

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DESARROLLO DEL METODO PARA LA CUANTIFICACION DE LA
CLOROFILA-a EN MUESTRAS DE AGUA, POR ESPECTROSCOPIA
ULTRAVIOLETA VISIBLE

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
SABRINA MONGE PINEDA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE, 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LIC. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL:

CALIDAD AMBIENTAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez.

**COORDINADOR DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

DOCENTES ASESORAS

Licda. Rosa Mirian Rivas de Lara

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** en primer lugar, por darme la sabiduría y entendimiento para realizar este trabajo y por estar a mi lado guiando y guardando mi vida en todo momento, porque a él debo todo lo que tengo y lo que soy.

A mis queridos **padres** Juan Monge y Doris Pineda, por todas sus oraciones y consejos, por esas palabras de aliento en los momentos difíciles y porque a ellos debo todo lo que soy, porque siempre me han impulsado a seguir adelante. También a mi **hermano**, Noel Monge, por ayudarme a culminar esta carrera y por estar a mi lado siempre.

A mis **docentes asesores**, Lic. Rosa Mirian Rivas de Lara y Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo, por ser excelentes docentes asesores y depositar su confianza en mí para realizar este trabajo de graduación y por dedicarme parte de su tiempo para asesorarme en todo el proceso de la realización de este trabajo.

A mis **amigos**, Karen Villatoro y Eva Marticorena por estar conmigo en las buenas y en las malas, por sus consejos y su apoyo incondicional.

Sabrina Monge Pineda

DEDICATORIAS

A **Dios** todo poderoso, por ser mi fiel amigo y ayudarme a culminar esta etapa de mi vida, porque es quien me ha dado las bendiciones, inteligencia y fuerzas para terminar este trabajo.

A **mis padres**, Juan Monge y Doris Pineda, por estar guiándome y apoyándome siempre en todas las etapas de mi vida, ayudándome a salir siempre adelante y por sus oraciones y consejos que nunca faltaron.

A **mi hermano**, Noel, porque nunca me dejo sola a lo largo de mi carrera, porque siempre me ha apoyado, lo quiero mucho y que Dios me lo bendiga siempre.

A **mis docentes asesores**, Lic. Rosita y Odette, por brindarme su confianza y su apoyo para que yo realizara este trabajo de graduación, que Dios me las bendiga. Y al comité de trabajos de graduación por todo su apoyo.

Sabrina Monge Pineda

INDICE

	Pág.
Resumen	11
Capítulo I	
1.0 Introducción	xiv
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	19
3.1 Niveles tróficos	19
3.1.2 Productores primarios	19
3.1.3 Consumidores	20
3.1.4 Descomponedores	21
3.2 Fitoplancton	21
3.3 Florecimiento o fenómeno Bloom	22
3.3.1 Estado trófico	23
3.4 La clorofila característica y composición	24
3.4.1 Tipos de clorofila presentes en las algas	24
3.4.1.1 Clorofila-a	24
3.4.1.2 Clorofila-b	25
3.4.1.3 Clorofila-c	25
3.4.1.4 Otros pigmentos	25
3.5 Métodos para la determinación de la clorofila-a	26
3.5.1 La fluorometría	26
3.5.2 Cromatografía líquida de alta resolución	26
3.5.3 Espectroscopia Ultra Violeta Visible	27
3.6 Generalidades del laboratorio fisicoquímico de aguas	27

Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	30
4.1 Tipo de estudio	30
4.2 Investigación bibliográfica	30
4.3 Investigación de campo	31
4.3.1 Universo	31
4.3.2 Muestra	31
4.4 Parte experimental	31
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	40
5.1 Identificación de la especie vegetal	40
5.2 Simulación del agua a utilizar para la recolección de la muestra	41
5.3 Determinación de la clorofila-a en estándar de trabajo y muestra	41
5.3.1 Determinación de la clorofila-a en estándar de trabajo	41
5.3.2 Determinación de la clorofila-a en muestras de agua	48
5.4 Lineamientos requeridos para la toma de muestra en el análisis de clorofila-a	50
5.4.1 Muestreo de fitoplancton	51
5.4.2 Directrices para la toma de muestra	52
5.4.3 Equipos de muestreo	52
5.4.4 Pre tratamiento de la muestra	54
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	56
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	59
Bibliografía	60
Glosario	62
Anexos	66

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°	N° Pag
1. Lista de plantas y alimentos ricos en clorofila-a	65
2. Carta de identificación taxonómica de la espinaca	66
3. Sistema creado para la toma de muestra de agua.	69
4. Equipos utilizados para el muestreo de aguas	70
5. Extracción y cuantificación de la clorofila-a en estándar de trabajo.	71
6. Determinación de clorofila-a en muestras de agua.	72

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° Pag
1. Descripción de botellas recolectoras para el análisis para el análisis de clorofila-a.	54
2. Alimentos y plantas ricos en clorofila de mayor a menor cantidad.	65
3. Equipos utilizados para el muestreo de aguas.	70

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° Pag
1. Botella de Van Dorn	53
2. Botella de Niskin	53
3. Carta de identificación de la espinaca.	66
4. Descripción taxonómica de la espinaca	67
5. Imágenes y característica taxonómica de la espinaca.	68
6. Tanque de vidrio utilizado para toma de muestra	69
7. Esquema de trabajo para el análisis de estándar de espinaca	71
8. Esquema de trabajo para el análisis de muestras de agua.	72

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pag
1. Recolección de datos, lecturas realizadas y cantidad de clorofila presente en estándar de trabajo (prueba1).	42
2. Análisis estadístico para el cálculo del coeficiente de variación	44
3. Recolección de datos, lecturas realizadas y cantidad de clorofila presente en estándar de trabajo (prueba2).	45
4. Análisis estadístico para el cálculo del coeficiente de variación	46
5. Recolección de lecturas hechas antes de la adición de ácido clorhídrico y absorbancias corregidas en muestras de agua	48
6. Recolección de lecturas hechas después de la adición de ácido clorhídrico y absorbancias corregidas.	49
7. Lecturas de volúmenes de extracto y miligramos de clorofila-a encontrados.	49

RESUMEN

La clorofila-a es el pigmento fotosintético dominante en microalgas (fitoplacnton), algas y cianobacterias por lo que es una medida útil para estimar la biomasa de estos organismos fotosintéticos en cualquier cuerpo de agua, además de ser un indicador biológico de la contaminación en medio ambientes acuáticos. El presente trabajo de graduación comprende el desarrollo del método para la cuantificación de la clorofila-a presente en muestras de agua por espectroscopia ultravioleta visible.

Para el desarrollo de la investigación , se procedió primero a la revisión bibliográfica la cual se llevo a cabo en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, sitios web, y consistió en recopilar toda aquella información relacionada con la cuantificación de la clorofila-a por espectroscopia ultravioleta-visible así como también retomar algunos lineamientos utilizados para la toma de muestra de agua en el análisis de clorofila-a, de igual manera se investigó que plantas poseen una mayor cantidad de clorofila-a en su composición y cuál de ellas es la más utilizada para la elaboración de un estándar de trabajo de clorofila a.

Una vez recopilada la información, se procedió a elaborar una lista de las especies vegetales que tiene en su composición una mayor cantidad de clorofila-a y que mejor se adaptaba al método utilizado, por lo que se seleccionó para el estándar de trabajo a la espinaca por su alto contenido de clorofila-a presente en ella, y por la facilidad de extraer este pigmento con el solvente utilizado que fue la acetona al 90%, además se creó un sistema simulado empleando un tanque de vidrio con las siguientes dimensiones : 60 cm de largo, 30 cm de alto, 30 cm de ancho; conteniendo agua con algunas especies acuáticas necesarias para que se lleve a cabo la fotosíntesis; además de la exposición a la luz solar constante, las muestras se tomaron directamente del

sistema antes descrito y se llevaron al laboratorio fisicoquímico de agua para su posterior tratamiento y determinación de clorofila-a presentes en ellas.

Para la cuantificación de la clorofila-a presente en las muestras de agua se procedió a trabajar con seis muestras de agua, y seis estándares de trabajo estos últimos se llevaron por duplicado para poder determinar la precisión del método mediante la repetibilidad. Posteriormente con los resultados obtenidos de clorofila-a presentes en el estándar de trabajo se prosiguió a determinar la precisión del método a través del cálculo del coeficiente de variación, dichos resultados se compararon con los criterios de aceptación el cual establece que para métodos espectrofotométricos el valor de coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3%.

En base a los resultados obtenidos se concluyó que el método para la cuantificación de la clorofila-a por espectrofotometría ultravioleta visible, es preciso y detecta fácilmente la clorofila-a presente en una especie vegetal como la espinaca y en una muestra de agua, por lo que se recomienda validar este método para que en un futuro se incluya dentro de los análisis realizados en el laboratorio físico químico de aguas de la facultad de química y farmacia, como parámetro de la calidad en aguas recreativas y mantos acuíferos como lagos, embalses, ríos, etc.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1. INTRODUCCION⁽⁶⁾

La calidad de los recursos hídricos se ve afectada en diferentes grados en muchas cuencas del país. Las materias orgánicas alteran el equilibrio químico natural del agua y en consecuencia la composición del fitoplancton que es una comunidad de microorganismos en su mayoría fotosintéticos que componen la base de un ecosistema acuático como productor primario además de ser el principal recurso directo o indirecto nutricional para todos los organismos marinos y pesquerías.

Un elemento muy importante para mantener el equilibrio de un ecosistema acuático es el fitoplancton, dentro de su composición se encuentra clorofila como resultado de su fotosíntesis, que es indicadora de la productividad primaria en cuanto a la cantidad de fitoplancton presente en un cuerpo de agua. Para su medición, se cuantifica la concentración de clorofila-a, expresada como los pigmentos fotosintéticos por unidad de volumen.

Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar el método para la cuantificación de la clorofila-a por medio de la espectrofotometría ultravioleta visible, utilizando muestras de agua y estándares de trabajo. Para las muestras de agua se creó un sistema simulado empleando un tanque de vidrio con las siguientes dimensiones: 60 cm de largo, 30 cm de alto, 30 cm de ancho; conteniendo agua y algunas especies acuáticas necesarias para que se lleve a cabo fotosíntesis dicho sistema se ubico en las instalaciones del laboratorio fisicoquímico de aguas de la facultad de química y farmacia, las muestras de agua utilizadas se tomaron directamente del sistema antes descrito y se llevaron al laboratorio físico químico de aguas para su posterior análisis; también se preparó seis estándares de trabajo a partir de la hoja de espinaca; posteriormente se realizaron las lecturas de los estándares de trabajo a dos diferentes longitudes de onda (663nm y 645nm) y se cuantificó la clorofila-a presente en ellos, con los resultados obtenidos se determino la precisión del método

mediante el cálculo del coeficiente de variación, comparando estos resultados con los límites de aceptación permitidos el cual debe ser menor o igual al 3% para el método utilizado.

La investigación se llevo a cabo entre Agosto del año 2014 hasta abril 2015 y la parte experimental se realizó en el Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad del El Salvador.

CAPITULO II

OBJETIVOS

26. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar el método para la cuantificación de la clorofila “a”, en muestras de agua por espectroscopia Ultravioleta visible

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Identificar la especie vegetal para la preparación del estándar de clorofila.

2.2.2 Prepara el sistema de donde se tomaran las muestras de agua para la medición de clorofila-a.

2.2.3 Determinar por el método espectrofotómetro ultravioleta visible la clorofila-a presente en el estándar de trabajo y en las muestras de agua.

2.2.4 Determinar la precisión mediante la repetibilidad del método.

2.2.5 Establecer los lineamientos para la toma de muestra del agua requerida en la medición de clorofila-a.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

26. MARCO TEORICO

Los lagos y ríos son la mayor fuente de agua fresca del mundo. Más del 99% de las fuentes de agua fresca de nuestro planeta están encerradas en los glaciares o enterradas bajo la superficie de la Tierra, los lagos y ríos pueden servir de hogar para una variedad de vida, incluyendo peces, crustáceos, anfibios y mamíferos; Los cuales tienen sus propios ecosistemas, creando un balance delicado que es fácil de perturbar. Los organismos que habitan en un ecosistema acuático en función de cómo obtienen su alimento se agrupan en tres grandes niveles tróficos: productores primarios, consumidores y descomponedores.

3.1 NIVELES TROFICOS

3.1.2 PRODUCTORES PRIMARIOS ⁽⁶⁾

Constituyen el primer nivel trófico de una trama alimentaria. En ecosistemas terrestres está representado por plantas, en tanto que en ecosistemas acuáticos los productores primarios son las algas y microalgas o fitoplacton. Se caracterizan por usar la energía solar para producir moléculas orgánicas (por ejemplo hidratos de carbono) y otros compuestos que luego serán transformados en energía química. Los productores constituyen el 99% de toda la materia orgánica del mundo vivo.

Son organismos capaces de captar y aprovechar la energía solar o lumínica (que es prácticamente toda la energía exterior que recibe el ecosistema) para transformar sustancias inorgánicas (agua, dióxido de carbono y sales minerales), pobres en energía química, en sustancias orgánicas, ricas en energía química. A este grupo pertenecen básicamente las plantas verdes, algunos organismos procarióticos, las algas verde-azules y pocas bacterias, pero su contribución es menor que las plantas verdes. Los mayores productores primarios de los ecosistemas acuáticos son las microalgas o fitoplancton y las

algas que a menudo se encuentran en las capas superficiales de los océanos y lagos. En los ecosistemas terrestres, los principales productores primarios son las plantas superiores, las angiospermas y gimnospermas.

3.1.3 CONSUMIDORES⁽⁶⁾

Los consumidores o segundo nivel trófico: Son organismos que aprovechan la materia orgánica de los productores primarios para convertirla en materia orgánica propia. A este grupo pertenecen los:

Consumidores primarios: se alimentan de los productores primarios. En la tierra, los herbívoros típicos incluyen insectos, reptiles, pájaros y mamíferos. Dos grupos importantes de mamíferos herbívoros son los roedores y los ungulados; estos últimos son los animales con pezuñas, que pastan, como los caballos, las ovejas o el ganado vacuno. En los ecosistemas acuáticos (de agua dulce y salada) los herbívoros son típicamente pequeños crustáceos y moluscos. La mayoría de estos organismos, como las pulgas de agua, los copépodos, las larvas de cangrejo y bivalvos (mejillones y almejas), junto con los protozoos forman el zooplancton, el cual se alimenta del fitoplancton. Los consumidores primarios también incluyen algunos parásitos de plantas, como por ejemplo: hongos, otras plantas y otros animales.

Consumidores secundarios: Este nivel está constituido por animales que comen otros animales, se alimentan de los herbívoros y por lo tanto son carnívoros, por ejemplo: halcón, orca, carpa, etc.

Consumidores terciarios: Se alimentan de los consumidores secundarios, y por lo tanto también son carnívoros, por ejemplo: león, cocodrilo, etc.

3.1.4 DESCOMPONEDORES⁽⁶⁾

Descomponedores: Son organismos que aprovechan la materia y la energía que aún contienen los restos de seres vivos (cuerpos muertos, desecho etc), descomponiendo la materia orgánica en materia inorgánica. A este grupo pertenecen los hongos, bacterias y otros microorganismos, quienes segregan enzimas digestivas sobre el material muerto o de desecho y luego absorben los productos de la digestión.

Dentro del ecosistema, la materia se aprovecha de forma continua, en cambio la energía se emplea una sola vez, perdiéndose progresivamente a lo largo del proceso en forma de calor y de trabajo, por lo tanto es necesario incorporarla al sistema en forma continua.

3.2 FITOPLANCTON⁽¹⁰⁾

Se define como fitoplancton la comunidad de microorganismos, en su mayoría fotosintéticos (microalgas, cianobacterias, flagelados heterótrofos y otros grupos sin clorofila) que viven suspendidos en la masa de agua.

El fitoplancton se encuentra en la base de la cadena alimentaria de los ecosistemas acuáticos, ya que sirve de alimento a organismos mayores; es decir, realiza la parte principal de la producción primaria en los ambientes acuáticos, sobre todos los animales marinos.⁽¹⁰⁾

Pero además de eso, el fitoplancton es el responsable original de la presencia de oxígeno en el ecosistema acuático.

La abundancia del fitoplancton en los lagos y embalses depende de los siguientes factores:

-Condiciones físicas e hidrológicas: Luz, temperatura, turbulencia/estabilidad del agua, tiempo de resistencia del agua y tasa de sedimentación del plancton.

-Composición química del agua: Nutrientes y materia orgánica, mineralización y pH.

-Factores biológicos:

- Depredación por parte de filtradores planctofagos (zooplancton y peces) y relaciones entre especies.

El fitoplancton se ha usado ampliamente como indicador del estado trófico de las masas de agua, y también para la detección y seguimiento de las presiones fisicoquímicas relacionadas con:

- Contaminación ambiental.
- Cambios en la mineralización del agua (y en la composición de los iones mayoritarios disueltos).
- Eutrofización (concentraciones de nitrógeno y fosforo y en ocasiones de sílice y otros cationes como el hierro).
- Contaminación orgánica (soluble y particulada).

El fitoplancton es un indicador de las presiones hidromorfológicas que determinan cambios en la tasa de renovación de lagos y embalses. ⁽¹⁰⁾

3.3 FLORECIMIENTO O FENOMENO “BLOOM”⁽⁷⁾

El fitoplancton también puede ser responsable de algunos problemas ecológicos cuando se desarrolla demasiado; en una situación de exceso de nutrientes y de temperatura favorable, estos organismos pueden multiplicarse rápidamente formando lo que se suele llamar florecimiento o “bloom”, o también mareas rojas. En esta situación, el agua se vuelve de color verdoso, pero rápidamente (1-2 días, dependiendo de la temperatura) se vuelve amarronada cuando el plancton agota los nutrientes y comienza a morir. A esa altura, la descomposición mas o menor rápida de los organismos muertos puede llevar al agotamiento del oxígeno y como consecuencia, a la muerte de peces y otros organismos. Por otro lado debido a esta acumulación del fitoplancton este puede sintetizar y acumular toxinas o excretarlas al medio acuático (toxinas identificadas del tipo neurotóxicas, hepatotóxicas y epidérmicas) causando daño a otros organismos del medio acuático y la salud humana.

Este fenómeno se presenta tanto en cuerpos de agua continentales y oceánicas.⁽⁷⁾

En los estudios del fitoplancton existen los siguientes enfoques:

- Estudio de las especies y de comunidades características.
- Ponderación de los diferentes grupos (índices).
- Análisis de parámetros relacionados con su biomasa (concentración de pigmentos, biovolumen).⁽¹⁰⁾

Bajo condiciones estables de los ecosistemas, especialmente en ecosistemas tropicales, las comunidades fitoplanctónicas tienden a alcanzar un rango de fluctuación muy bajo, tanto en su composición y abundancia como en su distribución y variación estacional. Cualquier cambio en los parámetros que afectan el ecosistema acuático o que son parte de él, pueden producir cambios en el comportamiento del fitoplancton. Una causa importante que produce cambios evidentes y pronunciados en las comunidades algales es el aporte de nutrientes en niveles anormales, llevados al sistema por la descarga de aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas. Los conocimientos adquiridos a través del estudio del comportamiento del fitoplancton contribuyen a definir una imagen del estado trófico de un cuerpo de agua.

