

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



Diseño de una metodología de determinación de la clorofila "A" en muestras de agua, mediante la técnica de extracción en fase sólida y fluorescencia molecular.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el Br. Christian E Padrón G para optar al título de Licenciado en Química. Tutor: Dr. Alberto Fernández (UCV)

Caracas, Abril 2009.

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo especial de grado titulado: **“Diseño de una metodología de determinación de la clorofila “A” en muestras de agua, mediante la técnica de extracción en fase sólida y fluorescencia molecular.”** Presentado por el **Br. Christian Padrón**, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Alberto Fernández
(Director)

Dr. Rosa Amaro
(Jurado)

Dr. Jimmy Castillo
(Jurado)

DEDICATORIA

A mis padres hermanos y novia, a quien no solo le dedico este trabajo, si no también mi vida entera. Con su voluntad, sacrificio, paciencia, conocimiento, cariño, y sobre todo con su amor, han sabido guiarme por el camino del bien y me ha convertido en el hombre que soy.

Sin duda, son la fuente que me inspira a ser cada día una mejor persona.

Los amo.....

*"No es ver lo que aún nadie ha visto, sino pensar... sobre aquello que todos creen ver".
(Erwin Schrödinger, premio Nóbel de Física)*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado todo lo que necesito para ser un hombre feliz y por haber puesto gente maravillosa en mi camino con quien compartir cada momento de mi vida.

A mi familia; mis padres, mis hermanos y en especial a Elena, que siempre han estado a mi lado apoyándome y haciéndome saber lo mucho que me quieren.

A Lerida, por ser la persona que estuvo a mi lado a lo largo de todo este tiempo. No hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí.

A mi co-tutoras la Profesora Yosmery Vitta, por haber hecho todo lo posible para que este trabajo se llevara a cabo. En momentos de dificultad siempre estuvo dispuestas a buscar una salida; por eso..... muchas gracias.

A mi tutor el profesor Alberto Fernández, quien siempre con sus sabios conocimientos supo guiarme por el camino correcto para el desarrollo de este trabajo.

A todos mis amigos de carrera y en especial a los Técno-03, con quienes pasé momentos inmemoriales a lo largo de mi permanencia en la universidad. Siempre estarán en mi mente y corazón.

A todos mis profesores, de los cuales siempre pude instruirme y me ayudaron a ser un mejor estudiante y un mejor compañero. Les estoy muy agradecido.

RESUMEN

En el siguiente estudio, se realizó una evaluación preliminar en la aplicación de la técnica de extracción en fase sólida (SPE) y la fluorescencia molecular para la determinación de clorofila "a" en muestras de agua, en la búsqueda de una metodología alterna a la empleada rutinariamente.

En una primera fase del estudio, se ensambló un prototipo de analizador de fluorescencia molecular con los siguientes componentes: un diodo de emisión de luz (LED) de longitud de onda de 410 nm, como fuente de excitación, un espejo cóncavo, una cubeta rectangular de vidrio de 1 cm de camino óptico, como contenedor de muestra y un fibra óptica multimodo para colectar y transportar la radiación emitida. Para la detección de la señal analítica, se utilizó un espectrómetro compacto de detección simultánea, constituido por una red de difracción de echelle como sistema dispersivo y un detector de estado sólido (CCD). Se escogieron como condiciones óptimas del analizador, aquellas que suministraron el máximo valor de la señal de fluorescencia logrado desde la medición de una disolución estándar de clorofila "a", obteniéndose una intensidad de fluorescencia 3,9 veces mayor al colocar el espejo cóncavo en equipo. El sistema ensamblado, es compacto y robusto. En una segunda fase del estudio, se evaluó el dispositivo construido mediante el cálculo de la figuras de merito analíticas y un análisis de reproducibilidad, obteniéndose límites de detección y cuantificación de $(0,024 \pm 0,001)$ y $(0,080 \pm 0,004)$ mgL^{-1} respectivamente, y un coeficiente de variación de 2% al medir tres días consecutivo. En esta etapa, se exploró el uso de la extracción en fase sólida (SPE), para extraer y para pre-concentrar el analito en muestras de agua, para ello se evaluó y se optimizó el volumen muestra a cargar en el cartuchos de SPE de fase estacionaria C-8 (octil), y el volumen etanol para su posterior elusión. Finalmente se realizó la cuantificación de la clorofila "a", mediante los métodos de adición estándar (ads). Los resultados obtenidos fueron comparados estadísticamente con los suministrados al utilizar protocolos estándar de determinación

de clorofila a ^{[1][2][3][4][5]}, encontrando que no existen diferencias significativa entre (ads) y el protocolo estándar.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
2. FUNDAMENTO TEORICO	15
2.1 Generalidades sobre la clorofila	15
2.1.1 Productos de degradación de las clorofilas	16
2.2 Técnicas de determinación de clorofila en ambientes acuáticos	19
2.3 Técnicas de extracción y preconcentración de la clorofila ``a``	22
2.3.1 Extracción en Fase Sólida (SPE)	23
2.3.2 Interacciones de los analitos en el sólido adsorbente	24
2.3.3 Interacciones apolares en SPE	24
2.3.4 Fases estacionarias en SPE	25
2.3.5 Procedimiento para la aplicación de la SPE.....	26
2.3.6 Dispositivos para el empacado de la fase estacionaria.....	28
2.3.7 Ventaja de la técnica de Extracción en Fase Solida.....	28
2.5 Determinación cuantitativa de la clorofila ``a`` mediante técnicas espectroscópicas	29
2.6 Antecedentes en el desarrollo de nuevas metodologías de análisis de la clorofila ``a`` en muestras de agua	30
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO	32

4. PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1. Reactivos, Solventes, Estándares y Muestras.....	34
4.1.1. Reactivos y Solventes.....	34
4.1.2. Estándares.....	34
4.1.3. Muestra.....	34
4.2. Instrumentación.....	35
4.2.1. Componentes para la construcción del analizador de fibra óptica para fluorescencia molecular.....	35
4.2.2. Materiales para la extracción de la clorofila ``a`` desde muestras de agua mediante SPE.....	36
4.3. Metodología Experimental.....	36
4.3.1. Construcción del analizador de fluorescencia, para la determinación cuantitativa de clorofila ``a``.....	36
4.3.2. Optimización y evaluación del analizador de fluorescencia.....	39
4.3.3. Uso de SPE, para la extracción y pre-concentración de la clorofila ``a`` desde las muestras de agua.....	39
4.3.4. Optimización del proceso de SPE para la extracción y preconcentración de la clorofila ``a`` en la muestra de agua.....	40
4.3.4.1. Evaluación del volumen de muestra a cargar en el cartucho:.....	40
4.3.4.2. Evaluación de volumen de elución:.....	40
4.3.5. Aplicación de la metodología de análisis propuesta.....	41

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
5.1. Construcción del analizador de fluorescencia.....	44
5.1.1. Optimización del analizador de fluorescencia	44
5.1.2. Evaluación del analizador de fluorescencia	45
5.1.3. Evaluación de la Precisión del analizador de fluorescencia	48
5.1.3.1. Repetibilidad	48
5.1.3.2. Reproducibilidad	49
5.2. Optimización del proceso de SPE, para la extracción y preconcentración de la clorofila ``a`` en la muestra de agua	49
5.2.1. Evaluación del volumen de muestra a cargar en el cartucho.	49
5.2.2. Evaluación de volumen de elución.	51
5.3. Aplicación de la metodología de análisis propuesta	53
5.3.1. Cuantificación de las muestras	53
6. CONCLUSIONES	57
7. RECOMENDACIONES	59
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. APÉNDICE	64

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Especificaciones técnicas de los componentes del analizador.....	35
Tabla 2. Especificaciones técnicas de los cartuchos de SPE.....	36
Tabla 3. Parámetros de la curva de calibración.....	47
Tabla 4. Figuras analíticas de mérito para el análisis de clorofila ``a``.....	47
Tabla 5. Resultados obtenidos para la evaluación de repetibilidad.....	48
Tabla 6. Resultados obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad.....	49
Tabla 7. Concentración de clorofila ``a`` en la muestra obtenidas por los tres métodos de análisis.....	54
Tabla 8. Comparación estadística de la concentración de clorofila ``a`` obtenidas por cada método (ccd, ads y protocolo estándar).....	55

Figuras

Figura 1.- Estructura química de la clorofila ``a``.....	13
Figura 2.- Estructura química de las clorofilas ``a``, ``b`` y ``d``.....	15
Figura 3.- Estructura química de las clorofila ``c``.....	16
Figura 4.- Formación de los feopigmentos de la clorofila ``a``.....	17
Figura 5.- Diagrama de Energía en los procesos de excitación y relajación de la molécula de clorofila.....	18
Figura 6.- Configuraciones ópticas para medidas de Intensidad de Absorción y Fluorescencia Molecular.....	20
Figura 7. Ejemplo de interacciones apolares en SPE.....	25
Figura 8. Pasos para el proceso de extracción en fase solida SPE.....	27
Figura 9. Dispositivos de SPE para el empaclado de la fase estacionaria.....	28
Figura 10. Esquema del analizador de fluorescencia.....	37
Figura 11. Receptáculo de muestra del analizador de fluorescencia.....	38

Figura 12. Fotografía del Analizador de Fluorescencia.....	38
Figura 13. Sistema de extracción y preconcentración.....	40
Figura 14. Intensidad de fluorescencia de una disolución de 1mg/L de clorofila ``a`` captada en el equipo sin el espejo cóncavo y con el espejo cóncavo.....	45
Figura 15. Curva de calibración directa de clorofila ``a`` para determinar las figuras de mérito.....	46
Figura 16. Espectros de fluorescencia de clorofila ``a`` tomadas en el analizador en un rango de concentración de (0 - 4) mg/L	46
Figura 17. Estudio de saturación de la fase estacionaria.....	50
Figura 18. Espectros de fluorescencia de clorofila ``a`` en el análisis del residuo	51
Figura 19. Evaluación del volumen de extracción.....	52
Figura 20. Comparación de las curvas de adición estándar y la curva de calibración directa para cuantificar la concentración de clorofila ``a`` en la muestra de agua.....	54
Figura 21. Espectros de fluorescencia para la clorofila ``a`` presente en un extracto de la muestra, en una disolución estándar y en el extracto de adición estándar.....	56

1. INTRODUCCIÓN

La clorofila a (Clo ``a´´) es el principal pigmento presente en todas las especies de fitoplancton, constituyendo aproximadamente entre (1 a 2) % del peso en seco de las algas planctónicas^[2]. Esta constituye un biomarcador selectivo de fitoplancton en presencia de otros componentes biológicos, tales como detritus, bacterias y zooplancton^[6]. Por lo que, en investigaciones en ambientes acuáticos, la concentración de la Clo ``a´´ se correlaciona con la biomasa del fitoplancton de sistemas acuáticos tanto en sistemas marino como de agua dulce. La evaluación del estatus del fitoplancton en sistemas acuáticos es importante, ya que permite detectar posibles alteraciones en el equilibrio ecológico de estos sistemas y en algunos casos esto nos permite prevenir y/o disminuir la ocurrencia de ciertos problemas ambientales. Por ejemplo, el denominado florecimiento en las aguas, se produce por un aumento excesivo de la cantidad del fitoplancton, lo cual puede provocar la muerte masiva de peces y otros organismos acuáticos por el excesivo consumo de oxígeno de las mismas. Por otro lado, estudios recientes^[7] han encontrado que un posible indicador de la ocurrencia de un terremoto es el incremento anómalo de la concentración de Clo ``a´´ en zonas costeras. Esto sucede cuando el epicentro del movimiento telúrico, se encuentra localizado cerca de dichas zonas.

Debido a la importancia del fitoplancton en sistemas marinos, se ha establecido un monitoreo continuo de la concentración de la Clo ``a´´ mediante un método estándar para su análisis. Este método consiste de diferentes etapas experimentales, desde el muestreo, la extracción del pigmento y finalmente su análisis por técnicas espectroscópicas o de cromatografía líquida. En base a dicho método, se han propuestos los protocolos estándares de análisis de Clo ``a´´, por instituciones internacionales como la Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio (NASA)^[1], Asociación Internacional para la Salud Pública (APHA)^[2], Estudios Conjuntos

del Flujo Oceánico Global(JGFOS)^[3], Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES)^[4] y la Agencia de Protección Ambiental (EPA)^[5] .

Aunque los protocolos, han sido usados sistemáticamente por décadas, sus metodologías involucran múltiples etapas en el tratamiento de la muestra, que conllevan a apreciables pérdidas y alteraciones del analito, así como largos tiempos de análisis y alto consumo de muestra y solventes. Por lo que se ha explorado el uso de métodos alternativos de extracción de la Clo ``a``, en este sentido la técnica de extracción en fase sólida (SPE)^{[8][9]} resulta idónea, debido a que ésta consiste en la retención selectiva del analito según su polaridad en una fase estacionaria sólida; seguida por su posterior elución selectiva con un solvente químicamente compatible. Dado la estructura química de la Clo ``a``, que le confiere característica no-polares (ver figura 1), la SPE ha sido estudiada como un método alternativo para la extracción y pre-concentración de este analito en muestras de agua^[10]. Entre las ventajas de la aplicación de la SPE en análisis ambientales, tenemos: el incremento de la sensibilidad en la determinación de compuestos en cantidades trazas, además es una técnica rápida y económica que permite la extracción de impurezas aislando el analito, un transporte de la muestra al laboratorio relativamente fácil y el acondicionamiento del analito.

