

Determinación Selectiva De Clorofila *a* Por Fluorescencia Molecular

Yosmery Vitta ^a, Alberto Fernández ^a y Pilar Campíns Falcó ^b.

^a Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Laboratorio de Espectroscopia Láser. Paseo Los Ilustres, Urb. Valle Abajo. Apartado Postal 20513. Caracas 1020-A. ^b Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, España.

RESUMEN

Se desarrolló un método fluorométrico de determinación selectiva de la clorofila *a*, Clo *a*, en extractos de muestras de agua de mar, con un límite de detección de $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Se optimizó una metodología simple de extracción de los pigmentos fotosintéticos, utilizando un filtro de membrana de nylon de 13 mm de diámetro y tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$, para la separación del fitoplancton. Para la extracción de los pigmentos se utilizó etanol. Se disminuyó el volumen de muestra (10 mL) y el volumen de extracción (1 mL) en función del tamaño de filtro utilizado. Este procedimiento se validó por el proceso de “spiking” sobre muestras de agua de mar. Se comparó la aplicación de modelos de calibración univariados y multivariados, PLS 1 y PLS2, en la determinación de la recuperación de Clo *a* en muestras “spiked”. En todos los casos se observa que el modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales, PLS1 permitió incrementar la exactitud del análisis, obteniendo porcentajes de recuperación de Clo *a* cercanos al 100%. El modelo de calibración PLS2 para la determinación simultánea de Clo *a* y Clorofila *b*, Clo *b*, resultó ineficiente en la predicción de Clo *a* con un RMSEP del 50%. Este resultado está acorde con lo reportado en la literatura de la sobre-estimación de la Clo *a* en presencia de la Clo *b* por métodos fluorométricos.

Palabras Clave: Fluorescencia molecular, Clorofila *a*, Calibración Multivariada.

ABSTRACT

In this work a selective method for determination of chlorophyll *a*, Chl *a*, on seawater samples by molecular fluorescence has been developed. A detection limit of $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ for Chl *a* was obtained. A methodology of pigments extraction was optimized in this study. The best condition of extraction: 10 mL sample and 1 mL extraction volume, a nylon membrane filter (size pore $0.45 \mu\text{m}$ and 12 mm diameter), were chosen by the results in the Chl *a* and *b* recovery obtained by application of univariate and multivariate calibration model on spiked samples. The partial square least squares regression model PLS1 and PLS2, were applied over extracts from spiked samples and over standard solutions of these chlorophylls. The application of PLS1 model allowed validating the procedure of extraction 1F-0,45 with recovery percentages nearly 100% for a sample volume of 10 ml and extraction volume of 1 mL. Multivariate model were compared with univariate calibration models, in all cases bigger accuracy was obtained by use of PLS1 model. The PLS2 model was less efficient in the simultaneous quantification of Chl *a* and *b*, a poor accuracy was obtained for Chl *a* and the best results in the prediction were obtained for Chl *b*. This result is according with reported previous work, of the overestimation of Clo *a* in presence of Clo *b* by fluorometric methods.

1. INTRODUCCIÓN

La concentración de clorofila *a*, Clo *a*, es el parámetro bioquímico de mayor importancia medido en investigaciones marinas. Esto debido a su carácter indicador de la biomasa del fitoplancton de los océanos y aguas dulcesⁱ. Para la determinación de Clo *a* en sistemas acuáticos se utiliza un protocolo estándar de análisis^{ii,iii}, el cual comienza con la filtración de grandes volúmenes de la muestra, desde 500 a 1000 mL^{ii,iv,v,vi,vii}. Los filtros que suelen utilizarse son filtros de membrana, con un tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$ ^{iv} y filtros de superficie (fibra de vidrio) de dimensiones de orificio entre $0,5$ a $0,7 \mu\text{m}$ ^{ii,iv}.

La etapa siguiente, es la extracción de los pigmentos en solventes químicamente compatibles, generalmente 90% acetona acuosa para agua de mar y etanol acuoso al 95% en el análisis de muestras de agua dulce o de reservorios^{ii,iii}. En

muchos casos, la extracción no es completa hasta que se produce una ruptura total de la pared celular de las algasⁱⁱⁱ, en consecuencia es común el uso de procesos mecánicos tales como molienda, maceración, ultrasonido, extracción sólido-líquido, etc., que facilite la ruptura de las células. El último paso del protocolo de análisis es la cuantificación de la Clo *a* en el extracto de muestra, bien sea por técnicas espectroscópicas o mediante cromatografía líquida de alta resolución, HPLC^{viii,ix}.

En la cuantificación de la Clo *a* mediante técnicas espectroscópicas se ha reportado una muy pobre exactitudⁱⁱ; esto debido a la similitud entre el espectro de absorción y fluorescencia molecular de los principales tipos de clorofilas (a, b y c) y sus productos de degradación y de otros pigmentos presentes en muestras acuáticas. Sin embargo, ciertas ventajas de estas técnicas tales como: sencillez, rapidez, disponer de pocos estándares de calibración, etc han permitido que estas prevalezcan con respecto a las técnicas cromatográficas, las cuales requieren de equipos más sofisticados, mayor tiempo de análisis y que son más costosas.

