

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**POSTGRADO EN QUIMICA**



**Aplicaciones de Calibración Multivariada en la Determinación de Algunos analitos orgánicos en muestras de agua mediante la Técnica de Fluorescencia Molecular.**

**Trabajo Especial de Grado  
presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de  
Venezuela por la Lic. Yosmery  
Vitta Brito para optar al Título  
de Dr. en Ciencias Mención  
Química.**

**Tutor: Dr. Alberto Fernández.**

Caracas, 25 de Abril del 2008

## **DEDICATORIA**

Las metas y logros que he alcanzado en cada etapa de mi vida, se deben siempre a ti madre adorada. Con todo mi amor, te dedico el logro de esta nueva meta profesional. Gracias por tu inspiración, cariño, apoyo, comprensión, paciencia y consejos, te amó.

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradezco a Dios, por darme la fortaleza y la fe para alcanzar mis sueños aún en las circunstancias más adversas. Gracias señor por estar siempre en mi corazón.

Al grupo de Físicoquímica del Laboratorio de Espectroscopia Láser, por prestar sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo de investigación. A su gente: Vincent, por ser esa persona accesible, incondicional y siempre dispuesta a ayudar, al Profesor Jimmy, por su ingenio, al Prof. Manolo, por su apoyo constante, a Héctor, por la ayuda prestada y a Mauro por su simpatía. En especial, agradezco a mi tutor, el Profesor Alberto, por su excelente orientación durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

A los profesores, José Chirinos, Lorenzo Echeverría, María Antonieta, Gustavo Pérez y Luís Gómez, gracias por la inmensa ayuda prestada. En especial, al Prof. Chirinos, por ser el ejemplo de excelente profesional que he tenido durante mi vida académica.

Al departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, España, por brindarme la oportunidad de realizar una parte de mi tesis doctoral en sus instalaciones. Agradezco especialmente a la Dra. Pilar Campíns Falcó, por su excelente dirección durante la estancia de investigación realizada.

A mi hermano Juan Antonio, gracias por tu cariño y tu temple, aunque ya no estés presente para compartir este momento conmigo, se que lo disfrutarás desde el cielo, te amó y siempre estarás en mi corazón.

A mis amigos, Rita, José Zabala, Mechita, Jetzaly, Jimena, Jaime, Esteban, Sr. Vicente Spena y todas las personas que me prestaron su ayuda en un momento determinado.

## Tabla de Contenido

<b>Indice de Tablas .....</b>	<b>10</b>
<b>Indice de Ilustraciones.....</b>	<b>15</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>22</b>
<b>Capítulo 1 Marco Teórico.....</b>	<b>26</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Principios Básicos De Fluorescencia Molecular .....</b>	<b>31</b>
2.1 Instrumentación para la medición de Fluorescencia.....	33
2.2 Aspectos Cuantitativos de la Fluorescencia .....	33
<b>3. Calibración Multivariable.....</b>	<b>9</b>
3.1 Construcción de modelos de Calibración Multivariada.....	34
3.1.1 Definición del conjunto de Calibración.....	42
3.1.2 Registro de la información analítica.....	42
3.1.3 Examinar y Re-procesar la data.....	42
3.1.4 Estimar el modelo.....	45
3.1.5 Validar el modelo.....	47
3.1.6 Utilizar el modelo.....	49
<b>4. Bibliografía.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo 2 Determinación Simultánea de Antraceno y Pireno mediante fluorescencia molecular aplicando modelos de calibración multivariable .....</b>	<b>51</b>
<b>Capítulo 2 Parte 1 Revisión Bibliográfica sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs).....</b>	<b>52</b>
<b>1. Generalidades de los HAPs.....</b>	<b>52</b>
<b>2. Técnicas de determinación de HAPs.....</b>	<b>54</b>
<b>3. Relación entre la Fluorescencia y los HAPs .....</b>	<b>56</b>

<b>4. Estudios de Fluorescencia y Calibración Multivariada en HAPs .....</b>	<b>58</b>
<b>5. Justificación y Objetivos.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 2-Parte 2 Aplicación de modelos de CM en la determinación simultánea de antraceno y pireno en muestras de agua de consumo mediante espectroscopia de fluorescencia molecular .....</b>	<b>66</b>
<b>1. Parte Experimental.....</b>	<b>67</b>
1.1 Equipos.....	67
1.2 Reactivos.....	68
<b>2. Metodología Experimental.....</b>	<b>68</b>
2.1 Preparación de Estándares de calibración.....	68
2.2 Preparación de Estándares de CM.....	69
2.3 Método Experimental.....	70
2.3.1. Sistema de excitación con láser Nd- Yag y detector simultaneo CCD.....	70
2.3.2 Sistema de Adquisición del registro de la señal de Fluorescencia con un sistema de integración boxcar y detector de respuesta rápida .....	71
2.3.3 Sistema de excitación con lámpara de arco de xenón láser y detector simultaneo CCD.....	73
<b>3. Resultados y Discusiones.....</b>	<b>74</b>
<b>3.1 Espectros de Fluorescencia de Antraceno y Pireno.....</b>	<b>74</b>
3.1.1. Espectros de Fluorescencia de Antraceno y Pireno obtenidos mediante sistema de detección con fotomultiplicador .....	80

<b>3.2 Calibración Univariada de los HAP<sub>s</sub></b> .....	<b>81</b>
<b>3.3 Aditividad de las señales de Fluorescencia</b> .....	<b>84</b>
<b>3.4 Calibración Multivariada de los HAPs / Láser Nd-YAG</b> .....	<b>86</b>
3.4.1 Aplicación del algoritmo PLS1 en las soluciones unicomponentes de los HAPs.....	86
<b>3.4.2 Construcción del Modelo de Calibración y de Validación utilizando un diseño factorial Multinivel</b> .....	<b>92</b>
3.4.2.1 Aplicación de los modelos PLS1 y PLS2 sobre el conjunto de las muestras de Calibración del diseño factorial 5 <sup>2</sup> .....	96
3.4.2.2 Validación externa de los modelos de calibración establecidos por PLS1 y PLS2.....	98
<b>3.4.3 Construcción del Modelo de Calibración y de Validación utilizando un diseño de Matriz Doehlert</b> .....	<b>101</b>
3.4.3.1 Aplicación de los modelos PLS1 y PLS2 sobre el conjunto de calibración de la Matriz de Doehlert.....	105
3.4.3.2 Validación externa de los modelos de calibración PLS1 y PLS2 sobre el conjunto de Validación del diseño Matriz de Doehlert.....	108
<b>3.4.4 Efectos del uso de un detector de respuesta rápida en la determinación de los HAPs mediante CM con Excitación láser Nd: YAG</b> .....	<b>108</b>
<b>3.4.5 Efectos del uso de una Lámpara de Arco de Xenón en la determinación de los HAPs mediante CM</b> .....	<b>109</b>
3.4.5.1 Construcción del conjunto de Calibración en base a un diseño factorial 5 <sup>2</sup> y aplicación de los algoritmos PCR, PLS1 y PLS2.....	110

3.4.5.2 Validación externa de los modelos de calibración PCR , PLS1 y PLS2.....	112
3.4.5.3 Comparación entre los modelos PCR, PLS1 y PLS2 sobre el conjunto de calibración del diseño 5 <sup>2</sup> y un sub-conjunto de quince muestras.....	113
3.4.5.4 Desarrollo del modelo de Calibración utilizando los algoritmos PLS1 y PLS2 sobre un conjunto de muestras de calibración independientes.....	116
<b>3.5 Predicción de los HAPs antraceno y pireno en muestras de agua potable.....</b>	<b>121</b>
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>123</b>
4.1 Sistema de Excitación con Láser Nd-YAG.....	123
4.2 Sistema de Excitación con Lámpara de Arco de Xenón.....	125
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>126</b>
<b>Capitulo 3 Determinación de Clorofila “a” (Clo “a”) en sistemas acuáticos.....</b>	<b>128</b>
<b>Capítulo 3 Parte 1 Revisión Bibliográfica.....</b>	<b>128</b>
<b>1. Generalidades sobre la Clorofila.....</b>	<b>129</b>
1.1 Productos de Degradación de las Clorofilas.....	131
1.2 Propiedades ópticas de las Clorofilas.....	132
<b>2. Determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos.....</b>	<b>133</b>
2.1 Extracción de Pigmentos Fotosintéticos desde muestras de agua.....	135
2.2 Interferencias en la determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos, por técnicas espectroscópicas.....	138
2.3 Técnicas Clásicas de determinación espectrofotométrica de la Clo “a”..	140

2.4	Técnicas Clásicas de determinación Fluorométrica de la Clo “a”.....	141
2.5	Determinación de la Clo “a” por HPLC.....	143
2.6	Calibración Multivariada y su Aplicabilidad en la detección por métodos espectroscópicos de Clorofilas en muestras de agua.....	146
<b>3.</b>	<b>Justificación y Objetivos.....</b>	<b>147</b>
<b>4.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>151</b>
<b>Capítulo 3 Parte 2 Determinación de Clo “a” en sistemas acuático mediante fluorescencia molecular y Calibración Multivariada.....</b>		<b>157</b>
<b>1.</b>	<b>Parte Experimental.....</b>	<b>158</b>
1.1	Equipos.....	158
1.2	Reactivos y Solventes .....	158
1.3	Muestras.....	159
<b>2.</b>	<b>Metodología Experimental.....</b>	<b>159</b>
2.1	Medición de Fluorescencia.....	159
2.2	Procedimiento de Extracción de pigmentos .....	160
2.3	Estudios de Recuperación de Clo “a” y Clo “b” .....	161
2.4	Modelos de Calibración para la determinación de Clo “a” y la Clo “b” en muestras de agua de mar.....	162
2.4.1	Modelos de Calibración Univariados(CU).....	162
2.4.2	Modelos de Calibración Multivariados (CM).....	163
<b>3.</b>	<b>Resultados Experimentales y Discusiones.....</b>	<b>165</b>
<b>3.1</b>	<b>Espectros de Fluorescencia de disoluciones de las Clorofilas “a” y “b” en etanol.....</b>	<b>165</b>



<b>3.2 Estudios de Recuperación de Clo “a” y Clo “b”</b> .....	<b>168</b>
3.2.1 Evaluación del Procedimiento 1F-0,45 $\mu\text{m}$ en la extracción de pigmentos en muestras de agua de mar.....	169
3.2.2 Evaluación del Procedimiento 1F-0,45 $\mu\text{m}$ sobre muestras de agua de reservorio.....	173
3.2.3 Evaluación del Procedimiento de SPE C-18 en la extracción de pigmentos en muestras de agua de mar. ....	176
<b>3.3 Modelos de CU para la determinación de la Clo “a” y la Clo “b”</b> .....	<b>182</b>
3.3.1 Modelos de CU /Curva de calibración externa (CCE).....	182
3.3.2 Modelos de CU /Método de Adición de estándar (ADS).....	183
<b>3.4 Modelos de CM en la determinación de Clo “a” y Clo “b”</b> .....	<b>184</b>
3.4.1 Modelo PLS1, establecido con soluciones uni-componentes de las soluciones de Clo “a” y Clo “b”. ....	186
3.4.2 Validación de los Modelos de Calibración PLS1.....	188
3.4.3 Aplicación del Modelo PLS1I en la determinación de la Clo “a” en muestras de agua de mar.....	190
3.4.4 Aplicación del Modelo PLS1II en la determinación de la Clo “a” y la Clo “b” en muestras de agua de mar.....	191
3.4.5 Aplicación del Modelo PLS1III en la determinación de la Clo “a” y la Clo “b”.....	194
3.4.6 Aplicación del modelo PLS1III en la determinación de Clo “a”.....	197
<b>3.5 Modelo de CM PLS2</b> .....	<b>198</b>
3.5.1 Validación del Modelo PLS2 en la determinación de la Clo “a” y la Clo “b”. ....	199

3.5.2	Aplicación del modelo PLS2 para la determinación simultánea de Clo “a” y Clo “b”.	201
<b>3.6</b>	<b>Aplicación a muestras reales.</b>	<b>202</b>
<b>4.</b>	<b>Conclusiones.</b>	<b>203</b>
<b>5.</b>	<b>Bibliografía.</b>	<b>205</b>
<b>Capítulo 3</b>	<b>Parte 3 Determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) convencional y Capilar.</b>	<b>207</b>
<b>1.</b>	<b>Parte Experimental.</b>	<b>208</b>
<b>1.1</b>	<b>Instrumentación</b>	<b>208</b>
1.1.1	Cromatografía de Líquidos Convencional (HPLC Convencional)	208
1.1.2	Cromatografía de Líquidos Capilar (HPLC capilar)	208
1.1.3	Fluorímetro	209
<b>1.2</b>	<b>Reactivos y soluciones.</b>	<b>209</b>
<b>1.3</b>	<b>Muestras de Campo.</b>	<b>209</b>
<b>2.</b>	<b>Metodología Experimental.</b>	<b>184</b>
<b>2.1</b>	<b>Procedimientos de pre-concentración de los pigmentos acoplados a HPLC Convencional.</b>	<b>209</b>
2.1.1	SPME en tubo con columna capilar-HPLC convencional	210
2.1.2	Optimización del Sistema de SPME en tubo – HPLC Convencional	211
2.1.3	SPE en línea - HPLC convencional	212
<b>2.2</b>	<b>Procedimientos de pre-concentración de los pigmentos acoplados a HPLC Capilar.</b>	<b>215</b>
2.2.1	SPME en tubo con columna capilar-HPLC capilar	215

2.3	<b>Aplicación de los sistemas de pre-concentración de pigmentos acoplados a HPLC convencional y HPLC Capilar, sobre los extractos de muestra .....</b>	<b>217</b>
2.4	<b>Influencia de los diferentes procedimientos de Extracción de pigmentos en la recuperación de Clo “a” en las muestras.....</b>	<b>219</b>
2.5	<b>Validación del Método.....</b>	<b>219</b>
2.5.1	Límites de Detección .....	219
2.5.2	Repetitividad y Reproducibilidad.....	220
2.5.3	Recuperación.....	220
2.5.3.1	HPLC Convencional.....	220
2.5.3.2	HPLC Capilar.....	220
2.6	<b>Análisis de Muestras .....</b>	<b>221</b>
2.6.1	Análisis de Muestras de Agua de Mar .....	221
2.6.2	Análisis de Muestras de Agua de Reservorio.....	221
2.6.3	Análisis de Muestras de aguas de vertido de planta depuradora.....	221
3.	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>222</b>
3.1	<b>Optimización de los Procedimientos de pre-concentración en línea, acoplado al Sistema de HPLC convencional.....</b>	<b>222</b>
3.1.1	SPME en tubo con columna abierta - HPLC convencional.....	222
3.1.2	SPE en línea - HPLC convencional.....	226
3.1.3	Optimización del sistema SPME en tubo - HPLC capilar.....	229
3.1.3.1	Optimización del Sistema de SPME en tubo – HPLC Capilar en el análisis de muestras.....	232
3.2	<b>Aplicación de los sistemas de pre-concentración en línea de los pigmentos sobre los extractos de muestra.....</b>	<b>236</b>
3.2.1	Sistema SPE en línea .....	236
3.2.2	Sistema SPME en tubo - HPLC Convencional.....	237

<b>3.3</b>	<b>Influencia de los diferentes procedimientos de Extracción de pigmentos en la recuperación de Clo “a” utilizando SPME en tubo-HPLC Convencional.....</b>	<b>243</b>
<b>3.4</b>	<b>Validación del Método.....</b>	<b>247</b>
3.4.1	Linealidad, límites de Detección y Reproducibilidad.....	247
3.4.2	Recuperación.....	250
3.4.2.1	SPME en tubo- HPLC Convencional .....	250
3.4.2.2	SPME en tubo- HPLC Capilar.....	252
<b>3.5</b>	<b>Análisis de Muestras .....</b>	<b>252</b>
3.5.1	Análisis de Muestras de Agua de Mar- SPME en tubo- HPLC Convencional.....	252
3.5.2	Análisis de Muestras de Agua de Reservorio-SPME en tubo CL Convencional.....	254
3.5.3	Análisis de Muestras de Mar- SPME en tubo-HPLC Capilar.....	255
3.5.4	Análisis de Muestras de Aguas de Vertido de Depuradora - SPME en tubo-HPLC Capilar.....	257
<b>4.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>266</b>
<b>5.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>269</b>

## INDICE DE TABLAS

### Capítulo 2 Parte 1 Revisión Bibliográfica sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

**Tabla 2.1** Longitud de onda de Excitación de los cinco HAPs.....56

### Capítulo 2-Parte 2 Aplicación de modelos de CM en la determinación simultánea de antraceno y pireno en muestras de agua de consumo mediante espectroscopia de fluorescencia molecular.

**Tabla 2.2** Condiciones Instrumentales en el sistema de Detección con Fotomultiplicador.....72

**Tabla 2.3** Condiciones Instrumentales del Sistema de Detección CCD.....73

**Tabla 2.4** Relación de la Intensidad de Fluorescencia medio micelar y medio acuoso a las longitudes de emisión máxima.....79

**Tabla 2.5** Parámetros analíticos de CU para antraceno y pireno en medio orgánico, medio micelar a las longitudes de emisión máxima. ....82

**Tabla 2.6** Parámetros Estadísticos calculados aplicando el modelo PLS1 al antraceno y el pireno en medio orgánico y en medio micelar.....88

**Tabla 2.7** Valores codificados y valores naturales para el diseño  $5^2$ .....94

**Tabla 2.8** Composición del conjunto de Muestras de Calibración.....95

**Tabla 2.9** Composición del conjunto de Muestras de Validación.....95

**Tabla 2.10** Parámetros Estadísticos calculados por validación interna aplicando el modelo PLS1 y PLS2 para el antraceno y el pireno en las mezclas de calibración en medio micelar.....97

**Tabla 2.11** Parámetros Estadísticos por validación externa en las mezclas de validación para el antraceno y el pireno en medio micelar, aplicando el modelo PLS1 y PLS2. ....99

<b>Tabla 2.12</b> Valores codificados para una matriz de Doehlert de dos variables.....	103
<b>Tabla 2.13</b> Composición de las muestras del conjunto de calibración utilizando como diseño una matriz de Doehlert de dos variables.....	104
<b>Tabla 2.14</b> Composición de las muestras del conjunto de validación utilizando como diseño una matriz de Doehlert de dos variables.....	104
<b>Tabla 2.15</b> Parámetros Estadísticos obtenidos por validación interna, aplicando los modelos PLS1 y PLS2 para el antraceno y el pireno en las mezclas de calibración en medio micelar utilizando como diseño la matriz de Doehlert.....	106
<b>Tabla 2.16</b> Parámetros Estadísticos calculados por validación externa aplicando el modelo PLS1 y PLS2 para el antraceno y el pireno en las mezclas de validación en medio micelar.....	107
<b>Tabla 2. 17</b> Composición del conjunto de Muestras de Calibración diseño $5^2$ .....	110
<b>Tabla 2.18</b> Parámetros Estadísticos calculados por validación interna aplicando los modelos PCR, PLS1 y PLS2 para el conjunto de muestras de calibración de antraceno y pireno en medio orgánico.....	111
<b>Tabla 2.19</b> Composición del conjunto de Muestras de Validación.....	112
<b>Tabla 2.20</b> Parámetros Estadísticos calculados por validación externa aplicando los modelos PCR, PLS1 y PLS2 para el conjunto de muestras de validación de antraceno y pireno de en medio orgánico.....	113
<b>Tabla 2.21</b> Composición del conjunto de Muestras de Calibración.....	117
<b>Tabla 2.22</b> Composición del conjunto de Muestras de Validación.....	117
<b>Tabla 2.23</b> Parámetros Estadísticos calculados por validación interna aplicando los modelos PLS1 y PLS2 para el antraceno y el pireno en las mezclas de calibración en medio orgánico utilizando un subconjunto de calibración de 6 muestras.....	118
<b>Tabla 2.24</b> Parámetros Estadísticos calculados por validación externa aplicando los modelos PLS1 y PLS2 para cuatro muestras de antraceno y el pireno en medio orgánico.....	119
<b>Tabla 2.25</b> Determinación de antraceno y pireno en agua potable aplicando el modelo PLS1.....	121

<b>Tabla 2.26</b> Determinación de antraceno y pireno en agua potable aplicando el modelo PLS2.....	122
---	-----

**Capítulo 3 Parte 2 Determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos mediante fluorescencia molecular y Calibración Multivariada.**

<b>Tabla 3.1</b> Condiciones Instrumentales Fluorimetro Hitachi F-4500.....	160
---	-----

<b>Tabla 3.2</b> Conjunto de Muestras de Calibración, utilizada para la aplicación del modelo PLS1.....	164
---	-----

<b>Tabla 3.3</b> Propiedades Fluorescentes de la Clo “a” y la Clo “b” determinadas en diferentes solventes. ....	168
--	-----

<b>Tabla 3.4</b> Porcentajes de Recuperación de Clo “a” obtenidos en las muestras de Agua de Mar. ....	173
--	-----

<b>Tabla 3.5</b> Porcentajes de Recuperación de Clo “a” y Clo “b” sobre los extractos de Muestras de Agua de Reservorio.....	176
--	-----

<b>Tabla 3.6 y 3.7</b> Parámetros analíticos obtenidos, por CU para la Clo “a” y Clo “b”.....	183
---	-----

<b>Tabla 3.8</b> Comparación entre el método de CCE y de ADS para la Clo “a” y la Clo “b”.....	184
--	-----

<b>Tabla 3.9</b> Parámetros Estadísticos obtenidos, de los modelos PLS1I, PLS1II y PLS1III, sobre soluciones unicomponentes de Clo “a” y Clo “b”.....	187
---	-----

<b>Tabla 3.10</b> Comparación de los errores RMSECV, RMSEP y RMSEC en los modelos de calibración PLS1I y PLS1 II.....	189
---	-----

<b>Tabla 3.11</b> Predicción de Clorofila “a” en muestras de agua de mar, utilizando los modelos de calibración CCD y PLS1I.....	191
--	-----

<b>Tabla 3.12</b> Predicción de la Clo “a” y la Clo “b”, en muestras de agua de mar, utilizando los modelos de calibración de CCD y PLS1I.....	192
--	-----

<b>Tabla 3.13</b> Porcentaje de Recuperación de la Clo “a” y la Clo “b” en las muestras de agua de mar contaminadas utilizando los modelos de calibración de CCD y PLS1I, establecidos para cada analito.....	193
<b>Tabla 3.14</b> Parámetros Analíticos del Modelo PLS1I, en la predicción de Clo “a” y Clo “b”, en muestras de agua de mar.....	193
<b>Tabla 3.15.</b> Predicción individual, de la Clo “a” y la Clo “b” en muestras de agua de mar, utilizando el modelo PLS1II. ....	196
<b>Tabla 3.16</b> Comparación del error de predicción relativo RRMSEP (%) en la Clo “a” y la Clo “b” en las muestras contaminadas, obtenidos por los modelos de calibración de CCD, PLS 1I y PLS1II.....	197
<b>Tabla 3.17</b> Predicción de Clorofila “a”, en muestras de agua de mar, utilizando el modelo PLS1III, como modelo de calibración. ....	198
<b>Tabla 3.18</b> Parámetros Estadísticos obtenidos del modelo PLS2.....	199
<b>Tabla 3.19</b> Composición del conjunto de Muestras de Validación.....	200
<b>Tabla 3.20</b> Parámetros Estadísticos calculados por validación externa aplicando el modelo PLS2 para la Clo “a” y la Clo “b”, en las mezclas de validación.....	200
<b>Tabla 3.21.</b> Predicción Simultánea de la Clo “a” y la Clo “b”, en muestras de agua de mar, utilizando los modelos de calibración PLS2.....	201
<b>Tabla 3.22</b> Aplicación de los modelos de calibración sobre muestras reales.....	202
<b>Capítulo 3 Parte 3 Determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) convencional y Capilar</b>	
<b>Tabla 3.23</b> Condiciones experimentales utilizadas para la SPME en tubo-CL convencional.....	212



<b>Tabla 3.24</b> Condiciones experimentales utilizadas en el Sistema de SPE en tubo con columna empacada.....	214
<b>Tabla 3.25</b> Condiciones Experimentales utilizadas en la SPME en tubo -CL capilar...	217
<b>Tabla 3.26</b> Parámetros cromatográficos estimados en los cromatogramas de las figuras 1 y 2 obtenidos de la SPME en columna capilar TRB-5 modificando las variables del tamaño del bucle y volumen de muestra procesado. ....	225
<b>Tabla 3.27</b> Optimización del tamaño de bucle y volumen de inyección, para una solución de Clo “a” de 50 ppb, analizada por un sistema de HPLC de pre-columna-columna analítica. ....	227
<b>Tabla 3.28</b> Comparación de la sensibilidad, alcanzada por el sistema cromatográfico, mediante inyección directa y de vaciado de bucle. ....	235
<b>Tabla 3.29</b> Comparación de las concentraciones de Clo “a” obtenidas mediante diferentes procedimientos de extracción de pigmentos en muestras de agua de mar contaminadas con este analito. ....	244
<b>Tabla 3.30</b> Parámetros Estadísticos obtenidos en los sistemas de Extracción en tubo acoplados a CL Convencional y CL Capilar bajo las condiciones experimentales óptimas. ....	248
<b>Tabla 3.31</b> Concentración de Clo “a” obtenida, en muestras contaminadas, analizadas por SPME en tubo con bucle TRB-5 de 50µL-CL convencional y análisis por Fluorescencia. ....	251
<b>Tabla 3.32</b> Concentración de Clo “a” obtenida, en muestras de aguas contaminadas, mediante análisis con SPME en tubo (bucle de 50µL) -HPLC capilar. Se aplicó el método de extracción, 1F-0,45. ....	252
<b>Tabla 3.33</b> Concentración de Clo “a” obtenida en muestras de aguas de mar, mediante el sistema SPME en tubo- HPLC convencional. ....	253

**Tabla 3.34** Concentraciones de Clo “a” obtenidas en muestras de aguas de reservorio, mediante análisis con SPME en tubo con bucle de 50  $\mu$ L –CL convencional y por fluorescencia.....255

**Tabla 3.35** Identificación de pigmentos fotosintéticos en muestras de aguas de plantas depuradora, analizadas por SPME en tubo-CL Capilar.....265

## INDICE DE ILUSTRACIONES

### Capítulo 1 Marco Teórico

Figura 1.1 Diagrama de Jablonski.....32

### Capítulo 2 Parte 1 Revisión Bibliográfica sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs).

**Figura 2.1** Estructura Química de algunos HAP<sub>s</sub>.....52

**Figura 2.2** Espectros de emisión de Fluorescencia de los HAP<sub>s</sub>: ANT, 9,10 DPA, 9,10 BPA, PER y PIR. ....57

### Capítulo 2-Parte 2 Aplicación de modelos de CM en la determinación simultánea de antraceno y pireno en muestras de agua de consumo mediante espectroscopia de fluorescencia molecular

**Figura 2.3** Montaje Experimental para medidas de Fluorescencia inducida por un láser Nd:Yag a una longitud de onda de excitación de 355nm.....70

**Figura 2.4** Montaje Experimental para medidas de Fluorescencia inducida por una lámpara de Arco de xenón. ....74

**Figura 2.5** Espectro de Fluorescencia de Solución de soluciones de pireno de I) 100 ppb de concentración, en los medios orgánico, micelar y acuoso. Excitación con láser Nd-Yag y II) de 1 ppm en: a) medio orgánico y b) medio micelar. Excitación con lámpara de arco de Xenón y detección simultánea con CCD. ....75

<b>Figura 2.6</b> Espectro de Fluorescencia para soluciones de antraceno, de 100 ppb de concentración, en los medios orgánico, micelar y acuoso. Excitación con láser Nd-Yag y detección simultánea con CCD. ....	76
<b>Figura 2.7.</b> Espectros de fluorescencia para soluciones de antraceno, obtenidos con el sistema de lámpara de arco de Xenón y detección simultánea con CCD. ....	78
<b>Figura 2.8</b> Espectros de Fluorescencia, obtenidos con PMT para soluciones de antraceno y pireno de 500 ppb de concentración, en medio micelar.....	80
<b>Figura 2.9</b> Espectro de Fluorescencia para: I) soluciones de pireno y antraceno de 100 ppb en medio acuoso. La suma del espectro de estas soluciones; y el espectro de una mezclas de antraceno y pireno a una concentración de 100ppb de cada elemento. II) las mismas soluciones pero en medio orgánico y a un 1 ppm de concentración. En I excitación con láser Nd-YAG a 355 nm y en II con lámpara de arco de xenón.....	85
<b>Figura 2.10</b> Parámetros de CM, aplicando PLS1 para el antraceno en metanol, (a) gráfico de puntuaciones (“scores”), (b) coeficientes de regresión, (c) RMSEC vs factores o componentes principales y (d) Correlación entre valor predicho y valor medido.....	91
<b>Figura 2.11</b> Parámetros de CM, aplicando PLS1 para el antraceno en metanol, (a) gráfico de RMSEC/RMSEP, (b) Correlación entre valor predicho y valor medido, suprimiendo valores anómalos. ....	92
<b>Figura 2.12</b> Diseño de Calibración $5^2$ para un conjunto de calibración de 25 muestras.....	93
<b>Figura 2.13</b> Comparación entre los valores de referencia y lo valores predichos para el a) Antraceno y b) para el Pireno, aplicando los modelos PLS1 y PLS2 en el conjunto de 25 muestras de Validación. ....	100
<b>Figura 2.14</b> Diseño Matriz de Doehlert para dos variables.....	102
<b>Figura 2.15</b> (a) Espectro de Absorción del Antraceno y (b) Espectro de Absorción del Pireno.....	109
<b>Figura 2.16</b> Comparación de los errores de calibración, validación cruzada y validación externa la determinación de antraceno, utilizando diferentes modelos de calibración.....	114

**Figura 2.17** Comparación de los errores de calibración, validación cruzada y validación externa la determinación de pireno, utilizando diferentes modelos de calibración. ....115

**Figura 2.18** Influencia de los modelos de calibración sobre el error de predicción relativo, RRMSEP (%), en la predicción de antraceno y de pireno.....115

**Figura 2.19** Influencia de los modelos de calibración sobre el error de predicción relativo (RRMSEP (%)) en la predicción de antraceno y de pireno utilizando los diferentes conjuntos de calibración.....120

### **Capítulo 3 Parte I Revisión Bibliográfica.**

**Figura 3.1 a)** Estructura química de las Clorofilas a, b y d.....129

**Figura 3.1 b)** Estructura química de las Clorofila c.....130

**Figura 3.2** Formación de los feopigmentos de la Clorofila “a”.....132

**Figura 3.3** Diagrama de Energía en los procesos de excitación y relajación de la molécula de clorofila.....133

**Figura 3.4** Espectros de absorción y de fluorescencia molecular de la Clo “a” y la Clo “b”.....139

### **Capítulo 3 Parte 2 Determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos mediante fluorescencia molecular y Calibración Multivariada.**

**Figura 3.5** Espectros de Fluorescencia de una solución de Clo “a” de 500 ppb en etanol, a un intervalo de excitación entre 420 y 460 nm.....165

**Figura 3.6** Espectros de Fluorescencia, para una solución de Clo “b” de 500 ppb en etanol, a un intervalo de excitación entre 420 y 460 nm. ....166

<b>Figura 3.7</b> Espectros de Fluorescencia de los pigmentos extraídos en etanol de la muestra de agua de mar, en un intervalo de longitudes de onda de excitación entre 420 y 460 nm.....	169
<b>Figura 3.8</b> Espectros de Fluorescencia obtenido a una $\lambda_{exc}$ a 430nm para: a) Blanco de la muestra b) Extracto de la muestra en etanol y c) Solución patrón de 10 ppb de Clo "a" en etanol.....	170
<b>Figura 3.9</b> Espectros de Fluorescencia de los pigmentos extraídos en etanol a una $\lambda_{exc}$ a 430nm desde: a) extracto de muestra en etanol b) extracto de muestra de agua contaminada con 24 ppb de Clo "a" con sustracción del espectro de a y c) la solución patrón de 250 ppb de Clo "a".....	171
<b>Figura 3.10</b> Espectros de Fluorescencia obtenidos a una $\lambda_{exc}$ a 460nm de los pigmentos extraídos en etanol, provenientes de: a) el extracto de la muestra b) Solución patrón de 250 ppb de Clo "b" y c) extracto de la muestra contaminada con 24 ppb de Clo "b".....	172
<b>Figura 3.11</b> Espectros de Fluorescencia de los pigmentos extraídos en etanol, provenientes de la muestra de agua de reservorio, previamente filtradas con filtro de 8 $\mu$ m.....	174
<b>Figura 3.12</b> Espectros de Fluorescencia obtenidos a una $\lambda_{exc}$ a 460nm de los pigmentos extraídos en etanol provenientes de: a) la muestra b) la muestra de contaminada con 24 ppb de Clo "b" y c) Solución de Clo "b" de 250 ppb.....	175
<b>Figura 3.13</b> Espectros de Fluorescencia a $\lambda_{exc}$ de 430nm para: a) Solución patrón de Clo "a" de 250 ppb, b) Solución patrón de Clo "b" de 250 ppb y para los extractos obtenidos por SPE C-18 desde: c) la muestra d) la muestra contaminada con 38,46 ppb de Clo "a" y d) la muestra contaminada con 38,46 ppb de Clo "b" .....	177

**Figura 3.14** Espectros de Fluorescencia a  $\lambda_{exc}$  de 460nm para: a) Solución patrón de Clo "a" de 250 ppb, b) Solución patrón de Clo "b" de 250 ppb y para los extractos obtenidos por SPE C-18 desde: c) la muestra d) la muestra contaminada con 38,46 ppb de Clo "a" y d) la muestra contaminada con 38,46 ppb de Clo "b" .....178

**Figura 3.15** Espectros de Fluorescencia obtenidos a una  $\lambda_{exc}$  de 450nm para: a) solución de Clo "a" de 500ppb , b) Solución de Clo "b" de 500ppb, c) Mezcla de solución de Clo "a" y Clo "b" de 500 ppb, d) Suma aritmética de los espectros individuales de la soluciones de Clo "a" y Clo "b" de 500ppb.....185

**Figura 3.16** Espectro de Fluorescencia de Mezclas de Clo "a" y Clo "b" y soluciones patrones de estos analitos a una  $\lambda_{exc}$  de 430nm. ....194

**Figura 3.17** Espectro de Fluorescencia de Mezclas de Clo "a" y Clo "b" y soluciones patrones de estos analitos a una  $\lambda_{exc}$  de 460nm. ....195

**Capítulo 3 Parte 3 Determinación de Clo "a" en sistemas acuáticos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) convencional y Capilar**

**Figura 3.18** Diagrama Esquemático de la configuración para la SPME en tubo. a) Posición "Load" (carga) y b) Posición "inject" (inyección).....211

**Figura 3.19** Diagrama Esquemático-Sistema Cromatográfico de Acoplamiento de Dos Columnas-SPE en columna empacada.....213

**Figura 3.20.** Sección de Cromatogramas obtenidos en SPME en tubo –HPLC convencional. ....224

**Figura 3.21** Optimización del tamaño del bucle en el sistema SPE en línea-HPLCconvencional. Los cromatogramas se obtienen realizando una inyección de una solución de Clorofila "a" de 50 ppb en etanol.....228

**Figura 3.22** Sección de Cromatogramas para evaluar la inyección de la Clo "a", en el sistema de SPME en tubo-CL.....230

<b>Figura 3.23</b> Optimización del volumen de muestra y del tamaño de bucle.....	232
<b>Figura 3.24</b> Optimización del porcentaje de agua, añadido en los extractos de muestra analizadas.....	233
<b>Figura 3.25</b> Optimización del procedimiento de inyección de muestra sobre la sensibilidad alcanzada en la detección de Clo “a” en muestras reales (factor de preconcentración: (10:1). ....	234
<b>Figura 3.26.</b> Cromatogramas de Extractos de Muestra obtenidos con el sistema de SPE en línea con bucle de 200 $\mu\text{L}$ .....	237
<b>Figura 3.27.</b> Cromatogramas de Extractos de Muestra de agua de mar, obtenidos con el sistema SPME en tubo- HPLC Convencional. ....	239
<b>Figura 3.28.</b> Cromatogramas de Extractos de Muestra de agua de mar, obtenidos con el sistema HPLC, con bucle de 50 $\mu\text{L}$ .....	240
<b>Figura 3.29</b> Sección de Cromatogramas, obtenidos para los extractos de muestras de agua de mar, utilizando el método de extracción Empore C-18 y el sistema SPME en tubo con bucle de 50 $\mu\text{L}$ .....	241
<b>Figura 3.30</b> Cromatogramas de Extractos de Muestra, obtenidos con el sistema HPLC, con bucle TRB-5 de 50 $\mu\text{L}$ con disco empore, c-18 (10:0.25). ....	242
<b>Figura 3.31</b> Influencia de diferentes procedimientos de extracción en la recuperación de Clo “a” en muestras de agua de mar calculados desde una muestra contaminada con 1,99 ppb de Clo “a”.....	246
<b>Figura 3.32</b> Correlación de valores de concentración de Clo “a” ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) determinada por SPME en tubo-CL convencional y Fluorescencia, en muestras de agua de mar.....	251
<b>Figura 3.33</b> Cromatogramas de extractos de muestras de agua de mar, mediante análisis por el sistema de SPME en tubo-HPLC capilar. a) 430nm y b)660nm.....	256
<b>Figura 3.34</b> Cromatograma de extracto de muestra de agua de planta de tratamiento, obtenida por análisis de SPME en tubo-HPLC capilar.....	257

<b>Figura 3.35</b> Sección de Cromatogramas de extractos de muestra de agua de planta de tratamiento, obtenida por SPME en tubo-HPLC capilar.....	259
<b>Figura 3.36</b> Cromatogramas de extractos de muestra de agua de planta de tratamiento, obtenida por análisis de SPME en tubo-HPLC capilar. La detección se realiza a una $\lambda_{abs}$ de 460nm.....	260
<b>Figura 3.37</b> Cromatogramas de extractos de muestra de agua de depuradora, obtenida por análisis de SPME en tubo-HPLC capilar. La detección se realiza a una $\lambda_{abs}$ de 430nm.....	263
<b>Figura 3.38</b> Cromatogramas de extractos de muestra de agua de planta de tratamiento, obtenida por análisis de SPME en tubo-HPLC capilar. La detección se realiza a una $\lambda_{abs}$ de 460nm. ....	264



## RESUMEN

La aplicación de la calibración multivariada (CM) en el área de la química analítica, ha marcado un precedente en el análisis multi-componente de muestras complejas. Mediante esta calibración, es posible interpretar la información multivariable suministrada por diversos análisis químicos y concentrarla en un pequeño número de variables latentes (componentes principales) que contienen la información química de mayor relevancia. Esto ha permitido utilizar técnicas de espectros completos, tales como espectroscopia de infrarrojo y de absorción y fluorescencia molecular en la determinación cuantitativa de un elevado número de compuestos en una amplia diversidad de muestras, ya sea mediante análisis simultáneo o en presencia de otras especies interferentes. En este sentido, en este trabajo se planteó el uso de modelos de CM mediante algoritmos de mínimos cuadrados parciales PLS en la cuantificación simultánea de analitos orgánicos en muestras de agua, mediante fluorescencia molecular. En una primera etapa del estudio, se realizó la determinación simultánea semi-cuantitativa de dos hidrocarburos aromáticos poli-cíclicos (HAPs): antraceno (Ant) y pireno (Pir) en muestras de agua potable. Para la determinación de los HAPs se utilizaron tres configuraciones experimentales: a) un láser pulsado Nd-YAG a 355nm (sistema 1) y b) una lámpara de arco de xenón (sistema 2). En ambos casos se registro la señal analítica mediante un detector simultáneo CCD. En la tercera configuración experimental se modificó el sistema de detección de la fluorescencia inducida por láser (LIFs), empleando un sistema de integración boxcar junto con un detector de respuesta rápida (sistema 3). Para los tres sistemas de medidas, fueron evaluadas las propiedades fluorescentes de los HAPs en diferentes medios de disolución: medio orgánico, medio acuoso y medio micelar. En el sistema 1, se escogió el medio micelar y en el sistema 2 la determinación de los analitos se realizó en medio orgánico.

Diferentes estrategias fueron utilizadas para la construcción de los conjuntos de calibración y validación empleados en la CM. Se utilizaron diseños multinivel: diseño factorial  $5^2$ , matriz de doehlert y planteamiento de conjuntos de calibración simplificados, formado por un pequeño número de muestras. En los conjuntos anteriores, fueron aplicados los algoritmos de calibración multivariante con regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS): PLS1 y PLS2. El ajuste de ambos modelos de calibración y la capacidad predictiva de estos, se evaluó mediante validación cruzada interna y validación externa. Los resultados obtenidos por validación externa indican que la matriz de Doehlert resultó ser un diseño de calibración más eficiente que el diseño factorial para realizar la determinación de antraceno y pireno en medio micelar por CM. Por otro lado, los mejores valores del error de predicción relativo (RRMSEP) : del 5% para el antraceno y 6% para el pireno, fueron obtenidos cuando se utilizó un conjunto de calibración y validación simplificado. Se demuestra entonces que la construcción del modelo de calibración influye en la eficiencia del modelo PLS, en este estudio se obtiene una predicción satisfactoria de los analitos por validación externa sin requerir el uso de un elevado número de estándares de calibración.

La aplicación de los modelos PLS1 y PLS2, permitió la determinación semi-cuantitativa de antraceno y pireno en presencia de la matriz de compuestos inorgánicos de muestras de agua potable, sin separación previa de los analitos. Se analizaron cuatro muestras, con el modelo PLS1, se obtienen porcentajes de recuperación entre el 88 y el 112 % del antraceno y del 88 y 75% para el pireno. En el modelo PLS2, la recuperación del antraceno varía del 117% al 84% y la del pireno va desde el 98 al 49%, indicando este último valor una poca capacidad predictiva respecto a esta muestra.

En una segunda etapa de este trabajo de investigación, se desarrolló la determinación selectiva de la Clo "a" en sistemas acuáticos. En una primera fase experimental se utilizó la técnica de fluorescencia molecular y en una segunda fase la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Inicialmente fueron ensayados dos procedimientos de extracción de pigmentos: a) método 1F-0,45 y b) método SPE C-18; en el primero se utilizó un filtro de membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y diámetro de 12mm, como medio filtrante para la retención del fitoplancton. En el segundo procedimiento se realiza la extracción en fase sólida (SPE) en cartuchos C-18, de los organismos del fitoplancton contenidos en las muestras analizadas. En ambos procedimientos se utilizó etanol como solvente de extracción. Se aplicó el procedimiento de "spiking" sobre las muestras analizadas, para evaluar la eficiencia de estos métodos de extracción. Se comparó entonces la aplicación de modelos de calibración univariados, curva de calibración externa y adición de estándar con modelos multivariados PLS sobre las muestras "spiked". Se obtiene que la mejor eficiencia de extracción para la Clo "a" fue alcanzada por el método 1F-045, ya que se obtienen porcentajes de recuperación cercanos al 100%. Esto indica pérdidas mínimas del analito durante la extracción y la ausencia de errores sistemáticos. No obstante el método 1F-0,45 no fue eficiente en la extracción de la Clo "b". Una pobre eficiencia en la recuperación de la Clo "a" y la Clo "b" en las muestras fue obtenida con el procedimiento SPE C-18. Por otro lado, en todos los casos hay un incremento en la exactitud del análisis mediante la aplicación de los modelos PLS1. .

Bajo las condiciones óptimas de los procedimientos de extracción, se realizó la determinación selectiva de la Clo "a" por fluorescencia en muestras de agua de mar y de reservorio alcanzado un límite de detección de 1,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ . La concentración de Clo "a" encontradas en las muestras se encontró por debajo de los límites de detección.

En la segunda fase experimental de este estudio, fueron establecidos dos métodos isocráticos de separación por HPLC convencional y HPLC capilar para la determinación rápida y sensible de Clo “a” en muestras de aguas de mar, de reservorio y de vertido de depuradora. Por HPLC convencional se alcanzó un LOD de  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  y por HPLC - Capilar de  $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ . Un aumento en la sensibilidad de la determinación por HPLC fue alcanzado, mediante un sistema de pre-concentración en línea de los analitos, de micro extracción en fase sólida (SPME) en tubo en una fase estacionaria de polidimetilsiloxano (PDMS) de una columna capilar abierta de Cromatografía de gases (CG), acoplado a ambos sistemas cromatográficos utilizados. Finalmente, se comparó la técnica de HPLC convencional con SPME en tubo y la de fluorescencia molecular en el análisis de muestras “spiked”, obteniendo un elevado coeficiente de correlación entre los métodos de  $r^2$  de 0,9874. Los resultados obtenidos mediante estas técnicas permitió validar el método 1F 0,45 como método de extracción de la Clo “a”.

El siguiente trabajo de investigación fue presentado en este manuscrito, en una secuencia de tres capítulos. El primero corresponde a un marco teórico donde se presentan conceptos básicos acerca de la CM y la técnica de fluorescencia molecular. El segundo capítulo se divide en dos secciones: en la primera se presentó una breve revisión bibliográfica los HAPs, sus propiedades, técnicas de análisis y algunos antecedentes sobre la aplicación de CM en la cuantificación de los estos. En la segunda sección se presentan los resultados experimentales obtenidos mediante la aplicación de diversas estrategias de CM y fluorescencia molecular en la determinación de antraceno y pireno en muestras de agua potable. El tercer capítulo está dividido en tres secciones: la primera consiste de una revisión bibliográfica del proceso de determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos. En la segunda sección se presentan los resultados obtenidos, mediante el desarrollo de un método fluorométrico y la aplicación de CM para la determinación selectiva de la Clo “a”. En la tercera sección se presentan los resultados obtenidos mediante la aplicación de métodos HPLC en la determinación de la Clo “a”.

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**POSTGRADO EN QUIMICA**



**Aplicaciones de Calibración Multivariada en la Determinación de Algunos analitos orgánicos en muestras de agua mediante la Técnica de Fluorescencia Molecular.**

Autor: Lic. Yosmery del Valle Vitta Brito.

Tutor: Dr. Alberto Fernández.

## **CAPITULO 1**

### **MARCO TEÓRICO**

## 1 INTRODUCCIÓN

En investigaciones ambientales<sup>1</sup> se ha reportado que determinadas sustancias químicas a muy bajos niveles de concentración ya sea a niveles de trazas o del orden de concentración de ultra- trazas contenidas en una amplia diversidad de muestras tales como aire, agua o suelos, pueden producir algún impacto especial sobre el medio ambiente que los rodea. Este impacto puede estar asociado con efectos perjudiciales sobre los seres vivos, alteración del equilibrio de los sistemas biológicos, problemas ambientales, etc. Por esta razón, en las investigaciones actuales del tipo medio-ambiental existe un gran interés en la determinación de compuestos químicos en el orden de las partes por billón e incluso a concentraciones inferiores.

