro científico-técnico para analizar la mejor estrategia de eliminar los contaminantes con bajo impacto ambiental, incluyendo las necesidades ambientales de la ciudad, que no se dañen los caudales hídricos normales de los ríos, lagos y humedales (Gemma Ansola González, 2015).

#### **2.3.1. Restauración de sistemas acuáticos eutrofizados**

Un ecosistema eutrofizado necesita disminuir la cantidad de nutrientes, pero no es tan fácil, existen consecuencias faunísticas de invertir el proceso, ya que generalmente los estudios se centran en eliminar fosfatos sin importar el impacto ambiental provocado.

Muchas instituciones gubernamentales y universidades de diversos países realizan investigaciones centrándose en la turbiedad, el pH, la demanda química de Oxígeno (DQO), las microalgas o cantidad de clorofila dispersa y la concentración de los nutrientes, parámetros que están íntimamente relacionados con la eutrofización y poder predecir el crecimiento de algas. Para calcular la capacidad máxima de asimilación de la materia orgánica, se generaron modelos en cuerpos de agua, así como medir los índices químicos y ecológicos de la eutrofización (Arenas, Chapa and Guerrero, 2010).

Existen varias técnicas que sirven para la desfosfatización de aguas en estado de eutrofización, las cuales se describirá a continuación:

2.3.1.1 *Arcilla modificada recubierta con lantano*: técnica usada para eliminar el fósforo reactivo filtrable del agua y evitar su liberación del sedimento. También llamada PHoslock, y permite la eliminación de fósforo reactivo filtrable basados en metales en presencia de sustancias húmicas con Lantano, visualizando un aumento de macrófitos y la profundidad del lago (Lürling, *et al.*, 2014).

2.3.1.2 *Arcilla bentonita (montmorillonita de calcio)*: es una técnica basada en la modificación de la superficie, pH, salinidad y temperatura, para remover fosfatos del medio. También llamada BepHos, visualizando que a temperaturas mayores la adsorción de fosfato en bajas concentraciones es mayor, ya sea en agua dulce, salobre o marina (Zamparas & Zacharias, 2014).

2.3.1.3 *Partículas magnéticas*: técnica basada en la recuperación de aguas ricas en fosfato mediante separación magnética, estas pueden estar elaboradas de Hierro o Magnetita, siendo no importante los cambios de pH y temperatura del agua, teniendo una eficiencia mayor ante las anteriores técnicas siendo un 80% la movilidad electroforética del fosfato (Funes, *et al.*, 2015).

### **2.3.2. Mecanismos para la remediación de contaminantes**

Los mecanismos para la remediación de ecosistemas tienen a consideración varios factores, el tipo de contaminante y el modelo de ecosistema con todas sus variantes, clima, temperatura, pH, salinidad, microorganismos, entre muchas otras; siendo interminable los mecanismos usados para la remediación de ecosistemas (Abhishek, *et al.*, 2018).

La descarga de efluentes industriales, hospitalarios, urbanos y sobre todo agrícolas producen constantemente una contaminación intensa en los ecosistemas acuáticos, la depuración natural debida a la escases del tratamiento, logra eliminar una cantidad considerable de contaminantes, sin que las características naturales se modifiquen, ya sea por arrastre natural, por el vertido de residuos sólidos o líquidos, por sedimentación, fotooxidación o por sobre todo las bacterias y hongos que existen de manera natural (Korol, 2007).

### **2.3.3. Problemas ambientales por exceso de fósforo: Eutrofización**

Para la mayoría de ecosistemas acuáticos de agua dulce y costeros, la eutrofización se ha convertido en el mayor problema de cambios en la calidad de éstas aguas. Generalmente, la transferencia de fósforo se da por las aguas de escorrentía, formando parte de sus minerales disueltos (Sharpley, *et al.*, 1992), permitiendo que el ciclo del fosfato y/o amonio no pueda cumplirse (Zamparas & Zacharias, 2014). Los problemas provocados son los siguientes:

- Contaminación de aguas subterráneas por lixiviación del fósforo aplicado a lo largo de los años en los suelos, adicionándole el que se encuentra en el estiércol de los animales (Eghball, *et al.*, 2004).
- La Eutrofización, que resulta de la entrada de fósforo a cuerpos de agua superficiales. En sistemas acuáticos, el nutriente limitante a menudo es el fósforo, pero por su baja capacidad amortiguante en su almacenamiento, estimula el crecimiento de algas y microorganismos acuáticos (Sharpley, *et al.*, 1994). La escases de oxígeno disuelto por el consumo del mismo durante la descomposición de algas, provoca que los microorganismos aeróbicos del ecosistema sean afectados y mueran (Walker, *et al.*, 2000); incrementado la demanda de oxígeno (DO) dentro del sistema, produciendo que la demanda de oxígeno se vuelva eventualmente un limitante, lo que provoca que el ecosistema acuático pase de ser un sistema aeróbico a uno anaeróbico (Rohwer, *et al.*, 2001). Esto, fomenta el crecimiento masivo de cianobacterias, provocando problemas de salud a los seres humanos y matando los animales que beban esta agua (Gitau, *et al.*, 2005).
- Cuerpos de agua eutrofizados, donde se altera la diversidad, la estructura y la abundancia ecológica, aunque aparentemente por la bonanza de nutrientes llegan al ecosistema acuático especies como anélidos, macroalgas verdes y flotantes, caracoles u otras especies oportunistas que en condiciones de desoxigenación se adaptan muy fácil, además, de ser mucho más resistentes que los autóctonos, logrando suplantarlos al paso del tiempo (Arenas, Chapa and Guerrero, 2010).

- Problemas económicos al país, por los elevados costos del tratamiento de estas aguas (Eghball, *et al.*, 2004).

## **2.4. Nanotecnología**

La Nanotecnología, es la tecnología que permite diseñar y manipular la materia en escalas pequeñas y como aplicación, busca resolver problemas, mejorar técnicas precursoras de alternativas económicas, eficaces, eficientes y de fácil manipulación, haciendo posible la remoción de virus, bacterias, metales pesados y plaguicidas, por su variabilidad en tamaños (Starbird-Pérez and Montero-Campos, 2015).

### **2.4.1. Nanopartículas**

Una revolución tecnológica son los materiales nanoestructurados, cumpliendo un papel preponderante las NPMs, dado a su variabilidad aplicativa: diagnóstico médico, almacenamiento de información, liberación controlada de drogas, remediación de ecosistemas, tratamiento de cáncer, entre muchas otras (Ramírez, 2013).

Estas NPs presentan características relacionadas con sus propiedades magnéticas, la anisotropía magnética de distinto valor que el volumen y un mayor espaciado entre niveles del espectro de energía electrónica, esta última puede ser regulable mediante el enlace con diferentes tipos de moléculas, siendo compatible con una alta gama de elementos químicos, permitiendo ser aplicable a distintas áreas (Grande, 2007).

Las NPs son sintetizadas en laboratorios o elaboradas con equipos especializados en cortes de materiales en dimensiones nanométricas, su tamaño puede variar entre 10 a 100 nanómetros y están compuestas por una mezcla de metales magnéticos como el níquel, hierro, cobalto, con sus óxidos y alguna molécula que define el fin aplicativo de la misma (Reyes, *et al.*, 2011).

A comparación de los mecanismos tradicionales, las NPMs permiten que sus tratamientos sean menos contaminantes, además, utiliza menos capital monetario y personal que en otros sistemas de tratamiento (Starbird-Pérez and Montero-Campos, 2015). Específicamente, se han presentado aplicaciones para la inactivación y remoción de fosfatos en aguas eutróficas a nivel de laboratorio, generando condiciones iniciales.

### **2.4.2. Síntesis de nanopartículas de hierro: Ferrofluido**

Una nueva clase de materiales magnéticos son los denominados ferrofluidos, los cuales consisten en NPMs coloidales estables y dispersas en un líquido portador que tiene las mismas

características magnéticas, permitiendo que estas no se agrupen, sino se encuentren suspensas en diferentes posiciones (Berkovsky, *et al.*, 1993).

Con el recubrimiento de las NPMs con moléculas de surfactante de cadena larga, se logra estabilizar los ferrofluidos; el surfactante produce la repulsión entrópica, venciendo las fuerzas de Vander-Waals de corto alcance, sin producir inestabilidad en la precipitación (García-Cerda, *et al.*, 2003). Dichas partículas tienen la característica de ser susceptibles a campos magnéticos externos, entregando energía y activando los momentos magnéticos de las partículas, como consecuencia, las partículas logran sobrepasar la barrera de energía, fluctuarán y la energía se disipará cuando el momento magnético se relaje y regresen a su orientación de equilibrio (Sánchez-Ramírez, *et al.*, 2017).

### **2.4.3. Caracterización de nanopartículas**

#### **2.4.3.1. Microscopia electrónica de barrido**

Es una técnica de caracterización para las nanopartículas, ya que nos permite observar las estructuras cuasi atómicas, su morfología y la composición química de la muestra.

Para formar la imagen usa un cañón de electrones los cuales son enfocados hacia la muestra, diferentes detectores recogen los electrones después de su interacción, creando una imagen y revelando sus características superficiales. El dispositivo causa poco o ningún daño a la muestra ya que se puede calibrar la energía de los haces de electrones focalizándolos (Vanegas, *et al.*, 2014).

La microscopía electrónica de barrido para la determinación de la muestra de manera óptima, trabaja con blancos en forma de porta muestras, los cuales sirven de guía para tomar el punto exacto donde se requieren tomas de una imagen de la muestra para su análisis químico y dependiendo de este aumentará o disminuirá la energía de los electrones del equipo (López, *et al.*, 2013).

#### **2.4.3.2. Espectrometría UV – visible**

La espectrometría ultravioleta-visible, es una técnica amplia y frecuente, empleada para realizar análisis químicos, la cual, implica el uso de luz o fotones dentro del rango ultravioleta cercano y el infrarrojo cercano, ya que en esta región las moléculas se someten a transiciones electrónicas, pasando de un estado basal a un estado excitado.

Para realizar el análisis, es necesario que la sustancia activa sea colorida, ya que consiste en medir la intensidad del color, puesto que, éste absorberá la longitud de onda del espectro visible,

mientras transmite los complementarios que dan origen al color de la muestra activa, comparándola con otras soluciones de concentración conocida que contenga el mismo absorbente. Cada elemento, sustancia o muestra, absorbe una longitud de onda característica (Leary and Holler, 1998).

Esta técnica, emplea la ley de Beer, la cual enuncia que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración para una muestra absorbente, que, este contenida en una celda de espesor constante, por lo tanto, lo que mide la espectrofotometría UV-visible es la concentración de la sustancia a medir en un fluido.

#### 2.4.3.3 *Espectrofotometría Infrarroja*

La espectrofotometría infrarroja, es un método que permite medir la adsorción de la radiación cuando atraviesa una fina capa de la sustancia activa; usando el espectro que corresponde a las frecuencias que van desde  $8 \times 10^{-5} \text{cm}$  a  $8 \times 10^{-2} \text{cm}$ , capaz de identificar sustancias estructuralmente diferentes, por medio de la vibración de los elementos que componen la molécula y su tipo de enlace.

Casi todos los grupos funcionales se encuentran en bandas de adsorción que van desde 800 y  $4000 \text{cm}^{-1}$ , presentados como gráficas de absorbancia vs el número de onda (Arenas Sosa and López Sanchez, 2004).