Más recientemente, se ha explorado el uso de la calibración multivariante (CM), como una alternativa en la determinación simultánea de clorofila y sus correspondientes feopigmentos por técnicas espectroscópicas, esto de forma de resolver la falta de selectividad de estas técnicas sobre mezclas complejas y en consecuencia mejorar la exactitud en la cuantificación de este analito. Esos estudios han reportado que diversos algoritmos de la CM, tales como regresión sobre componentes principales (PCR), mínimos cuadrados clásicos (CLS), la Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS1 Y PLS2) y las redes neuronales artificiales (ANN), permiten mejorar la capacidad predictiva de la Clo *a* en comparación con su determinación por métodos espectroscópicos clásicos^{x,xi,xii}.

Debido a que gran parte de las desventajas presentes en el proceso de determinación de Clo *a* en sistemas acuáticos : riesgos de contaminación, transformación y pérdida del analito, largos tiempo de análisis, etc; son consecuencia del proceso clásico de extracción se debe proponer entonces una nueva metodología experimental que permita solventar las limitaciones de este análisis. Una metodología ideal sería aquella en que se disminuya el número de etapa de análisis, se preserve la integridad de los pigmentos y una alta exactitud sea obtenida. En este sentido, en este trabajo se plantea desarrollar un método de extracción rápido, simple y reproducible de la Clo *a* y Clo *b* desde muestras acuáticas y su posterior cuantificación mediante fluorescencia molecular en conjunto con la aplicación de modelos estadísticos de CM. Esto último se realizó con el propósito de incrementar la exactitud del análisis. Para validar la eficiencia del método propuesto se evaluará los porcentajes de recuperación de la Clo *a* en muestras de agua de mar contaminadas con este analito.

2. EXPERIMENTAL

Reactivos y Soluciones

Soluciones estándares de Clo *a* de 45,2 mg L⁻¹ y Clo *b* de 144 mg L⁻¹ fueron preparadas por disolución del contenidos del reactivo sólido puro (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) en etanol grado HPLC (Fluka, Suiza). Estas soluciones fueron refrigeradas a 4°C en un frasco ámbar de 1,0 mL envuelto en papel de aluminio, esto para proteger la solución de las luz y así disminuir el riesgo de descomposición. Las soluciones de calibración fueron preparadas en etanol, por dilución diaria de las soluciones estándares. Estas estuvieron en un intervalo de concentración de 100-1000 µg L⁻¹.

Muestras

Muestras de agua de mar fueron obtenidas desde playas de diferentes regiones de la Comunidad de Valencia- España. Estas regiones fueron el Paseo marítimo y Perelló. También fueron colectadas muestras desde un reservorio de agua dulce de la facultad de Química de la universidad de Valencia, Burjassot, España. El muestreo se llevo a cabo entre los meses de Abril y Mayo del 2007. Las muestras fueron colocadas en botellas plásticas de 1 L y almacenadas a 5 °C previo a su análisis.

2.3 Aparatos

Se utilizó un fluorímetro Hitachi F4500 (Instrumentos Hitachi Inc Tokio, Japón). Las longitudes de onda de excitación fueron de 430 y 460 nm para la Clo *a* y Clo *b* respectivamente. La emisión de radiación de fluorescencia se registró entre

600 a 800nm, con un incremento de 2 nm. Los anchos de banda de excitación y de emisión utilizados fueron de 10 nm. La velocidad del barrido fue de 12000 nm / min. El detector del instrumento fue un PMT, a un voltaje de 950 V.

2.4 Metodología

2.4.1 Evaluación Del Método Fluorométrico

Se evaluó la eficiencia analítica del método fluorométrico utilizado en la determinación de las clorofilas (a y b). Para ello inicialmente se obtienen los espectros de disoluciones puras de estas clorofilas, disueltas en etanol. Esto permitió escoger las mejores condiciones de excitación y emisión de cada clorofila. Posteriormente, se aplicó el modelo de calibración univariada de curva de calibración externa (CCE), mediante regresión lineal por ajuste de mínimos cuadrados entre las intensidades de fluorescencias y la concentración de soluciones de los estándares de calibración. Las soluciones utilizadas en la calibración univariada, se prepararon en etanol, en un intervalo de concentración entre 0-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.4.2 Extracción del Pigmento

Se realizaron múltiples ensayos previos para el procedimiento de extracción de las clorofilas desde las muestras y se obtuvieron los mejores resultados al utilizar los siguientes procedimientos:

- ◆ Procedimiento 1F-0,45.
- ◆ Procedimiento 2 SPE C-18.

Procedimiento 1F-0,45: Se filtraron 10 mL de muestra a través de una membrana de nylon con tamaño de poro de 0,45 μm y diámetro de 13 mm (Magna, Osmonic INC). Los filtros fueron transferidos dentro de frascos ámbar (5 mL), los cuales contenían 1 mL de etanol. Se agitó suavemente la solución y se dejó reposar por cinco minutos, para luego realizar de forma inmediata la medición de la señal analítica de fluorescencia molecular.

Procedimiento 2 SPE C-18: se hacen pasar diferentes volúmenes de muestra a través de un cartucho de extracción de fase sólida C-18, donde son retenidos los organismos de fitoplancton y luego se realiza la elusión de los pigmentos con volúmenes variables de etanol. Múltiples ensayos fueron realizados en este procedimiento, obteniendo los mejores resultados cuando se utilizan 10 mL de muestra y 1 mL de etanol.

Todas las operaciones experimentales fueron realizadas en la oscuridad, para evitar la posible foto-oxidación de los pigmentos. Finalmente, los extractos de muestras obtenidos por ambos procedimientos de extracción, fueron analizados de forma inmediata.