Desde el punto de la química analítica la cuantificación de analitos en cantidades trazas o ultra-trazas esta sujeta a una serie de limitaciones<sup>2</sup>, entre las más importantes podemos señalar las siguientes:

- ◆ Se requiere de procesos de pre-concentración del analito. Estos procedimientos aumentan las etapas de preparación de la muestra, lo que incrementa la posibilidad de pérdidas y contaminación del analito, así como también aumenta la posibilidad de alteración de sus propiedades químicas en la muestra.

- ◆ A medida que disminuye la concentración del analito, debe haber un estricto control de calidad en los reactivos y procedimiento de preparación de la muestra.

- ◆ Una inter-comparación entre los resultados obtenidos en la cuantificación de un analito por diversos laboratorios es poco probable, debido a que se obtienen diferencias significativas en la cuantificación. Esto es la exactitud en la determinación de elementos trazas llega a ser bastante baja.

- ◆ Se requiere de técnicas instrumentales que alcancen la sensibilidad requerida en la determinación. En general, mientras más baja sea la concentración requerida hay un incremento en el costo de análisis, tiempo de análisis, etc.

Todas estas limitantes influyen de forma significativa en la determinación de componentes en cantidades trazas en muestras ambientales. Por otro lado, este tipo de muestras se caracteriza por poseer matrices complejas con una alta cantidad de compuestos que suelen producir sendas interferencias durante la determinación de un compuesto en particular; presentan una alta variabilidad y a menudo la concentración de los analitos está por debajo del límite de detección de los métodos analíticos.

El análisis de muestras ambientales para la determinación de compuestos químicos específicos en cantidades ultra- trazas resulta un reto a seguir en la aplicación de la química analítica en el medio ambiente.

La escogencia de la técnica analítica a utilizar para la cuantificación de un componente en cantidades trazas en una muestra ambiental estará vinculada necesariamente al analito y al tipo de muestra como tal. Normalmente se requiere de técnicas con muy bajos límites de detección, una elevada sensibilidad y la posibilidad de separación del analito de la matriz. En general las técnicas analíticas que presentan estas características son las cromatográficas bien sea cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (CG) acopladas a sistemas de detección de elevada sensibilidad, tales como los detectores de espectrometría de masas, detectores de fluorescencia en el caso de la HPLC, etc. No obstante estas técnicas presentan un costo elevado, ya que se necesita disponer de una instrumentación analítica sofisticada e invertir bastante tiempo en optimizar las condiciones de separación. Además en algunos casos el análisis de la muestra requiere que la técnica sea no destructiva. Estas limitantes hace que se recurra muchas veces a otros tipos de técnicas analíticas que se adecuen a las exigencias del análisis de elementos trazas.



Una alternativa es el uso de las técnicas espectroscópicas en particular de la fluorescencia molecular<sup>3</sup> la cual se caracteriza por poseer una elevada sensibilidad con niveles de detección del orden de partes por billón, un amplio intervalo de trabajo de tres a cinco ordenes de magnitud y una relativa selectividad en la determinación de ciertos compuestos. También destaca su simplicidad y la capacidad de procesamiento de un elevado número de muestras en poco tiempo. Por otro lado la fluorescencia es muy útil en el caso en donde no hay disponibilidad de grandes cantidades de muestra.

La principal limitación que presenta la técnica de fluorescencia es su falta de selectividad en la detección. Esta limitación se incrementa cuando se realiza el análisis de muestras complejas tales como las muestras ambientales, más aún si se pretende determinar simultáneamente varios compuestos a bajas concentraciones.

La alternativa clásica para resolver la falta de selectividad en la mayoría de los procedimientos analíticos es la separación previa de los componentes químicos puros antes de analizarlos. Esta separación suele realizarse generalmente mediante pre-tratamiento de la muestra para aislar los analitos de los interferentes o si se requiere que la separación sea total se utilizan técnicas cromatográficas. El paso posterior es la determinación cuantitativa de los analitos mediante métodos de calibración univariados.

Una herramienta estadística que actualmente ha tenido una amplia aplicación en la química analítica y en especial en técnicas poco selectivas, es la quimiometría<sup>4</sup>; la cual es una disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos experimentales. En general, los métodos quimiométricos permiten extraer la información requerida sobre los componentes de interés de las muestras a partir del tratamiento de datos sin separación previa de los analitos.

La calibración multivariante<sup>5</sup> (CM) pertenece a los denominados métodos quimiométricos. En este tipo de calibración se desarrolla un modelo matemático que permite extraer la máxima información química del análisis de muestras a partir de toda o gran parte de la respuesta instrumental que éste correlacionada entre sí. Se establecen entonces modelos de calibración predictivos de una propiedad a determinar como por ejemplo la concentración de un analito.

Entre las ventajas de la CM tenemos que: se aumenta la precisión del análisis debido a las múltiples medidas instrumentales, permite detectar la presencia de interferencias físicas y químicas desconocidas corrigiéndolas por modelaje matemático, determinación simultánea de los componentes de una muestra en poco tiempo y disminución de los costes de análisis.

La CM permite la resolución de sistemas químicos complejos aún cuando estén presentes fuentes de variación físicas o químicas tales como: interferencias, ruido, desviaciones de la linealidad, sin realizar ningún tratamiento previo a la muestra. En consecuencia, la CM surge como una alternativa a la falta de selectividad de técnicas tales como la fluorescencia. Por esta razón se ha incrementado el uso de la fluorescencia molecular en la determinación simultánea multicomponente de compuestos a niveles trazas en muestras de matriz compleja tales como las muestras ambientales.

## 2 PRINCIPIOS BÁSICOS DE FLUORESCENCIA

Como consecuencia del proceso de absorción de un fotón de luz, las moléculas pasan a un estado excitado de mayor energía, el paso siguiente a la absorción es la pérdida de energía absorbida por diferentes mecanismos de relajación. Las moléculas se deben relajar de cualquiera de los niveles vibracionales en su estado electrónico excitado hacia su estado fundamental. Un estado electrónico molecular donde los espines de los electrones están apareados se denomina estado singlete. Cuando un electrón del estado fundamental es excitado a un nivel de energía superior pasa un estado singlete o triplete, en este último los electrones quedan desapareados<sup>6</sup>. La **fluorescencia**<sup>3</sup>, es la emisión que resulta desde un estado singlete excitado al estado fundamental (órbita de más baja energía), que no requiere un cambio en la orientación del espín.

En el proceso de fluorescencia ocurren tres etapas consecutivas; estas son: la excitación o absorción, formación de uno o más estados excitados, las transiciones no radiactivas entre los estados excitados por conversión interna y relajación vibracional y las pérdidas de energía por emisión de la radiación de fluorescencia, tal y como se muestra en la figura 1, que corresponde al diagrama de Jablonski<sup>7</sup>. En este diagrama  $S_0$  representa el estado singlete fundamental, mientras que  $S_1$  representa el primer estado singlete excitado y  $S_2$  el segundo estado singlete excitado. Cada uno de estos estados electrónicos excitados está asociado a numerosos niveles de energía vibracional.

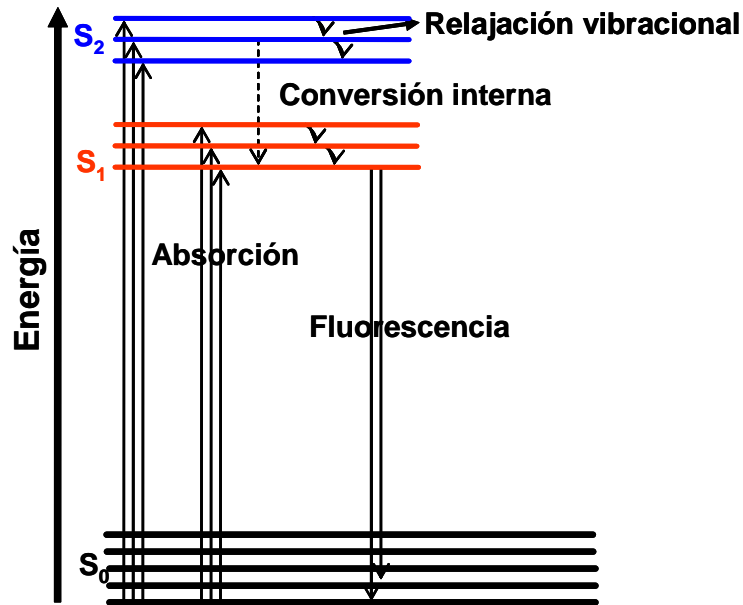


Figura 1. 1 Diagrama de Jablonski

En fluorescencia se distinguen dos tipos de espectros: el de excitación y el de emisión, los cuales reflejan el rango de energía asociado con los estados excitados de los fluoróforos. Para realizar el espectro de excitación se mide la intensidad fluorescente a una longitud de onda fija mientras se varía la longitud de onda de excitación, mientras que en el espectro de emisión de fluorescencia se utiliza una excitación a una longitud de onda fija y se registra la intensidad de emisión en función de la longitud de onda.

La espectroscopia de fluorescencia está asociada a moléculas que poseen electrones  $\pi$  deslocalizados que pueden colocarse en los niveles más bajos del estado singlete excitado. En sistemas aromáticos poli-cíclicos donde existe un gran número de electrones  $\pi$  disponibles, se obtienen elevadas intensidades de fluorescencia.

Entonces se emplea la espectroscopia de fluorescencia como técnica de análisis cualitativo y cuantitativo en moléculas aromáticas o que poseen en sus estructuras múltiples enlaces dobles conjugados con un alto grado de estabilidad por resonancia, que denominaremos fluoróforos.

### 2.1 Instrumentación para la medición de Fluorescencia

Para la obtención de los espectros de fluorescencia molecular, se utiliza un sistema instrumental, que consta en general de una fuente de excitación, un filtro o monocromador de excitación, el contenedor de la muestra, un filtro o monocromador de emisión y finalmente el detector y sistema de lectura. Las fuentes de excitación que se utilizan son lámparas incandescentes (ejemplo halógeno-tungsteno), lámparas de arcos como las de mercurio y xenón, láser y diodos de emisión de luz (led), luego se utilizan filtros de interferencia o monocromadores que permiten la separación de la longitud de onda. La muestra es contenida en celdas de cuarzo o de vidrio según la región del espectro que se este trabajando; se utiliza otro monocromador o filtro para seleccionar un rango específico de emisión de la radiación de fluorescencia. La detección de la fluorescencia se realiza en ángulo recto con respecto a la fuente de excitación con un detector fotoeléctrico: fotomultiplicador o detectores del estado sólido.

### 2.2 Aspectos Cuantitativos de la Fluorescencia Molecular

Existe una relación cuantitativa derivada de la ley de Beer, entre la intensidad de fluorescencia ( $F_o$ ) y la concentración. Para soluciones diluidas ésta relación se expresa mediante la siguiente ecuación<sup>3</sup>:

$$F_o = (2.3)kI_0\phi \epsilon_\lambda lc \quad [1]$$

Donde  $\phi$  es el rendimiento cuántico del cromóforo,  $\epsilon_{\lambda}$  es la absorptividad molar a  $\lambda_{exc}$ ,  $l$  es el camino óptico en la muestra,  $c$  es la concentración del analito y  $k$  es una constante que involucra factores instrumentales.

En esta ecuación se observa que existe una dependencia lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración, la cual se cumple en soluciones diluidas. A altas concentraciones se producen desviaciones negativas de la linealidad debido a fenómenos de auto-quenching y auto-absorción. El auto-quenching resulta del aumento de las colisiones entre las moléculas y consecuente pérdida de energía por transferencias no-radiactivas. La auto-absorción se produce cuando las longitudes de onda de absorción y emisión se solapan, la radiación de fluorescencia emitida se absorbe por la misma muestra, lo que se denomina efecto de filtro interno.

De la ecuación 1, se observa que la intensidad de fluorescencia también se relaciona linealmente con la intensidad de excitación, por lo que se puede aumentar la sensibilidad del análisis trabajando a altas intensidades de excitación para así obtener altas relaciones señal/ruido.

### 3. CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE:

La calibración<sup>8</sup>, se define como un proceso que permite establecer la relación entre la respuesta de un instrumento y la propiedad del analito a determinar, utilizando un conjunto de muestras representativas. Una clasificación bastante sencilla de los métodos de calibración es la siguiente:

- Univariable-Multivariable: en función del número de variables de la respuesta instrumental.
- Lineales-No lineales: según la función que relaciona las variables.
- Directos-Indirectos: si los parámetros de calibración se calculan en función de los espectros puros o de las mezclas.

- Clásica-Inversa: en función de cuál sea la variable independiente utilizada (concentración o señal analítica, respectivamente).
- Espectro Completo-Selección de variables: según el número de variables utilizadas.
- Rígidos-Flexibles: en los primeros se debe poseer información de todas las especies que contribuyen a la señal, mientras que en los segundos se tiene información solo del analito que se desea cuantificar.

La calibración univariable<sup>9</sup>, es el tipo más sencillo de calibración, en esta se obtiene un solo valor numérico y es la que se aplica principalmente en las determinaciones cuantitativas tradicionales. Matemáticamente se realiza un ajuste de mínimos cuadrados, obteniéndose normalmente una línea recta entre la respuesta del instrumento y la propiedad a determinar. En este tipo de calibración se supone que la respuesta del instrumento se debe solo a una especie química de la muestra y se excluye la presencia de interferencias.

La poca selectividad de algunos métodos tradicionales de análisis, se puede resolver mediante la aplicación de herramientas estadísticas que permiten el paso del análisis univariado (medidas instrumentales a una sola longitud de onda) a medidas espectrales (multivariantes) con una gran cantidad de información. Esto mediante el uso de algoritmos matemáticos que permiten la resolución de estos sistemas multivariantes de forma eficiente. Este conjunto de herramientas estadísticas se engloban dentro de los métodos de CM los cuales son parte esencial del análisis multicomponente en técnicas analíticas pocas selectivas.

La **regresión lineal múltiple (MLR)**<sup>5</sup>, constituye el modelo más simple utilizado en CM. Para la MLR hay dos modelos de regresión posible el clásico y el inverso, en el **clásico** se supone cumplimiento de la Ley de Beer en todo el intervalo de trabajo. La señal debida a una muestra es función de la concentración de cada componente por un coeficiente de proporcionalidad, esta se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$R = K_{j1}c_1 + K_{j2}c_2 + K_{j3}c_3 + K_{j4}c_4 + e_j \quad [2]$$

Siendo esta ecuación válida para una muestra que contenga n componentes,  $c_i$  es la concentración del componente i,  $k_{ji}$  es el coeficiente de proporcionalidad de cada muestra, siendo igual al producto de su absorptividad molar por el camino óptico,  $e_j$  es el error aleatorio de la medida. Este es un método de espectro completo, que incluye mayor información espectral que aquellos métodos con menor número de variables. La MLR clásica solo es aplicable en determinaciones simultáneas, si se conocen todos los componentes que contribuyen a la señal analítica, no hay efectos de matriz ni interacciones químicas o físicas entre los analitos, el ruido es aleatorio y tiene poca magnitud.

El otro modelo de la MLR es el de **calibración inversa**, en este modelo la concentración del analito se modela como una función del espectro, a diferencia del método clásico. La calibración inversa es útil ya que la concentración no es una variable controlada, por lo que no importa si existe interferencias entre las muestras. En este tipo de regresión se establecen dos grupos de variables: variables predictoras (independientes) ("x") que indican la información espectral, y variables respuestas ("y") (dependientes), que se refieren a la concentración del analito, esto se expresa matemáticamente como:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + f \quad [3]$$



Cuya notación matricial para "i" muestras tiene la misma forma pero con distintas dimensiones en b y en la matriz X que contiene la información multivariable de la señal analítica.

Este modelo de MLR inversa, se restringe a la aplicación de métodos donde se asume que cada variable "x" arroja información única acerca de cada variable "y", Por lo que si existe colinealidad (correlaciones) entre las variables de la información contenida en X no es posible la estimación del modelo anterior. Además también para poder aplicar MLR es necesario que las muestras de calibración sean mayores en número que las variables predictoras.

Cuando no es posible aplicar el algoritmo de MLR, se debe recurrir a métodos en los cuales la información relevante contenida en X sea expresada por nuevas variables que constituyan el modelo de calibración. En otras palabras, se plantean los **métodos de reducción de datos**<sup>5</sup>. Cuya aplicabilidad está justificada, cuando el número de variables predictoras es mucho mayor que el número de muestras de calibración; existe colinealidad: intercorrelaciones entre las variables predictoras (X) y cuando hay falta de conocimiento sobre el sistema.

Existe una diversidad de métodos de compresión de los datos, pero nos centraremos en dos métodos específicos: **Regresión de Componentes Principales (PCR) y Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)**<sup>8</sup>, estos métodos inversos, suelen denominarse también método de los factores, debido a que transforman un alto número de las variables originales (X) en un pequeño número de variables ortogonales llamadas factores (variables latentes) o componentes principales, que no están correlacionadas entre sí, las cuales son combinaciones lineales de las variables originales.

Los primeros factores suelen ser los que contiene información útil, mientras que las últimas normalmente representan ruido, lo cual se pueden descartar y no ser consideradas en el modelo.

La compresión de los datos tal y como mencionamos anteriormente se basa en la concentración de la información contenida en K variables independientes  $x'$  ( $x_1, x_2, \dots, x_k$ ) en unas cuantas variables latentes, simbolizadas con la letra A, llamadas componentes, registros, factores de regresión o factores ( $t_1, t_2, \dots, t_A$ ) ( $A < K$ ); los cuales son combinaciones lineales de las variables originales(x):

$$(t_1, t_2, \dots, t_A)' = h_1[x_1, x_2, \dots, x_k]'$$
 [4]

Estos nuevos factores se usan como regresores en la ecuación de predicción del sistema con "j" componentes:

$$(y_1, y_2, \dots, y_j)' = h_2[(t_1, t_2, \dots, t_A)'] + f'$$
 [5]

Simplificando los cálculos estadísticos al reducir el número de parámetros del modelo de calibración.

Para la PCR el primer paso constituye descomponer las variables X en sus componentes principales

$$X = TP' + E = \sum_{a=1}^A t_a p_a' \pm E$$
 [6]

donde, P' es la matriz transpuesta "loading" (carga), que representa los coeficientes de regresión de X en T.

Con los factores óptimos escogidos, para describir la matriz X, se puede representar la matriz de puntuaciones o "scores" T,

$$T = XP \quad [7]$$

Luego la matriz de datos Y se calcula mediante la siguiente expresión:

$$Y = TB + E \quad [8]$$

donde B representa los coeficientes de regresión de Y en T; E representa los residuales, que indican la variación en X y Y no explicada por la nueva estructura de los factores A, cuyo origen puede ser ruido en las mediciones, errores del operador, desviaciones de la linealidad de los datos, etc. Es importante señalar que a estos modelos de compresión de los datos, también suelen denominárseles modelos bilineales dado que X en sí misma se modela mediante el producto de dos grupos de parámetros lineales: registros (T) y las cargas (P) más el ruido E.

Así, el cálculo de los parámetros de regresión B para establecer la predicción se expresa como:

$$\hat{B} = (T'T)^{-1}T'Y \quad [9]$$

En este caso, los coeficientes de regresión individuales  $b_{kj}$  no se estiman independientemente; la razón es que el problema de colinealidad en X fue resuelto excluyendo un bajo número de regresores o combinaciones de los mismos, quedando T en función de X, así los coeficientes de regresión son función de los parámetros estimados del modelo.

A partir de la matriz de cargas calculadas en la calibración, para los factores óptimos "A", se calculan los scores de las muestras de predicción,  $\hat{T}$ :

$$\hat{T} = XP \quad [10]$$

Se utiliza la matriz de regresores,  $\hat{B}$ , calculada también en la calibración, junto con los scores de estas muestras y se calcula la propiedad a determinar en las muestras desconocidas:

$$Y = \hat{T} \hat{B} \quad [11]$$

Las ventajas que se obtienen con la PCR radica en que las variables originales que en principio eran colineales, se transforman en factores no-correlacionados sobre los cuales se realiza la regresión, la escogencia de los factores se basa en un análisis realizado sobre los auto valores que explican un alto porcentaje de la variabilidad. La principal desventaja de este método es que no considera las variables de respuesta (Y) cuando construye los componentes principales. Es por ello que la RCP no distingue entre fenómenos de X relevantes para “y” y fenómenos de X irrelevantes para Y. Por el contrario, en el método PLS X y Y se utilizan simultáneamente en la estimación de los componentes principales, con el fin de asegurar que los A factores resuman en conjunto la información de X relevante en el cálculo de Y.

La regresión de PLS escoge un grupo de variables latentes que realiza una descomposición simultánea de X y Y con la restricción de que estas variables maximicen tanto y como sea posible la covarianza entre X y Y a diferencia de PCR, las variables Y se utilizan en la descomposición bilineal de las variables X. Dado que se consideran ambas variables este método logra reducir el impacto de grandes, pero irrelevantes variaciones de X en el modelo de calibración. Esto último constituye una de las ventajas que posee el PLSR y otra de ellas es que cuando se utilizan datos de baja precisión se pueden obtener resultados más útiles que en RCP, esto es porque la información relevante de Y en X se coloca en los primeros factores. Además la regresión de PLS selecciona automáticamente el número mínimo de factores óptimos.

Sin embargo la PLS presenta ciertas limitantes, relacionadas con el uso simultáneo de información en X y Y, una de estas se relaciona con la ortogonalidad, dado que como se verá más adelante el PLS presenta dos vectores de carga (W y P), los registros obtenidos t pueden estar inter-correlacionados, lo cual requiere regresión simultánea de Y sobre todos los registros T, siendo entonces de más difícil interpretación los resultados obtenidos. También se tiene que el ruido en los datos tiene una elevada tendencia al sobre ajuste del modelo en comparación con el PCR, lo cual afecta notablemente la validación del modelo.

Existen varios algoritmos para realizar la regresión por PLS: El primer algoritmo propuesto para PLS, fue desarrollado por Svante Wold<sup>5</sup> y se le denomina PLRS ortogonalizado, posteriormente Harald Martens<sup>5</sup> desarrollan otro el cual se le denomina PLRS no-ortogonalizado.

Se definen dos tipos de algoritmos PLS, PLS1 y PLS2. Se habla de PLS1 cuando solo se estima una variable dependiente (Y). El PLS2 cuando se estiman varias variables Y. Cabe señalar que en PLS1 también se pueden calcular varias variables Y, pero el cálculo se realiza secuencialmente lo cual incrementa el tiempo empleado en los mismos, mientras que en PLS2 el cálculo de todas las variables Y es simultáneo.

La regresión de PLS2 tiene la ventaja de ser más rápida en los cálculos y es muy útil para un análisis preliminar en los datos de entrada de la calibración, pero cuando se tienen relaciones no-lineales entre las variables X y Y o ruidos aleatorios en estas variables, entonces es mejor usar el PLS1 para cada variable “y”.

### **3.1 Construcción de modelos de Calibración Multivariada:**

#### **3.1.1 Definición del conjunto de Calibración:**

La matriz de variables  $Y$  constituye el conjunto de calibración empleado en la CM, de este se conoce la propiedad a determinar, es representativo del sistema en estudio y debe permitir realizar predicciones futuras sobre un nuevo conjunto de mezclas. El conjunto de calibración debe cubrir todo el intervalo de concentraciones, así como las posibles interferencias en las muestras que puedan afectar las medidas experimentales. Por tanto una forma de construir la matriz  $Y$  en CM, es utilizar un diseño de experimentos que cumpla con los requisitos mencionados acerca del conjunto de calibración.

#### **3.1.2 Registro de la información analítica**

La matriz de variables ( $X$ ) se obtiene directamente de las medidas experimentales. Dado que la obtención de cualquier medida experimental siempre esta asociado a un determinado valor de ruido, debe aumentarse la relación señal-ruido a niveles óptimos y así mejorar la calidad de los datos obtenidos. Esto último puede lograrse aplicando tratamientos matemáticos de pre-tratamiento a los datos originales de la matriz  $X$  de la C.M., los cuales se mencionarán posteriormente.

#### **3.1.3 Examinar y Re-procesar la data:**

Como los datos en la matriz  $X$ , la constituye espectros, se pueden aplicar diversidad de tratamientos matemáticos que permitan mejorar la relación señal a ruido (S/R), en las medidas, los empleados en este trabajo experimental son: promediado de los espectros, boxcar y aumento en el tiempo de integración.

a) Promediado de la Señal:

Este tratamiento implica la suma de un número repetido de espectros adquiridos. El promedio de la señal se obtiene mediante la división de esta suma en cada punto por el número total de registros<sup>2</sup>. La señal de respuesta se correlaciona con el estímulo que la produce, cuando se suman continuamente varios registros, la señal aumenta linealmente con el número de registros, N, esto es:

$$S = \text{señal} = kN \quad [12]$$

Mientras que en el ruido que es de naturaleza aleatoria, la suma de estos aumenta a una velocidad proporcional a la raíz cuadrada del número de registros sumados.

$$R = \text{ruido} = k(N)^{1/2} \quad [13]$$

La relación señal a ruido (S/R) aumenta en un factor de  $N^{1/2}$  (proporcional a la raíz cuadrada del número de repeticiones promediadas).

b) Suavizado de la Señal:

El suavizado de la señal es un tratamiento de los datos que permite retener información útil sobre la señal en amplios intervalos, mientras que pequeñas fluctuaciones en la señal que normalmente se deben a errores aleatorios pueden ser desechadas. Los datos originales se dividen en varios sub-conjuntos y cada grupo se utiliza para calcular un valor promedio suavizado de los mismos<sup>10</sup>.

En nuestro caso se utiliza el **promediado Boxcar**, o promediado por grupos, el espectro se divide en diversos sub-conjuntos de datos (boxcar), los datos espectrales en cada boxcar se reemplaza por el centroide del mismo, la contribución del ruido aleatorio en cada boxcar debe tender a un valor promedio de cero<sup>10</sup>.

Mientras mayor sea el número de puntos en cada boxcar mayor será la probabilidad de tener un valor promedio de cero para el ruido aleatorio y por tanto un mejor valor de la relación S/R; no obstante esto también origina una gran pérdida en la resolución del espectro y una mayor distorsión en los datos. Por lo que el número de puntos en cada boxcar depende de la aplicación que tenga.

La aplicación de modelos de calibración multivariada, tales como PLS1, PLS 2 y PCR, suelen realizarse normalmente sobre datos pre-procesados y no sobre las variables originales. El efecto de diversos métodos de pre-procesamiento de los datos<sup>5</sup>, son evaluados sobre los modelo de CM empleados.

Los métodos de pre-procesamiento de datos evaluados son:

- a) **La no transformación:** donde  $z_{ij} = x_{ij}$ , siendo  $z_{ij}$  los datos procesados.
- b) **Centrado de los datos en columna:** se calcula la intensidad media ( $\bar{x}_{ij}$ ) de cada columna a diferente longitud de onda se sustrae de cada valor  $x_{ij}$ , siendo la data transformada:  $z_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_{ij}$ . Este tratamiento permite mantener las unidades originales y equivale a tratar la matriz de varianza-covarianza de las variables originales.
- c) **Auto-escalamiento** donde los datos centrados se escalan posteriormente, dividiendo por la desviación estándar de la columna ( $z_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_{ij}}{s_j}$ ), así se debe obtener una matriz donde cada columna tenga media cero y desviación estándar igual a 1.



En este pre-procesamiento de los datos todas las variables tienen el mismo peso y así si se tiene una variable que tiene una varianza muy alta, ésta no controle el primer factor escogido por el algoritmo utilizado ya sea PCA o PLS. Como los datos son espectros, no es conveniente auto escalar los datos, ya que se daría el mismo peso a variables con baja intensidad ( en donde predomina el ruido) y a los máximos de intensidad de emisión de fluorescencia.

### 3.1.4 Estimar el modelo

Para la estimación del modelo bien sea aplicando PLS o PCR, lo primero a considerar es la escogencia de los factores que representan una combinación lineal de las variables originales recogiendo la máxima variabilidad. Además debe evaluarse la capacidad predictiva del modelo de CM, esto es la capacidad de este de predecir correctamente la concentración de muestras reales con un ajuste residual lo menor posible.

Para la selección del número de factores para ser utilizados en el algoritmo de PLS como para la evaluación de la capacidad predictiva del modelo, se usa comúnmente el procedimiento de validación cruzada <sup>(5,10)</sup>; él cual consiste en un proceso iterativo que consiste en remover sistemáticamente una de las muestras a la vez, usando solo las observaciones restantes (N - 1) para la construcción de los factores latentes; la posterior regresión sobre estos factores permite calcular la concentración de la muestra dejada afuera. Las concentraciones predichas se comparan con las concentraciones conocidas utilizando el Error de Predicción de la sumatoria del cuadrado de los residuales, PRESS (Prediction Error Sum of Squares) calculado mediante la siguiente expresión:

$$PRESS = \sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2 [14]$$

Donde N es el número de muestras,  $y_i$  es la concentración real de la muestra y  $\hat{y}_i$  es la concentración estimada por el modelo de la muestra i, el PRESS se calcula de la misma forma, cada vez que un nuevo factor sea añadido al modelo PLS.

Para seleccionar el modelo óptimo suelen utilizarse tres criterios: el mínimo valor del PRESS, el valor de PRESS mínimo local<sup>11</sup>, expresado por la ecuación [16] y el parámetro estadístico F ( $\alpha=0.05$ ) donde en un pequeño número de factores el PRESS no tiene diferencias significativas con el valor del PRESS mínimo.

El parámetro estadístico F se expresa como:

$$F = \frac{\text{PRESS}(k)}{\text{PRESS}(\text{mínimo})} \quad [15]$$

Donde PRESS (k) es el valor que se obtiene en el modelo con los k factores y PRESS (mínimo), es el mínimo valor de PRESS que se obtenga. Este criterio, PRESS, es válido para escoger los factores tanto para la RCP o el PLS. Una vez que se escogen los factores que permiten obtener la dimensionalidad óptima del modelo a calibrarse, debe estimarse el grado de ajuste del modelo a los datos de calibración, el parámetro estadístico que se utiliza para ello es Mean Square Error of Calibration (MSEC), que se estima mediante la siguiente ecuación:

$$MSEC = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2}{N - A - 1} \quad [16]$$

Donde  $\hat{y}_i$  son los valores de concentración cuando todas las muestras están incluidas en el modelo, N es el número de muestras de calibración y A es el número de componentes principales.

### 3.1.5 Validar el modelo

Para estimar la bondad del modelo de CM, en la predicción de muestras distintas a las utilizadas en el conjunto de calibración, es necesario un proceso de validación. La validación del modelo debe ser tanto interna como externamente utilizando dos grupos de mezclas sintéticas de concentración conocida: el conjunto de calibración y el conjunto de validación o de prueba. La validación interna se refiere a la validación desde el conjunto de calibración y no representa en sí misma una prueba de predicción. No obstante ésta generalmente da resultados con mucha información útil sobre la capacidad de predicción.

La Full cross-validation (Full CV)<sup>10</sup>, es el método de validación interna utilizada, en esta se repite la calibración N veces. Cada vez se utiliza una N-ésima parte del conjunto total de calibración como objeto de predicción y se calcula el error MSECv. La Full CV requiere de mucho tiempo para realizarse en el computador debido al gran número de calibraciones repetidas, por lo que una alternativa es realizarla sobre segmentos del conjunto de calibración (M) (M<N) y entonces solo calibrar M veces, probando cada vez alrededor de 1/M parte del conjunto de calibración. Se estima el número de factores óptimos para tener una mejor capacidad predictiva entre los objetos de calibración., mediante la obtención de un valor mínimo del Mean Square Error of Cross-Valibration (MSECv).

La ecuación que estima el error MSECv es:

$$MSECv = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2}{N} \quad [17]$$

También se puede expresar como RMSECv, esto es la raíz del error cuadrado medio de validación cruzada (Root-mean-square of cross-validation).

En la validación externa el parámetro estadístico de mayor importancia es el Mean Square Error of Prediction (MSEP), el cual se estima mediante la siguiente ecuación:

$$MSEP = \frac{\sum_{i=1}^{N_v} (\hat{y}_i - y_i)^2}{N_v} \quad [18]$$

También se puede expresar como RMSEP, esto es la raíz del error cuadrado medio de predicción. Los parámetros de esta ecuación ya han sido definidos en ecuaciones anteriores, en este caso  $N_v$  se refiere a las muestras utilizadas en el conjunto de predicción. Con frecuencia el RMSEP se reporta en términos relativos, esto es el Relative Root-Mean Square Error of Prediction, RRMSEP (%), que se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$RRMSEP(\%) = \left( \frac{RMSEP}{\bar{y}_i} \right) * 100 \quad [19]$$

Este error se puede calcular tanto para la etapa de validación cruzada como en la validación externa,  $\bar{y}_i$  es el promedio de la concentración predicha por las muestras.

En la validación externa suele utilizarse también como indicativo el porcentaje de recuperación de muestras contaminadas con su respectiva desviación estándar.

Finalmente los parámetros estadísticos de mayor importancia para la evaluación tanto del modelo PLS1 como PLS2, es el número de factores óptimos a emplear, la varianza explicada según los factores tanto para las variables X como para las variables Y, además de los errores que permiten estudiar el adecuado ajuste del modelo. El RMSEC que indica el ajuste del modelo a los datos de calibración, el RMSECV que es una medida de la capacidad del modelo de predecir nuevas muestras, el RMSEP que es el error de predicción calculado cuando el modelo de CM se aplica a nuevos datos (conjunto de validación externa) donde se conocen valores de referencia, o en términos del error relativo RRMSEP (%).

### 3.1.6 Utilizar el modelo

Una vez que se realiza la validación del modelo y por tanto se obtiene el óptimo, el paso siguiente es la aplicación del mismo en muestras reales.

## 4. BIBLIOGRAFIA

- 
- 1 T. Spiro, W. Stigilani. *Química Medioambiental*. Pearson Prentice Hall. (2003).
  - 2 J. Rubinson. *Análisis Instrumental*. Prentice Hall. España 2000.
  - 3 H. Willard, L. Merrit, J. Dean and F. Settle. *Instrumental Methods of Analysis*. Sixth Edition, New York. (1981)
  - 4 [wikipedia.org/wiki/Chemometrics](http://wikipedia.org/wiki/Chemometrics)

- 5 H. Martens and T. Naes. *Multivariate Calibration*. John Wiley and Sons, Chichester (1989).
- 6 Skoog, W y col, *Análisis instrumental*, Mc Graw Hill, 1994, pp 258-259.
- 7 Lackowicz J, *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, ed. Plenum Press, vol. 4. New York: 1-19 (1994).
- 8 K.Danzer, M. Ohio and Lloy A. Currie. **Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry. Part 2. Multisciencies Calibration. IUPAC, Pure and Applied Chemistry Vol. 76, Nº 6 1215-1225 (2004).**
- 9 Miller N. y Miller J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Cuarta Edición. Prentice Hall (2000).
- 10 M. Sharaf, D. I. Illman, B. R. Kowalsky. *Chemometrics*. Edic. John Wiley & Sons. pag.85. New York (1986).
- 11 D.M. Haaland, E.V: Thomas, *Anal. Chem.*60 1193 (1988).

## **CAPITULO 2**

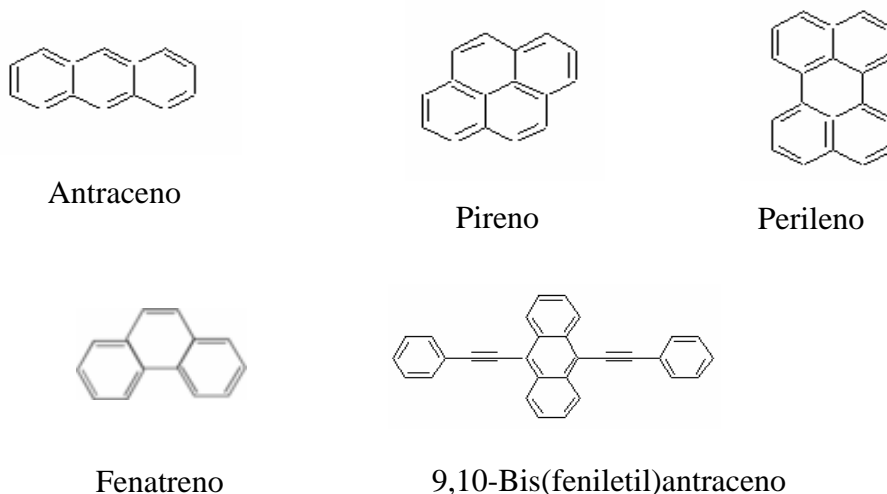
**Determinación Simultánea de Antraceno y Pireno mediante fluorescencia  
molecular aplicando modelos de calibración multivariable**

### **PARTE I**

**Revisión Bibliográfica sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos**

## 1. Generalidades sobre Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos poli-cíclicos (HAP<sub>s</sub>)<sup>1</sup>, constituyen un grupo de compuestos que están constituidos en sus estructuras solo por hidrógeno y carbono, teniendo como característica principal la unión de dos o más anillos bencénicos. Estos compuestos pueden contener desde cuatro hasta siete anillos aromáticos, ver figura 2.1, los más comunes son los de cinco y seis anillos aromáticos.



**Figura 2.1** Estructura Química de algunos HAP<sub>s</sub>

Los HAP<sub>s</sub> suelen formarse durante la combustión incompleta o pirolisis de materia orgánica. Las fuentes de combustión pueden ser naturales o antrópicas. Estos compuestos pueden ser emanados al ambiente durante la incineración de desechos, emisión de gases en vehículos y en otros procesos de combustión de residuos de carbón, petróleo, etc. Las continuas emisiones de los HAP<sub>s</sub> al ambiente, hacen que estos se distribuyan en una amplia variedad de muestras ambientales en un amplio intervalo de concentración<sup>2,3</sup>.



Varios de los HAP<sub>s</sub> son considerados compuestos cancerígenos. En el organismo humano los efectos carcinogénicos de estos compuestos se activan por medio de una enzima, el citocromo P450, presente en el hígado<sup>4</sup>. La enzima incorpora oxígeno a la estructura del HAP, originando aductos tipo epóxido que reaccionan fácilmente con las bases heterocíclicas de la ADN, alterando los genes.

Debido las propiedades carcinogénicas y mutagénicas de los HAP<sub>s</sub> y su presencia en el ambiente, estos compuestos constituyen uno de los grupos más importantes de contaminantes ambientales. Por esta razón, organismos internacionales tales como la Organización Mundial de la Salud y la Agencia de Protección Ambiental (EPA)<sup>5</sup> han regulado el control de estas sustancias en el medio ambiente e identifica 16 de estos compuestos como contaminantes que deben ser monitoreados de forma prioritaria. La importancia de la determinación de los HAP<sub>s</sub> se fundamenta en el estudio de los niveles de contaminación ambiental.

La administración de salud y seguridad laboral cuyas siglas en inglés son OSHA<sup>6</sup>, ha fijado un límite de 0,2 miligramos de HAP<sub>s</sub> por metro cúbico en aire (0.2 mg / m<sup>3</sup>). El instituto nacional de salud y seguridad laboral, cuyas siglas en inglés son NIOSH<sup>7</sup>, recomienda que los niveles promedios en aire para productos de alquitrán de hulla en sitios de trabajo no excedan los 0,1 mg / m<sup>3</sup>, en un período de 10 horas de jornada laboral. Existen otros límites de exposición en sitios de trabajos, para sustancias que contienen HAP<sub>s</sub> tales como carbón, alquitrán de hulla y aceite mineral.

Los HAPs poseen baja solubilidad en agua, no obstante estos suelen estar presentes en sistemas acuáticos. Los intervalos de concentración típicos de los HAP<sub>s</sub> en aguas subterráneas están entre 10 y 20 ng L<sup>-1</sup>, en aguas de ríos entre 50 y 200 ng L<sup>-1</sup> y hasta 100 µg L<sup>-1</sup> en aguas de desechos<sup>8</sup>.

El consejo directivo de la comunidad europea (EU Directive 80/778/EEC)<sup>9</sup> para la regulación de la calida del agua de consumo establece que en aguas potables la concentración máxima permitida de HAP<sub>s</sub> totales es de 200 ng L<sup>-1</sup>. Por otro lado, se recomienda que la concentración de benzopireno en aguas de consumo no exceda los 0,01 µg / L.

### 2. Técnicas de determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

La determinación de los HAPs, se ha realizado comúnmente mediante técnicas cromatográficas<sup>10,11,12</sup> y espectroscópicas<sup>13,14</sup>. Entre las técnicas cromatográficas que han sido utilizadas tenemos: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) y electroforesis capilar (CE).

Las técnicas cromatográficas permiten el monitoreo cualitativo y cuantitativo de los HAPs de forma individual en muestras complejas con una elevada selectividad y muy bajos límites de detección (Lods). La Cromatografía de líquidos (LC) se ha empleado en la detección de los HAPs utilizando detectores de absorción molecular ultravioleta (UV)-visible y de fluorescencia molecular, obteniéndose mejor resolución y selectividad en el análisis. La cromatografía de gases utiliza detección de ionización a la llama y de espectrometría de masas (CG-MS)..

Las técnicas espectroscópicas de absorción molecular UV-visible y espectrofluorimetría<sup>13,14</sup>, también han sido utilizadas en la determinación de los HAP<sub>s</sub> principalmente en matrices acuosas donde los analitos se encuentran en solución. Estas técnicas se han empleado considerando su elevada sensibilidad y en algunas de ellas su selectividad. No obstante, para la aplicación de estas técnicas se requiere en la mayoría de los casos un pre-tratamiento de la muestra para limpieza o pre-concentración de la misma.

Entre los tratamientos de la muestra principalmente utilizados para los HAPs destacan para muestras sólidas: extracción Soxhlet<sup>15</sup>, extracción ultrasónica<sup>15,16</sup> y extracción acelerada por solvente<sup>15</sup>, para muestras líquidas: extracción en fase sólida (SPE)<sup>17</sup>, extracción líquido-líquido en solventes orgánicos. Estos tratamientos de muestras mejora la selectividad y los límites de detección del análisis pero incurren en un excesivo consumo de tiempo, gasto de reactivos, posibilidad de pérdidas de la muestra y contaminación de la misma. Posterior a estos pre-tratamientos de muestras, se puede determinar de forma selectiva los HAPs mediante técnicas cromatográficas que permiten la separación de los analitos.

Sin embargo, si las técnicas empleadas son las espectroscópicas, el tratamiento previo de matriz consigue minimizar sus efectos interferentes, pero sólo se pueden cuantificar la cantidad total de HAPs y no es posible la determinación individual de los mismos debido a las múltiples interferencias espectrales que se producen. Para poder realizar una determinación cuantitativa individual de cada analito, es necesario realizar una separación previa.

La CM<sup>18</sup> representa una alternativa a la poca selectividad de las técnicas espectroscópicas de absorción y de Fluorescencia molecular. En consecuencia resulta atractiva su aplicación en la determinación de los HAPs, ya que el paso previo de tratamiento de la muestra se minimiza o elimina por completo disminuyendo así el tiempo y complejidad del análisis.

La fluorimetría<sup>19</sup> es una técnica analítica de elevada sensibilidad, límites de detección (Lods) en partes por billón (ppb), con alta aplicabilidad en el análisis de trazas, de moderada a elevada especificidad y amplio rango dinámico lineal. Por su lado, la técnica de absorción molecular UV-Visible presenta menor sensibilidad, (Lod en partes por millón (ppm)), es menos selectiva que la fluorescencia y el intervalo de concentración es de uno a dos órdenes de magnitud.

Dado las ventajas que posee la fluorometría, respecto a la absorción molecular UV-Visible, ésta resulta de gran interés en la determinación de los HAPs. Además la sensibilidad de la fluorescencia es comparable a otras técnicas de análisis de, tales como CG-MS, HPLC-UV.

### 3. Relación entre la Fluorescencia y los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

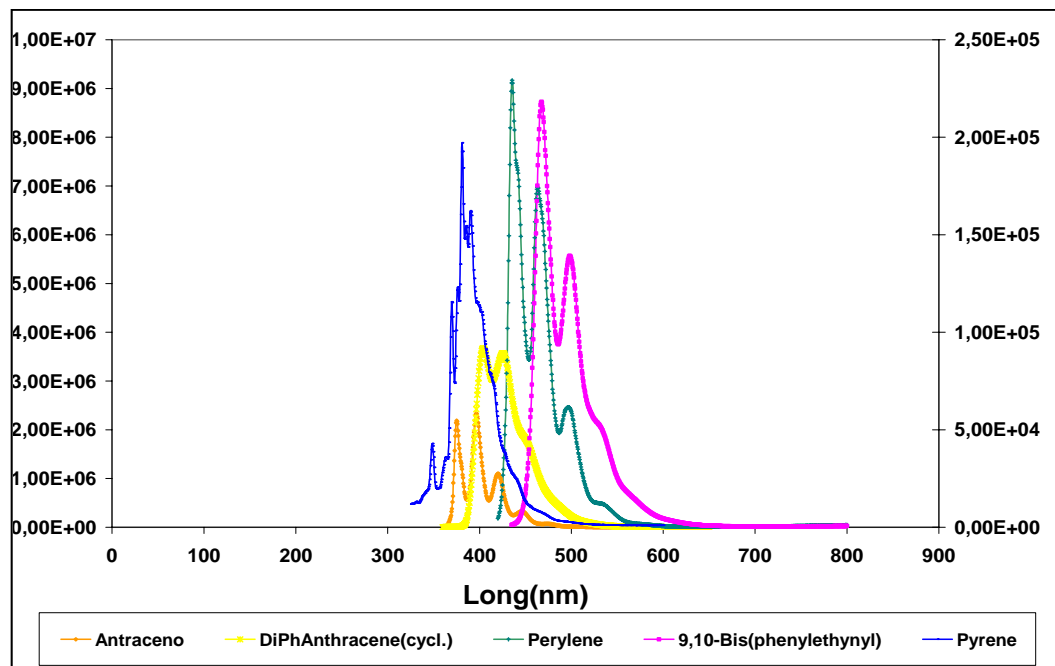
La fluorescencia de los HAPs se inicia por la absorción de radiación de la energía de los fotones de excitación en el ultravioleta (UV) lo que produce la promoción de sus electrones desde el estado singlete fundamental a otros estados singletes excitados de mayor energía ocurriendo una transición del tipo  $\pi-\pi^*$ . Posteriormente se relaja el electrón en el nivel vibracional más bajo del estado singlete excitado al estado fundamental, emitiendo un espectro de fluorescencia que suministra información cualitativa y cuantitativa.

En la tabla 2.1, se presenta la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) utilizada en la obtención del espectro de fluorescencia de algunos de los HAPs que pertenecen al grupo de los dieciséis HAPs considerados por la EPA como agentes contaminantes de monitoreo prioritario. Estos son el antraceno, perileno, pireno, 9,10 bis (fenil-etil) antraceno, el 9,10 difenil antraceno.