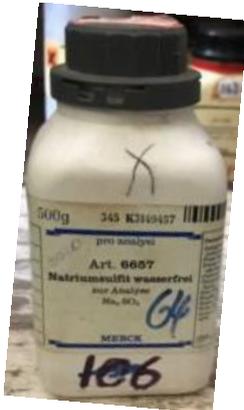
## CAPITULO III

### 3) MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Reactivos

**Tabla 1-3:** Reactivos usados para la esterilización de materiales, síntesis y purificación de NPMs

Ácido Clorhídrico		Ácido Nítrico	
Fórmula	HCl	Fórmula	HNO <sub>3</sub>
Masa Molar	36.46 g/mol	Masa Molar	63.01 g/mol
Casa Comercial	J.T.BAKER	Casa Comercial	J.T.BAKER
Grado Reactivo	Químicamente Puro (QP)	Grado Reactivo	QP
			
Ácido Oleico		Cloruro Férrico-Hexahidratado	
Fórmula	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Fórmula	FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O
Masa Molar	283.47 g/mol	Masa Molar	270.19 g/mol
Casa Comercial	MERCK	Casa Comercial	J.T.BAKER
Grado Reactivo	Análítico (RA/PA)	Grado	Técnico
			

Hidróxido de Sodio		Sulfito de Sodio	
Fórmula	Na(OH)	Fórmula	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
Masa Molar	39.98 g/mol	Masa Molar	126.04 g/mol
Casa Comercial	MERCK	Casa Comercial	MERCK
Grado reactivo	Analítico (RA/PA)	Grado reactivo	Analítico (RA/PA)
			

Agua Destilada	
Fórmula	H <sub>2</sub> O
Masa Molar	18.02 g/mol
Casa Comercial	Baterías Ecuador
	

Elaborado por: Paola Toala, 2019.

**Tabla 2-3:** Reactivos para determinar la concentración de Fósforo Reactivo, cuantificación de clorofila-a y Demanda Química de Oxígeno.

PHOSVER 3					
Reactivos	Ácido ascórbico	Pirosulfato de Potasio	Molibdato de Sodio	Tartrato de Potasio y Antimonil	EDTA, Sal Tetrasódica
Fórmula	$C_6H_8O_6$	$K_2S_2O_7$	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	$C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$	$C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8 \cdot 2H_2O$
Casa Comercial	HACH				
					
<b>Agua Destilada</b>			<b>Acetona</b>		
Fórmula	$H_2O$		Fórmula	$C_3H_6O$	
Masa Molar	18.02 g/mol		Masa Molar	58.08 g/mol	
Casa Comercial	Baterías Ecuador		Casa Comercial	J.T.AKER	
			Grado reactivo	QP	
					
<b>Vial de Digestión de Mercurio (Hg)</b>					
Reactivos	Hg				
Rango	Alto				
Casa Comercial	HACH				
					

Elaborado por: Paola Toala, 2019.

### 3.2. Materiales

**Tabla 3-3:** Materiales de Laboratorio usados en la Síntesis de NPMs

1) Vasos de Precipitación de 150 ml y de 100 ml	2) Vidrio de Reloj
3) Espátula con cuchara	4) Varrilla de Agitación
5) Pipeta de 10 ml	6) Piceta
7) Pera de Succión	8) Termómetro
9) Matraz Erlenmeyer de 500 ml	10) Frascos de Vidrio

Elaborado por: Paola Toala, 2019.

**Tabla 4-3:** Materiales usados en la recolección de la muestra, determinación de fósforo reactivo y Clorofila-a

Frasco ámbar de vidrio con cierre hermético	Palo de madera de 150 cm
Tubos de ensayo con tapa	

Filtros de microfibra de Vidrio	1. Kitasato de 500 ml	2. Embudo
Poros de 0.45 µm	3. Mangueras	4. Papel Filtro
		

Elaborado por: Paola Toala, 2019

### 3.3. Equipos

**Tabla 5-3:** Equipos usados en la síntesis y caracterización de NPMs

Agitador-Calentador Magnético		Sorbona	
Marca	Fisher Scientific	Marca	BIOBASE
Modelo	C1928150310708H	Modelo	FH1000(X)
Rango de Temperatura	(0 – 300) °C	Dimensiones	880*730*745
Peso máx.	2 L		
Velocidad máx.	2500 rpm		
Dimensiones	(21 x 13.3 x 11.1) cm		
			
Estufa		Balanza Electrónica	
Marca	ESCO	Marca	OHAUS
Modelo	OFA-54-8	Modelo	Explorer EX623
Rango de Temperatura	0 °C - 300°C / 500°F	Error	±0.1 mg
Peso máx.	54 L	Capacidad	620g * 0.001 g
		Software de análisis	Ingeniosuly Practical
			

Espectrofotómetro IR		Espectrofotómetro UV	
Marca	JASCO	Marca	Thermo Electron
Modelo	FT/IR-4100	Modelo	Helios B
Resolución máx.	0.9 cm <sup>-1</sup>		
Software de análisis	Spectra Manager		
			
Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)			
Marca	JEOL		
Modelo	JSM-IT500HR		
Ampliación máx.	x100,000		
			

Elaborado por: Paola Toala, 2019

**Tabla 6-3:** Equipos usados para la determinación de Clorofila-a, Potencial Hidrógeno, Demanda Química de Oxígeno y Turbiedad

Bomba de vacío		Espectrofotómetro UV	
Marca	BOECO	Marca	Thermo Electron
Modelo	R-300	Modelo	Helios B
Presión máx.	1000 atm		
			
Baño María Ultrasonico Sonificador		pH metro	
Marca	Tuttnauer	Marca	HANNA HI
Modelo	Sonica 882	Modelo	98128
Temperatura máx.	60 °C	Resolución	0.01
Tiempo máx.	15 segundos	Marca	HANNA HI
			

Digestor de DQO		Fotómetro	
Marca	HANNA instruments	Marca	HACH
Modelo	HI 839800	Modelo	DR 2800
Rango de Temperatura	60°C	Montaje	Benchtop
			
Turbidímetro		Procesador ultrasónico	
Marca	HACH	Marca	SONICS Vibra Cell
Modelo	RATIO XR	Modelo	VC 505 / VC 750
Rango de Turbiedad	(0.001 – 1999)NTU	Procesador Ultrasónico	500 y 750 Vatios
			

Elaborado por: Paola Toala, 2019

### 3.4. Metodología Estadística

Esta investigación es de tipo experimental y correlacional, permitiendo determinar la suspensión de nanopartículas magnéticas y el tiempo de contacto necesario para inactivar el fósforo presente en muestras de aguas eutróficas. Para esto, se usó un diseño estadístico que consta de un Análisis Factorial Mixto estructurado de la siguiente manera:

**Tabla 7-3:** Análisis Factorial Mixto (2<sup>3</sup>)

Muestra	Suspensión 1 de NPMs	Tiempo 1
		Tiempo 2
	Suspensión 2 de NPMs	Tiempo 1
		Tiempo 2
	Suspensión 3 de NPMs	Tiempo 1
		Tiempo 2

Elaborado por: Paola Toala, 2019

El estudio contempla unidades experimentales que constan de un tratamiento sin inoculación como control y unidades tratamiento con varias repeticiones en las que se inoculó diferentes

concentraciones de nanopartículas magnéticas de hierro considerando tiempos de retención, como se observa en la tabla 7-3. Todos los tratamientos se realizaron en condiciones aerobias.

Se trabajó con un volumen de 300 ml por unidad experimental, previo el establecimiento de las características físico-químicas. La cantidad de agua a tratar corresponde a que se determinó la dosis de nanopartículas magnéticas necesarias para la adsorción del fósforo, siendo un total de 18 análisis.

Para el análisis estadístico se usó el programa estadístico SPSS, que, como factores intra-sujetos o también llamadas variables dependientes, se colocaron los parámetros a analizar: fósforo, turbidez, pH, DQO y clorofila-a, como se muestran en la tabla 8-3, y como factores inter-sujetos o también llamadas variables independientes, la suspensión de NPMs en sus diferentes tratamientos, como se muestran en la tabla 9-3; realizando diferentes pruebas estadísticas que implica en el ANOVA factorial mixto, permitiendo analizar cada una de las variables.

**Tabla 8-3:** Variables de muestras relacionadas

<b>Factores intra-sujetos</b>	
factor	Variable dependiente
1	Fósforo
2	Turbidez
3	pH
4	DQO
5	Clorofila-a

Elaborado por: Paola Toala, 2019

**Tabla 9-3:** Variables de muestras independientes

<b>Factores inter-sujetos</b>		N
	10	6
<b>Suspensión de NPMs</b>	20	6
	40	6

Elaborado por: Paola Toala, 2019

Acorde a la metodología estadística, y concordando con el análisis planteado, se hizo necesario plantear la hipótesis nula (H0) y la hipótesis alternativa (H1), permitiéndonos aseverar que, si una se cumple, la otra se anulará.

### ***3.4.1. Hipótesis Nula***

Las nanopartículas magnéticas en diferentes concentraciones y con dos tiempos de interacción, no inactivarán el fósforo reactivo contenido en las aguas eutróficas extraídas de la Laguna de San Antonio de Padua.

### ***3.4.2. Hipótesis Alternativa***

Las nanopartículas magnéticas en diferentes concentraciones y con dos tiempos de interacción, inactivarán el fósforo reactivo contenido en las aguas eutróficas extraídas de la Laguna de San Antonio de Padua.

## **3.5. Métodos**

### ***3.5.1. Metodología para la Síntesis de NPMs***

#### ***3.5.1.1. Esterilización de Materiales***

Este paso es importante para el proceso de síntesis de NPMs, de éste depende el poder magnético y la capacidad de inactivación del fósforo.

Primero, los materiales fueron lavados con jabón, esponja, cepillo y agua, se procedió a enjuagar con agua destilada y luego, se colocó en la estufa. Después, se realiza nuevamente un lavado con agua regia y agua destilada para evitar que metales restantes de usos anteriores puedan tener alguna interacción con las NPMs. El proceso se detalla a continuación:

En un vaso de precipitación se realiza una mezcla en relación 1:3 de agua y jabón, donde se sumergió el cepillo de cerdas suaves, intentando hacer espuma. Los materiales fueron lavados con el cepillo, procurando enfocarse en las esquinas y bordes de los materiales. Mientras tanto, se precalentó la estufa a 70°C. Luego del lavado, se colocaron los materiales sobre una franela limpia, procediendo después, a ubicarlos cuidadosa y estratégicamente dentro de la estufa para su esterilización (20 min). Posteriormente, éstos fueron colocados sobre una franela limpia y seca hasta que baje su temperatura. Seguidamente, son enjuagados con agua regia con una relación 3:1 de Ácido Clorhídrico (HCl) y Ácido Nítrico (HNO<sub>3</sub>). Finalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada y se volvió a colocarlos en la estufa durante 20 minutos más.

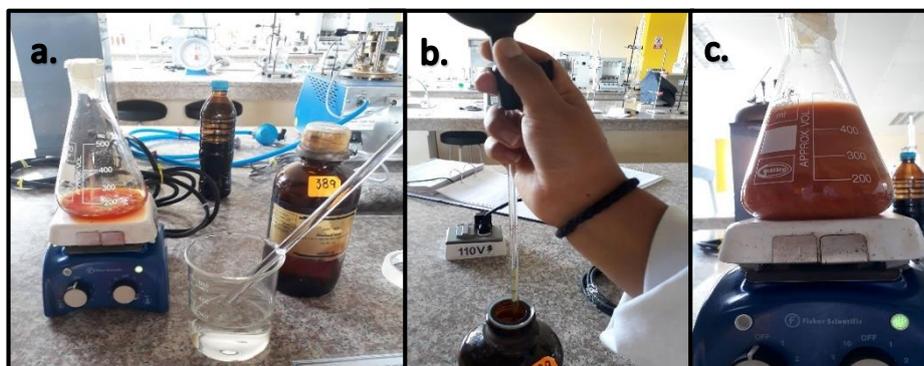


**Figura 1-3:** a. Agua Regia. b. Materiales dentro de la estufa  
Elaborado por: Paola Toala, 2019

### 3.5.1.2. Síntesis de NPMs

La síntesis se basa en el procedimiento realizado por Vera F., en el año 2018 (“Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magnéticas”), el cual hace uso del método de co-precipitación y absorción superficial. Dentro del proceso se realizaron las siguientes variaciones:

En un Matraz Erlenmeyer de 50 ml, se fijaron 35,97 ml de agua destilada con la ayuda de una probeta de 50 ml. Se pesó en la balanza electrónica 899,3 mg de Cloruro Férrico Hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 449,6 mg de Sulfito de Sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) y 9,6 g de Hidróxido de Sodio ( $\text{Na}(\text{OH})$ ). Los dos primeros compuestos fueron agregados al Matraz Erlenmeyer y se tapó con una lámina de papel aluminio para su posterior colocación en el agitador-calentador magnético durante 30 minutos. En un vaso de precipitación, con la ayuda de una varilla de agitación, se mezclaron 300 ml de agua destilada con 9,6 g de  $\text{Na}(\text{OH})$ . Luego se pipetearon 1,80 ml de Ácido Oleico, este se colocó en el Matraz Erlenmeyer y situado en el agitador-calentador magnético a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , durante 10 min. Manteniendo la agitación magnética y verificando que la temperatura del precipitado no supere los  $60^\circ\text{C}$ , se agregó la solución de  $\text{Na}(\text{OH})$  antes indicada. Pasados 30 minutos se mantiene la agitación a temperatura ambiente por otros 30 minutos



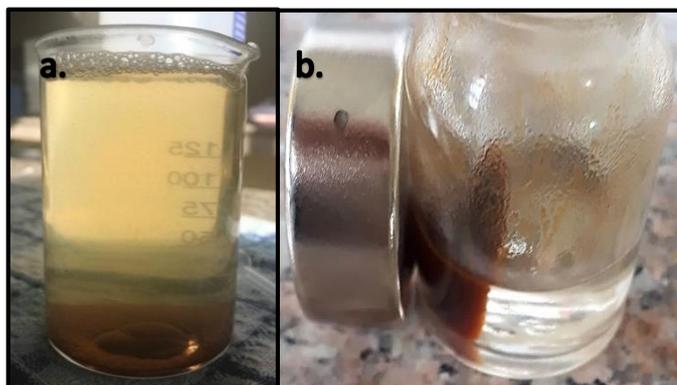
**Figura 2-3:** a. Proceso de síntesis de NPMs. b. Pipeteado de Ácido Oleico.  
c. Síntesis de NPMs, después de colocar el  $\text{Na}(\text{OH})$

Elaborado por: Paola Toala, 2019

### 3.5.2. Purificación de las NPMs

La purificación de las NPMs, se realizan mediante dos métodos de ablución, en búsqueda de disminuir la fracción acuosa generada en la síntesis de NPMs.

A continuación, se describen paso a paso cada una de las purificaciones:



**Figura 3-3:** a. Antes de la purificación. b. Después de la Purificación.  
Elaborado por: Paola Toala, 2019

#### 3.5.2.1. Purificación Física

Se empleó un imán de 0,2 Teslas (T) de campo magnético para retirar la cápsula de agitación del matraz Erlenmeyer. Se racionó a su mitad (150 ml) el ferrofluido, en dos vasos de precipitación, realizándose en cada uno el procedimiento que se describe a continuación:

Usando nuevamente el imán, se atrajeron las nanopartículas magnéticas hacia un costado del vaso de precipitación, mientras que, con una pipeta Pasteur de 3 ml, se extrajo el líquido restante del otro costado.

De esta manera, las NPMs, por atracción permanecerán en el vaso de precipitación, logrando descartar la mayor cantidad de fracción acuosa posible.

#### 3.5.2.2. Purificación Química

Se colocó 50 ml de agua destilada en cada uno de los vasos de precipitación. Se usó una varilla de agitación para mezclar uniformemente el líquido (agua destilada) con las NPMs y permitir que las NPMs adheridas al vaso de precipitación, por efecto del campo magnético, formen parte de la mezcla.

### 3.5.3. Caracterización de las NPMS

Para obtener datos de estabilidad, grupos funcionales de interés, cantidades relativas de las NPMS, y tamaño de la muestra, se usaron las siguientes técnicas:

#### 3.5.3.1. Espectroscopia IR

Con el equipo previamente calibrado, se colocan 2 gotas de solución de NPMS en el porta muestra del espectroscopio (IR JASCO, FT/IR-4100). Se alineó y aseguró el cristal, para que todo el rango de luz pueda atravesar sin interferencias la solución de NPMS y así la absorción de la energía produzca las vibraciones características en los enlaces de cada una de las moléculas. Se usó el software (Spectra Manager) para la lectura, captura y procesamiento de los datos obtenidos en el análisis.



**Figura 4-3:** a. Materiales utilizados en la espectroscopia IR. b. Muestra colocada en espectrofotómetro IR.

**Elaborado por:** Paola Toala, 2019

#### 3.5.3.2. Espectroscopia UV-visible

Las muestras de NPMS diluidas en agua destilada fueron analizadas con la ayuda del espectrofotómetro (Thermo Electron, Helios B UV-visible) y una celda de cuarzo.

Para generar el fondo o línea base, se utilizó 4 ml de agua destilada, incitando que la lectura del equipo sea un espectro netamente de las NPMS. La muestra se analizó en tres distintas cantidades de NPMS; en la primera se usó una relación 1:3 ml de NPMS y agua destilada, en la segunda de 2:3 ml de las mismas sustancias y en la tercera 3:3. En cada una de las lecturas se realizó un enjuague de la celda con agua destilada. Se realizaron barridos de absorbancia, con el fin de obtener 3 espectros comparables con anteriores estudios.

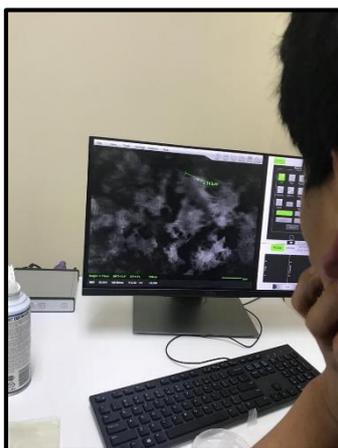


**Figura 5-3:** a. Muestra colocada en el espectrofotómetro. b. Condiciones en las que se realiza el barrido a las NPMs.

Elaborado por: Paola Toala, 2019

### 3.5.3.3. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Previa observación y caracterización de las NPMs por medio del MEB (JEOL, JSM-IT100LA), fue necesario obtener muestras secas. Para esto, se usó la mufla (SNOL, modelo 3/1100 LHM01) a 60°C. Se dispuso de una gota de muestra en un porta muestras de vidrio. Después de 10 min, se extrajo el porta muestra de la mufla y se raspó la muestra con una pinza. Se colocó el polvo de muestra en una cinta oscura doble faz que no permite refracción, la misma, se ubica de manera estratégica en un porta muestra propio del equipo, y se procede al análisis físico y químico.



**Figura 6-3:** Análisis de la muestra en el MEB.

Elaborado por: Paola Toala, 2019

### 3.5.4. Análisis de Aguas Eutróficas

#### 3.5.4.1. Recolección de la muestra

Se usó la Norma Técnica Ecuatoriana (INEN) para el agua, calidad de agua, muestreo, manejo y conservación de la muestra, específicamente el literal 4; como se describe a continuación:

Se adhirió a un costado de un palo de madera de 1.50 metros, una botella ámbar de vidrio, previamente esterilizada, con ayuda de cinta taípe negra. Se introdujo la botella a 1 m de profundidad, se llenó completamente y se tapó de tal forma que no exista aire sobre la muestra. Durante todo el transporte, se mantuvo la muestra en un ambiente fresco, protegida de la luz solar y evitando cualquier golpe.

En el laboratorio, la muestra se mantuvo en refrigeración a 4°C y en total oscuridad, se etiquetó como Muestra Madre, agua eutrófica de la laguna de San Antonio de Padua, con fecha y hora del muestreo.



**Figura 7-3:** a. Muestra en el Laboratorio. b. Forma de sostener la muestra para su posterior recolección. c. Sistema de recolección.

Elaborado por: Paola Toala, 2019

#### 3.5.4.2. Cuantificación de la Clorofila-a

Siguiendo el Protocolo Analítico de Clorofila-a, se refrigeró la muestra a 4°C, en total oscuridad, durante 24 horas; se empleó una bomba al vacío (BOECO, R-300), embudo y kitasato de vidrio, como dispositivo de filtración, y con el uso de un filtro de microfibras de vidrio (47mm de diámetro y 0.45 µm de poro), se procedió a filtrar 200 ml de muestra con una presión de 100 mm de mercurio (Hg); se retiró el filtro con una pinza pequeña y se colocó el mismo en un tubo de ensayo con tapa.

Se introdujeron 10 ml de solución acuosa de acetona al 90% en el tubo de ensayo, se tapó, intentado que el fluido, y sus vapores no se dispersen.

Se colocó el tubo en el baño ultrasónico con hielo picado y agua destilada al máximo, durante 15 segundos (s), con un descanso de 10 s, por un periodo de 1 min; se refrigeró la muestra durante 12 horas a 4°C.

Para la determinación espectrofotométrica, se retiraron los restos grandes del filtro con ayuda de una pinza pequeña y con previa calibración del espectrofotómetro (Thermo Electron, Helios B UV-visible), se procedió a realizar un barrido de la muestra, entre 350 y 850 nm. Se extrajeron las absorbancias necesarias para aplicar la fórmula tricromática de Jeffrey y HumpHrey (1975):

$$\text{Chl. "a"} (\text{mg}/\text{m}^3) = \frac{[11,85 * (A664 - A750) - 1,54(A647 - A750) - 0,80 * (A630 - A750)] * v}{V * Z} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

**A630, A647, A664, A750** = Densidad óptica (absorbancia) medida a las longitudes de onda indicadas (en nm)

v = volumen del extracto, en mL

V = volumen de agua filtrada, en L

Z = Paso óptico de la cubeta, en cm



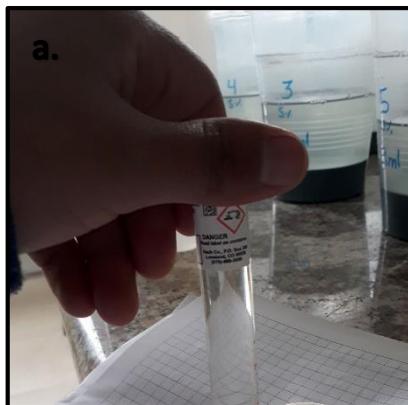
**Figura 8-3:** a. Colocación de la membrana de microfibras de vidrio. b. Sistema de Filtración.

Elaborado por: Paola Toala, 2019

#### 3.5.4.3. Análisis de Fósforo Reactivo

Con la previa calibración del fotómetro (HACH, DR 2800) y el método de aminoácido (8178), se seleccionó el programa de fósforo reactivo almacenado en el fotómetro; se colocó 10 ml de la

muestra en el tubo de ensayo propio del equipo, disolviendo en su interior un sobre de PHOSVER3 y se agitó el tubo con tapa durante 1 min. para homogeneizar la muestra; se limpió con una toallita el tubo, y se procedió a la lectura del equipo, introduciendo el tubo en su interior.



**Figura 9-3:** a. Muestra con PHOSVER 3.

Elaborado por: Paola Toala, 2019

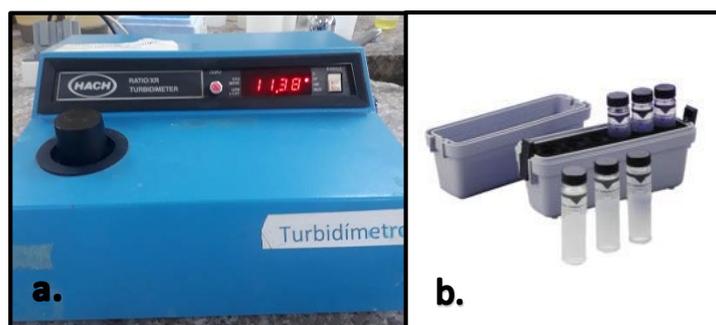
#### 3.5.4.4. *Determinación de Demanda Química de Oxígeno (DQO)*

En el fotómetro (HACH, DR 2800), se seleccionó el programa almacenado para DQO, mientras, se preparó el blanco con 2ml de agua destilada en un tubo reactivo para DQO de rango alto (0-1500 mg/l), y se procede a la lectura, calibrando el equipo.

Se sostuvo el tubo reactivo para DQO de rango alto en 45° de inclinación y con el uso de una pipeta Pasteur, se introdujo 2 ml de la muestra, se tapó el tubo y se limpió la superficie. Se colocó la muestra en el digestor con las siguientes condiciones: 160°C y 120 min. Se limpió nuevamente la superficie y analizamos las muestras en el fotómetro.