2.4.3 Estudios de Recuperación de la Clo a y la Clo b en las muestras.

Inicialmente se realizó la identificación cualitativa de las clorofilas (a y b) en las muestras, se realizó por comparación entre los espectros fluorescencia de los extractos de las muestras contaminadas y la muestra original con los espectros de soluciones estándares de estas clorofilas en etanol. Posteriormente se realizó una evaluación global del procedimiento de separación del fitoplancton y extracción de las clorofilas a y b desde las muestras, de manera de validar la exactitud del método de extracción propuesto. Dado la alta reactividad de la clorofila y su tendencia a transformarse en sus derivados, no se disponen de estándares de referencia certificados que permitan realizar la validación de un método experimental. En estos casos, la IUPAC^{xiii} recomienda el uso del método de enriquecimiento de las muestras para realizar dicha validación. La exactitud del método se expresa entonces como el porcentaje de recuperación. En nuestro estudio, varias réplicas de 10 mL de las muestras de agua fueron enriquecidas con cantidades conocidas de las clorofilas (a y b), se aplicó el método de extracción y posteriormente se analizaron los extractos obtenidos. El mismo procedimiento se llevó a cabo en réplicas de muestras sin enriquecer, esto para corregir la señal analítica de los pigmentos extraídos desde las muestras enriquecidas, con respecto a la cantidad original de estos en la muestra. El porcentaje de recuperación se determinó por comparación entre la intensidad de fluorescencia (a la longitud de onda de máxima emisión) del extracto con la señal obtenida desde una solución estándar de la clorofila disuelta en etanol.

2.4.4 Análisis Multivariado

En este estudio, se exploró el uso de los modelos de Calibración Multivariante, CM, de regresión de mínimos cuadrados parciales, PLS1 y PLS2, para el análisis multivariable de las señales de fluorescencia obtenidas desde diferentes modelos de calibración planteados en este estudio. Dichos modelos de CM fueron aplicados en los estudios de recuperación de las clorofilas (a y b) en las muestras enriquecidas y fueron comparados con el modelo CCE, esto con el propósito de forma de validar la exactitud del método de extracción propuesto.

2.4.4.1 Estándares de Calibración Multivariante

Cuatro conjuntos de calibración fueron establecidos para el análisis multivariado. En la tabla 1, se presenta la composición de los conjuntos de calibración utilizados. El primer conjunto de calibración, c1 a c4, se construyó con soluciones uni-componentes de las clorofilas (a y b) disueltas en etanol. El segundo conjunto de calibración, e1 a e4, se construyó con extractos en etanol obtenidos mediante el método de extracción 2SPE c-18, desde muestras contaminadas con Clo a y Clo b, ver sección 2.4.2. De igual forma se plantea un tercer conjunto de calibración, desde e1 a e4, sobre extractos en etanol obtenidos por el procedimiento 1F-0.45, desde muestras contaminadas con cantidades conocidas de Clo a. El cuarto conjunto de calibración consistió de siete soluciones estándares (m1 a m7) de las clorofilas en etanol.

Tabla 1 Conjunto de Muestras de Calibración, utilizada para la aplicación del modelo PLS1

Muestras de calibración	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Clo a	Clo b
c1	0	0
c2	10	25
c3	25	50
c4	50	100
e1	1,96	9,9
e2	3,85	19,6
e3	5,66	29,1
e4	7,41	38,0
m1	0	0
m2	10	0
m3	25	0
m4	50	0
m5	0	25
m6	0	50
m7	0	100

2.4.4.2 Aplicación de los Modelos de CM

El planteamiento de los conjuntos de calibración anteriores, se realizó con la finalidad de establecer tres modelos de calibración PLS1, el primero: denominado (PLS1I), se aplicó sobre el conjunto de calibración c1 a c4. En el segundo modelo, PLS1II, se aplicó de forma individual a las clorofilas (a y b), del conjunto de calibración de e1 a e4. El tercer modelo de calibración PLS1III, se aplicó sobre el conjunto de calibración establecido sólo para la Clo a, e1 a e4. En la validación del modelo PLS1I se utilizó el conjunto e1 a e4. En los modelos PLS1II y PLS1III el conjunto de validación consistió de las soluciones c1 a c4. El modelo calibración PLS2 fue aplicado sobre el conjunto de calibración m1 a m7. La estimación y ajuste de los modelos multivariados se realizó utilizando los siguientes parámetros estadísticos: (uno) el error promedio cuadrado de calibración (RMSEC), para evaluar el ajuste del modelo a los datos de calibración, (dos) la estimación del error de validación cruzada (RMSECV), para realizar la validación interna del modelo y (tres) el error relativo de predicción (RMSEP) para evaluar la capacidad predictiva del modelo sobre muestras de validación independientes. La similitud entre la magnitud del error de calibración y los errores de validación, indicará la robustez de los modelos.

3. RESULTADOS

Evaluación Del Método Fluorométrico

En las figuras 1 a y 1b, se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos para soluciones de Clo *a* y Clo *b* (500 µg L⁻¹) disueltas en etanol. Se utilizó un intervalo de longitudes de excitación (λ_{exc}) entre 420 y 460 nm. Se observó que la máxima intensidad de fluorescencia se obtiene a una longitud de onda de emisión (λ_{emis}) de 670nm para la Clo *a* y 660 nm para la Clo *b*. Las longitudes de ondas óptimas de excitación para la Clo *a* y Clo *b*, fueron de 430 nm y 460 nm, respectivamente.