**Tabla 2.1.** Longitud de onda de Excitación de los cinco HAPs seleccionados.

<b>Hidrocarburo Aromático Policíclico</b>	<b><math>\lambda</math> de excitación (nm)</b>
Antraceno (ANT)	350
Perileno (PER )	410
Pireno ( PIR )	317
9,10-Bis (feniletil) antraceno(BPA)	425
9,10-Difenilantraceno. ( DPA)	350

Los espectros de fluorescencia de estos compuestos<sup>20</sup> se presentan en la figura 2.2. Se observa la obtención de espectros de banda ancha muy similares entre sí. Esto incrementa el riesgo de solapamiento de las bandas de fluorescencia cuando se analizan mezclas. La máxima intensidad de fluorescencia se obtiene a longitudes de onda muy cercanas entre sí, observándose un desplazamiento hacia el rojo para los sistemas donde existe un mayor grado de conjugación de los dobles enlaces (9,10(BPA)). En una muestra compleja que posea en su matriz varios o todos los HAPs mostrados en la figura 2.2, la cuantificación individual de alguno de estos no es posible si no hay una separación previa de los analitos. Por esta razón se debería realizar un pre-tratamiento de muestra para poder separarlos. Se puede entonces aplicar la calibración clásica mediante ajuste lineal entre la señal de fluorescencia y la concentración de las soluciones en el intervalo de trabajo donde se cumpla la ley de Beer.



**Figura 2.2** Espectros de emisión de Fluorescencia de los HAP<sub>s</sub>: ANT, 9,10 DPA, 9,10 BPA, PER y PIR.

La técnica de fluorescencia molecular aplicada a la determinación de HAPs en mezclas, sin separación previa, solo permite determinar la cantidad total de estos. La señal analítica total es aditiva y es producto de la contribución de todas las especies que presentan emisión por fluorescencia en la muestra.

La determinación simultánea de HAPs en una muestra real es posible si se aplica la CM, ésta herramienta estadística permite compensar la aplicación ineficiente de métodos de calibración univariados (CU) en muchas técnicas de análisis cuando la presencia de interferencias bien sean físicas o químicas modifican la señal analítica, lo que limita la selectividad y linealidad del análisis químico.

#### **4. Estudios de Fluorescencia y Calibración Multivariada en HAPs:**

Se han reportado estudios que combinan la utilización de CM y la fluorescencia en la determinación de HAPs en muestras de aguas industriales o de consumo<sup>21-28</sup>. Podemos citar algunos trabajos específicos sobre la determinación de los HAP empleando fluorescencia sincronizada y CM<sup>22-23,28</sup>.

En la fluorescencia sincronizada<sup>28</sup>, las longitudes de onda de excitación y emisión, se varían simultáneamente, manteniendo un intervalo constante entre la longitud de onda de excitación y la emisión. De esta forma, se obtienen espectros de fluorescencia, con una reducción de los solapamientos espectrales comparados con los métodos de fluorescencia clásica. Por otro lado, en todos estos estudios se utilizó el medio micelar de forma de incrementar la sensibilidad en la determinación de los HAP<sub>s</sub> ya que se ha reportado que en medio micelar se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia de estos compuestos respecto al medio acuoso<sup>21-25</sup>.

Entre 1997 y 1998, los investigadores Ferrer, Beltrán y Guiteras<sup>21-24</sup>, han publicado varios artículos sobre la determinación simultánea de 10 HAP (criseno, fluorantreno, fluoreno, naftaleno, perileno, fenantreno y pireno, antraceno, benzopireno, benzantraceno,) en muestras de agua, empleando CM y fluorescencia sincronizada. En el primer estudio<sup>21</sup>, se aplicaron los algoritmos PLS1 y PLS2, en la determinación simultánea de HAPs contenidos en varias mezclas. El mejor modelo obtenido, se utiliza para la determinación de los HAP en muestras de aguas naturales contaminadas a niveles de concentración entre los 4 y 20 ng mL<sup>-1</sup>.

En un segundo estudio<sup>22</sup>, se comparó tres métodos diferentes de CM, CLS, RCP y PLSR, mediante la diferencia cuadrada de la media relativa, finalmente los modelos de PCR y PLSR fueron empleados en determinación de los HAP en muestras de aguas naturales, contaminadas a niveles de concentración entre los 4 y 20 ng mL<sup>-1</sup>.

Posteriormente, utilizando los mismos analitos, se reportó la comparación entre el algoritmo de las redes neuronales artificiales (ANN), con los de PCR y PLSR, obteniéndose que las ANN ofrecen una alternativa válida a otros procedimientos de calibración multivariada para el análisis de mezclas complejas<sup>23</sup>.

Finalmente estos autores<sup>24</sup> reportan el uso de varios algoritmos para la cuantificación de los compuestos, PARAFAC, PLS1, PLS2, Tri-PLS1 y Tri-PLS2, empleando tanto el espectro de excitación como el de emisión por fluorescencia, los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación de un método de calibración multivariada de tres formas (Tri-PLS2).

**Andrew y colaboradores**<sup>25</sup>, realizaron también un estudio sobre la aplicación de la detección por quimioluminiscencia del peroxi-oxalato (PO-CL) en la determinación de HAP. Mediante CM, empleando los algoritmos de PCR, PLS1 y PLS2 se cuantificó dos HAP individualmente en una mezcla sin necesidad de una separación previa por cromatografía.

Otra técnica analítica utilizada para la determinación cuantitativa de los HAP es la fluorescencia de ángulo variable lineal, un estudio sobre esto lo realiza **Amador-Hernández y colaboradores**<sup>26</sup>; realizando la detección de seis HAP<sub>s</sub> en medio micelar generado por el surfactante no-iónico, éter del 10 laurilo polioxietileno (POLE). Las interferencias espectrales entre las señales analíticas de los seis HAP<sub>s</sub> son resueltas aplicando el algoritmo matemático de calibración multivariada PLS1, validándose el modelo mediante la determinación de los HAP<sub>s</sub> en muestras de aguas de dos orígenes diferentes (agua proveniente del mar y agua de suministro urbano), obteniéndose resultados de recuperación satisfactorios.

En el 2001, **Amador- Hernández y Fernández**<sup>27</sup>, reportan la determinación de HAP<sub>s</sub> mediante espectroscopia de fluorescencia inducida por láser. Se aplicó PLS1 obteniendo información semi-cuantitativa sobre los analitos.

En el 2002, **O. Debos y colaboradores**<sup>28</sup>, realizaron un estudio de determinación mediante fluorescencia sincrónica de HAP<sub>s</sub> en medio micelar. Ellos evaluaron el efecto de utilizar un diseño multinivel Plackett- Burman (PB) en la construcción de un conjunto de calibración para aplicar un modelo PLS. El conjunto de calibración PB se comparó con un análogo colinear, se aplicó PLS sobre estos conjuntos para la determinación de seis HAP<sub>s</sub>. La validación externa mostró que el conjunto colinear es inapropiado para cuantificar HAP en muestras reales, pero el conjunto de calibración PB permite obtener resultados óptimos.



### 5. Justificación y Objetivos

De la revisión bibliográfica anterior se desprende que la aplicación de la técnica de fluorescencia molecular en conjunto con CM en la determinación de HAPs ha permitido realizar su determinación simultánea multicomponente a niveles trazas, en muestras de agua, obteniendo excelentes resultados de predicción. El uso de la CM ha permitido disminuir el tratamiento de la muestra para la separación de los analitos. Aunque los estudios expuestos en la revisión anterior suministran un aporte significativo del uso de las herramientas estadísticas en la CM para la determinación simultánea de HAPs en muestras complejas mediante técnicas poco selectivas como la fluorescencia molecular, no establecen una metodología clara sobre la construcción de los conjuntos de calibración para aplicar los modelos multivariados y presentan como limitación principal el uso de un elevado número de muestras o estándares de calibración.

Tampoco se realiza un estudio sobre la influencia del conjunto de calibración sobre las diversas etapas de la CM y en la capacidad predictiva de los modelos. Sólo en la investigación desarrollada por O. Debois y Col<sup>28</sup>, se estudia la influencia del conjunto de calibración sobre la aplicabilidad del modelo PLS. En consecuencia, resulta de interés realizar estudios más exhaustivos que permitan desarrollar una metodología de calibración fiable, eficaz y sencilla para optimizar el uso de la CM en la determinación de HAPs mediante fluorescencia molecular. En este sentido, en este trabajo se plantea el estudio de diversos conjuntos de calibración para la aplicación de modelos multivariados en la determinación simultánea mediante fluorescencia molecular de dos HAPs: antraceno y pireno en muestras de agua.

Se pretende estudiar la influencia de uso de diversos tipos de diseño multinivel tales como: diseño factorial, matriz de dohlert, etc; en las diversas etapas de la CM: construcción del conjunto de calibración, desarrollo de los modelos de calibración, la validación externa de los mismos y su aplicación sobre muestras reales. Por otro lado también se pretende evaluar el efecto del medio micelar sobre la fluorescencia de estos HAPs utilizando un surfactante no iónico del éter del 10 iso-octil fenil polioxietileno (Tritón X-100).

En una primera etapa de este trabajo, se realizó el estudio de diversos modelos de calibración multivariados para la determinación del antraceno y del pireno en muestras de agua de consumo, mediante espectroscopia de fluorescencia inducida por láser (LIFS). Posteriormente en una segunda fase del trabajo experimental se realizó la determinación de los HAPs obteniendo la fluorescencia desde una fuente de excitación de arco de xenón. En ambos sistemas la emisión de radiación de la fluorescencia se colectó mediante fibra óptica y se transportó hacia dispositivos de detección simultáneos.

El objetivo principal de este trabajo consistió en establecer modelos de calibración multivariados que permitan la determinación simultánea e independiente de antraceno y pireno en muestras de aguas de consumo mediante espectroscopia de fluorescencia molecular.

Para alcanzar el objetivo principal se plantean los siguientes objetivos secundarios:

1. Optimizar los parámetros instrumentales en el montaje experimental para la medición de la fluorescencia molecular.

2. Realizar la calibración univariada para cada uno de los HAPs en estudio con el montaje experimental optimizado, calcular las Figuras de Mérito Analíticas y evaluar el impacto de las mismas en el desarrollo de la calibración multivariada.
  
3. Explorar la calibración multivariada en el tratamientos de señales instrumentales:
  - a) Establecer la composición de las mezclas sintéticas de calibración mediante el uso de diseños multinivel y/o mediante escogencia al azar.
  - b) Estimar el modelo multivariado aplicando los algoritmos PLS1 y PLS2.
  - c) Establecer la composición de las mezclas sintéticas de validación.
  - d) Validar el modelo multivariado mediante validación cruzada externa.
  
4. Determinación semi-cuantitativa de los HAPs en muestras de agua potable de consumo.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- 
- 1 A. Bjorseth, *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, New York, (1983).
  - 2 S.A. Wise, B.A. Benner, R.G. Christensen, B.J. Koster, J. Kurz, M.M. Schantz, R. Zeizier, *Environment Science Technology*, 25, 1695 (1991).
  - 3 C.A. Menzie, B.B. Potoci, J. Santodonato, *Environment Science Technology*, 25, 1695 (1991).
  - 4 T. Spiro, W. Stigilani. *Química Medioambiental*. Pearson Prentice hall.(2003).
  - 5 Method EPA (49/300, 50/300, 51/300, 52/300) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons.
  - 6 Method Osha 58. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in air samples. (1996).

- 7 Enviro Tools, Hazardous Substances Research Center, Michigan State University. (2002).
- 8 *Liquid Chromatography in Environment Analysis*, Merck, Darmstad. (1996).
- 9 Directive 80/778/EEC Council of European Communities, J. Eur. Commurr. L229, 11 (1980).
- 10 W.J. Sinonsick and R.a.Hites. *Analytical Chemistry*, 58,2114(1986).
- 11 J.C. Fetzer, W.R. Biggs and K.Gino. *Chromatographia*,21,439 (1986).
- 12 Ph Diercxens, Ph Thesis, Dep. de Genie Rural et Geoetre, Ecole Polytechnique Federale de Laussane, Switzerland (1987).
- 13 D.J. Futoma,S.R. Smith,J. Tanaka and T.E. Smith. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Siystems", CRC Press, Boca Raton, Fla. (1981).
- 14 K.D. Bartle, M.L. Leeand S.A. Wise. *Chem. Soc. Rev*,10, 113 (1981).
- 15 J.D. Berst, M. Ejem, R.Holzer, P: Lischer, *Analytica Chimica Acta* 383 (1999) 263.
- 16 F. Sun. D. Littlejohn,M.D. Gibson, *Analytica Chimica Acta* 364 (1998) 1.
- 17 D.C. Messer, L.T.Taylor, *Journal of Chromatography*, Sci.33 (1995) 290.
- 18 H. Martens and T. Naes, *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester (1989).
- 19 Willard. *Libro de Instrumental*.
- 20 J. Lindsey. *Photochem CAD Spectra by Category*
- 21 R. Ferrer, J.L. Beltran, J. Guiteras. **Multivariate Calibration applied to synchronous fluorescence spectrometry. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water Samples.** *Talanta* 45. 1073-1080 (1998).
- 22 R. Ferrer, J.L. Beltran, J. Guiteras. **Quantitative multicomponent analyisi of polycyclic aromatic hydrocarbons in water Samples.** *Analytica Chimica Acta* 361 233-40 (1998).
- 23 R. Ferrer, J.L. Beltran, J. Guiteras. **Artificial neural networks (ANN) in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water Samples by synchronous fluorescence.** *Analytical Chimica Acta* 384, 261-69 (1999).

- 24 R. Ferrer, J.L. Beltran, J. Guiteras. **Multivariate Calibration of polycyclic aromatic hydrocarbons mixtures from excitation-emission fluorescence spectra.** *Analytica Chimica Acta* 384, 311-319 (1998).
- 25 K. Andrew, M. G. Sanders, S. Forbes, P. Worsfold. **Flow methods of polycyclic aromatic hydrocarbons using low power photomultiplier tube and charge coupled device chemiluminescence detection.** *Analytical Chimica Acta* 346, 113-120 (1997).
- 26 J. Amador-Hernandez, L. Fernandez-Romero. **Flow injection screening and semiquantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by laser induced spectrofluorimetry-chemometrics.** *Analytical Chimica Acta* 448 , 61-69 (2001).
- 27 J. Amador-Hernandez, L. Lopez-Martínez, P.L. Lopez de Alba, A. Caldera, J.M. Estela. **Determinación Simultánea de seis Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en medio micelar por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-1) utilizando espectros de Fluorescencia de Angulo Variable Lineal.**
- 28 O. Debos, B. Fanget, A. Saber y col. Use of a Plackett-Burman **Design with Multivariate Calibration for The Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar media by Synchronous Fluorescence.** *Anal. Chem.*, 74. 678-683 (2002).

## **CAPITULO 2**

### **PARTE II**

**Aplicación de modelos de calibración multivariante en la determinación simultánea de antraceno y pireno en muestras de agua de consumo mediante espectroscopia de fluorescencia molecular.**

## 1. PARTE EXPERIMENTAL

### 1.1 Equipos:

1.1.1 Láser Nd: Yag, modelo Minilite II, con una frecuencia fundamental a 1064 nm, segundo armónico a 532 nm y un tercer armónico a 355nm. Se utilizó el tercer armónico ( $\lambda=355\text{nm}$ ) como longitud de onda de excitación, con un ancho de pulso de 2-5 nanoseg y frecuencia variable de hasta 15 Hz de repetición de pulsos.

1.1.2 Lámpara de Arco de Xenón, modelo LPS 220, Arc Lamp Suply Photon Technology Internacional.

1.1.3 Joulímetro Piroeléctrico Modelo (EM 500), Molelectron, sensibilidad nominal de  $9,19 \text{ VJ}^{-1}$ .

#### 1.1.4 Elementos Ópticos:

- a. Lente acromática de 20 cm de distancia focal, Mellest Griot.
- b. Lente acromática de 2 cm de distancia focal, Mellest Griot.
- c. Filtro de excitación:  $\phi\phi\text{C1}$  filtro pasa banda UV de 300 a 400 nm.
- d. Espejo Dicroico para longitud de onda de 355nm.
- e. Fibra Óptica, modelo ML1705, Ocean Optics.
- f. Fibra Óptica, modelo M29L02, Ocean Optics.

1.1.5 Celda de Cuarzo de fluorescencia, modelo Starna de 1cm de paso óptico.

1.1.6 Sistema de Detección: espectrómetro de Fibra Óptica Modelo USB2000, Ocean Optics. Este espectrómetro consta de un monocromador Czerny-Turner cruzado simétrico de 42 mm de distancia focal de entrada y 68 mm de salida; red de 300 líneas  $\text{mm}^{-1}$ , reforzado a 500 nm y rango espectral entre 300 y 1100nm. El detector consiste de un dispositivo de carga acoplado (CCD) de silicio, modelo Sony ILX511, de 2048 píxeles, rango espectral entre 200 y 1100nm, sensibilidad de 75 fotones/cuentas a 400nm y 41 fotones/cuentas a 600nm.

### 1.2 Reactivos:

Soluciones Estándar de Antraceno (ANT) al 98,1% Pureza y Pireno (PIR) al 98,4% Pureza fueron obtenidos desde la casa comercial Sigma Aldrich. Los solventes utilizados fueron Metanol grado HPLC al 99,9% Pureza de Mallinckrodt, Chromar HPLC y Agua Desionizada ( $18\text{m}\Omega$ ). Se utilizó el surfactante no iónico del éter del 10 iso-octil fenil polioxietileno (Tritón X -100) de la casa Merck.

## 2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL:

### 2.1 Preparación de Estándares de calibración:

Se prepararon soluciones estándar de los HAPs con una concentración máxima de  $143\text{ mg L}^{-1}$  y  $161\text{ mg L}^{-1}$  para el antraceno y el pireno respectivamente, por dilución de cantidades conocidas (exactamente pesadas) de cada HAPs en metanol grado HPLC. Estas soluciones se mantienen refrigeradas a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Soluciones de los HAPs puros y una mezcla de ambos, se prepararon a una concentración de  $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando como solvente agua desionizada  $18\text{ m}\Omega$ .



Las soluciones de calibración de los HAPs se prepararon en dos solventes diferentes: metanol y un medio micelar. El medio micelar está constituido por: Tritón X-100 al  $3,75 \times 10^{-3}$  M (que corresponde a 40 veces su concentración micelar crítica), metanol 0,5 % en agua desionizada. El intervalo de concentración de las soluciones HAPs fue de 0-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , en medio orgánico y en medio micelar. Estas soluciones se preparan diariamente por dilución adecuada de las soluciones estándares concentradas.

### **2.2 Preparación de Estándares de calibración multivariada:**

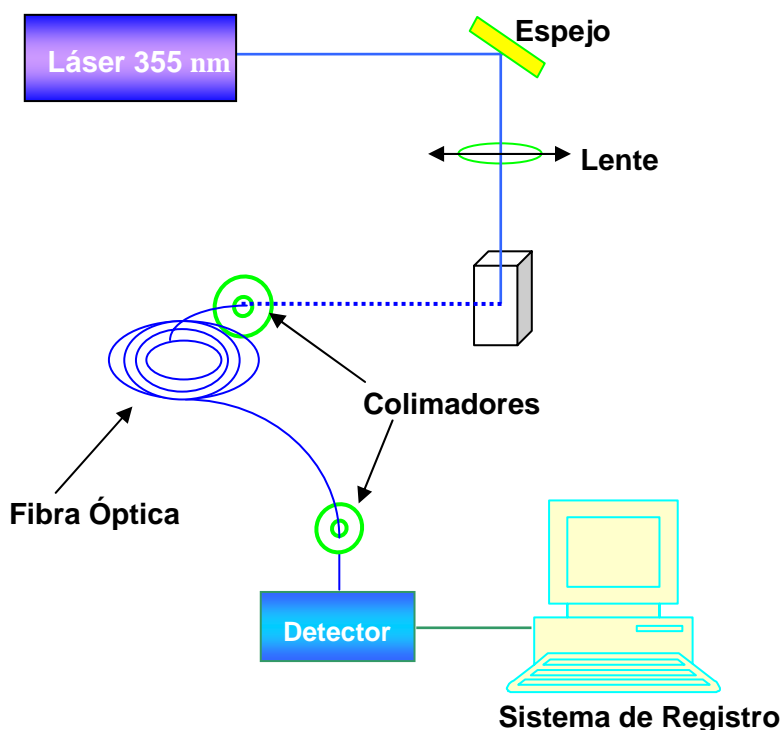
Soluciones multicomponentes de los HAPs, fueron preparadas en medio micelar mediante dilución de cantidades conocidas de las soluciones estándares a un volumen final de 10 mL. Se estableció un conjunto de calibración y uno de validación independiente constituido cada uno por 25 mezclas para obtener en total 50 muestras con diferente valor de concentración. El intervalo de concentración de los HAPs se estableció entre 7 - 71,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para el antraceno y 2-25  $\mu\text{g L}^{-1}$  para el pireno, en las mezclas de calibración y validación.

En medio orgánico se establecieron diferentes conjuntos de calibración, inicialmente se establece uno constituido por 25 mezclas provenientes de un diseño factorial  $5^2$  de este se toma un subconjunto de 15 muestras al azar para establecer un segundo modelo de calibración. Para estos dos modelos de calibración se utilizó un conjunto de validación independiente constituido con un total de 10 muestras. De un tercer conjunto de 10 muestras en medio orgánico, cuyas concentraciones se escogen al azar, se escogen seis muestras para el conjunto de calibración y las cuatro restantes se establecen como conjunto de validación. En las secciones sub-siguientes se presentará la composición detallada de cada conjunto de muestras.

## 2.3 Método Experimental:

### 2.3.1 Sistema de excitación con láser Nd- Yag y detector simultaneo CCD.

Los espectros de Fluorescencia de los HAPs, fueron obtenidos utilizando el montaje experimental que se muestra en la Figura 2.3. El haz de excitación se genera desde el tercer armónico ( $\lambda_{\text{emisión}} = 355\text{nm}$ ) de un láser Nd: YAG, con una energía de 0,600 mJ. Un espejo dicroico para 355 nm y una lente acromática de 20 cm de distancia focal dirige y enfoca el haz de excitación hacia la celda de cuarzo de 1 cm. de camino óptico que contiene la muestra. La fluorescencia emitida se colecta a  $90^\circ$  de la trayectoria del haz de excitación mediante una fibra óptica de rango espectral 300-1200 nm. La fibra óptica dirige la radiación hacia el espectrómetro.



**Figura 2.3** Montaje Experimental para medidas de Fluorescencia inducida por un láser Nd:Yag a una longitud de onda de excitación de 355nm.

### **2.3.2 Sistema de Adquisición del registro de la señal de Fluorescencia con un sistema de integración boxcar y detector de respuesta rápida.**

En la obtención de los espectros de Fluorescencia de los HAPs, se realizó una modificación en la adquisición del registro de la señal. Para ello se utilizó como sistema de detección, un Integrador de Compuerta y un Modulo de Promediado Boxcar, modelo SR250 Gated Integrator. Un Fotomultiplicador (PMT) Science-Tech Modelo PMH-02 y un osciloscopio Tektronik, modelo TDS 3032.

El Integrador SR250<sup>1</sup>, consiste de un generador e Integrador rápido de compuerta temporal y un circuito de promediado exponencial. El generador, se “triggered” (sincroniza), interna o externamente, para un “delay”, tiempo de espera, desde nano-segundos a 100 mili-segundos, antes de generar una compuerta temporal continua, entre 2 nano-segundos a 15 micro-segundos. La integración de la señal se realiza durante la compuerta temporal. La salida del integrador, se normaliza según el ancho de ésta compuerta, suministrando un voltaje que es proporcional al promedio de la señal de entrada durante el muestreo de la compuerta temporal. La señal se amplifica según la sensibilidad escogida. El promediador exponencial, cubre entre 1 a 10.000 muestras.

Las condiciones experimentales utilizadas se presentan en la tabla 2.2. Luego que el integrador boxcar sincroniza exactamente el tiempo en que se produce la señal de fluorescencia inducida por el láser con el tiempo en que se abre la compuerta temporal; el registro de la fluorescencia se realiza mediante una fibra óptica que dirige la radiación sobre una rendija de entrada de 250 micrones. Se realizó un barrido espectral entre 350 y 450 nm, con un motor automático. Finalmente la radiación pasa a través de la rendija de salida de 250 micrones y se enfoca sobre el foto-multiplicador. El espectro de fluorescencia se obtiene mediante un programa donde se controla el rango espectral y la sensibilidad de la señal, realizado con el software Lab-View

**Tabla 2.2.** Condiciones Instrumentales en el sistema de Detección con Fotomultiplicador.

Unidad	Parámetros Instrumentales
	Ancho de compuerta temporal= 60 ns(señal). 10 ns (referencia).
<b>Integrador SR 250</b>	Averaging= 100 muestras. Sensibilidad = 5mV (señal), 200 mv (referencia). Delay = 100 nseg
<b>Foto Multiplicador</b>	Voltaje= 850V. Delay = 40 ns
<b>Láser Minilite II</b>	Tasa de Repetición = 15 Hz, $\lambda_{emis} = 355$ nm.
<b>Software LAB View.</b>	Retardo = 8 seg Rango Espectral = 350-450 nm $\Delta\lambda = 1$ nm

Como se desprende de la explicación anterior acerca del funcionamiento de un sistema de integración Boxcar, el interés principal de la utilización de este sistema es la sincronización del tiempo del pulso de excitación del láser con la adquisición de la señal de fluorescencia inducida por el mismo.

Un integrador boxcar<sup>2</sup>, es un promediador de canal simple. Se realizan varias medidas para solo una porción de la señal y entonces se obtiene una amplitud promedio. El detector se sincroniza de forma, que siempre se mide la misma porción de la señal. Como se realizan n medidas y éstas son promediadas sobre un mismo intervalo de la señal, el valor promedio debe converger al valor promedio de la señal y el ruido debería tener un promedio de cero. La relación S/R se incrementa en un factor de la raíz cuadrada del número de muestras promediadas.

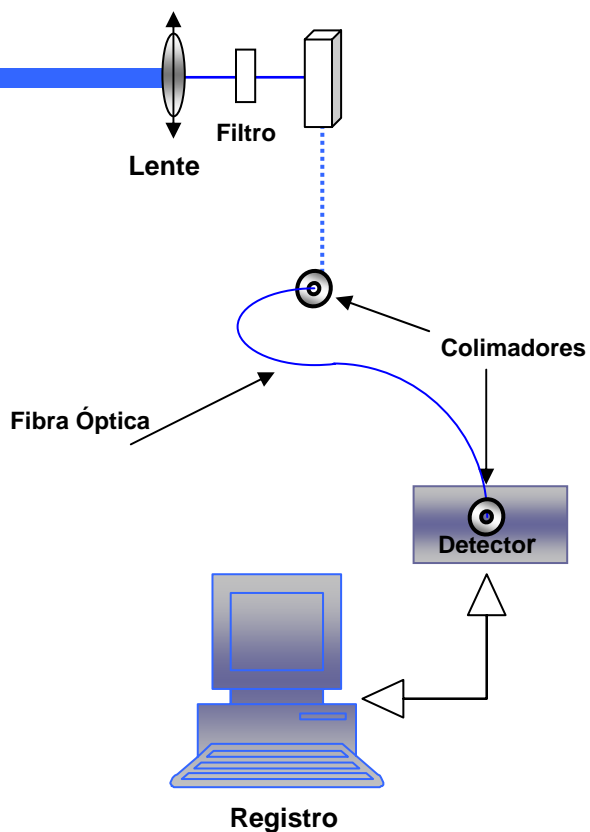
### 2.3.3 Sistema de excitación con lámpara de arco de xenón láser y detector simultaneo CCD.

Se sustituyó el láser Nd-Yag por una lámpara de arco de Xenón, como fuente de excitación continua y de amplio rango espectral (200 hasta 1000 nm). Esto con la finalidad de obtener una excitación eficiente del antraceno y pireno en los diferentes medios de disolución.

En la figura 2.4 se presenta el montaje experimental utilizado. El haz de excitación se genera desde la fuente de arco de xenón. La corriente de la lámpara utilizada es de 4,36 Amp. Una lente acromática de 2,0 cm de distancia focal dirige y enfoca el haz de excitación hacia una celda de cuarzo de 1 cm. de camino óptico que contiene la muestra. Se coloca un filtro de excitación pasa-banda, entre la lente acromática y la celda de cuarzo para que la radiación incidente este en un rango espectral entre 300 y 400nm. La fluorescencia emitida se colecta a 90° de la trayectoria del haz de excitación, mediante una fibra óptica ,de rango espectral entre 200-1200 nm, que dirige la radiación hacia un espectrómetro Ocean Optics USB 2000. En la tabla 2.3, se presentan las condiciones experimentales para el sistema de detección.

**Tabla 2.3** Condiciones Instrumentales del Sistema de Detección

<b>Parámetros</b>	<b>Valor Optimo</b>
Tiempo de integración	250 ms.
Boxcar	20
Average	20



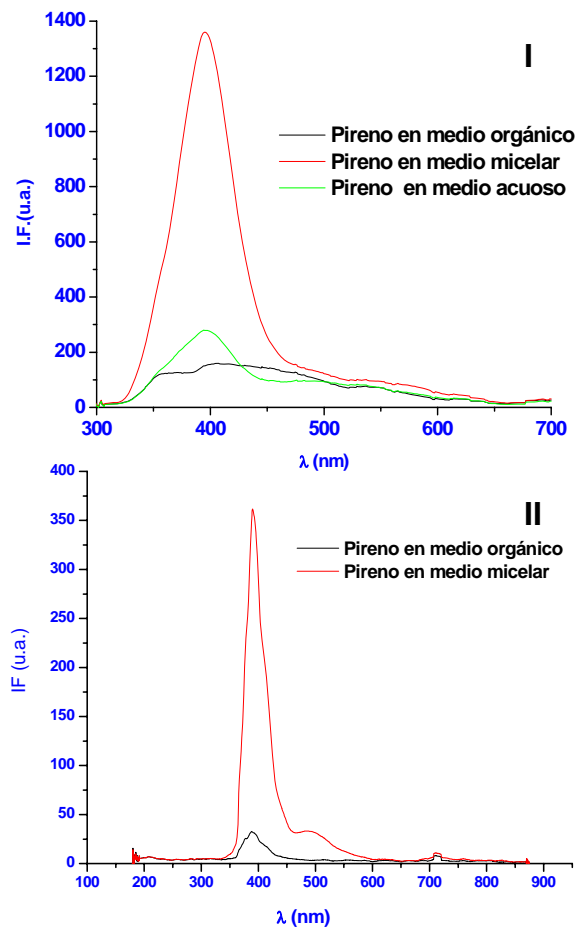
**Figura 2.4** Montaje Experimental para medidas de Fluorescencia inducida por una lámpara de Arco de xenón.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Espectros de Fluorescencia de Antraceno y Pireno

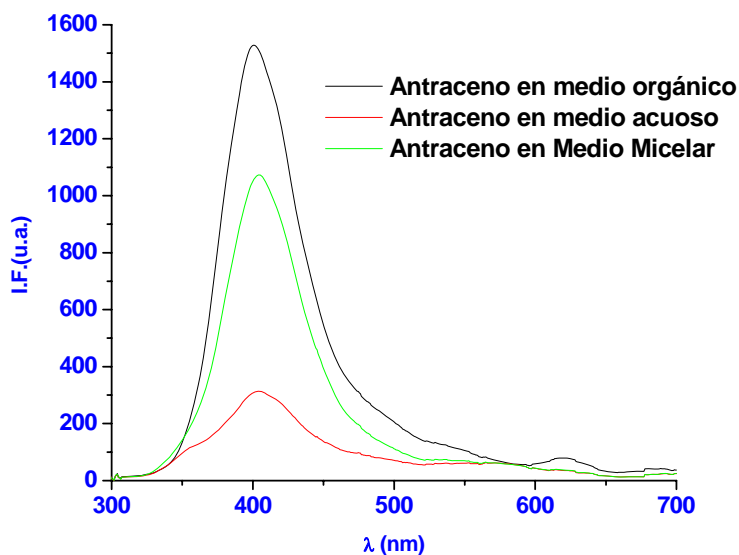
En las figuras 2.5 I y 2.5 II, se presentan los espectros de fluorescencia de soluciones de pireno de 100 ppb y 1 ppm obtenidos en diferentes medios de disolución: medio orgánico, medio micelar y medio acuoso.

Se observa en la figura 2.5 I, que la máxima intensidad de fluorescencia del pireno fue obtenida a 396nm, en los espectros obtenidos en el medio micelar y en medio acuoso. Mientras que en medio orgánico no se observa un máximo de intensidad de emisión definido. En los espectros de la figura 2.5 II, se obtiene el máximo de fluorescencia a 388 nm. Un incremento en la intensidad de fluorescencia fue alcanzado, en los especros de las soluciones de pireno en medio micelar.



**Figura 2.5** Espectro de Fluorescencia de Solución de soluciones de pireno de I) 100 ppb de concentración, en los medios orgánico, micelar y acuoso. Excitación con láser Nd-Yag y II) 1 ppm de concentración en: a) medio orgánico y b) medio micelar. Excitación con lámpara de arco de Xenón y detección simultánea con CCD.

En la figura 2.6, se presentan los espectros obtenidos para soluciones de antraceno de 100 ppb en los diferentes medios de disolución utilizados. Para el antraceno los espectros obtenidos en los tres medios muestran claramente un máximo de emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 403 nm y la mayor intensidad en este caso se observa en medio orgánico.



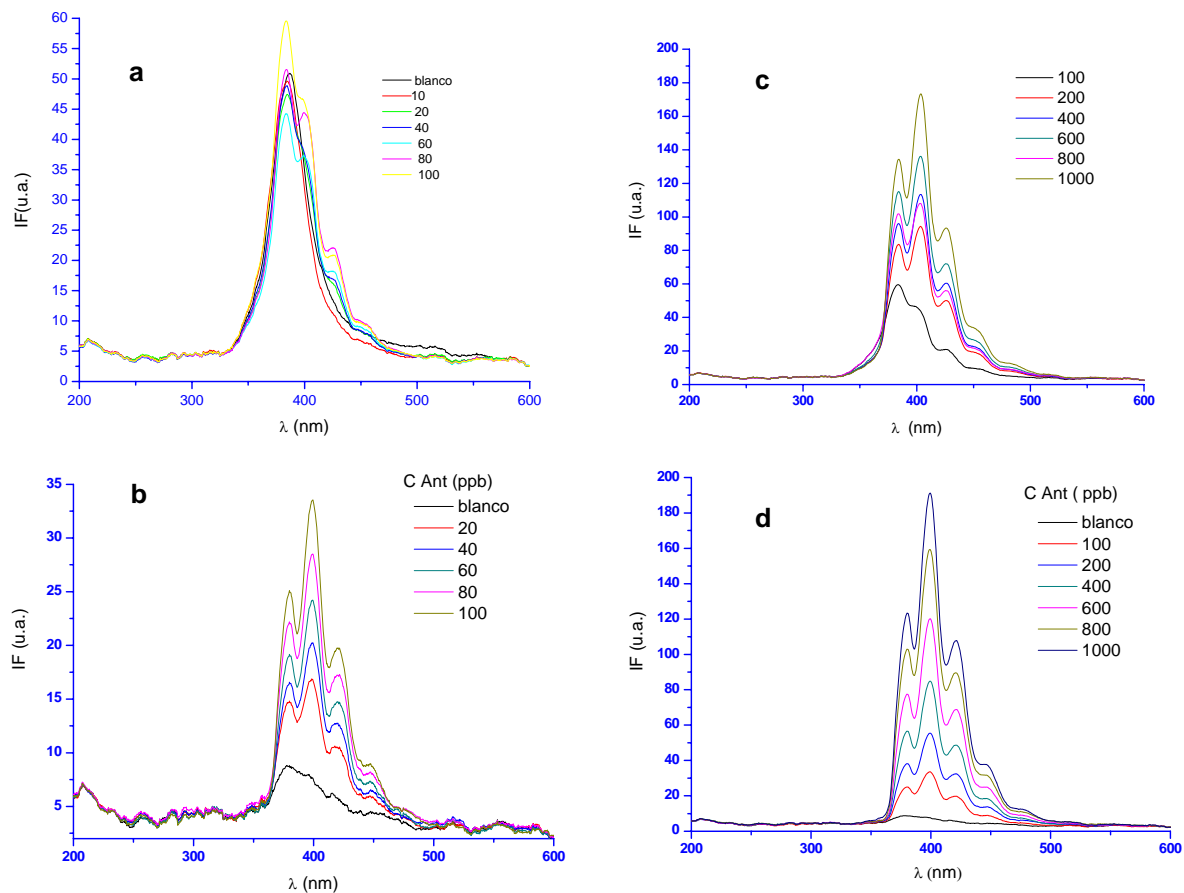
**Figura 2.6** Espectro de Fluorescencia para soluciones de antraceno, de 100 ppb de concentración, en los medios orgánico, micelar y acuoso. Excitación con láser Nd-Yag y detección simultánea con CCD.

En la sección de las figuras 2.7 se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos para soluciones de antraceno, en un intervalo de concentraciones entre 0 y 1000 ppb, disueltas en medio micelar y en medio orgánico. Estos espectros son obtenidos utilizando el montaje experimental descrito en la sección 2.3.3.



En la figura 2.7 a, se observa que hay fuertes interferencias espectrales entre las bandas de emisión de los espectros de las soluciones de antraceno en medio micelar y la solución blanco en el intervalo de concentración entre 0 y 100 ppb. De hecho no se observa las bandas correspondientes a la emisión de fluorescencia del analito sino las correspondientes a la solución del blanco. En consecuencia no se produce un aumento en la intensidad de fluorescencia en estos espectros. Si se compara con los espectros obtenidos en etanol, ver figura 2.7 b, en estos se observan las bandas características de emisión de fluorescencia de este compuesto con un máximo de intensidad de fluorescencia a 399 nm. También se observa el incremento en la intensidad de fluorescencia acorde con el aumento de la concentración

En la figura 2.7 c, se presenta los espectros de fluorescencia para soluciones de antraceno en medio micelar entre 100 y 1000 ppb. Se observa que no hay un incremento apreciable en la intensidad de fluorescencia por el uso del medio micelar con respecto a los espectros obtenidos para las soluciones de antraceno en medio orgánico, ver figura 2.7 d. Las interacciones moleculares que se dan entre el solvente del medio micelar y el antraceno provocan interferencias tales que solapan la emisión de fluorescencia del analito a bajas concentraciones del mismo. Es probable que se produzcan fenómenos de relajación no-radiactivos tales como relajación vibracional o conversión interna debido a las colisiones entre el solvente y las moléculas excitadas desfavoreciendo la emisión de fluorescencia del analito<sup>3</sup>.



**Sección de Figuras 2.7.** Espectros de fluorescencia para soluciones de antraceno obtenidos con lámpara de arco de Xenón y detección simultánea con CCD. Las Figuras “a” y “b” corresponden a un intervalo de concentración entre 0 y 100 ppb, para medio micelar y medio orgánico respectivamente. Las figura “c” y “d” corresponde a un intervalo de concentración entre 100 y 1000 ppb, para medio micelar y medio orgánico respectivamente..

En los espectros presentados anteriormente, se observa que tanto para el antraceno como para el pireno la fluorescencia tiene mayor intensidad en medio micelar que en medio acuoso. El incremento de intensidad en medio micelar para cada analito, se cuantifica a través del factor  $R_{IF}$ , que es el cociente entre la intensidad de fluorescencia del medio micelar y el medio acuoso u entre el medio micelar y el medio orgánico. En la tabla 2.4 se muestra el factor  $R_{IF}$  calculado para cada analito.

**Tabla 2.4** Relación de la Intensidad de Fluorescencia medio micelar y medio acuoso a las longitudes de emisión máxima.

Compuesto	$\lambda_{emisión}$ máxima	$R_{IF}$
Antraceno	403	3,5
	399	1*
Pireno	396	5
	388	10*

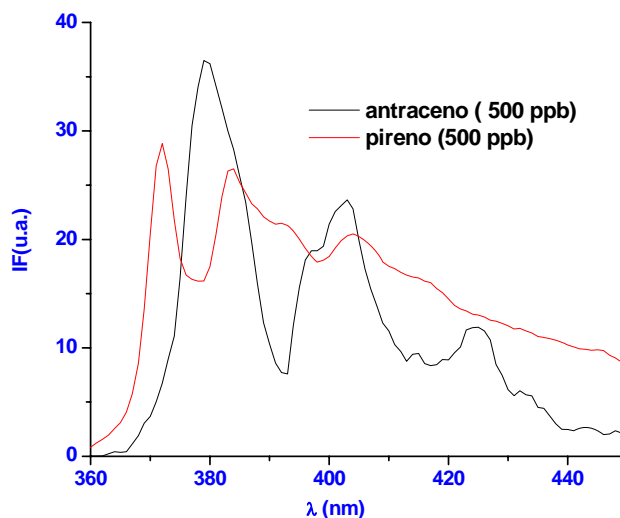
\* Obtenidas con la fuente de excitación de lámpara de Arco de xenón, relativo a medio orgánico.

Para el antraceno hay un incremento de 3,5 veces y para el pireno de 5 veces. Esta tendencia corrobora resultados previos reportados, de incremento en la intensidad de fluorescencia en medio micelar<sup>11,13,15</sup>. Este hecho se atribuye a que las micelas protegen el estado singlete excitado de los fluoróforos con lo que se produce un aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia, desfavoreciendo los procesos de relajación no-radiactivos. No obstante, cuando se utiliza la fuente de excitación de lámpara de arco de xenón en el antraceno no se registra un aumento en la intensidad de fluorescencia del medio micelar respecto al medio orgánico, mientras que para el pireno el incremento es de diez veces.

### 3.1.1 Espectros de Fluorescencia de Antraceno y Pireno obtenidos mediante sistema de detección con fotomultiplicador (PMT).

En la figura 2.8, se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos para las soluciones de antraceno y pireno en medio micelar a una concentración de 500ppb, mediante el uso del sistema de detección con PMT. Estos espectros fueron obtenidos utilizando el diseño experimental de la sección 2.2.3. Se observa que para el pireno se obtienen tres bandas, cuyos máximos de emisión se ubican a 372,385 y 404 nm. Mientras que para el antraceno, las bandas presentan su máxima emisión a 379,403 y 425 nm.

Con respecto, a los espectros de emisión de fluorescencia mostrados en las figuras 2.5, 2.6 y 2.7 donde se observa un máximo de emisión para cada compuesto, podemos decir que el máximo de emisión de fluorescencia obtenido con el detector simultáneo, es producto de la contribución de los tres máximos de emisión observados para cada analito, cuando se utiliza el PMT.



**Figura 2.8** Espectros de Fluorescencia, obtenidos con PMT para soluciones de antraceno y pireno de 500 ppb de concentración, en medio micelar.

Según los resultados obtenidos en esta sección, podemos afirmar que el uso del surfactante no-iónico tritón X-100 y el medio micelar en sí presentan una influencia diferente sobre la señal de fluorescencia según el HAP. En nuestro estudio es adecuado el uso de medio micelar en la determinación de antraceno y de pireno en medio micelar cuando se utiliza el láser Nd-Yag a 355nm como fuente de excitación. Mientras que el uso de medio micelar es adecuado para el pireno, pero no para el antraceno, cuando se utiliza la lámpara de arco de xenón como fuente de excitación.

### 3.2 Calibración Univariada (CU) de los HAP<sub>s</sub>:

Se aplicó regresión lineal entre los datos espectrales de fluorescencia obtenidos mediante tres sistemas de medición experimental y la concentración de soluciones de antraceno y pireno disueltas en medio orgánico y en medio micelar. En la tabla 2.5, se presentan los parámetros analíticos obtenidos por CU. Se observa que el antraceno es la especie con mayor sensibilidad respecto al pireno, dado el elevado valor de la pendiente de calibración y los bajos límites de detección obtenidos en todos los sistemas. Para el sistema experimental I, se observa que el intervalo dinámico lineal (IDL) para el antraceno y el pireno, en medio orgánico es de 5 a 1000ppb, mientras que en medio micelar este intervalo disminuye para el antraceno de 5 a 100 ppb y para el pireno de 5 a 50 ppb. El error estándar de regresión ( $S_{y/x}$ ) obtenido es elevado, principalmente para el antraceno en medio orgánico, esto indica una pobre precisión en la medición de la señal analítica mediante el sistema experimental 1. Esto debido a que, la señal de fluorescencia obtenida mediante el espectrómetro simultáneo; se registró como el promedio entre la máxima fluorescencia emitida por el analito (cuando el pulso de excitación incide sobre la muestra) y el mínimo valor de la señal (en el instante en que el pulso no excita la muestra), sin posibilidad de discriminar entre ambas respuestas que resultan de una excitación pulsada del analito.

**Tabla 2.5** Parámetros analíticos de CU para antraceno y pireno en medio orgánico, medio micelar a las longitudes de emisión máxima.

Parámetros	Medio Orgánico I		Medio Micelar I		Medio Orgánico II		Medio Micelar II	Medio Micelar III	
	Antraceno	Pireno	Antraceno	Pireno	Antraceno	Pireno	Pireno	Antraceno	Pireno
<b>N</b>	9	9	5	4	11	5	4	9	9
$\lambda_{emismax}(nm)$	402,16	397,51	402,94	395,19	399	388	388	379	372
<b>IDL (ppb)</b>	5-1000	5-1000	5-100	5-50	170-1000	300-1000	220-1000	5-800	5-1610
<b>Pendiente (<math>\mu g L^{-1}</math>)</b>	12,489 ± 0,295	0,674 ± 0,023	6,45 ± 0,34	2,57 ± 0,15	0,179 ± 0,003	0,017 ± 0,001	0,145 ± 0,007	0,155 ± 0,016	0,0546 ± 0,0004
<b>Intercepto</b>	107,97 ± 138,94	95,75 ± 9,59	25 ± 18	74 ± 4	14 ± 1	16 ± 1	223 ± 5	-46 ± 1	1,28 ± 0,23
<b>Error Típico (<math>s_{y/x}</math>)</b>	313	22	26	5	3,08	0,53	3,18	5	0,5837
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9970	0,9936	0,9918	0,9936	0,9989	0,9928	0,9952	0,9797	0,9979
<b>(Lods) (ppb)<sup>a</sup></b>	0,38	7	0,73	1,83	52	93	66	5	14

<sup>a</sup> Los Lods se calculan como  $3 \cdot S_{y/x}$

La condición I se refiere a la excitación con láser Nd-Yag a 355 nm y detector CCD La condición II se refiere a la excitación con lámpara de arco de xenón y detector CCD. La condición III se refiere a la excitación con láser Nd-Yag a 355 nm y detector PMT.