#### 3.5.4.5. *Medición de la turbidez*

Con el uso del Turbidímetro (HACH, RATIO XR), mediante el método nefelométrico, se procedió a calibrar con el tubo de -1.8 unidades nefelométricas (NFU); se colocó en el porta muestra propio del Turbidímetro, 20 ml de muestra, se limpió con un pañuelo del porta muestra y se introdujo en el equipo; para tomar los datos, seleccionamos la cantidad más alta indicada en el equipo.



**Figura 10-3:** A. Medición de turbidez. B. Caja de tubos para encerrar.

Elaborado por: Paola Toala, 2019

#### *3.5.4.6. Determinación del Potencial Hidrógeno en Campo*

Se realizó la lectura del pH en campo para conocer el valor real de la concentración de iones hidrógeno en la Laguna de San Antonio de Padua; con el uso del pHmetro (HANNA HI, 98128), mediante el método potenciométrico, se intentó ubicar el pHmetro en la parte más cercana al centro de la laguna, se tomaron las lecturas más altas; se realizó un triplicado de lecturas, para proceder a realizar un promedio.

#### *3.5.4.7. Determinación del Potencial Hidrógeno en el Laboratorio*

En búsqueda de una variación del pH, después de la interacción de las aguas eutróficas con las NPMs, con el uso del pHmetro (HANNA HI, 98128) y mediante el método potenciométrico, se enjuagó el pHmetro con la muestra, evitándose así lecturas erróneas; se procedió a tomar un triplicado de lecturas de cada muestra.

#### *3.5.5. Evaluación de la adsorción de Fósforo en Aguas Eutróficas*

Cumpliendo con el modelo estadístico planteado para evaluar la capacidad de adsorción de fósforo con la aplicación de las NPMs de hierro, se tomó como muestra madre 6 litros de agua procedente de la Laguna “San Antonio de Padua”. Se utilizaron tres diferentes tratamientos, cada uno consistió en agregar 10ml (T<sub>1</sub>), 20ml (T<sub>2</sub>) y 40ml (T<sub>3</sub>) de suspensión de NPMs (50gL<sup>-1</sup>), como se puede observar en la tabla 8-3, en 300 ml de agua de la “Laguna de San Antonio de Padua”, con interacciones en dos tiempos: 5 min. y 10 min.

**Tabla 8-3:** Configuración experimental de los tratamientos de NPMs.

Tratamiento	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Suspensión de NPMs	10	20	40

Elaborado por: Paola Toala, 2019

Se realizaron dos unidades experimentales por tratamiento; la primera unidad experimental, tuvo un tiempo de sonicación de 10 min. y la segunda unidad experimental con un tiempo de sonicación de 5 min., ambos con una amplitud del 40% de la onda de ultrasonido, siendo 60 Hz la frecuencia máxima cuando la amplitud está al 100%; se realizó un triplicado de cada tratamiento con su tiempo de interacción, dando un total de 18 unidades experimentales. Después de la purificación (punto 3.5.2), se aplicaron cinco análisis para determinar las variaciones obtenidas después de esta interacción, las cuales son: Clorofila-a, fósforo reactivo, pH, DQO y turbidez.



**Figura 11-3:** a. Sonicación de las muestras. b. Preparación de las concentraciones. c. Muestras con tres concentraciones, para un tiempo de sonicación de 10 min.

Elaborado por: Paola Toala, 2019

## CAPÍTULO IV

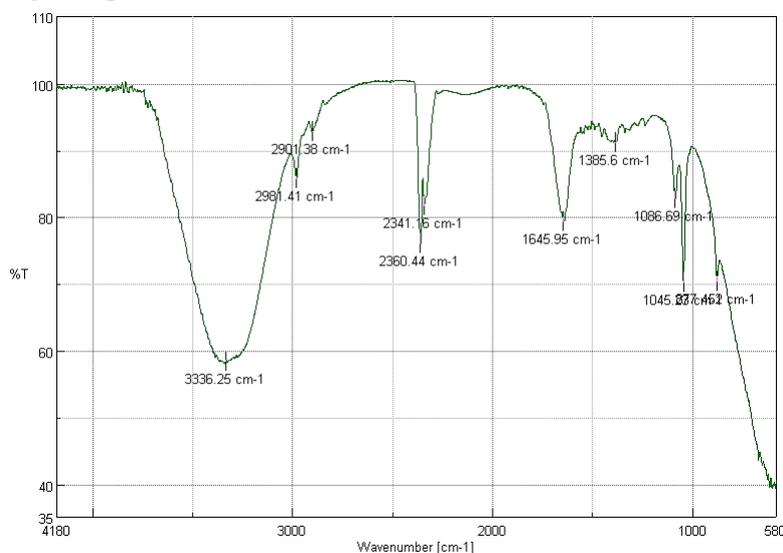
### 4) ANÁLISIS Y RESULTADOS

#### 4.1. Resultados de la Síntesis de NPMs

##### 4.1.1. Espectroscopia IR

El Gráfico 1-4, muestra un espectro propio de la formación de NPMs. Pueden observarse bandas de absorción características para los grupos funcionales más comunes como: la banda 3386.95  $\text{cm}^{-1}$ , que se atribuye a la vibración del grupo hidroxilo (O-H); la banda 2981.41  $\text{cm}^{-1}$ , característica del estiramiento anti simétrico de los enlace carbono-hidrógeno (C-H); la 2901.38  $\text{cm}^{-1}$ , perteneciente a la banda que se genera por la resonancia de Fermi en los aldehídos (C-H); las bandas 2360.44  $\text{cm}^{-1}$  y 2341.16  $\text{cm}^{-1}$ , formadas por el estiramiento del grupo  $\text{NH}_3\text{C}$  en aminoácidos; la banda 1645.16  $\text{cm}^{-1}$ , designada al estiramiento producido por la ausencia de un acoplamiento fuerte de los hidrocarburos alquilo (C=C); la banda 1385.6  $\text{cm}^{-1}$ , característica de la vibración de los enlaces isopropilo; la banda 1086.69  $\text{cm}^{-1}$ , debido al estiramiento de los enlaces que producen vibraciones pertenecientes a los grupos carboxílicos (CO); la banda 1045.23  $\text{cm}^{-1}$ , producida por el estiramiento de los alcoholes primarios (C-O);y finalmente, la banda 877.452  $\text{cm}^{-1}$  que indica la vibración producida por el estiramiento de Hematita (Fe-O-Fe) (Shurvell, 2017).

**Gráfico 1-4:** Espectrograma de las NPMs de hierro.



Elaborado por: Paola Toala, 2019

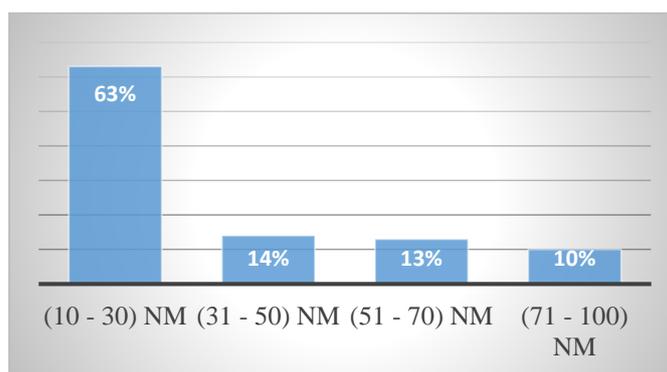
#### 4.1.2. Microscopia Electrónica

La observación realizada con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), con un aumento de 10  $\mu\text{m}$ , un voltaje de 20.0 kV y una viscosidad de 1675 cps; arrojó el resultado de 100 NPMs con su información morfológica (Figura 12-4). De acuerdo al análisis realizado con el software Image J, se pudo determinar que el 63% de NPMs presentan un tamaño que oscila entre 10 y 30 nm, con un valor medio de 15 nm (Gráfico 2-4). Confirmando entonces, según la uniformidad en los tamaños, que el proceso de síntesis utilizado es apropiado. Se deduce también que, el surfactante actúa de la manera esperada e influye de forma positiva en las propiedades morfológicas de las nanopartículas magnéticas, y que la cantidad de reactivo permite la generación de interacciones suficientes para crear la sal precursora de las NPMs.



**Figura 12-4:** Cristales de Hierro (Magnetita)  
Elaborado por: Paola Toala, 2019

**Gráfico 2-4:** Cantidad y tamaños de las NPMs.



**Elaborado por:** Paola Toala, 2019

## 4.2. Condiciones iniciales de las aguas eutróficas

Al objeto de determinar las características de las aguas provenientes de la Laguna de “San Antonio de Padua” se realizó el análisis físico-químico de éstas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9-4.

**Tabla 9-4:** Resultados de los análisis realizados a la muestra madre.

Parámetro	Unidad	Valor
Clorofila-a	(mg/L)	35.2
PH	-	10.14
Turbidez	(NTU)	11.13
Fósforo reactivo	(mg/L)	0.17
DQO	(mg/L)	48

Elaborado por: Paola Toala, 2019

La concentración de fósforo reactivo, nos permitió medir la cantidad de ortofosfatos disueltos o particulados en forma orgánica e inorgánica, además de ser un nutriente limitante de la producción primaria, siendo determinante del estado trófico (véase la tabla 10-4) del sistema acuático en estudio (Wetzel, 2001; Arocena, 2016); la DQO, determinó la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica y su método, midió los contaminantes de las aguas interaccionadas con NPMs, evaluando la fuerza de desechos (Espinosa Chávez, Ramírez Islas and Contreras Ramos, 2016); la turbidez, estableció la cantidad de partículas en suspensión y fitoplancton; la cuantificación de la clorofila-a, indirectamente, permitió identificar las variaciones de la biomasa fitoplanctónica, responsable directa de la salud del ecosistema, siendo determinante para el estado trófico del agua superficial en estudio (véase tabla 10-4) y, nos dio una respuesta inmediata de la variabilidad de los nutrimentos; el pH, es un factor de crecimiento para muchos organismos, la diversidad de las especies y la especiación de nutrientes, su valor tiene gran influencia en la eutrofización, cuando este es ácido (Huang, Ynag and Tang, 2010).

**Tabla 10-4:** Límites y determinación del estado trófico del agua de la “Laguna San Antonio de Padua”, según (Diana, Moreno-Arbeláez and Ramírez-Restrepo, 2010)

Parámetro	Unidad	Valor	Estado Trófico
Clorofila-a	mg/L	35,2	$\gamma$ Eutrófico
Fósforo reactivo	mg/L	0,17	$\beta$ Eutrófico

Elaborado por: Paola Toala, 2019

### 4.3. Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se realizó una prueba de Normalidad, por medio del Test de Shapiro Wilk que, plantea una hipótesis nula, la cual afirma que los valores esperados provienen de una población distribuida normalmente; y Kolmogorov-Smirnov, que, determinar la discrepancia de los valores observados con los esperados, tal como se observa en la tabla 11-4; muestran que la Turbidez y DQO con 20 ml de ferrofluido de NPMs, no cumple con el supuesto; el fósforo reactivo y pH, cumplen con el supuesto; se acepta la hipótesis nula de Shapiro Wilk, y se concluye que los grupos siguen una distribución normal.

**Tabla 11-4:** Pruebas de Normalidad

PRUEBAS DE NORMALIDAD							
Análisis realizados	Suspensión de NPMs	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Fósforo reactivo (mg/L)	10	0,270	6	0,195	,912	6	,446
	20	0,171	6	0,200*	,966	6	,863
	40	0,209	6	0,200*	,907	6	,415
Turbidez (NTU)	10	0,135	6	0,200*	,988	6	,985
	20	0,378	6	<b>0,008</b>	,646	6	<b>,002</b>
	40	0,199	6	0,200*	,952	6	,754
pH	10	0,228	6	0,200*	,923	6	,527
	20	0,230	6	0,200*	,938	6	,641
	40	0,248	6	0,200*	,908	6	,423
DQO (mg/L)	10	0,226	6	0,200*	,899	6	,365
	20	0,359	6	<b>0,015</b>	,739	6	<b>,016</b>
	40	0,223	6	0,200*	,913	6	,459

\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Elaborado por: Paola Toala, 2019

Para analizar si existe un patrón de esfericidad en las varianzas-covarianzas de los análisis a nivel poblacional, se realizó una prueba de Mauchly, el cual realiza una diferencia entre parejas de los valores obtenidos en los análisis, y se cumple, si las diferencias son iguales, por ende, forman una esfera; se puede observar en la tabla 12-4, los valores que nos conducen a rechazar la esfericidad, implicando que las variables dependientes transformadas son proporcionales a una matriz identidad, por lo tanto, aseveramos que la suspensión de nanopartículas afecta en los análisis realizados y que las diferencias entre parejas son distintas.