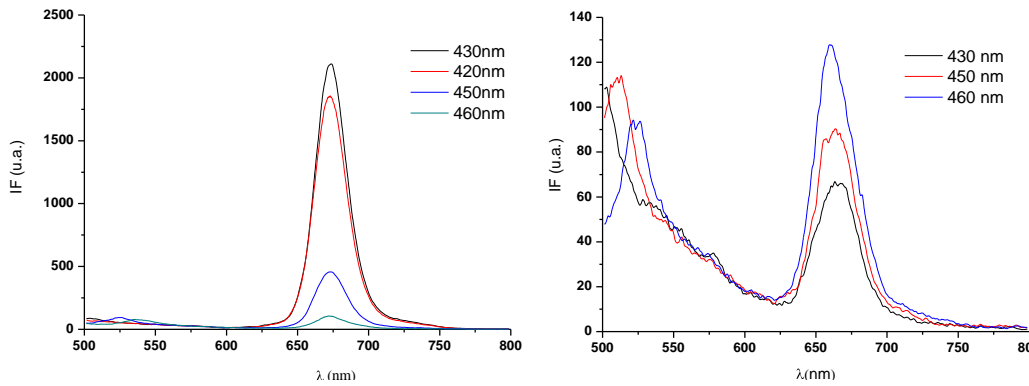


Figura 1. Espectros de Fluorescencia obtenidos con un intervalo de longitudes de excitación (λ_{exc}) entre 420 y 460 nm para : soluciones de a) Clo *a* y b) Clo *b* de 500 ppb disueltas en etanol.

La linealidad entre la señal de fluorescencia y la concentración de soluciones de Clo *a* y Clo *b*, (100 - 1000 µg L⁻¹), fue determinada por regresión de mínimos cuadrados a la λ_{emis} óptima de cada clorofila. En la tabla 2, se presentan los parámetros analíticos de la curva de calibración de cada clorofila. Se observa una mayor sensibilidad en la determinación de las Clo *a* respecto a la Clo *b*, esto según los valores de pendiente (b) y límites de detección (Lods) obtenidos. La mayor sensibilidad en la detección por fluorescencia de la Clo *a*, se explica ya que esta posee un rendimiento cuántico absoluto (0.32), superior al de la Clo *b* (0.117)^{xiv}.

Tabla 2. Parámetros de regresión lineal de la Clo *a* y la Clo *b*

ANALITO	λ_{EXC} (NM)	λ_{EMIS} (NM)	M (µG ⁻¹ L)	B ₀	S _{Y/X}	LOD (µG L ⁻¹)	INTERVALO DINÁMICO LINEAR (µG L ⁻¹)	R ²
CLO A	430	670	4,77± 0.02	31 ± 21	28	18	60 A 500	0.9995
CLO B	460	660	0,33 ±0.02	14 ± 5	6,63	60	200 A 500	0.9940

Los resultados anteriores, demuestran que es posible realizar la determinación selectiva de la Clo *a* en presencia de Clo *b*; a la λ_{exc} de 430nm. Esto debido a que a esta longitud de onda, se obtiene una elevada sensibilidad de la Clo *a* y se desfavorece la excitación de la Clo *b*, con la que esta última no interfiere de forma significativa. Esto es un aporte significativo en este tipo de análisis, ya que la principal fuente de error en los métodos clásicos de cuantificación de Clo *a* por fluorescencia molecular es la interferencia causada por la Clo *b*^{xv,xvi,xvii}. Este resultado esta acorde con lo reportado por Welschmeyer^{xviii}, el cual propuso un método fluorométrico para la determinación selectiva de la Clo *a* en presencia de Clo *b* y de sus feo-pigmentos.

Estudios de Recuperación de las Clorofilas *a* y *b* en las muestras.

Para evaluar la eficiencia del método de extracción propuesto se determinó el porcentaje de recuperación (% Rec) de las clorofilas *a* y *b* en las muestras. Se alcanzó un elevado porcentaje de recuperación de la Clo *a*, 105%, mientras que éste porcentaje no se pudo determinar para la Clo *b*, ya que no se logró la extracción de ésta. Estos resultados pueden ser explicados si se analizan los espectros de fluorescencia de los extractos de las muestras original y enriquecidas con ambas clorofilas (a,b), solapados con los espectros de soluciones estándares, ver figura 2. En la figura 2a, se observa la

coincidencia en los espectros del extracto de muestra enriquecida con Clo *a* y su solución estándar; con lo cual se evidencia que la metodología experimental propuesta fue eficiente en la extracción de la Clo *a* en las muestras, sin evidencia aparente de presencia de errores sistemáticos. Por el contrario el procedimiento no resulta adecuado en la extracción de la Clo *b*, ya que no se observó el máximo de emisión característico de esta clorofila, 660 nm, en el espectro del extracto de muestra enriquecida, ver figura 2 b .