Los parámetros de calibración obtenidos por el sistema experimental II, indican que se produce un incremento notable de la sensibilidad en la determinación del pireno en medio micelar respecto al medio orgánico. Por otro lado una sensibilidad similar es alcanzada entre la determinación de antraceno en medio orgánico y del pireno en medio micelar. Se evidencia así que el uso del medio micelar favorece la determinación del pireno mediante la técnica de fluorescencia molecular en este sistema experimental.

En los resultados obtenidos por CU con el sistema de PMT, se obtiene un menor error estándar de regresión respecto al que se alcanzó con el detector simultáneo. Esto indica que se disminuyen los errores aleatorios en el registro de la señal analítica y por tanto aumentó la precisión del sistema. Se observó en este sistema, un incremento notable en el IDL tanto para el antraceno, 5 a 800 ppb, como para el pireno, 5 a 1610 ppb. Los Lods obtenidos con este sistema de detección con PMT son mayores a los que se obtienen con el detector simultáneo. Por tanto, se obtienen una menor sensibilidad en la determinación del pireno y el antraceno con este sistema instrumental.

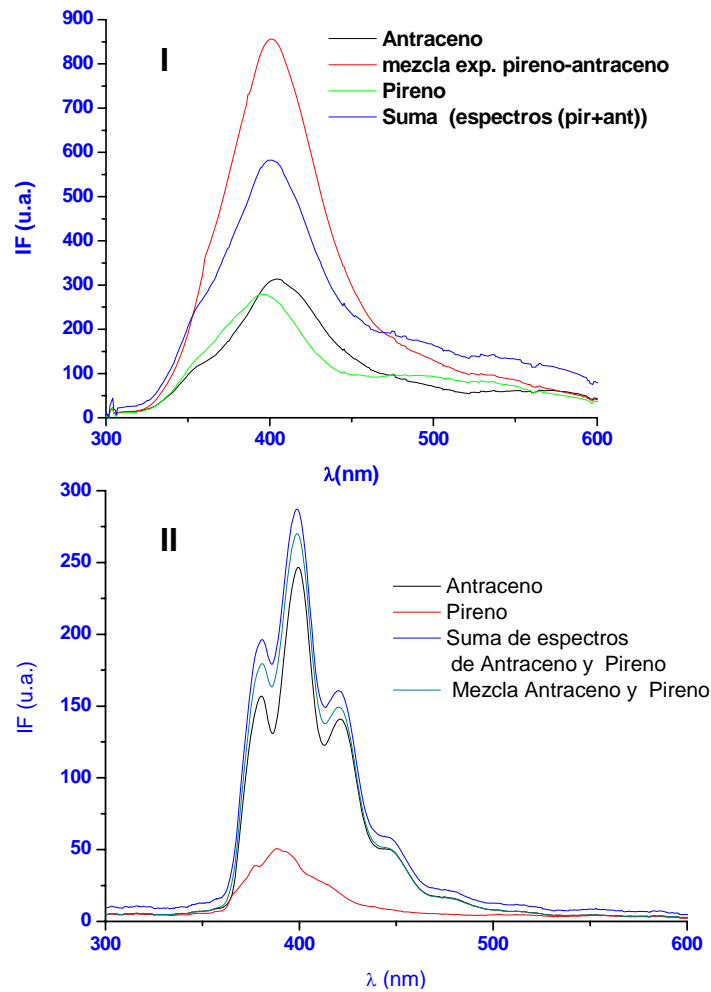
Según los resultados anteriores, se evidencia que el uso de dos sistemas diferentes de detección de la señal de fluorescencia, no permite mejorar la sensibilidad en la determinación del pireno ya que esta es inherente a la  $\lambda_{exc}$  y por tanto a la fuente de excitación. El uso de una lámpara de arco de xenón para la excitación, no registró un incremento en la sensibilidad de los analitos. Esto debido a la alta intensidad de energía suministrado por el láser Nd-YAG. No obstante se optimizó la excitación del pireno a su longitud de onda de excitación característica, mediante el uso de la lámpara de arco de xenón.

### 3.3 Aditividad de las señales de Fluorescencia :

En la figura 2.9 I y II, se presentan los espectros de fluorescencia individuales de soluciones de antraceno y pireno, el espectro obtenido al sumar los espectros individuales de los analitos y el espectro experimental de fluorescencia de una mezcla de estos analitos a esta misma concentración. En la figura 2.9 I las soluciones están en medio acuoso y su concentración fue de 100 ppb, los espectros fueron obtenidos utilizando el montaje experimental descrito en la sección 2.3.1. En la figura 2.9 II las soluciones están en medio orgánico y su concentración fue de 1 ppm, en este caso los espectros fueron obtenidos utilizando el montaje experimental descrito en la sección 2.3.3. En estas figuras se observa claramente el solapamiento de los espectros en el rango espectral de emisión de fluorescencia de los analitos en estudio. Siendo muy cercanas las longitudes de onda de emisión máxima de los analitos: 396 nm para el pireno y 403 nm para el antraceno, ver figura 2.9 I, 388 para el pireno y 399 para el antraceno, ver figura 2.9 II. La determinación cuantitativa de estos analitos en mezclas por CU estará fuertemente afectada por las interferencias espectrales mostradas.

Por otro lado se observa en la figura 2.9 I, que la señal de fluorescencia medida experimentalmente para la mezcla es mayor que la observada cuando se suman los espectros de las soluciones individuales de los analitos. Esto hace suponer la presencia de efectos interferentes (sinérgicos o de interacción entre los analitos) que influyen sobre la señal de fluorescencia total en la mezcla. Mientras que en la figura 2.9 II el espectro referente a la mezcla coincide casi perfectamente con el espectro obtenido por la suma de los espectros individuales de los HAPs. Esto indica que en este último caso, existe aditividad entre las señales de fluorescencia y que es posible aplicar la CM para la determinación simultánea de los dos HAPs en mezclas.





**Figura 2.9** Espectro de Fluorescencia para: **I)** soluciones de pireno y antraceno de 100 ppb en medio acuoso. La suma del espectro de estas soluciones; y el espectro de una mezclas de antraceno y pireno a una concentración de 100ppb de cada elemento. **II)** las mismas soluciones pero en medio orgánico y a un 1 ppm de concentración. En **I** excitación con láser Nd-YAG a 355 nm y en **II** con lámpara de arco de xenón.

Según los resultados obtenidos la aplicación de CM mediante el sistema experimental con láser Nd-Yag se verá más sujeta a efectos de no-linealidad entre los datos espectrales, que en el sistema donde se utiliza la lámpara de arco de xenón como fuente de excitación.

### **3.4 Calibración Multivariada de los HAPs/ Sistema de Excitación con Láser Nd-YAG.**

#### **3.4.1 Aplicación del algoritmo PLS1 en las soluciones unicomponentes de los HAPs:**

El intervalo de concentraciones de las mezclas de CM, se determinó en base al rango dinámico lineal presentado por los analitos en la CU. Para las soluciones unicomponentes se aplicó el algoritmo PLS1, para ello se toma como único vector Y, la concentración individual de los analitos y como matriz X sus respectivos espectros. Este algoritmo<sup>4</sup> permite cuantificar de forma independiente el vector Y (concentración del analito) en función de muchas variables X, utilizando información espectral que puede ser importante para el ajuste del modelo de calibración, la cual se suprime en CU a solo una variable (intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión máxima).

Durante la adquisición de los espectros de fluorescencia, se utilizaron dos tratamientos matemáticos que permiten obtener un aumento de la relación señal a ruido. Estos tratamientos fueron el promediado conjunto de la señal y el suavizado de la misma, mediante el promediado Boxcar<sup>5</sup> o promediado por grupos<sup>6</sup>. Para el promediado conjunto de la señal, se realiza la adquisición de veinte espectros continuos en un intervalo constante de longitudes de onda, luego se calcula el promedio punto a punto de estos espectros. En el promediado Boxcar, los datos espectrales se suavizan tomando sub-conjuntos de veinte datos adyacentes, reemplazando estos por el centroide de los mismos. Se supone que la señal analítica varía sólo lentamente con el tiempo y que el promedio de un número pequeño de puntos adyacentes es una medida mejor de la señal que cualquiera de los puntos individuales. En el promediado por grupos se pierde información espectral, su utilidad se limita a señales complejas que cambian rápidamente en función del tiempo.

Experimentalmente tanto el promediado de la señal como el promediado en conjunto, se realiza con el software del espectrómetro, en tiempo real, es decir, a medida que los datos se obtienen. Estos dos tratamientos matemáticos, se utilizaron en todos los datos espectrales obtenidos en nuestro trabajo experimental.

Para mejorar los resultados de predicción en el modelo PLS1, se utilizaron algunas estrategias en el tratamiento de los datos tanto en el vector Y como en la matriz X, primero: el pre-tratamiento de la datos mediante centrado en la media, segundo: escogencia de una región espectral con un número de variables en X estudiadas de forma tal de suprimir información irrelevante para el modelo, se escogió la región entre 300 y 700 nm (ver figura 2.8 I ) donde se observa un máximo de emisión de la fluorescencia molecular para los analitos en estudio, el número total de variables en X fue de 524 valores.

Los resultados obtenidos por el modelo PLS1, para el antraceno y el pireno en dichos medios, se muestran en la tabla 2.6. Con este modelo se obtiene, que tanto para el antraceno como para el pireno en medio orgánico los datos fueron modelados con dos factores y para el pireno en medio micelar se modela con cinco factores. Como son soluciones uní componentes se espera que el número de factores sea igual a la unidad, porque se deben tener tantos factores como número de especies presentes en la muestra siempre que se cumpla que el intervalo de trabajo la relación entre la señal de fluorescencia y la calibración sea lineal<sup>4</sup>. La inclusión de más factores generalmente es para describir (modelar) la influencia de relaciones no lineales en los datos, provenientes bien sea de interacciones químicas o de respuestas no lineales del detector o también para explicar una mayor variabilidad en la misma.

**Tabla 2.6** Parámetros Estadísticos calculados aplicando el modelo PLS1 al antraceno y el pireno en medio orgánico y en medio micelar.

Parámetros		Medio Orgánico		Medio Micelar	
		Antraceno	Pireno	Antraceno	Pireno
Número de Muestras (n)		9	8	8	8
Rango de Variables X		(300-700) nm			
PC		4	2	2	5
Porcentaje de	Matriz X	99,46	99,38	98,79	99,89
Varianza	Vector Y1 Antraceno	98,27	-	99,66	-
Explicada (%)	Vector Y2 Pireno	-	99,24	-	83,95
Coeficiente de Determinación R <sup>2</sup>	Calibración	0,9997	0,9997	0,9993	0,991
	Validación	0,9920	0,9936	0,9979	0,9114
RMSEC (ppb)		6	16	10	12
RMSECV (ppb)		36	35	18	124
RMSECV (%)		17	10	8	-

Debe considerarse también que el número óptimo de factores para un modelo de CM se obtiene cuando el valor del RMSECV alcanza un mínimo<sup>4</sup>. Entonces se debe optimizar el modelo escogiendo un número de factores tal que ni se sobre ajuste los datos de calibración (demasiado factores), reteniendo una gran cantidad de información irrelevante relativa al ruido, o que el modelo sea subestimado (pocos factores).

Los factores escogidos en casi todos los casos describen aproximadamente el 99% de la variabilidad en los datos tanto en la matriz X como en los vectores Y1 y Y2 (% Varianza Explicada total), con lo que solo el 1% remanente debe corresponder a información irrelevante para el modelo (ruido). Estos altos porcentajes de varianza total explicada, indican que el modelo aplicado ajusta correctamente los datos de calibración y que este debe ser capaz de predecir adecuadamente nuevos datos. Para el pireno en medio micelar el porcentaje de varianza explicada en el vector Y2 es del 84%, esto indica que este modelo describe solo el 84% de la variabilidad en los datos de calibración para el pireno, mientras que el 16% corresponde a ruido o error. En este caso no existe un buen ajuste de los datos de calibración por este modelo.

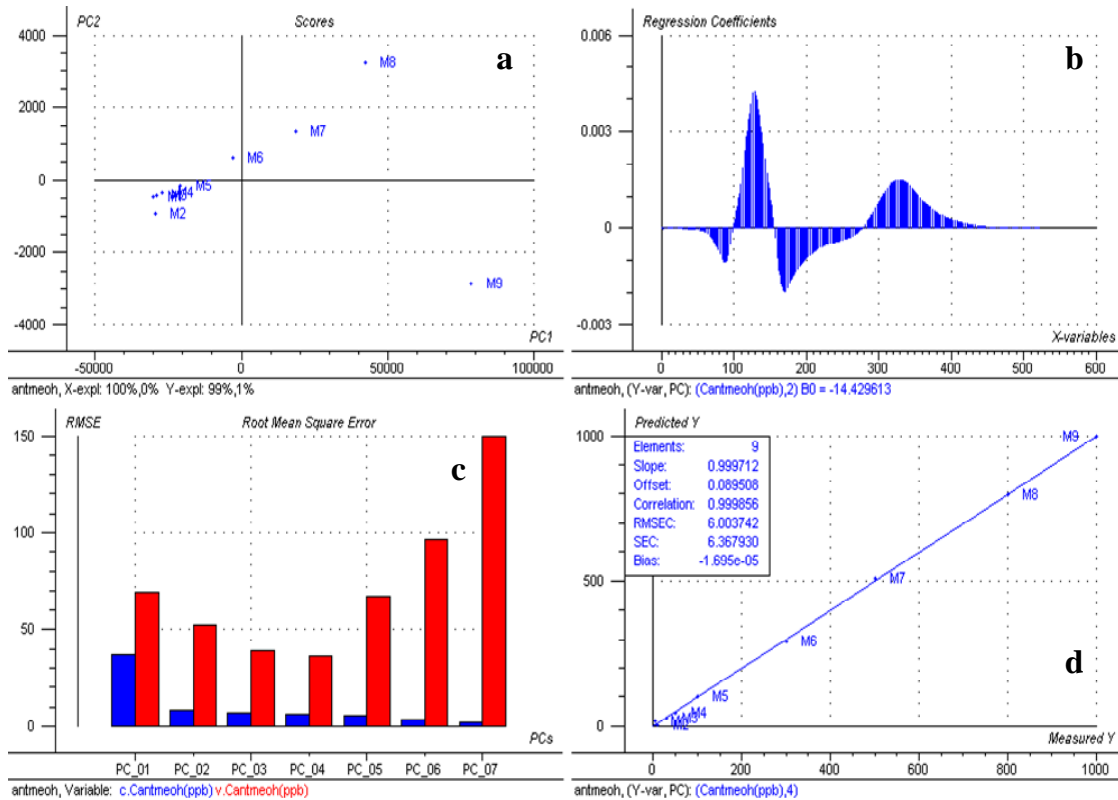
La similitud entre los errores de calibración (RMSEC) y validación (RMSECV) es un indicativo de la robustez del modelo multivariado<sup>7</sup>. En la tabla 2.6 se observa que existe mayor similitud entre los valores de error de calibración y validación para el pireno en medio orgánico y el antraceno en medio micelar, observándose diferencias más notables en estos errores para el antraceno en medio orgánico y en mayor magnitud para el pireno en medio micelar. Esta última tendencia indica que no hay un ajuste adecuado en los datos de calibración, pudiendo haber un sobre ajuste de estos, lo cual sucede principalmente cuando muestras diferentes o con respuestas diferentes al modelo son incluidas en los subconjuntos de calibración y de validación.

Es importante señalar que en el caso del pireno en medio micelar los factores escogidos (cinco) indican un sobre ajuste del modelo. En vista de la evidente falta de robustez del modelo en el pireno en medio micelar se tiene que el error de predicción relativo RMSECV (%) no se reporta porque arroja un valor mayor al cien por ciento con lo cual no se obtiene resultados de predicción satisfactorios. Para el resto de los casos el RMSECV (%) presenta valores bastantes aceptables siendo el del antraceno en medio orgánico ligeramente mayor.

Los resultados anteriores muestran algunas inconsistencias con respecto al ajuste de calibración, por lo que un análisis más exhaustivo de los parámetros de la CM permite una mejor interpretación del modelo y por tanto la optimización del mismo. Para la mejor comprensión de la escogencia de los factores o componentes principales (PC), se requiere presentar algunos resultados del modelo de CM.

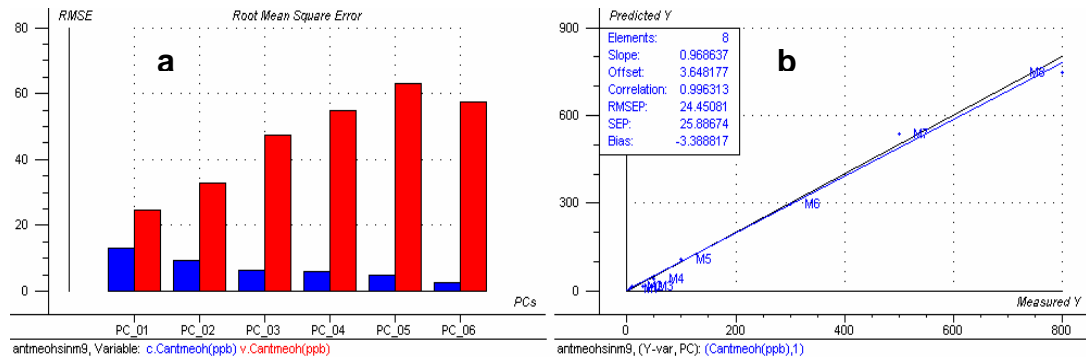
En la figura 2.10 se presentan los resultados obtenidos al aplicar el modelo PLS1 para el antraceno en metanol. La figura 2.10 (a) corresponde al gráfico de puntuaciones o de "Scores" para dos PC sugeridos por el modelo, este gráfico presenta la distribución de las muestras y se puede identificar diferencias o semejanzas entre las mismas. La distribución de las muestras es prácticamente una distribución creciente de tendencia lineal, observándose mayores semejanzas entre las muestras m1 y m4. Las muestras de 5 a 8 van en una tendencia lineal de incremento y por último la muestra 9 resulta diferente a todas las demás, la distribución que se muestra es la esperada ya que en las muestras originales la concentración del analito va incrementándose desde m1 a m9 con un relación lineal de la señal de fluorescencia con la concentración. Del gráfico de scores es evidente que la m9 presenta un comportamiento anómalo en relación a las otras por lo que es posible suprimirla del modelo de forma de optimizar el mismo.

En la figura 2.10 (c) se muestra la tendencia que presentan los errores RMSEC y RMSECV con respecto al número de los factores, se observa una disminución de ambos hasta alcanzar un valor mínimo y luego el incremento de estos, el número de factores óptimos según este gráfico es de 4 componentes principales donde el valor de RMSECV es mínimo. El valor de RMSEC tiene siempre tendencia al menor valor posible porque este se calcula en relación al número de factores incluyendo mayor variabilidad en la data, por tanto a mayor número de factores menor será el valor del RMSEC.



**Figura 2.10** Parámetros de CM, aplicando PLS1 para el antraceno en metanol, (a) gráfico de puntuaciones (“scores”), (b) coeficientes de regresión, (c) RMSEC vs factores o componentes principales y (d) Correlación entre valor predicho y valor medido.

Para optimizar el Modelo PLS1 de antraceno en metanol, se suprime la muestra m9 como un valor anómalo y se realizó un nuevo ajuste del modelo PLS1, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 2.11. Se observa que el número de factores disminuye a 1, que es donde el valor el RMSECV alcanza un mínimo esto se refleja en un mejor valor del RRMSECV(%) el cual disminuye al 11% y por lo tanto un mejor ajuste del modelo con un menor número de factores.



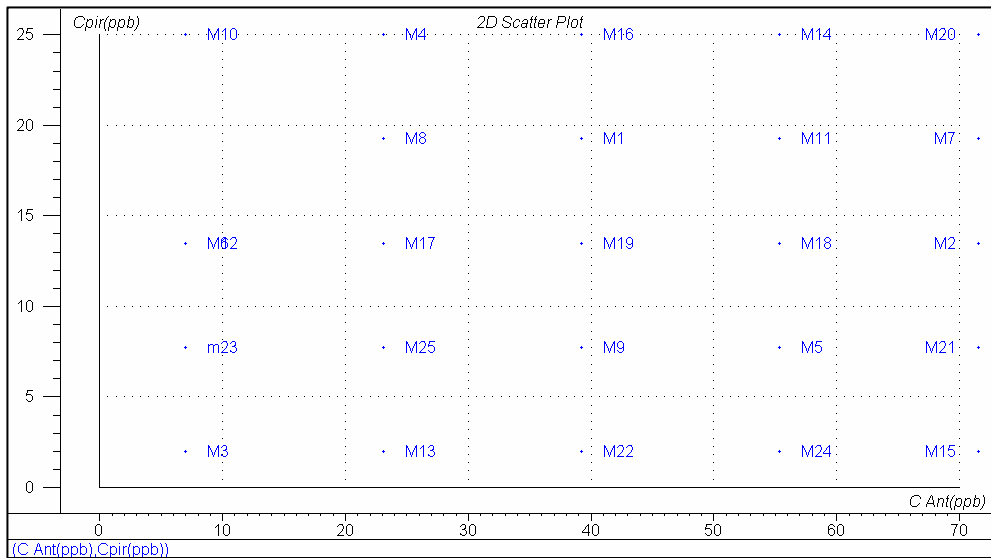
**Figura 2.11** Parámetros de CM, aplicando PLS1 para el antraceno en metanol, (a) gráfico de RMSEC/RMSEP, (b) Correlación entre valor predicho y valor medido, suprimiendo valores anómalos.

Realizando un estudio similar, para el análisis del pireno en medio micelar, se obtiene un valor de RMSEC= 10,91 y de RMSECV= 17,15 para el modelo PLS1, indicando la robustez del mismo. Se suprimen las muestras de calibración de mayor concentración (m6 a m8). El error relativo de predicción RMSECV (%), en este caso es de un 44%, aunque no es un valor del todo óptimo para la predicción de nuevas muestras es mejor al del modelo anterior que excedía un valor del 100%.

### 3.4.2 Construcción del Modelo de Calibración y de Validación utilizando un diseño factorial Multinivel:

Se utilizó un diseño multifactorial  $5^2$ , para un total de 25 muestras de calibración ver figura 2.12. Se escogió un diseño full factorial<sup>8,2</sup>, porque en estos cada nivel de cada variable de diseño se estudia en igual número de veces en combinación con cada nivel de la otra variable de diseño, esto implica que se establece un perfecto balance entre los niveles de las variables del diseño. Como lo que interesa es cubrir un amplio rango de concentraciones (niveles) y sus interacciones en las mezclas de los HAPs, este tipo de diseño es de gran conveniencia. Dado que el diseño factorial es ortogonal, es decir, se construye de tal forma que no existe correlación entre los factores experimentales, es aplicable para calibración con PLS<sup>4</sup>.





**Figura 2.12** Diseño de Calibración  $5^2$  para un conjunto de calibración de 25 muestras.

Los valores codificados para el diseño multinivel de cinco niveles y dos factores son los siguientes: (-2, 2, 0, 1,2). La ecuación que correlaciona el valor codificado con los valores naturales es la siguiente:

$$C_{ij} = C_{o_{ij}} + X_{ij} \left( \frac{C_{\max j} - C_{\min j}}{L - 1} \right) \quad [1]$$

Donde:

$C_{\max j}$  = es el valor máximo de concentración del constituyente j.

$C_{\min j}$  = es el valor mínimo de concentración del constituyente j.

$C_{o_{ij}}$  = es el valor medio del rango de concentraciones.

$C_{ij}$  = es la concentración del constituyente j para la mezcla i.

$X_{ij}$  = es el valor codificado de la concentración del constituyente j para la mezcla i.

$L$  = es el número de niveles de la concentración.

En la tabla 2.7, se presentan los valores codificados y los valores naturales del diseño para el antraceno y el Pireno:

**Tabla 2.7** Valores codificados y valores naturales para el diseño  $5^2$

Valor Codificado	Valor natural	
	Antraceno	Pireno
-2	7	2
-1	23,13	7,75
0	39,25	13,5
1	55,38	16,38
2	71,5	25

La matriz total del diseño se obtiene por permutaciones cíclicas de  $\left| \frac{(N-1)}{(L-1)} \right| - 1$  veces, donde N = es el número de experimentos (mezclas) y por la adición de una fila del más bajo nivel tanto para el Antraceno como para el Pireno.

En las tablas 2.8 y 2.9, se muestran la composición del conjunto de calibración y del conjunto de validación, de una totalidad 50 muestras para el análisis multivariable. Para establecer el conjunto de validación también se utilizó un diseño multifactorial  $5^2$  la concentración para el antraceno se varió entre 8 y 60 mg L<sup>-1</sup>, para el pireno se estableció entre 2 y 20 mg L<sup>-1</sup>. Las muestras fueron preparadas en medio micelar incluido en tantas combinaciones como sea posible en el conjunto de calibración y descrito en el modelo de calibración.

**Tabla 2.8** Composición del conjunto de Muestras de Calibración

Mezclas calibración	CAnt (ppb)	CPir (ppb)	Mezclas calibración	CAnt (ppb)	CPir (ppb)
1	39.25	19.25	14	55.375	25
2	71.5	13.5	15	71.5	2
3	7	2	16	39.25	25
4	23.125	25	17	23.125	13.5
5	55.375	7.75	18	55.375	13.5
6	7	13.5	19	39.25	13.5
7	71.5	19.25	20	71.5	25
8	23.125	19.25	21	71.5	7.75
9	39.25	7.75	22	39.25	2
10	55.375	19.25	23	7	7.75
11	7	19.25	24	55.375	2
12	7	13.5	25	23.125	7.75
13	23.125	2			

**Tabla 2.9** Composición del conjunto de Muestras de Validación

Mezclas validación	C Ant (ppb)	C Pir (ppb)	Mezclas validación	C Ant (ppb)	C Pir (ppb)
1	21	6.5	14	60	11
2	8	6.5	15	21	15.5
3	34	6.5	16	34	20
4	8	2	17	47	2
5	60	15.5	18	60	2
6	21	2	19	8	15.5
7	34	11	20	21	20
8	60	20.125	21	8	11
9	47	20.150	22	8	20
10	47	11	23	34	15.5
11	34	2	24	21	11
12	47	15.5	25	47	6.5
13	60	6.5			

Se observa tanto en las muestras de calibración como de validación que se tienen todas las posibles combinaciones entre las variables para un total de cinco niveles de concentración. Además se tiene que el conjunto de validación presenta una distribución de muestras idénticas al del conjunto de calibración con lo que se garantiza que las muestras de calibración sean representativas de las muestras de predicción. Esto es de suma importancia ya que se cubren todos los tipos de variabilidad sistemática, por lo que todo fenómeno que varía en X en el conjunto de muestras de predicción debe ser incluido en tantas combinaciones como sea posible en el conjunto de calibración.

### **3.4.2.1 Aplicación de los modelos PLS1 y PLS2 sobre el conjunto de las muestras de Calibración del diseño factorial 5<sup>2</sup>:**

Al conjunto de las muestras de calibración se le aplicaron los algoritmos PLS1 y PLS2 para establecer el ajuste del modelo de calibración y realizar la validación interna de los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.10. Se obtiene que tanto el modelo PLS1 como el modelo PLS2 presentan un buen ajuste del modelo dado que los factores escogidos explican una alta variabilidad en los datos tanto para las variables X como las Y, aunque se modela mejor la variabilidad en la data espectral X, donde la varianza explicada es próxima al 100%. La similitud entre los errores de calibración (RMSEC) y de validación (RMSECV) son indicativo de la robustez en el modelo por lo que no debería haber un sobre ajuste del modelo según los factores escogidos.

El número de factores esperados en esta determinación es de dos, que corresponden al número de componentes de las muestras. No obstante existen más factores que los esperados (ver tabla 2.10). Esto indica que existen desviaciones de la linealidad que deben ser modeladas y para ello es necesaria la inclusión de más factores. Dichas relaciones no-lineales en estas muestras, pueden presentarse debido a fenómenos tales como auto-quenching o efecto del filtro interno<sup>3</sup>.

Al incrementarse la concentración de los HAPs, se presume hay un aumento de las interacciones intermoleculares entre sus estructuras aromáticas. Esto da origen a aglomerados o nuevas especies “quenchers” que disminuyen la intensidad de fluorescencia.

**Tabla 2.10** Parámetros Estadísticos calculados por validación interna aplicando el modelo PLS1 y PLS2 para el antraceno y el pireno en las mezclas de calibración en medio micelar.

Parámetros		PLS1		PLS2	
		Antraceno	Pireno	Antraceno	Pireno
<b>PC</b>		5	7	7	5
	<b>Matriz X</b>	99,46	99,93	99,95	
<b>Varianza Total Explicada (%)</b>	<b>Vector Y1 Antraceno</b>	86,48	-		
	<b>Vector Y2 Pireno</b>	-	68,57	82,99	
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Calibración</b>	0,9621	0,9186	0,9658	0,9095
	<b>Validación</b>	0,9242	0,8266	0,9147	0,8175
<b>RMSEC (ppb)</b>		6,35	3,14	6,03	3,31
<b>RMSECV (ppb)</b>		8,95	4,67	9,51	4,69
<b>RMSECV(%)</b>		20	33	24	33
<b>Número de Muestras (n)</b>		25			
<b>Rango de Variables</b>		(300-700) nm (524 valores)			
<b>Pre-procesamiento de los datos</b>		Centrado en columna			

El pre-procesamiento de la muestra escogido es el de centrado en la media y el rango de variables en X (300 a 700 nm), al igual que en el algoritmo PLS1 para las soluciones unicomponentes. Resultados aceptables en el ajuste de ambos modelos de calibración son obtenidos; no obstante el notable solapamiento entre los espectros de emisión por fluorescencia.

### 3.4.2.2 Validación externa de los modelos de calibración establecidos por PLS1 y PLS2.

Para la validación externa del modelo, se utilizó un conjunto de 25 muestras, cuya composición se presentó en la tabla 2.9. Se aplicaron los modelos PLS1 y PLS2 establecidos previamente con el conjunto de las muestras de calibración. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.11, tanto para el modelo PLS1 como el PLS2, se obtienen por validación externa valores similares del error de predicción (RMSEP) para el antraceno. Ambos modelos tienen la misma eficiencia predictiva, con un mismo valor del RRMSEP del 22% y se predicen adecuadamente alrededor de 20 muestras de validación en ambos casos. Para el pireno, el número de muestras predichas por PLS1 es de 13 y por PLS2 es de 23, con un valor de RRMSEP de 24% y 45 % respectivamente.

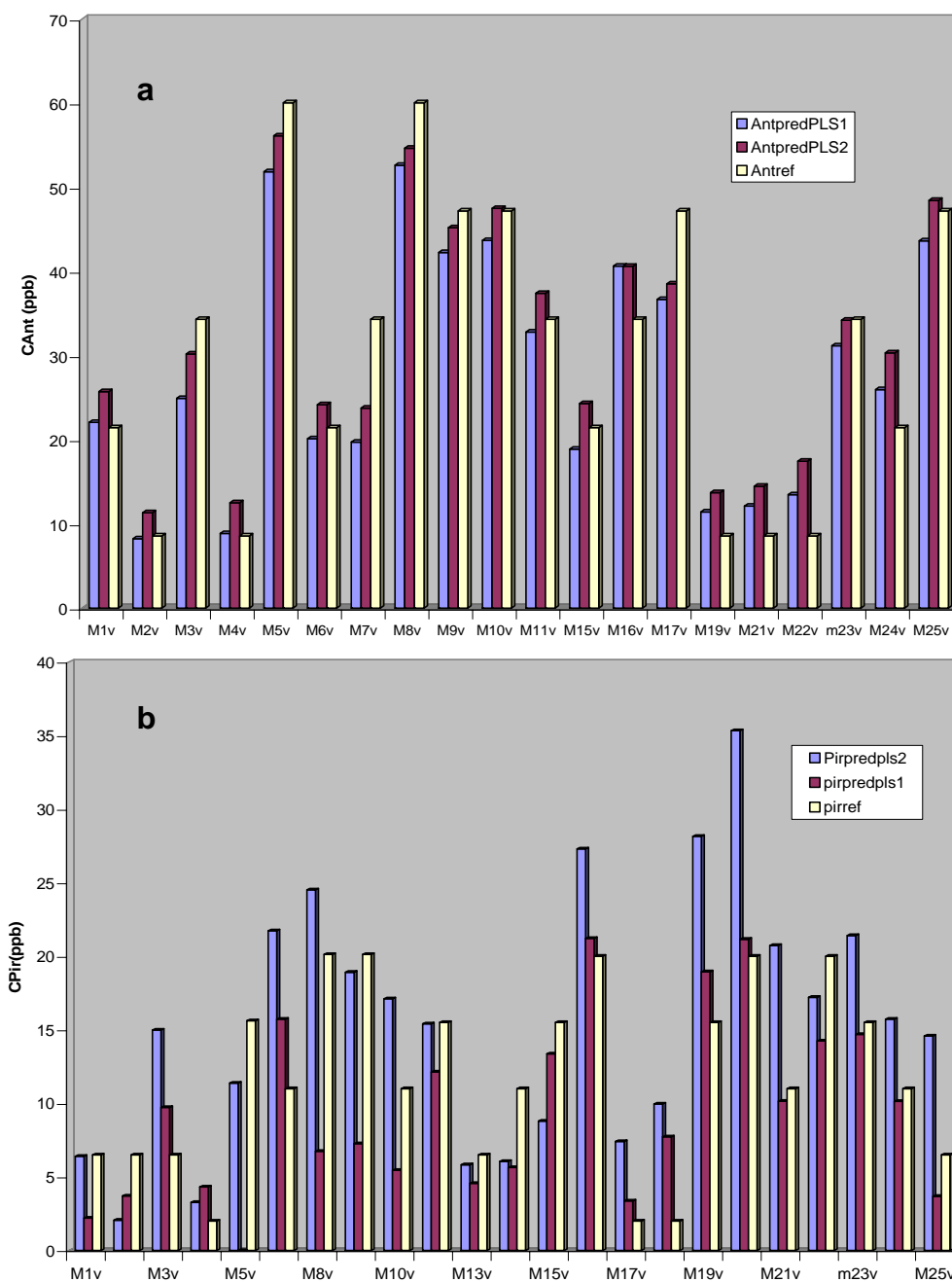
El modelo PLS2 predice un mayor número de muestras para el pireno, pero también se incrementa el error de predicción relativo, por lo que la capacidad de predicción de este modelo es inferior a la del PLS1. Se escoge el modelo PLS1, como el que mejor ajusta los datos de validación del pireno, ya que presenta el menor valor del RRMSEP. Los errores de RRMSEP (%) para el antraceno y el pireno, se comparan con los obtenidos por validación cruzada (RMSECV (%)), (ver tabla 2.10 y tabla 2.11), se tiene que para el antraceno aplicando los modelos PLS1 y PLS2 no hay diferencias significativas entre ellos, lo que indica la eficiencia de ambos modelos tanto en el ajuste del error residual así como en la capacidad de cuantificación de este analito. Para el pireno se tiene que si existen diferencias entre los mencionados errores por lo que se esperan resultados poco satisfactorios en la predicción de este analito.

**Tabla 2.11** Parámetros Estadísticos por validación externa en las mezclas de validación para el antraceno y el pireno en medio micelar, aplicando el modelo PLS1 y PLS2.

Parámetros	PLS1		PLS2	
	Antraceno	Pireno	Antraceno	Pireno
<b>PC</b>	5	9	6	11
<b>RMSEP(ppb)</b>	6,59	2,24	6,21	6,83
<b>RRMSEP (%)</b>	22	24	22	45
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9276	0,9189	0,9481	0,7420
<b>Número de Muestras (n)</b>	21	13	20	23
<b>Rango de Variables</b>	(300-700) nm (524 valores)			
<b>Procesamiento datos</b>	Centrado en columna			

En la figura 2.13 (a), se muestra comparativamente las predicciones para el antraceno mediante los modelos estadísticos PLS1 y PLS2. Se observa, que existe una buena correlación entre los valores predichos por ambos modelos con respecto a los valores de referencia, no existiendo diferencias notables en la predicción respecto al antraceno. La figura 2.13 (b), muestra la misma información para el pireno, pero en este caso la correlación obtenida entre los valores predichos y los de referencia no es satisfactoria.

El modelo PLS1, presentó una mejor predicción en la concentración del pireno, pero sólo sobre un pequeño número de muestras, lo que limita la obtención de un mejor RMSEP y ajuste del modelo de predicción. En el modelo PLS2, la predicción es inferior a la del modelo PLS1. En el conjunto de validación para el pireno, se limita la predicción de este analito a un rango de concentraciones limitado.



**Figura 2.13** Comparación entre los valores de referencia y lo valores predichos para el a) antraceno y b) para el pireno aplicando los modelos PLS1 y PLS2 en el conjunto de 25 muestras de Validación.



### 3.4.3 Construcción del Modelo de Calibración y de Validación utilizando un diseño de Matriz Dohlert:

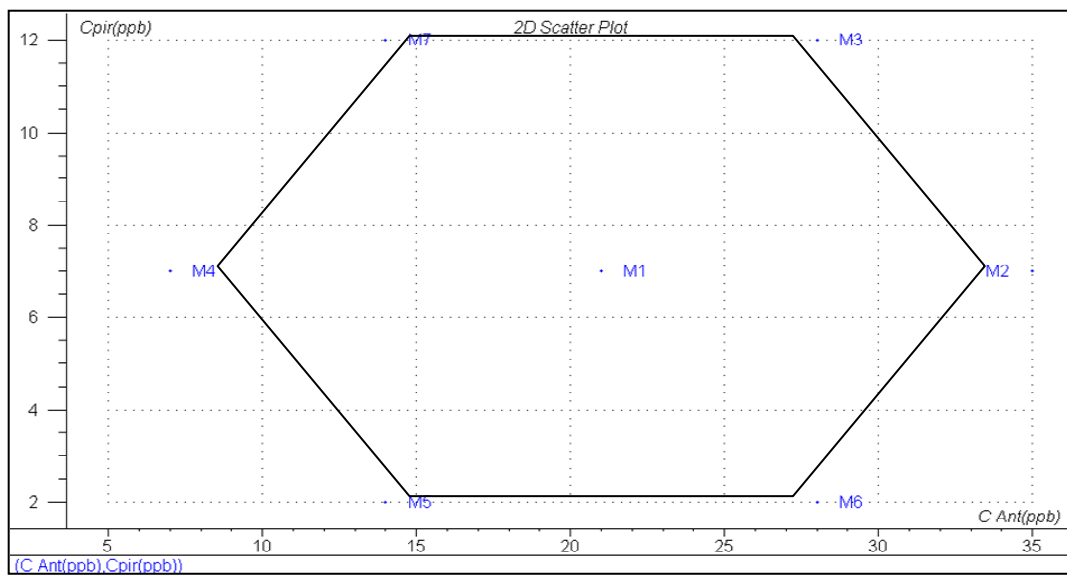
Dado que los resultados obtenidos en la CM, utilizando el diseño multinivel  $5^2$ , fueron poco satisfactorios, se ensayó el uso de otro diseño experimental, la matriz de Doehlert. Cuando los niveles de cada variable se incrementan y además cada factor no posee exactamente el mismo número de niveles, se utiliza el diseño de segundo orden de **Matriz de Doehlert**<sup>9</sup>, el cual requiere pocos experimentos a pesar del aumento de los niveles y los factores, y son más eficientes porque se puede abarcar todo el dominio experimental. Para la matriz de Doehlert el número de experimentos requeridos viene dado por la expresión:

$$N = k^2 + k + C_o \quad [2]$$

Donde N es el número de experimentos, k es el número de factores y  $C_o$  el número de puntos centrados.

Para dos variables que en nuestro caso es la concentración de Antraceno y Pireno, la matriz de Doehlert consiste de 7 experimentos, un punto central y seis formando un hexágono. En el diseño Doehlert, el número de niveles no es el mismo para todas las variables. En un diseño de dos variables, una de estas es estudiada a cinco niveles mientras que la otra se estudia a solo tres niveles. Como regla general, se escoge la variable con el efecto más fuerte con cinco niveles para obtener más información del sistema.

En la figura 2.14, se muestra la representación gráfica de la matriz de Doehlert para dos factores, en nuestro caso la concentración del antraceno, representado en el eje de las abscisas, y la concentración del pireno, representada en el eje de las ordenadas. La concentración para el antraceno varía entre 7 y 35 ppb, para el pireno se estableció entre 2 y 12 ppb. El punto centrado y los que conforman el hexágono, representan la concentración de las siete muestras de calibración.



**Figura 2.14** Diseño Matriz de Doehlert para dos variables

La relación entre las variables naturales y las variables codificadas para la matriz de Doehlert, viene expresada por la siguiente ecuación:

$$C_i = \left( \frac{X_i - X_i^o}{\Delta X_i} \right) \alpha \quad [3]$$

Donde:

$C_i$  = es el valor codificado de la concentración del constituyente j para la mezcla

$X_i$  = es el valor natural de la concentración del constituyente  $i$  en el experimento.

$X_i^o$  = es el valor medio del rango de concentraciones.

$\Delta X$  = es el paso de variación del valor real.

$\alpha$  = es el valor límite codificado de cada factor.

Para una matriz de Doehlert de dos variables, los valores codificados se muestran en la tabla 2.12.

**Tabla 2.12** Valores codificados para una matriz de Doehlert de dos variables.

Muestras	Variables Experimentales	
	A	B
1	0	0
2	1	0
3	0.5	0.866
4	-1	0
5	-0.5	-0.866
6	0.5	-0.866
7	-0.5	0.866

En la tabla 2.13 se muestra la composición de las siete muestras de calibración, establecidas por la matriz de Doehlert. Se indica la concentración de antraceno y pireno en ppb, como valores naturales del diseño. Para el conjunto de validación se escoge igualmente una matriz de Doehlert de dos variables, en este caso la concentración del antraceno varía desde un valor mínimo de concentración de 8 ppb hasta un valor máximo de 32 ppb con un paso de variación de 6. Para el pireno la concentración del pireno varía desde 3 hasta 9 ppb con un paso de variación de 6. La composición de las mezclas de validación se muestra en la tabla 2.14.

**Tabla 2.13** Composición de las muestras del conjunto de calibración utilizando como diseño una matriz de Doehlert de dos variables.

Muestras	Concentración(ppb)	
	Ant	Pir
1	21	7
2	35	7
3	28	12
4	7	7
5	14	2
6	28	2
7	14	12

**Tabla 2.14** Composición de las muestras del conjunto de validación utilizando como diseño una matriz de Doehlert de dos variables.

Muestras	Concentración(ppb)	
	Ant	Pir
1	20	6
2	32	6
3	26	9
4	8	6
5	14	3
6	26	3
7	14	9

### | 3.4.3.1 Aplicación de los modelos PLS1 y PLS2 sobre el conjunto de Calibración del diseño Matriz de Doehlert:

Los resultados obtenidos aplicando los algoritmos PLS1 y PLS2 , se muestran en la tabla 2.15. Se obtiene que tanto el modelo PLS1 como el modelo PLS2 presentan un buen ajuste del modelo, dado que los factores escogidos explican una alta variabilidad en los datos tanto para las variables X como las Y. Aunque se modela mejor la variabilidad en la data espectral X, donde la varianza explicada es próxima al 100%. Para las variables Y, la varianza explicada solo es del 55%.

Se obtiene que los errores de calibración (RMSEC) presentan valores bajos en general, con lo que se obtiene un buen ajuste de calibración con excelentes coeficiente de correlación, cercanos a la unidad. Con respecto al error de validación (RMSECV), se obtienen valores más elevados por lo que la capacidad predictiva del modelo en principio no debería ser tan eficiente, esto también se refleja en el error relativo RMSECV(%) donde incluso los valores obtenidos son peores para el antraceno con respecto al obtenido utilizando el diseño factorial  $5^2$  (ver tabla 2.11), aunque mejores para el pireno.

La inclusión de menos factores en el modelo de matriz de Doehlert comparado al diseño factorial  $5^2$ , se puede deber a que el número de muestras de calibración (siete) es menor a las del diseño factorial (veinticinco). El hecho de tener menor cantidad de muestras y un intervalo de concentración más cercano disminuye la variabilidad entre las muestras.

**Tabla 2.15** Parámetros Estadísticos calculados por validación interna aplicando el modelo PLS1 y PLS2 para el antraceno y el pireno en las mezclas de calibración en medio micelar utilizando como diseño la matriz de Doehlert.

Parámetros		PLS1		PLS2	
		Antraceno	Pireno	Antraceno	Pireno
PC		3	5	5	5
Varianza Total Explicada (%)	Matriz X	96	98,35	99,80	
	Vector Y1 Ant	60	-		
R <sup>2</sup>	Vector Y2 Pir	-	50,53	55,15	
	Calibración	0,9801	0,9917	0,9989	0,9994
	Validación	0,7519	0,7418	0,7286	0,9080
RMSEC (ppb)		1,82	0,12	0,42	0,13
RMSECV (ppb)		6,74	1,68	7,56	1,68
RMSECV (%)		32	24	36	24
Número de Muestras (n)		7			
Rango de Variables		(300-700) nm (524 valores)			
Pre-procesamiento de la data		Centrado en columna			

### 3.4.3.2 Validación externa de los modelos de calibración PLS1 y PLS2 sobre el conjunto de Validación del diseño Matriz de Doehlert:

Para la validación externa del modelo del diseño de matriz de Doehlert se utilizó un conjunto de 7 muestras, ver tabla 2.14. Se aplicaron los modelos de PLS1 y PLS2 establecidos previamente con el conjunto de las muestras de calibración y los resultados obtenidos en esta etapa de la CM, se muestran en la tabla 2.16.

Se obtiene que para el antraceno tanto el modelo PLS1 como en el PLS2, el valor de error de predicción relativo (RRMSEP) es muy similar, alrededor del 20%, utilizando solo dos componentes principales y se predicen adecuadamente casi todas las muestras de validación (7 para el PLS1 y 6 para el PLS2).

**Tabla 2.16** Parámetros Estadísticos calculados por validación externa aplicando el modelo PLS1 y PLS2 para el antraceno y el pireno en las mezclas de validación en medio micelar.

Parámetros	PLS1		PLS2	
	Antraceno	Pireno	Antraceno	Pireno
<b>PC</b>	2	5	2	5
<b>RMSEP(ppb)</b>	3,98	1,48	4,28	1,46
<b>RRMSEP (%)</b>	18	30	21	29
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9053	0,9311	0,8081	0,9290
<b>Número de Muestras</b>	7	6	6	6
<b>Rango de Variables</b>	(300-700) nm (524 valores)			
<b>Procesamiento de los datos</b>	Centrado en columna			

Para el pireno tanto el modelo PLS1 como el PLS2 presentan un mismo valor del error RRMSEP (%), por lo que se tiene la misma capacidad predictiva para ambos modelos por validación externa y se ambos predicen seis de las siete mezclas de validación. Los resultados obtenidos, utilizando la matriz de Doehlert como diseño de calibración, indican que este modelo es representativo de las mezclas de validación y predice la concentración de antraceno y pireno con un porcentaje de error bastante aceptable.