3.3.1 ESTADO TROFICO ⁽⁸⁾

El estado trófico de un lago expresa la relación entre el estado de nutrientes y el aumento de materia orgánica en el cuerpo de agua. Actualmente existe una jerarquía que diferencia los niveles de trofía que puede representar un lago, de acuerdo a lo cual un lago puede caer dentro de un estado **oligotrófico**, o pobre en nutrientes, **eutrófico**, rico en nutrientes o **mesotrófico**, que corresponde a una condición intermedia. ⁽⁸⁾

3.4 LA CLOROFILA CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN.⁽¹⁾

La concentración de pigmentos fotosintéticos se utiliza ampliamente para calcular la biomasa del fitoplancton. Todas las plantas verdes contienen clorofila-a que constituye aproximadamente de 1 al 2 por 100 del peso seco de las algas planctónicas. Otros pigmentos presentes en el fitoplancton incluyen a las clorofilas b y c, xantofilas, ficobilinas y carotenos. Los productos importantes de degradación de la clorofila encontrados en el medio acuático son los clorofilidos, feoforbidos y las feofitinas. La presencia o ausencia de los distintos pigmentos fotosintéticos, se utiliza entre otras características para separar los principales grupos de algas.

La clorofila es una molécula compleja que posee un átomo de magnesio en el centro mantenido por un anillo de porfirinas. Una molécula de clorofila se compone de una cabeza y una cola. La cabeza contiene cuatro anillos de carbono/nitrógeno unidos formando un anillo mayor, en el centro de este anillo hay un átomo de magnesio y tiene un pigmento color verde con estructuras policíclicas planas. La cola es una cadena de carbonos enlazados unidos a la cabeza (ver anexo n°2). El contacto de las partículas luminosas (fotones) con la clorofila produce una excitación de la misma desencadenando una serie de reacciones fotoquímicas que se encargan de transformar la energía luminosa en energía química (fotosíntesis).

3.4.1 TIPOS DE CLOROFILA PRESENTES EN LAS ALGAS. ⁽¹²⁾

3.4.1.1 Clorofila a

La clorofila-a se encuentra en todos los organismos que experimentan fotosíntesis, incluyendo las algas y microalgas. La razón de por qué es esencial se debe a su capacidad de capturar longitudes de onda de luz que caen en el espectro de la luz solar. Una vez capturada por la clorofila A (que se encuentra en un orgánulo llamado cloroplasto), la luz del sol se combina con agua y dióxido de carbono para producir energía y moléculas de glucosa utilizadas

para potenciar el funcionamiento de las células del alga. La clorofila A es un pigmento de color verde, que le da a las plantas, algas y fitoplancton su color verde natural.

3.4.1.2 Clorofila b

La clorofila B es un pigmento verde en las plantas y microalgas o fitoplancton del mismo color. Esta aumenta la capacidad de la clorofila A para captar la luz solar. Las algas verdes son el organismo más común en el agua dulce y el mar, y son un importante proveedor de oxígeno, el que se produce durante la fotosíntesis.

3.4.1.3 Clorofila c

La clorofila C se encuentra en ciertos tipos de algas, incluyendo los dinoflagelados. Al igual que la clorofila B, esta ayuda a la clorofila A a captar la luz solar, pero no participa en la fotosíntesis más allá de la etapa inicial. La clorofila C es un pigmento de color marrón rojizo y le da a los dinoflagelados su color característico. En efecto, los dinoflagelados son conocidos por conglomerarse en forma masiva (lo que se conoce como “floraciones”) y dar a todo un cuerpo de agua un color rojo; se cree que a causa de ellos se le dio el nombre al Mar Rojo.

3.4.1.4 Otros pigmentos

Es posible encontrar otros pigmentos similares a la clorofila en las algas, aunque estos no captan directamente la luz solar. Un ejemplo es el carotenoide, que es un pigmento marrón (y se encuentra en las algas marrones que al igual que los dinoflagelados, pueden causar floraciones). Además, algunos tipos de algas tienen clorofilina y ficobilinas, que son sales solubles en agua derivadas de la clorofila utilizadas para ayudar a captar la luz solar (aunque la fotosíntesis no se produce en ninguna de las dos) y se encuentran en el cloroplasto.

La clorofila puede detectarse fácilmente gracias a su comportamiento frente a la luz. La medición óptica de la concentración de clorofila-a en una muestra de

agua permite una estimación suficiente de la concentración de fitoplancton e, indirectamente, de la actividad biológica, de esta manera la medición de la clorofila-a es un instrumento importante de vigilancia de los procesos de eutrofización. ⁽¹¹⁾

3.5 METODOS PARA LA DETERMINACION DE LA CLOROFILA-a. ⁽¹⁾

Hay tres métodos para determinar la clorofila-a en el fitoplancton: el espectrofotométrico, el fluorométrico y la cromatografía líquida de alta resolución.

3.5.1 La fluorometria. Por este método se cuantifica la concentración de clorofila-a y feopigmentos presentes en una muestra. Este método se puede aplicar en todos los rangos de concentración de clorofila-a que se encuentren en un cuerpo de agua.

FUNDAMENTO: Una muestra de agua se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio, la extracción de los pigmentos se efectúa usando metanol como disolvente y el ultrasonido (sonificación), esto se hace para romper el filtro y las células, luego de aclarar el extracto por centrifugación se coloca en un fluorímetro donde los pigmentos de las algas se excitan con luz de longitud de onda azul, emitiendo fluorescencia con longitud de onda roja, la fluorescencia se detecta por medio de un fotomultiplicador.

3.5.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Este método permite: identificar, caracterizar, cuantificar, separar, y purificar los diferentes pigmentos lipídicos de las algas y cianobacterias, como clorofilas, carotenoides, scitonemina y productos de degradación.

FUNDAMENTO: La cromatografía líquida de alta eficiencia permite la purificación de los pigmentos aislados, esta se realiza usualmente en fase reversa, ya que las clorofilas, al igual que los carotenoides, son pigmentos poco

polares. La fase estacionaria más utilizada para la separación de estos pigmentos es la C18, y como eluyentes se emplea agua/metanol, o metanol/acetona, siempre conservándose la acetona en mayor proporción.

3.5.3 Espectroscopia Ultravioleta visible.

Es el método más usado en el área de investigación y es la medida de la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra en función de las longitudes de onda específicas, la espectroscopia ultravioleta visible estudia la adsorción de la radiación uv-visible de moléculas orgánicas e inorgánicas dentro de un rango de 0.6 a 380nm.

FUNDAMENTO: La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. Para el análisis de la clorofila-a se filtra la muestra utilizando filtro de fibra de vidrio, el filtro se coloca en un mortero con una cantidad determinada de acetona al 90%, se centrifuga y luego se hace las lecturas respectivas.

Es importante al momento de tener los resultados compararlos con límites normativos existentes internacionalmente como los límites normativos australianos de clorofila-a en aguas recreativas en donde el valor permitido es de 2-10µg/L de clorofila-a equivalente a 15000 cel/mL.⁽¹⁾

3.6 GENERALIDADES DEL LABORATORIO FISICOQUIMICO DE AGUAS DE LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA.

El Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador fue fundado en 1998. Es un laboratorio

acreditado y responsable de los análisis fisicoquímicos de: Agua potable y envasada, aguas residuales, agua de ríos, lagos, nacientes, pozos, etc, Con respecto a estos últimos y dado que se trata de aguas naturales, dentro de los componentes que contiene estos cuerpos de agua está el fitoplancton y como productos fotosintéticos esta la clorofila-a, considerado como un indicador de la contaminación del agua dado a su relación directa con la cantidad de micro algas presentes en las aguas naturales, de ahí la importancia de contar un método practico para la determinación de clorofila-a y ofrecer este parámetro a instituciones públicas y privadas.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

26. DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo a desarrollar se clasificó como un estudio retrospectivo, prospectivo y experimental.

- Retrospectivo: Se hizo una revisión de los antecedentes internacionales relacionados a la cuantificación de clorofila-a en lagos y embalses.
- Prospectivo: Porque se generó la información necesaria para la cuantificación de la clorofila-a por el método Espectrofotométrico Ultravioleta Visible, lo cual será un insumo a tomar en cuenta en futuros análisis de aguas superficiales.
- Experimental: Se realizó la determinación de clorofila-a por el método Espectrofotométrico Ultravioleta Visible, a la muestra de agua artificial y a los estándares de trabajo.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se llevó a cabo la búsqueda y revisión de información en libros oficiales y no oficiales en las siguientes bibliotecas:

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca "Benjamín Orozco" de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Facultad de Ciencia Naturales y Matemática de la Universidad de El Salvador.
- Internet.

4.3. INVESTIGACIÓN DE CAMPO

Se investigó que especies vegetales contienen dentro de su composición una mayor cantidad de clorofila, se elaboró un listado de las mismas y se seleccionó la especie vegetal mas empleada como estándar en el análisis de clorofila;(Ver anexo N° 1) además de ser la que mejor se adecuo al método a utilizar en la espectroscopia ultravioleta visible; luego se procedió a la identificación de la especie vegetal por parte de un profesional biólogo, (Ver anexo N° 2) para la posterior preparación de los seis estándares de trabajo.

4.3.1 Universo

Los diferentes métodos utilizados para la determinación de clorofila-a.

4.3.2 Muestra

Método de Espectroscopia Ultravioleta Visible para la determinación de clorofila-a.