**Tabla 12-4:** Prueba de esfericidad de Mauchly

**PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY<sup>a</sup>**

<i>Efecto intra-sujetos</i>	<i>W de Mauchly</i>	<i>Chi-cuadrado aprox.</i>	<i>gl</i>	<i>Sig.</i>	<b>Epsilon<sup>b</sup></b>		
					<i>Greenhouse-Geisser</i>	<i>Huynh-Feldt</i>	<i>Límite-inferior</i>
Factor	,000	229,300	9	,000	,262	,302	,250

a. Diseño: Intersección + concentración Diseño intra-sujetos: factor

b. Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

Elaborado por: Paola Toala, 2019

La suspensión de NPMs para 10, 20 y 40 ml de ferrofluido corresponden a grupos diferentes, y se han separado las variables independientes para determinar la equivalencia de grupos durante el proceso para cada tratamiento, permitiéndonos determinar si la población de muestras usadas, permite que el análisis sea simétrico; en la Tabla 13-4, asevera que el supuesto de equivalencia se cumple, ya que, las asignaciones aleatorias de cada análisis en las diferentes suspensiones son suficientemente grandes para que pueda actuar al azar, ya que los resultados tienen el mismo tamaño para cada suspensión de NPMs.

**Tabla 13-4:** Equivalencia de grupos

**RESUMEN DEL PROCESAMIENTO DE LOS CASOS**

Análisis realizados	Suspensión de NPMs	Casos					
		<i>Válidos</i>		<i>Perdidos</i>		<i>Total</i>	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Fósforo (mg/L)	10	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	20	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	40	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
Turbidez (NTU)	10	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	20	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	40	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
pH	10	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	20	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	40	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
DQO (mg/L)	10	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	20	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	40	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
Clorofila-a (mg/L)	10	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	20	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	40	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%

Elaborado por: Paola Toala, 2019

Para analizar la homogeneidad de varianzas y verificar si las diferencias obtenidas en las variaciones, se deben a un muestreo aleatorio de una población con varianzas iguales, se realizó la prueba de Levene; en la tabla 14-4 nos indica que: el Fósforo, Turbidez, pH y DQO, cumplen con el supuesto de igualdad de varianzas ya que sus valores son iguales o superan el 0,05, mientras que la Clorofila no cumple con el supuesto ya que su valor es menor a 0,05, por lo que existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, concluyendo que si existe homogeneidad de varianzas, que la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos y que existe inactivación de fósforo en aguas eutróficas con el uso de las NPMs de Hierro (Magnetita).

**Tabla 14-4:** Prueba de Levene (supuesto de homogeneidad de varianzas)

**CONTRASTE DE LEVENE SOBRE LA IGUALDAD  
DE LAS VARIANZAS ERROR<sup>a</sup>**

Análisis	Unidades	F	gl1	gl2	Sig.
Fósforo	(mg/L)	1,392	2	15	,279
Turbidez	(NTU)	3,606	2	15	,053
pH		1,996	2	15	,170
DQO	(mg/L)	3,679	2	15	,050
Clorofila-a	(mg/L)	3,835	2	15	<b>,045</b>

a. Diseño: Intersección + suspensión Diseño intra-sujetos: factor

Elaborado por: Paola Toala, 2019

Para la interpretación del Anova Factorial Mixto se realizó un resumen de las pruebas estadísticas (véase Tabla 15-4), en la que los supuestos en las pruebas de Normalidad y Equivalencia de muestras, se cumplen, excepto la Esfericidad, por lo que procede la aplicación de la corrección de Greenhouse-Geisser, que es una corrección de los grados de libertad aplicados a cada variable.

**Tabla 15-4:** Resumen de las pruebas estadísticas

Análisis	Normalidad	Equivalencia de muestras	Esfericidad
Traza de Pillai	NO	SI	SI
Raíz mayor de Roy	SI	NO	SI
<b>Greenhouse-Geisser</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>
Límite-inferior	NO	NO	NO

Elaborado por: Paola Toala, 2019

Debido a que no se cumple la Esfericidad de Mauchly, se realizó la prueba de Greenhouse-Geisser descrita en la tabla 16-4; el valor de significancia  $p=0,000$ , implica que la suspensión de NPMs influye significativamente en el Fósforo, Turbiedad, pH, DQO y Clorofila-a; en vista que el valor  $p=0,794$ , se concluye que el tiempo de interacción no influye significativamente en el fósforo reactivo, Turbiedad, pH, DQO y Clorofila-a.

**Tabla 16-4:** Efectos de la Suspensión de NPMs sobre cada uno de los valores de los análisis.

**PRUEBAS DE EFECTOS INTRA-SUJETOS.**

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
factor	Esfericidad asumida	59208,180	4	14802,045	149,871	,000
	<b>Greenhouse-Geisser</b>	59208,180	1,047	56572,148	149,871	<b>,000</b>
	Huynh-Feldt	59208,180	1,207	49062,834	149,871	,000
	Límite-inferior	59208,180	1,000	59208,180	149,871	,000
Factor /suspensión	Esfericidad asumida	194,374	8	24,297	,246	,980
	<b>Greenhouse-Geisser</b>	194,374	2,093	92,860	,246	<b>,794</b>
	Huynh-Feldt	194,374	2,414	80,534	,246	,823
	Límite-inferior	194,374	2,000	97,187	,246	,785
Error (factor)	Esfericidad asumida	5925,927	60	98,765		
	<b>Greenhouse-Geisser</b>	5925,927	15,699	377,473		
	Huynh-Feldt	5925,927	18,102	327,368		
	Límite-inferior	5925,927	15,000	395,062		

Elaborado por: Paola Toala, 2019

Basándonos la numeración de cada análisis según la tabla 8-3, en la que, el fósforo reactivo (1), la turbidez (2), el pH (3), la DQO (4) y la clorofila (5); se realiza una comparación por pares, la cual, nos permitió determinar si existen diferencias en los parámetros utilizados, analizándose uno frente a otro, como se puede observar en la tabla 17-4; afirmando que existe una diferencia significativa entre los diferentes grupos: la clorofila-a y el fósforo están relacionados directamente, es decir cuando disminuye el fósforo reactivo, también disminuye la clorofila-a; de acuerdo con las medias, al aplicar las NPMs en aguas eutróficas se obtiene una mayor influencia sobre el fósforo que en la turbidez del agua; y la DQO es mayor al aplicar las NPMs en las aguas eutróficas, que el fósforo, la turbidez, pH y clorofila-a.

**Tabla 17-4:** Diferencias por pares en los tratamientos.

<b>COMPARACIONES POR PARES</b>						
(I)factor	(J)factor	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	<b>-8,769*</b>	,071	,000	-8,920	-8,618
	3	<b>-8,264*</b>	,070	,000	-8,414	-8,115
	4	-68,098*	5,135	,000	-79,043	-57,152
	5	-1,324	,840	<b>,136</b>	-3,114	,465
2	1	8,769*	,071	,000	8,618	8,920
	3	,504*	,055	,000	,387	,622
	4	-59,329*	5,117	,000	-70,236	-48,421
	5	7,444*	,857	,000	5,618	9,270
3	1	8,264*	,070	,000	8,115	8,414
	2	-,504*	,055	,000	-,622	-,387
	4	-59,833*	5,115	,000	-70,735	-48,932
	5	6,940*	,835	,000	5,160	8,720
4	1	<b>68,098*</b>	5,135	,000	57,152	79,043
	2	<b>59,329*</b>	5,117	,000	48,421	70,236
	3	<b>59,833*</b>	5,115	,000	48,932	70,735
	5	<b>66,773*</b>	5,373	,000	55,320	78,226
5	1	1,324	,840	<b>,136</b>	-,465	3,114
	2	-7,444*	,857	,000	-9,270	-5,618
	3	-6,940*	,835	,000	-8,720	-5,160
	4	-66,773*	5,373	,000	-78,226	-55,320

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

b. Ajuste para comparaciones múltiples: Diferencia menos significativa (equivalente a la ausencia de ajuste).

**Elaborado por:** Paola Toala, 2019

Se realizó un análisis de efectos intra sujetos con intervención del tiempo de interacción y la suspensión de NPMs, por lo que la prueba Greenhouse-Geisser descrita en la tabla 18-4; el valor de  $p=0,000$ , implica que el tiempo y la suspensión de NPMs influye significativamente en los análisis: Fósforo, Turbiedad, pH, DQO y Clorofila-a; el valor  $p=0,006$ , concluye que el tiempo influye significativamente el fósforo total, Turbiedad, pH, DQO y Clorofila-a;

**Tabla 18-4:** Pruebas de efectos intra-sujetos con intervención del tiempo

<b>PRUEBAS DE EFECTOS INTRA-SUJETOS</b>						
<b>Origen</b>		<b>Tipo III de suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Factor	Esfericidad asumida	59208,180	4	14802,045	289,426	,000
	<b>Greenhouse-Geisser</b>	59208,180	1,103	53668,438	289,426	<b>,000</b>
	Huynh-Feldt	59208,180	1,639	36128,280	289,426	,000
	Límite inferior	59208,180	1,000	59208,180	289,426	,000
Factor / Tiempo	Esfericidad asumida	2048,835	4	512,209	10,015	,000
	<b>Greenhouse-Geisser</b>	2048,835	1,103	1857,138	10,015	<b>,006</b>
	Huynh-Feldt	2048,835	1,639	1250,180	10,015	,002
	Límite inferior	2048,835	1,000	2048,835	10,015	,008
Error(Factor)	Esfericidad asumida	2454,855	48	51,143		
	Greenhouse-Geisser	2454,855	13,239	185,431		
	Huynh-Feldt	2454,855	19,666	124,827		
	Límite inferior	2454,855	12,000	204,571		

Elaborado por: Paola Toala, 2019

#### 4.4. Evaluación de la adsorción de fósforo

Una vez aplicado el diseño experimental, considerando los parámetros dependientes: tiempo y suspensión, y los independientes: pH, turbidez y fósforo; se obtienen los resultados presentados en la tabla 19-4.

**Tabla 19-4:** Resultados de los análisis de aguas eutróficas sonicados durante 5 y 10 minutos.

Tiempo (minutos)		5				10			
Análisis NPMs		pH	Turbidez (NTU)	Fósforo (mg/L)	DQO (mg/L)	pH	Turbidez (NTU)	Fósforo (mg/L)	DQO (mg/L)
		10 ml	1	7.51	9.22	0.13	47	7.52	9.27
2	7.88		9.24	0.11	53	7.59	9.3	0.05	128
3	7.31		9.25	0.14	42	7.42	9.28	0.1	93
20 ml	1	8.53	8.17	0.1	62	8.61	8.13	0.07	63
	2	8.63	8.22	0.09	54	8.72	8.2	0.06	57
	3	8.55	9.14	0.11	58	8.63	8.32	0.04	89
40 ml	1	8.51	9.17	0.04	77	8.45	8.57	0.01	66
	2	8.53	8.35	0.02	55	8.43	8.92	0.01	62
	3	8.41	9.01	0.03	58	8.42	9.32	0.03	89

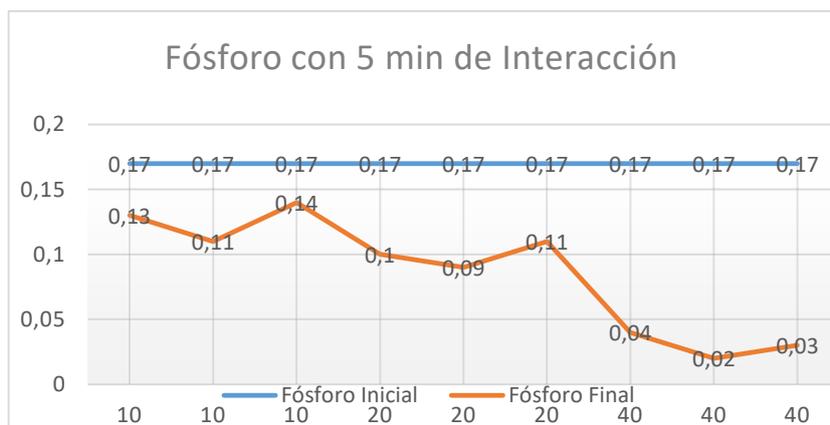
Elaborado por: Paola Toala, 2019

Para que se puedan observar mejor los cambios producidos por la interacción de las NPMs en cada uno de los tiempos en los diferentes análisis realizados.