Los errores de predicción relativos obtenidos en la validación externa, por la matriz de Doehlert son mejores, que los alcanzados en el diseño factorial  $5^2$  (ver tabla 2.11) tanto para el antraceno como para el pireno. La matriz de Doehlert, resultó ser un diseño de calibración más eficiente que el diseño factorial, en la determinación de antraceno y pireno en medio micelar por CM.

### **3.4.4 Efectos del uso de un detector de respuesta rápida en la determinación de los HAPs mediante CM con sistema de Excitación láser Nd: YAG.**

La detección de la señal analítica, proveniente de una fuente de excitación de láser pulsado, mediante un sistema de detección simultáneo constituyó una limitación experimental que afectó la determinación de los HAPs mediante CM. Para compensar la poca precisión obtenida en las medidas de fluorescencia que se registran con el detector simultáneo, se realizó el registro de la señal analítica, mediante un sistema de integración boxcar, que sincroniza el tiempo del pulso de excitación del láser con la adquisición de la señal y se utilizó para la detección un fotomultiplicador,

Se realizó la CM de nueve mezclas de antraceno y pireno, registrando la señal de fluorescencia con el PMT. Para el pireno y el antraceno, se obtienen por PLS2 valores de RMSEC de 55,97 y RMSECV de 70, para un solo componente principal. Los valores obtenidos por PLS1 son más altos que los reportados con el detector simultáneo, por tanto este sistema de detección no fue efectivo en la determinación de los HAPs por CM.



### 3.4.5 Efectos del uso de una Lámpara de Arco de Xenón en la determinación de los HAPs mediante CM.

La diferencia entre la sensibilidad del antraceno y del pireno obtenida, cuando se utilizó como fuente de excitación un láser pulsado Nd-YAG, influyó de forma notable sobre los resultados obtenidos por CM. La longitud de onda de excitación del láser fue de 355nm, ésta favoreció la excitación del antraceno dado la fuerte absorción que presenta este analito en esta zona espectral, ver figura 2.15 a. Para el pireno la excitación fue mucho más débil a 355nm; ya que en esta zona espectral la absorbancia es muy bajo, ver figura 2.15 b. No obstante se logró observar la emisión de fluorescencia de este analito a 399nm (ver figura 2.8 I) con la limitación de una pobre sensibilidad en esta señal.

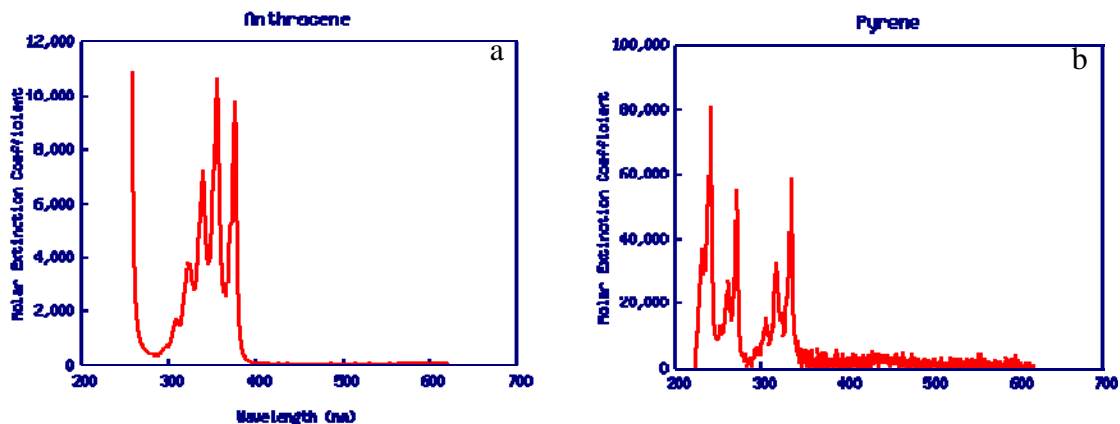


Figura 2.15 (a) Espectro de Absorción del Antraceno y (b) Espectro de Absorción del Pireno

De forma de compensar los efectos que se producen debido a la baja sensibilidad en la determinación del pireno por el uso del láser como fuente de excitación, éste se sustituyó por una lámpara de arco de xenón. Se realizó entonces la determinación simultánea de antraceno y pireno en mezclas en medio orgánico, mediante CM. Se utilizó en esta etapa experimental el montaje experimental descrito en la sección 2.3.3.

**3.4.5.1 Construcción del conjunto de Calibración en base a un diseño factorial 5<sup>2</sup> y aplicación de los algoritmos PCR, PLS1 y PLS2.**

Al igual que en la sección anterior, se utilizó un diseño multifactorial 5<sup>2</sup> para establecer el conjunto de calibración. En la tabla 2.17 se presentan la composición de las muestras del conjunto de calibración, el intervalo de concentración utilizado fue entre 20 y 100 µg L<sup>-1</sup> para el antraceno y entre 100 y 500 µg L<sup>-1</sup> para el pireno. Las muestras de calibración se preparan en medio orgánico debido a la influencia del medio micelar sobre los HAP<sub>s</sub> utilizados.

**Tabla 2. 17** Composición del conjunto de Muestras de Calibración diseño 5<sup>2</sup>

Mezclas calibración	CAnt(ppb)	CPir(ppb)	Mezclas calibración	CAnt(ppb)	CPir(ppb)
0	0	0	13	60	100
1	20	300	14	80	100
2	40	100	15	100	400
3	20	500	16	60	400
4	60	500	17	20	200
5	100	100	18	80	300
6	80	100	19	80	400
7	40	200	20	40	300
8	60	200	21	60	300
9	100	500	22	100	200
10	40	500	23	40	400
11	20	100	24	100	300
12	80	200	25	20	400

En la tabla 2.18, se presentan los resultados obtenidos mediante la aplicación de los algoritmos PCR, PLS1 y PLS2 en el conjunto de calibración. Los datos de calibración fueron ajustados con 3 PC en los modelos PCR y PLS1 y con 4 PC en el modelo PLS2. Los PC obtenidos modelan los componentes de las muestras de calibración y las posibles no-linealidades entre los datos de fluorescencia. Los modelos de calibración obtenidos son robustos, ya que existe gran similitud entre los errores de calibración (RMSEC) y de validación cruzada interna (RMSECV) obtenidos para cada HAP en los diferentes algoritmos utilizados. Esto indica que las muestras de calibración son representativas de las muestras de predicción, esto es describen adecuadamente los fenómenos de variabilidad que se presentan en estas últimas y no debería haber un sobre ajuste del modelo según los factores escogidos<sup>10</sup>.

**Tabla 2.18** Parámetros Estadísticos calculados por validación interna aplicando los modelos PCR, PLS1 y PLS2 para el conjunto de muestras de calibración de antraceno y pireno en medio orgánico.

Parámetros	PCR		PLS1		PLS2	
	Ant	Pir	Ant	Pir	Ant	Pir
<b>PC</b>	<b>3</b>		<b>3</b>		<b>3</b>	
<b>Coefficiente de Calibración</b>	0,9521	0,9794	0,9380	0,9797	0,9419	0,9824
<b>Determinación R<sup>2</sup> Validación</b>	0,9221	0,9707	0,9002	0,9678	0,9104	0,9694
<b>RMSEC (ppb)</b>	<b>8,83</b>	<b>27,30</b>	<b>9,69</b>	<b>26,89</b>	<b>9,48</b>	<b>25,46</b>
<b>RMSECV (ppb)</b>	<b>11,22</b>	<b>32,47</b>	<b>12,22</b>	<b>33,83</b>	<b>11,70</b>	<b>33,62</b>
<b>Número de Muestras predichas NP</b>	21	23	23	21	22	22
<b>Número de Muestras N</b>	25					
<b>Pre-procesamiento de los datos</b>	Data centrada					

### 3.4.5.2 Validación externa de los modelos de calibración PCR , PLS1 y PLS2

Se utilizaron diez muestras para la validación externa del modelo de calibración 5<sup>2</sup>; cuya composición se presenta en la tabla 2.19.

**Tabla 2.19** Composición del conjunto de Muestras de Validación

Mezclas validación	C Ant (ppb)	C Pir (ppb)	Mezclas validación	C Ant (ppb)	C Pir (ppb)
1	32	160	6	52	360
2	52	260	7	72	160
3	72	360	8	92	260
4	92	100	9	32	360
5	32	300	10	72	160

Los resultados obtenidos por validación externa de los modelos de calibración PCR, PLS1 y PLS2 se presentan en la tabla 2.20. Se observa que los tres modelos de calibración presentan una mejor predicción en la concentración de las soluciones de pireno ya que se obtienen los más bajos errores de predicción relativos RRMSEP (%). Con respecto a la predicción de la concentración de las soluciones de antraceno, se obtienen valores más altos de RRMSEP (%), por lo que la eficiencia de predicción de este analito es ligeramente inferior a la del pireno.

Se realizó un análisis de varianza de un factor para los valores de RRMSEP (%) de los tres modelos de calibración para el antraceno y para el pireno. En ambos HAPs se obtiene que el valor de F calculado para el antraceno (516) y para el pireno (319) fue mayor al valor de F crítico  $(_{0.05,3,4})= 5,14$ , esto indica que existen diferencias significativas en la capacidad de predicción de los modelos de calibración.

**Tabla 2.20** Parámetros Estadísticos calculados por validación externa aplicando los modelos PCR, PLS1 y PLS2 para el conjunto de muestras de validación de antraceno y pireno de en medio orgánico.

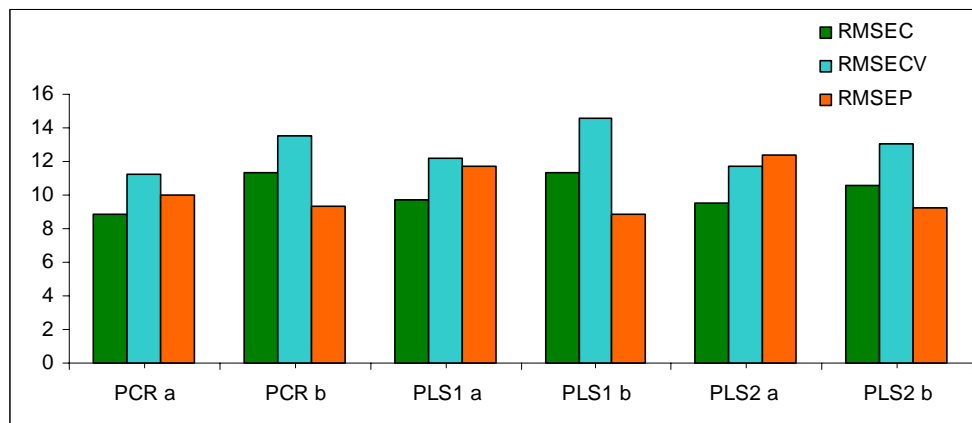
Parámetros	PCR		PLS1		PLS2	
	Ant	Pir	Ant	Pir	Ant	Pir
PC	9	3	2	2	2	3
Coefficiente de Regresión R <sup>2</sup>	0,9412	0,9572	0,9412	0,8975	0,9444	0,9384
RMSEP (ppb)	10,01	40,18	11,68	41,69	12,39	37,46
RRMSEP(%)	<b>17,62</b>	<b>14,97</b>	<b>21,63</b>	<b>16,30</b>	<b>22,17</b>	<b>14,05</b>
NP			10			9
N				10		
Rango de Variables			(350-500) nm (299 valores)			
Pre-procesamiento de los datos			Data Centrada			

Según los resultados obtenidos por validación externa, el mejor modelo de calibración para la predicción del antraceno corresponde al PLS1 ya que posee el menor número de PC y un bajo valor en el error de predicción relativo del 21,63 %. El modelo PCR presenta un valor más bajo de RRMSEP (%) (17,62) pero requiere de una elevada cantidad de PC. Para el pireno se escoge como mejor modelo el PLS2 ya que posee el menor valor de RRMSEP (%) (14,05).

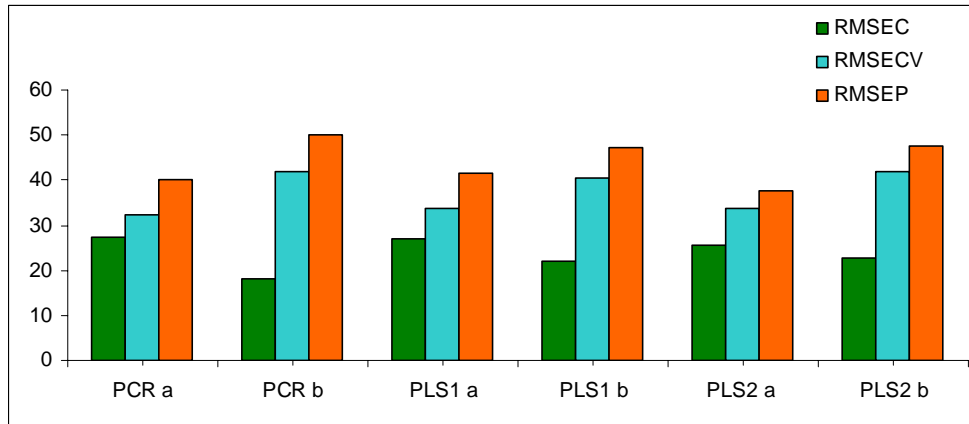
### 3.4.5.3 Comparación entre los modelos PCR, PLS1 y PLS2, sobre el conjunto de calibración del diseño factorial 5<sup>2</sup> y un sub-conjunto de quince muestras.

Se escogió un subconjunto de las primeras quince muestras de calibración, ver tabla 2.12, de las veinticinco obtenidas por el diseño multinivel 5<sup>2</sup> para la aplicación de los modelos de calibración utilizados anteriormente. Para la validación externa, se utilizó el mismo conjunto de las muestras de validación anterior, ver tabla 2.19.

En las figuras 2.16 y 2.17 se presenta la comparación entre los errores de calibración, de validación cruzada interna y de validación externa cuando se utiliza: a) el conjunto de calibración de 25 muestras y b) el subconjunto de 15 muestras. Para el antraceno, se obtienen en todos los casos robustez entre los modelos de calibración utilizados, ya que presentan valores similares entre la magnitud de los errores de calibración y ambas formas de validación. Para el pireno se obtiene robustez entre los modelos PCR, PLS1 y PLS2, cuando se utilizan el conjunto total de las muestras de calibración. Para el sub-conjunto de quince muestras de calibración, los errores de RMSECV y RMSEP son similares entre sí indicando que las muestras de calibración son representativas de las muestras de validación externa. No obstante existen diferencias notables entre el valor del RMSEC y RMSECV, esto indica que al disminuir el número de muestras del conjunto de calibración obtenidas por un diseño multinivel se produce un sobre-ajuste de los datos de calibración<sup>10</sup>.

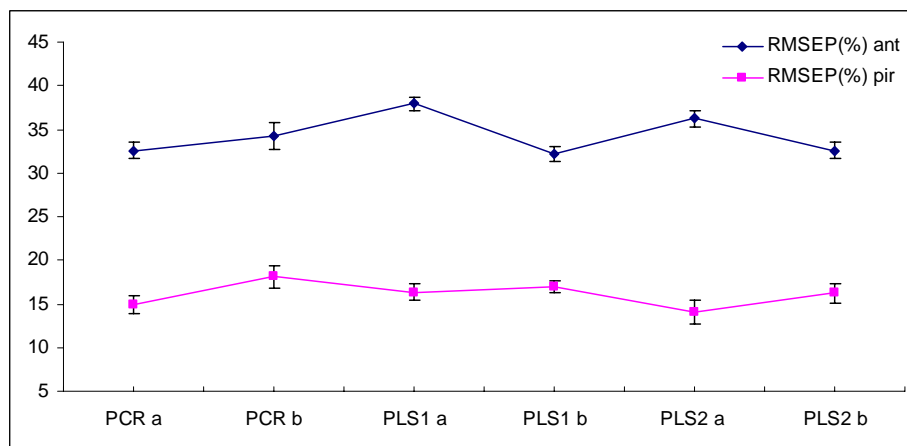


**Figura 2.16** Comparación de los errores de calibración, validación cruzada y validación externa la determinación de antraceno, utilizando diferentes modelos de calibración.



**Figura 2.17** Comparación de los errores de calibración, validación cruzada y validación externa la determinación de pireno, utilizando diferentes modelos de calibración.

En la figura 2.18, se muestra la comparación entre los valores de RRMSEP (%) obtenidos por validación externa de los modelos de calibración PCR, PLS1 y PLS2 cuando se utiliza: el conjunto de calibración (a) y su subconjunto (b). Se observa que en todos los modelos existe una mejor predicción para la determinación del pireno con respecto al antraceno; ya que se obtienen los valores más bajos de RRMSEP (%). Una mejor predicción para el antraceno se alcanza cuando se utilizan los modelos PLS1 b y PLS2 b.



**Figura 2.18** Influencia de los modelos de calibración sobre el error de predicción relativo, RRMSEP (%), en la predicción de antraceno y de pireno.

Por otro lado, se observa que no existe mayor influencia sobre los errores relativos de predicción entre los modelos de calibración utilizados. Esto esta acorde con los resultados obtenidos por Debos y col<sup>11</sup>, al comparar la influencia de un diseño Plackett-Burman (PB) y un diseño PB incompleto sobre el ajuste de los modelos de calibración PLS.

### **3.4.5.4 Desarrollo del modelo de Calibración utilizando los algoritmos PLS1 y PLS2 sobre un conjunto de muestras de calibración independientes.**

Normalmente en la construcción del conjunto de calibración, suelen utilizarse diseños multinivel tales como diseños factoriales, plackett- Burman, matriz de dohlert, etc, para disminuir la covarianza entre los analitos y disminuir los efectos de colinealidad entre los datos de las muestras<sup>12</sup>. No obstante la construcción de estos conjuntos no se limita al uso de un diseño multinivel y se puede establecer la composición de un conjunto de calibración simplificado, con un menor número de muestras, que cubra el intervalo de concentraciones en que se puedan cuantificar todos los componentes presentes. En este sentido, en este estudio se planteo un conjunto de calibración de seis muestras, ver tabla 2.21, donde se establecen seis niveles de concentración para cada componente. Estos niveles se incrementan de forma ascendente al azar. Se utilizó el mismo intervalo de concentración de antraceno y el pireno establecido en el modelo factorial 5<sup>2</sup>. Para la validación externa se escogen cuatro muestras cuya composición se indica en la tabla 2.22.



**Tabla 2.21** Composición del conjunto de Muestras de Calibración

Mezclas Calibración	C Ant (ppb)	C Pir (ppb)
1	24	240
2	32	320
3	52	400
4	72	520
5	80	640
6	92	760

**Tabla 2.22** Composición del conjunto de Muestras de Validación

Mezclas Validación	CAnt(ppb)	CPir(ppb)
1	36	360
2	56	480
3	76	560
4	84	720

En la tabla 2.23, se presentan los resultados obtenidos en el ajuste de los datos de calibración del conjunto de muestras anterior mediante los modelos PLS1 y PLS2. Se obtiene que los errores RMSEC y RMSECV presentan valores más bajos para el antraceno que para el pireno. Esto indica que los modelos de calibración PLS presentan un mejor ajuste de los datos de calibración con respecto al antraceno. No obstante en ambos modelos de calibración se observa que hay diferencias apreciables entre los valores de RMSEC y RMSECV por lo que es probable que estos modelos sobre ajusten los datos de calibración.

El número de PC de cada modelo es de 4 para el antraceno y 3 para el pireno, esto indica que deben existir efectos no lineales entre los datos de calibración y por tanto se requiere la inclusión de más PC para modelar dichos efectos. Estos factores pueden contener información espectral irrelevante relacionada al ruido lo cual también produce un sobre-ajuste de los datos.

**Tabla 2.23** Parámetros Estadísticos calculados por validación interna aplicando los modelos PLS1 y PLS2 para el antraceno y el pireno en las mezclas de calibración en medio orgánico utilizando un subconjunto de calibración de 6 muestras.

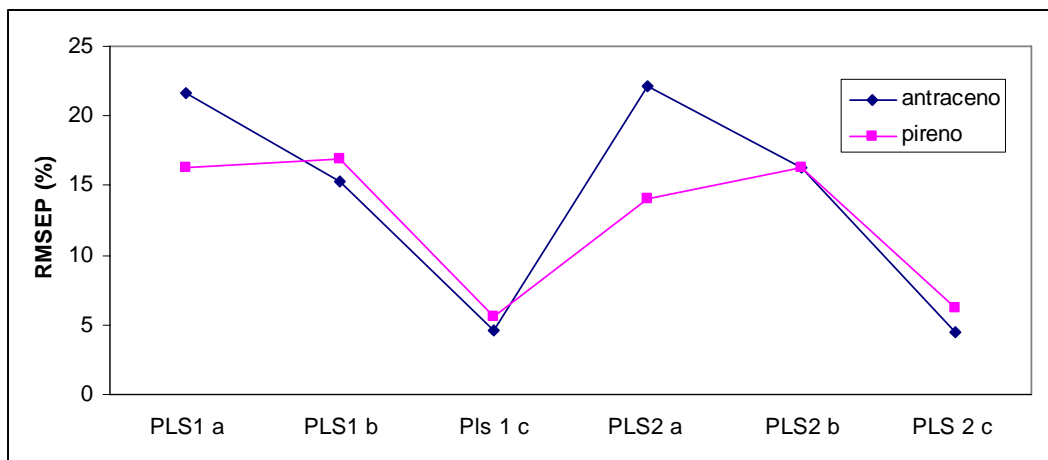
Parámetros			PLS1		PLS2	
			Ant	Pir	Ant	Pir
<b>PC</b>			4	3	4	3
<b>Coficiente de Regresión R2</b>	<b>Calibración</b>		0,9999	0,9989	0,9998	0,9975
	<b>Validación</b>		0,9987	0,9953	0,9967	0,9939
<b>RMSEC (ppb)</b>			0,21	8,60	0,47	8,60
<b>RMSECV (ppb)</b>			1,55	19,26	2,41	22,83
<b>RMSECV (%)</b>			<b>2,65</b>	<b>4,01</b>	<b>4,11</b>	<b>4,76</b>
<b>NP</b>			6	6	6	6
<b>N</b>			6			
<b>Rango de Variables</b>			<b>(350-500) nm (299 valores)</b>			
<b>Pre-procesamiento de los datos</b>			<b>Data Original</b>			

Posteriormente se realizó la validación externa de los modelos de calibración anteriores. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.24, se obtienen errores de predicción relativos alrededor de 4,5 % para el antraceno y del 6% para el pireno. Según estos resultados se obtiene que los modelos de calibración PLS1 y PLS2 presentan una elevada capacidad predictiva tanto para el antraceno como para el pireno sobre estas muestras de validación.

**Tabla 2.24** Parámetros Estadísticos calculados por validación externa aplicando los modelos PLS1 y PLS2 para cuatro muestras de antraceno y el pireno en medio orgánico.

Parámetros	PLS1		PLS2	
	Ant	Pir	Ant	Pir
PC	3	5	5	4
Coefficiente de Determinación R <sup>2</sup>	0,9986	0,9820	0,9989	0,9786
RMSEP (ppb)	2,99	29,46	2,96	33,05
RMSEP(%)	4,55	5,60	4,51	6,27
Np		4		
N		4		
Rango de Variables	(350-500) nm (299 valores)			
Pre-procesamiento de los datos	Data Original			

En la figura 2.19, se presenta el efecto de los diferentes conjuntos de calibración utilizados en esta sección: a) conjunto de 25 muestras de diseño factorial 5<sup>2</sup> b) subconjunto de 15 muestras del diseño factorial y c) conjunto de 6 muestras sobre el valor del RRMSEP (%) obtenido de los modelos de calibración PLS1 y PLS2. Se observa que la mejor predicción se obtiene en los modelos PLS1 c Y PLS2 c. Esto indica que al simplificar el conjunto de calibración utilizando un menor número de muestras y disminuyendo el número de combinaciones entre ellas se obtienen una mejor eficiencia de predicción.



**Figura 2.19** Influencia de los modelos de calibración sobre el error de predicción relativo (RRMSEP (%)) en la predicción de antraceno y de pireno utilizando los diferentes conjuntos de calibración.

Para efectos de comparación citaremos estudios previos sobre la determinación de HAPs en medio micela<sup>13-17</sup>, ya la magnitud de los errores de predicción obtenidos. Amador –Hernández y col.<sup>13</sup>, realizó la determinación semi-cuantitativa de HAPs con LIFS reportando valores de RRMSEP (%) del 5 al 10%. En otro estudio<sup>14</sup> de este mismo autor pero utilizando fluorescencia de ángulo variable lineal en la determinación de seis HAPs en medio micelar con el surfactante éter del 10 laurilo poli-oxietileno (POLE), se reportan errores de predicción del 3 al 12%. Guiteras y col<sup>15</sup>, reportan errores de predicción del 6 al 11% para la determinación de diez analitos en medio micelar utilizando como surfactante Brij-35. Olivier Debos y col<sup>11</sup>, obtienen errores de predicción entre el 3 y 10%. En nuestro estudio los errores de predicción relativos obtenidos están alrededor del 20% para el antraceno y para el pireno entre el 24 y 45%. Una mejor predicción del pireno fue obtenida, cuando se utiliza el diseño de la matriz de Doelhert, con un RRMSEP entre el 21 y el 29% y aun más bajo cuando se utiliza la lámpara de arco de xenón, RRMSEP del 15%.

No obstante valores de RRMSEP del 5% y 6% fueron obtenidos en la predicción de la concentración de antraceno y pireno respectivamente; cuando se utilizó un conjunto de calibración y validación simplificado, ver tabla 2.16 y 2.17. Estos valores de RRMSEP (%) son comparables en magnitud a los reportados en trabajos previos de determinación de HAPs en medio micelar.

### 3.5 Predicción de los HAPs antraceno y pireno en muestras de agua potable.

Fueron aplicados los modelos PLS1 y PLS2 validados mediante el sistema de detección con detector simultáneo y el uso de láser ND: YAG, sobre cuatro muestras de agua potable contaminadas con cantidades conocidas de pireno y antraceno. Así se evaluó la eficiencia de estos modelos en la determinación semi-cuantitativa de los analitos. Los resultados obtenidos al aplicar el modelo PLS1 en las muestras de agua se muestran en la tabla 2.25, se incluyen los valores de concentración añadida de cada analito y el porcentaje de recuperación de los mismos. El modelo PLS1, predice adecuadamente la concentración de antraceno en las cuatro muestras con porcentajes de recuperación que van desde el 88 % al 112%. Para el pireno solo se predicen dos muestras de las cuatros analizadas, obteniéndose porcentajes de recuperación del 88 y 75%.

**Tabla 2. 25** Determinación de antraceno y pireno en agua potable aplicando el modelo PLS1

Muestras	C Ant(ppb)		% Rec	Cpir(ppb)		% Rec
	Añadida	Encontrada		Añadida	Encontrada	
1	20	20,162	<b>101</b>	10	-	-
2	65	73,023	<b>112</b>	4	-	-
3	37	32,406	<b>88</b>	10	8,770	<b>88</b>
4	51	46,528	<b>91</b>	30	22,366	<b>75</b>

En la tabla 2.26, se presentan los resultados obtenidos en la determinación de antraceno y pireno, empleando el modelo PLS2, en las cuatro muestras de agua potable contaminadas. Se observa que para el antraceno, se logra predecir la concentración de tres de las cuatro muestras analizadas con porcentajes de recuperación que van del 117% al 84%. Para el pireno también se predice la concentración de sólo tres muestras del total analizadas (cuatro), con porcentajes de recuperación que van desde el 98 al 49%, indicando este último valor poca capacidad predictiva del modelo PLS2, respecto a esta muestra.

**Tabla 2.26** Determinación de antraceno y pireno en agua potable aplicando el modelo PLS2

Muestras	C Ant(ppb)		% Rec	C pir(ppb)		% Rec
	Añadida	Encontrada		Añadida	Encontrada	
1	20	19,958	<b>100</b>	10	9,822	<b>98</b>
2	65	75,870	<b>117</b>	4	3,681	<b>92</b>
3	37	30,955	<b>84</b>	10	4,871	<b>49</b>
4	51	-	-	30	-	-

De los resultados obtenidos se puede inferir que en una matriz sencilla de compuestos inorgánicos como el agua potable, estos no ejercen influencia en la cuantificación del antraceno sobre la predicción del modelo PLS1. Los resultados obtenidos para el pireno, se deben a las limitaciones previas del modelo y no a las interferencias de la matriz de la muestras, esto constituye una de las ventajas de los modelos bilineales PLS1 y PLS2 en la determinación de analitos junto con otros posibles interferentes sin la separación previa de los componentes de la matriz de la muestra como se realiza habitualmente en la determinación de los HAPs mediante técnicas cromatográficas, procesos de extracción y de preconcentración antes de ser analizados.

## 4. CONCLUSIONES

### 4.1 Sistema de Excitación con Láser Nd-YAG.

- Se propuso un método para la determinación simultánea semi-cuantitativa de antraceno y pireno en muestras de aguas potables, mediante espectroscopia de fluorescencia inducida por láser. Para ello se utilizaron dos sistemas de registro de la señal analítica: simultáneo y secuencial. Dos tipos de diseño de experimentos multinivel: factorial y matriz de Doehlert, fueron aplicados. Los mejores modelos obtenidos mediante CM, fueron aplicados en el análisis de muestras de agua potable contaminadas con antraceno y pireno.
- Se escogió el medio micelar como medio de disolución del antraceno y del pireno en el análisis multivariado, ya que se registraron incrementos en la señal de fluorescencia de estos analitos en medio micelar con respecto al medio acuoso. Los valores de  $R_{IF}$  fueron de 3,5 y 5 para el antraceno y el pireno respectivamente.
- La aplicación de los modelos de calibración univariada y multivariada, requirió el pre-tratamiento de los datos espectrales. Se incremento la relación señal a ruido, mediante la utilización de tratamientos matemáticos de promediado de la señal y promediado boxcar, que se realizaron con el software del espectrómetro, en tiempo real, a medida que la señal analítica era registrada. El pre-procesamiento de los datos, centrado en columna, se utilizó en todos los modelos de calibración multivariada, porque con este se obtiene los mejores resultados en dichos modelos.

- La capacidad predictiva de los modelos de calibración PLS1 y PLS2, sobre las muestras de validación del diseño  $5^2$ , presenta la misma eficiencia predictiva para el antraceno, con un RRMSEP del 22%. Para el pireno, se obtiene RRMSEP de 24% y 45% por PLS1 y PLS2 respectivamente. Los modelos de calibración PLS1 y PLS2 fueron eficaces tanto en el ajuste del error residual así como en la capacidad de predicción del antraceno. Para el pireno estos modelos de calibración presentan poca eficiencia predictiva.
- La utilización de un sistema de registro de fluorescencia con sistema de integración boxcar acoplado a un foto-multiplicador permitió mejorar la precisión en las medidas de la señal de fluorescencia obtenidas mediante fluorescencia inducida por láser.
- El uso de dos sistemas diferentes de detección de la señal de fluorescencia: espectrómetro simultáneo con detector CCD y secuencial con integración boxcar y detector foto-multiplicador, permitió la determinación del antraceno con una elevada sensibilidad. Una pobre sensibilidad en la detección del pireno, fue obtenida por fluorescencia inducida por láser (355 nm).
- La mejor eficiencia predictiva se obtiene en la determinación semi-cuantitativa de antraceno en cuatro muestras de agua potable. Los modelos PLS1 y PLS2, presenta una capacidad predictiva satisfactoria de la concentración de antraceno en las muestras analizadas, con porcentajes de recuperación que van desde el 88% al 112% y 84% al 117%, respectivamente. Para el pireno, la eficiencia predictiva es poco satisfactoria, el modelo PLS 1 predice solo dos muestras de las cuatros analizadas, con porcentajes de recuperación del 88 y 75%. El modelo PLS2, presentó porcentajes de recuperación para el pireno entre el 49 al 98%, sobre sólo tres muestras del total analizadas.



- La aplicación de los modelos PLS1 y PLS2, permitió la determinación semi-cuantitativa de antraceno y pireno en muestras de agua potable, en presencia de la matriz de compuestos inorgánicos de la muestra. No se requirió la separación previa de los analitos de la matriz, como se realiza habitualmente en la determinación de HAPs mediante técnicas cromatográficas, procesos de extracción y de preconcentración antes de ser analizados.
- La aplicación de la matriz de Doehlert resultó ser un diseño estadístico más sencillo, rápido y con menor coste experimental, en la predicción semi-cuantitativa de antraceno y pireno en medio micelar con respecto al diseño multinivel  $5^2$ . Se obtuvieron resultados satisfactorios tanto en la bondad de ajuste del modelo de calibración como en el de validación aplicando los algoritmos PLS1 y PLS2.

### **4.2 Sistema de Excitación con Lámpara de Arco de Xenón.**

- El uso de medio micelar permitió un incremento en la intensidad de fluorescencia en la determinación del pireno. No obstante para el antraceno no se observa diferencias significativas entre la fluorescencia obtenida entre el medio micelar y el medio orgánico.
- Se realizó una comparación en la aplicación de diferentes conjuntos de calibración: un diseño factorial  $5^2$  multinivel, un diseño factorial incompleto y un conjunto de de calibración simplificado de seis muestras, en el ajuste de los modelos de calibración PCR, PLS1 y PLS2. Se obtiene que el mejor ajuste tanto por validación interna como por validación externa del PLS se obtiene utilizando el conjunto de calibración simplificado. Se demuestra que se puede obtener una predicción satisfactoria del antraceno y pireno mediante el modelo PLS sin requerir el uso de un elevado número de muestras en el conjunto de calibración.

- La aplicación de los modelos de calibración PCR, PLS1 y PLS2 presentan una eficiencia similar en la predicción de antraceno y de pireno cuando se utilizan los conjuntos de calibración: a) del diseño factorial  $5^2$  (25 muestras) y b) el subconjunto del diseño factorial (15 muestras). Esto indica que se puede disminuir el número de muestras de calibración sin que se afecte la exactitud de la predicción.
- El uso de los conjuntos de calibración de diseño factorial y el de diseño factorial incompleto no influyo sobre la robustez de los modelos de calibración PCR, PLS1 y PLS2 en la determinación de antraceno; ya que se obtienen valores similares entre los errores de calibración, validación interna y validación externa. Para el pireno se observan diferencias entre el RMSEC y el RMSECV, esto debido que al disminuir el número de muestras de calibración se produce un sobre-ajuste de los datos de calibración.
- El más bajo error de predicción relativo obtenido para los HAPs se obtiene cuando se utilizó el conjunto de calibración de 6 muestras. Esto indica que al simplificar el conjunto de calibración utilizando un menor número de muestras y disminuyendo el número de combinaciones entre ellas se obtienen una mejor eficiencia de predicción.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- 
- 1 *Fast Gated Integrators and Boxcar Averagers*. Stanford Research Systems, 1290D Ream wood Avenue, Sunnyvale, California 94089 USA, (408) 744-9040.1-10.
  - 2 M. Sharaf, D. I. Illman, B. R. Kowalsky. *Chemometrics*. Edic. John Wiley & Songs. pag.85. (1986).
  - 3 H. Willard, L. Merrit, J. Dean and F. Settle. *Instrumental Methods of Analysis*. Sixth Edition , New York. (1981).
  - 4 H. Martens and T. Naes. *Multivariate Calibration*. Wiley, Chichester (1989).

- 6 K. Rubinson y J. Rubinson. *Análisis Instrumental*. Prentice Hall.España (2000).
- 7 L.Tortajada ,P-Campíns,J.Verdú, F.Bosch-Reig.**Multivariate versus Univariate Calibration for nonlineal chemiluminiscence data. Application to Chromiun determiunation by luminal-hidrogren peroxide reaction.** *Analytical Chimica Acta*,450(155-173. 2001),
- 8 N. Miller and J. Miller. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Cuarta edición. Prentice Hall. España (2000).
- 9 Sergio L. C. Ferreira et al. **Doehlert Matrix: a Chemometric Tool for Analytical Chemistry--Review.** *Talanta* 63, N° 4 1061-1067 (2004).
- 10 H. Martens and T. Naes, *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester (1989).
- 11 O.Debos, B.Fanget, A.Saber y col. **Use of a Plackett-Burman Design with Multivariate Calibration for The Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar media by Synchronous Fluorescence.** *Anal.Chem*,74. 678-683 (2002).
- 12 M. Sharaf, D. I. Illman, B. R. Kowalsky. *Chemometrics*. Edic. John Wiley & Songs.1986 pag.85.
- 13 J. Amador-Hernandez, L. Fernandez-Romero. **Flow injection screening and semi quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by laser induced spectrofluorimetry.** *Analytical Chimica Acta* 448 , 61-69 (2001).
- 14 J. Amador-Hernandez, L. Lopez-Martínez, P.L. Lopez de Alba, A. Caldera, J.M. Estela **Determinación Simultánea de seis Hidrocarburos Policiclicos Aromáticos en medio micelar por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-1) utilizando espectros de Fluorescencia de Angulo Variable Lineal.**
- 15 R. Ferrer, J.L. Beltran, J. Guiteras. **Multivariate Calibration applied to synchronous fluorescence spectrometry. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water Samples.** *Talanta* 45, 1073-1080. (1998)

## **CAPITULO 3**

### **Determinación de Clorofila “a” en sistemas acuáticos**

#### **PARTE I**

##### **Revisión Bibliográfica**

## 1. Generalidades sobre la Clorofila

La clorofila es un pigmento verde que se encuentra en todas las plantas terrestres y acuáticas. La estructura básica de la molécula de la clorofila<sup>1</sup>, ver figura 3.1a, consiste de un macrociclo de tetrapirrol formado por cuatro anillos pirrólicos y coordinado en el centro a un ión de magnesio (2+) y el resto de la molécula de clorofila la constituye una cadena de fitol larga (C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>OH), que es un alcohol isoprenoide de 15 carbonos que se encuentra unida a uno de los anillos pirrólicos que ésta parcialmente reducido.

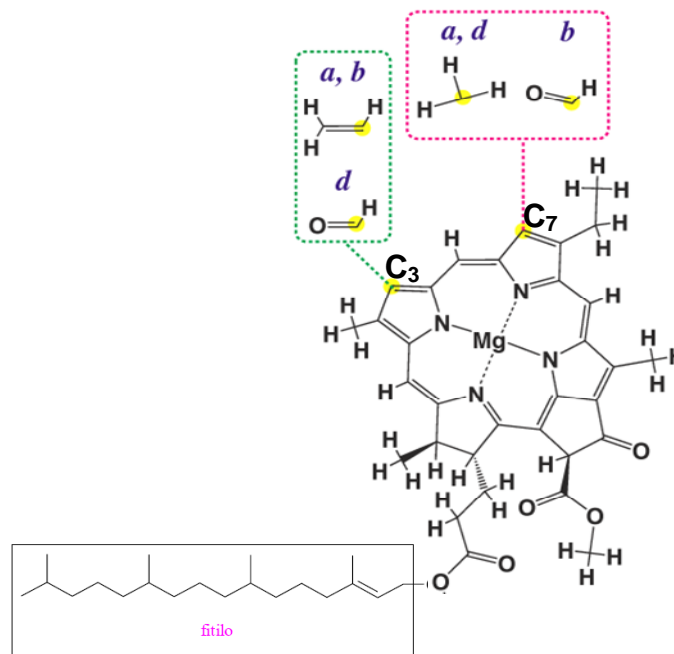


Figura 3.1 a) Estructura química de las Clorofilas a, b y d<sup>2</sup>

Existen diferentes tipos de clorofilas: la Clorofila a, Clo “a”, que se encuentra en todos los organismos fotosintéticos, la Clorofila b, Clo “b” y las clorofilas c, d y e. Según los sustituyentes unidos a los anillos del macrociclo se identificará que tipo de clorofila es, ver figura 1, si el sustituyente unido al grupo C<sub>3</sub> es un aldehído es la clorofila “d”, ahora bien si el sustituyente unido al grupo C<sub>7</sub> es un radical metilo se denomina Clo “a” y si es un grupo aldehído se denomina clorofila “b” (Clo “b”), mientras que se identifica una clorofila tipo “c” porque no posee el fitol en sus estructura<sup>2</sup> (ver figura 3.1b).

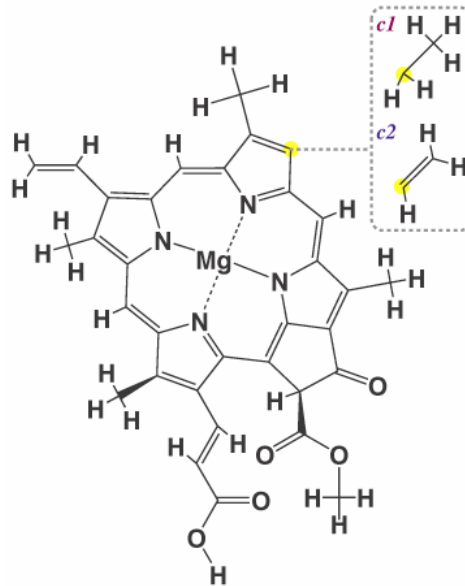


Figura 3.1 b) Estructura química de las Clorofila c

### 1.1 Productos de Degradación de las Clorofilas

Las clorofilas son altamente susceptibles a transformarse en sus productos de degradación<sup>1</sup> debido a efectos: de la luz (foto-oxidación), calor (isomerización), relación aire: oxígeno (oxidación), ácidos (desmetalización) y bases (apertura de macro-ciclos), acción de solventes, etc, por lo que solo algunos pocos estándar de los pigmentos están disponibles comercialmente entre ellos la Clo “a” y la Clo “b”.

Las reacciones de degradación<sup>3</sup> principales a las que están expuestas las clorofilas son la: alomerización (oxidación), epimerización, des-metalización, defitilación y transesterificación, halogenación y descarboxilación. En la alomerización se produce la oxidación de la molécula de clorofila por oxígeno triplete, por hidrólisis alcalina se forma un anión enolato que es sensible al oxígeno y esta anion se transforma a diversos productos de degradación de la clorofila, entre ellos se pueden obtener epímeros de la Clo”a” y la Clo “b”. Esta reacción puede ser evitada si las muestras son procesada con poca luz y a pH neutro. En la reacción de defitilación se realiza la hidrólisis de las clorofilas y mediante trans-esterificación en se remueve la cadena de fitol, se obtienen las clorofilidas (chlorophyllides).

El tratamiento de la clorofila con ácido, suele sustituir el ión de magnesio que posee esta molécula por dos átomos de hidrógeno, esta reacción se conoce como des-metalización<sup>4</sup> y el producto de esta es la formación de las denominadas feo-fitinas. La hidrólisis de las feofitinas produce la separación del grupo fitol (de-fitilación) formando las denominadas feoforbidas (pheophorbides). Las feofitinas y feoforbidas se conocen como los feopigmentos de la clorofila.

En la figura 3.2, se ilustra la reacción de transformación de la Clo “a” a sus respectivos feopigmentos<sup>5</sup>:

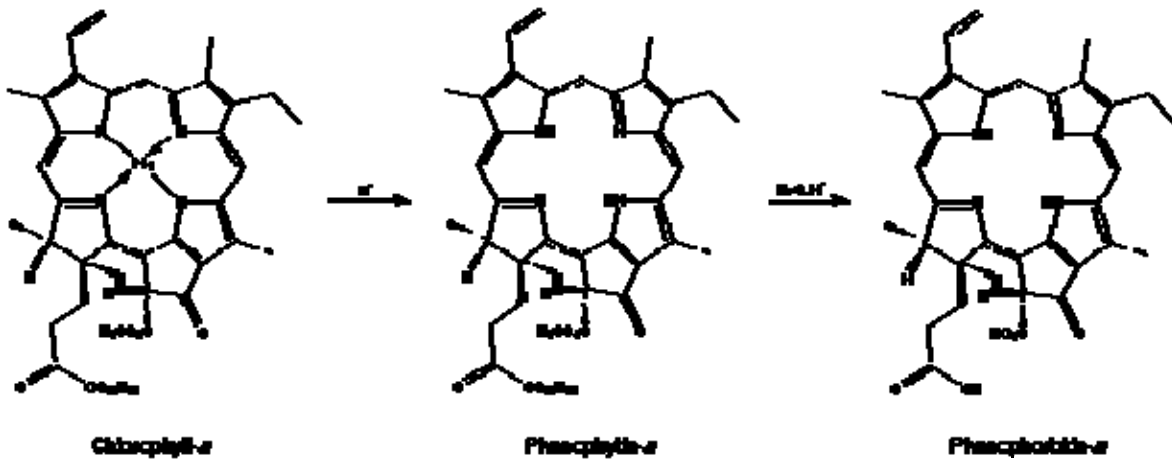


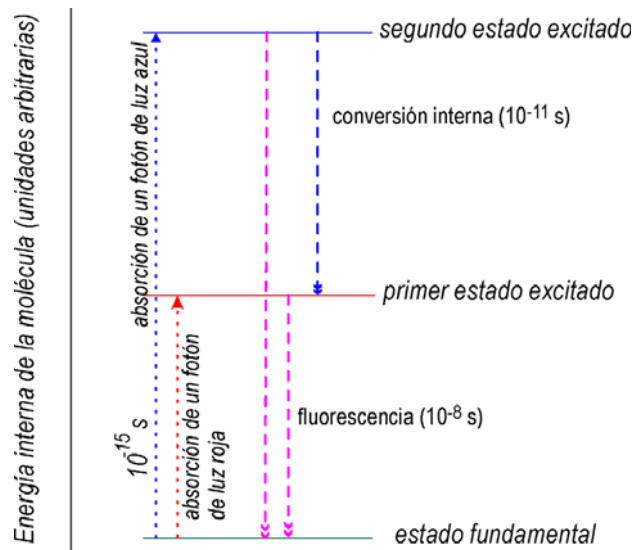
Figura 3.2 Formación de los feopigmentos de la Clorofila “a”

## 1.2 Propiedades ópticas de las Clorofilas

Un diagrama de energía de Jablonski simplificado, ver figura 3.3, permite explicar los mecanismos de relajación que ocurren cuando una molécula de clorofila es excitada<sup>6,7</sup>. Inicialmente se produce la absorción de fotones de luz “azul” de alta energía en ( $300 \text{ kJ.einstein}^{-1}$  para 400 nm de longitud de onda), excitando la molécula al segundo estado excitado. En este estado la molécula sufre dos mecanismos de relajación: uno radiactivo por emisión de un fotón de fluorescencia donde la longitud de onda de emisión se encuentra en un rango de 600 a 730 nm y otro no radiactivo “conversión interna” donde la molécula pierde rápidamente unos  $130 \text{ kJ.mol}^{-1}$  en forma de calor y queda en el primer estado excitado de menor energía.