4.4. PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se desarrolló de la siguiente manera:

- a) Extracción y cuantificación de la clorofila-a por espectroscopia ultravioleta visible para el estándar de trabajo elaborado a partir de la hoja de espinaca. Con los resultados obtenidos se determino la precisión del método, a través de la repetibilidad.
- b) Adecuación del agua artificial a ocupar para la medición de clorofila-a.
- c) Determinación de la clorofila-a por espectroscopia ultravioleta visible en las muestras de agua.

a) Extracción y cuantificación de la clorofila-a en estándar de trabajo a partir de la hoja de espinaca. (9)(12)(13)(14)

Se seleccionó la hoja de espinaca de entre la lista de especies vegetales que contienen mas clorofila, por su considerable contenido de clorofila-a y por la facilidad de extraerla con el solvente ocupado (acetona 90%), para el método utilizado de espectrofotometría ultravioleta visible. Para la determinación y extracción de la clorofila-a en la hoja de espinaca se trabajó en el laboratorio con luz baja para evitar que la clorofila-a se degrade, y se siguió de la siguiente manera:

Aparatos y Equipos:

- Espectrofotómetro ultravioleta visible
- Balanza analítica
- Centrifuga

Materiales y Reactivos:

- Probetas de 100 mL y 10 mL
- Mortero y pistilo
- Tubos para centrifuga
- Agitador de vidrio
- Papel carbón
- Acetona al 90%

Procedimiento (9)(12)(13)(14)

- 1) Cortar la hoja de espinaca eliminando los tallos y las venas gruesas de la hoja.
- 2) Pesar 0.1 gramos de la hoja y colocarlos en un mortero.
- 3) Medir 10 mL de acetona al 90% y agregarlos al mortero poco a poco.

- 4) Triturar hasta que la mayoría de la hoja se halla decolorado y obtener una pasta homogénea.
- 5) Colocar la maceración en un tubo centrifuga previamente forrado con papel carbón.
- 6) Almacenar a 4 °C por 24 horas.
- 7) Posteriormente centrifugar a 2700 por 10 minutos.
- 8) Decantar y registrar el volumen del sobrenadante en una probeta de 10 mL previamente forrado con papel carbón.
- 9) Decantar en otro tubo de centrifuga previamente forrado con papel carbón y tapar.
- 10) Calibrar el espectrofotómetro ultravioleta visible con acetona al 90% (blanco).
- 11) Realizar las lecturas del estándar a las siguientes longitudes de onda 663 y 645 nm.
- 12) Realizar el mismo procedimiento con cinco estándares más de trabajo.
- 13) Determinar la clorofila-a presente en la hoja de espinaca con la ecuación de Arnold:

$$\text{Clorofila-a mg/g hoja} = \frac{[(12.7 \times A_{663}) - (2.6 \times A_{645})] \times \text{mL de acetona}}{\text{mg de tejido vegetal}}$$

Dónde:

12.7 y 2.6 = son constantes.

A_{663} y A_{645} = son las lecturas de absorbancia a las longitudes de onda de 663 y 645 nm.

14) Determinar la precisión del método a través de los resultados obtenidos de clorofila-a presentes en los seis estándares de trabajo utilizando las siguientes formulas: ⁽²⁾

$$S = \sqrt{\frac{\sum(\chi_i - \bar{\chi})^2}{(n-1)}} \quad CV = \frac{S}{\bar{\chi}} \times 100$$

En donde:

S = Desviación estándar de las medias de los valores obtenidos de clorofila-a.

CV = Coeficiente de variación.

$\bar{\chi}$ = La media de los valores individuales de clorofila-a presentes de los seis estándares.

χ_i = Son los valores individuales de clorofila-a presente de cada uno de los seis estándares.

N = Numero de estándares realizados.

b) Preparación del sistema simulado del agua artificial a ocupar para la medición de la clorofila-a.

Para poder determinar la clorofila-a presente en una muestra de agua, se hizo necesario preparar un sistema simulado, en un tanque de vidrio, conteniendo agua y algunas plantas acuáticas necesarias para que se lleve a cabo la fotosíntesis y mantenerlo de alguna manera controlado, y de esta forma evitar posibles interferencias en las muestras tomadas.

Para la preparación del sistema se siguió de la siguiente manera:

Materiales:

- Pecera de vidrio con capacidad de 3 – 4 galones.
- Plantas acuáticas.
- Malla de plástica.
- Agua potable.

Procedimiento:

- 1) Colocar en el tanque de vidrio de 3 a 4 galones de agua potable.
- 2) Introducir dentro del mismo tanque, abundantes plantas acuáticas.
- 3) Cubrir la pecera con una malla plástica.
- 4) Colocar la pecera en un lugar donde reciba la luz solar y este protegida de la lluvia.

c) determinación de la clorofila-a por espectroscopia ultravioleta visible en las muestras de agua. ⁽¹⁾

Las muestras de agua que se utilizaron para determinar la clorofila-a, se tomaron directamente del sistema antes mencionado (pecera), posteriormente se llevo la muestra en un frasco ámbar debidamente rotulado al laboratorio y se trabajo de la siguiente manera:

Aparatos y Equipos:

- Espectrofotómetro ultravioleta visible
- Equipo de filtración al vacío.
- Centrifuga

Materiales y Reactivos:

- Frasco ámbar con capacidad de 1000 mL
- Tubos para centrifuga

- Balón volumétrico de 250 mL
- Probeta de 100 mL
- Probeta de 10 mL
- Mortero con pistilo
- Filtro de fibra de vidrio whatman GF/C o su equivalente que para el caso sería Sartorio MG/C.
- Pinzas
- Agitador
- Micro pipeta
- Papel carbón
- Ácido Clorhídrico 1N
- Suspensión de carbonato de magnesio
- Acetona al 90%.

Procedimiento^(*)

- 1) Tomar de la pecera 1000 mL de agua y colocarlos en frasco de vidrio ámbar, cerrar y rotular.
- 2) Colocar la muestra en un balón volumétrico de 250 mL previamente forrado con papel carbón, y aforar con la misma.
- 3) Armar el aparato de filtración al vacío y colocar el papel filtro.
- 4) Filtrar la muestra de manera constante
- 5) Añadir 0.2 mL de una suspensión de carbonato de magnesio a los últimos pocos mililitros de agua en el filtro cuando este por concluir la filtración.
- 6) Colocar el filtro en el mortero.
- 7) Agregar al mortero 10 mL de acetona al 90% y triturar hasta que las fibras del filtro se separen.
- 8) Colocar la maceración en un tubo de centrifuga previamente forrado con papel carbón.

- 9) Almacenar a 4°C por 24 horas.
- 10) Posteriormente centrifugar los tubos cerrados durante 15 minutos a 3000 rpm para clarificar la muestra.
- 11) Decantar y registrar el volumen del sobrenadante en una probeta de 10 mL previamente forrado con papel carbón.
- 12) Decantar en otro tubo de centrifuga previamente forrado con papel carbón y tapar.
- 13) Calibrar el espectrofotómetro ultravioleta visible con acetona al 90% (blanco).
- 14) Realizar las lecturas de la muestra a las siguientes longitudes de onda 750^a, 665^a, y 663^a nm.
- 15) Retirar las celdas del espectrofotómetro y calibrar de nuevo con acetona al 90% acidificada con dos gotas de Ácido Clorhídrico 1N.
- 16) Agregar a las muestras dos gotas de Ácido Clorhídrico 1N y realizar las lecturas respectivas a 750^b, 665^b, 663^b nm.
- 17) Hacer los cálculos respectivos para la determinación de clorofila-a.

FORMULA:

$$\text{Clorofila-a (mg/m}^3\text{)} = \frac{26.73(663^a - 665^b)(Ve)}{Vs (1)}$$

DONDE:

750^a, 665^a, y 663^a = Son las lecturas hechas a las absorbancias de 750, 665, 663 nm sin la adición de Ácido Clorhídrico.

750^b, 665^b, y 663^b = Son las lecturas hechas a las absorbancias de 750, 665 y 663 nm después de la adición de Ácido Clorhídrico.

Corrección de absorbancias:

Restar las lecturas hechas a las siguientes absorbancias:

663a – 750a = Lectura a la absorbancia **663a corregida**

665b – 750b = Lectura a la absorbancia **665b corregida**

Ve = Volumen de extracto de acetona en litros.

Vs = Volumen de muestra de agua m³

1 = Paso de la luz de la cubeta en cm.

26.73 = Es un numero constante

Utilizando como blanco la solución de acetona al 90%

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

La elección de la especie vegetal utilizada para la elaboración del estándar de trabajo, se hizo a partir de una lista de especies que contienen mayor cantidad de clorofila en su composición (Ver anexo N°1), y se seleccionó de entre las que contenía una mayor cantidad de clorofila-a en su composición además de ser la idónea para ser utilizada con el tipo de solvente utilizado como es la acetona al 90%, después de la investigación de cada una de las especies descritas en la lista, se optó por utilizar la espinaca.

Una vez seleccionada la especie vegetal a utilizar se prosiguió a la identificación de la misma, para lo cual se llevó una muestra de la especie a la Escuela de Biología de la facultad de ciencias naturales y matemáticas de la Universidad de El Salvador, la identificación estuvo a cargo de la bióloga y profesora investigadora : MSC. Nohemy Elizabeth Ventura Centeno. La cual nos proporcionó una carta (Ver anexo N°2), en donde se detalla las características de la especie vegetal, entre las más importantes están las siguientes:

IDENTIFICACIÓN TAXONOMICA DE LA ESPINACA

- Nombre científico: *Tetragoniatetragonoides*
- Nombre común: Espinaca de nueva Zelandia
- Familia: Aizoaceae
- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheobionta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Caryophylliales
- Género: Tetragonia

DESCRIPCIÓN BOTANICA:

- Habitat: Hierbas anuales, menudamente papilosas, erectas y suculentas se encuentran en tierra poco arida.
- Hojas: de 3 a 15 cm de largo de forma triangular, color verde brillante, y están cubiertas con diminutas vellosidades tanto en el haz como el envés.
- Flores: Amarillas
- Fruto: una nuececilla con un endocarpo casi leñosos y epicarpo herbáceo
- Semillas: de 5 a 8 reniformes

5.2 PREPARACION DEL SISTEMA SIMULADO PARA LA TOMA DE MUESTRA AGUA A UTILIZAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA-a

Para poder determinar la clorofila-a presente en una muestra de agua, se hizo necesario simular un sistema, para ello se tomaron algunos de los elementos necesarios para que se dé la fotosíntesis como: agua, plantas acuáticas, y la exposición al sol durante el día, además de la protección del mismo con una malla plástica para evitar posibles interferencias como podrían ser larvas de mosquitos, u otros insectos. (Ver anexo N° 3).

