

MICRODETERMINACION ESPECTROFLUORIMETRICA DE CLOROFILAS a Y b EN ALGAS BENTONICAS MARINAS DEL ARCHIPIELAGO CANARIO.

M. DEL MAR BERNAL SUAREZ (**); J.J. SANTANA RODRÍGUEZ (*)
y M.A. VIERA RODRIGUEZ (**)

(*) Departamento de Química (**) Departamento de Biología
Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Politécnica de Canarias,
Apartado 550, Las Palmas de Gran Canaria.

Resumen:

Se presenta un método para la determinación espectrofluorimétrica de clorofilas a y b en algas bentónicas marinas, utilizando como técnica de separación la Cromatografía en Capa Fina. Se establecen las correspondientes curvas de calibrado y se realiza un estudio estadístico del método. El mismo se aplica a la determinación de clorofila a y b en algas verdes y pardas del litoral del Archipiélago Canario.

Palabras clave: pigmentos, algas, espectrofluorimetría.

Summary:

The paper presents a spectrofluorometric method for determining chlorophylls a and b in marine algae using thin-layer chromatography as separate technique.

This established a corresponding calibration curve and a statistical study of the method. Green and brown algae from the Canary Islands was used to determine chlorophylls a and b.

Key words: Pigments, algae, spectrofluorimetry.

INTRODUCCION

La determinación cuantitativa de pigmentos clorofílicos fotosintéticos es uno de los análisis que, con mayor frecuencia, se llevan a cabo en Oceanografía. El propósito de los estudios sobre estimación de concentraciones de pigmentos suele ser variado, aunque centrado casi siempre en comunidades de fitoplancton.

Las concentraciones de clorofila a se utilizan rutinariamente para estimar la biomasa del fitoplancton y la productividad, mientras que los productos de degradación son indicadores del estado fisiológico, del contenido detrítico y de los procesos de pastaje de las poblaciones naturales de fitoplancton (9). Las medidas de clorofilas también ayudan a entender los sistemas naturales y juegan un papel importante en estudios de evaluación del impacto de la polución(10).

En general, los métodos analíticos utilizados para la determinación de clorofi-

las están basados en medidas espectrofotométricas (6,8,11,13) y espectrofluorimétricas (1,3,7). Estos se han ido perfeccionando progresivamente pero se caracterizan por presentar ciertas desventajas que les restan precisión y exactitud(9,12).

Aunque con las medidas de fluorescencia se alcanza mayor sensibilidad y selectividad que con las de absorción(1), la determinación fluorimétrica de la clorofila *a* sufre interferencias debido a la presencia de las clorofilas *b* y *c* y productos de degradación, que emiten en la misma región espectral que la primera (2). Estos problemas se pueden subsanar mediante la separación previa de los distintos pigmentos presentes en la muestra (4).

Como casi todos los estudios sobre el desarrollo y comparación de los métodos de estimación de pigmentos se refieren a muestras de plancton y la utilización de los mismos está aún en discusión, se introduce un método basado en la espectrofluorimetría usando como técnica de separación previa la cromatografía en capa fina(5), para la determinación de clorofilas *a* y clorofila *b* en muestras naturales de macroalgas. Los resultados obtenidos se comparan con los encontrados utilizando las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey(6).

METODO EXPERIMENTAL

Aparatos

Todas las medidas de fluorescencia se efectuaron con un Espectrofluorímetro Perkin-Elmer equipado con arco de Xenon Osram XBO 150 W, registrador, ultratermostato Selecta Frigitherm y células de cuarzo de 1 cm. de paso de luz.

Las medidas de absorción se realizaron en un Espectrofotómetro Visible-U.V. Perkin-Elmer S501.

La localización de las manchas de los pigmentos en las placas se realizó con una lámpara Biotron con longitudes de onda de emisión de 254 y 360 nm.