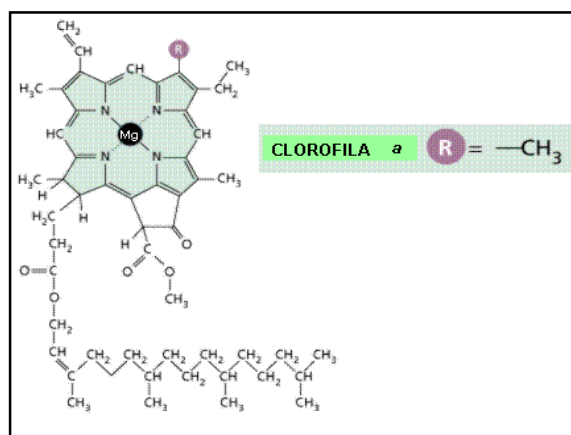


Figura 1.- Estructura química de la Clo ``a``.

Más recientemente se han incluido para la determinación de Clo ``a´´, el uso de sensores de fibra óptica para el monitoreo directo en el ambiente acuático, basados en las propiedades de color de los océanos^{[11][12]}. Estos dispositivos en general son fáciles de utilizar, rápidos en la medición y de bajos costos. Dado estas ventajas, el uso de estos equipos ha fomentado el uso de las técnicas espectroscópicas con respecto a las cromatográficas, en la realización de este tipo de análisis. Considerando además que las técnicas cromatográficas, requieren invertir grandes cantidades de tiempo en el desarrollo y optimización de métodos de análisis, el uso de equipos sofisticados y personal calificado.

En este sentido, en este trabajo se desea fomentar el uso de dispositivos contruidos con tecnología opto-electrónica, para la realización de análisis de rutina de Clo ``a´´. Por otro lado, se plantea explorar el uso de la SPE como procedimiento de extracción de la Clo ``a´´ desde muestras de agua, esto de forma de reducir las fuentes de variabilidad de este tipo de análisis y así obtener una mejor precisión y exactitud en la cuantificación de dicho analito.

2. FUNDAMENTO TEORICO

2.1 Generalidades sobre la Clorofila

La clorofila es un pigmento verde que se encuentra en todas las plantas terrestres y acuáticas. La estructura básica de la molécula de la clorofila^[13], ver figura 2, consiste de un macrociclo de tetrapirrol formado por cuatro anillos pirrólicos y coordinado en el centro a un ión de magnesio (2+) y el resto de la molécula de clorofila la constituye una cadena de fitol larga (C₂₀H₃₉OH), que es un alcohol isoprenoide de 15 carbonos que se encuentra unido a uno de los anillos pirrólicos que ésta parcialmente reducido.

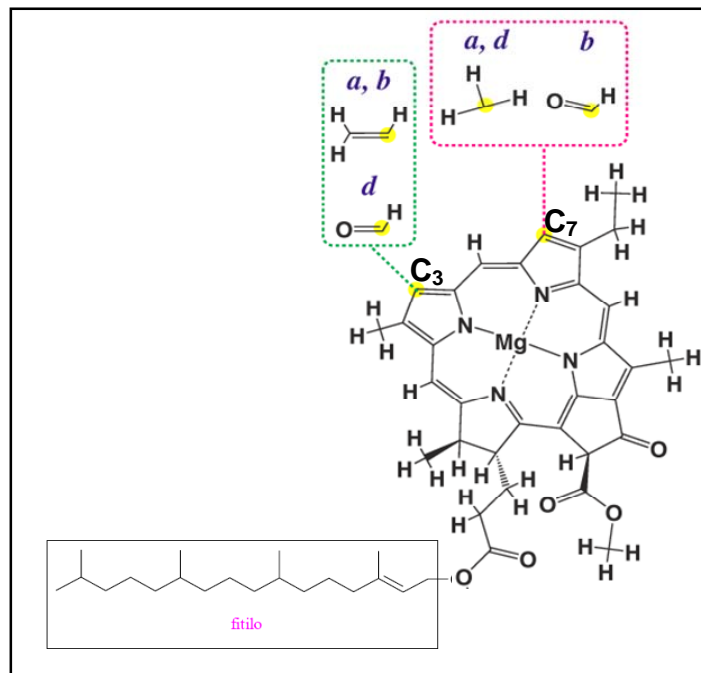


Figura 2.- Estructura química de las Clorofilas a, b y d.

Existen diferentes tipos de clorofilas: la Clorofila a, Clorofila "a", que se encuentra en todos los organismos fotosintéticos, la Clorofila b, Clorofila "b" y las clorofilas c, d y e. Según los sustituyentes unidos a los anillos del macrociclo se identificará que tipo de clorofila es, ver figura 2, si el sustituyente unido al carbono C₇ es un radical metilo se

denomina Clo ``a``, ahora bien si el sustituyente es un grupo aldehído se denomina clorofila ``b`` Clo ``b``, mientras que se identifica una clorofila tipo ``c`` porque no posee el fitol en sus estructura (ver figura 3).

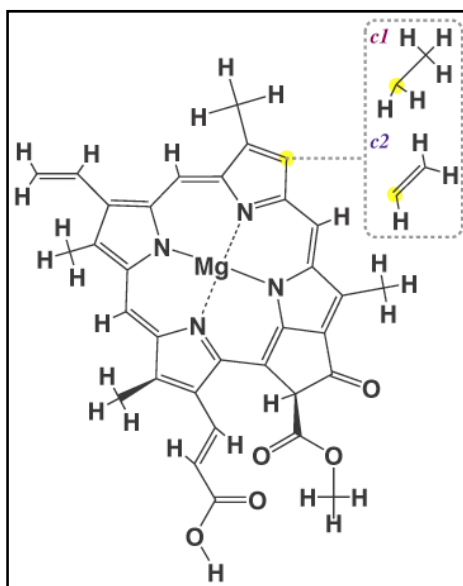


Figura 3.- Estructura química de las Clo ``c``.

2.1.1 Productos de Degradación de las Clorofilas

Las clorofilas son altamente susceptibles a transformarse en sus productos de degradación debido a efectos: de la luz (foto-oxidación), calor (isomerización), relación aire: oxígeno (oxidación), ácidos (des-metalización) y bases (apertura de macro-ciclos), acción de solventes, etc, por lo que solo algunos pocos estándares analíticos estables están disponibles comercialmente entre ellos la Clo ``a`` y la Clo ``b``.

Las reacciones de degradación^[14] principales a las que están expuestas las clorofilas son la: alomerización (oxidación), epimerización, des-metalización, de-fitilación y transesterificación, halogenación y descarboxilación. En la alomerización se produce la oxidación de la molécula de clorofila por oxígeno triplete, por hidrólisis alcalina se

forma un anión enolato que es sensible al oxígeno y este anión se transforma a diversos productos de degradación de la clorofila, entre ellos se pueden obtener epímeros de la Clo ``a`` y la Clo ``b``. Esta reacción puede ser evitada si las muestras son procesada con poca luz y a pH neutro. En la reacción de defitilación se realiza la hidrólisis de las clorofilas y mediante trans-esterificación se remueve la cadena de fitol, se obtienen las clorofilidas (chlorophyllides).

El tratamiento de la clorofila con ácido, suele sustituir el ión de magnesio que posee esta molécula por dos protones, esta reacción se conoce como des-metalización^[15] y el producto de esta es la formación de las denominadas feofitinas. La hidrólisis de las feofitinas produce la separación del grupo fitol (de-fitilación) formando las denominadas feoforbidas (pheophorbides). Las feofitinas y feoforbidas se conocen como los feopigmentos de la clorofila. En la figura 4, se ilustra la reacción de transformación de la Clo ``a`` a sus respectivos feopigmentos^[16].

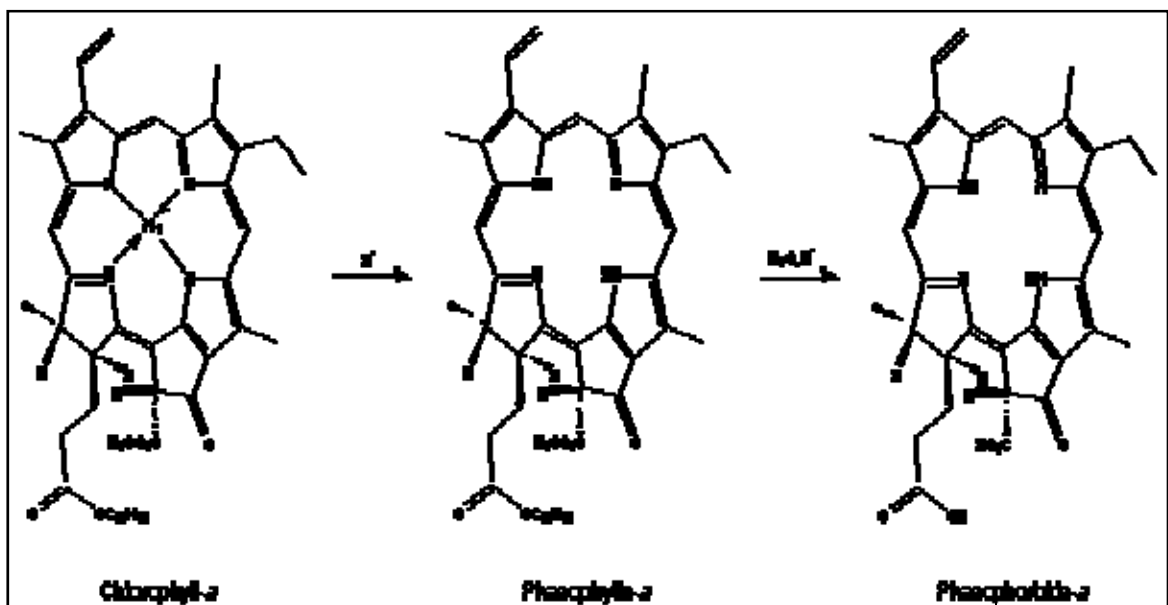


Figura 4.- Formación de los feopigmentos de la Clo ``a``.

2.1.2 Propiedades ópticas de las Clorofilas

Un diagrama de energía de Jablonski simplificado, ver figura 5, permite explicar los mecanismos de relajación que ocurren cuando una molécula de clorofila es excitada^{[17][18]}. Inicialmente se produce la absorción de fotones de luz “azul” de alta energía en ($300 \text{ kJ.einstein}^{-1}$ para 400 nm de longitud de onda), excitando la molécula al segundo estado excitado. En este estado la molécula sufre dos mecanismos de relajación: uno radiactivo por emisión de un fotón de fluorescencia donde la longitud de onda de emisión se encuentra en un rango de 600 a 730 nm y otro no radiactivo “conversión interna” donde la molécula pierde rápidamente unos 130 kJ.mol^{-1} en forma de calor y queda en el primer estado excitado de menor energía.

La absorción de un fotón de luz roja de baja energía ($171 \text{ kJ.einstein}^{-1}$ para 700 nm) por parte de la molécula de clorofila produce una transición al primer estado excitado, en éste se produce la transferencia de un electrón de la clorofila a un aceptor adecuado y también ocurre la relajación por fluorescencia.

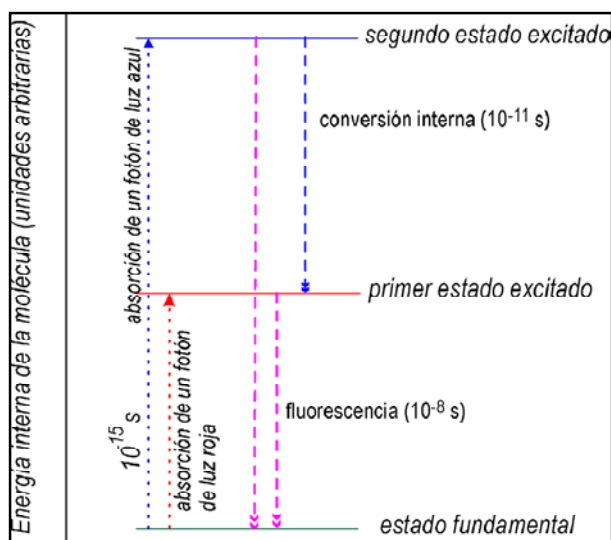


Figura 5.- Diagrama de Energía en los procesos de excitación y relajación de la molécula de clorofila.

2.2 Técnicas de Determinación de Clorofila en ambientes acuáticos

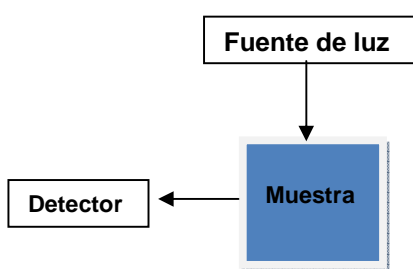
Las técnicas espectroscópicas que tradicionalmente se utilizan en la detección de las clorofilas son la absorción y la fluorescencia molecular, debido a las propiedades ópticas que poseen estos analitos, así como las ventajas analíticas que presentan estas técnicas tales como elevada sensibilidad, alto rango dinámico lineal, etc.