El fósforo, se pueden observar cambios en las tres concentraciones de NPMs en el tiempo de 5 min (gráfico 3-4), siendo las más bajas en los 40 ml de ferrofluido con una media de 0,3 mg/L, disminuyendo un 82,35% de fósforo confirmando con el estudio de Merino-Martos y sus colaboradores en el cuál disminuyeron un 72% el nivel del fósforo en un tratamiento similar con NPMs (Merino-Martos *et al.*, 2015); la suspensión de 20 ml de ferrofluido con una media de 0,10 mg/L con una disminución del 41,18% de fósforo y finalmente 0,13 mg/L de fósforo en la suspensión de 10 ml de ferrofluido, obteniendo una disminución del 23,53%.

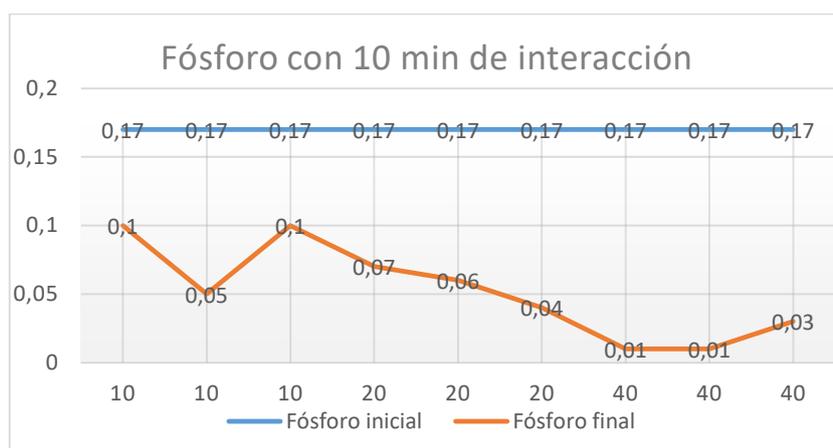
En el tiempo de interacción de 10 min, podemos observar en el gráfico 4-4 que las cifras disminuyen un 90,6% en la suspensión de 40 ml de ferrofluido, 66,66% en la suspensión de 20 ml de ferrofluido y un 50,98% en la suspensión de 10 ml.

**Gráfico 3-4:** Fósforo inicial y el fósforo obtenido después de 5 minutos de interacción con las NPMs



Elaborado por: Paola Toala, 2019

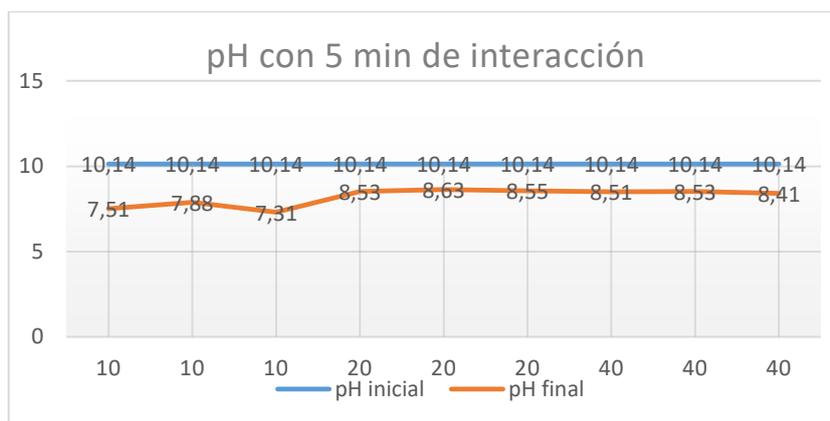
**Gráfico 4-4:** Fósforo inicial y el fósforo obtenido después de 10 minutos de interacción con las NPMs



Elaborado por: Paola Toala, 2019

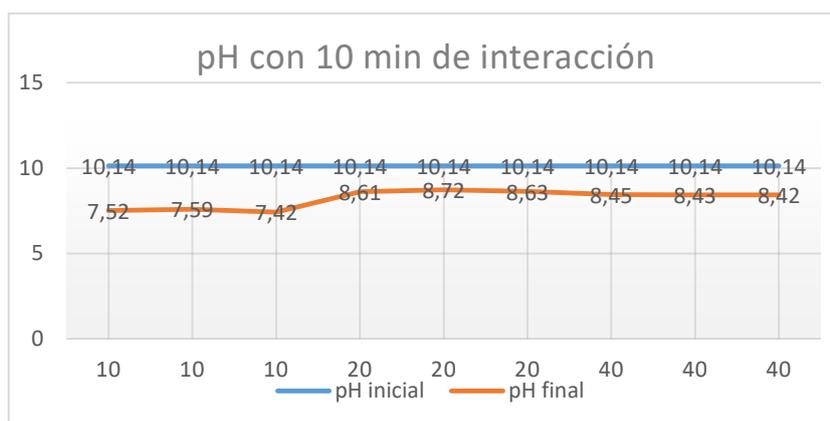
Es evidente en la comparación, la disminución del pH, en el gráfico 5-4 que representa a la interacción de las NPMs con las aguas eutróficas durante 5 min, el pH disminuyó un 25,37% cuando interaccionó con la suspensión de 10 ml de ferrofluido, 15,48% en 20 ml y en la suspensión de 40 ml un 16,33%. En el gráfico 6-4 en la interacción de las NPMs con el agua durante 10 min, el pH disminuyó un 25,93% en 10 ml, 14,66% en 20 ml y 16,33% en 40 ml de NPMs; encontrando, que hubo un aumento de temperatura del agua considerable, cuando se realizó la interacción en el vibracell o sonicador y durante el proceso de análisis, pero el tiempo no es significativo, ya que el sonicador llega a una temperatura constante después de pasar 2 min de sonicación, tal como dice su manual (SONICS & MATERIALS INC., 2016).

**Gráfico 5-4:** Comparación entre el pH inicial y el pH obtenido después de 5 minutos de interacción con las NPMs



Elaborado por: Paola Toala, 2019

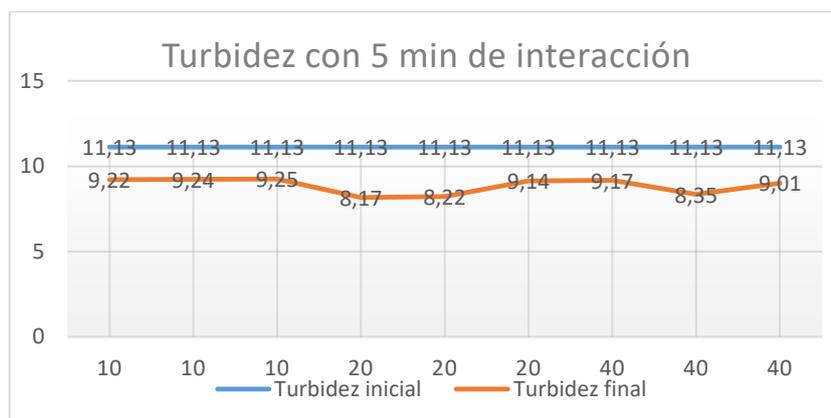
**Gráfico 6-4:** Comparación entre el pH inicial y el pH obtenido después de 10 minutos de interacción con las NPMs



Elaborado por: Paola Toala, 2019

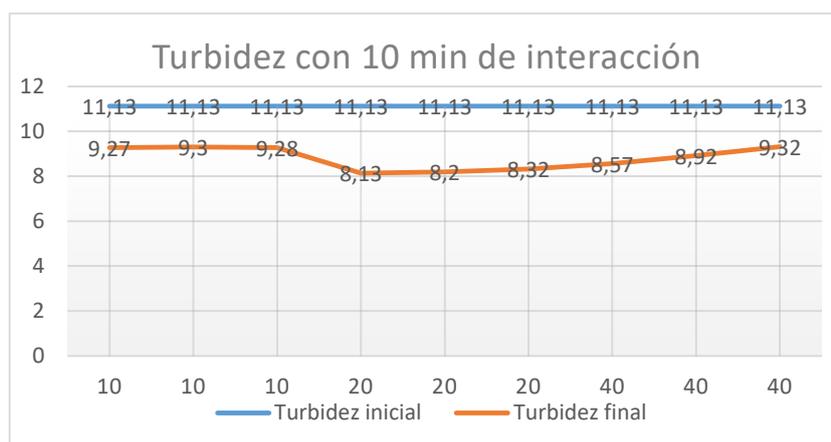
En la comparación de la turbidez, se puede observar en el gráfico 7-4, que disminuyó un 17% cuando la suspensión es de 10 ml, el 23,54% en 20 ml y el 20,54% en 40 ml. Mientras que en el gráfico 8-4, el cual compara los resultados en la interacción de 10 min, se puede observar que, disminuyó un 16,59% en la suspensión de 10 ml, 26,17% en 20 ml y el 19,71% en 40 ml; lo cual indica que la cantidad de fitoplancton y material en suspensión disminuyó, debido a la interacción de las NPMs, pero el tiempo de interacción no es significativo en la disminución de la turbiedad en las aguas eutróficas.

**Gráfico 7-4:** Comparación entre la turbidez inicial y la turbidez obtenida después de 5 minutos de interacción con las NPMs



Elaborado por: Paola Toala, 2019

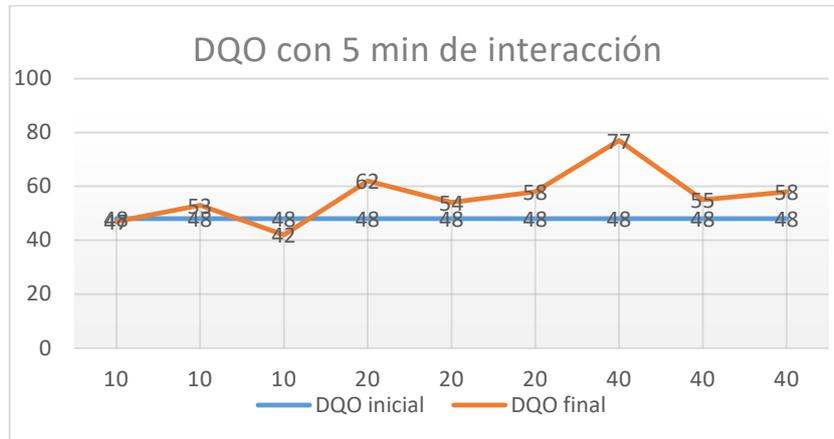
**Gráfico 8-4:** Comparación entre la turbidez inicial y la turbidez obtenida después de 10 minutos de interacción con las NPMs



Elaborado por: Paola Toala, 2019

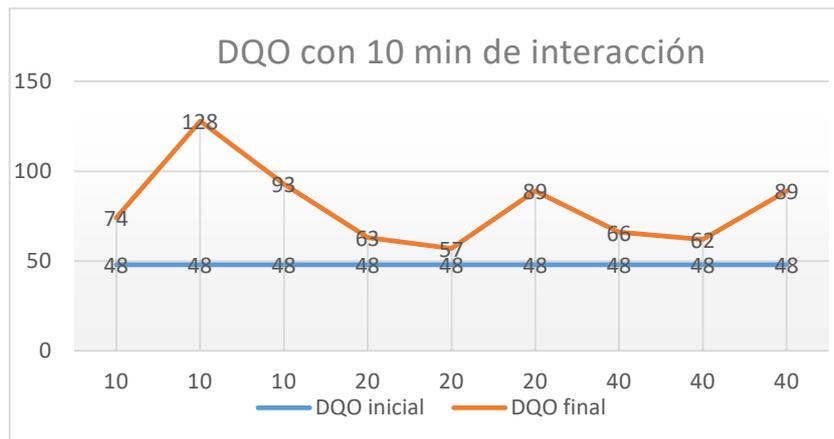
Al comparar el valor inicial de DQO con los obtenidos en un tiempo de 5 minutos de interacción, es evidente en el gráfico 9-4 que hay un aumento de 47,91% en la suspensión de 10 ml de NPMs, 20,83% en 20ml y 31,94% en 40ml. Mientras que, en el tiempo de 10 minutos de interacción, tenemos aumentos de 104,86% en la suspensión de 10 ml, 45,13% en 20 ml y 31,94% en 40 ml, lo cual se visualiza en la gráfica 10-4. Con esto podemos afirmar que, las NPMs en un tiempo de interacción mayor, producen un incremento de DQO significativo en el agua, ya que el nivel de sustancias inorgánicas susceptibles a ser oxidadas aumentó, pudiendo asociar esto a la presencia de las NPMs que tal vez por purificación física no se hizo posible retirar.