5.3 DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA-a POR EL METODO ESPECTROFOTOMÉTRICO EN ESTANDAR DE TRABAJO Y MUESTRAS DE AGUA.

ESTANDAR DE TRABAJO.

Para la determinación de la clorofila-a en estándar de trabajo se hizo necesario realizar dos pruebas; debido a que el primer valor calculado de coeficiente de variación no se encontraba dentro del límite de aceptación

definidos para el método empleado el cual debe ser menor o igual a 3, haciendo una revisión de los primeros resultados (tabla N°1) se detectó que el tiempo de maceración fue el que incidió en el cálculo del coeficiente de variación, por lo que se decidió hacer una segunda prueba siguiendo el mismo proceso esta vez teniendo el cuidado que el tiempo de maceración fuera igual para todos los estándares de trabajo, obteniendo de esta forma un coeficiente de variación de 1.89% encontrándose dentro de los límites de aceptación permitidos para el método empleado. Para el cálculo de coeficiente de variación se utilizó la fórmula y procedimientos antes descritos obteniendo los siguientes resultados:

5.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILA-a EN HOJA DE ESPINACA (ESTANDAR DE TRABAJO)

TABLA N°1: Recolección de datos, lecturas realizadas y cantidad de clorofila presente en estándar de trabajo (prueba 1)

Std absorbancia	645 (nm)	663 (nm)	Volumen de acetona (mL)	Peso de muestra (g)	Clorofila (mg/g de hoja)
1	0.269	0.715	8.2	0.1011	0.67977
2	0.227	0.602	8.8	0.1003	0.61900
3	0.224	0.597	9.0	0.1008	0.62495
4	0.177	0.607	8.5	0.1038	0.59358
5	0.278	0.615	8.6	0.1018	0.59876
6	0.223	0.606	8.5	0.1001	0.60428

Para la cuantificación de la clorofila-a en la hoja de espinaca se hicieron los cálculos de acuerdo al siguiente ejemplo:

Std 1

Datos:

$$A_{645} = 0.269 \text{ nm}$$

$$A_{663} = 0.715 \text{ nm}$$

Volumen de acetona = 8.2 mL, siendo este el volumen final obtenido del extracto antes de hacer la lectura en el espectrofotómetro.

$$\text{Mg de tejido pesado} \rightarrow 0.1011\text{g} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 101.1 \text{ mg}$$

Calculando la clorofila-a presente en la hoja:

$$\text{Cl a mg/g hoja} = \frac{[(12.7 \times A_{663}) - (2.6 \times A_{645})] \times \text{mL de acetona}}{\text{mg de tejido vegetal}}$$

$$\text{Cl a mg/g hoja} = \frac{[(12.7 \times 0.715\text{nm}) - (2.6 \times 0.269\text{nm})] \times 8.2 \text{ mL}}{101.1 \text{ mg}}$$

$$\text{Cl a mg/g hoja} = 0.67977$$

Posteriormente se siguió con el cálculo estadístico para determinar el coeficiente de variación y conocer la precisión del método.

TABLA N°2 Análisis estadístico para el cálculo del coeficiente de variación

Estándar	Clorofila (mg/g de hoja) (Xi)	\bar{X}	$(Xi - \bar{X})$	$(Xi - \bar{X})^2$
1	0.67977	0.62005	0.05972	3.56×10^{-3}
2	0.61900	0.62005	-1.05×10^{-3}	1.10×10^{-6}
3	0.62495	0.62005	4.90×10^{-3}	2.40×10^{-5}
4	0.59358	0.62005	-0.02647	7.00×10^{-4}
5	0.59876	0.62005	-0.02129	4.53×10^{-4}
6	0.60428	0.62005	-0.01577	2.48×10^{-4}
Σ	3.72034			4.98×10^{-3}

Los datos se obtuvieron mediante la realización de los cálculos según el siguiente ejemplo:

Estándar 1

$$\bar{X} = \frac{3.72034}{6} = \mathbf{0.62005}$$

$$(Xi - \bar{X}) \longrightarrow (0.67977 - 0.62005) = \mathbf{0.05972}$$

$$(Xi - \bar{X})^2 \longrightarrow (0.05972)^2 = \mathbf{3.56 \times 10^{-3}}$$

Calculo de la desviación estándar y coeficiente de variación:

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma (Xi - \bar{X})^2}{(n-1)}} \longrightarrow \sqrt{\frac{4.98 \times 10^{-3}}{(6-1)}} = \mathbf{0.03155}$$

$$CV = \frac{S}{x} \times 100 \quad \longrightarrow \quad \frac{0.03155}{0.62005} \times 100 = 5.08\%$$

TABLA N°3: Recolección de datos, lecturas realizadas y cantidad de clorofila-a presente en estándar de trabajo (prueba 2)

Std absorbancia	645 (nm)	663 (nm)	Volumen de acetona (mL)	Peso de muestra (g)	Clorofila (mg/g de hoja)
1	0.224	0.600	8.5	0.1004	0.59581
2	0.227	0.602	8.8	0.1003	0.61900
3	0.225	0.598	9.0	0.1008	0.62585
4	0.225	0.600	8.6	0.1003	0.60320
5	0.226	0.601	8.8	0.1003	0.61814
6	0.223	0.606	8.5	0.1001	0.60428

Para la determinación de la clorofila en la hoja de espinaca se hicieron los cálculos de acuerdo al siguiente ejemplo:

Std 1

Datos:

$$A_{645} = 0.224 \text{ nm}$$

$$A_{663} = 0.600 \text{ nm}$$

Volumen de acetona = 8.5 mL, siendo este el volumen final obtenido del extracto antes de hacer la lectura en el espectrofotómetro.

$$\text{Mg de tejido pesado} \longrightarrow 0.1004\text{g} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 100.4 \text{ mg}$$

Calculando la clorofila-a presente en la hoja:

$$\text{Cl a mg/g hoja} = \frac{[(12.7 \times A_{663}) - (2.6 \times A_{645})] \times \text{mL de acetona}}{\text{mg de tejido vegetal}}$$

$$\text{Cl a mg/g hoja} = \frac{[(12.7 \times 0.600\text{nm}) - (2.6 \times 0.224\text{nm})] \times 8.5 \text{ mL}}{100.4 \text{ mg}}$$

$$\text{Cl a mg/g hoja} = \mathbf{0.59581}$$

Posteriormente se siguió con el cálculo estadístico para determinar el coeficiente de variación y conocer la precisión del método.

TABLA N° 4: Análisis estadístico para la precisión del método (Prueba 2)

Estándar	Clorofila (mg/g de hoja) (Xi)	\bar{X}	$(Xi - \bar{X})$	$(Xi - \bar{X})^2$
1	0.59581	0.61104	- 0.01523	2.31x10⁻⁴
2	0.61900	0.61104	7.9 x 10 ⁻³	6.24x10 ⁻⁵
3	0.62585	0.61104	0.01481	2.19x10 ⁻⁴
4	0.60320	0.61104	- 7.8 x 10 ⁻³	6.08x10 ⁻⁵
5	0.61814	0.61104	7.1 x 10 ⁻³	5.04x10 ⁻⁵
6	0.60428	0.61104	- 6.7 x 10 ⁻³	4.48x10 ⁻⁵
Σ	3.66628			6.68x10⁻⁴

Los datos se obtuvieron mediante la realización de los cálculos según el siguiente ejemplo:

$$\bar{X} = \frac{3.66628}{6} = \mathbf{0.61104}$$

$$(Xi - \bar{X}) \longrightarrow (0.59581 - 0.61104) = \mathbf{- 0.01523}$$

$$(Xi - \bar{X})^2 \longrightarrow (-0.01523)^2 = \mathbf{2.31x10^{-4}}$$

Calculo de la desviación estándar y coeficiente de variación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (\chi_i - \bar{\chi})^2}{(n-1)}} \longrightarrow \sqrt{\frac{6.68 \times 10^{-4}}{(6-1)}} = \mathbf{0.01155}$$

$$CV = \frac{S}{x} \times 100 \longrightarrow \frac{0.01155}{0.61104} \times 100 = \mathbf{1.89\%}$$

Para esta segunda prueba se observo en los datos de la tabla N° 3 una mayor uniformidad en el volumen de acetona y las lecturas hechas como resultado de llevar un control en el tiempo de maceración, obteniendo un coeficiente de variación aceptable dentro de los límites establecidos para el método utilizado.

Precisión

Es la cercanía o grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente o múltiples muestreos de una muestra homogénea.

Criterios de aceptación: ⁽²⁾

- CV ≤ 2% para métodos cromatográficos y volumétricos.
- **CV ≤ 3% para métodos químicos o espectrofotométricos.**
- CV ≤ 5% para métodos biológicos.