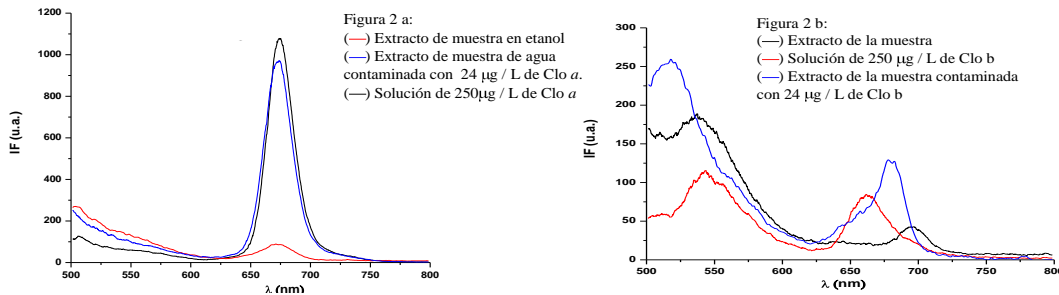


Figura 2 Espectros de Fluorescencia obtenidos a) una λ_{exc} de 430nm y b) una λ_{exc} a 460nm

3.3 Modelos de Calibración Multivariados

3.3.1 Regresión y Validación

En la tabla 3, se presentan los parámetros estadísticos obtenidos por aplicación de los modelos PLS. Fueron aplicados dos métodos de pre-procesamiento de los datos de calibración: la no transformación y centrado de columna, este último método fue la mejor opción para todos los modelos. El procedimiento de validación cruzada interna fue utilizado para determinar el número óptimo de los componentes principales (CPs). Todos los modelos de calibración PLS 1, fueron ajustados con un solo CP, mientras que el modelo PLS2 se ajustó con 2 CPs en ambas clorofilas, se evidencia entonces la linealidad de los modelos.

Tabla 3 Parámetros estadísticos de los modelos PLSI y PLSII de soluciones de Clo *a* y Clo *b*.

Parámetros de Regresión	PLSI I		PLSI II		PLSI III	PLS 2	
	Clo <i>a</i>	Clo <i>b</i>	Clo <i>a</i>	Clo <i>b</i>	Clo <i>a</i>	Clo <i>a</i>	Clo <i>b</i>
PC	1	1	1	2	1	2	2
R ² Calibración	0,9997	0,9965	0,9963	0,9971	0,9963	0,9982	0,9870
R ² Validación	0,9990	0,9877	0,9821	0,9410	0,9821	0,9892	0,9519
RMSEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,82	1,58	0,18	1,02	0,18	1,05	6,33
RMSECV ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,02	3,12	0,44	4,62	0,44	2,91	17,36
RMSEP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,10	3,05	0,43	2,35	0,33	6,19	11,54
RMSEP (%)	10	8	13	12	-	21	31
Pre-procesamiento de los datos	Centrado en Columna						

Un análisis de varianza fue llevado a cabo, para comparar la influencia de los modelos PLS sobre los errores RMSEC, RMSECV y RMSEP. Se aplicó previamente la prueba de homogeneidad de las varianzas de Levene, se obtuvo en todos los casos que el estadístico de Levene fue inferior al valor crítico a un nivel de confianza del 95% ($F_{2,6} = 5, 14$). Por lo tanto, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los errores de cada modelo. En el análisis de varianza los valores de F calculados para la Clo *a* fueron de RMSEC: 5239, RMSECV: 23764, y RMSEP: 37999. Se observa que en todos los casos valores de F calculados, mayores al valor crítico a un 95% de confianza ($F_{0,05,2,6}=5,14$).

Debido a que hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los errores de predicción de los modelos de calibración, se aplicó el método comparación múltiple de la diferencia mínima estadística (LSD), para evaluar las diferencias significativas entre los errores de cada modelo de calibración. Para la Clo *a*, se obtiene que el error de calibración y los errores de ambas formas de validación del modelo PLS1 I y PLS2, presentan diferencias

significativas con respecto a los modelos PLS1 II y PLS1III. Mientras que para estos dos últimos modelos, los errores no difieren entre sí entre un modelo u otro, por tanto su capacidad de predicción es equivalente. Resultados similares se obtienen al comparar los modelos de calibración PLS1I y PLS1II con respecto a la Clo *b*, el ANOVA mostró que en todos los casos los valores de F calculados son superiores al valor crítico a un nivel de significancia del 95% $F_{(0,05,1,4)}=7,71$. Estos resultados indican que para la predicción de la Clo *b*, los dos modelos de calibración PLS1I y PLS1II ya que presentan los errores de menor magnitud.

3.3.2 Aplicación de modelo PLS1 I.

En la tabla 4, se presenta la concentraciones de Clo *a* y Clo *b*, suministradas por los modelos de calibración: CCE y PLS1I y se comparan con los valores de concentración añadidos sobre las muestras. En todos los casos, el modelo PLS1I presenta mayor exactitud en la cuantificación de la concentración de las clorofilas (a y b) con respecto al modelo CCE. Esto se evidencia por la similitud entre los valores predichos y los valores de referencia suministrados por el modelo multivariado, mientras que para el modelo CCE se observa que estos valores presentan mayor diferencia entre sí. Como era de esperarse, elevados porcentajes de recuperación tanto con el método 1F-0.45 como con el método SPE C-18, fueron obtenidos con el modelo PLS1I en ambas clorofilas. Mientras que en el modelo CCE dichos porcentajes fueron más bajos.

Tabla 4 Predicción de Clo *a* y Clo *b* en muestras de agua de mar, por los modelos de CCE y PLS1I.