La clorofila puede absorber y fluorescer (emisión) al ser excitada por una fuente continúa de amplio rango espectral o también con fuentes monocromáticas. En la determinación de la concentración de clorofila utilizando Absorción molecular UV-Visible^[19], se mide la cantidad de energía radiante que absorbe la clorofila y sus especies como medio absorbente; la muestra se coloca posterior a la fuente de radiación de luz incidente de forma que ésta atraviese completamente a la misma, colocando un detector de energía radiante al final del sistema para medir la intensidad de la luz transmitida. Por otro lado, en la determinación por Fluorescencia, se mide la radiación emitida por moléculas, previamente excitadas, cuando estas se relajan a sus estados de menor energía. En éste proceso la emisión de fluorescencia se registra colocando el detector perpendicularmente con respecto a la fuente de radiación incidente, existe otra disposición de medir fluorescencia donde el ángulo que forman el detector y la fuente es 45°, aun que este último es muy poco utilizado. La fluorescencia cesa de inmediato una vez que la fuente de excitación ha sido retirada de la sustancia ($<10^{-6}$ seg.). La respuesta de fluorescencia “espectro de fluorescencia” dependerá de las características de la fuente de excitación, es decir para poder tener una respuesta debemos inicialmente excitar el analito. Esta dependencia permite lograr mayor selectividad en esta técnica comparada con la de absorción.

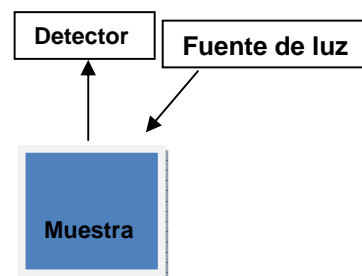
En la figura 6 se presenta un diagrama esquemático de la configuración instrumental para la medición de absorción y fluorescencia.



a) Configuración lineal (Absorción)



b) Configuración de ángulo recto



c) Configuración Frontal (Fluorescencia)

Figura 6.- Configuraciones ópticas para medidas de Intensidad de Absorción y Fluorescencia Molecular

La espectroscopia de absorción es una de las herramientas más usadas para la determinación cuantitativa de compuestos, debido a su gran aplicabilidad tanto para compuestos orgánicos como inorgánicos. Posee una sensibilidad característica de 10^{-4} a 10^{-5} M que se puede ampliar a 10^{-6} hasta llegar a 10^{-7} M en condiciones especiales, la selectividad de la técnica es de moderada a alta, buena precisión, normalmente se encuentran incertidumbres de 1 a 3 %, pudiéndose disminuir a décimas. Las aplicaciones en análisis cualitativo, está en cierta medida limitado, ya que el número de máximos y mínimos de absorción es relativamente pequeño así como el relativo ancho

de las bandas de absorción, por lo que una identificación inequívoca es a menudo muy limitada^[19].

Por otro lado la técnica de fluorescencia, de igual manera se puede utilizar para la determinación cuantitativa con selectividad y sensibilidad de moderada a alta, siempre utilizando los filtros ópticos correspondientes en la fuente de excitación y en la detección de radiación emitida por la muestra, para disminuir interferencias. Las determinaciones cualitativa en este caso son mucho más extensas que para la absorción debido a que se puede combinar estos espectros para una identificación positiva, esta técnica con ayuda de otras técnicas espectroscópicas se han utilizado para determinar enzimas y coenzimas, productos naturales, etc^[19].

Hoy en día la fluorescencia es de esencial importancia en la química analítica. Una de sus más importantes aplicaciones ha sido en la detección y cuantificación de sustancias que son separadas a través del uso de la cromatografía de líquidos. Muchos sistemas bioquímicos son de estructura tal que frecuentemente presentan fluorescencia o pueden ser transformados a especies de este tipo si originalmente no lo son, a través de la derivatización. Por otro lado, especies inorgánicas que son difíciles de detectar y cuantificar por espectroscopia de absorción molecular UV-Visible o por absorción atómica son analizadas por fluorescencia^[19].

Adicionalmente a esto, los niveles de detección son del orden de partes por billón ($\mu\text{g/L}$)^[19], cantidades que por otras técnicas son difíciles de detectar. Estas entre otras son las razones de la importancia creciente de la fluorescencia molecular. En estos momentos las aplicaciones más importantes son en análisis de alimentos, productos farmacéuticos, productos naturales y en análisis clínicos.

2.3 Técnicas de extracción y preconcentración de la Clorofila "a"

Debido a que generalmente la Clo "a" en las aguas se encuentra contenido dentro del organismo vivo y además a muy bajas concentraciones, se hace difícil realizar un análisis directo de esta molécula con las técnicas de determinación espectroscópicas y de cromatografía. Por esta razón es necesario realizar un tratamiento previo de la muestra que permita la extracción y pre-concentración del analito, de forma que se puedan alcanzar concentraciones apropiadas para su posterior análisis, con cualquiera de las técnicas anteriormente mencionadas.

En los protocolos de análisis de Clo "a"^{[1][2][3][4][5]}, dicho proceso de extracción se inicia con la obtención de una muestra de agua de mar o de agua dulce. El volumen de muestra varía entre 250 mL y 4 L dependiendo de su procedencia y de la técnica de análisis utilizada. Para la determinación espectrofotométrica de la Clo "a", se utiliza por lo general un volumen de muestra de un litro, mientras que para la técnica fluorométrica es requerida una menor cantidad (250 mL). El paso posterior es la filtración de la muestra a través membranas de (nylon, acetato de celulosa, poliéster, etc.) o mediante filtros de profundidad (de fibra de vidrio), el tamaño de poro adecuado para las membranas es de 0.45 μm y para los de fibra de vidrio es de 0,7 μm ^[20]. Si no se van a extraer los pigmentos al momento, los filtros se almacenan bajo temperaturas que van desde -90 hasta -196°C protegidos de la luz, para disminuir riesgo de la degradación del analito. Para realizar la extracción, los filtros almacenados son sumergidos en un recipiente con la menor cantidad de un solvente orgánico, para luego ser sometidos a una acción mecánica por ultrasonido y/o trituración, de forma de destruir la pared celular del fitoplancton, permitiendo así la extracción de los pigmentos. Seguidamente, se realiza la centrifugación y se separa el sobrenadante, para el análisis posterior del extracto por las técnicas espectroscópicas o cromatográficas. Entre los solventes más utilizados, la acetona ha sido reportada como un excelente solvente para la extracción de los pigmentos en muestra de fitoplancton marino^[21]. Mientras que Moed y Hallegraeff

(1978), y Nush (1980) en sus investigaciones, encontraron que el etanol es el solvente más idóneo para la extracción de los pigmentos presentes en fitoplancton proveniente de agua dulce^[21]. Los inconvenientes de este tipo de análisis es que su metodología involucra múltiples etapas en el tratamiento de la muestra, que conllevan a apreciables pérdidas y alteraciones del analito, así como largos tiempos de análisis y alto consumo de muestra.

2.3.1 Extracción en Fase Sólida (SPE)

Debido a las limitaciones del método clásico de extracción de la clorofila, se ha explorado recientemente el uso de la Extracción en Fase Sólida (SPE), como método alternativo de tratamiento de la muestra^[10]. Esto debido a que esta técnica, se utiliza comúnmente para la pre-concentración y purificación de los analitos en muestras acuosas. La SPE consiste en pasar una disolución que contiene analito(s) sobre una fase sólida (o fase estacionaria) que lo(s) adsorbe específicamente. La fase sólida suele estar compactada en el fondo de una columna, un cartucho o un disco como los que se muestra en la figura 9. Después de la adsorción, los analitos se eluyen con una pequeña cantidad de un disolvente, con el que interaccionan más fuertemente que con la fase estacionaria. Por tanto, la SPE no solo consigue un cambio de matriz del analito, sino que reduce el volumen de muestra.

La extracción en fase sólida se asemeja a un proceso de cromatografía líquida en columna abierta a pequeña escala. De hecho algunos de los términos empleados en estos procesos son similares a los empleados en cromatografía. Sin embargo, la SPE no puede ser considerado como un proceso cromatográfico en el sentido de que obtenga separaciones de diferentes componentes. La SPE separa grupos de moléculas con propiedades químicas similares.

Las fases sólidas que se emplean en SPE son similares a las utilizadas en cromatografía líquida. Un tipo general de fase estacionaria es la de sílice modificada

químicamente con diferentes grupos químicos, estos grupos son los que condicionan las propiedades químicas a la fase estacionaria y los responsables de la separación. La sílice modificada es estable entre pH 2 y 7,5, si bien el rango de estabilidad con el pH puede considerarse entre 2 y 11 puesto que la fase estacionaria solo está en contacto con la disolución acuosa unos pocos minutos. Además, las fases estacionarias son compatibles con casi todos los disolventes orgánicos^[22].

2.3.2 Interacciones de los analitos en el sólido adsorbente

Las diferentes fases estacionarias se clasifican según el tipo de interacción que tenga con el analito. La interacción son consecuencia de las propiedades químicas y básicamente son de tres tipos: interacciones polares (fase normal), interacciones no polares (fase reversa) e interacciones de intercambio iónico. Esta última se subdivide en intercambio aniónico e intercambio catiónico. A continuación se discute, brevemente, la interacción que será de interés para este trabajo.

2.3.3 Interacciones apolares en SPE

Las interacciones no polares (fuerzas de Vander Walls o interacciones hidrofóbicas) son aquellas que ocurren entre los enlaces carbono-hidrogeno del adsorbente y los enlaces carbono-hidrogeno de los analitos. La retención de analitos por interacciones no polares se facilita por disolventes polares. La elución de los analito desde adsorbentes no polares se facilita con disolventes con suficiente carácter apolar como para romper las interacciones no polares entre analito y adsorbente. La figura 7 muestra ejemplos de fases estacionarias apolares con las interacciones que se dan con los analitos^{[22][23]}. En la figura 7 la secuencia de la izquierda representa un ambiente más polar que la de la derecha.

2.3.4 Fases estacionarias en SPE

Entre los adsorbentes más utilizados en la extracción en fase sólida. Puede observarse que para las interacciones polares se utilizan grupos ciano e hidroxilos unidos a cadenas alifáticas cortas (3-4 carbonos) o incluso sílice no derivatizada, cuyos grupos Si-OH confieren un carácter altamente polar. Para las interacciones apolares se usan grupos de cadenas alifáticas hidrocarbonadas, siendo las más comunes las de Si-C₁₈ (sílice-octadecil), Si-C₈ (sílice-octil), anillos cíclicos alifáticos (ciclohexil) y aromáticos (fenil). Las interacciones de intercambio iónico de tipo catiónico fuerte se dan con grupos fenil o alquil sulfónicos (SO₃⁻)^[22].

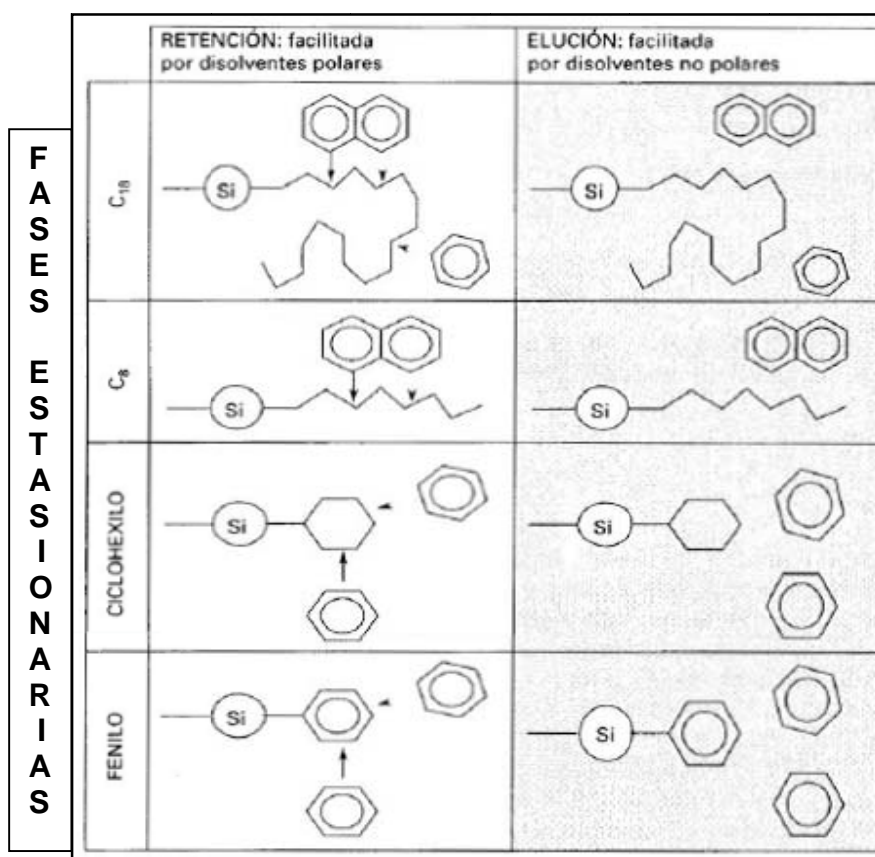


Figura 7.- Ejemplo de interacciones apolares en SPE

2.3.5 Procedimiento para la aplicación de la SPE

El método de extracción en fase sólida consiste principalmente en cuatro pasos sucesivos que se describen a continuación y se resumen en la figura 8.