Coeficiente de aceptación obtenido para la primera prueba

CV = 5.08% este valor se puede deber al tiempo de maceración

Coeficiente de aceptación obtenido de segunda prueba

CV = 1.89% este valor si se encuentra dentro de los criterios de aceptación el cual debe ser de menor o igual a 3

5.3.2 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA-a EN MUESTRA DE AGUA

Para determinar la clorofila-a se obtuvieron los siguientes datos; la tabla N° 5 hace referencia a los datos obtenidos antes de acidificar la muestra, y los datos de la tabla N°6, son los datos obtenidos después de la acidificación, esto se hizo con el fin de eliminar cualquier interferencia al momento de calcular la cantidad de clorofila-a presente en la muestra. Al agregar el ácido clorhídrico se logra que la clorofila-a se degrade y se transforme en feofitina por lo que es necesario hacer una nueva lectura, y los datos obtenidos se le restan a las lecturas hechas antes de la acidificación obteniéndose las lecturas corregidas.

TABLA N°5: Recolección de lecturas hechas, antes de la adición de Ácido clorhídrico 1N y las absorbancias corregidas.

Muestra / Absorbancia	750a (nm)	665a (nm)	663a (nm)	Absorbancia corregida (663a-750a)
1	0.003	0.080	0.079	0.076
2	0.001	0.057	0.055	0.054
3	0.002	0.095	0.097	0.095
4	0.003	0.089	0.091	0.088
5	0.004	0.100	0.101	0.097
6	0.001	0.091	0.091	0.090

TABLA N°6: Recolección de las lecturas hechas, después de la adición de Acido clorhídrico 1N y las absorbancias corregidas.

Muestra / Absorbancia	750b (nm)	665b (nm)	663b (nm)	Absorbancia corregida (665b-750a)
1	0.002	0.058	0.062	0.056
2	0.003	0.041	0.056	0.038
3	0.004	0.073	0.072	0.069
4	0.003	0.069	0.063	0.066
5	0.005	0.083	0.075	0.078
6	0.004	0.074	0.068	0.070

TABLA N°7: Lectura de los volúmenes de extracto y mg de clorofila-a encontrados.

Muestra	Volumen de extracto (mL)	Clorofila-a (mg/m ³)
1	7.1	15.1826
2	6.0	11.5473
3	6.1	16.9575
4	5.9	13.8782
5	6.0	12.1888
6	5.8	12.4027

Los datos anteriores corresponden al volumen del extracto antes de la adición de ácido clorhídrico y a los miligramos de clorofila-a encontrados en cada una de las seis muestras.

Los datos se obtuvieron mediante la realización de los cálculos según el siguiente ejemplo:

Muestra 1

Datos:

Corrección de absorbancias:

$$663a - 750a \longrightarrow (0.079 - 0.003) = 0.076 \text{ absorbancia corregida (663a)}$$

$$665b - 750b \longrightarrow (0.058 - 0.002) = 0.056 \text{ absorbancia corregida (665b)}$$

$$V_e = 7.1 \times 10^{-3} \text{ Lt}$$

$$V_s = 2.5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$$

$$\text{Clorofila-a (mg/m}^3) = \frac{26.73(663a - 665b)(V_e)}{V_s (1)}$$

$$\text{Clorofila-a (mg/m}^3) = \frac{26.73(0.076 - 0.056)(7.1 \times 10^{-3})}{2.5 \times 10^{-4}(1)} = 15.1826 \text{ mg/m}^3$$

Aunque la cantidad de clorofila presente en las muestras analizadas es mínima, se puede decir que el método empleado si es viable ya que logra detectar a las longitudes de onda especificadas la clorofila-a presente en una muestra de agua, además se pudo comprobar que el sistema creado para la toma de muestra funciono porque se detecto clorofila-a en las pruebas realizadas en cada una de las seis muestras.

5.4 LINEAMIENTOS REQUERIDOS PARA LA TOMA DE MUESTRA DE AGUA EN EL ANALISIS DE CLOROFILA-a.

Es necesario tener en cuenta algunos lineamientos o parámetros para la recolección de muestra en cualquier superficie de agua en el análisis de clorofila-a y de esta manera se evita cualquier interferencia. Dichos lineamientos se retomaron del manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros físico químicos y contaminantes marinos de Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras IVEMAR ⁽⁹⁾ y del protocolo de muestreo y análisis para fitoplancton del ministerio de medio ambiente en Barcelona.₍₁₀₎

5.5.1 MUESTREO DE FITOPLANCTON₍₁₀₎

Equipo:

Protección personal

- Botas o vadeadores de pescador.
- Guantes de latex.
- Chaleco salvavidas.

Recolección de muestras

- Botellas de vidrio color ámbar así se protege la muestra de la luz.
- Botella con mecanismo de cierre para muestras más profundas
- Hielera

Etiquetado

- Todas las muestras deben estar convenientemente etiquetadas de manera que se identifique un código de muestra, procedencia, fecha de recolección entidad a cargo de la recolección e identificación.

5.4.2 DIRECTRICES PARA LA TOMA DE MUESTRA EN AGUAS RECREATIVAS: ⁽¹⁰⁾

- Cuando se toma la muestra en la superficie de un cuerpo de agua, se hará por medio de una botella de vidrio color ámbar, (esto permite conservar el estado de conservación) el volumen recomendado a tomar es de de 0.5 a 2 litros, y mantener la muestra en frío hasta su filtrado, es recomendable colocarlo en una hielera.
- Cuando se requiere tomar la muestra a diferentes profundidades o a una profundidad definida, se utilizarán botellas de muestro especializadas con dispositivo de cierre, luego almacenar la muestra a oscuras y mantenerla en frío hasta su filtrado.

5.4.3 EQUIPOS DE MUESTREO: ⁽³⁾

Cuando las muestras son superficiales únicamente es necesario extremar la limpieza del material y procurar procedimientos que eviten la contaminación. En muestras superficiales la recolección se puede hacer manualmente introduciendo la botella colectora bajo la superficie; en el caso se quiera analizar clorofila-a la botella debe ser de vidrio color ámbar, procurando siempre hacerlo a la misma profundidad.

Cuando el objetivo es obtener muestras de agua a profundidades determinadas para el análisis de clorofila-a, se emplean botellas colectoras dotadas de mecanismos de cierre para confinar la masa de agua que se encuentra a la profundidad de interés. Las botellas Van Dorn y Niskin, (ver figura 2 y 3) por tener capacidad de mayor volumen, son ideales para la obtención de muestras en el análisis de pigmentos como la clorofila-a.

BOTELLA DE VAN DORN

La botella de van dorn, es un muestreador de agua de forma horizontal es ideal se utiliza para el análisis de pigmentos como la clorofila-a, y es ideal para

adquirir muestras de lagos, ríos, lagunas, etc. Posee doble liberador activado por mensajero y cuando las dos tapas finales de PVC se liberan son firmemente sujetas por una banda elástica. Hay que tener bastante precaución cuando se usan estas botellas en el muestreo de aguas con alto contenido de sólidos sedimentales; su forma alargada y un flujo muy lento para extraer la muestra por las llaves, facilitan la sedimentación de los sólidos provocando diferencia en este parámetro entre las primeras y las últimas botellas receptoras que se llenan.

BOTELLA DE NISKIN.

Cuando se quiere determinar pigmentos presentes en aguas marinas como la clorofila-a, la botella de niskin es la ideal ya que tiene la pieza superior e inferior sujetas por un tubo elástico resistente al agua de mar.

La recolección de muestras para el análisis de hidrocarburos requiere un equipo de muestreo especial; la muestra se debe recolectar en la misma botella de almacenamiento (que debe ser de vidrio) y a una profundidad de un metro, por lo cual no es posible utilizar ninguna de las mencionadas anteriormente (Ver anexo N°4).

BOTELLAS RECOLECTORAS

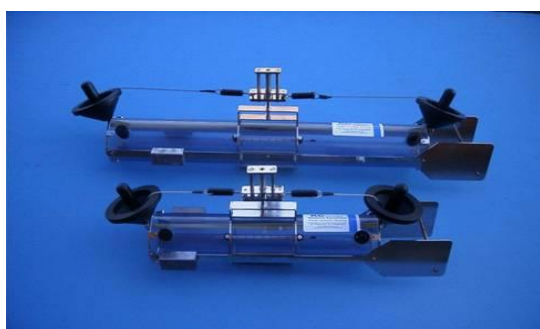


Figura N° 1: Botella de Van Dorn



Figura N° 2: Botella de Niskin

CUADRO N°1Descripción de botellas recolectoras para el análisis de clorofila-a ⁽³⁾

Botella de Van Dorn	Botella de Niskin
Cuerpo de PVC transparente	Cuerpo de PVC con interior libre de partes metálicas.
Dispositivo de liberación en acero inoxidable	Modelos disponibles según capacidad.
Termómetro	
Aletas de dirección integradas, que brindan estabilidad en corrientes de agua.	
Modelos disponibles de acuerdo a la capacidad de 2,3 o 5 litros	

5.4.4 PRE TRATAMIENTO DE LA MUESTRA: ⁽¹⁰⁾

Aclimatación de la muestra:

- Someter la muestra y el equipo a utilizar aproximadamente a la misma temperatura a la que esta la muestra a utilizar.

Homogeneización de la muestra

- Durante el tiempo de almacenaje, las partículas de sedimento en la botella y se forman agregados entre algas y otras algas o colonias más grandes para estandarizar en lo posible la homogeneización manual se recomienda que la manipulación la realice una sola persona combinando giros horizontales y verticales de la botella durante 1 a 3 minutos.