**Gráfico 9-4:** Comparación entre la DQO inicial y la DQO obtenida después de 5 minutos de interacción con las NPMs



Elaborado por: Paola Toala, 2019

**Gráfico 10-4:** Comparación entre la DQO inicial y la DQO obtenida después de 10 minutos de interacción con las NPMs



Elaborado por: Paola Toala, 2019

## CONCLUSIONES

- Este estudio aporta con modificaciones convenientes en el proceso de síntesis de NPMs, bajo la modalidad de adsorción superficial mediante el método de Co-precipitación, ya que, variando parámetros controlables (temperatura y tiempo de agitación), se obtuvieron muestras estables en tamaño y estructura, demostrando los beneficios del proceso empleado. También, por medio de la caracterización con Espectrofotometría IR, donde se verificó la presencia de magnetita, hematita e hidrocarburos (carboxilos, alcoholes y aminoácidos) y, del MEB, donde se observó la estructura cristalina, tamaños (con una media de 15 nm) y la composición química de las NPMs; se consiguió información ya conocida, sobre la compatibilidad de estas nanopartículas para eliminar fósforo.
- Para determinar la posibilidad de aplicar a gran escala las NPMs sintetizadas, con la caracterización físico-química de las muestras de agua (laguna de San Antonio de Padua), se establecieron las condiciones iniciales de fósforo reactivo, clorofila-a, turbidez, potencial hidrógeno y demanda química de oxígeno; siendo éstos, parámetros determinantes para conocer el estado trófico del agua. Estableciendo entonces, con el análisis de las muestras de agua post tratamiento con la intervención de las NPMs sintetizadas, la capacidad de éstas nanopartículas para adsorber fósforo y la posibilidad de aplicarlas en procesos de restauración de ecosistemas acuáticos lénticos.

- Observando los porcentajes de remoción de fósforo alcanzados, se evidencia que de los parámetros analizados pre y post tratamiento, únicamente el DQO, que es reportado por la literatura como el que presenta ligeras interferencias en la capacidad de las NPMs para adsorber P; y cuyos valores fueron relativamente altos en nuestro análisis, pero similares a los reportados en otros estudios, no afectó en la eficiencia de adsorción de P. De ahí que, se continúa sugiriendo este tipo de aplicaciones para la restauración de ecosistemas eutrofizados.
- La efectividad de la utilización de las NPMs en cuerpos de agua eutrofizados, se evidenció en la capacidad de adsorción de fósforo. Puesto que, los análisis realizados a las muestras de agua luego de la interacción con las nanopartículas, evidenciaron una gran disminución de P. Siendo idóneo el tratamiento en la inactivación de fósforo, observando mejores resultados que en otros estudios realizados para distintos tratamientos de mejora de la calidad del agua, se puede aseverar que las cantidades y tiempos utilizados permitieron reducir la cantidad de fósforo reactivo de las aguas eutróficas; con esto podemos considerar un tratamiento óptimo para mejorar la calidad de las aguas.

## **RECOMENDACIONES**

- Es importante que exista información accesible dentro de las entidades encargadas de manejo de los cuerpos de agua de la región, que permita el contraste de información con la obtenida en estudios de caracterización de aguas.
- Considerando la diversidad de estudios que se pueden desarrollar en la Facultad de Ciencias, se debe asegurar que existan protocolos para el uso y manejo de reactivos y equipos de laboratorio.
- Se recomienda continuar con investigaciones que permitan conocer elementos (aniones y cationes) que interfieren en la capacidad de las nanopartículas magnéticas en la adsorción de fósforo.
- Desarrollar nuevos estudios que permitan reducir los procesos de oxidación en las nanopartículas magnéticas y con ellos lograr mayor estabilidad para futuras aplicaciones.

## **BIBLIOGRAFÍA**

ADÉS, Harry y GRAHAM, Melissa, *Guías de viaje: generales, regiones, países*. S.l. : s.n. 2016.

ARENAS, Cecilia, CHAPA, Balcorta y GUERRERO, Rosalía, Eutrofización: abundancia que mata. En : *¿Comoves?* S.l. : s.n. p. 22-25. 2010.

ARENAS SOSA, Iván y LÓPEZ SANCHEZ, José Luis, *Espectrofotometría de Absorción*. S.l. 2004.

AROCENA, R Métodos en ecología de aguas continentales. En : *D.I.R.A.C. Facultad de Ciencias-Udelar*. 2016. p. 323.

ASAMBLEA DE LA REPUBLICA DEL ECUADOR, Ecuador. Artículo 318. En : *Constitución de la Republica del Ecuador*. Quito : s.n. p. 99. 2008.

ÁVILA, Hendrik, et.al. Nitrogen and phosphorus in superficial waters of the low part of the River Catatumbo. En : *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad de Zulia*. 2007.

Vol. 30, n° Especial Maracaibo.

BOEYKENS, Susana, et.al. Eutrophication decrease: Phosphate adsorption processes in presence of nitrates. En : *Journal of Environmental Management*. 2017. Vol. 203, p. 888-895.

DE VICENTE, I, et.al. Interferencias químicas cuando se utiliza separación magnética de alto gradiente para la eliminación de fosfato: Consecuencias para la conservación del lago. En : *Journal of Hazardous Materials*. 2011. Vol. 192, n° 1, p. 995-1001.

DE VICENTE, Inmaculada, JENSEN, H S y ANDERSEN, F O. Factores que afectan la adsorción de fosfato al aluminio en el agua del lago: implicaciones para la restauración del lago. En : *Science Direct*. 2008. Vol. 389, n° 1, p. 29-36.

DE VICENTE, Inmaculada, MERINO-MARTOS, Azahara, CRUZ-PIZARRO, Luis y DE VICENTE, Juan. On the use of magnetic nano and microparticles for lake restoration. En : *Journal of Hazardous Materials*. 2010. Vol. 181, p. 375-381.

DIANA, P, MORENO-ARBELÁEZ y RAMÍREZ-RESTREPO, John J. Variación temporal de la condición trófica del lago del parque norte, Medellín (Antioquía), Colombia. En : *Actualidades Biológicas*. 2010. Vol. 32, n° 92, p. 75-87.

ESPINOSA CHÁVEZ, Armando, RAMÍREZ ISLAS, Gabriel y CONTRERAS RAMOS, Ximena, *Determinación de demanda química de oxígeno (DQO)*. S.l. 2016.

FUNES, A, et.al. Micropartículas magnéticas como una nueva herramienta para la restauración del lago: un experimento de microcosmos para evaluar el impacto en los flujos de fósforo y las reservas de fósforo sedimentario. En : *Water Research*. 2015. Vol. 89, n° 1, p. 366-374.

GAUTAM, Shristy, et.al. Morphological and physiological alterations in the diatom *Gomphonema pseudoaugur* due to heavy metal stress. En : *Ecological Indicators* [en ligne]. 2017.

Vol. 72, n° 1, p. 67-76. Disponible en :  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X16304630>.

GONZÁLEZ, Gemma Ansola, DE LUIS CALABUIG, Estanislao y BUSTILLO NÚÑEZ, Juan Manuel,. Protección y recuperación del medio acuático. En : *Universidad de León, Universidad de Burgos*. 2015. Vol. 1, n° 1.

GREGORI, Mireia Illana,. *Estudio de la adsorción de fosfatos en aguas de depuradora mediante intercambiadores iónicos* [en línea]. S.l. : s.n. Disponible en :  
[https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/22649/Estudio de la adsorción de fosfatos en aguas de depuradora m.pdf](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/22649/Estudio%20de%20la%20adsorción%20de%20fosfatos%20en%20aguas%20de%20depuradora%20m.pdf).

HARRIS, Daniel C.,. *Análisis Químico Cuantitativo*. Seguna. S.l. : s.n. 2014.

HERBAS ANTEZANA, Ruth Clara, RIVERO OSTOIC, Francis y GONZALES RAMOS, Ariel,. *Indicadores Biológicos de la calidad del agua*. S.l. 2006.

HUANG, Y. C., YNAG, C. P. y TANG, P. K.,. Water quality management scenarios for the Love River in Taiwan. En : *Engineering, International Conference on Challenges in Enviromental Science and Computer*. S.l. : s.n. 2010. p. 487-490.

JOFRE-MELÉNDEZ, Rodolfo, CERVANTES-PÉREZ, Juan y BARRADAS, Víctor L. Calidad del agua de la Niebla captada artificialmente en la microcuenca del río Pixquiac, Veracruz, México: resultados preliminares. En : *Propina* [en línea]. 2015. Vol. 18, n° 2, p. 122-130. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X15000170>.

KIRTLEY F, Mather, JULIVERT, Manuel y ZAMARREÑO, Isabel,. *The Earth Beneath US*. Segunda Ed. Barcelona : Random House.

KOROL, Edith Sonia, 2007. Biorrecuperación de ecosistemas acuáticos contaminados ¿Una

misión imposible? En : *Revista Argentina de microbiología*. 2007. Vol. 39, n° 2.

KUEHN, Kevin A.,. Los hábitats lóticos y lénticos como templets para las comunidades de hongos: características, adaptaciones y su importancia para la descomposición de la hojarasca dentro de los ecosistemas de agua dulce. En : *Science Direct*. 2016. Vol. 19, n° 1, p. 135-154.

LEARY, J.J. y HOLLER, F. James.,. Espectroscopía. En : *Principios de Análisis Instrumental*. S.l. : s.n. p. 353-367.

MARTÍN APARICIO, Mónica, et.al. Protocolo para la caracterización Hidromorfológica de masas de agua de la categoría ríos en España. En : *Restaurio del Congreso Ibérico de Restauración Fluvial*. 2015. Vol. 2, n° 1, p. 198-206.

Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España  
PROTOCOLO DE ANÁLISIS Y CÁLCULO DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES. 2013.

MERINO-MARTOS, A, DE VICENTE, J, CRUZ-PIZARRO, L y DE VICENTE, I, Interferencias de ion único cuando se usan micropartículas magnéticas para la eliminación de fósforo en ecosistemas acuáticos. En : *Limnetica*. 2015. Vol. 34, n° 1, p. 17-28.

RODRÍGUEZ, Silvia C., y MARTÍNEZ, Gloria C.,. Variabilidad de fosfatos en distintas fuentes de agua. En : *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. 2009. Vol. 1, n° 1, p. 30-34.

SEPULVEDA-JAUREGUI, Armando, et.al. La eutrofización agrava el impacto del calentamiento climático en la emisión de metano del lago. En : *Science of the Total Enviroment*. 2018. Vol. 636, n° 1, p. 411-419.

SHURVELL, H.F.,. Spectra-Structure Correlations in the Mid-and Far-infrared. En : *Quee's University*. 2017. Vol. 1, n° 1, p. 1-35.

SONICS & MATERIALS INC.,. *User's Guide HIGH INTENSITY ULTRASONIC PROCESSOR* [en línea]. S.l. : s.n. Disponible en : [https://www.sonics.com/site/assets/files/2959/500-750\\_watt\\_with\\_temp\\_ac.pdf](https://www.sonics.com/site/assets/files/2959/500-750_watt_with_temp_ac.pdf).