En el primer paso, antes de iniciar la extracción, para asegurar la eficiencia y la reproducibilidad de ésta, se debe acondicionar la fase estacionaria mediante la percolación de un disolvente apropiado y seguidamente por un disolvente que posea las mismas características del disolvente de la muestra. En la mayoría de los casos este paso es absolutamente necesario por varias razones: 1) Se logra una adecuada solvatación de los grupos funcionales y, 2) Permite remover el aire existente en la columna y posibles impurezas presentes en la fase estacionaria. Las características del disolvente para acondicionar la fase estacionaria dependerán de la naturaleza de esta, usualmente se usan adsorbentes de tipo fase reversa, tales como Si-C₁₈ y Si-C₈, en este caso se acostumbra usar un disolvente con polaridad intermedia entre el agua y el disolvente orgánico que se utilizará como eluyente. Metanol y acetonitrilo son los disolventes más empleados en la solvatación de las columnas de SPE^[22].

Un segundo paso en la técnica de SPE es la percolación de la muestra a través de la fase estacionaria. En esta paso los analitos son retenidos y concentrados sobre la fase estacionaria. La muestra se puede cargar en el cartucho mediante aspiración por succión o por bombeo. Dependiendo del empaquetamiento de la fase estacionaria, el volumen de muestra que se puede cargar puede variar de 1mL a 1L. El flujo de La muestra a través de la fase estacionaria debe ser lo suficientemente pausado para garantizar una eficiente retención del los analitos, pero a la vez debe ser rápido para que el análisis no se torne largo, se presenta una situación de compromiso. Durante este paso así como es retenido el analito de interés lo hacen algunos otros componentes de la matriz, en tal ocurrencia se deben efectuar la purificación^[22].

Un tercer paso (que puede ser opcional) en la SPE, radica en el lavado de la fase estacionaria con un disolvente apropiado, el cual debe tener una fuerza elutropica para eluir los componentes de la matriz que fueron retenidos en la fase estacionaria, sin eluir a los analitos de interés. En este paso generalmente es conveniente realizarle un secado del adsorbente con nitrógeno.

Un cuarto y último pasó de la SPE, es la elución de los analitos de interés desde la fase sólida con un disolvente adecuado capaz de romper las interacciones entre el analito y el adsorbente. Tanto la cantidad como el flujo de disolvente deben ajustarse para garantizar la eficiencia y la reproducibilidad del proceso.

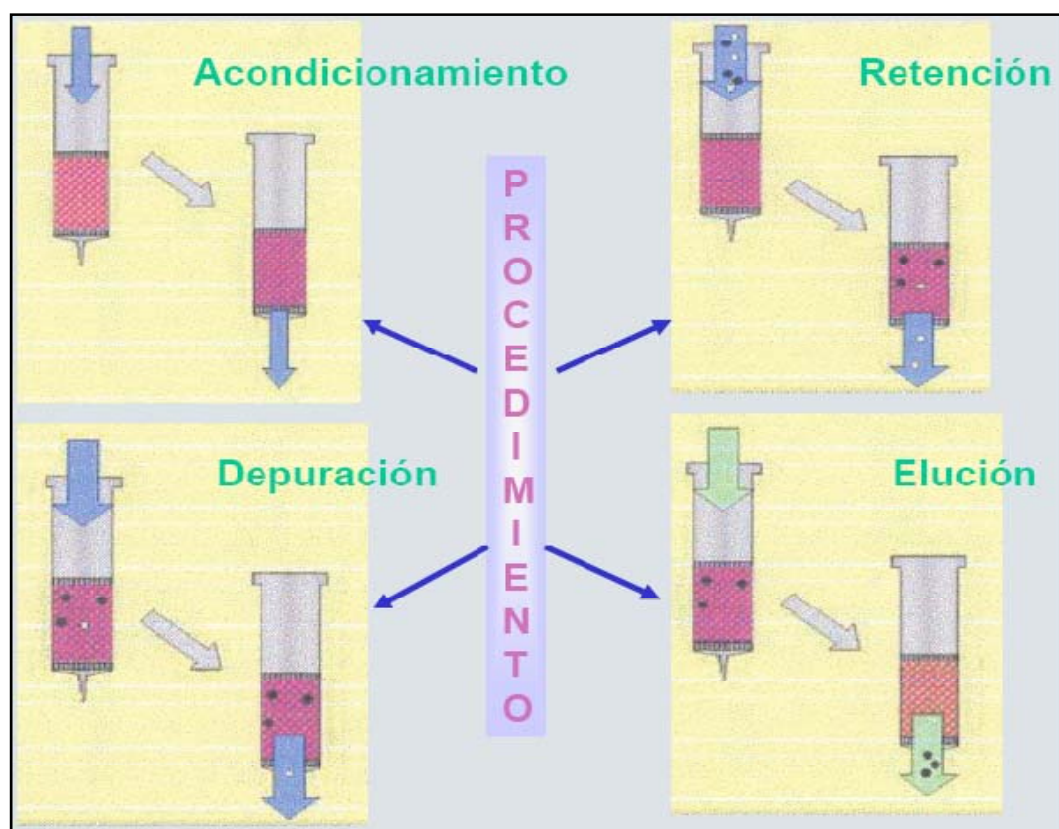


Figura 8.- Pasos para el proceso de extracción en fase solida SPE

2.3.6 Dispositivos para el empaqueo de la fase estacionaria.

Las fases estacionarias pueden conseguirse empaçadas en distintos formatos, entre los más utilizados se encuentran: los discos, los cartuchos y las jeringas figura 9.



Figura 9.- Dispositivos de SPE para el empaqueo de la fase estacionaria^[22].

2.3.7 Ventaja de la técnica de Extracción en Fase Sólida

- 1.- Permite incrementar la sensibilidad en los análisis de compuestos que se encuentran en cantidades trazas.
- 2.- Disminuye el consumo de solventes y muestra.
- 3.- Permite la posibilidad de muestreo in situ y traslado de la muestra desde el sitio al laboratorio, evitando el traslado de grandes volúmenes de muestras al sitio de análisis.
- 4.- Puede ser acoplada en línea con otras técnicas analíticas.
- 5.- Es una técnica rápida y económica.
- 6.- Presenta una gran variedad de aplicaciones debido a la gama de fases estacionarias disponibles para escoger.

2.5 Determinación cuantitativa de la Clorofila "a" mediante técnicas espectroscópicas

El método clásico fotométrico fue propuesto por Lorenzen, C.J. Lorenzen^[24] (1967), para determinar simultáneamente la Clo "a" y su feopigmento feofitina "a" en muestras acuosas. En este método la absorbancia se lee a 664 nm antes y después de la acidificación del extracto, lo cual produce la des-metalización de la Clo "a" para formar la feo "a". La concentración de la Clo "a" y la de feo "a" se determinan algebraicamente mediante las ecuaciones propuestas en dicho método (ver apéndice). En estas se considera numéricamente la degradación de la Clo "a" hacia su correspondiente feofitina por acidificación del medio. Este método se utiliza principalmente para corregir las interferencias de la feo "a" en el análisis de Clo "a", dado que esta provoca una sobreestimación de la concentración de la Clo "a", debido a la similitud de los espectros de absorción de los dos pigmentos.

Por su parte, Jeffrey y Humphrey^[25] (1975) desarrollaron el método tricromático (medidas de la absorción a tres longitudes de onda), con el propósito de determinar la (Clo a, b, c). En este se utilizan las ecuaciones denominadas *tricromáticas* (ver apéndice); donde se estima la cantidad total de clorofila y luego se sustrae la contribución de Clo "b" y Clo "c", para determinar la Clo "a", se supone que las dos primeras están presente en igual cantidad.

O. Holm-Hansen, C.J. Lorenzen, Yentsch^{[26][27]}, en 1960 proponen el primer método clásico fluorométrico para la determinación de clo "a" y feo "a" en ambientes marinos, debido a la sensibilidad de las medidas fluorométricas de clo "a" con respecto a la espectrofotometría. En este método, la intensidad de fluorescencia se mide a de longitudes de onda específicas de excitación (430nm) y de emisión (663nm), antes y después de la acidificación de los extractos.

2.6 Antecedentes en el desarrollo de nuevas metodologías de análisis de la Clorofila *a* en muestras de agua

Recientemente se han realizado estudios sobre el análisis directo de Clorofila *a*, mediante equipos espectroscópicos portátiles, basado en tecnología de fibra óptica. En este sentido, la compañía YSI^[12] desarrolló un sensor denominado YSI 6025, para estimar las concentraciones de fitoplancton en su ambiente natural mediante la detección *in situ* de la fluorescencia emitida por la Clorofila *a* en fitoplancton. Este sensor emplea tecnología similar a la utilizada por fluorímetros tipo sonda, pero con un arreglo opto-electrónico que le concede un menor tamaño.

Por su parte, Ferrer en su trabajo especial de grado^[28] en el 2007, construyó e implementó un dispositivo con componentes opto-electrónicos, para realizar medidas de absorción molecular UV-Visible y fluorescencia molecular de la Clorofila *a* y feo *a* en muestras de agua natural. El dispositivo se destaca por ser compacto (con dimensiones de 30cm de largo, 25cm ancho y 8cm alto) e involucrar componentes de bajo costo y fáciles de reemplazar. Con este dispositivo, se alcanzó una sensibilidad por fluorescencia molecular, 520 veces mayor que la obtenida por absorción. El sistema se utilizó en la cuantificación de feo *a* en muestras de aguas, provenientes del estanque ornamental ubicado en el “Instituto de Zoología Tropical” de la Facultad de Ciencias. Se obtuvo, una concentración de feo *a* en la muestra de $(314,83 \pm 0,07)\text{mgL}^{-1}$ y $(355,2 \pm 0,5)\text{mgL}^{-1}$ por fluorescencia y absorción molecular, respectivamente.

Por otro lado, el análisis de Clorofila *a* en muestras de agua, requiere un menor número de etapas experimentales en el pre-tratamiento de la muestra, durante el proceso de extracción de este pigmento. En este sentido, Vitta^[10], 2008, realizaron un estudio en la implementación de la técnica de SPE con cartucho de fase estacionaria C-18 (octadecilo) para evaluar su eficiencia en el proceso de extracción de la clorofila *a* en muestras de agua de mar. Se obtuvo una eficiencia de extracción del 84 %, esto

debido a que existe una fuerte adsorción del pigmento sobre la fase estacionaria C-18 y por tanto no se logra una elusión total del pigmento.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO

Aunque una vasta investigación ha sido establecida en el desarrollo de metodologías experimentales que suministren una alta exactitud en la cuantificación de la clorofila ``a`` y en la identificación del resto de otros pigmentos fotosintéticos, se requiere establecer metodologías de análisis modernas integrales que minimicen el tratamiento de muestra y permitan sacar partido de las ventajas que ofrecen las técnicas espectroscópicas. En este sentido, este trabajo plantea la elaboración de un dispositivo sensible de fibra óptica, para la determinación cuantitativa de la clorofila ``a``, basado en la técnica de Fluorescencia Molecular. Para la construcción de este dispositivo, se emplearán una diversidad de componentes: Diodos emisores de luz (LED), colimadores, fibra óptica y sistemas de detección de estado sólido (CCD). Dichos componentes opto-electrónicos permiten el desarrollo de un sistema portátil, compacto, robusto y versátil, con un costo inferior a un fluorímetro convencional. Por otro lado, también se pretende implementar el uso de la extracción en fase sólida (SPE), como técnica de extracción y pre-concentración de la clorofila ``a``, con el propósito de disminuir y/o evitar el elevado número de etapas experimentales utilizadas en el tratamiento clásico de la muestra e incrementar la sensibilidad del análisis.

Se plantea entonces como Objetivo General de este trabajo:

Diseñar un analizador de fibra óptica, basado en la técnica de fluorescencia molecular, para la determinación cuantitativa de clorofila ``a``. Explorar el uso de la SPE como técnica de extracción y pre-concentración de esta clorofila en muestras de agua.

Para alcanzar éste objetivo general se plantean como objetivos específicos los siguientes:

1. Construir el analizador de fluorescencia, mediante selección y ensamblaje de los componentes opto-electrónicos.
2. Escoger la condiciones óptimas instrumentales del analizador, que suministren la máxima señal analítica para la medición de soluciones estándares de clorofila ``a``.
3. Evaluar la eficiencia analítica del Instrumento, mediante la obtención de figuras de mérito por el método de cuantificación de curva de calibración directa.
4. Evaluar la capacidad de retención de la clorofila ``a`` en muestras de agua sobre cartuchos de SPE de fase C-8 y su posterior elusión con etanol.
5. Optimizar las variables experimentales del procedimiento de extracción en fase sólida: volumen de muestra y de eluyente, que permitan obtener el máximo factor de pre-concentración de la clorofila ``a``.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos, Solventes, Estándares y Muestras

4.1.1. Reactivos y Solventes:

- Acido Clorhídrico, Fluka, Riedel-de Haën, 37 %, d: 1,190 g/mL
- Estándares de la clorofila ``a`` (Clo "a") al 98,1% de pureza, en ampollas ámbar selladas de 5 mg; (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA).
- Etanol absoluto, Fluka, Riedel-de Haën, 99,8 %, d: 0,788 g/mL
- Agua Desionizada, 18 mΩ

4.1.2. Estándares:

Para realizar la optimización, evaluación y calibración del equipo se prepararon una serie de disoluciones estándares de calibración, a partir de una disolución estándar de Clo ``a`` en etanol con una concentración de $(42,5 \pm 0,1)$ mg/L. Todas las soluciones se almacenan en frascos de color ámbar y en un congelador a una temperatura de -4 °C de forma de garantizar su estabilidad.