En el laboratorio

- Realizar de ser posible todo el procedimiento con luz tenue para evitar interferencias en los resultados como la degradación de la clorofila por la luz.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.CONCLUSIONES

- 1 La extracción y cuantificación de la clorofila-a en la hoja de espinaca es bastante viable en la preparación de un estándar de trabajo, debido a la facilidad de extraer el pigmento con acetona al 90% y a que en su mayoría está compuesta del pigmento verde correspondiente a la clorofila-a.
- 2 La clorofila-a nos sirve como un indicador biológico del estado trófico de un manto acuífero porque está directamente relacionado con la abundancia o ausencia de productores primarios presente en un ecosistema acuático.
- 3 Se comprobó que el sistema simulado utilizado para la toma de muestra, funcionó ya que detectó y cuantificó la presencia de clorofila-a en las muestras de agua analizadas por espectrofotometría ultravioleta visible y que fueron tomadas directamente del sistema creado.
- 4 El tiempo de maceración es un punto crítico a tomar en cuenta en el proceso de preparación del estándar de trabajo porque al prolongar demasiado este tiempo y no mantenerlo uniforme en la preparación de cada uno de los estándares el solvente utilizado (acetona 90%) se evapora, afectando el volumen final del extracto y por ende los resultados finales.
- 5 Con el cálculo del coeficiente de variación y por el ultimo valor obtenido ($C.V = 1.89\%$), se concluye que el método es preciso, porque se encuentra dentro del intervalo de aceptación permitido el cual debe ser menor o igual a 3% para métodos espectrofotométricos.

- 6 En la determinación de clorofila-a presentes en muestra de agua es importante tener en cuenta los lineamientos o directrices metodológicas para la toma de muestras tanto en aguas superficiales o profundas en cualquier cuerpo de agua dulce o salada (embalses, lagos, cuencas, mar, lagunas, aguas recreativas, etc) reduciendo de este modo posibles interferencias en la cuantificación de la clorofila-a.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.RECOMENDACIONES

- 1 Que al determinar la clorofila-a presente en la espinaca se lleve un control en el tiempo de maceración el cual debe ser de un minuto, para evitar que el solvente se evapore y prevenir posibles errores al momento de hacer las lecturas en el espectrofotómetro y obtener el coeficiente de variación.
- 2 Al Laboratorio Fisicoquímico de aguas de la Facultad de Química y Farmacia validar este método para la determinación de clorofila-a por espectroscopia ultravioleta visible y ofrecer este parámetro para el análisis de aguas recreativas.
- 3 En futuras investigaciones dar un seguimiento a este método, con muestras reales tomadas en lagos, ríos, etc. Aplicando los lineamientos para la toma de muestra.
- 4 Al validar el método, se debe realizar diez replicas en los diferentes parámetros de validación para mejores resultados.
- 5 Seguir la metodología para la toma de muestras en aguas superficiales o profundas y aguas recreativas.

BIBLIOGRAFIA

1. Díaz de Santos, J.B. (1992). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid
2. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. GUIA DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.
3. EURACHEM, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. First Edition 1998.
4. http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2005000200007&lng=es&nrm=
5. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n60/n60a16.pdf>
6. <http://www.astromia.com/tierraluna/lagos.htm>
7. http://www.ehowenespanol.com/descripcion-del-ecosistema-lago-info_249099/
8. <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/406/A5-%20CAPITULO%202.pdf?sequence=5>
9. http://www.rutageologica.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=833&Itemid=3332&limitstart=42
10. <http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/7010manualTecnicasanaliticas..pdf>

11. http://195.55.247.234/webcalidad/estudios/indicadoresbiologicos/Manual_fitoplancton.pdf
12. <http://html.rincondelvago.com/determinacion-cuantitativa-de-lasclorofilas.html>
13. <file:///C:/Documents%20and%20Settings/BlackCrystal%E2%84%A2/Mis%20documentos/Downloads/56T00256.pdf>
14. <http://es.scribd.com/doc/164322463/Cuantificacion-de-la-clorofila#scribd>

GLOSARIO

Aguas superficiales: Son aquellas que se encuentran sobre la superficie del suelo. Esta se produce por la fluimienta generada a partir de las precipitaciones o por el afloramiento de aguas subterráneas.

Pueden presentarse en forma corrientosa, como en el caso de corrientes, ríos y arroyos, o quietas si se trata de lagos, reservorios, embalses, lagunas, humedales, estuarios, océanos y mares.

Lagos: Es un cuerpo de agua dulce, de una extensión considerable, que se encuentra separado del mar.⁽⁶⁾

Embalses: Se denomina embalse a la acumulación de agua producida por una obstrucción en el lecho de un río o arroyo que cierra parcial o totalmente su cauce.⁽⁶⁾

Cuenca: Depresión en la superficie de la tierra, valle rodeado de alturas.⁽⁹⁾

Biovolumen: Referido a un volumen celular.⁽¹⁰⁾

Planctofagos: Animales que comen plancton como las ballenas, el tiburón ballena, entre otros.⁽⁶⁾

Zooplancton: Es la fracción del plancton constituida por seres que se alimenta, por ingestión de materia orgánica ya elaborada. (Plancton animal).⁽⁶⁾

Fitoplancton o plancton: Conjunto de organismos acuáticos autótrofos del plancton que tiene capacidad fotosintética y que viven dispersos en el agua. (Organismo vegetal).⁽⁶⁾

Zona limítrofe: Es el límite de un lugar con respecto a otro.⁽⁶⁾

Enrarecimiento: Disminución de la densidad de un gas.⁽⁶⁾

Biomasa: Es la cantidad de materia acumulada en un individuo, un nivel trófico, una población o un ecosistema.⁽¹⁰⁾

Nivel trófico: Se denomina nivel trófico a cada uno de los conjuntos de especies, o organismos de un ecosistema que ocupan un lugar equivalente a la cadena alimenticia. ⁽⁶⁾

Luz tenue o luz baja: Esta relacionado a la intensidad de la luz, adjetivo a débil, delicado, suave con poca intensidad o fuerza.

ANEXOS

Anexo n° 1

Lista de plantas y alimentos ricos en clorofila

Cuadro N° 2 alimentos y plantas ricos en clorofila de mayor a menor cantidad

Planta	Parte de la planta
Damiana (<i>TurneraDiffusa</i>)	Hojas
Mate (<i>Ilexparaquensis</i>)	Hojas
Palmera Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Fruto
Manzano (<i>Malus domestica</i>)	Fruto
Ajo (<i>Alliumsativum</i>)	Bulbo
Brócoli (<i>Brassicaoleraceavar. italica</i>)	Hojas
Espinacas (<i>Spinaciaoleracea</i>)	Hojas
Te verde (<i>Camelliasinensis</i>)	Hojas
Pimentero (<i>Capsicumannuum</i>)	Frutos
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	Planta
Soja (<i>Glycinemax</i>)	Semillas
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Planta
Plátanos (<i>Musa x paradisiaca</i>)	La parte inferior de la piel
Verdolaga (<i>Portulacaoleracea</i>)	Planta

Anexo N°2

Carta de identificación taxonómica de la espinaca.



Figura N°3 Carta de identificación de la espinaca

Fuente: Ventura Centeno, N. E. 2012. Especies vegetales promisorias, en El Salvador. Libro inédito.

Ubicación Taxonómica:

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Caryophyllidae*

Orden: *Caryophyllales*

Familia: *Aizoaceae*

Subfamilia: *Tetragonioideae*

Género: *Tetragonia*

Especie: ***T. tetragonoides***

Nombre científico: *Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Kuntze, Revis. Gen. Pl. 2: 264. 1891. C.M. Taylor. Revision of *Tetragonia* (Aizoaceae) in South America. Syst. Bot. 19: 575–589. 1994.

Sinonimias: *Demidovia tetragonoides* Pall.; *Tetragonia expansa* Murray.

Nombre común: "espinaca de nueva Zelandia"

Origen: Nativa de áreas costeras de Australia, Tasmania, Nueva Zelanda, Japón y las islas del Pacífico.

Distribución: Cultivada y ocasionalmente naturalizada en regiones cálidas de América. En el Norte y Sur América es considerada una planta invasora; su cultivo también está muy extendido en la franja oriental de Asia. Prospera en climas cálidos y pocos, es atacada por pocos insectos; pero la atacan, caracoles y babosas.

Ecología: Prefieren un ambiente húmedo para crecer

Descripción Botánica:

Hábito: Hierbas anuales, menudamente papilosas, glabras, erectas a rastreras, suculentas.

Hojas: De 3 a 15 cm de largo, forma triangular, color verde brillante, son gruesas y están cubiertas con diminutas vellosidades tanto en el haz y en el envés grueso, estípulas ausentes.

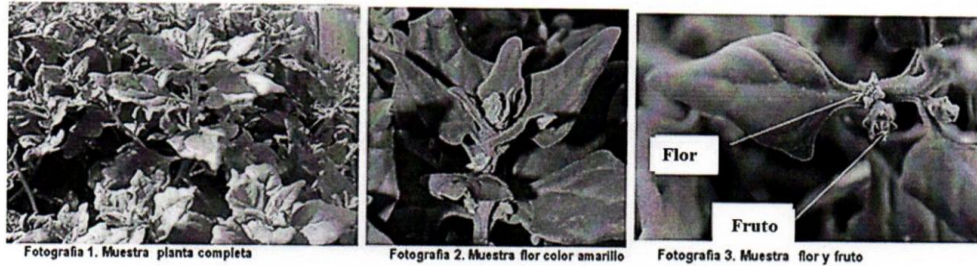
Flores: Amarillas, solitarias o en fascículos de 2–3, axilares, con pedicelo 2–5 mm de largo.

Fruto: Una nuececilla con un endocarpo casi leñoso y epicarpo herbáceo a carnoso, turbinado, 9–12.5 mm de largo y casi 7 mm de ancho.

Semillas: De 5 a 8, reniformes (en forma de riñón).