STARBIRD-PÉREZ, Ricardo y MONTERO-CAMPOS, Virginia,. Síntesis de nanopartículas magnéticas de óxido de Hierro para la remoción de arsénico del agua de consumo humano. En : *Tecnología en Marcha*. 2015. Vol. 28, n° 3, p. 15-21.

ULRICH, Uta, HÖRMANN, Georg, UNGER, Malte, PFANNERSTILL, Matthias, FRANK, Steinmann y FOHRER, Nicola,. Lentic small water bodies: Variability of pesticide transport and transformation patterns. En : *Science of the Total Environment* [en línea]. 2018. Vol. 618, n° 1, p. 26-38. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717330905>.

WETZEL, R. G.,. *Limnology: Lake and River Ecosystems*. En : *Academic Press, San Diego*. 2001. p. 1006.

WILLIAMS, WD.,. Adaptaciones bióticas en aguas lenticulares temporales, con especial referencia a las regiones semiáridas y áridas. En : *Hydrobiology*. 1985. Vol. 125, n° 1, p. 85-110.

ZHANG, Yao, SONG, Chunlei, JI, Lei, LUI, Yunqian, XIAO, Jian, CAO, Xiuyun y ZHOU, Yiyong,. Causa y efecto del descenso de la relación N / P con la agravación de la eutroficación en lagos someros. En : *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 627, n° 1, p. 1294-1302.

ZHEN WU, Bi Yun,. *Calidad físico-química y bacteriológica del agua para consumo humano de la microcuenca de la quebrada Victoria, Curubandé, Guanacaste, Costa Rica*. S.l. : s.n.

## ANEXOS

**Anexo A:** Norma Técnica Ecuatoriana (IN. . . . . el agua, calidad de agua, muestreo, manejo y conservación de la muestra, en el literal 4

- 1) En muestras que se van a utilizar para la determinación de parámetros físicos y químicos, llenar los frascos completamente y taponarlos de tal forma que no exista aire sobre la muestra. Esto limita la interacción de la fase gaseosa y la agitación durante el transporte (así se evita la modificación del contenido de dióxido de carbono y la variación en el valor del pH, los bicarbonatos no se conviertan a la forma de carbonatos precipitables; el hierro tiende a oxidarse menos, limitando las variaciones de color, etc.).
- 2) Los recipientes que contienen las muestras deben ser protegidos y sellados de manera que no se deterioren o se pierda cualquier parte de ellos durante el transporte.
- 3) El empaque debe proteger los recipientes de la posible contaminación externa y de la rotura, especialmente de la cercana al cuello y no deben ser causa de contaminación.  
*Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos.*
- 4) Durante la transportación, las muestras deben guardarse en ambiente fresco y protegidas de la luz; de ser posible cada muestra debe colocarse en un recipiente individual impermeable.
- 5) Si el tiempo de viaje excede al tiempo máximo de conservación recomendado antes del análisis, estas muestras deben reportar el tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis; y su resultado analítico debe ser interpretado por un especialista.
- 6) Al arribo al laboratorio, las muestras deben, si su análisis no es posible inmediatamente, ser conservadas bajo condiciones que eviten cualquier contaminación externa y que prevengan cambios en su contenido.
- 7) Es recomendable para este propósito el uso de refrigeradoras o de lugares fríos y oscuros.
- 8) En todos los casos y especialmente cuando se requiera establecer la cadena de custodia es necesario verificar el número recibido, contra el registro del número de recipientes enviados por cada muestra.
- 9) Los recipientes que contienen las muestras deben estar marcados de una manera clara y permanente, que en el laboratorio permita la identificación sin error.
- 10) Anotar, en el momento del muestreo todos los detalles que ayuden a una correcta interpretación de los resultados (fecha y hora del muestreo, nombre de la persona que

muestreó, naturaleza y cantidad de los conservantes adicionados, tipo de análisis a realizarse, etc.).

- 11) Las muestras especiales con material anómalo, deben ser marcadas claramente y acompañadas de la descripción de la anomalía observada. Las muestras que contienen material peligroso o potencialmente peligroso, por ejemplo, ácidos, deben identificarse claramente como tales.

**Anexo B:** Protocolo Analítico de Clorofila-a que se encuentra en la primera versión del “PROTOCOLO DE ANÁLISIS Y CÁLCULO DE MÉTRICAS DE FITOPLANCTON EN LAGOS Y EMBALSES”, código: MFIT- 2013 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España, aprobado el 22 de noviembre del 2013.

#### **Protocolo analítico de clorofila-a.**

La concentración de clorofila-a es una medida indirecta de la biomasa del fitoplancton. El procedimiento para su análisis consiste en la concentración del fitoplancton; la extracción de los pigmentos con una solución acuosa de acetona (90%); y la determinación de la densidad óptica (absorbancia) del extracto por medio de un espectrofotómetro. El procedimiento que se describe está basado en Standard Methods 10200 H (APHA, 1998)<sup>5</sup>, y es compatible con el Standard ISO 10260:1992, “Water quality– Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration”, aunque éste último recomienda la extracción de clorofila mediante etanol.

#### **Concentración del fitoplancton y extracción de pigmentos**

- La alícuota destinada al análisis de clorofila obtenida a partir de la muestra integrada (Protocolo de muestreo de fitoplancton en lagos y embalses Código: M-LE-FP-2013) puede filtrarse en campo o en laboratorio. En caso de filtrado en laboratorio éste se llevará a cabo a partir de la muestra refrigerada a 4° C y conservada en oscuridad, durante las siguientes 24 horas al muestreo. Cuando la muestra se filtre en laboratorio se concentrará mediante el filtrado de un volumen suficiente de agua (normalmente entre 0,1 y 2 litros, dependiendo del estado trófico de la masa de agua), a través de un filtro de microfibras de vidrio (tipo GF/F o equivalente) y a una presión de menos de 100 mm Hg (~0,15 atm). La adición de una suspensión acuosa de carbonato magnésico al 1% aumenta la eficiencia de retención del filtro y evita la degradación de la clorofila (APHA, 1998). Los filtros utilizados para la filtración deben ser de microfibras de vidrio de 47 mm de diámetro, con capacidad para retener todas las partículas de tamaño superior a 0,7 µm.
- Posteriormente es necesario retirar el filtro del dispositivo de filtración mediante unas pinzas de punta roma. El filtro deberá quedar lo más escurrido posible. Si el filtro retiene un exceso de agua, ésta alterará el volumen final del solvente de extracción añadido y

también su concentración. Tras retirar el filtro del soporte de filtración, se depositará sobre un papel de filtro blanco, seco y limpio durante unos segundos, para que por capilaridad pierda el agua sobrante. Si es necesario se repetirá la operación moviendo el filtro a una nueva posición seca del papel de filtro. Finalmente, se colocará el filtro cuidadosamente enrollado en el tubo 5. En aguas muy oligotróficas con muy bajo contenido en clorofila se filtrará un volumen suficiente de agua, incluso utilizando varios filtros, para que la medida sea fiable. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE donde se va a realizar la extracción (normalmente un tubo de vidrio de 15 mL de capacidad, con tapón de rosca resistente a la acetona).

- En caso de filtrado en campo, el análisis se iniciará a partir de los filtros congelados a una temperatura inferior a  $-20^{\circ}\text{C}$ , siempre antes de que transcurran 2-3 semanas desde el muestreo. En cualquier caso (filtrado en campo o en laboratorio), se deberá mantener el filtro congelado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), preferiblemente en el mismo tubo donde se realizará posteriormente la extracción, y protegido de la luz. El filtro se puede conservar así hasta 2-3 semanas, aunque es recomendable proceder a su procesamiento cuanto antes.
- Para iniciar el procedimiento de extracción se añadirá al tubo con el filtro de fitoplancton 5 mL de solución de acetona 90% de manera que cubra totalmente al filtro (añadir más cantidad de acetona si fuera necesario).
- Posteriormente se realizará, como mínimo, una trituración mecánica que garantice la rotura de las células pues de lo contrario la cantidad de pigmento extraído de algunas algas de paredes robustas puede verse mermada hasta en un 50%. Dado el pequeño tamaño de algunas algas y cianobacterias (picoplancton) la mera trituración mecánica puede no ser efectiva, por lo que se recomienda complementar esta trituración con una serie de tres tratamientos de sonicación de la muestra, a intervalos de 1-2 horas tras añadir el solvente de extracción, durante los que se les aplicará ultrasonidos en un baño sonicador con agua fría y hielo picado. El tiempo de sonicación no debe exceder los 2 minutos y, tras aplicar los ultrasonidos, la muestra debe volver al congelador o nevera durante 1-2 horas. El procedimiento se completará agitando los tubos a intervalos periódicos una o dos veces entre sonicaciones.
- Finalizada la trituración o sonicación, se mantendrá la muestra en frío ( $0 - 4^{\circ}\text{C}$ ) y en la oscuridad, al menos 12 horas, pero no más de 24 horas, pues en esas condiciones podría empezar la degradación del pigmento. También puede realizarse la extracción durante al menos 24 horas en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  y siempre en oscuridad, pero sin exceder los 2-3 días.
- Todo el proceso debe realizarse en la oscuridad o con una iluminación indirecta lo más tenue posible.

- 

### **Determinación espectrofotométrica del extracto y cuantificación de la clorofila-a**

- La determinación espectrofotométrica y cuantificación de la clorofila-a del extracto se realizará después de que el proceso de concentración y extracción de pigmentos haya terminado. Para ello se seguirán los pasos descritos a continuación:
- Una vez concluida la extracción, y después de agitar los tubos por última vez para homogenizar su contenido, se procederá a retirar los restos grandes del filtro con ayuda de unas pinzas y seguidamente a centrifugar los tubos en una centrifugadora preferiblemente refrigerada (4°C) y en oscuridad durante 5 minutos a 3.500 rpm, o bien a filtrar el solvente a través de un filtro de un solo uso, de pequeño volumen muerto y de membrana filtrante resistente a solventes orgánicos.
- Se medirá el volumen del extracto. Es importante trabajar rápido para evitar la evaporación de la acetona y la variación del volumen del extracto.
- La medida del extracto en el espectrofotómetro debe realizarse en cubetas de vidrio o cuarzo, preferiblemente de boca esmerilada provistas del correspondiente tapón hermético, del tipo utilizado para medidas con solventes volátiles.
- La cubeta ha de lavarse con una pequeña alícuota de la muestra antes de su llenado para efectuar la lectura. Es muy importante que cuando se toma la muestra del tubo de centrifugación no se resuspenda el sedimento. Cualquier medida en la que se aprecie turbidez debida a restos del material u otros detritus no tiene validez. La espectrofotometría solo es aplicable a soluciones completamente transparentes.
- Una vez llenada la cubeta, se medirán las densidades ópticas del extracto para las longitudes de onda que requiere la fórmula señalada a continuación. Las absorbancias de las muestras se miden frente a un blanco realizado con el solvente de extracción utilizado (acetona 90 %).
- Las medidas pueden realizarse en espectrofotómetros de bandas fijas, aunque es preferible realizar un barrido entre 350 y 850 nm y de ahí extraer las absorbancias a las longitudes de onda necesarias para el cálculo, ya que al disponer de un espectro de absorción entre 350 y 850 se podrían hacer cálculos adicionales de otros pigmentos, ajustar mejor los cálculos de corrección y calcular diversos índices pigmentarios del fitoplancton.
- Los pigmentos en extracto son muy sensibles a la luz por lo que hay que realizar este proceso, así como la lectura espectrofotométrica, con la luz de la habitación muy

atenuada, y mantener los tubos a baja temperatura en un contenedor opaco o debidamente protegidos de la luz.

Para el cálculo de la concentración de se utilizará la fórmula tricromática de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$Chl. \ddot{a} (mg/m^3) = \frac{[11.85*(A664-A750)-1.54*(A647-A750)-0.08*(A630-A750)]*v}{V*Z}$$

Dónde:

**A630, A647, A664, A750** = Densidad óptica (absorbancia) medida a las longitudes de onda indicadas (en nm)

**v** = volumen del extracto, en mL

**V** = volumen de agua filtrada, en L

**Z** = Paso óptico de la cubeta, en cm