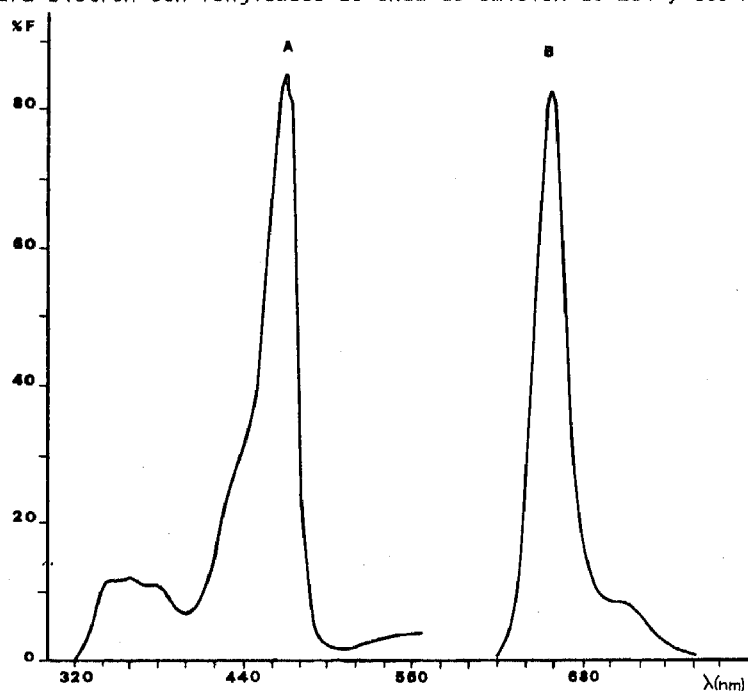


Figura 1.- Espectros de excitación (A) y emisión (B) de la clorofila *a* en acetona-agua (90% v/v). R (4-4), S (0.1-1)

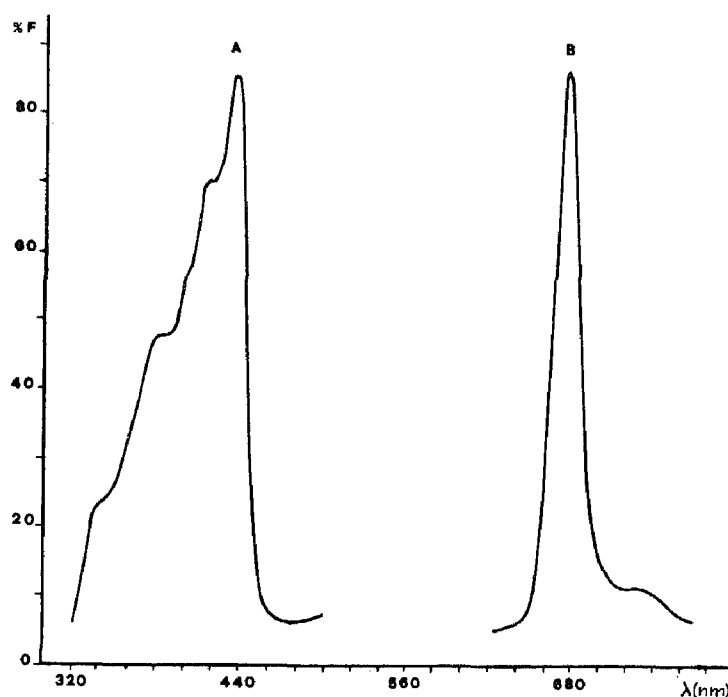


Figura 2.- Espectros de excitación (A) y (B) de la clorofila *b* en acetona-agua (90% v/v). R (4-4), S (0.1-3)

Reactivos

Todos los experimentos se llevaron a cabo con reactivos de grado analítico, disolventes purificados y agua desionizada.

Se usaron patrones de clorofila *a* y *b* Sigma (C-6144 y C-5878 respectivamente), previamente purificados por cromatografía en capa fina.

Procedimiento

Curvas de calibrado

Se realizaron los espectros de excitación y emisión de las clorofilas *a* y *b* (Figuras 1 y 2), resultando como longitudes de onda de excitación y emisión máximas respectivas, 432, 668 nm. para la primera, y 462, 652 nm. para la segunda.

Se establecieron las correspondientes curvas de calibrado entre 100 y 1000 ppb., utilizando las longitudes de excitación y emisión indicadas anteriormente.

Aplicando el método de regresión, las ecuaciones correspondientes a las rectas de calibrado resultaron ser:

$$\%F = 2.06 + 0.09 (\text{ppb. cl } a), \text{ para la clorofila } a, \text{ c.c.} = 0.996$$

y

$$\%F = 0.48 + 0.10 (\text{ppb. cl } b), \text{ para la clorofila } b, \text{ c.c.} = 0.992$$

cuya representación gráfica se encuentra en la Figura 3.

Los resultados del estudio estadístico del método se reflejan en la Tabla I, observándose que éste es correcto y que no presenta errores sistemáticos.