4.1.3. Muestra:

Las muestras de agua se recolectaron en el estanque ornamental situado en el "Instituto de Zoología Tropical" de la Facultad de Ciencias. Universidad central de Venezuela. Caracas. Estas se almacenaron en frascos de color ámbar y en un congelador a una temperatura de -4 °C de forma de garantizar estabilidad de la Clo ``a`` durante el periodo de estudio.

4.2. Instrumentación

4.2.1. Componentes para la construcción del analizador de fibra óptica para fluorescencia molecular.

El analizador de fibra óptica se construyó con los componentes instrumentales descritos en la tabla 1. Se utilizaron un diodo emisor de luz (LED) como fuente de emisión, un espejo cóncavo para enfocar y coleccionar la radiación de fluorescencia emitida. Un receptáculo de muestra que incluye una celda de fluorescencia rectangular de vidrio de 1 cm de camino óptico, una fibra óptica multimodo y sus respectivos colimadores. Para la detección se utiliza un espectrómetro modelo Ocean Optics, constituido por una red de echelle y un detector multicanal de estado sólido del tipo de carga acoplada (CCD).

Tabla 1. Especificaciones técnicas de los componentes del analizador

Componentes	Especificaciones
LED	$\lambda=(410\pm 10)\text{nm}$.
Celda	Celda de Vidrio de camino óptico 1 cm, para fluorescencia (Starna).
Colimadores	Longitud de onda de alineación 543 nm, Recubrimiento AR 400-600 nm, Diámetro 2,17mm, Angulo 0,018, Apertura numérica de lente 0,25, Distancia focal 11mm. ThorLabs, Modelo F220 SMA-A,
Fibra óptica	Multimodo, Apertura numérica 0,37, Diámetro 600 μm . ThorLabs, Modelo FL37-600,
Espectrómetro	Espectrómetro Ocean Optics modelo USB2000, Dimensiones: 89.1 mm de largo x 63.3 mm de ancho x 34.4 mm de alto. Peso: 90 gr. detector: Sony ILX511 lineal matriz de silicio CCD, 2048 píxeles, Rango de detección 200-1100nm. Banco óptico: sistema cruzado Czerny-Turner f/4, red de difracción de echelle.

4.2.2. Materiales para la extracción de la clorofila "a" de las muestras de agua mediante SPE

Para llevar a cabo la extracción y pre-concentración de la Clo "a" de las muestras de agua, se utilizaron cartuchos de SPE con una fase estacionaria del tipo reversa, C-8, (octil), jeringas de (5, 10, 20 y 50mL), pipetas volumétricas, micropipeta y viales de color ámbar. Las especificaciones técnicas de los cartuchos de SPE se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Especificaciones técnicas de los cartuchos de SPE

Componente	Especificaciones
Cartucho de SPE	Capacidad de 500 mg/3 mL. Con Fase estacionaria octil (C-8) unida químicamente a Sílica gel con las siguientes características: área superficial de 546 m ² /g, tamaño de poro de 60 Å. Marca AccBOND II

4.3. Metodología Experimental

4.3.1. Construcción del analizador de fluorescencia, para la determinación cuantitativa de clorofila "a"

El diagrama del analizador de fluorescencia, se presenta en la figura 10. La radiación emitida por el LED incidirá directamente sobre la muestra la cual estará contenida en una celda rectangular. Dicha celda estará colocada entre un espejo cóncavo y un colimador unido a la fibra óptica que colectará y transportará la emisión de fluorescencia hacia el detector. La función de dicho espejo es la de recolectar y enfocar la mayor parte de la fluorescencia emitida en todas las direcciones por el analito cuando este se relaja. La radiación emitida se colecta por el colimador a un ángulo de 90° con respecto a la trayectoria del haz de excitación, para finalmente dirigirla a través

de la fibra óptica al espectrómetro constituido por una red de echelle encargada de dispersar la radiación para luego ser detectada en una cámara CCD. Finalmente un computador se emplea para el registro de los espectros.

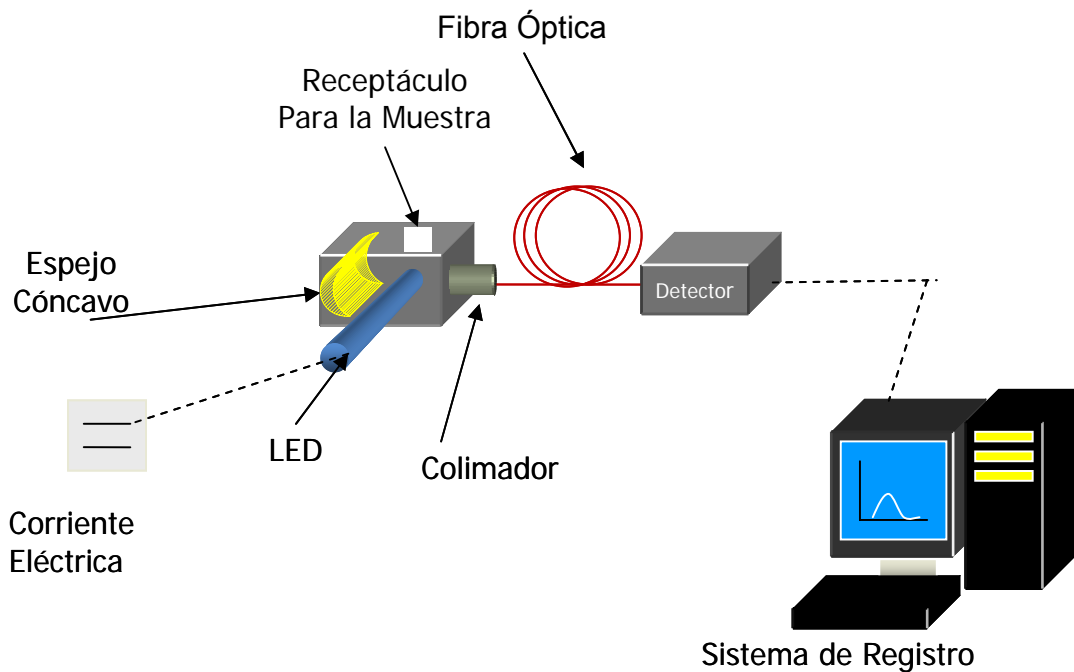


Figura 10.- Esquema del analizador de fluorescencia.

En la figura 11 se presenta un diagrama detallado del receptáculo que contiene la muestra. Donde se especifican las dimensiones y la disposición de los componentes opto-electrónicos, y en la figura 12 se presenta una fotografía del sistema ensamblado, donde se puede apreciar el aspecto del equipo real.

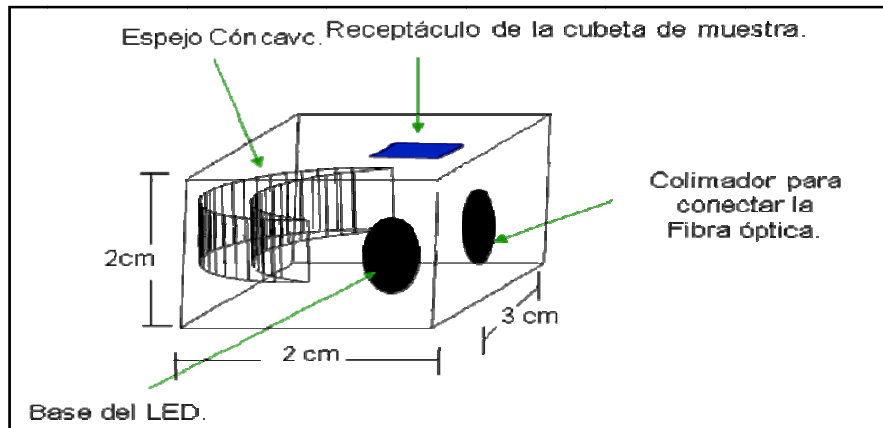


Figura 11.- Receptáculo de muestra del analizador de fluorescencia.

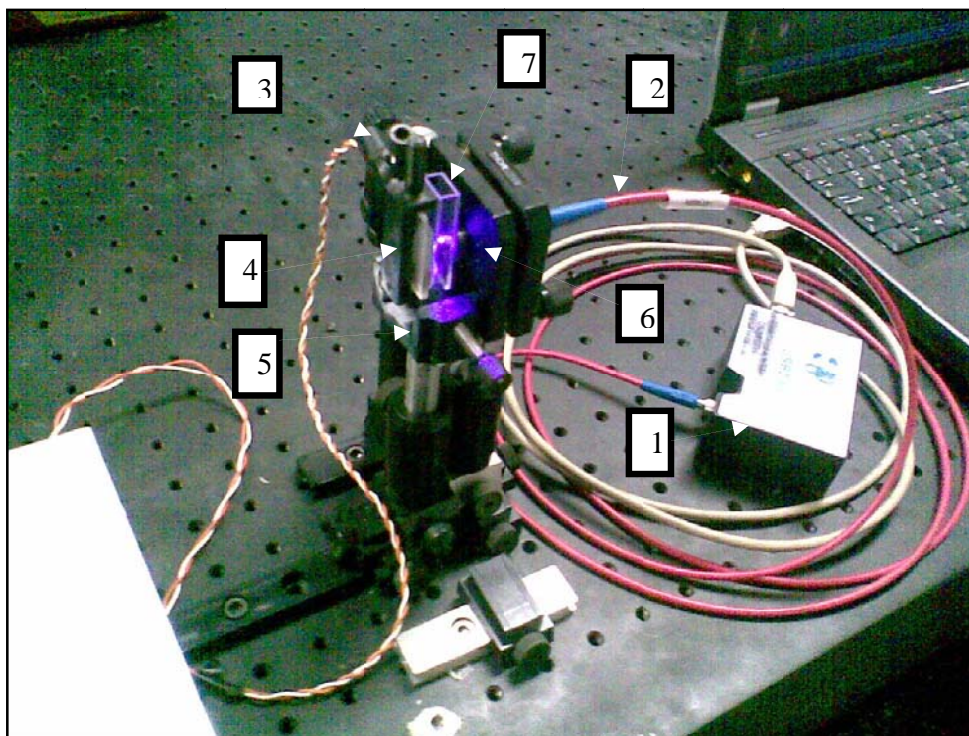


Figura 12.- Fotografía del Analizador de Fluorescencia. Espectrómetro (1), Fibra Óptica (2), Base del LED (3), Espejo Cónvavo (4), Base para el receptáculo de la muestra (5), Colimador (6), Cubeta de muestra (7).

4.3.2. Optimización y evaluación del analizador de fluorescencia

Para la optimización de algunas de las variables de diseño, se escogieron las condiciones instrumentales que suministraran el máximo valor de la señal analítica de una disolución estándar de 1 mgL^{-1} de Clo ``a``. Posteriormente se realizó la determinación y cálculo de las figuras de mérito analíticas tales como: límites de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad, de forma de evaluar la eficiencia del analizador de fluorescencia. Para ello se prepararon disoluciones de calibración de Clo ``a`` de 1, 2, 3 y 4 mgL^{-1} , partiendo de la disolución estándar de $(42,5 \pm 0,1) \text{ mgL}^{-1}$ de clorofila ``a`` en etanol.

4.3.3. Uso de SPE, para la extracción y pre-concentración de la clorofila ``a`` desde las muestras de agua.

Para realizar el procedimiento de SPE, se procedió a efectuar las siguientes etapas en el sistema de preconcentración que se muestra en la figura 13:

1. Activación del cartucho C-8 por humidificación de la fase estacionaria con 3 mL etanol.
2. Acondicionamiento de la fase estacionaria con 5 mL agua, lo cual permite alinear la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. En esta etapa se elimina el etanol residual usado para la activación.
3. Retención del analito (Clo ``a``) mediante el paso de la muestra a través del cartucho C-8.
4. Elución de la Clo ``a`` mediante el paso de etanol a través del cartucho.



Figura 13.- Sistema de extracción y preconcentración.

4.3.4. Optimización del proceso de SPE para la extracción y preconcentración de la clorofila "a" en la muestra de agua.

Para optimizar del procedimiento de SPE se modificaron las siguientes variables experimentales; volumen de muestra y volumen de eluyente.

4.3.4.1. Evaluación del volumen de muestra a cargar en el cartucho:

Con la finalidad de evaluar la cantidad óptima de muestra, que va pasar por los cartuchos, se llevó a cabo un estudio de saturación. Para ello se hizo pasar diferentes volúmenes de muestra (10, 20, 30 y 40 mL) en diferentes cartuchos respectivamente, y se analizó la Clo "a" en el residuo mediante el analizador de fluorescencia.

4.3.4.2. Evaluación de volumen de elución:

Con la finalidad de evaluar la cantidad de etanol que es necesario para extraer y obtener una sensibilidad adecuada en el análisis de Clo "a", se procedió a realizar un estudio donde se agregó un volumen fijo de muestra de 20 mL a los cartuchos y se

varió el volumen de etanol desde 1 mL hasta 7 mL, para finalmente medir el extracto en el analizador de fluorescencia.

4.3.5. Aplicación de la metodología de análisis propuesta.

La evaluación de la metodología propuesta se realizó mediante el análisis de muestras de agua que se recolectaron del estanque ornamental situado en el “Instituto de Zoología Tropical” de la Facultad de Ciencias. Universidad central de Venezuela. Caracas, por la técnica de SPE propuesta determinando la concentración de Clo “a” mediante el método de adición estándar. Los resultados obtenidos mediante la metodología propuesta, fueron comparados con los suministrados al utilizar el protocolo estándar de determinación de Clo “a” mediante absorción molecular.