Usos: Se cocina como verdura en lugar de *Spinacia oleracea* L. ("espinaca"), familia Chenopodiaceae, en países tropicales. Un género con 50–60 especies en áreas tropicales y templadas del hemisferio Sur.

Figura N°4 Descripción taxonómica de la espinaca



Esquemas que muestran estructuras estériles (1. hojas); reproductoras (2. flor y 3. fruto)

Figura N°5 Imágenes y características taxonómicas de la espinaca.

Anexo n°3

Sistema creado para la toma de muestra de agua



FIGURA N° 6 Tanque de vidrio

Anexo n°4

Cuadro N°3 Equipos utilizados para el muestreo de aguas.

Equipo	Aplicación	Material de construcción	Ventajas	Desventajas
Botella Nansen	Colecta de fitoplancton	Metal/ recubierto con capa de teflón	Se puede usar en serie	Colecta poco volumen de muestra
Botella de Kemmerer	Compuestos químicos	PVC	No genera contaminación	Capacidad fija
	Bacteriología	Latón/bronce	metálica	Toxicidad debido al metal
	Zooplancton	Acrílico/plástico	No contamina con metales	
Botellas de Van dom	Compuestos químicos Bacteriología Fitoplancton Zooplancton	PVC	No generan contaminación metálica	Capacidad fija existen de 2 a 30 litros
Botellas comunes	Compuestos químicos Bacteriología	Vidrio	Bajo costo	No puede controlarse la profundidad del muestreo
Bombas extractoras	Compuestos químicos Fitoplancton zooplancton	Acero inoxidable	Puede coleccionar grandes volúmenes en forma continua	Existe posibilidad de contaminación metálica, y puede generar daño a los microorganismos

Anexo N° 5

Extracción y cuantificación de la clorofila-a en estándar de trabajo a partir de la hoja de espinaca.

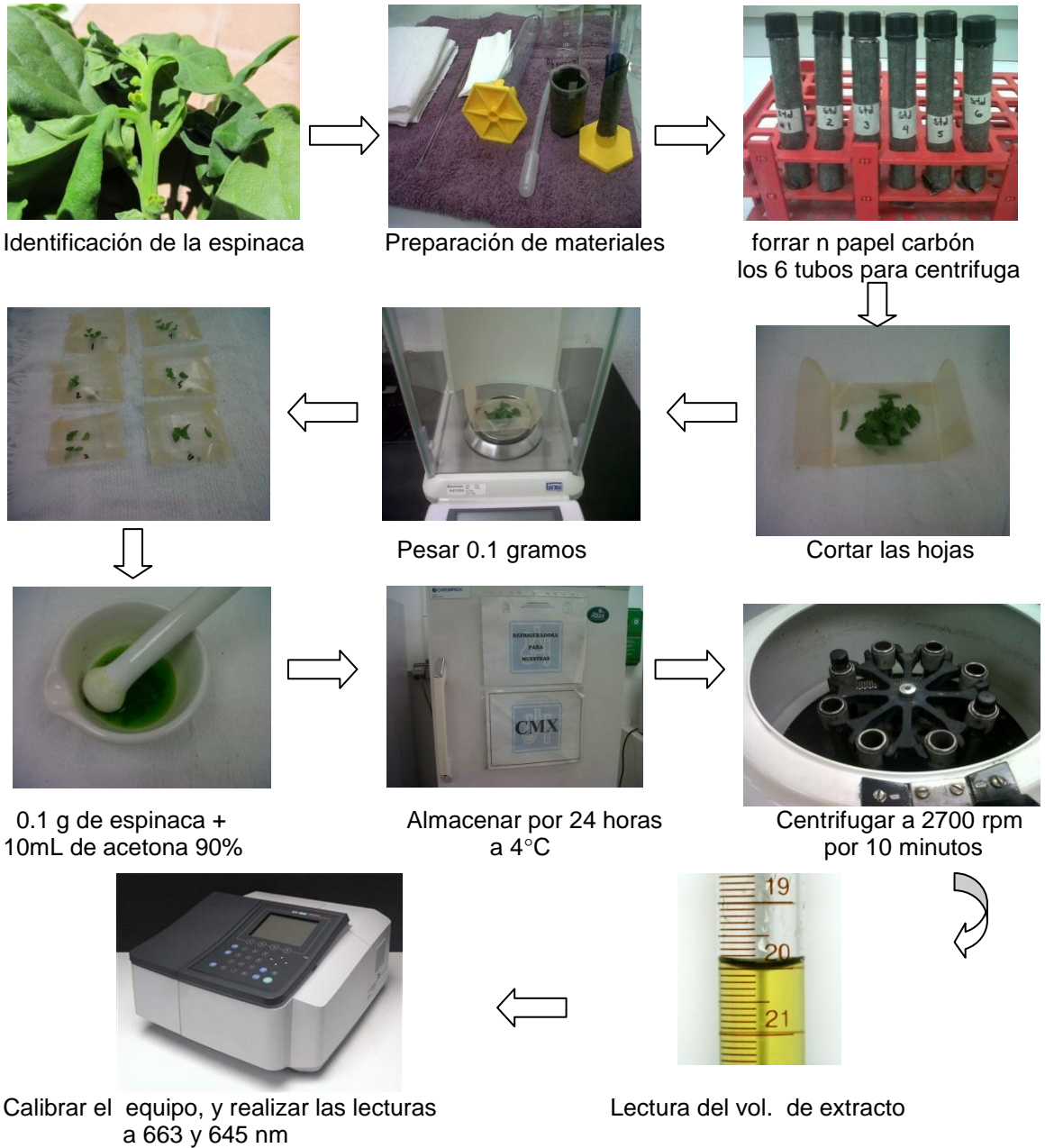


FIGURA N° 7 Esquema de trabajo en analisis de estandar de espinaca

Anexo N° 6

Determinación de clorofila-a en muestras de agua.

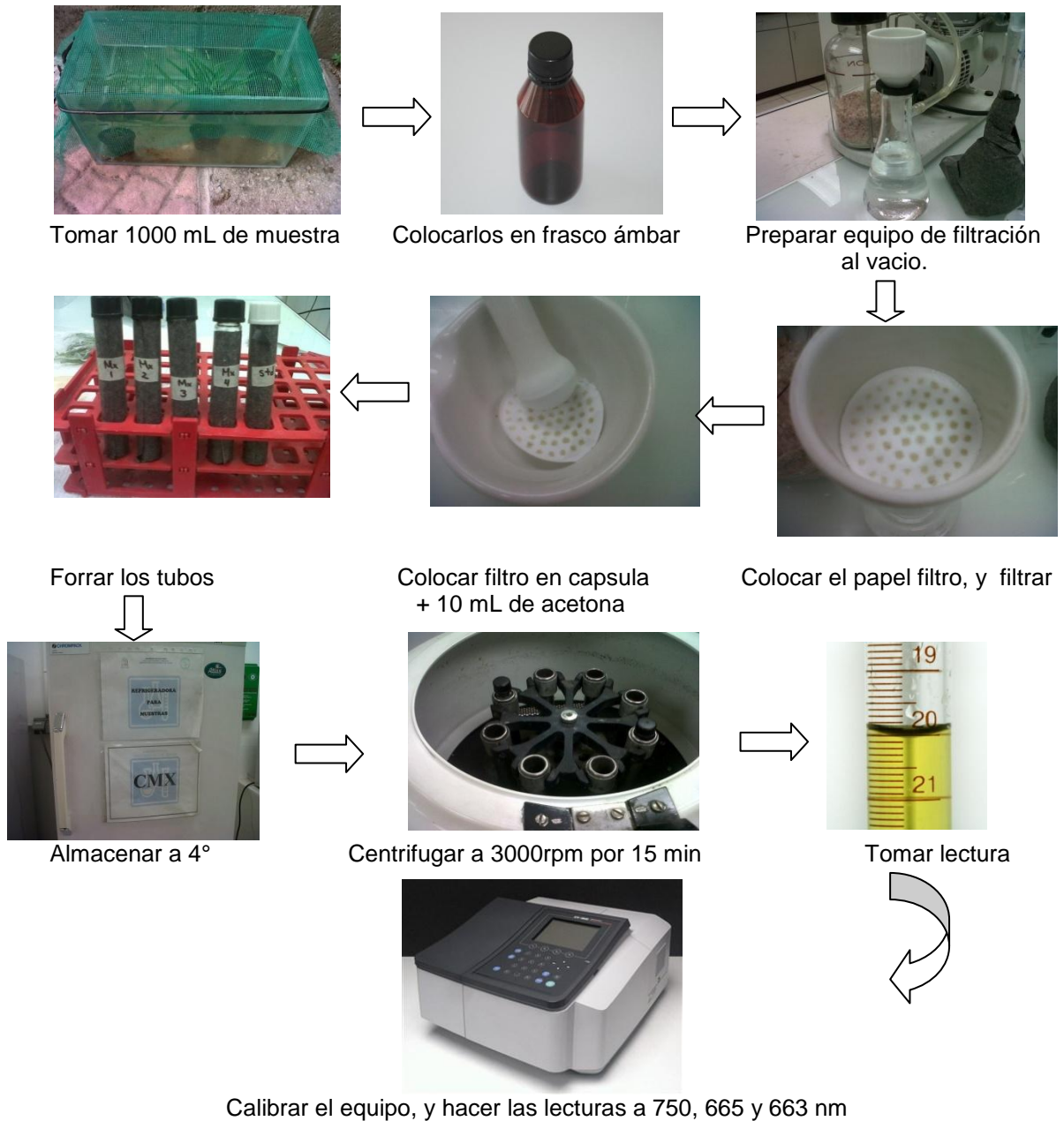


FIGURA N° 8 Esquema de trabajo para análisis de muestras de agua