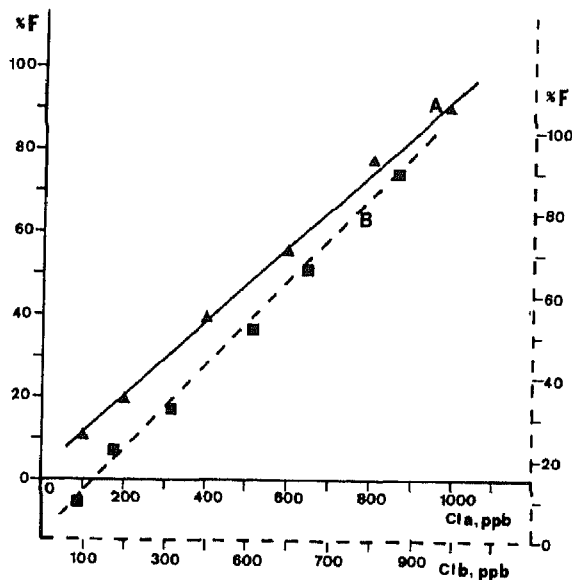


Figura 3.- Curvas de calibrado de la clorofila a (A) y clorofila b (B)
 (A) λ exc.= 432 nm., λ em.= 668 nm., R (6-6), S (0,3-0)
 (B) λ exc.= 462 nm., λ em.= 652 nm., R (6-6), S (1-2)

TABLA I: Resultados del estudio estadístico del método.

Parámetros estadísticos *	Curva A Cl a puesta (ppb) 499.3	Curva B, Cl b puesta (ppb) 430.2
\bar{X}	497.0	433.2
v	615.0	310.1
σ	24.8	17.6
σ_m	7.4	5.3
$t_{exp.}$	0.0	0.1
$t_{i exp.}$	0.3	0.5
Error (%)	± 3.4	± 2.7

* Calculados para 11 muestras diferentes.

Determinación espectrofluorimétrica de clorofilas a y b en muestras naturales de algas bentónicas marinas

Se introduce en un tubo de ensayo de 2 cm. de diámetro, cerrado herméticamente, una cantidad de alga comprendida entre 1.5 y 4.0 g. La extracción de los pigmentos se realiza en acetona al 90% (v/v) durante 24 horas manteniendo las muestras a 0° C y protegidas de la luz. A continuación se completa la extracción con un energético triturado del material. El extracto una vez filtrado se cambia de fase a dietil éter:NaCl (1:10).

La separación de los diferentes pigmentos se realiza utilizando placas cromato-

gráficas de vidrio, usando como fase estacionaria celulosa y como fase móvil las mezclas n-propanol:éter de petróleo (2.5:97.5) en una dimensión y éter de petróleo:cloroformo:acetona (70:30:0.5) en la otra.

Una vez desarrolladas las placas, se reextraen las clorofilas *a* y *b* con acetona al 90% (v/v) previo centrifugado a 0° C durante 30 min. y lavado con volúmenes de 4,3 y 3 ml.

Las medidas de fluorescencia de los extractos resultantes y las ecuaciones de las correspondientes curvas de calibrado nos permiten determinar las concentraciones de los pigmentos en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSION

El método antes descrito se aplicó a la determinación de niveles de concentración de dichos pigmentos en algas verdes y pardas de diferentes zonas de la isla de Gran Canaria (Figura 4). Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas II, III, IV y V, junto con los encontrados aplicando las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (6).

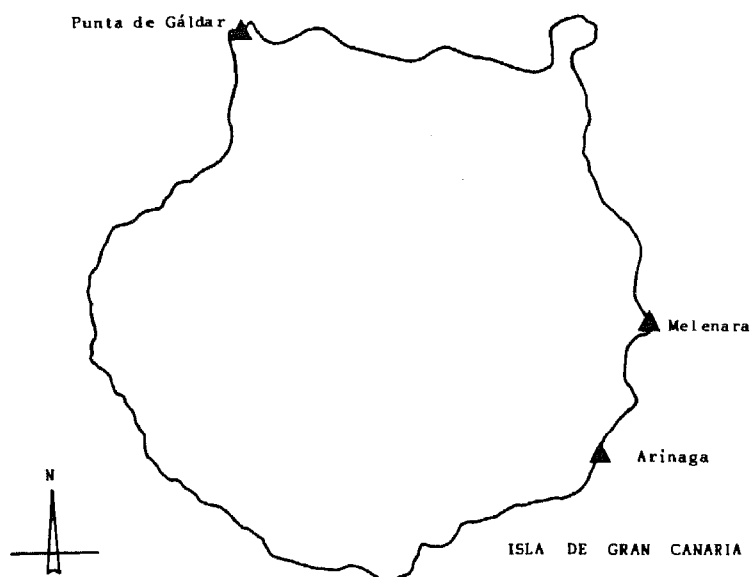


Figura 4.- Localización geográfica de las zonas muestreadas.