Para el análisis de la Clo “a” se recolectaron tres muestra de aproximadamente 600 mL de agua cada una y se procedió de la siguiente forma:

De manera de compensar las interferencias espectrales asociadas a la matriz de la muestra en el análisis de Clo “a”, se tomaron dos de las tres muestras recolectadas y se cuantificó el analito en cada una de ella mediante curva de *adición estándar* (ads) (metodología propuesta). Para ello se procedió del la siguiente forma para cada muestra:

1. Se tomaron cuatro alícuotas de muestra de 8 mL cada una.
2. Se contaminaron tres de ellas con una cantidad conocida de solución estándar de Clo “a”, luego las cuatro disoluciones se aforaron con agua hasta 10 mL y se sometieron al proceso de SPE mencionado en la sección 4.3.3 para obtener cuatro extracto con concentraciones de 0, 1, 2 y 3 mg/L de estándar de Clo “a” respectivamente.

3. Finalmente se analizaron los cuatro extractos a través del analizador de fluorescencia, con la finalidad de construir la curva de adición estándar a una longitud de onda de 673.

Para el análisis de la Clo ``a'' mediante el *protocolo estándar* en las tres muestras de agua recolectadas, se procedió de la siguiente manera:

1. Se filtró 100 mL de cada muestra de agua utilizando filtros de celulosa. Luego cada filtro se colocó en un tubo de ensayo.
2. Se agregó 10 mL de etanol en cada tubo de ensayo que contienen los filtros con los organismos con pigmentos fotosintéticos.
3. Los tubos de ensayo con los filtros se calentaron en un baño María a 75 °C por 5 minutos. Luego se enfriaron con agua y hielo, después se maceraron los filtros.
4. Los tubos de ensayo con los filtros macerados se centrifugaron a 3000 rpm por un tiempo de 15 minutos.
5. Con una pipeta, se tomó aproximadamente 5 mL del sobrenadante de cada extracto centrifugado y se midió la absorbancia a 750 y 664 nm en un equipo Ocean Optics con una lámpara LS-1 de Tungsteno-Halógeno de rango espectral 360-2000nm y un espectrómetro Ocean Optics modelo USB 2000. A 750 nm se determina la turbiedad de la muestra.
6. Para desmetalizar la Clo ``a'', se añadió 30 µL de una solución de HCl 0,1 M por cada mL de extracto, y después de un período de 5 minutos se determinó nuevamente la absorbancia a 750 y 664 nm. Se verifica que el pH del extracto se encuentre entre 2-3.

El proceso de filtrado y de extracción de la Clo ``a'' se realizó en un cuarto con poca iluminación para disminuir los riesgos de descomposición. La filtración de las muestra se realizaron con filtro de 0,45 micra MILLIPORE de celulosa. La concentración de Clo ``a'' en µg/L se calculó mediante la ecuación 1 (ver apéndice)^[24]. Los software usados para la adquisición y el procesamiento de los datos fueron son; (OOI Base32, de la compañía Ocean Optics) adquisición de datos y (Origin Pro 7.5 y Excel Microsoft Office 2007) procesamiento de datos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Construcción del analizador de fluorescencia.

5.1.1. Optimización del analizador de fluorescencia

Para la optimización del analizador se modificaron las siguientes variables: las distancias entre el LED y la cubeta de muestra y la distancia entre el colimador y la cubeta de muestra. Encontrándose que las distancias donde se genera la mayor señal de fluorescencia para las dos variables fue de 0 cm respectivamente, es decir tanto el LED como el colimador adosados a las paredes de la cubeta o celda que contiene la muestra.

En la figura 14 se presenta los espectros obtenidos cuando se recolecta la señal de fluorescencia en presencia y en ausencia del espejo colimador ubicado perpendicularmente a la fuente de excitación. Se observa como la intensidad de fluorescencia emitida por la disolución Clo ``a'' aumenta 3,9 veces cuando el espejo cóncavo es colocado en el equipo, esto se le atribuye a que el espejo permite enfocar sobre el colimador gran parte de la radiación fluorescencia emitida en todas las direcciones por la disolución de Clo ``a'' en la cubeta.

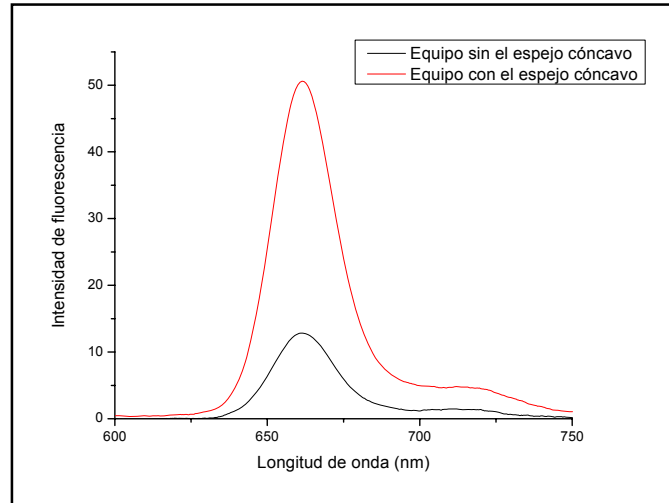


Figura 14.- Intensidad de fluorescencia de una disolución de 1mg/L de clorofila "a" captada en el equipo sin el espejo cóncavo y con el espejo cóncavo.

Cabe destacar que aunque las tres variables que se optimizaron en la construcción del equipo son importantes, la única que interviene de manera significativa en el aumento de la señal de fluorescencia, es la colocación del espejo cóncavo en la estructura del analizador. Esta optimización es importante ya que todos los parámetros que contribuyan al aumento de la señal analítica, se verá reflejado en el aumento de la sensibilidad en el análisis de cualquier analito capaz de fluorecer al ser irradiado con el LED de $\lambda = (410 \pm 10)$ nm.

5.1.2. Evaluación del analizador de fluorescencia

Una vez que se ensambló y optimizó el analizador de fluorescencia se procedió a evaluar mediante las figuras de mérito analíticas: límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), sensibilidad de la curva de calibración (pendiente de la curva) y evaluación de la precisión (repetibilidad y reproducibilidad). Para ello se construyó una curva de calibración, ver figura 15, donde se midieron cuatro disoluciones estándares de Clo "a" en etanol con un intervalo de concentración de 1 a 4 mg/L, además de un blanco (etanol). Dicha curva fue realizada con los valores de áreas integradas de las

bandas de fluorescencia obtenidas de los espectros de las disoluciones analizadas, ver figura 16.

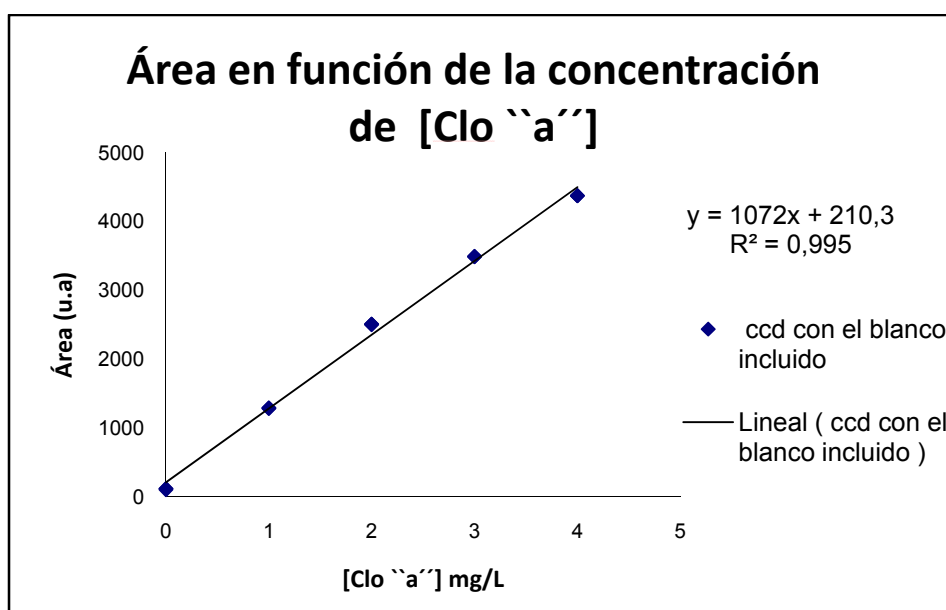


Figura 15.- Curva de calibración directa de clorofila "a" para determinar las figuras de mérito.

Figura 16.- Espectros de fluorescencia de clorofila "a" tomadas en el analizador en un rango de concentración de (0 - 4) mg/L.

En la tabla 3 se presentan los parámetros obtenidos al realizar el ajuste lineal por mínimos cuadrados de la curva de calibración de fluorescencia para Clo ``a``.

Tabla 3. Parámetros de la curva de calibración, tomando la ecuación de la recta

$$\text{Área} = A + B \cdot [\text{Clo ``a``}]$$

Parámetro	Valor
A	(210 ± 49) u.a
B	(1072 ± 20) (u.a).L.mg ⁻¹
R ²	0,995
Error típico	16

Como observamos en la tabla 3, se encontró, en el intervalo de concentraciones estudiado, un buen ajuste lineal con valores del coeficiente de correlación cercanos a la unidad y valores de error típicos, considerablemente bajos.

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para las figuras de mérito analítico.

Tabla 4. Figuras de mérito analíticas para el análisis de Clorofila ``a``

LD [Clo ``a``](mg/L)	LC [Clo ``a``](mg/L)	Sensibilidad ((u.a).L.mg ⁻¹)
0,024 ± 0,001	0,080 ± 0,004	1072 ± 20

Los límites de detección y cuantificación fueron calculados con las ecuaciones 1 y 2 respectivamente mostradas a continuación:
 LD = promedio + 3 (desv. estd. del blanco) Ecu. 1
 LC = promedio + 10 (desv. estd. del blanco) Ecu. 2

De los resultados presentados en la Tabla 4, podemos decir que el límites de detección (y por lo tanto el de cuantificación) es superior que el reportado (0,05 µg/L) con el método 445 de referencia de la agencia de protección ambiental (EPA)^[5]. Tomando en consideración la sencillez y lo económico de los componentes usados y del equipo ensamblado, se logran alcanzar límites de detección y cuantificación que permiten la cuantificación del analito en una diversidad de muestra, de una forma

sencilla y rápida. Estos límites de detección podrían mejorarse utilizando otro LED el cual genere una radiación de mayor intensidad.

5.1.3. Evaluación de la Precisión del analizador de fluorescencia

5.1.3.1. Repetibilidad

Para la evaluación de la repetibilidad, expresada como el coeficiente de variación, se realizaron 8 medidas de una disolución estándar de clo `a` de (4,0±0,1) mg/L en el analizador, realizadas en un mismo día. Se reportaron los promedios obtenidos, las desviaciones estándares generadas y el coeficiente de variación. La tabla 5 presenta los resultados obtenidos, donde se observa que los valores de concentración son altamente repetibles, ya que se generan un coeficiente de variación por debajo de un 2%, mostrando la poca variabilidad de los resultados en las medidas realizadas.

Tabla 5. Resultados obtenidos para la evaluación de repetibilidad.

	Día 1	Día 2	Día 3
Medida	[Clo `a`]ppm	[Clo `a`]ppm	[Clo `a`]ppm
1	3,902	3,865	3,802
2	3,955	3,864	3,761
3	3,923	3,804	3,824
4	3,942	3,863	3,815
5	3,953	3,857	3,861
6	3,893	3,812	3,772
7	3,925	3,818	3,860
8	3,936	3,894	3,831
Promedio	3,93	3,85	3,82
Desv. Estd.	0,02	0,03	0,04
CV	0,5	0,8	1

El coeficiente de variación fue calculado mediante la siguiente ecuación: $CV = (Desv.Estad/Promedio) \times 100$

5.1.3.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad fue obtenida desde el análisis de una disolución estándar de Clo *a* de 4 mg/L, durante un período de tres días consecutivos, utilizando por cada día 8 réplicas de dicha disolución. La concentración promedio obtenida para un total de 24 réplicas y su respectiva desviación, se presenta en la tabla 6. Los resultados obtenidos, indican que el coeficiente de variación generado por las medias tomadas en los tres días consecutivos se encuentra por debajo de un 3 %, indicando que el analizador de fluorescencia construido genera resultados reproducibles.

Tabla 6. Resultados obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad

	Día 1	Día 2	Día 3
[Clo <i>a</i>]ppm	3,93	3,85	3,82
Promedio		3,87	
Desv. Estd.		0,06	
CV		2	

5.2. Optimización del proceso de SPE, para la extracción y preconcentración de la clorofila *a* en la muestra de agua

Para optimizar el procedimiento de SPE se modificaron las siguientes variables experimentales; volumen de muestra y volumen de eluyente, con la finalidad de obtener las condiciones optimas de trabajo.