Método	Analito	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Porcentaje de Recuperación (%)	
		Referencia	Determinada		CCE	PLS1I
			CCE	PLS1I		
1F-0.45	Clo <i>a</i>	1,96 ± 0,20	1,50 ± 0,20	1,94 ± 0,50	77	99
		3,85 ± 0,50	3,27 ± 0,90	4,19 ± 0,80	85	109
		5,66 ± 0,70	4,62 ± 1,70	5,47 ± 1,60	82	97
SPE C-18	Clo <i>a</i>	7,41 ± 1,00	6,39 ± 2,10	7,20 ± 2,10	86	97
		0,99 ± 0,10	1,27 ± 0,45	0,94 ± 0,30	128	95
		3,85 ± 0,35	3,45 ± 1,15	3,87 ± 1,05	90	101
	Clo <i>b</i>	5,66 ± 0,60	4,24 ± 2,20	5,06 ± 2,08	75	89
		9,90 ± 1,15	14,16 ± 4,10	11,20 ± 3,20	143	113
		19,60 ± 2,15	20,58 ± 7,20	20,20 ± 6,19	105	103
		38,46 ± 4,10	32,45 ± 12,30	35,47 ± 11,14	111	92
		47,61 ± 5,06	39,31 ± 13,15	44,87 ± 12,83	83	94

Los resultados obtenidos en la predicción de la concentración de ambas clorofilas, demuestran que la aplicación del modelo multivariado de PLS1, incrementa la exactitud de la determinación, siendo este capaz de modelar cualquier contribución a la señal analítica de los interferentes que puedan estar presentes en la muestra. Por otro lado, los resultados obtenidos en la cuantificación de Clo *a* por ambos modelos de calibración, indican una alta eficiencia en los procesos de separación del fitoplancton y la extracción de la clorofila en etanol, mediante el método 1F-0,45 μm . Mientras que por el método SPE C-18, se evidencia la presencia de errores sistemáticos que afectan la exactitud del análisis.

3.2.3 Aplicación del modelo PLS1II en la determinación de las Clorofilas a y b en las muestras.

Los modelos PLS1II y PLS2 fueron aplicados sobre cuatro muestras enriquecidas con ambas clorofilas, *a* y *b*, a diferentes concentraciones. Se usó el método de extracción SPE C-18. En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos en la predicción de las clorofilas. Una elevada exactitud fue alcanzada en la determinación selectiva de ambas clorofilas con el modelo PLS1II, aun cuando la cuantificación se realizó en muestras que contenían mezclas de ambos analitos. La cuantificación individual de estas clorofilas mediante el modelo univariado de CCE sería inexacta, debido a la presencia de interferencias espectrales entre los analitos y por tanto una separación previa de los componentes es requerida. No obstante, mediante la aplicación del modelo multivariado esto no fue necesario.

Tabla 5 Predicción de Clo *a* y Clo *b* utilizando los modelos PLS1II y PLS2, en muestras analizadas por el método SPE C-18.

Muestras	Concentración Clo <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Concentración Clo <i>b</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	Referencia	Determinada		Referencia	Determinada	
		PLS1 II	PLS 2		PLS1 II	PLS 2
1	2,91 \pm 0,20	2,92 \pm 0,51	1,81 \pm 0,35	14,78 \pm 3,20	20,91 \pm 3,15	1,94 \pm 0,50
2	4,76 \pm 0,50	5,05 \pm 0,82	3,40 \pm 0,60	24,39 \pm 4,05	27,49 \pm 3,95	4,19 \pm 0,80
3	2,44 \pm 0,70	3,24 \pm 0,76	-	33,82 \pm 6,30	31,31 \pm 5,75	5,47 \pm 1,60
4	7,41 \pm 1	-	-	43,06 \pm 7,25	45,54 \pm 6,85	7,20 \pm 2,10

El modelo PLS2 fue capaz de predecir adecuadamente la concentración de la Clo *b*, esto dado la similitud entre los valores predichos y los valores de referencia, con un valor de RMSEP del 15%. Mientras que en la cuantificación de la Clo *a*, este modelo presentó una pobre capacidad predictiva, ya que solo se realizó la determinación en dos muestras, con un valor del RMSEP del 47%. Este resultado esta acorde con resultados previos reportados en la literatura, sobre una baja exactitud en la determinación por fluorescencia de la Clo *a* en presencia de la Clo *b*ⁱⁱ.

3.4.5 Aplicación del modelo PLS1III en la determinación de Clo *a*.

El modelo PLS1III se aplicó para evaluar la exactitud del método 1F-0,45 en la extracción de Clo *a* en dos muestras de agua de mar, provenientes de diferentes playas, enriquecidas con esta clorofila y una tercera muestra de agua de reservorio filtrada previamente con un filtro de 8 μm . Se aplicó el método 1F-0,45. Cada una de las muestras se enriqueció con 23,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Clo *a*. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6 Predicción de Clo *a*, utilizando el modelo PLS1III en diferentes tipos de muestras analizadas por el método 1F-0,45

Muestras	Concentración determinada de Clo <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Porcentaje de Recuperación (%)
	Muestra	Muestra con 23,8 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Agua de Mar 1	0,9 \pm 0,2	20,54 \pm 1,90	86
Agua de Mar 2	1,7 \pm 0,6	19,33 \pm 1,27	81
Agua de Reservorio	0,49 \pm 0,03	21,24 \pm 5,04	89

En todos los casos, la concentración de Clo *a* determinada estuvo cercana a los valores de referencia, independientemente del tipo de muestra, con porcentajes de recuperación entre 81 y 89%. En consecuencia no fueron encontrados efectos de matriz en las muestras y por tanto se validó el método 1F-0,45.