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



**Figura 3.3** Diagrama de Energía en los procesos de excitación y relajación de la molécula de clorofila.<sup>7</sup>

## 2. Determinación de Clorofila “a” en sistemas acuáticos

EL fitoplancton<sup>8</sup> constituye el conjunto de organismos microscópicos de origen vegetal con capacidad fotosintética que viven en la zona eufótica de las aguas, esto es cercano a la superficie donde puede penetrar la radiación solar. Se encuentran tanto en el mar como en el agua dulce y comprende bacterias, organismos afines a ellas y plantas verdes (algas) en forma de células aisladas o pequeñas colonias. Estos microorganismos suelen dividirse en tres clases según su tamaño: el microplancton (20 a 200  $\mu\text{m}$ ), nanoplancton (2 a 20  $\mu\text{m}$ ) y el picoplancton (0.2 a 2.0  $\mu\text{m}$ )<sup>9</sup>.

La capacidad fotosintética del fitoplancton se debe a la clorofila, la cual absorbe la luz solar y el dióxido de carbono atmosférico, realizando la transformación de la energía lumínica en energía bioquímica mediante la síntesis de alimento orgánico y liberación de oxígeno a la atmósfera. Las microalgas planctónicas representan la base de la cadena alimenticia en los ecosistemas marinos ya que sirven de alimento a organismos superiores; esto los convierte en los productores primarios más importantes en estos sistemas acuáticos.

La estimación de la biomasa del fitoplancton en océanos y otros tipos de aguas, así como la identificación de los tipos de especies presentes en un sistema acuático determinado, permite establecer la calidad de las aguas en las cuales estos se encuentran<sup>10</sup>. Por tanto el monitoreo de las poblaciones de fitoplancton en agua es de importancia fundamental en el estudio del equilibrio de ecosistemas acuáticos.

Richards y Thompson,<sup>11</sup> (1952) reconocieron la Clo”a” como biomarcador selectivo del fitoplancton en presencia de otros componentes biológicos, tales como detritus, bacterias y zooplancton. Por lo que la estimación de la concentración de la Clo “a” se ha establecido como el principal estimador de la biomasa del fitoplancton. En investigaciones tanto en ambientes oceánicos como los de agua dulce, la cuantificación de la Clo “a” se correlaciona con la concentración de fitoplancton y se estima así la productividad primaria y biomasa en estos ambientes.

En los métodos estándar aplicados en el análisis de clorofila en aguas naturales y aguas de desecho<sup>12</sup>, se establecen tres técnicas analíticas para la determinación de clorofila: la espectrofotometría<sup>13,14</sup>, la fluorescencia<sup>15,16</sup> y el análisis por HPLC<sup>17</sup>. Las técnicas espectroscópicas resultan inexactas para la cuantificación de la concentración de Clo “a”<sup>18,19,20,21,22,23</sup>. Esto se debe principalmente a que se generan múltiples interferencias espectrales, cuando co-existen en el fitoplancton los distintos tipos de clorofilas, sus productos de degradación y otros pigmentos fotosintéticos<sup>24</sup>.

En general, se prefiere la fluorimetría en la determinación de la Clo “a” ya que es una técnica de mayor selectividad que la espectrofotometría, se requiere menor cantidad de muestra y se puede utilizarse para mediciones en vivo<sup>25</sup>. Por su parte, la técnica de HPLC<sup>17,21,22,26,27,28,29</sup> ha permitido realizar la identificación y cuantificación de una amplia variedad de pigmentos fotosintéticos. Se alcanza una mayor exactitud en la cuantificación de la Clo “a”, ya que esta se separa del resto de los otros pigmentos y simultáneamente se puede establecer la composición taxonómica de un determinado grupo de algas.

Una excelente guía para estudiar la determinación de la Clo “a” y otros pigmentos fotosintéticos en sistemas marinos la constituye la Monografía *Phytoplankton pigments in Oceanography* publicada por Jeffrey; Mantoura y Wright<sup>30</sup> (1997). Esta monografía es el resultado de las investigaciones realizadas sobre la determinación de pigmentos fotosintéticos en agua de mar, por el Grupo de trabajo 78 de la Scientific Committee on Oceanic Research, SCOR, publicada por la UNESCO. En este libro se presentan los resultados de un vasto trabajo experimental sobre todo lo relacionado con la determinación de los pigmentos fotosintéticos, desde la colección de la muestra hasta el análisis de los pigmentos por diferentes técnicas analíticas. A su vez, también se presenta una amplia revisión bibliográfica sobre las características de los pigmentos fotosintéticos, su importancia, reacciones químicas, su extracción y análisis.

### **2.1 Extracción de Pigmentos Fotosintéticos desde muestras de agua**

La recolección de las muestras es el primer paso que se realiza en la determinación de pigmentos fotosintéticos en muestras de aguas<sup>12</sup>. Posteriormente se sigue un protocolo en el tratamiento de las muestras hasta realizar la extracción de los pigmentos fotosintéticos.

◆ **Recolección de muestra:**

Las muestras de agua de mar pueden ser obtenidas de diversas maneras: con recipientes desde la superficie, tuberías o líneas de agua de mar en barcos, desde ciertas profundidades con botellas Niskin y a profundidades de 50m por bombeo<sup>31</sup>. Una vez recogidas las muestras deben colocarse en botellas opacas y se deben filtrar inmediatamente, evitando que reciban luz o calor para evitar pérdidas sustanciales de los pigmentos.

◆ **Filtración:**

La filtración de las muestras de agua, se realiza haciendo pasar grandes volúmenes de éstas desde 500 a 1000 mL, a través de filtros que suelen ser de fibra de vidrio o de membrana<sup>32</sup>. El tamaño de poro de los filtros debe ser lo suficientemente pequeño para retener todos los organismos del fitoplancton de pequeñas dimensiones. Si se utilizan filtros de membranas, el tamaño de poro recomendado es de 0,45  $\mu\text{m}$ <sup>33</sup>. Los filtros de membrana suelen usarse en los métodos espectroscópicos, ya que pueden disolverse convenientemente en los solventes de extracción. Cuando se utilizan filtros de fibra de vidrio, el tamaño de poro debe de ser de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$ , estos se prefieren para el análisis cromatográfico<sup>32</sup>. Los filtros de fibra de vidrio GF/F o filtros de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , pueden utilizarse indistintamente ya que se ha reportado<sup>34</sup> que no hay diferencias significativas en la concentración de Clo “a” determinada utilizando cualquiera de estos filtros.

◆ **Preservación de la muestra:**

Los filtros suelen almacenarse en la oscuridad y a bajas temperaturas en caso de no realizar la extracción de los pigmentos de forma inmediata. Si el tiempo de almacenamiento es de semanas las temperaturas deben ser de  $-20^{\circ}\text{C}$ , para largos períodos de tiempo los filtros deben almacenarse en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ <sup>31,32</sup>.

El almacenamiento de los filtros no es recomendable por el riesgo de degradación.

◆ Extracción de los Pigmentos.

El paso siguiente al almacenamiento de los filtros, es la extracción de los pigmentos en solventes químicamente compatibles. Numerosos solventes tales como metanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilacetamida han sido utilizados<sup>35</sup>, no obstante la acetona al 90% es el solvente validado para la extracción de pigmentos en muestras de agua de mar y el etanol en el análisis de muestras de agua dulce<sup>11,12,36,37,38</sup>

El mecanismo que opera durante la etapa de extracción es el siguiente: el solvente penetra la pared celular de las algas, luego los lípidos y proteínas de las membranas del cloroplasto se solubilizan en una matriz acuosa<sup>32</sup>. En general la extracción de los pigmentos no es completa hasta que no hay una ruptura total de la pared celular de las algas. En consecuencia, es necesario la utilización de procesos mecánicos que faciliten el rompimiento de las células, tales como: agitación por ultrasonido, trituración con mortero, extracción sólido-líquido mediante maceración de los filtros con las algas en los solventes de extracción, etc.

La eficiencia del proceso de extracción, dependerá de varios factores: el tipo de filtro, el tipo de alga, el tipo de solvente, sus propiedades de solvatación y penetración en la muestra, el tiempo de extracción, la utilización de mecanismos mecánicos que faciliten el rompimiento de las células y la modificación en las temperaturas que mejoren la extracción de los pigmentos<sup>32</sup>. La extracción debe ser rápida, sencilla, reproducible y con elevada precisión permitiendo procesar un gran número de réplicas.

◆ Análisis de los extractos.

La etapa final de la metodología de extracción de los pigmentos es el análisis de los extractos mediante técnicas espectroscópicas o de cromatografía líquida<sup>33</sup>.

### 2.2 Interferencias en la determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos, por técnicas espectroscópicas.

En el fitoplancton suelen encontrarse una amplia diversidad de pigmentos fotosintéticos. En los sistemas acuáticos, además de la Clo “a” que es el principal pigmento fotosintético presente en todas las especies de fitoplancton, también se encuentran las clorofilas b y c, así como también las xantofilas, ficobilinas y carotenos<sup>12</sup>.

Por otro lado, las clorofilas en su medio natural o durante los procesos de extracción, suelen transformarse en sus productos de degradación<sup>3,33</sup>, siendo los de mayor importancia encontrados en los sistemas acuáticos las clorofilas, feoborbitas y feofitinas, éstos últimos conocidos como feopigmentos<sup>5</sup>. Es posible encontrar entonces simultáneamente varios pigmentos y productos de degradación en una muestra.

En la determinación por técnicas espectroscópicas de la Clo “a”, la presencia de otros pigmentos fotosintéticos suelen causar interferencias espectrales que provocan en algunos casos la subestimación y en otros la sobre-estimación de esta clorofila<sup>18-23</sup>. En la figura 3.4, se presentan los espectros de absorción molecular y de emisión de fluorescencia de las clorofilas a y b<sup>39</sup>. Se observa una gran similitud entre los espectros de estas clorofilas, lo mismo ocurre para la clorofila c. La determinación de Clo “a” en presencia de los otros dos tipos de clorofila, mediante técnicas espectroscópicas suele verse afectada por la coincidencia entre los máximos de absorción y emisión de fluorescencia de estas clorofilas, ya que en la obtención de los espectros se producen solapamientos entre estos máximos. Esto produce interferencias espectrales que afectan la exactitud de la determinación cuantitativa de la Clo “a” y excluyen la posibilidad de realizar la cuantificación de esta mediante el uso de la ley de Beer.

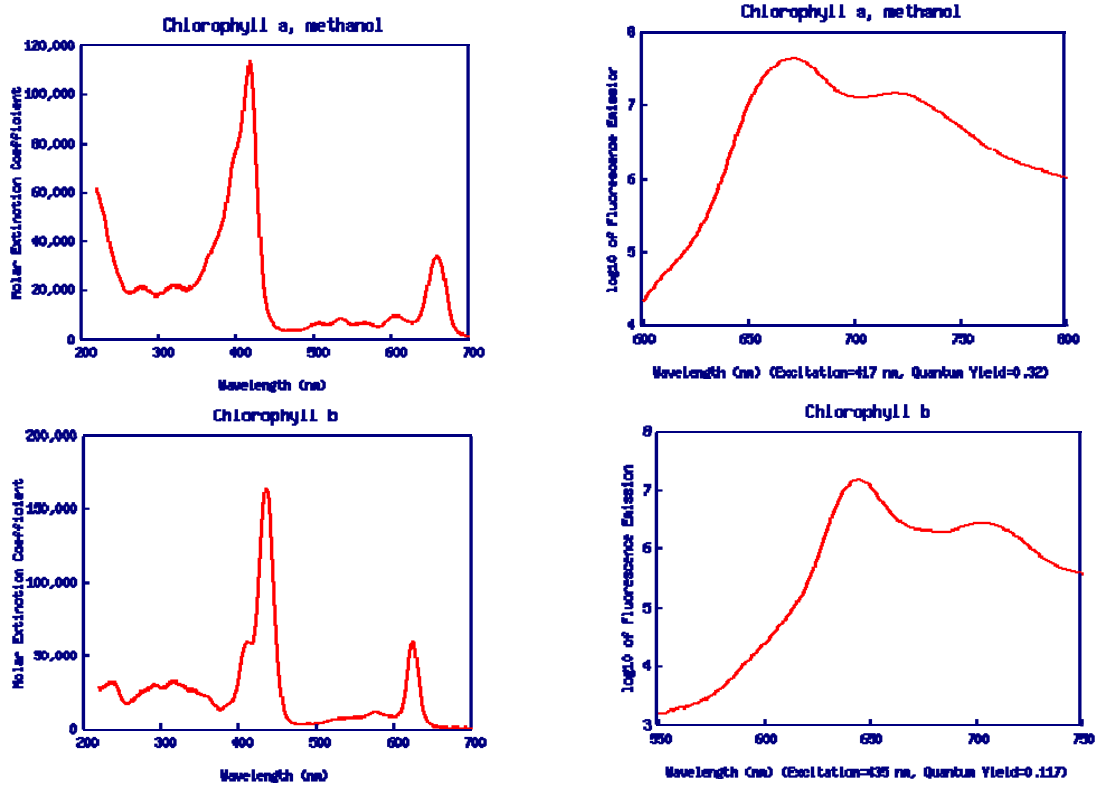


Figura 3.4 Espectros de absorción y de fluorescencia de la Clo “a” y Clo “b”.

Por otro lado los productos de degradación de las clorofilas también suelen tener características espectrales similares a aquellas de las cuales provienen. Por ejemplo el espectro de absorción de las clorofilas no se distingue espectroscópicamente del de la Clo “a”. La feoborbita “a” y la feofitina “a” absorben luz y emiten fluorescencia en la misma región espectral que la Clo “a”. Mientras que el espectro de fluorescencia de la feofitina “b” coincide con el de la feofitina “a”<sup>12,33</sup>.

Aunque se han desarrollado diversidad de métodos espectroscópicos para la determinación de la Clo “a” en presencia de los otros tipos de clorofilas y sus feopigmentos, estos métodos frecuentemente son inexactos. Por esta razón los métodos cromatográficos muchas veces se prefieren en el análisis de pigmentos en muestras acuáticas, ya que mediante la separación de los pigmentos fotosintéticos se solucionan los problemas de interferencias presentes en las técnicas espectroscópicas. No obstante el uso de la CM fomenta el uso de las técnicas espectroscópicas y éstas además presentan las ventajas de mayor simplicidad, bajo coste y mayor capacidad de procesamiento de muestras, en el caso de de la fluorescencia destaca su sensibilidad.

### 2.3 Técnicas Clásicas de determinación espectrofotométrica de la Clo “a”

En las determinaciones espectroscópicas, debido al solapamiento que presentan los tres tipos principales de clorofilas (a, b y c) en sus bandas de absorción máxima, varios procedimientos han sido desarrollados para la determinación de las tres clorofilas en una misma muestra. Estos se basan en la medición de absorbancia a tres longitudes de onda distintas y el cálculo de la concentración de cada clorofila se realiza mediante las ecuaciones denominadas “tri-cromáticas”<sup>14,40,41</sup>.

Jeffrey y Humprey<sup>14</sup>, desarrollo la denominada, **ecuación tricromática**, para determinar simultáneamente Clo “a”, Clo “b” y Clo “c”. En esta ecuación primero se estima la cantidad de clorofila total, luego para la determinación de Clo “a” e igualmente para otros constituyentes, se sustrae la contribución desde Clo “b” y Clo “c”. Las ecuaciones tricromáticas para determinar concentraciones de pigmentos en mezclas de clorofilas “a”, “b” y “c” supone la ausencia de los productos de degradación de la clorofila que pueden interferir con el análisis.



Lorenzen<sup>13</sup>, desarrolló un procedimiento espectroscópico para la determinación de Clo”a” y feofitina “a”. La absorbancia se lee a 665nm antes y después de la acidificación de la muestra. La acidificación degrada la Clo”a” a feofitina “a”. Este método se utiliza principalmente para corregir las interferencias de los feopigmentos en el análisis de clorofila, dado que estos provocan una sobre-estimación de la clorofila “a” debido a la similitud de los espectros de absorción de los pigmentos y de la clorofila.

### 2.4 Técnicas Clásicas de determinación Fluorométrica de la Clo “a”

En muestras de aguas de tipo oligotróficas<sup>42</sup>, que contienen baja concentración de Clo “a”, el uso de las técnicas fluorométricas resulta muy atractivo ya que esta técnica suele ser hasta dos órdenes de magnitud más sensible que la espectrofotométrica. El método fluorométrico tiene amplia aplicación en la determinación de la Clo “a” y sus feopigmentos, no obstante el método no es fiable si hay presencia de Clo “b”, ya que bajo acidificación de esta clorofila, el espectro de emisión de fluorescencia de la feofitina “b” coincide con la feofitina “a”, con lo cual se produce sub-estimación de la clorofila “a” y sobre-estimación de sus feo-pigmentos<sup>12</sup>.

Yentsch<sup>15</sup> en 1963 y O. Holm-Hansen<sup>16</sup> (1965), proponen el primer método fluorométrico para la determinación de Clo “a” y feofitina “a” en ambientes marinos. En dicho método la intensidad de fluorescencia es medida en un rango dado de longitudes de onda de excitación y emisión, antes y después de la acidificación. Este método no es recomendable para el análisis de muestras naturales que contengan concentraciones significativas de Clo “b”.

Otras propuestas para determinar la concentración de clorofilas a, b ,c y sus feofitinas mediante métodos fluorométricos, han sido realizada por los siguientes autores: Loftus y Carpenter<sup>43</sup>, 1971, Boto y Bunt<sup>44</sup>, 1978, y Neveux y Panouse<sup>45</sup>,1987. Todos estos métodos utilizan el hecho de que el espectro de excitación/emisión de fluorescencia es único para cada pigmento y a su vez cada pigmento presenta un máximo de fluorescencia escogiendo la longitud de onda de excitación y de emisión adecuada. Se requiere que el número de medidas de fluorescencia sea equivalente a los pigmentos individuales analizados. Estos métodos fluorométricos presentan varias limitantes: se requieren procedimientos de calibración tediosos, cada pigmento a analizar debe estar disponible como estándar de alta pureza y su concentración debe ser conocida para la determinación de coeficientes de respuesta de fluorescencia.

Lorenzen<sup>25</sup> en 1966, propone un método de fluorescencia en vivo, en él cual aprovecha la tendencia que tiene la clorofila a fluorescer cuando se irradia con luz a una determinada longitud de onda.

Welschmeyer en 1994<sup>46</sup> propone un método para determinar Clo “a” en presencia de feopigmentos y Clo “b”. El sistema instrumental utilizado en éste método consiste de una lámpara Tipo 10-089 de Diseños Turner, que contiene poca energía a la longitud de onda de excitación máxima de feofitina “a” (408 nm) y utiliza filtros de interferencias a 436 y 680 nm en las posiciones de excitación/emisión. La configuración óptica produce elevada sensibilidad para la clorofila “a” mientras que mantiene respuestas poco sensibles desde clorofila “b” y feofitina “b”. Para la configuración óptica escogida se reporta que este método sobre-estima la Clo “a” por 10% en la presencia de Clo “b” a relaciones molares 1:1. Este método tiene como ventaja principal : la detección selectiva de la Clo “a”. Además es simple, de bajo costo y reduce los requerimientos de pureza de los estándares de Clo“a”, dado que cualquier mezcla de solvente que contenga clorofila “a” puede ser utilizada para la estandarización.

En los protocolos del programa internacional de Oceanografía, Joint Global Ocean Flux Study, JGFOS, 1994, también se establece un método para la determinación de Clo “a” y su feofitina en presencia de Clo “b”<sup>47</sup>. En 1997 la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) propone el método estándar 445.0<sup>38</sup> para la determinación de Clo “a” y feofitina “a” en algas de aguas dulces y oceánicas por fluorescencia, este método propuesto se basa en el mismo principio que el desarrollado por Holm-Hansen<sup>16</sup>. La Agencia de Aeronáutica nacional y administración de los Estados Unidos (NASA)<sup>48</sup>, ha incluido en sus protocolos para la validación de la medición de color en océanos por sensores, un método para la determinación fluorométrica de la Clo”a”.

### 2.5 Determinación de la Clo “a” por cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)<sup>17-20,25-28</sup> es una de las herramientas de análisis preferidas en la determinación de la Clo “a” y otros pigmentos fotosintéticos provenientes de muestras de aguas marinas y aguas de reservorio. Esto debido a que mediante HPLC se realiza la separación de la Clo “a” del resto de los otros pigmentos presentes en el fitoplancton, en consecuencia se obtiene una elevada exactitud en la determinación cuantitativa de este pigmento. Además la técnica de HPLC ofrece una serie de ventajas: rapidez, fácil automatización, detección en línea, selectividad, sensibilidad, precisión, etc, con respecto a las técnicas espectroscópicas.

Entre los primeros estudios realizados para el aislamiento y determinación de la Clo “a” y otros pigmentos del fitoplancton por la técnica de HPLC, podemos mencionar el de Abaychi y Ryley<sup>17</sup>, Falkowski y Sucher<sup>49</sup>, Mantoura y Lewelling<sup>21</sup>. Estos desarrollaron metodologías simples para la determinación de clorofilas, sus productos de degradación, carotenoides en muestras de cultivo de fitoplancton, de algas, de muestras de aguas marinas y de aguas naturales.

Estos autores, mejoran la exactitud en la determinación cuantitativa de la Clo “a” y a la vez obtener información importante sobre la composición taxonómica de las comunidades del fitoplancton. Estos estudios corresponden a los métodos clásicos de HPLC para análisis de fitoplancton marino y marcaron la pauta en el curso de la investigación en esta área.

Investigaciones posteriores, realizadas por varios autores tales como Gieskes y Kraay<sup>26</sup>, Bidigare y Kennicutt<sup>29</sup>, Suzuki y col.<sup>50</sup>, Wright y Jeffrey<sup>51</sup>, Kohata y Watanabe<sup>52</sup>, Jeffrey y Wright<sup>53</sup>, Zapata y Garrido<sup>54</sup> permitieron la evolución en la investigación de mejores métodos de análisis de HPLC para la separación de pigmentos fotosintéticos en fitoplancton marino. Estas investigaciones fueron orientadas en general hacia dos vertientes principales: la separación rápida y eficaz de la Clo “a” de otros pigmentos interferentes, para garantizar que su cuantificación sea exacta y establecer una metodología que sea capaz de separar adecuadamente todos los pigmentos presentes en fitoplancton, que den información importante acerca de la composición taxonómica de un extensa población de comunidades de algas estudiadas.

Una amplia revisión bibliográfica sobre la evolución de los métodos HPLC reportados, puede encontrarse en la Monografía de Jeffery<sup>30</sup> y las referencias bibliográficas citadas dentro de la misma. Mantoura y Barlow<sup>55</sup> recomiendan el uso de métodos de HPLC isocráticos para un análisis rápido de clorofilas y sus derivados empleados volúmenes pequeños de muestras. La detección por fluorescencia incrementa la selectividad y la sensibilidad para la cuantificación con elevada exactitud de la Clo “a”. Ahora bien si se requiere un análisis completo de clorofilas y carotenoides, se prefiere el uso de métodos de HPLC por gradiente<sup>56</sup>. También señalan que la detección por fluorescencia en HPLC es altamente selectiva para las clorofilas y excluye los carotenoides, mientras que la detección de pigmentos por absorción molecular es sensible tanto para las clorofilas como para los carotenoides.

La vasta investigación que ha sido desarrollada desde los métodos clásicos hasta los métodos más modernos de HPLC para el análisis de pigmentos de fitoplancton, ha permitido establecer las condiciones experimentales del sistema cromatográfico para el aislamiento y cuantificación de una amplia diversidad de pigmentos. El mayor esfuerzo en la optimización de los métodos cromatográficos fue realizado hace décadas y en consecuencia la metodología actual de HPLC para la separación de clorofilas y sus productos de degradación en muestras de agua, no saca partido de las herramientas instrumentales y cálculos para mejorar la eficiencia de este análisis.

La tendencia actual en la investigación de la técnica de HPLC para el análisis de pigmentos en fitoplancton se enfoca principalmente en la optimización de la metodología de análisis en todas sus etapas: desde el muestreo, extracción de los pigmentos hasta una separación eficiente de los pigmentos. En este sentido, Van Leeuwe<sup>57</sup> y col., realizaron un estudio sobre la optimización de un método de análisis automatizado de pigmentos de algas por HPLC. Estos trabajos evalúan la estabilidad de los pigmentos en los extractos, la eficiencia de extracción de los pigmentos y la optimización en la resolución de los picos cromatográficos. Se obtuvo que el tratamiento de la muestra mediante el procedimiento de freeze-drying, la extracción de los pigmentos en acetona al 90% y la aplicación del empaquetamiento con agua (water parking) suministra un protocolo óptimo para el análisis por HPLC de una amplia población de plancton natural y de cultivos de microalgas.

Por otro lado, es conocido que la técnica de HPLC es una técnica de referencia para el análisis de pigmentos en muestras de aguas marinas o dulces. Organizaciones internacionales como el JGFOS<sup>58</sup> recomienda la técnica de HPLC para la determinación de la concentración de Clo “a” y más recientemente la NASA incluye el uso de métodos de HPLC para análisis de pigmentos de fitoplancton<sup>59</sup>, en un conjunto de protocolos de medición de soporte para medidas ópticas de océano.

Dado la exactitud del análisis cromatográfico por HPLC, esta técnica suele utilizarse para validar los resultados obtenidos en la extracción de pigmentos desde muestras de aguas principalmente clorofila “a”, mediante la aplicación de nuevas metodologías experimentales que permitan optimizar los procesos de extracción de pigmentos en el fitoplancton.

Estudios recientes sobre la aplicación de la técnica de HPLC en la evaluación de la eficiencia de la recuperación de pigmentos mediante procedimientos de extracción han sido realizados, entre estos tenemos el de Mantoura y Wright<sup>31</sup>, en este estudio se utiliza la técnica de HPLC por primera vez para evaluar la recuperación y degradación de clorofilas y carotenoides en filtros congelados desde microalgas y fitoplancton, en un experimento a largo término ( 328 días). También podemos citar las investigaciones de Kniefkamp y col<sup>60</sup>, estos realizaron un estudio comparativo de seis filtros de diferente tipo en la retención de Clo “a” provenientes de muestras de agua. Se comparo la retención de la clorofila “a” en los diferentes filtros por análisis HPLC, se obtiene que el filtro de membrana de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  es el que suministra los mejores resultados.

### **2.6 Calibración Multivariada y su Aplicabilidad en la detección por métodos espectroscópicos de Clorofilas en muestras de agua.**

El uso de CM en técnicas espectroscópicas para la determinación simultánea de clorofilas y sus correspondientes feopigmentos, ha sido ampliamente reportado<sup>61-64</sup>. Modber<sup>61</sup> realizó un trabajo en el cual compara un método espectrofotométrico aplicando CM para la determinación simultánea de Clo (a, b y c) y sus correspondientes feo-pigmentos; con métodos clásicos fotométricos: mediante las ecuaciones de Lorenzen y la denominada ecuación tricromática. En este estudio, se obtiene que utilizando el algoritmo PLS2 se mejora la capacidad predictiva para la Clo “a” mejora en un factor de 2,4 y permite el análisis simultáneo de seis analitos en comparación con el método de Lorenzen (dos analitos) y el método tricromático (tres analitos).

Casi simultáneamente Modberg<sup>62</sup> realiza otro estudio en el cual se determina seis especies de la clorofila, empleando métodos fluorométricos, se aplica como algoritmo de CM el análisis del factor paralelo (PARAFAC)<sup>5</sup>. Los resultados obtenidos se comparan con mínimos cuadrados clásicos (CLS) y métodos de referencia (HPLC y espectroscopia visible). El método de CLS y el de PARAFAC dan resultados similares en términos de capacidad predictiva con respecto a las soluciones estándares de prueba. En las muestras, se obtienen resultados con el método de PARAFAC que concuerdan con los métodos de referencia, mientras que CLS falla. Por otro lado se obtiene que la Clo "a" y feofitina "a" son predichos satisfactoriamente asumiendo que la clorofila b y c y la feofitina b, son interferencias desconocidas.

Posteriormente Modberg y Karlberg<sup>63</sup>, realizan un estudio sobre la validación del método de calibración multivariada para la determinación de las tres clorofilas (a, b y c) y sus correspondientes feo-pigmentos. Los resultados obtenidos indican que el modelo PLS1, predice analitos que probablemente están presentes en las muestras desde los cultivos de laboratorio, los modelos también demuestran que las concentraciones de feofitinas después de acidificación igualan la concentración de clorofila antes de acidificar, mostrando que aquellos son exactos y selectivos.

### **3. Justificación y Objetivos**

De la revisión bibliográfica anterior se desprende que el proceso de determinación global de la Clo "a" en sistemas acuáticos será óptimo si se logra disminuir el número de etapas de análisis involucradas en el proceso, se preserva la integridad de los pigmentos y se alcanza una alta exactitud en la cuantificación de la Clo "a" aun en presencia de otros pigmentos fotosintéticos en la muestra. En este sentido, en esta investigación se pretende desarrollar una metodología rápida y sencilla que permita disminuir las fuentes de variabilidad que suelen introducirse durante el proceso de extracción de los pigmentos.

Para ello se planteo la optimización del procedimiento de extracción de pigmentos, respecto al volumen de muestra, el tipo de solvente y el tiempo utilizado en la extracción de los pigmentos, así como también la supresión del uso de procesos mecánicos durante el procedimiento.

Por otro lado el uso de CM mejora notablemente la exactitud de los métodos espectroscópicos, sin embargo presenta como limitante principal el uso de procedimientos de calibración complejos que en algunas ocasiones no son adecuados para análisis de rutina. Por su parte, de los estudios citados sobre la aplicación actual de HPLC en la determinación de pigmentos fotosintéticos se desprende que en general estos suelen basarse en procedimientos clásicos de separación por HPLC. Esto debido a que los métodos cromatográficos establecidos son en su mayoría eficientes en la identificación y cuantificación de los pigmentos fotosintéticos. No obstante, es necesario el desarrollo de métodos modernos de HPLC en la determinación de pigmentos fotosintéticos utilizando las innovaciones actuales que han sido desarrolladas para esta técnica.

La importancia de este estudio se fundamenta en el desarrollo de métodos modernos de análisis utilizando las técnicas de fluorescencia en conjunto con CM y de HPLC convencional y capilar, para la determinación de las clorofilas “a” y “b” en sistemas acuáticos, que permiten minimizar las limitantes que presentan dichas técnicas. En una primera fase del trabajo se planteo la optimización del procedimiento de extracción de los pigmentos y se evaluó la aplicación de la técnica de fluorescencia molecular en conjunto con la CM sobre la determinación de estas clorofilas. En una segunda fase de este estudio se desarrollo un método de separación rápido y sencillo para la identificación y cuantificación de los pigmentos mediante la técnica de HPLC.



De forma de incrementar la sensibilidad en la detección cromatográfica y facilitar la automatización de esta técnica se planteó la aplicación de los sistemas de pre-concentración en línea de la micro extracción en fase sólida en tubo<sup>64</sup> (SPME en tubo) realizada sobre la fase estacionaria de una columna capilar de cromatografía de gases (CG) y la extracción en fase sólida (SPE) realizada sobre la fase estacionaria de una columna empacada. Estos procedimientos, fueron acoplados a dos sistemas de HPLC: cromatografía líquida convencional y cromatografía líquida capilar.

La SPME es una técnica de extracción rápida, sensible, libre de solvente, que fue desarrollada por Pawlyszin y colaboradores<sup>65</sup>. Se ha establecido recientemente un tipo de SPME, denominada SPME en tubo<sup>64,66</sup>, esta es una técnica de extracción de compuestos orgánicos desde muestras acuosas, en la cual los analitos son extraídos directamente desde la muestra dentro de una columna capilar tubular abierta por ciclos repetidos de llenado y salida de la solución de muestra. La SPME en tubo ha sido acoplada a sistemas HPLC, suministrando un procedimiento de extracción automatizado y exacto, para el análisis de drogas.<sup>64</sup> Una comparación entre la SPME en tubo acoplada a HPLC convencional y a HPLC capilar, en la determinación de triazinas en muestras de aguas fue realizada por Pericás y col<sup>67</sup>.

La aplicación de los sistemas de SPME y SPE en tubo no ha sido anteriormente reportada en la literatura para la determinación de pigmentos fotosintéticos en muestras de aguas, por lo que nuestra propuesta permite establecer un precedente sobre las ventajas y desventajas que pueden tener estos sistemas en dicha determinación. Este trabajo es de gran importancia en el estudio de métodos modernos de análisis de HPLC de Clo “a” y “b” en muestras acuáticas, ya que se plantea una optimización en la metodología integral de análisis:, el uso de la SPME en tubo por primera vez como sistemas de extracción en línea de pigmentos fotosintéticos, acoplada tanto a HPLC convencional como a HPLC capilar, así como la comparación entre la detección por fluorescencia y por espectrofotometría en el análisis por HPLC.

El objetivo principal planteado en nuestro estudio es:

- ◆ Desarrollar una metodología óptima de determinación de la Clo “a” en muestras acuáticas mediante las técnicas de fluorescencia molecular y HPLC. A su vez aplicar modelos de calibración multivariados en la determinación de la Clo “a” que permitan aumentar la exactitud en su cuantificación por fluorescencia.

Para alcanzar este objetivo principal se proponen los siguientes objetivos secundarios:

- ◆ Optimizar los parámetros instrumentales para la determinación de Clo “a” y Clo “b” mediante el uso de fluorímetro convencional y los sistemas de HPLC.
- ◆ Optimizar las variables que afectan el proceso de extracción de los pigmentos tales como el volumen de muestra de filtración, volumen del solvente de extracción y tiempo de extracción.
- ◆ Evaluar la eficiencia del etanol como solvente de extracción tanto en muestras de agua de mar como en muestras de agua dulce.
- ◆ Evaluar la eficiencia de dos procedimientos de separación del fitoplancton y extracción de los pigmentos fotosintéticos en las muestras de agua de mar, mediante la recuperación de Clo “a” y Clo “b” en muestras contaminadas “spiked”.

- ◆ Plantear modelos de calibración multivariados mediante la aplicación de algoritmos de regresión de mínimos cuadrados parciales, PLS1 y PLS2 que sean aplicables a la determinación de las clorofilas “a” y “b” en las muestras acuáticas.

#### 4. Bibliografía

---

- 1 R.J. Porra and E. Pfündel and N:Engel. “Metabolism And Function Of Photosynthetic Pigments” in *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods*. S.W Jeffrey, R.F Mantoura and S. W. Wright. Unesco Publishing. París, 93. (1997).
- 2 <http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll>
- 3 R.J. Porra and E. Pfündel and N:Engel. “Metabolism And Function Of Photosynthetic Pigments” in *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods*. S.W Jeffrey, R.F Mantoura and S. W. Wright.Unesco Publishing. París . 104 (1997).
- 4 <http://www.nalms.org> R.E Carlson . and J. Simpson. *A Coordinator’s Guide to Volunteer Lake Monitoring Methods*. North American Lake Management Society. 96 , (1996).
- 5 [www.ch.ic.ac.uk/local/projects/steer/chloro.htm](http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/steer/chloro.htm) /J. Steer *Structure and Reactions of Chlorophyll*.
- 6 J. R. Dell, P. M. A. Toivonen. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer Academy Publisher.
- 7 [webpages.ull.es/users/bioquibi/bioquimica\\_fotosintesis/fotosintesis](http://webpages.ull.es/users/bioquibi/bioquimica_fotosintesis/fotosintesis) **Tema 14. La Fase luminosa de la fotosíntesis** Javier Corzo. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecula*.Universidad de La Laguna.
- 8 K. Cristopher, E. Van Holde, *Enciclopedia Microsoft Encarta*, BIOQUIMICA 2da Edición, Mc Graw-Hill, 657-665, (1998).
- 9 S.W.Jeffrey and M. Vesk. **Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures** in *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods*. S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 42 (1997).
- 10 <http://www.ozestuaries.org/indicators/> Aquatic Ecosystem Health - Chlorophyll A Water Quality Monitoring Toolkit.htm

- 11 Richards, F.Am, Thompson T.G.. *The estimation and characterization of plankton populations by pigments analyses.II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments.* J. Mar. Res 11,156-172 (1952).
- 12 Standard methods for the examination of Water and Wastewater, 19th Edition, Section 10200 H, APHA, AWWA, WPCF, Washintong. (1995).
- 13 C.J. Lorenzen. **Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations.** *Limnol. Oceanography.* 12, 343. (1967)
- 14 S.W. Jeffrey and F. Humphrey. **New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b y c in higher plants, algae and natural Phytoplankton.** *Biochemical Physiology Pflanzen.* 167-191. (1975).
- 15 D. W. Menzel, C.S.Yentsch, **A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescente.** *Depp-Sea Res,* 1963, 221.
- 16 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).
- 17 J.K. Abaychi and J.P. Riley. **The determination of Phytoplankton Pigments by high-performance liquid chromatography.** *Analytical Chim. Acta* 107, 1. (1979).
- 18 T.R. Jacobsen. **A quantitative method for the separation of chlorophylls a, b pigments by high-pressure liquid chromatography.** *Mar. Sci. Comm.* 4, 33. (1978).
- 19 L.M Brown, B.T. Hargrave and M.D. Mackinnon. **Analysis of chlorophyll a in sediments by high-performance liquid chromatography.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 205. (1981).
- 20 R.J.Gowen, P. Tett and B.J.B. Wood. **Changes in the major dihydroporphyrin plankton pigments during the spring bloom of phytoplankton in two Scottish sea-lochs.** *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* Vol 63, 27. (1983).
- 21 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).
- 22 W.W.C.Gieskes and G.W. Kraay. **Phytoplankton, its pigments, and primary production at a central North Sea station in May, July and September 1981.** *Neth. J. Sea Res.* 18, 71. (1984).
- 23 G.M. Hallegraeff and S.E. Jeffrey. **Description of new chlorophyll a alteration products in marine phytoplankton.** *Deep Sea Res.* 3, 697. (1985).

- 24 C.C.Trees, M.C. Kennicutt II and J.M. Brooks. **Errors associated with the standard fluorometric determination of chlorophylls and phaeopigments.** *Mar. Chem.* 17, 1. (1985).
- 25 C.J. Lorenzen, **A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration.** *Deep Sea Res.*, 13, 223. (1966).
- 26 W.W.Gieskes, & G.W. Kraay. **Unknown chlorophyll a derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis.** *Limnol. Oceanogr.* 28, 757. (1983).
- 27 K.Eskins, C.R. Schofield and H.J. Dutton. **High-performance liquid chromatography of plant pigments.** *J. Chromatogr.* 135, 217. (1977).
- 28 S.W.Wright and J.D. Shearer. **Rapid extraction and high performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton.** *J. Chromatogr.* 294, 281. (1984).
- 29 R.R Bidigare, M.C. Kennicutt II and J.M. Brooks. **Rapid determination of chlorophylls and their degradation products by high-performance liquid chromatography.** *Limnol. Oceanogr.* 30, 432. (1985).
- 30 S.W Jeffrey, R.F Mantoura and S. W. Wright. **Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods.** *Unesco Publishing. París.* (1997).
- 31 S.W.Wright and R.F.C. Mantoura. **Guidelines for collection and pigment analysis of field samples** in *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods.* S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 433 (1997).
- 32 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).
- 33 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).
- 34 D.A. Phinney and C.S. Yentsch. **A novel phytoplankton chlorophyll technique : toward automated analysis.** *J. Plank. Res.*, 7. 633-642. (1985).

- 35 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).
- 36 J.D. Strickland and D.H. Parsons. **A practical Handbook of seawater analysis. 2<sup>nd</sup> Edition**. *Bull.Fish.Res.Bd. Can, N° 167*, 310.(1972).
- 37 T.R. Parsons, Y. Maita and C.M. Lalli. **A manual of chemical and biological methods for seawater analysis**. Pergamon Press. Oxford, 173. ( 1984).
- 38 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).
- 39 <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/index.html> . J. Lindsey. Photochem CAD Spectra by Category.
- 40 T.R.Parsons and J.D.H. Strickland. **Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids**. *Journal of Marine Research*, 21. 155–163. (1963).
- 41 SCOR-UNESCO. **Determination of photosynthetic pigments in sea water**. *UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology, Paris, France*. 1.69. (1966) .
- 42 T. Spiro and W. Stigliani. *Química medio ambiental*. 2<sup>a</sup> edición. Pearson Prentice hall. (2003).
- 43 J. H Loftus. And M. E.Carpenter. **A Fluorometric Method of Determining Chlorophylls a,b and c**. *Journal Marine Research*, 29. 319-338 (1971).
- 44 J.S. Botto and K. G Bunt. **Selective Excitation Fluorometry for the Determination of Chlorophylls and Pheophytins**. *Analytica Chemical*,50. 392-395. (1978).
- 45 J. Neveux and M. Panouse, **Spectrofluorometry Determination of Chlorophylls and Pheophytins**, *Archiv für hydrobiologie*, 109, 567-581. (1987).
- 46 Welschmeyer N. A, **Fluorometric Analysis of Chlorophyll a in the Presence of Chlorophyll b and Pheopigments**, *Limnol.Oceanography*, 38. 1985-1992. (1994).
- 47 **Measurement of Chlorophyll a and Phaeopigments by Fluorometric Analysis JGOFS Protocols—June 1994**

- 48 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).
- 49 P.G. Falkowski, J. Sucher. Rapid, quantitative separation of **chlorophylls and their degradation products by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography*, 213. 349-351. (1981).
- 50 N. Suzuki, K. Saitoh and Y. Adachi. **Reversed-phase high-performance thin-layer chromatography and column liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives.** *Journal of Chromatography A Volume 408*, 181-190 (1987).
- 51 S.W. Wright, S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura and C.A. Llewellyn. **Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton.** *Marine Ecology Progress Series 77*, 183-196. (1991).
- 52 K. Kohata and M. Watanabe. **Highly sensitive determination of photosynthetic pigments in marine in situ samples by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography A Volume 558, Issue 1, 27.* 131-140. (1991).
- 53 S.W. Jeffrey, S.W. Wright, M. Zapata. **Recent advances in HPLC pigments analysis of phytoplankton.** *Mar. Fresw. Res. 50.* 879-896 (1999).
- 54 M. Zapata, F. Rodríguez, J.L. Garrido. Separation of **chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C<sub>8</sub> column and pyridine- containing mobile phases.** *Marine Ecology Progress Series 195*, 29-45.
- 55 R.F.C. Mantoura, R.G. Barlow. **Sample Isocratic HPLC methods for chlorophylls and their degradation products.** In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods.* S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 307-324 (1997).
- 56 S.W. Wright and S.W.Jeffrey. **HPLC system for chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton..** In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography : Guidelines to modern methods.* S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 327-341 (1997).
- 57 M.A. Leeuwe, L.A. Villerius, J.Roggeveld,R. Visser. **An optimized method for automated analysis of algal pigments by HPLC.** *Marine Chemistry,102.* 267-275. (2006).

- 58 Joint Global Ocean Flux Study. **Protocols for the join global ocean flus study core measurements.** *Intergovernmental Oceanographic Commision, SCOR, Manual and Guides, Unesco, 29, 91-96.* (1994).
- 59 R. Bidigare, L. Van Heukelem, C. Tress. **HPLC phytoplankton pigments: sampling, laboratory methods and quality assurance procedures.** In: *J.L. Mueller, Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation Revision 3, Volume2.* In : *J.L. Mueller NASA/TM-2002-210004/rev 3 -Vol.2.* (2002).
- 60 B. Knefelkamp, K. Carstens, K. Wiltshire. **Comparison of different types on chlorophyll-a retention and nutrient measurements.** *Journal of Experimental marine Biology and Ecology, 345.* 61-70 (2007).
- 61 L. Moberg, B. Karlberg, S. Bloqvist, U. Larsson. **Comparison Between a New Application of Multivariate Regression and Current Spectroscopy Methods for the Determiation of Chlorophylls and Their Corresponding Pheopigments.** *Analytica Chimica Acta 411,* 137-143. (2000).
- 62 L. Moberg, G. Robertsson and B. Karlberg, **Spectrofluorimetric Determiation of Chlorophylls and Pheopigments** Using Parallel Factor Analysis," *Talanta 54 ,* 161-170 (2001).
- 63 L. Moberg and B.Karlberg. **Validation of a Multivariate Calibration Method for the Determiation of Chlorophyll a, b and c and Their Corresponding Pheopigments.** *Analytica Chimica Acta 450,* 143-153. (2001).
- 64 H. Katoaka, M.Ise. **A review on the aplications automated sample preparation usin in-tube SPME.** *J. Sep. Sci.*25,77 (2002).
- 65 C. Arthur and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.,* 62. 2145–2148 (1990).
- 66 B. J. Goncalves, F. M. Lancas, M. Costa. In tube solid-phase microextraction coupled to liquid cromatography ( In.tube SPME(CL) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. *Journal of Chromatography B,* doi: 10.1016. (2007)
- 67 C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández and P. Campíns-Falco. **On fibre solid.phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples.** *Journal of Chromatography A, 1125.* 1-28 (2006).



## **CAPITULO 3**

### **PARTE II**

**Determinación de Clorofila “a” en sistemas acuáticos mediante fluorescencia molecular y calibración Multivariada**

### 1. PARTE EXPERIMENTAL

#### 1.1 Equipos:

Se utilizó un fluorímetro Hitachi F4500 (Instrumentos Hitachi Inc Tokio, Japón), éste consta de una fuente de excitación de Arco de Xenón, dos monocromadores (uno para la radiación de excitación y otro para la de emisión) y un sistema de detección de foto multiplicador. La medición de fluorescencia en este fluorímetro se realizó de la siguiente forma: el primer monocromador permite seleccionar la longitud de onda de excitación proveniente de la fuente de Xenón, posteriormente esta radiación incide sobre una celda de Fluorescencia de cuarzo, geometría rectangular (de 10 mm x 2 mm) paso óptico de 2mm, volumen de 0,70 mL, (Hellma, Alemania). La emisión de radiación de fluorescencia se recoge de forma perpendicular a la trayectoria del haz de excitación. El segundo monocromador sirve para seleccionar la longitud de onda de la emisión de fluorescencia y la enfoca sobre el detector ( foto multiplicador).

#### 1.2 Reactivos y Solventes:

Estándares de la Clorofila “a” (Clo “a” ) al 98,1% de pureza y la Clorofila “b”, (Clo “b” ) al 98,4% fueron suministrados en ampollas ámbar selladas de 5 mg; (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA). Los solventes utilizados fueron etanol 99,9% grado HPLC suministrado por Fluka (Suiza) y agua desionizada 18 mΩ ( Nanopura, Sybron Barnstead (España).

Soluciones patrones de la Clo “a” y la Clo “b” fueron preparadas en etanol grado HPLC. Cantidades conocidas (exactamente pesadas) de las clorofilas se obtienen desde las ampollas selladas de cada reactivo y se transfieren en la oscuridad a frascos volumétricos ámbar de 25 mL.