5.2.1. Evaluación del volumen de muestra a cargar en el cartucho.

Con la finalidad de evaluar la cantidad de muestra a pasar mediante el cartucho C-8, se realizó un estudio de saturación para determinar la capacidad de adsorción de de la fase estacionaria. Es importante indicar que existe una saturación de la fase

estacionaria cuando se observa en el residuo del proceso de retención señal de Clo ``a``. En la figura 17 se presenta la tendencia de la señal de Clo ``a`` en el residuo para los diferentes volúmenes de muestra utilizados. Se observa cómo comienza a incrementa la señal generada por la Clo ``a`` en el residuo a medida que se aumenta el volumen de muestra por encima de 20 mL, dicho volumen corresponde al volumen de saturación de la fase estacionaria, debido a que sus centros activos no tienen más capacidad de retener analito. Este fenómeno puede estar asociado a que tanto el analito de interés como otros componentes de la matriz están saturando los centros activos de la fase estacionaria, permitiendo el paso de la Clo ``a`` remanente al residuo.

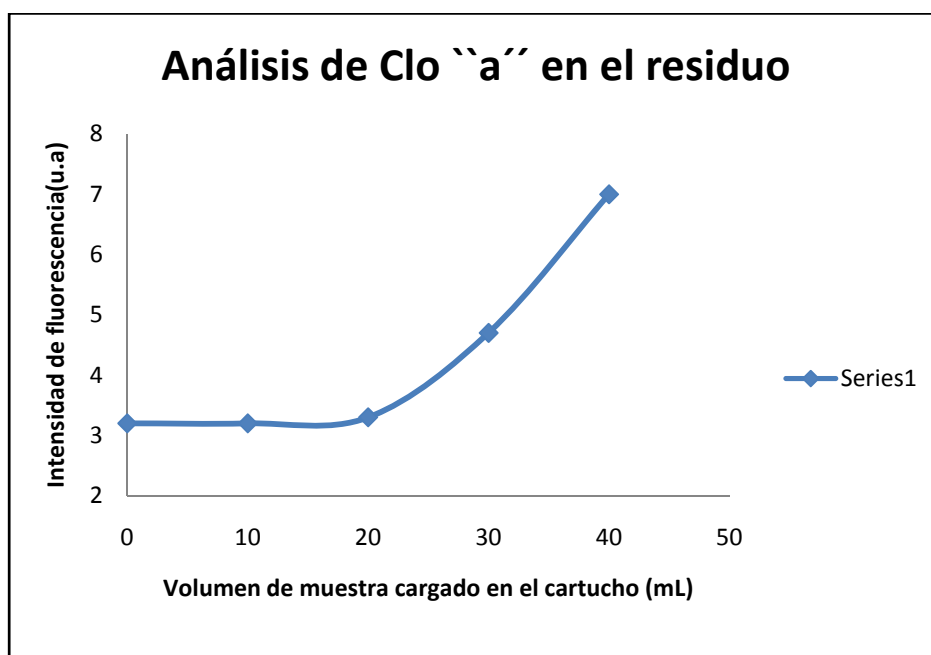


Figura 17.- Estudio de saturación de la fase estacionaria.

Por otra parte este estudio permitió determinar el intervalo de trabajo para el volumen de muestra donde se garantiza una retención total de la Clo ``a`` en la fase estacionaria. El cual se encuentra justo después de cero hasta veinte mililitros como lo muestra la figura 17. Estos resultados corresponden a los espectros fluorescencia del

analito, presentados en la figura 18, en el análisis del residuo para los diferentes volúmenes muestra (10 mL, 20 mL, 30 mL y 40 mL).

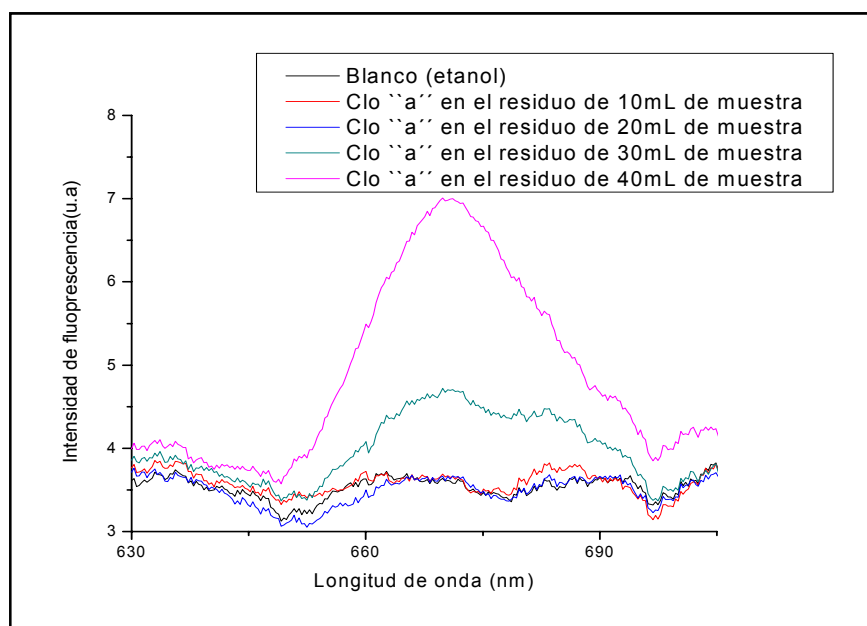


Figura 18.- Espectros de fluorescencia de clorofila "a" en el análisis del residuo.

5.2.2. Evaluación de volumen de elución.

Una vez realizado el estudio de saturación de la fase estacionaria C-8 y obtenido el intervalo del volumen óptimo de muestra, se procedió a evaluar el volumen de elución, con la finalidad de obtener la cantidad de etanol necesario para la extracción y una adecuada sensibilidad para el análisis de Clo "a". Para ello se realizó un estudio donde se cargó a los cartuchos un volumen fijo de muestra (20 mL) y se varió el volumen de etanol de 1 a 7 mL para realizar la extracción. La figura 19 presenta la variación de la masa recuperada y la intensidad de fluorescencia en función del volumen de extracción.

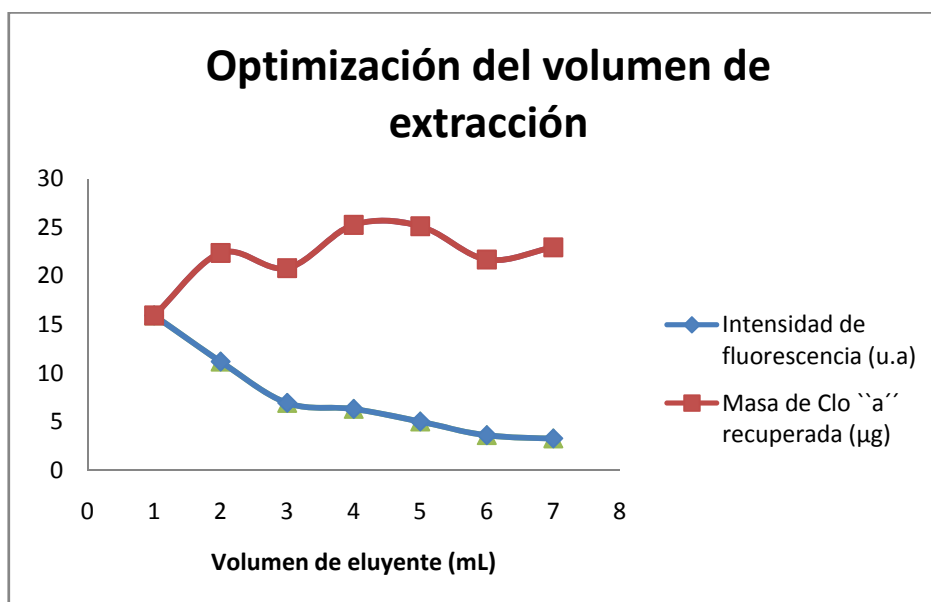


Figura 19.- Evaluación del volumen de extracción.

En la figura 19 se observa que a medida que se aumenta el volumen de eluyente se comienza a recuperar más cantidad de analito, hasta llegar a un máximo entre 4 y 5 mL. En contraste con la masa recuperada tenemos que la intensidad de fluorescencia decae abruptamente a medida que se aumenta la cantidad de eluyente, lo que trae consigo una menor sensibilidad para el análisis, mediante el analizador de fluorescencia. Esto se debe a que al realizar la extracción con esas cantidades de eluyente, existe un efecto de dilución de la concentración del analito que repercute directamente en la intensidad de la señal y en consecuencia produce una disminución de la misma. De allí que se crea una situación de compromiso, para el cual se escogió el menor volumen de eluyente en función de que éste generaba la mayor señal analítica. No obstante se observa que a este volumen no se garantiza una extracción completa de este pigmento.

5.3. Aplicación de la metodología de análisis propuesta

5.3.1. Cuantificación de las muestras

Se procedió a realizar un análisis cuantitativo de muestras de agua tomadas del estanque ornamental situado en la Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela. Esto con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de la metodología propuesta para el análisis de Clo "a" en agua de reservorios.

Las muestras fueron analizadas mediante el procedimiento de SPE optimizado. Para determinar la concentración de Clo "a", se realizó mediante curva de adición estándar (ver figura 20) con el fin de compensar los efectos asociados a la matriz de la muestra, que trae como consecuencia un desplazamiento de la banda de emisión de fluorescencia del analito de 663 nm a 672nm (ver figura 21). Luego para efectos comparativos de los resultados obtenidos al analizar las muestras de agua, se procedió a aplicar el método de referencia empleado comúnmente en el análisis de Clo "a" y feo "a" en muestras de aguas naturales, el cual se detalló en la sección 4.3.4 de la parte experimental. Es de hacer notar que este método no es totalmente exacto en el análisis, pues no emplean un patrón de referencia para el cálculo de la concentración de Clo "a" en las muestras, pero es uno de los métodos de referencia internacional ampliamente empleado. Se puede tomar como un método que nos servirá como comparación del orden de magnitud de la concentración que se encontró mediante (ads) en la muestra analizada. Los resultados obtenidos con los dos métodos de análisis, se resumen en la tabla 7.

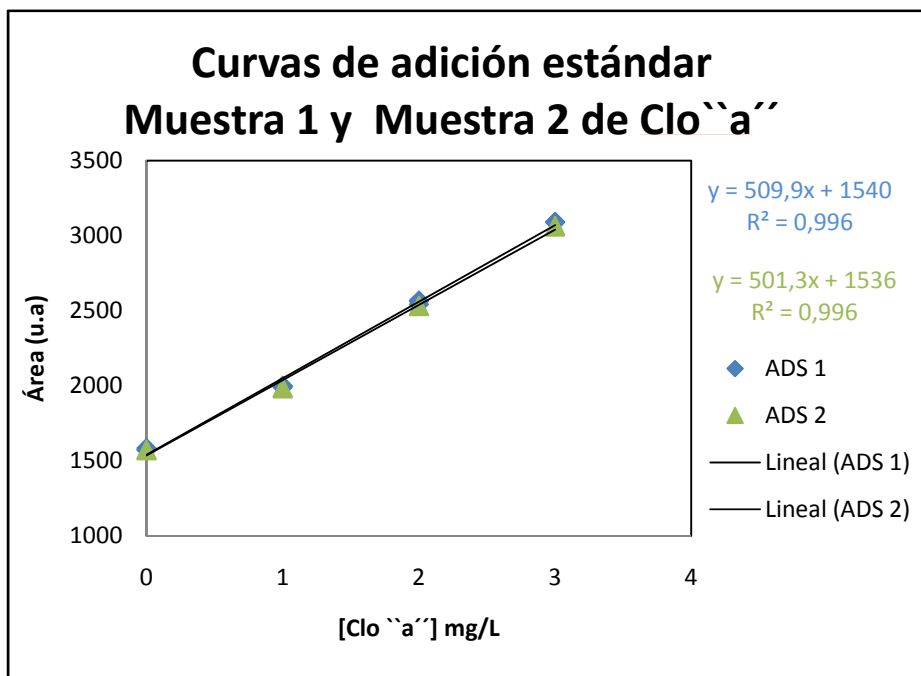


Figura 20.- Curvas de adición estándar para cuantificar la concentración de clorofila "a" en las muestras de agua

Tabla 7. Concentración de clorofila "a" en la muestra obtenidas por los dos métodos de análisis.

Método	[Clorofila "a"] ± sd (µg/L)	CV
Ads	380 ± 4	1
Protocolo estándar	391 ± 20	5

(ads) Curva de adición estándar

Se realizaron prueba de significancias F y t, con un nivel de 95% de confianza, para comparar las concentraciones promedio de Clorofila "a" obtenidas por los dos métodos de análisis utilizados. Los resultados de estas pruebas estadísticas se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Comparación estadística de la concentración de Clo ``a`` obtenidas por cada método (ads y protocolo estándar) empelando un nivel de significancia del 95%.

Métodos comprados	t calculado	t critico	¿Existen diferencias significativas entre las medias obtenida por cada método?
Ads	0,9	3,18	No
Protocolo estándar			

De los resultados arrojados por las pruebas estadísticas (tabla 8) entre la adición estándar realizada en nuestra metodología y el protocolo estándar de análisis de Clo ``a``, podemos observar que no existen diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas por ambos métodos. El aporte de la metodología propuesta es un menor tiempo de análisis y disminución en la escala del proceso de tratamiento de la muestra. A pesar de que las condiciones empleadas en SPE con una eficiencia de extracción del pigmento relativamente baja, el resultado obtenido de la concentración de Clo ``a`` en las muestras analizadas es de alta fiabilidad analítica; baja incertidumbre y magnitud que no presenta diferencias significativas con el obtenido en el método de referencia. Sobre la exactitud es poco lo que se puede adelantar debido a la ausencia de patrones certificados, por razones atribuibles a la inestabilidad del analito.