4. DISCUSIÓN

La excelente eficiencia en la recuperación de Clo *a* en las muestras, utilizando el método 1F-0,45, se atribuye al mecanismo por el cual se presume que se llevo a cabo la extracción de los pigmentos. Esto es, inicialmente la membrana de nylon posee un tamaño de poro de 0,45 μm suficientemente pequeño para retener en su totalidad las especies del

fitoplancton, posteriormente este filtro por ser químicamente compatible con el etanol se disuelve en este solvente. Durante esta etapa el etanol posee el suficiente poder de penetración en la pared celular de las algas para producir la destrucción de aquellas y de esta forma lograr la extracción total del pigmento; que es lo que se demuestra con los altos porcentajes de recuperación obtenidos, cercanos al 100%. Por esta razón, el uso de procedimientos físicos utilizados en la destrucción de la pared celular de las algasⁱⁱⁱ, tales como sumergir el filtro en el solvente por determinados períodos de tiempo “soaking”, la trituración mecánica mediante mortero “grinding” y la aplicación de ultrasonido “sonication” no fue necesario en nuestro estudio. La supresión de dichos procedimientos conlleva a una serie de ventajas en el tratamiento de la muestra: se disminuye los riesgos de pérdida y contaminación de la muestra, se evita la posibilidad de degradación de los pigmentos y se disminuye el tiempo de análisis. De igual forma, nuestra metodología cumple con los criterios establecidos por el grupo de trabajo SCOR 78, para las técnicas de extracción del fitoplanctonⁱⁱⁱ. Esto es fidelidad: los pigmentos no son alterados durante el proceso, la compatibilidad: el solvente debe ser compatible con el método de análisis de las muestras, precisión: el proceso debe ser repetible y la seguridad: el solvente debe tener baja toxicidad.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la recuperación de la Clo a y la Clo b por el procedimiento SPE C-18 sobre las muestras contaminadas indican una baja eficiencia de extracción de los pigmentos mediante aquel. Esto se explica debido a que el mecanismo de extracción de los pigmentos con el procedimiento SPE C-18 fue diferente al método 1F-0,45. En este proceso, el cartucho de extracción con fase C-18, actúa como un filtro de fibra de vidrio, donde las partículas se retienen sobre su superficie y a lo largo de los espacios internos del filtro^{iv}, en nuestro caso el fitoplancton de las muestras se retendrá a lo largo del volumen interno del cartucho. Además una adsorción selectiva de las clorofilas se produce sobre la fase C-18 y diferentes formas de interacción entre el analito y la fase estacionaria pueden llevarse a cabo. Por esta razón, el mecanismo de elusión con etanol es diferente al que se da en los filtros de nylon. El etanol además de penetrar la pared celular de las algas, debe ser capaz de realizar la elusión de todos los pigmentos contenidos en el fitoplancton que se encuentra adsorbido a lo largo del cartucho de extracción. Es de esperar entonces que esta metodología se encuentre más afectada por interferencias de matriz que cuando se utilizan filtros de nylon, que son superficiales, es decir, las partículas se retienen sobre la superficie del filtro y además estos suelen disolverse en el solvente de extracción. Los mejores resultados en la predicción de las clorofilas sobre las muestras analizadas con este método, fueron los obtenidos mediante la aplicación de los modelos de calibración multivariante. Esto debido a que dichos modelos permiten compensar la influencia de los errores sistemáticos en la extracción de estos analitos y mejorar la exactitud del análisis. De igual forma, la aplicación de dichos modelos permitió validar la exactitud del método 1F-0,45 en la extracción de Clo a en muestras de agua de mar.

Otro aporte importante de nuestra metodología experimental, es la drástica reducción en el volumen de muestra utilizado para la filtración en comparación con los procedimientos clásicos de extracción de pigmentos. El volumen de filtración para análisis de fitoplancton se escoge según el método de análisis de los pigmentos y de la biomasa de fitoplancton se estima contenga el agua a analizar. En base a estas premisas se utilizan diferentes volúmenes de filtración, en el método 445 de la EPA^{xvii}, el volumen de filtración es de 4 L para aguas de océanos abiertos y de 1L o menos para lagos o aguas de estuarios. En el protocolo de la JFGOS^{xix} sugieren utilizar volúmenes de muestras entre 0,1 a 0,5 L en aguas oligotróficas para ser analizadas por fluorescencia, la NASA^{xx} en sus protocolos de análisis para la determinación fluorométrica de la Clo “a” sugiere volúmenes de filtración de 0,5 a 1 L para aguas oligotróficas, 0,2 a 0,5 litros para aguas mesotróficas y 0,1 L y menos para aguas eutróficas. En los procedimientos estándar para determinación de Clo “a” por métodos espectroscópicos del ICES^{xxi}, sugiere un volumen de filtración de 0,25 L para análisis fluorométrico. Se observa que en todos los protocolos estándar de determinación de la Clo “a” en muestras de agua por análisis por fluorescencia se requiere el gasto de elevados volúmenes de muestras para la filtración. En nuestro análisis el volumen de muestra fue de 10 mL, esto implica una notable disminución con respecto al volumen mínimo requerido que comúnmente es de 0,1 L. Evidentemente la cantidad de muestra no representa una limitación en nuestra metodología, cuando ésta no se dispone en grandes cantidades.