Se realizó la dilución de cada compuesto y se obtiene una solución estándar de Clo “a” de  $45,2 \text{ mg L}^{-1}$  y una solución estándar de Clo “b” de  $144 \text{ mg L}^{-1}$ . Estas soluciones se mantienen refrigeradas a una temperatura de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en los frascos ámbar envueltos en papel de aluminio, para proteger las soluciones de la luz y así evitar posibles transformaciones químicas.

### 1.3 Muestras:

Se analizaron dos tipos de muestras de agua: de agua de mar y de agua de reservorio. Las muestras de agua de mar fueron colectadas en botellas plásticas de (1L) en playas de la ciudad de Valencia al este de España. Las otras muestras se colectaron desde un reservorio de agua dulce ubicado en la facultad de Química de la Universidad de Valencia núcleo: Burjassot. El muestreo se realizó en los meses de abril y mayo del 2007. Las muestras fueron almacenadas en nevera a una temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$  para posteriormente ser filtradas y realizar el procedimiento de extracción de los pigmentos fotosintéticos.

## 2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 2.1 Medición de Fluorescencia.

Para la adquisición de los espectros de fluorescencia de las clorofilas “a” y “b” se emplean las condiciones instrumentales resumidas en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Condiciones Instrumentales Fluorimetro Hitachi F-4500.

Tiempo de Integración (seg.)	0,1
Ancho de Rendija de Excitación (nm)	10
Ancho de Rendija de Emisión (nm)	10
Voltaje Foto multiplicador (V)	950
Longitud de onda de excitación Clo “a” (nm)	430
Longitud de onda de excitación Clo “b” (nm)	460
Longitud de onda de emisión Clo “a” (nm)	670
Longitud de onda de excitación Clo “b” (nm)	660

### 2.2 Procedimiento de Extracción de los pigmentos.

La extracción de pigmentos constituye el primer paso en la determinación de Clo “a” en sistemas acuáticos<sup>1</sup>. Este procedimiento experimental se realizó en dos etapas: en la primera se realiza la separación del fitoplancton de las muestras de agua, bien sea por filtración o por la retención de los organismos en la fase C-18 del cartucho de SPE. En la segunda etapa se realizó la extracción de los pigmentos desde el fitoplancton retenido mediante la adición de etanol. En este trabajo se sigue los pasos experimentales indicados en el protocolo estándar utilizado en esta etapa de análisis de pigmentos del fitoplancton. No obstante, en este estudio se realizó una optimización del procedimiento experimental respecto al diámetro del filtro, volumen de muestra, volumen de solvente, tiempo de extracción y otras variables tales como el uso de procedimientos mecánicos para la extracción de los pigmentos.

Se utilizaron dos procedimientos para la optimización de la separación del fitoplancton y extracción de los pigmentos desde las muestras de agua :

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

En el primer procedimiento se filtran 10 mL de la muestra de agua con una membrana de nylon de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y 13 mm de diámetro (Teknokroma, Barcelona, España), luego éste filtro se transfiere a una frasco de vidrio ámbar de 5 mL, al cual se añade 1 mL de etanol para extraer los pigmentos.

En el segundo procedimiento, 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.

### **2.3 Estudios de Recuperación de Clorofila “a” y Clorofila “b”.**

Una evaluación global del procedimiento de separación y extracción de los pigmentos desde las muestras de agua se requiere para garantizar la fiabilidad de los procedimientos 1F-0,45 y SPE C-18. Dado la alta reactividad de la clorofila y su tendencia a transformarse en sus derivados, no existen estándares de referencia que permita la determinación de estos pigmentos y que puedan ser utilizados en la validación de un procedimiento experimental. En estos casos, la IUPAC<sup>2</sup> recomienda el uso de “spiking” (contaminación) de muestras, para realizar la validación de un método experimental. La exactitud del método puede expresarse como la recuperación analítica.

En nuestro estudio, la contaminación de muestras de agua de mar y de agua dulce, con soluciones estándares de Clo “a” y Clo “b” permitió evaluar la eficiencia en la exactitud de los procedimientos de preparación de la muestra utilizados. En este procedimiento, varias réplicas de las muestras, 10 mL, fueron contaminadas con cantidades conocidas de las clorofilas (a y b), posteriormente se someten al proceso de extracción y luego los extractos son analizados. Lo mismo se realiza sobre varias réplicas de las muestras sin contaminar, esto para corregir la respuesta analítica del pigmento extraído desde las muestras contaminadas con respecto a la cantidad de pigmento en la muestra original. La recuperación se determina por comparación entre la intensidad de fluorescencia, a la longitud de onda de máxima emisión, del extracto con respecto a la señal de fluorescencia obtenida de una solución estándar del pigmento disuelto en etanol puro.

Para la identificación cualitativa de las clorofilas “a” y “b” en las muestras, fueron comparados los espectros de fluorescencia obtenidos en los extractos de pigmentos desde la muestra original y las muestras de aguas contaminadas, con los espectros de soluciones estándares de estas clorofilas en etanol.

### **2.4 Modelos de Calibración para la determinación de Clo “a” y la Clo “b” en muestras de agua de mar.**

#### **2.4.1 Modelos de Calibración Univariados**

En este estudio fueron planteados dos modelos de calibración univariada:

- ◆ Curva de calibración externa (CCE); realizado con una serie de soluciones patrones de Clo “a” y Clo “b” disueltos en etanol en el intervalo de concentraciones de 100 a 1000  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Estas soluciones se preparan diariamente por dilución adecuada de las soluciones estándares.

- ◆ Curva de adición de estándar (ADS) para el análisis de Clo “a” y Clo “b”. Se utilizó el procedimiento 1F-0,45 para la Clo “a”, y el procedimiento SPE C-18 para la Clo “b”.

En ambos modelos, se aplicó la regresión lineal entre las señales de fluorescencia y la concentración de las soluciones de las clorofilas.

### 2.4.2 Modelos de Calibración Multivariados

Se aplicó el modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales, PLS, en el análisis multivariado de las señales de fluorescencia obtenidas desde diversos conjuntos de calibración de soluciones de Clo “a” y Clo “b”. En este estudio, fueron aplicados tanto el algoritmo PLS1 como el PLS2. Se utilizaron tres conjuntos de muestras calibración para la aplicación de los modelos de calibración PLS 1 y PLS2. En el primero, muestras c1 a c 4, se construyó con soluciones uni-componentes de las clorofilas, a y b, disueltas en etanol. El segundo conjunto de calibración, e1 a e 5, se construyó con extractos en etanol obtenidos mediante el procedimiento SPE C-18 provenientes de muestras contaminadas de forma individual con Clo “a” y Clo “b”. El tercer conjunto de calibración consistió de siete soluciones estándares ( m1 a m7 ) de las clorofilas en etanol. En la tabla 3.2 se presentan un resumen de los conjuntos de calibración utilizados.

El planteamiento de los dos 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, el conjunto de calibración fue e1 a e5. El tercer modelo de calibración: PLS1III, se utilizó sobre extractos en etanol obtenidos por el procedimiento 1F-0.45, desde muestras contaminadas con cantidades conocidas de Clo “a” esto el conjunto e 1 a e 4.

En la validación del modelo PLS1I se utilizó el conjunto e1 a e 4. En los modelos PLS1I y PLS1II el conjunto de validación consistió de las soluciones c1 a c4. El modelo calibración PLS2 fue aplicado sobre el conjunto de calibración m1 a m 7.

**Tabla 3.2** Conjunto de Muestras de Calibración, utilizada para la aplicación del modelo PLS1

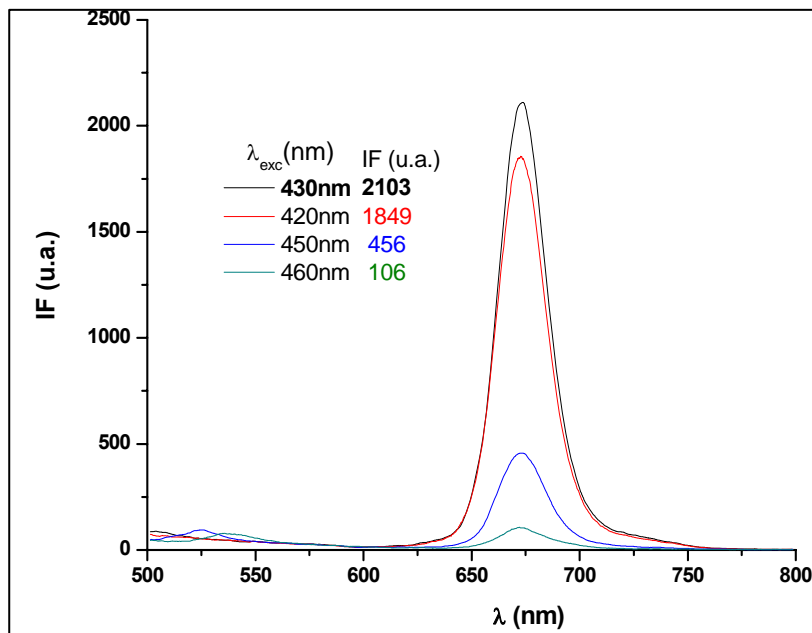
Muestras de calibración	Analito	
	Clo “a” ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Clo “b” ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
c1	0	0
c 2	10	25
c 3	25	50
c4	50	100
e 1	1.96	9.9
e 2	3.85	19.6
e 3	5.66	29.1
e 4	7.41	38.0
e 5	-	47.6
m 1	0	0
m 2	10	0
m 3	25	0
m 4	50	0
m 5	0	25
m 6	0	50
m 7	0	100



### 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIONES

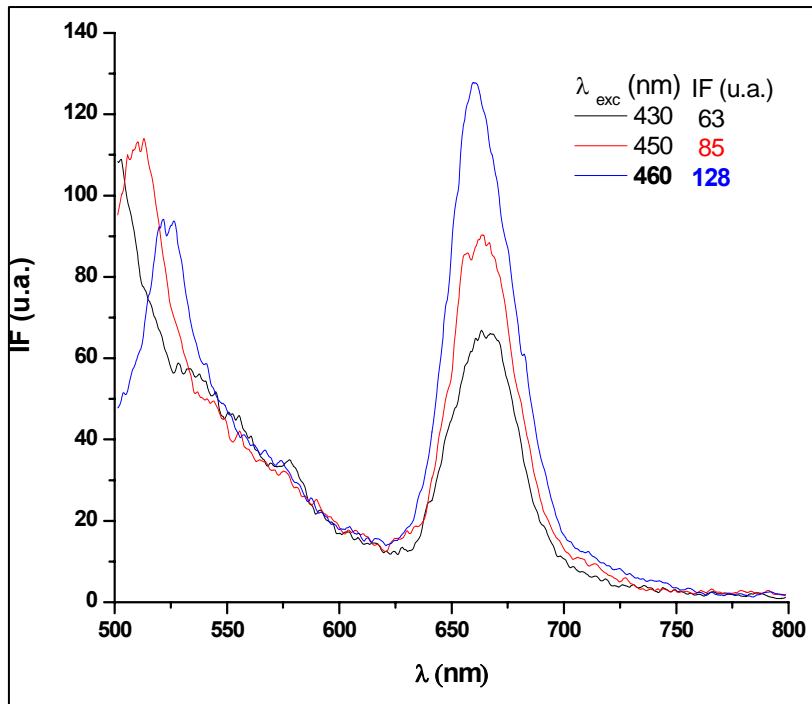
#### 3.1 Espectros de Fluorescencia de disoluciones de las Clorofilas “a” y “b” en etanol.

En la figura 3.5 se presenta el espectro de fluorescencia obtenido para la Clo “a” a longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) en un intervalo entre 420 y 460 nm (en incrementos de 10 nm). Se observa que el máximo de intensidad de fluorescencia se obtiene a una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{emis}$ ) de 670nm. La intensidad de fluorescencia para la Clo “a” disminuye en el siguiente orden en función de la  $\lambda_{exc}$ , esto es  $430 > 420 > 450 > 460$  nm, por tanto la  $\lambda_{exc}$  óptima para la Clo “a” es de 430 nm; ya que en esta se obtiene la máxima intensidad en la señal analítica.



**Figura 3.5** Espectros de Fluorescencia de una solución de Clo “a” de 500 ppb en etanol, a un intervalo de excitación entre 420 y 460 nm.

En la figura 3.6 se presenta el espectro de fluorescencia de una solución de Clo “b” a tres longitudes de excitación: 430,450 y 460nm. Se obtiene el máximo de intensidad de fluorescencia a una  $\lambda_{emis}$  de 660nm, cuando se excita a 460 nm. Se observa que la intensidad de emisión para la Clo “b” es muy baja, si se compara con la obtenida para la Clo “a”, ver figura 3.5, lo que indica una pobre sensibilidad en la detección de Clo “b” por fluorescencia. La mayor sensibilidad en la detección por fluorescencia, de la Clo “a” respecto a la Clo “b”, se explica ya que la Clo “a” posee un rendimiento cuántico absoluto (0.32), superior al de la Clo “b” (0.117)<sup>3</sup>.



**Figura 3.6** Espectros de Fluorescencia, para una solución de Clo “b” de 500 ppb en etanol, a un intervalo de excitación entre 420 y 460 nm.

Los resultados obtenidos en las figuras 3.5 y 3.6 indican que se puede realizar la determinación selectiva de la Clo “a”, a una excitación de 430nm aun cuando este presente la Clo “b” sin que esta interfiera significativamente en el análisis por fluorescencia. Este resultado esta acorde con lo reportado por Welschmeyer<sup>4</sup>, el cual propuso un método fluorométrico para la determinación selectiva de la Clo “a” en presencia de Clo “b” y de feo-pigmentos.

La determinación selectiva de la Clo “a” en presencia de Clo “b” en las muestras, resulta 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”<sup>5,6,7</sup>.

En la tabla 3.3, se comparan las longitudes de excitación y de emisión de fluorescencia de Clo “a” y Clo “b” reportados en la literatura, utilizando como solventes acetona o dietil-éter con las obtenidas en nuestro estudio. Se observa que las propiedades fluorescentes con respecto a la excitación y emisión de las clorofilas en etanol, obtenidas en este trabajo, no varían apreciablemente respecto a las que se obtienen en otros solventes. Esto indica que puede sustituirse un solvente irritante, tóxico, corrosivo como es la acetona, comúnmente utilizado en la extracción de pigmentos del fitoplancton marino, por un solvente seguro y de baja toxicidad como es el etanol sin que se vean afectadas las propiedades fluorescentes de las clorofilas.

**Tabla 3.3** Propiedades Fluorescentes de la Clo “a” y la Clo “b” determinadas en diferentes solventes.

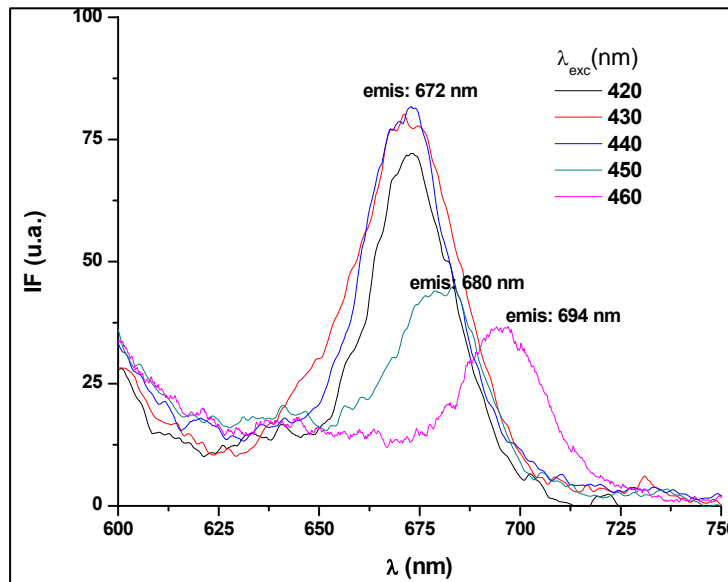
Analito	Solvente	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Reportado por:
Clo “a”	Dietil-éter	428	666	Boardman y Thorne (1971)
	Dietil-éter	427	666	SCOR WG 78 data
	Acetona	430	668	Jeffrey (1972)
	Metanol	417	671	Junzhong Li (1997)
	<b>Etanol</b>	<b>430</b>	<b>670</b>	<b>En este estudio</b>
Clo “b”	Dietil-éter	453	646	Boardman y Thorne (1971)
	Acetona	459	652,710	Jeffrey (1972)
	Acetona	453	652	SCOR WG 78 data
	Dietil-éter	435	644	Junzhong Li (1997)
	<b>Etanol</b>	<b>460</b>	<b>660</b>	<b>En este estudio</b>

### 3.2 Estudios de Recuperación de Clo “a” y Clo “b”.

Para evaluar la eficiencia del procedimiento de separación del fitoplancton y extracción de los pigmentos en etanol, se realizaron estudios de recuperación de la Clo “a” y la Clo “b” en muestras de aguas reales “spiked”. Se utilizó la metodología experimental descrita en la sección 2.3. En una primera etapa, se estudio el procedimiento 1F-0,45, descrito en la sección 2.2.

### 3.2.1 Evaluación del Procedimiento 1F-0,45 $\mu\text{m}$ en la extracción de pigmentos en muestras de agua de mar.

En la figura 3.7, se observan los espectros de fluorescencia de los extractos de los pigmentos de una muestra a diferentes longitudes de onda de excitación entre 420 y 460 nm. Se observa la emisión de fluorescencia de la Clo "a" en los extractos, con un máximo de intensidad a 672nm a las longitudes de onda de excitación entre 420 y 440nm. La Clo "b" no es detectada, ya que no se observa el máximo de emisión de fluorescencia de 660nm correspondiente a este analito cuando se excita a 460nm.

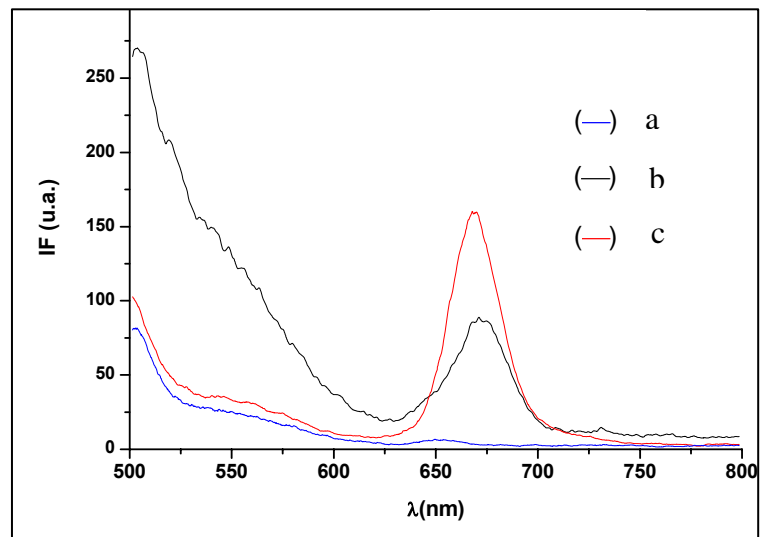


**Figura 3.7** Espectros de Fluorescencia de los pigmentos extraídos en etanol de la muestra de agua de mar, en un intervalo de longitudes de onda de excitación entre 420 y 460 nm.

En la figura 3.7, se observa que el máximo de emisión para una excitación de 450 y 460 nm, se encuentra a una  $\lambda_{\text{emis}}$  de 680 y 694nm respectivamente, esto indica la presencia de otros tipos de pigmentos que son excitadas a esta longitud de onda pero que no corresponde a la Clo "b".

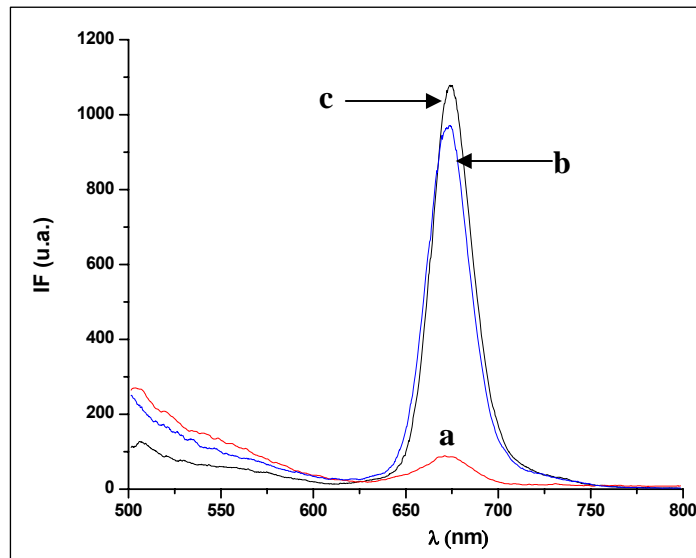
Es probable que dicha emisión se deba a algún tipo de clorofila “c”, ya que los principales tipos de clorofilas “c” se caracterizan por tener máximos de emisión alrededor de 638, 690 a 694 nm con una excitación de 450 a 453 nm<sup>8</sup>. Se hace esta suposición sobre el hecho de que la detección por fluorescencia excluye cualquier tipo de carotenoide y es selectiva para las clorofilas y sus derivados. No obstante una identificación confiable de este analito debe hacerse mediante un estándar.

En la figura 3.8, se presenta el espectro de fluorescencia obtenido para el extracto de los pigmentos en etanol a una excitación de 430 nm y se comparan con el espectro de un blanco y de una solución patrón de Clo “a” de 10ppb. Se observa la coincidencia en el máximo de emisión de fluorescencia, aproximadamente 670nm para el extracto de muestra y la solución patrón de Clo “a”, verificando así la detección cualitativa de este analito en las muestras de agua.



**Figura 3.8 Espectros de Fluorescencia obtenido a una  $\lambda_{exc}$  a 430nm para:** a) Blanco de la muestra b) Extracto de la muestra en etanol y c) Solución patrón de 10 ppb de Clo “a” en etanol.

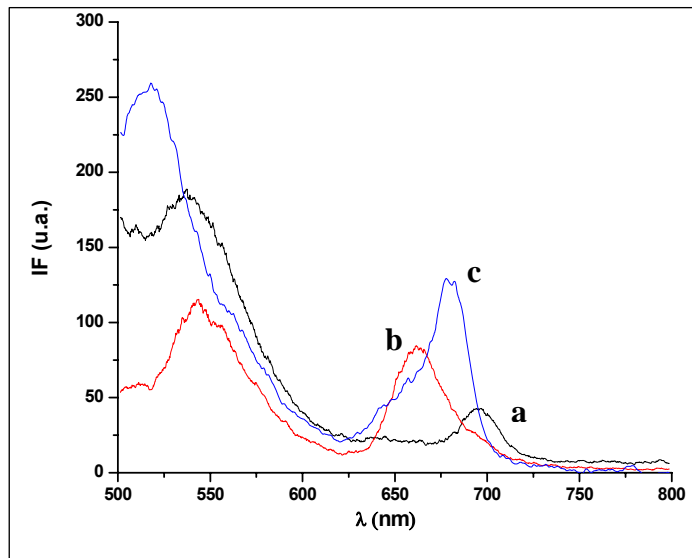
. Se evaluó la recuperación de la Clo “a” en una muestra contaminada con  $24 \mu\text{g L}^{-1}$  de Clo “a”, el espectro de fluorescencia obtenido para el extracto de esta muestra se compara al obtenido en una muestra sin contaminar y el espectro de una solución patrón de Clo “a” de 250 ppb, ver figura 3.9. Se observa que el espectro del extracto de muestra contaminada, presenta una intensidad de fluorescencia comparable en magnitud a la de una solución patrón de Clo “a” de 250 ppb a la  $\lambda_{\text{emi}}$  de 670nm, lo cual indica que no hay interferencias de matriz en la extracción de este analito cuando se realiza el procedimiento experimental 1F-0,45.



**Figura 3.9** Espectros de Fluorescencia de los pigmentos extraídos en etanol a una  $\lambda_{\text{exc}}$  a 430nm desde: a) extracto de muestra en etanol (—) b) extracto de muestra de agua contaminada con 24 ppb de Clo “a” con sustracción del espectro de a. (—) y c) la solución patrón de 250 ppb de Clo “a” (—).

En la figura 3.10, se presenta la información espectral referente a la extracción de la Clo “b” en las muestras. La Clo “b” no es detectable, ver figura 3.10 a, ya que no se observa el máximo de emisión de fluorescencia a 660nm correspondiente a este analito, ver figura 3.10 b.

Para la muestra contaminada con Clo “b”, se observa que el máximo de emisión se desplaza hacia longitudes de ondas de 680 nm, lo que indica que hay interferencias debido a la matriz. Por tanto la recuperación cuantitativa de la Clo “b” en muestras de agua de mar, mediante el procedimiento 1F-0,45 será inexacta debido a la presencia de especies interferentes.



**Figura 3.10 Espectros de Fluorescencia obtenidos a una  $\lambda_{exc}$  a 460nm de los pigmentos extraídos en etanol, provenientes de:** a) el extracto de la muestra (—) b) la solución patrón de 250 ppb de Clo “b” (—) y c) extracto de la muestra contaminada con 24 ppb de Clo “b” (—).

En la tabla 3.4, se presentan los porcentajes de recuperación (% Rec) para la Clo “a” cuando se aplica el procedimiento 1F-0,45, estos porcentajes van desde el 90 hasta el 105%. Estos resultados indican que el procedimiento de extracción utilizado es eficiente en la extracción de Clo “a” desde las muestras, sin evidencia aparente de presencia de errores sistemáticos en la determinación de este analito. Por el contrario el procedimiento 1F-0,45 no resulta adecuado para la detección de Clo “b” en las muestras y esta sujeto a interferencias de la matriz.



**Tabla 3.4** Porcentajes de Recuperación de Clo "a" obtenidos en las muestras de Agua de Mar.

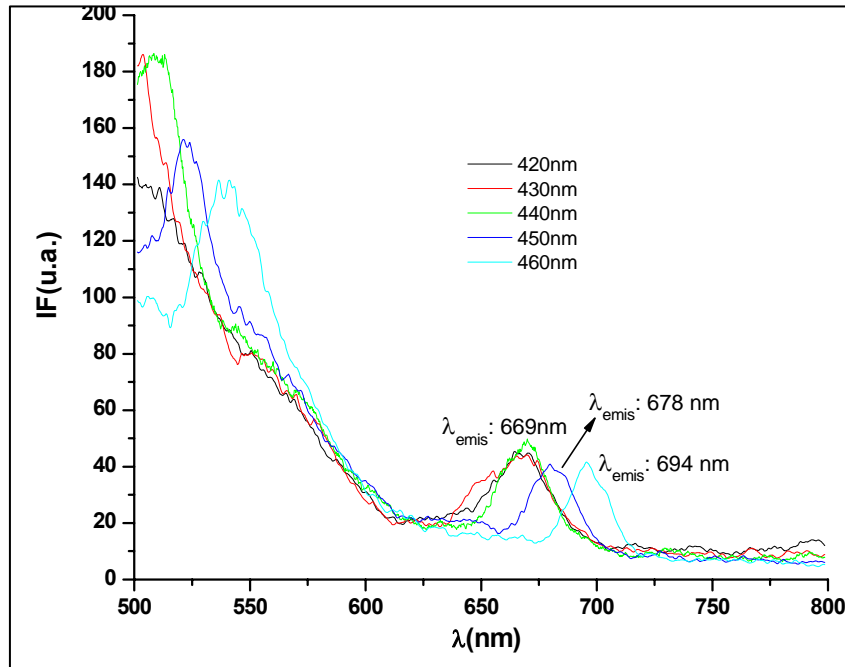
%Recuperación	$\lambda$ de excitación (nm)		
	420	430	440
Clo "a"	93	105	90

\* Procedimiento de extracción 1F-0,45.

### 3.2.2 Evaluación del Procedimiento 1F-0,45 $\mu\text{m}$ sobre muestras de agua de reservorio.

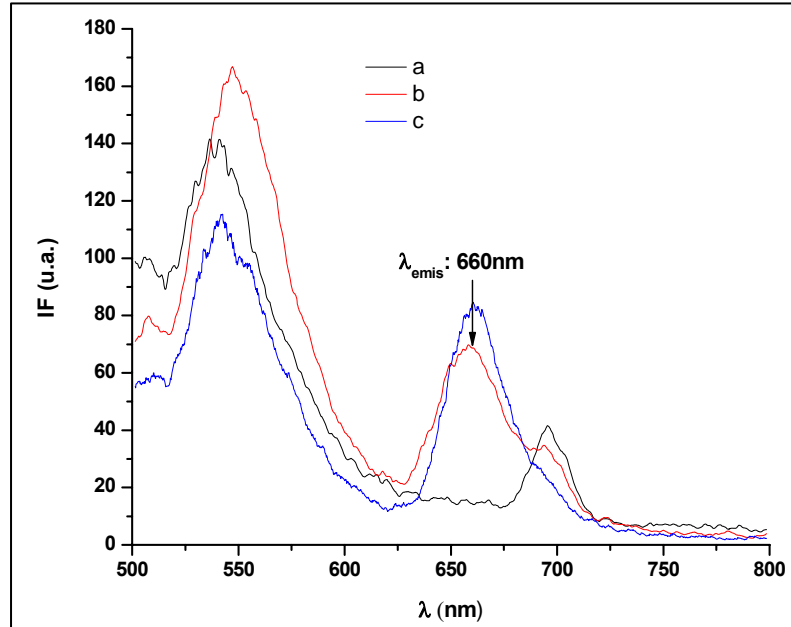
Según lo reportado en la literatura, el etanol es el solvente de mayor uso en la extracción de pigmentos desde el fitoplancton de muestras de agua dulce<sup>9</sup>, en nuestro estudio evaluamos la eficiencia de extracción de este solvente junto con el procedimiento de separación del fitoplancton sobre muestras de aguas de reservorio. Estas muestras fueron pasadas a través de un filtro whatman de 8  $\mu\text{m}$ , previo al procedimiento de extracción, de forma que sean retenidos los sólidos no disueltos que estas poseen y disminuir así posibles interferencias en la medición por fluorescencia, debido a la dispersión que provoca el material particulado.

En la figura 3.11, se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos, para las extractos de las muestras. Se obtienen los máximos de emisión de fluorescencia correspondientes a la Clo "a",  $\lambda_{\text{emis}}$  de 669nm, para la excitación entre 420 y 440nm, mientras que no hay detección de la Clo "b" sino que se observan máximos de emisión de 678 y 694nm. Se observa que hay una tendencia similar entre los espectros de fluorescencia registrados para los dos tipos de muestras analizadas: agua dulce y agua de mar (ver figura 3.7).



**Figura 3.11** Espectros de Fluorescencia de los pigmentos extraídos en etanol, provenientes de la muestra de agua de reservorio, previamente filtradas con filtro de 8 $\mu$ m.

En la figura 3.12, se presentan los espectros de fluorescencia para una extracto de muestra, un extracto de muestra contaminada con 24  $\mu$ gL<sup>-1</sup> de Clo “b”, y una solución patrón de Clo “b” de 250  $\mu$ gL<sup>-1</sup>. Se obtienen que el máximo de emisión del extracto de la muestra contaminada con Clo “b” coincide con el de la solución patrón de este analito, esto indica que no hay efectos de matriz en la extracción de esta clorofila en etanol. Por tanto, se evidencia una mejor eficiencia del procedimiento 1f-0,45 en la extracción de la Clo “b” en las muestras de agua de reservorio con respecto a las muestras de agua de mar.



**Figura 3.12** Espectros de Fluorescencia obtenidos a una  $\lambda_{exc}$  a 460nm de los pigmentos extraídos en etanol provenientes de: a) la muestra b) la muestra de contaminada con 24 ppb de Clo “b” y c) Solución de Clo “b” de 250 ppb.

En la tabla 3.5, se presentan los %Rec. obtenidos para la Clo “a” y la Clo “b”, en las muestras. Para la Clo “a” los %Rec. van desde 56% a la  $\lambda_{exc}$  de 440nm hasta 120% para la  $\lambda_{exc}$  de 420nm. Para la Clo “b”, se obtienen % Rec. de 64% a 460nm y del 66% a 450nm. Se presume la presencia de especies interferentes, debido a la matriz de estas muestras que afectan la determinación de la Clo “a” y la Clo “b” en las muestras de agua de reservorio.

**Tabla 3.5.** Porcentajes de Recuperación de Clo “a” y Clo “b” sobre los extractos de Muestras de Agua de Reservoirio.

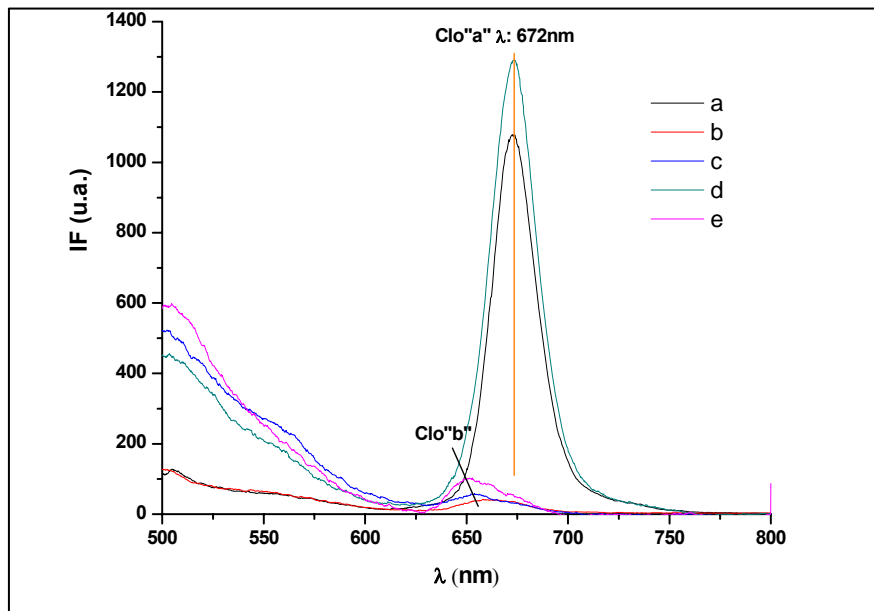
Pigmento	$\lambda_{exc}$ (nm)	%Recuperación
Clo "a"	420	120
	430	80
	440	56
Clo "b"	450	66
	460	64

Se obtienen mejores resultados en cuanto a la recuperación de la Clo “a” en las muestras de agua de mar, esto se debe a que la matriz de las muestras de agua de reservoirio es más compleja que la de las muestras de agua de mar. En aguas de reservoirio, suelen encontrarse gran cantidad de algas y de materia orgánica, lo que afecta la calidad del agua y genera la presencia de sedimentos y sólidos dispersos. Por el contrario las muestras de agua de mar corresponden a aguas superficiales con una escasa presencia de material particulado.

### 3.2.3 Evaluación del Procedimiento de SPE C-18 en la extracción de pigmentos en muestras de agua de mar.

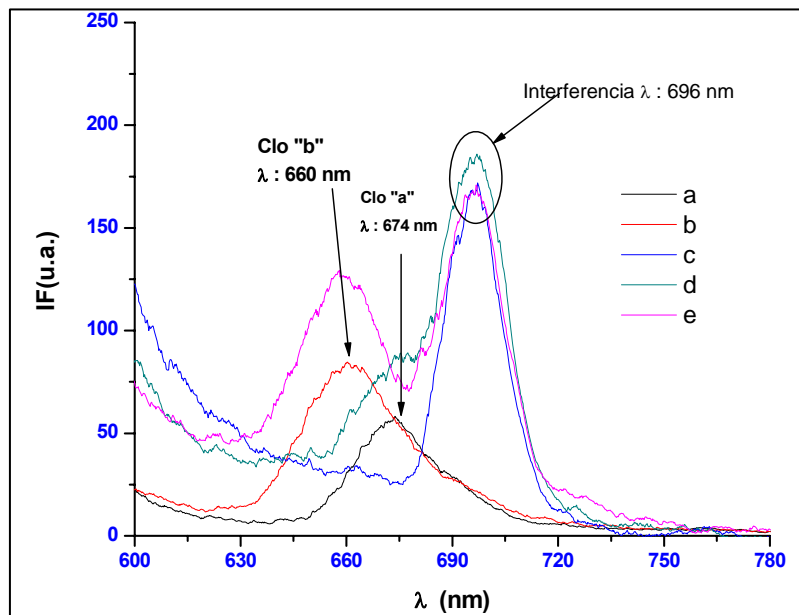
De forma, de obtener un procedimiento de extracción que sea óptimo tanto para la Clo “a” como para la Clo “b”, se ensayo la preconcentración de los pigmentos aplicando el procedimiento SPE C-18 (ver sección 2.2 ). Para la identificación cualitativa de la Clo “a” y la Clo “b” así como su determinación cuantitativa, se contaminaron individualmente dos muestras con  $38,6 \mu\text{g L}^{-1}$  de estos analitos.

En la figura 3.13, se presentan los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos a la  $\lambda_{exc}$  430nm, característica de la Clo "a". Se observa que para la muestra contaminada con Clo "a", el máximo de emisión de fluorescencia, obtenido coincide con el de la solución patrón de esta clorofila ( $\lambda_{emis}$  de 672nm). Para las soluciones que contiene Clo "b", se observó un máximo de emisión de fluorescencia alrededor de los 650nm, que debe corresponder alguna especie en la muestra, que responde a la excitación de 430nm, pero que no interfiere con la detección de la Clo "a".



**Figura 3.13 Espectros de Fluorescencia a  $\lambda_{exc}$  de 430nm para:** a) Solución patrón de Clo "a" de 250 ppb, b) Solución patrón de Clo "b" de 250 ppb y para los extractos obtenidos por SPE C-18 desde: c) la muestra d) la muestra contaminada con 38,46 ppb de Clo "a" y d) la muestra contaminada con 38,46 ppb de Clo "b" .

En la figura 3.14, se presentan los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos a una  $\lambda_{exc}$  de 460nm. Se observa en el espectro del extracto de la muestra contaminada con Clo "b" , el máximo de emisión de fluorescencia a 660nm, que coincide con el obtenido en el espectro de la solución patrón de 250 ppb de esta clorofila. Se evidencia así la extracción mediante SPE de este analito en etanol. El espectro de la figura 3.14 c, muestra que no hay detección de la Clo "b" en la muestra. Por otro lado, se observo un máximo de emisión a 696 nm en los espectros de las figuras 3.13c, d y e, que sólo esta presente en las réplicas de las muestras y que no es observado en el espectro de la solución patrón de Clo "b". Esto indica la presencia de una interferencia desconocida en las muestras, presuntamente Clo "c".



**Figura 3.14 Espectros de Fluorescencia a  $\lambda_{exc}$  de 460nm para:** a) Solución patrón de Clo "a" de 250 ppb, b) Solución patrón de Clo "b" de 250 ppb y para los extractos obtenidos por SPE C-18 desde: c) la muestra d) la muestra contaminada con 38,46 ppb de Clo "a" y d) la muestra contaminada con 38,46 ppb de Clo "b" .

El porcentaje de recuperación obtenido para la Clo “a” fue de 84% y para la Clo “b” fue de 73%. Estos porcentajes son relativamente bajos, no obstante permiten la extracción de ambas clorofilas, en consecuencia se aplica el procedimiento de SPE C-18 en la cuantificación de estos analitos en las muestras.

Según los resultados obtenidos en la recuperación de Clo “a” y Clo “b”, por los procedimientos de extracción descritos anteriormente; el procedimiento de “spiking”<sup>2</sup> permitió validar la exactitud del procedimiento 1F-0,45 para la extracción de Clo “a” en muestras de agua de mar siendo éste procedimiento óptimo para la separación y extracción de este pigmento. No obstante, el procedimiento de SPE C-18 también fue utilizado para la detección de estos pigmentos ya que permite la extracción de ambas clorofilas en muestras de agua de mar.

En nuestro estudio, una drástica reducción en el volumen de muestra utilizado para la filtración es alcanzada, comparada a los procedimientos clásicos de extracción de pigmentos. El volumen de muestra utilizado en la 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<sup>7</sup>, 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<sup>10</sup> sugieren utilizar volúmenes de muestras entre 0,1 a 0,5 L en aguas oligotróficas para ser analizadas por fluorescencia, la NASA<sup>11</sup> 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<sup>12</sup>, 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 independientemente del tipo de muestra analizada: agua de mar o agua de reservorio, esto implica una notable disminución en el volumen de filtración que suele utilizarse comúnmente en determinación de pigmentos en el fitoplancton donde el volumen mínimo requerido es de 0,1 L. Evidentemente la cantidad de muestra no representa una limitación en nuestra metodología, cuando no se dispone de esta en grandes cantidades.

La excelente eficiencia en la recuperación de Clo “a” en las muestras, utilizando el procedimiento 1F-0,45, indican que durante el proceso de extracción el etanol posee el suficiente poder de penetración en el fitoplancton de estas muestras para producir la destrucción de la pared celular de las algas y lograr la extracción total de este pigmento en este solvente. Así que el uso de procedimientos físicos comúnmente utilizados para la destrucción de la pared celular de las algas<sup>9</sup>, 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 estos procedimientos físicos conlleva a una serie de ventajas: 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.



La metodología 1f-0,45 propuesta en este estudio para la separación del fitoplancton y extracción de Clo “a” en muestras de agua de mar, cumple con cinco de los seis criterios aplicados a las técnicas de extracción del fitoplancton establecidos por el grupo de trabajo SCOR 78<sup>9</sup>. Estos criterios son: 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, en nuestro estudio se estudio como solvente etanol el cual cumple con las características requeridas. El único criterio con el que no cumple nuestra metodología, es el de la extractabilidad, el cual establece que la extracción de todos los pigmentos debe ser completa independientemente del tipo de alga. En nuestros experimentos se observó, que sólo para la Clo “a” se tienen elevados porcentajes de recuperación para las muestras de agua de mar “spiked”, mientras que para las muestras de agua de reservorio se obtienen bajos porcentajes de recuperación que indican que no hay una extracción eficiente de este analito. Con respecto a la Clo “b” se observa que en los dos tipos de muestras analizados, bajos porcentajes de recuperación son obtenidos. Los tipos de algas que poseen las muestras de agua de mar y de agua de reservorio son diferentes, por lo que el mecanismo de extracción de solvente que opera sobre las mismas también debe serlo. Nuestra metodología experimental solo es efectiva en la determinación de Clo “a” en muestras de agua de mar.

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 la presencia de errores sistemáticos en la determinación. En este proceso de SPE, el mecanismo de extracción que actúa sobre los pigmentos difiere al el que utiliza el filtro de nylon, en este caso 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<sup>1</sup>, en nuestro caso el fitoplancton de las muestras se retendrá a lo largo del volumen interno del cartucho.

Por otro lado, sobre la fase C-18 del cartucho de SPE, se produce una adsorción selectiva de la Clo “a” 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 filtros superficiales donde las partículas se retienen sobre la superficie del filtro y además estos suelen disolverse en el solvente de extracción. Durante el procedimiento experimental se ensayo la utilización de un mayor volumen del solvente de extracción, pero los mejores resultados fueron obtenidos utilizando la relación 10ml muestra: 1ml etanol. Con la aplicación de modelos de regresión multivariados en el procedimiento de SPE C-18, se espera poder obtener mejores porcentajes de recuperación ya que estos modelos deberían ser capaces de compensar los errores sistemáticos que influyen en la extracción de los analitos.

### **3.3 Modelos de Calibración Univariados (CU) para la determinación de la Clo “a” y la Clo “b”.**

#### **3.3.1 Modelos de CU /Curva de calibración externa (CCE)**

En las tablas 3.6 y 3.7 se presenta los parámetros de la ecuación de la recta obtenida al aplicar regresión lineal de las señales de fluorescencia medidas para una serie de soluciones patrones de Clo “a” y Clo “b” en el intervalo de concentraciones de 100 y 1000 ppb.

Los valores de pendiente (b) y límites de detección (Lods) mostrados , indican claramente una mayor sensibilidad y mejor límite de detección, de la Clo “a” con respecto a la Clo “b”. La mayor sensibilidad obtenida para la Clo “a”, se debe a las propiedades fluorescentes que presenta la Clo “a” respecto a la Clo “b”, ver figura 3.5 y 3.6.

**Tabla 3.6** Parámetros analíticos obtenidos, por CU para la Clo “a” y Clo “b”.

Analito	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{emis}$ (nm)	m ( $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ )	$b_0$	$S_{y/x}$	$R^2$
Clo “a”	430	670	$4,77 \pm 0.02$	$31 \pm 21$	28	0,9995
Clo “b”	460	660	$0.33 \pm 0.02$	$14 \pm 5$	6.63	0,9940

**Tabla 3.7** Parámetros analíticos obtenidos, por CU para la Clo “a” y Clo “b”.

Analito	$\gamma$ ( $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ )	Lod ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Loq ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Intervalo de Trabajo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	N
Clo “a”	2	18	59	60 a 500	4
Clo “b”	20	60	200	200 a 500	4

Los  $Lod_s$  se calculan como  $3 \cdot S_{y/x}/b$ .

### 3.3.2 Modelos de CU /Método de Adición de estándar (ADS)

Se aplicó el modelo de regresión por adición de estándar para la determinación de Clo “a” y Clo “b” en muestras de agua de mar. Sobre la base de los resultados obtenidos en la sección anterior (3.2), para el análisis de la Clo “a” se aplicó el procedimiento 1F-0,45 y para la Clo “b” se utilizó el procedimiento SPE C-18. Para evaluar la existencia de posible efecto matriz se realiza una curva de calibración externa con soluciones patrones de ambas clorofilas en etanol.

En la tabla 3.8, se indican los parámetros analíticos obtenidos, por CCE y por ADS, para la determinación de Clo “a” y la Clo “b”. Se observa, claramente que las pendientes de estos métodos, son similares en magnitud, para los dos analitos. Mediante una prueba t de comparación de medias, se verifica que no hay diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza, entre las pendientes, lo cual indica que no hay efectos de matriz, en la determinación de Clo “a” y Clo “b”, en las muestras de agua de mar.

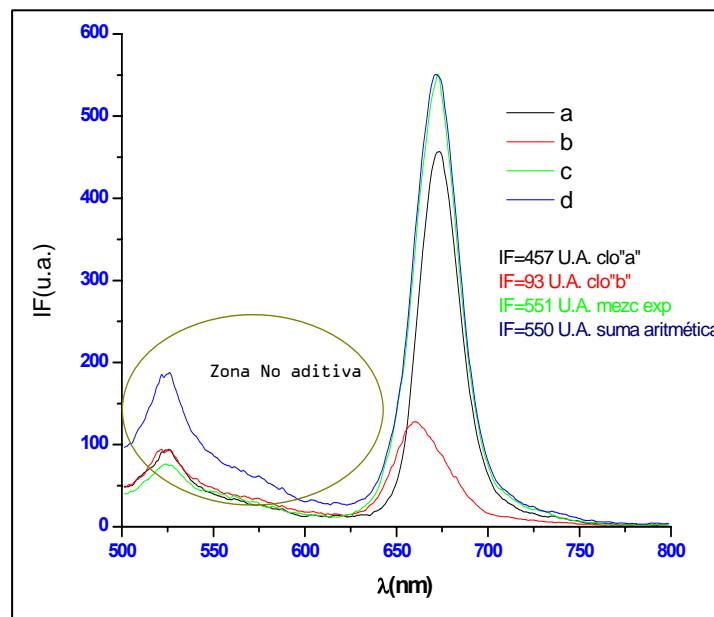
**Tabla 3.8** Comparación entre el método de CCE y de ADS para la Clo “a” y Clo “b”.