En la figura 21 se presentan los espectros tomados en el analizador de fluorescencia para el extracto de un patrón de Clo ``a``, de la muestra y de la disolución de adición estándar, donde se puede observar el desplazamiento en banda de emisión de la Clo ``a`` mencionado anteriormente. Esto puede estar atribuido a los efectos asociados con la matriz de la muestra que muchas veces están asociados a la degradación parcial de la Clo ``a`` hacia la feo ``a``, este efecto suele compensarse con el método de adición de estándar y por el método de referencia debido a que este

considera numéricamente la degradación de la Clo "a" hacia su correspondiente feofitina por acidificación del medio^[24] .

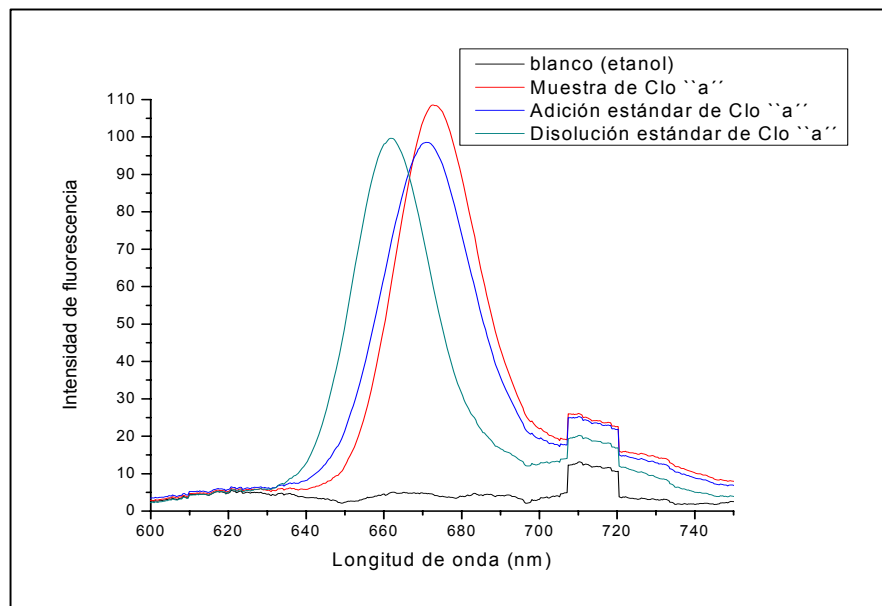


Figura 21.- Espectros de fluorescencia para la clorofila "a" presente en un extracto de la muestra, en una disolución estándar y en el extracto de adición estándar

6. CONCLUSIONES

Del trabajo realizado en la determinación de clorofila "a" en muestras de agua mediante la técnica de extracción en fase sólida y fluorescencia molecular se puede concluir que:

1. Se construyó un analizador de fluorescencia con diseño que involucra componentes de bajo costo y fácilmente reemplazables, confiriéndole un pequeño tamaño, con dimensiones de 20 cm de alto y 6 cm de ancho sin incluir la computadora.

2. En cuanto a sensibilidad obtenida en el analizador se logró mejorar 3.9 veces colocándole en su estructura un espejo cóncavo encargado de enfocar hacia el detector gran parte de la radiación emitida por el analito.

3. Se comprobó que el analizador, funcionó satisfactoriamente en el rango de concentración establecido para las soluciones de Clo "a" empleadas, puesto que en las curvas de calibración obtenidas se obtuvo un coeficiente de correlación que garantizan la lineal de las curvas.

4. Se obtuvieron límites de detección y cuantificación de $(0,024 \pm 0,001)$ y $(0,080 \pm 0,004)$ mg/L respectivamente, que permiten realizar la determinación de clorofila "a" en agua de reservorio previamente tratada mediante la técnica de SPE.

5. El analizador de fluorescencia genera resultados altamente reproducibles en la medición de disoluciones estándares de clorofila "a". Se lograron valores de coeficientes de variación menores a un 2% para las disoluciones estándar cuando se le realizan el análisis de repetibilidad, y menores al 3% para análisis de reproducibilidad.

6. En la evaluación de la técnica de extracción en fase sólida se establecieron las condiciones óptimas de análisis de clorofila "a" en las muestras de agua: rango de trabajo para el volumen de muestra por debajo de 30 mL y para el volumen de elución de 1 mL etanol.

7. Por otra parte a pesar de que con la técnica de SPE se consigue una eficiencia de extracción relativamente baja, no se encontraron diferencias significativa entre las concentraciones del analito cuando se aplica SPE para aislar y concentrar el analito y el análisis por fluorescencia empleando la adición estándar y el protocolo estándar de análisis de clorofila "a" en muestra de agua.

7. RECOMENDACIONES

Realizar modificaciones de los componentes opto-electrónico del analizador de fluorescencia, con el objeto de incrementar la sensibilidad y así mejorar el límite de detección alcanzado.

Realizar un estudio sobre la factibilidad del uso de filtros de absorción como sistema de selección de longitud de onda de la radiación emitida por la muestra, de forma de sustituir el espectrómetro empleado en el presente trabajo, con el fin disminuir aun más el coste de analizador de fluorescencia.

De existir un estándar certificado del analito, realizar un estudio de exactitud en la metodología de análisis con SPE propuesta para la determinación de clorofila ``a`` en muestra agua.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Charles C. Trees, Robert R. Bidigare. *Fluorometric Chlorophyll a: Sampling, Laboratory Methods, and Data Analysis Protocols*, Center for Hydro-Optics & Remote Sensing, San Diego State University, California, NASA/TM-2000-209966
- [2] APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washintong, 1995. 2005. Ref Type: Generic.
- [3] JGOFS Joint Global Ocean Flux Study. *Protocols Chapter 14. Measurement of Chlorophyll a and Phaeopigments by Fluorometric Analysis*, 1994.
- [4] ICES. *Techniques in Marine Environmental Sciences Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods*,
- [5] Elizabeth J. Arar, Gary B. Collins. *Method 445.0 In Vitro Determination of Chlorophyll a and Pheophytin in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence*. *Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH 45268* . United States of America. 1997
- [6] Richards, F.Am, Thompson T.G. *The estimation and characterization of plankton populations by pigments analyses.II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments*. *J. Mar. Res* 11,156-172 (1952).
- [7] Ramesh p. Singh, Sagnik Dey, Sanjeeb Bhoi. *Anomalous Increase of Chlorophyll Concentrations Associated with Earthquakes*, Department of Civil Engineering, India Institute of Technology, University Drive MS 5C3,USA. 2005.07.053.

-
- [8] Miguel Ángel Sogorb Sánchez, Eugenio Vilanova Gisbert. *Técnicas analíticas de contaminantes químicos: Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias*, Ediciones Díaz de Santos, 2004
- [9] Nigel J. K. Simpson. *Solid-phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, CRC Press, 2000, Harbor City, California 514 pág.
- [10] Vitta Yosmery . *Aplicación de Calibración Multivariada en la Determinación de algunos Analitos Orgánicos en Muestras de Agua mediante la Técnica de Fluorescencia Molecular*. Tesis doctoral. UCV, Caracas Venezuela. 2008, Capitulo 3. Pág 162.
- [11] Gregor J, Marsalek B. *Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods*. The department of Phycology and Ecotoxicology, The Institute of Botany. 2004; 517-522.
- [12] Y.S.I. *In Vivo Measurement of Chlorophyll and the YSI 6025 Wiped Chlorophyll Sensor*, 2000, www.YSI.com.
- [13] R.J. Porra and E. Pfündel and N: Engel. Metabolism And Function of Photosynthetic Pigments in *Phytoplankton Pigments in Oceanography: guidelines to modern methods*. S.W Jeffrey, R.F Mantoura and S. W. Wright. UNESCO Publishing. París, 93. (1997).
- [14] R.J. Porra and E. Pfündel and N: Engel. Metabolism And Function of Photosynthetic Pigments in *Phytoplankton Pigments in Oceanography: guidelines to modern methods*. S.W Jeffrey, R.F Mantoura and S. W. Wright. UNESCO Publishing. París. 104 (1997).

-
- [15] <http://www.nalms.org> R.E Carlson. and J. Simpson. *A Coordinator's Guide to Volunteer Lake Monitoring Methods*. North American Lake Management Society. 96, (1996).
- [16] www.ch.ic.ac.uk/local/projects/steer/chloro.htm /J. Steer *Structure and Reactions of Chlorophyll*. (revisión enero 2009)
- [17] J. R. Dell, P. M. A. Toivonen. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer Academy Publisher.
- [18] webpages.ull.es/users/bioquibi/bioquimica_fotosintesis/fotosintesis Tema 14. La Fase luminosa de la fotosíntesis Javier Corzo. *Departamento de Bioquímica y Biología Molécula*. Universidad de La Laguna. (revisión febrero 2009)
- [19] Skoog D, *Principios de Análisis Instrumental*, Editorial Mc Graw-Hill. Quinta Edición México. 2001.
- [20] R.F.C. Mantoura, S.W.Wright, S.W. Jeffrey, R.G. Barlow and D.E. Cummings. *Filtration and storage of pigments from microalgae in Phytoplankton Pigments in Oceanography: guidelines to modern methods*. S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright UNESCO Publishing. Paris. 234 (1997).
- [21] S.W.Wright and R.F.C. Mantoura. *Guidelines for collection and pigment analysis of field samples in Phytoplankton Pigments in Oceanography: guidelines to modern methods*. S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 433 (1997).
- [22] Thurman. E.M, Mills. M.S. *Solid Phase Extraction, principles and practice*, Editorial John Wiley & Sons. INC. Volumen 147. New York, United States of America. 1998

-
- [23] Fernando M. Lanças. *Extração em Fase Solida (SPE)*., Editorial RiMa. São Carlos Brasil. 2004.
- [24] Lorenzen C.J. *determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. Limnol.Oceanography*, 1967, 343.
- [25] Humphrey G. F. Jeffrey S.W. *New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, and c, in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol.Pflantzen*, 1975, 191.
- [26] Holm-Hansen O., C.J. Lorenzen. *Fluorometric Determination of Chlorophyll*, J Cons Int Explo Mer, 1965, 3-15.
- [27] Menzel D. W. Yentsch C.S., *Depp-Sea Res*, 1963, 221.
- [28] Ferrer I y col. *Contribución al Desarrollo de un Sistema Portátil para Determinación de Clorofila en Aguas Naturales, Trabajo Especial de Grado, Escuela de Química Facultad de Ciencias, UCV, Caracas Venezuela. 2007.*

9. APÉNDICE

Ecuaciones propuesta por Lorenzen (1967)^[24]:

$$\text{Concentración de Clorofila-a}_{(\mu\text{g/L})} = \frac{\beta k (A^b - A^a) \times v}{V \times l} \quad (3)$$

$$\text{Concentración de Feofitina-a}_{(\mu\text{g/L})} = \frac{\beta k (1.7 \times A^a - A^b) \times v}{V \times l} \quad (4)$$

Donde:

A^b = Absorbancia del extracto a 664 nm antes de acidificar (corregida restando la absorbancia a 750 nm)

A^a = Absorbancia del extracto a 664 nm después de acidificar (corregida restando la absorbancia a 750 nm)

v = Volumen de solvente utilizado en la extracción (en mL)

V = Volumen del filtrado (en Litros)

l = Longitud de paso de la luz a través de la celda (cm)

β = Coeficiente de absorción de la Clorofila a 664 nm: con un valor de 11.0 si el solvente es acetona y un valor de 12.2 si el solvente es etanol

k = Factor de corrección por la acidificación = 2.43

Ecuación denominada *tricromática*, propuesta por Jeffrey y Humprey (1975)^[25]

$$\text{a) } Clo\ a = (11.85(A664) - 1.54(A647) - 0.08(A630)) \nu_e / (V \times l) \quad (5)$$

$$\text{b) } Clo\ b = (21.03(A647) - 5.43(A664) - 2.66(A630)) \nu_e / (V \times l) \quad (6)$$

$$\text{c) } Clo\ c = (24.52(A630) - 7.60(A647) - 1.67(A664)) \nu_e / (V \times l) \quad (7)$$

Donde:

$Clo\ a$, $Clo\ b$ y $Clo\ c$ = concentración de la clorofila a, b y c respectivamente en mg/L.

A664, A630, A647 = Absorbancia corregidas (al restarla con la A750) a las respectivas longitudes de ondas.

ν_e = Volumen de solvente utilizado en la extracción (en mL)

V = Volumen del filtrado (en Litros)

l = Longitud de paso de la luz a través de la celda (cm)

Ecuación desarrollada por Holm-Hanse^{[26][27]}

$$\text{Concentración de Clorofila-a, } (\mu\text{g/L}) = K \times (F_m / (F_m - 1)) \times V_e \times (F_o - F_a) / V_f \quad (8)$$

$$\text{Concentración de Feofitina-a, } (\mu\text{g/L}) = K \times (F_m / (F_m - 1)) \times V_e \times ((F_m \times F_a) - F_o) / V_f \quad (9)$$

Donde:

K = coeficiente de calibración con patrones de Clo ``a``

F_o = intensidad de fluorescencia a 663 nm de la muestra antes de la acidificación

F_a = intensidad de fluorescencia a 663 nm de la muestra después de la acidificación

F_m = relación máxima de ácido (F_o/F_a) de una solución de Clo ``a`` estándar

V_e = Volumen de solvente utilizado en la extracción (en mL)

V_f = Volumen de muestra filtrado (en Litros)