TABLA II: Niveles de concentración de clorofila *a* en algunas especies de algas pardas procedentes de la PUNTA DE GALDAR (ZONA N-NW)

Especies	Clorofila <i>a</i> (mg./g.)*	
	Método A**	Método B***
<i>Cystoseira humilis</i>	1.19	1.02
<i>Cystoseira compressa</i>	1.71	1.71
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	2.06	1.91

* Valor medio de tres determinaciones

** Ecuaciones de Jeffrey y Humphrey

*** Método propuesto

TABLA III: Niveles de concentración de clorofila a en algunas especies de algas pardas procedentes de ARINAGA (ZONA E-SE)

Especies	Clorofila <u>a</u> (mg./g.)*	
	Método A**	Método B***
<u>Cystoseira humilis</u>	2.33	1.84
<u>Cystoseira compressa</u>	2.35	1.47
<u>Cystoseira abies-marina</u>	2.22	1.84
<u>Halopteris scoparia</u>	2.44	0.80
<u>Zonaria tournefortii</u>	1.71	0.53

* Valor medio de tres determinaciones

** Ecuaciones de Jeffrey y Humphrey

*** Método propuesto

TABLA IV: Niveles de concentración de clorofilas a y b en algunas especies de algas verdes procedentes de ARINAGA (ZONA E-SE)

Especies	Clorofila <u>a</u> (mg./g.)*		Clorofila <u>b</u> (mg./g.)*	
	Método A**	Método B***	Método A**	Método B***
<u>Chaetomorpha linum</u>	3.22	1.77	1.59	1.97
<u>Ulva rigida</u>	1.86	0.39	1.05	0.74
<u>Valonia utricularis</u>	1.17	0.21	0.71	0.44

* Valor medio de tres determinaciones

** Ecuaciones de Jeffrey y Humphrey

*** Método propuesto

TABLA V: Niveles de concentración de clorofilas a y b en algunas especies de algas verdes y pardas procedentes de MELENARA (ZONA E-SE)

Especies	Clorofila <u>a</u> (mg./g.)*		Clorofila <u>b</u> (mg./g.)*	
	Método A**	Método B***	Método A**	Método B***
<u>Cystoseira abies-marina</u>	1.72	1.35	-	-
<u>Cystoseira compressa</u>	2.01	1.31	-	-
<u>Halopteris scoparia</u>	3.28	2.11	-	-
<u>Codium efussum</u>	1.19	0.79	0.73	1.19

* Valor medio de tres determinaciones

** Ecuaciones de Jeffrey y Humphrey

*** Método propuesto

En general, se observan valores inferiores de concentración para la clorofila a por nuestro método respecto a los obtenidos basándonos en las ecuaciones antes citadas. Sin embargo, para la clorofila b se observa el efecto contrario.

Todo ello está de acuerdo con los datos bibliográficos que indican la falta de exactitud y precisión de los métodos espectrofotométricos puestos a punto para la determinación de pigmentos en muestras naturales del medio marino, en el sentido que sobreestiman los contenidos de clorofila a y subestiman los de la clorofila b (13).

BIBLIOGRAFIA

- (1) BOTO, K. G. y J. S. BUNT. 1978. Selective excitation fluorometry for the determination of chlorophylls and pheophytins. *Anal. Chem.* **50**: 392-395.
- (2) COVENEY, M. F. 1982. Elimination of chlorophyll *b* interference in the fluorometric determination of chlorophyll *a* and phaeopigment *a*. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **16**: 77-90.
- (3) HOLM-HANSEN, O., C. J. LORENZEN, R. W. HOLMES y J. D. H. STRICKLAND. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.* **30**: 3-15.
- (4) JEFFREY, S. W. 1968. Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta* **162**: 271-285.
- (5) JEFFREY, S.W. 1981. An improved thin-layer chromatographic technique for marine phytoplankton pigments. *Limnol. Oceanogr.* **26**: 191-197.
- (6) JEFFREY, S. W. y G. F. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **167**: 191-194.
- (7) LOFTUS, M. E. y J. H. CARPENTER. 1971. A fluorometric method for determining chlorophylls *a*, *b* and *c*. *J. Mar. Res.* **29**: 319-338.
- (8) LORENZEN, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* **12**: 343-346.
- (9) MANTOURA, R. F. C. y C. LLEWELLYN. 1983. 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**: 297-314.
- (10) MURRAY, A. P., C. F. GIBBS y A. R. LOGMORE. 1986. Determination of chlorophyll in marine waters: Intercomparison of a rapid HPLC, Spectrophotometric and Fluorometric methods. *Mar. Chem.* **19**: 211-227.
- (11) PARSONS, T. R. y J. D. H. STRICKLAND. 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine plants pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.* **21**: 155-163.
- (12) SARTORY, D. P. 1985. The determination of algal chlorophyllous pigments by High Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometry. *Water Res.* **19**: 605-610.
- (13) SARTORY, D. P. y J. E. GROBBELAAR. 1984. Extraction of chlorophyll *a* from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia* **114**: 177-187.