5. CONCLUSIÓN

Se desarrolló un método rápido, simple y barato para la determinación selectiva de la Clo a por fluorescencia molecular en muestras de agua de mar, alcanzando un límite de detección de $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$. Mediante la aplicación de los modelos de calibración multivariados, se obtuvo que el mejor procedimiento de extracción fue el método 1F-0,45. Una elevada eficiencia en la extracción de la Clo a fue alcanzada, con porcentajes de recuperación cercanos al 100%. Mientras que el procedimiento 2SPE C-18, suministró una pobre exactitud en la determinación de las clorofilas a y b en las muestras. Esto debido a que una elevada retención de los pigmentos se dio sobre la fase estacionaria de cartucho

de SPE y una baja eficiencia en la elusión de aquellos tuvo lugar. La aplicación del modelo PLS1 suministró en todos los casos, un incremento en la exactitud de la predicción de la concentración de la Clo *a*. El modelo PLS2 fue ineficiente en la determinación simultánea de las clorofilas *a* y *b*, esto según los altos valores de RMSEP. Este resultado está acorde con lo reportado en la literatura sobre la sub-estimación de la Clo *a* en presencia de la Clo *b* mediante métodos fluorométricos.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento suministrado, por el departamento de química analítica de la Universidad de Valencia España, para el desarrollo de este trabajo.

7. REFERENCIAS

-
- ⁱ S.W. Jeffrey and R.F.C. Mantoura. Development of pigments methods for oceanography: SCOR-supported Working Groups and objectives in *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods*. S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 19-21. (1997).
- ⁱⁱ Standard methods for the examination of Water and Wastewater, 19th Edition, Section 10200 H, APHA, AWWA, WPCF, Washington. (1995).
- ⁱⁱⁱ S.W.Wright , S.W. Jeffrey and R.F.C. Mantoura. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction in *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods*. S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 264-268. (1997).
- ^{iv} 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).
- ^v Joint Global Ocean Flux Study. Protocols for the join global ocean flux study core measurements. *Intergovernmental Oceanographic Commision, SCOR, Manual and Guides, Unesco, 29*, 91-96. (1994).
- ^{vi} A. Aminot and F. Rey. Determination of chlorophyll *a* by spectroscopic methods. International Council for the Exploration of the Sea (*ICES*) *Techniques in Marine Environmental Sciences*, 4 (1999).
- ^{vii} C. Trees, R. Bidigare, D.M. Karl and L. Van Heukelem. Fluorometric Chlorophyll *a*: Sampling, Laboratory Methods, and Data Analysis Protocols. *Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation Revision2. National Aeronautical and Space administration NASA/TM-2000-209966*. 162. (2000).
- ^{viii} J.K. Abaychi and J.P. Riley. The determination of Phytoplankton Pigments by high-performance liquid chromatography. *Analytical Chim. Acta 107, 1*. (1979).
- ^{ix} R.F.C. Mantoura and C.A. Llewellyn. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta 151*, 297. (1983).
- ^x L. Moberg, B. Karlberg, S. Bloqvist, U. Larsson. Comparison Between a New Application of Multivariate Regression and Current Spectroscopy Methods for the Determination of Chlorophylls and Their Corresponding Pheopigments. *Analytica Chimica Acta 411*, 137-143. (2000).
- ^{xi} L. Moberg, G. Robertsson and B. Karlberg, Spectrofluorimetric Determination of Chlorophylls and Pheopigments Using Parallel Factor Analysis," *Talanta 54* , 161-170 (2001).
- ^{xii} L. Moberg and B.Karlberg. Validation of a Multivariate Calibration Method for the Determination of Chlorophyll *a*, *b* and *c* and Their Corresponding Pheopigments. *Analytica Chimica Acta 450*, 143-153. (2001).

-
-
- ^{xiii} IUPAC. Harmonized Guidelines for the In-House Validation Of Methods Of Analysis. TECHNICAL REPORT. Budapest.
- ^{xiv} G. Weber and F. W. J. Teale. Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions. *Trans. Far. Trans.*, 53, 646-655, (1957).
- ^{xv} C.J. Lorenzen. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanography*. 12, 343. (1967).
- ^{xvi} O.Holm-Hansen, C.J. Lorenzen, R. W. Holmes and J. Strickland. Fluorometric Determination of Chlorophyll. *J.Cons. Cons. Perma. Int.Explo.Me*, 3-15. (1965).
- ^{xvii} E. Arar and G. Collins. In Vitro Determination of Chlorophyll "a" and Pheophytin "a" in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence, Method EPA 445.0. 2 ed. EEUU: EPA. (1992).
- ^{xviii} Welschmeyer N. A, Fluorometric Analysis of Chlorophyll a in the Presence of Chlorophyll b and Pheopigments, *Limnol.Oceanography*, 38. 1985-1992. (1994).
- ^{xix} Joint Global Ocean Flux Study. Protocols for the joint global ocean flux study core measurements. Intergovernmental Oceanographic Commission, SCOR, Manual and Guides, Unesco, 29, 91-96. (1994).
- ^{xx} C. Trees, R. Bidigare, D.M. Karl and L. Van Heukelem. Fluorometric Chlorophyll a: Sampling, Laboratory Methods, and Data Analysis Protocols. Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation Revision2. National Aeronautical and Space administration NASA/TM-2000-209966. 162. (2000).
- ^{xxi} A. Aminot and F. Rey. Determination of chlorophyll a by spectroscopic methods. *International Council for the Exploration of the Sea (ICES) Techniques in Marine Environmental Sciences*, 4 (1999).