Parámetros	Clo “a”		Clo “b”	
	CCE	ADS	CCE	ADS
<b>m</b>	4,78 ± 0,08	4,6 ± 0,2	0,33 ± 0,02	0,32 ± 0,02
<b>b<sub>o</sub></b>	31 ± 21	24 ± 10	13 ± 5	28 ± 7
<b>S<sub>y/x</sub></b>	8,81	12	6,60	13
<b>R<sup>2</sup></b>	0,999	0,9917	0,994	0,9835

### 3.4 Modelos de Calibración Multivariados en la determinación de Clo “a” y Clo “b”.

En esta parte del estudio, se plantea realizar la determinación simultánea de Clo “a” y Clo “b” mediante la aplicación de modelos multivariados. Por lo tanto, es de suma importancia, verificar que la aditividad de las señales de fluorescencia se cumpla en una mezcla de Clo “a” y Clo “b”. Dicha aditividad, es una condición obligatoria para la aplicación de regresión multivariada, ya que esta es aplicable sólo si existe una relación lineal entre las variables de la regresión.

En la figura 3.15, se presentan los espectros obtenidos para: (a) una solución de Clo "a" de 500 ppb, (b) una solución de Clo "b" de 500 ppb, (c) una mezcla de ambas clorofilas con una concentración de 500 ppb cada una y (d) la representación de un espectro, que es el resultado de la suma aritmética de cada espectro individual. La longitud de onda de excitación escogida fue de 450nm, esto es, porque a esta  $\lambda_{exc}$ , ambas clorofilas presentan los niveles de sensibilidad relativamente similares. Se observa, que el espectro obtenido de la suma aritmética (línea azul) de los espectros individuales de las soluciones de Clo "a" (figura 3.15a) y Clo "b" (figura 3.15b), coinciden perfectamente con el espectro obtenido de la solución que contiene ambas clorofilas (línea verde, figura 3.15c). Esto indica, que se cumple la aditividad cuantitativa de las señales de fluorescencia en el intervalo de longitudes de onda donde se presenta la máxima intensidad de emisión. Esto último hace posible aplicar modelos de regresión multivariados de reducción de la dimensionalidad de los datos bien sea: PLS1 o PLS2.



**Figura 3.15 Espectros de Fluorescencia obtenidos a una  $\lambda_{exc}$  de 450nm para:** a) solución de Clo "a" de 500ppb , b) Solución de Clo "b" de 500ppb, c) Mezcla de solución de Clo "a" y Clo "b" de 500 ppb, d) Suma aritmética de los espectros individuales de la soluciones de Clo "a" y Clo "b" de 500ppb.

### **3.4.1 Modelo PLS1, establecido con soluciones uni-componentes de las soluciones de Clo “a” y Clo “b”.**

En esta sección se realiza una evaluación de la eficiencia de los modelos de CM en la determinación cuantitativa de la Clo “a” y la Clo “b”, en las muestras. Para ello, fueron aplicados los dos métodos de separación y extracción de pigmentos previamente presentados y discutidos (1F 0,45 y SPE C-18) sobre varias replicas de las muestras. Se utilizaron dos conjuntos de muestras calibración, para la aplicación del modelo PLS1, en la detección de las Clorofilas “a” y “b”, la composición de estos conjuntos de calibración, así como el planteamiento de los modelos de calibración denominados PLS1I, PLS1II y PLS1III, se indica en la sección 2.4.2.

En la tabla 3.9, se presentan los parámetros estadísticos obtenidos, mediante el modelo PLS1, para la Clo “a” y la Clo “b”. Fueron aplicados los métodos de pre-procesamiento de los datos: sin transformación de los datos ( datos originales ) y el centrado en columna tanto en las variables X como en la variable Y. El método escogido corresponde aquel que produce el menor valor de RMSECV. La mejor opción para todos los modelos de calibración PLS1 fue el método de centrado en columna. Se observa que se requiere de un sólo PC para todos los modelos de calibración, excepto para el modelo PLS1II de la Clo “b” donde se requieren la inclusión de dos PC . La inclusión de un mayor número de PC, como se sucede en el modelo PLS1III se debe probablemente a que exista alguna no-linealidad en los datos espectrales.

**Tabla 3.9** Parámetros Estadísticos obtenidos, de los modelos PLS1I, PLS1II y PLS1III, sobre soluciones unicomponentes de Clo “a” y Clo “b”.

Parámetros Analíticos	PLS1I		PLS1II		PLS1III	
	Clo “a”	Clo “b”	Clo “a”	Clo “b”	Clo “a”	
<b>PC</b>	1	1	1	2	1	
<b>R<sup>2</sup> Calibration</b>	0,9997	0,9965	0,9963	0,9971	0,9963	
<b>R<sup>2</sup> Validation</b>	0,9990	0,9877	0,9821	0,9410	0,9821	
Porcentaje de Varianza	<b>Cal</b>	99.26	99.29	99.95	99.99	99.26
Total Explicada Y (%)	<b>Val</b>	97.35	98.45	99.79	99.82	97.35
Porcentaje de Varianza	<b>Cal</b>	99.37	99.92	99.99	99.82	99.37
Total Explicada X (%)	<b>Val</b>	98.19	99.71	99.92	98.02	98.19
<b>N</b>		5	4	4	4	4
<b>Pre-procesamiento de los datos</b>	Centrado en columna.					

Los tres modelos PLS1 aplicados, describen aproximadamente entre el 97 y 99 % de la variabilidad total de los datos de calibración mientras que entre el 1 y 3% corresponde a información relativa al ruido. Esto según los porcentajes de varianza total explicada obtenidos tanto en las variables X como en las variables Y que están por encima del 97% en todos los casos. Estos altos porcentajes de varianza explicada de calibración y validación, obtenidos con la mínima cantidad posible de PC, indican que los datos de calibración se ajustan perfectamente a dichos modelos de calibración y que además estos modelos deben predecir adecuadamente nuevos datos que sean utilizables en la validación de los mismos. La ventaja de utilizar este modelo multivariado, radica en el hecho que el algoritmo PLS1, permite modelar la presencia de interferentes directos. Estos interferentes provienen generalmente de la matriz de muestras reales. Como resultado de la aplicación de un modelo PLS1, se concluye que debe mejorar la exactitud en la predicción individual de la concentración del analito.

### 3.4.2 Validación de los Modelos de Calibración PLS1

En la tabla 3.10 se presentan los errores de calibración, de validación cruzada y de la validación externa obtenidos para cada modelo PLS1. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar la influencia de los tres modelos de calibración PLS1 sobre los valores de los errores de predicción de Clo “a” y Clo “b”. Se utilizó la prueba de Levene, para evaluar previamente la homogeneidad de varianzas de los modelos de calibración. En todos los casos, se obtuvo un valor del estadístico de Levene inferior al valor crítico a un 95 % de significancia ( $F_{2,6}=5,14$ ), por 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 los valores de F calculados son superiores al valor crítico a un 95% de confianza ( $F_{0,05,2,6}=5,14$ ). Esto indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los errores de predicción de los modelos de calibración.

Posteriormente se aplicó el método de la diferencia mínima estadística (LSD), que consiste de una prueba de comparación múltiple para evaluar las diferencias significativas entre los valores de los errores entre sí de cada modelo de calibración. Se obtiene que para el modelo PLS1 I el error de calibración y los errores de ambas formas de validación, presenta diferencias significativas con respecto a los otros modelos de calibración. Para los modelos PLS1 II y PLS1III, se obtiene que estos errores no difieren entre sí entre un modelo u otro, por tanto la capacidad de predicción es equivalente en la aplicación de estos últimos



**Tabla 3.10** Comparación de los errores RMSECV, RMSEP y RMSEC en los modelos de calibración PLS1I y PLS1 II.

Parámetros Analíticos	PLS1I		PLS1II		PLS1III
	Clo “a”	Clo “b”	Clo “a”	Clo “b”	Clo “a”
<b>PC</b>	1	1	1	2	1
<b>RMSEC (ppb)</b>	0,82	1,58	0,18	1,02	0,18
<b>Varianza</b>	0,68	2,48	0,032	1.04	0,032
<b>RMSECV (ppb)</b>	2,02	3,12	0,44	4,62	0,44
<b>Varianza</b>	4.08	9.73	0.19	21.34	0,19
<b>RMSEP</b>	2,10	3,05	0,43	2,35	0,33
<b>Varianza</b>	4.41	9.30	0.18	5.52	0.11

Resultados similares se obtienen al comparar los modelos de calibración PLS1I y PLS1II con respecto a la Clo “b”, se obtienen por ANOVA 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 PLS1 planteados difieren entre sí. Según los resultados obtenidos los mejores modelos de calibración son el PLS1II y PLS1III ya que presentan los errores de menor magnitud.

Por otro lado, cuando se comparan los errores de validación cruzada interna (RMSECV) con los de validación externa (RMSEP) de cada modelo de calibración, se observa que estos presentan igual magnitud con lo cual se verifica la robustez de estos modelos en la determinación de Clo “a” y Clo “b”. La validación de los modelos de calibración PLS1 indica que estos deben predecir adecuadamente nuevos datos.

### 3.4.3 Aplicación del Modelo PLS1I en la determinación de la Clo “a” en muestras de agua de mar.

Se aplicó el modelo de calibración multivariado de PLS1I y el modelo univariado de CCE, obtenidos en la sección anterior para la determinación de Clo “a” en las muestras. En la tabla 3.11, se presentan las concentraciones de Clo “a” obtenidas por ambos modelos de calibración: CCE y PLS1I para el conjunto de muestras analizadas. Se observa que las concentraciones predichas por ambos modelos son similares en magnitud a las concentraciones añadidas, mayores diferencias suelen mostrarse para el modelo CCE. Se obtienen elevados porcentajes de recuperación (% Rec.) para el modelo PLS1I, que van desde el 97 hasta el 109% , mientras que para el modelo de CCE se obtienen % Rec. más bajos, que van desde 77 al 86%. Estos resultados indican que el modelo de CCE está mas sujeto a interferencias de matriz en la determinación de la Clo “a”, afectando la exactitud de la cuantificación. Mientras que el modelo PLS1I es más exacto en la determinación, ya que se obtienen % Rec. cercanos al 100%, se demuestra entonces la utilidad del modelo multivariado de PLS1, siendo este capaz de modelar cualquier contribución a la señal analítica de los interferentes que puedan estar presentes en la muestra. Los resultados obtenidos en la recuperación de la Clo “a” por los modelos de calibración de CCE Y PLS1I, indican una elevada eficiencia en el procedimiento 1F-0,45.

Una elevada capacidad predictiva del modelo de calibración PLS1I es obtenida en la cuantificación de la Clo “a” en las muestras de agua de mar, ya que se obtiene un valor de RRMSEP del 4%, para un PC y una excelente correlación entre los valores de concentración de las cuatro muestras analizadas, con un valor de  $R^2$  de 0.9964.

**Tabla 3.11** Predicción de Clorofila “a” en muestras de agua de mar, utilizando los modelos de calibración CCD y PLS1I

Muestras Contaminadas	Concentración Clo “a” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )			Porcentaje de Recuperación (%)	
	Añadida	Predicha		CCD	PLS1I
		CCD	PLS1I		
1	1,96 $\pm$ 0,20	1,50 $\pm$ 0,20	1,94 $\pm$ 0,50	77	99
2	3,85 $\pm$ 0,50	3,27 $\pm$ 0,90	4,19 $\pm$ 0,80	85	109
3	5,66 $\pm$ 0,70	4,62 $\pm$ 1,70	5,47 $\pm$ 1,60	82	97
4	7,41 $\pm$ 1,00	6,39 $\pm$ 2,10	7,20 $\pm$ 2,10	86	97

#### 3.4.4 Aplicación del Modelo PLS1I en la determinación de la Clo “a” y la Clo ”b” en muestras de agua de mar.

También fueron aplicados los modelos de CCE y PLS1I en muestras de agua de mar contaminadas de forma individual con las clorofilas “a” y “b” a diferentes concentraciones. Para la extracción se utilizó el procedimiento SPE C-18 ya que éste permite extraer ambas clorofilas de forma cuantitativa. En la tabla 3.12, se muestra la predicción en las concentraciones de las clorofilas “a” y “b”, por el modelo de CCE y el modelo PLS1I. Se observa que existe mayor similitud entre los valores de concentración predichos por el modelo PLS1I con los valores de concentración comparados a los que se obtienen con el modelo de CCE.

**Tabla 3.12** Predicción de la Clo “a” y la Clo “b”, en muestras de agua de mar, utilizando los modelos de calibración de CCE y PLS1I.

Muestra	Concentración Clo “a” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )			Concentración Clo “b” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
	Añadida	Predicha		Añadida	Predicha	
		CCE	PLS1I		CCE	PLS1I
1	0,99 $\pm$ 0,10	1,27 $\pm$ 0,45	0,94 $\pm$ 0,30	9,90 $\pm$ 1,15	14,16 $\pm$ 4,10	11,20 $\pm$ 3,20
2	3,85 $\pm$ 0,35	3,45 $\pm$ 1,15	3,87 $\pm$ 1,05	19,60 $\pm$ 2,15	20,58 $\pm$ 7,20	20,20 $\pm$ 6,19
3	5,66 $\pm$ 0,60	4,24 $\pm$ 2,20	5,06 $\pm$ 2,08	38,46 $\pm$ 4,10	32,45 $\pm$ 12,30	35,47 $\pm$ 11,14
4	-	-	-	47,61 $\pm$ 5,06	39,31 $\pm$ 13,15	44,87 $\pm$ 12,83

En la tabla 3.13, se presentan los %Rec. de Clo “a” de ambos modelos de calibración. Para el modelo PLS1I, estos van desde el 90 hasta el 101% y para la Clo “b”, desde el 92 hasta el 113%. Para el modelo de CCE los % Rec. para la Clo “a”, van desde el 75 hasta el 129%, y para la Clo “b”, van desde 83 hasta 143%. Estos resultados, indican la presencia de errores sistemáticos en la determinación de las clorofilas utilizando el modelo de calibración de CCE mientras que el modelo de calibración PLS1I posee una elevada capacidad predictiva para la cuantificación de las Clo “a” y Clo “b” en muestras de agua de mar permitiendo incrementar la exactitud de la cuantificación.

Se obtienen valores de RRMSEP similares para la Clo “a” del 10% y para la Clo “b” del 8%, (ver tabla 3.14) sobre las muestras analizadas. Estos bajos valores de error indican que el modelo de calibración PLS1I predice adecuadamente dichos analitos en la matriz del agua de mar. Se evidencia entonces que la aplicación del modelo PLS1I permite obtener resultados más fiables en la cuantificación de ambos tipos de clorofilas con respecto al modelo de CCE, cuando se utiliza el procedimiento SPE C-18.

**Tabla 3.13** Porcentaje de Recuperación de la Clo “a” y la Clo “b” en las muestras de agua de mar contaminadas utilizando los modelos de calibración de CCE y PLS1I, establecidos para cada analito.

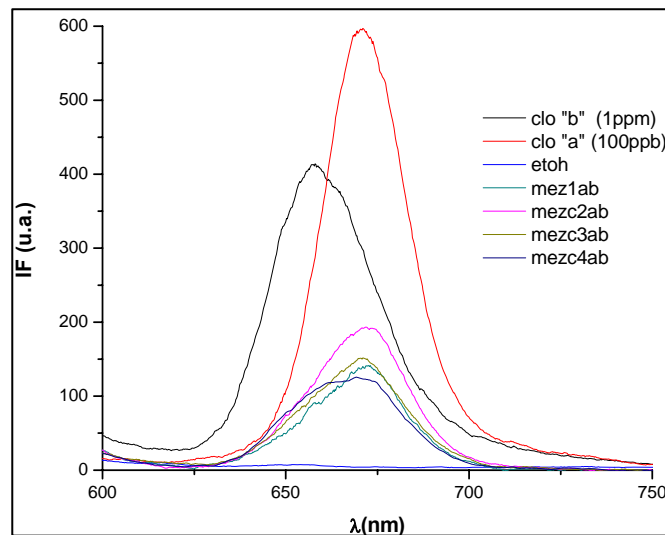
Muestra	Porcentaje de Recuperación (%)			
	Clo “a”		Clo “b”	
	CCE	PLS1I	CCE	PLS1I
1	129	93	143	113
2	90	100	105	103
3	75	89	111	92
4	-	-	83	94

**Tabla 3.14** Parámetros Analíticos del Modelo PLS1I, en la predicción de Clo “a” y Clo “b”, en muestras de agua de mar.

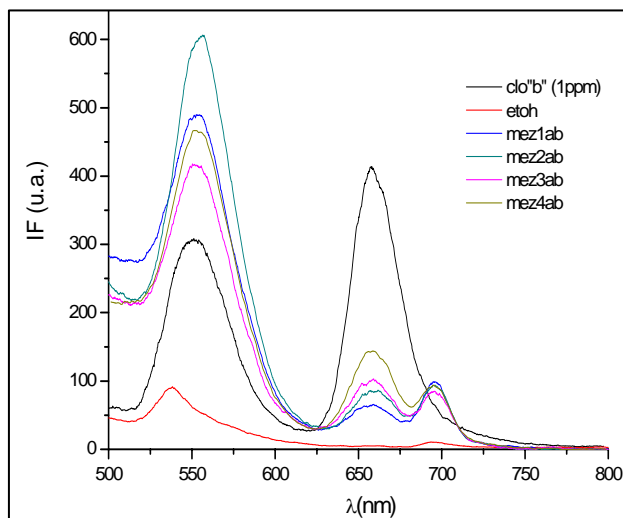
Parámetros del Modelo PLS1	Concentración ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	
	Clo “a”	Clo “b”
PC	1	1
R <sup>2</sup>	0.9941	0.9991
RRMSEP (%)	10	8

### 3.4.5 Aplicación del Modelo PLS1II en la determinación de la Clo "a" y la Clo "b".

Para la evaluación del modelo PLS1II se utilizan un conjunto de muestras de agua de mar, que fueron contaminadas con mezclas de cantidades conocidas de Clo "a" y Clo "b". La extracción de los analitos en estas muestras se realizó por SPE C-18. En las figuras 3.16 y 3.17, se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos para el conjunto de muestras de validación. Se observa, que los máximos de emisión de fluorescencia registrados para las mezclas es de 672nm para la  $\lambda_{exc}$  de 430nm y de 659 nm para la  $\lambda_{exc}$  de 460nm, coincidiendo estos máximos con los correspondientes a las soluciones patrones de la Clo "a" y la Clo "b". Esto indica, que para las longitudes de onda de excitación característica de cada clorofila hay una excitación selectiva de la cada una de estas en dichas mezclas.



**Figura 3.16** Espectro de Fluorescencia de Mezclas de Clo "a" y Clo "b" y soluciones patrones de estos analitos a una  $\lambda_{exc}$  de 430nm.



**Figura 3.17** Espectro de Fluorescencia de Mezclas de Clo "a" y Clo "b" y soluciones patrones de estos analitos a una  $\lambda_{exc}$  de 460nm.

En la tabla 3.15, se presentan los resultados obtenidos para la determinación de Clo "a" y Clo "b" en las muestras de predicción. El modelo PLS1III predice de forma selectiva la Clo "a" y la Clo "b" en las muestras contaminadas por mezclas de ambos analitos. Para la Clo "a" se tiene que excluir de la predicción la muestra 4, ya que ésta presenta un comportamiento anómalo respecto a las demás, afectando la predicción de este analito. En la composición de esta muestra hay un elevado porcentaje de Clo "b" respecto a la Clo "a". Cuando el extracto de esta muestra se excita a 430nm (ver figura 3.16) se observa un máximo de emisión de fluorescencia cercano a 660nm. Esto produce una pérdida de la selectividad en la detección de la Clo "a", por lo que el modelo PLS1III no es capaz de predecir adecuadamente la concentración de este analito en esta muestra. Mientras que para la Clo "b" las concentraciones predichas de este analito están acordes con los valores de las añadidas en las cuatro muestras analizadas.

**Tabla 3.15.** Predicción individual, de la Clo “a” y la Clo “b” en muestras de agua de mar, utilizando el modelo PLS1II.

Muestras de Validación	Concentración de Clo “a” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		Concentración de Clo “b” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	
	Añadida	Predicha	Añadida	Predicha
1	2.91	$2,92 \pm 0,51$	14.78	20.91
2	4.76	$5,05 \pm 0,82$	24.39	27.49
3	2.44	$3,24 \pm 0,76$	33.82	31.31
4	1.48	-	43.06	45.54
PC			1	
RMSEP (%)		13		12
Muestras predichas		3		4

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la Clo “a” y la Clo “b” , mediante la aplicación del modelo multivariado PLS1II indican que se puede realizar la determinación individual de estas clorofilas con un alto grado de exactitud en soluciones que poseen ambas analitos. La cuantificación individual de estos pigmentos cuando se aplica el modelo de CCE es inexacta debido a las interferencias espectrales entre ambas clorofilas.

Valores similares de RRMSEP (%) fueron obtenidos para los modelos de calibración PLS1 utilizando ambos procedimientos de extracción 1F-0,45 y SPE C-18, ver tabla 3.16, con lo cual se verifica la robustez de este modelo en la cuantificación de la Clo “a” y la Clo “b” en extractos de muestras de agua de mar. Se observa que para el modelo de CCE la predicción es menos eficiente.



**Tabla 3.16** Comparación del error de predicción relativo RRMSEP (%) en la Clo “a” y la Clo “b” en las muestras contaminadas, obtenidos por los modelos de calibración de CCD, PLS 1I y PLS1II

Modelo De Calibración	RRMSEP(%)		
	1F-0,45	SPE C-18	
	Clo “a”	Clo “a”	Clo “b”
PLS1I	4	10	8
PLS1II	-	13	12
CCE	26	29	19

### 3.4.6 Aplicación del modelo PLS1III para la determinación de Clo “a”.

Se aplicó el modelo PLS1III, para la cuantificación de la Clo “a” en tres muestras de agua que fueron recolectadas en diferentes sitios. Dos de estas muestras son de agua de mar: provenientes de dos sitios diferentes de una misma ciudad y la otra es agua de reservorio filtrada previamente con un filtro de 8  $\mu\text{m}$ . El procedimiento de extracción utilizado fue el 1F-0,45. Cada una de estas muestras fue contaminada con una cantidad conocida de Clo “a” de 23, 8  $\mu\text{g L}^{-1}$  para así estudiar la recuperación de este analito en dichas muestras.

En la tabla 3.17, se presentan la comparación entre los valores de la concentración de Clo “a” predicha por el modelo PLS1III y la concentración añadida de para las muestras de aguas analizadas. Se observa que se obtienen elevados porcentajes de recuperación, que van desde el 81 hasta el 89% . Estos resultados, indican que el modelo PLS1III es capaz de predecir aceptablemente la concentración de Clo “a” en muestras de aguas con diferentes matriz sin afectar la exactitud del resultado.

**Tabla 3.17** Predicción de Clorofila “a”, en muestras de agua de mar, utilizando el modelo PLS1III.

Muestras	Concentración Clo “a” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		Porcentaje de Recuperación (%)
	Muestra	Muestra con 23,8 $\mu\text{g l}^{-1}$ Clo “a” añadida	
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

### 3.5 Modelo de CM PLS2

Para el análisis simultáneo de Clo “a” y Clo “b” se planteó el modelo de calibración PLS2, registrando los espectros de fluorescencia de las mezclas a una longitud de onda de excitación de 450nm. A esta longitud de onda se verificó anteriormente la aditividad de la señal analítica (ver figura 11). Se construyó un conjunto de calibración a partir de las soluciones uni-componentes de Clo “a” y la Clo “b” para establecer un modelo PLS2. En la sección 2.3.2 se indica la composición de dicho conjunto de muestras.

En la tabla 3.18 se presentan los parámetros estadísticos obtenidos mediante el modelo PLS2, para la Clo “a” y la Clo “b”. Se observa que el número de PC requeridos es de dos (2) para ambas clorofilas. Se obtienen errores de calibración y de validación cruzada relativamente altos. El valor de RMSECV obtenido para la Clo “b” (69%) es mayor respecto a la Clo “a” (24%), esto indica que probablemente este modelo no sea adecuado en la predicción de nuevos datos.

**Tabla 3.18** Parámetros Estadísticos obtenidos del modelo PLS2

Parámetros Analíticos	PLS2	
	Clo “a” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Clo “b” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
PC	3	2
RMSEC (ppb)	1,05	6,33
RMSECV (ppb)	2,91	17,36
RMSECV (%)	24	69
R <sup>2</sup> Calibración	0,9982	0,9870
R <sup>2</sup> Validación	0,9892	0,9519
Número de Muestras (n)	7	7

### 3.5.1 Validación del Modelo PLS2, en la determinación de la Clo “a” y la Clo “b”.

Para la validación externa del modelo de calibración PLS2 se utilizó un conjunto de cinco muestras de validación, cuya composición fue escogida de forma tal que estas mezclas estuviesen dentro de los rangos de concentración del conjunto de las muestras de calibración. En la tabla 3.19 se muestra la composición de las mezclas del conjunto de validación.

**Tabla 3.19** Composición del conjunto de Muestras de Validación

Mezclas validación	Clo “a” (mg l <sup>-1</sup> )	Clo “b” (mg l <sup>-1</sup> )
1	25	10
2	50	50
3	10	25
4	50	25
5	25	50

En la tabla 3.20, se presentan los resultados obtenidos por validación externa aplicando el modelo PLS2 sobre las mezclas de validación. Se observa que se obtiene un valor de RRMSEP del 20% para la Clo “a”, siendo este más bajo al obtenido para la Clo “b” RMSEP del 31%. Esto indica una mejor predicción del modelo PLS2 para la Clo “a”. Por otro lado, se obtiene que los errores relativos de RMSECV del 24% y RRMSEP del 21% son similares en magnitud para la Clo “a”, indicando la robustez de este modelo de calibración respecto a este analito. Para la Clo “b”, se obtienen valores diferentes de RMSECV del 69% y RMSEP del 31%, indicando esto que el modelo PLS2 no es robusto en la determinación de este analito.

**Tabla 3.20** Parámetros Estadísticos calculados por validación externa aplicando el modelo PLS2 para la Clo “a” y la Clo “b”, en las mezclas de validación.

Parámetros	PLS2	
	Clo “a”	Clo “b”
PC	2	2
RMSEP(ppb)	61,93	11,54
RRMSEP (%)	21	31
R <sup>2</sup>	0,9218	0,9519

### 3.5.2 Aplicación del modelo PLS2 para la determinación simultánea de Clo “a” y Clo “b”.

El modelo de calibración PLS2 se aplicó en cuatro muestras contaminadas con mezclas de las clorofilas “a” y “b”, a diferentes concentraciones. En la tabla 3.21 se presentan los valores de concentración añadidos y predichos para ambos analitos. Se observa que existe una mejor predicción del modelo PLS2 para la Clo “b” que la obtenida en la Clo “a”, donde sólo se predicen dos muestras de las cuatro en estudio con un elevado RRMSEP del 47%.

**Tabla 3.21.** Predicción Simultánea de la Clo “a” y la Clo “b”, en muestras de agua de mar, utilizando los modelos de calibración PLS2

Muestras de Validación	Concentración de Clo “a” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		Concentración de Clo “b” ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	
	Añadida	Predicha	Añadida	Predicha
1	2.91	1.81	14.78	23.62
2	4.76	3.40	24.39	26.70
3	2.44	-	33.82	34.94
4	1.48	-	43.06	40.62
PC		1		1
RMSEP (%)		47		15
Muestras predichas		3		4

En el modelo PLS2 hay una pobre predicción sobre las muestras tanto para la Clo “a” como para la Clo “b”, esto verifica los resultados reportados en la literatura de la poca exactitud obtenida cuando se realiza la detección de Clo “a” por fluorescencia en presencia de Clo “b”<sup>7</sup>. Para la aplicación de este modelo los espectros se registran a una longitud de onda que no es selectiva para ninguna de las dos clorofilas y en las cuales ambas contribuyen a la señal analítica, ver figura 3.15.

### 3.6 Aplicación a muestras reales.

Los diferentes modelos de calibración planteados en la sección anterior fueron aplicados en la cuantificación de la Clo “a” en tres tipos de muestras M1 M2 y M3, las dos primeras corresponden a de agua de mar y de la última a agua de reservorio aplicando los procedimientos de extracción de pigmentos descritos anteriormente. En todas las muestras se obtiene que la concentración de Clo “a” , ver tabla 3.22, está por debajo del LOD del análisis que es de  $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabla 3.22** Aplicación de los modelos de calibración sobre muestras reales.

Modelos de Calibración	Concentración de Clo “a” ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	M1	M2	M3
	1F-0,45	C-18	1F-0,45
CCD			< LOD
ADS	< LOD		-
<b>PLS1I</b>			< LOD

#### 4. CONCLUSIONES

◆ Se desarrollo un método fluorométrico de determinación selectiva de la Clo “a” en extractos de muestras de agua de mar con un límite de detección de  $1,8 \mu\text{gL}^{-1}$ . Se optimizó una metodología simple de extracción de los pigmentos en etanol, mediante separación del fitoplancton con una membrana de nylon de 13mm de diámetro y tamaño de poro de  $0,45 \mu\text{m}$ . Se disminuyó el volumen de muestra y el volumen de extracción en función del tamaño de filtro utilizado. Este procedimiento se valido por el proceso de “spiking” sobre muestras de agua de mar, obteniendo porcentajes de recuperación para la Clo “a” cercanos al 100%, que indican pérdidas mínimas del analito durante la extracción y la ausencia de errores sistemáticos. Para muestras de agua de reservorio la metodología 1-045 resultó poco eficiente ya que bajos porcentajes de recuperación de la Clo “a” fueron encontrados.

◆ Se obtiene una pobre eficiencia en la recuperación de la Clo “a” y la Clo “b” sobre muestras contaminadas con estos analitos, cuando se aplica el procedimiento SPE C-18. Los resultados obtenidos indican una alta retención del analito por adsorción sobre la fase estacionaria del cartucho y una pobre eficiencia en la elusión de los pigmentos.

◆ La miniaturización de los procesos de separación del fitoplancton y extracción de los pigmentos, presenta varias ventajas en el tratamiento de la muestra entre ellas tenemos: se disminuyen los riesgos de pérdida y contaminación del fitoplancton y la posibilidad de degradación de los pigmentos, la cantidad de muestra no representa una limitación cuando no se dispone de esta en grandes cantidades y se disminuye el costo y tiempo de análisis.

- ◆ Se comparó la aplicación de modelos de calibración univariados y multivariados en la determinación de Clo “a” y Clo “b” en muestras de agua de mar “spiked”, utilizando los procesos de extracción 1F-0,45 y de SPE C-18, en todos los casos se observa que los modelos multivariados PLS1I permiten incrementar la exactitud del análisis.
  
- ◆ El modelo de calibración PLS2 para la determinación simultánea de Clo “a” y Clo “b” resulto ineficiente, ya que se obtienen elevados valores de RMSEP en la predicción. Este resultado esta acorde con lo reportado en la literatura de la sobre-estimación de la Clo “a” en presencia de la Clo “b” por métodos fluorométricos.
  
- ◆ No se logró la detección de Clo “b” en ninguna de las muestra analizadas, se infiere que esto se debe a la poca sensibilidad del método fluorométrico con respecto a esta clorofila y a los bajos valores de concentración que suelen encontrarse en este tipo de muestras.



## 5. BIBLIOGRAFIA

---

- 1 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).
- 2 IUPAC. Harmonized Guidelines for the In-House Validation Of Methods Of Analysis. TECHNICAL REPORT. Budapest.
- 3 G. Weber and F. W. J. Teale. **Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions**. *Trans. Far. Trans.*, 53, 646-655, (1957).
- 4 Welschmeyer N. A, **Fluorometric Analysis of Chlorophyll a in the Presence of Chlorophyll b and Pheopigments**, *Limnol.Oceanography*, 38. 1985-1992. (1994).
- 5 C.J. Lorenzen. **Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations**. *Limnol. Oceanography*. 12, 343. (1967).
- 6 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).
- 7 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).
- 8 S.W Jeffrey, R.F Mantoura and S. W. Wright. **Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods**. *Unesco Publishing. París*. (1997).
- 9 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).
- 10 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).

- 
- 11 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).
  - 12 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).

## **CAPITULO 3**

### **PARTE III**

**Determinación de Clorofila “a” en sistemas acuáticos mediante Cromatografía  
Líquida de Alta Resolución (HPLC) convencional y Capilar**

## 1. PARTE EXPERIMENTAL

### 1.1 INSTRUMENTACIÓN

#### 1.1.1 Cromatografía de Líquidos Convencional (HPLC Convencional)

El sistema de HPLC convencional, consistió de una bomba cuaternaria (Series1050, Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) acoplada a una válvula de inyección de seis puertos (Modelo 7725, Rheodyne, Palo Alto, USA) con un bucle de 20  $\mu\text{L}$  y un detector de fluorescencia programable (Serie 1100, Agilent). El detector esta acoplado a un sistema de adquisición de datos (ChemStation, Agilent). Se emplearon para la separación de los analitos dos columnas analíticas C18: una de longitud, L: 125 mm, diámetro interno, di: 4 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (Lichrosphere 100, Merck, Darmstadt, Germany) y la otra columna de L: 5 cm, di: 4.6 mm y tamaño de partícula de 4  $\mu\text{m}$  (Génesis, Jones Chromatography, Mid Glamorgan, United Kingdom). Los solventes utilizados fueron filtrados mediante una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Teknokroma, Barcelona, España) y desgasificados con helio previos a su uso.

#### 1.1.2 Cromatografía de Líquidos Capilar (HPLC capilar)

El sistema de HPLC capilar, consistió de una bomba capilar (Series 1100, Agilent, Waldbronn, Germany) acoplada a una válvula de inyección, de alta presión de seis puertos (modelo 7725, Rheodyne, Palo Alto, CA, USA), con un bucle interno de 2  $\mu\text{L}$ . Se utilizó para la separación de los analitos una columna C<sub>18</sub> de 150 mm de longitud, d.i.= 0.5 mm y tamaño de partícula: 5  $\mu\text{m}$  (Zorbax SB, Agilent). La detección fue realizada con un detector UV de arreglo de diodos , (DAD Series 1100, Hewlett-Packard). Este detector fue conectado, a un sistema de procesamiento de los datos (HPLC ChemStation, Agilent). Los solventes fueron filtrados mediante una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### 1.1.3 Fluorimetro

Se utilizó un Fluorimetro comercial (Hitachi F4500, Instrumentos Hitachi Inc, Tokio Japón), cuyas características y funcionamiento han sido descritos en la sección experimental 1.1 del capítulo de determinación por fluorescencia de la Clo “a” y Clo “b” (capítulo 3 parte II).

### 1.2 Reactivos y soluciones:

Se utilizan las soluciones estándares de calibración descritas en la sección experimental 1.2 del capítulo 3 parte II. Las soluciones de calibración de las clorofilas, se prepararon en un intervalo de concentración entre 10-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , en etanol. Estas soluciones se preparan diariamente por dilución adecuada de las soluciones estándares.

### 1.3 Muestras de Campo:

Se realiza el análisis de las muestras de aguas señaladas en la sección experimental 1.3 del capítulo 3 parte II.

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1 Procedimientos de pre-concentración de los pigmentos acoplados a HPLC Convencional.

Para la determinación por HPLC de las clorofilas “a” y “b” en los extractos de los pigmentos en etanol provenientes de las muestras de agua de mar, se utilizaron dos procedimientos que permiten la pre-concentración en línea de estos analitos y el aumento de la sensibilidad en el análisis cromatográfico. Inicialmente se realiza la optimización de estos procedimientos utilizando soluciones estándares de las clorofilas disueltas en etanol.

Estos procedimientos fueron:

- ◆ La micro-extracción en fase sólida (SPME) en tubo en una columna capilar abierta de cromatografía de gases.
- ◆ La extracción en fase sólida (SPE) en línea utilizando una columna empacada.

Ambos procedimientos de extracción fueron acoplados al sistema de CL-convencional.

### 2.1.1 SPME en tubo con columna capilar-HPLC convencional

La SPME en tubo con columna capilar, se llevó a cabo en una columna capilar tubular abierta de cromatografía de gases (columna de extracción) recubierta con una fase estacionaria, 95% dimetil-polisiloxano (PDMS) y 5% difenilo, con diámetro interno de 0.32 mm y 3  $\mu\text{m}$  de espesor de recubrimiento (TRB-5, Teknokroma, Barcelona, España).

Un diagrama esquemático del dispositivo utilizado para la SPME en tubo con columna capilar, se representa en la figura 3.18. El bucle de muestra de 20  $\mu\text{L}$  conectado a una válvula de inyección de seis puertos se sustituyó por la columna de extracción que actúa como bucle de inyección. En la posición de carga de la válvula (figura 3.18 a) el bucle de muestra se cargó con la solución del analito o la muestra pasando a través de la fase estacionaria, reteniéndose los analitos y pasando el solvente directamente al desecho. La fase móvil proveniente de la bomba de HPLC pasa directamente a la columna analítica. En la posición de inyección de la válvula, figura 3.18 b, la fase móvil se desplaza a través del bucle de muestra transportando los analitos hacia la columna analítica.

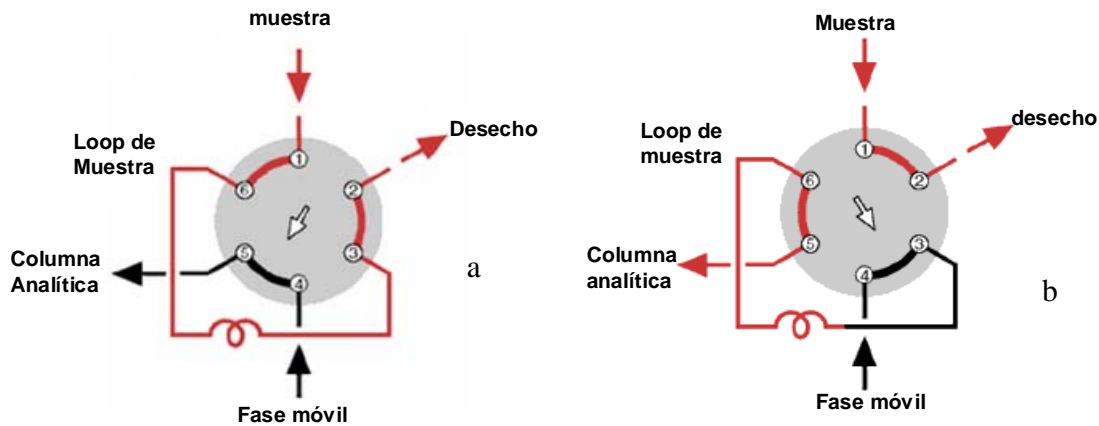


Figura 3.18 Diagrama Esquemático de la configuración para la SPME en tubo. a) Posición "Load" (carga) y b) Posición "inject" (inyección).

### 2.1.2 Optimización del Sistema de SPME en tubo –HPLC Convencional

En el sistema de SPME en tubo, se realizó la inyección directa de la muestra: se cargó el bucle de muestra con soluciones patrones de las Clo "a" , Clo "b" y de los extractos de muestra en etanol e inmediatamente se rota la válvula de inyección a la posición inject y así se transfieren los analitos retenidos hacia la columna analítica. Para la optimización del sistema de SPME en tubo, se modificó el tamaño de la columna de extracción para generar diferentes volúmenes internos de 25, 50 y 100  $\mu\text{L}$  que sirven como bucles de inyección. A su vez fueron procesados diferentes volúmenes de muestras, entre 50 y 500  $\mu\text{L}$  de forma incrementar el factor de pre-concentración de los analitos.

En la tabla 3.23 se indican las condiciones experimentales que se utilizaron en la optimización del sistema de SPME en tubo-HPCL y las condiciones cromatográficas empleadas para la separación de los analitos.

En la posición de inyección de la válvula, figura 3.18 b, la fase móvil se desplaza a través del bucle de muestra transportando los analitos hacia la columna analítica. La elusión se realizó de forma isocrática, utilizando como eluente una mezcla 95% etanol - 5% agua. La detección se realizó por fluorescencia.

**Tabla 3.23** Condiciones experimentales utilizadas para la SPME en tubo-CL convencional

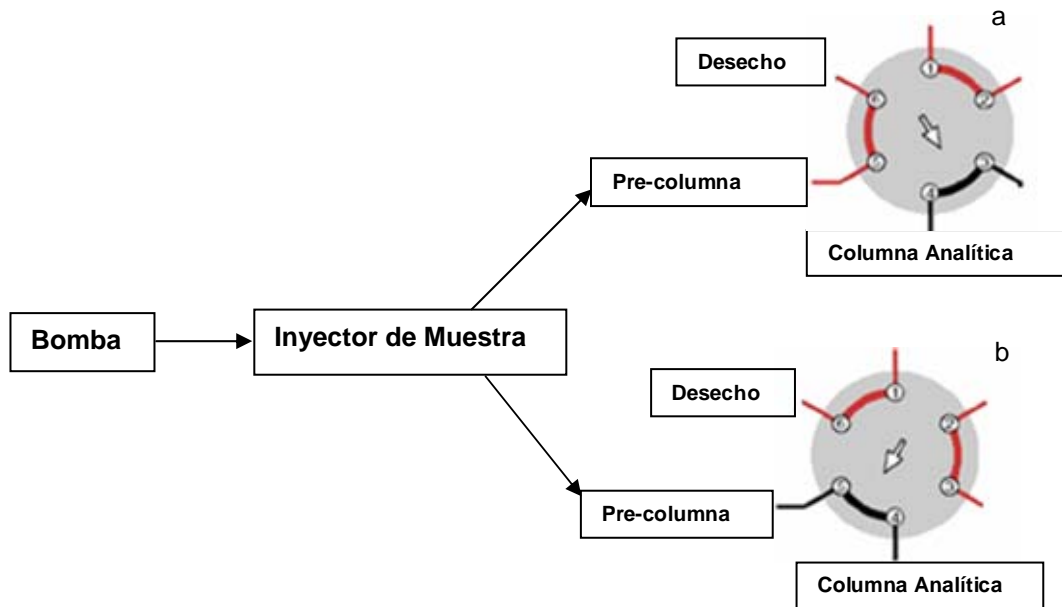
Parámetros	Tamaño del Loop TRB-5(μL)		
	25	50	100
Volúmenes de muestra (μL)	500	50 125 250	100
Flujo(mL min <sup>-1</sup> )	1	1	2
Solvente	A: 95% etanol-5% agua		
Programa	Elusion isocrática 100%A Fluorescencia		
Detector	Excitación: 430 nm Clo “a” 460nm Clo “b” Emisión: 670nm Clo “a” 660nm Clo “b”		

### 2.1.3 SPE en línea - HPLC convencional.

La SPE en línea se realizó en una columna (pre-columna) de di: 2.1mm y 20 mm de longitud, empacada con una fase estacionaria C-18 de tamaño de partícula de 30 μm (Hypersil, Merck). Se utilizó para el sistema de SPE en línea una configuración column switching en la cual se acoplan la pre-columna y la columna analítica del sistema cromatográfico mediante una válvula de conmutación de seis puertos (Hewlett Packard).



En la figura 3.19, se esquematiza el dispositivo de acoplamiento de las dos columnas. En la posición “a” se produce la SPE en la pre-columna y en la posición “b”, los analitos retenidos se transfieren a la columna analítica. En este sistema se utilizaron bucles de muestra de 200 y de 400  $\mu\text{L}$ .



**Figura 3.19** Diagrama Esquemático-Sistema Cromatográfico de Acoplamiento de Dos Columnas-SPE en columna empacada.

La SPE en línea, se llevó a cabo según el siguiente procedimiento: se cargó el bucle de inyección con una solución del analito o la muestra inmediatamente se inicia el programa de elusión por gradiente y se rota la válvula switching a la posición a (figura 3.19 a). Se realizó la SPE en la columna empacada, el eluyente de los compuestos que no son retenidos en la pre-columna van a desecho y se vacía el bucle en un tiempo de 3 minutos. Luego, la válvula switching se rota a la posición “b” (figura 3.19 b) para que los analitos sean transferidos hacia la columna analítica.

Para la optimización del sistema de SPE en línea, fueron procesados Volúmenes variables de muestra entre 200 y 400  $\mu\text{L}$  a través de los bucles de inyección. Diferentes modalidades en la inyección de la muestra fueron ensayadas: inyección simple en el loop de 200  $\mu\text{L}$ , inyección simple en el loop de 400  $\mu\text{L}$  e inyección de 400 $\mu\text{L}$  utilizando de forma consecutiva el loop de 200 $\mu\text{L}$ . En la tabla 3.29 se indican las condiciones experimentales utilizadas en el sistema de SPE en línea y las condiciones de separación cromatográfica.

**Tabla 3.24** Condiciones experimentales utilizadas en el Sistema de SPE en tubo con columna empacada

Parámetros	Tamaño del Loop de Sílice ( $\mu\text{L}$ )		
	200	400	
Volumen Inyección( $\mu\text{L}$ )	200	400	
	200		
	Dos veces		
Solvente	A: Etanol	B: Agua	
Gradiente	t(min)	%A	%B
	1	60	40
	8	95	5
	10	60	40
Flujo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	1		
Columna Analítica	Lichrosphere RP18 (5 $\mu\text{m}$ ) L: 12 cm		

La fase móvil utilizada consistió de una mezcla de los siguientes solventes: A: Etanol 99% grado HPLC y B: Agua 18 m  $\Omega$ . La elusión fue realizada por gradiente de solvente binario (ver tabla 3.29), a un flujo de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . En el programa de gradiente binario utilizado, se equilibró previamente la columna analítica por lavado con 60% de A y 40% de B por 1 minuto.

Posteriormente se disminuye la polaridad del eluente, aumentando el porcentaje de etanol esto para mejorar la separación de las clorofilas que son compuestos de baja polaridad. Finalmente el programa de inyección retorna a las condiciones iniciales, volviendo al equilibrio dos minutos antes de la siguiente inyección. Se utilizan las mismas columnas analíticas y las mismas condiciones de detección, empleadas en el sistema SPME en tubo con columna capilar -CL.

### **2.2 Procedimientos de pre-concentración de los pigmentos acoplados a HPLC Capilar.**

#### **2.2.1 SPME en tubo - HPLC capilar**

La separación de las clorofilas “a” y “b” por HPLC capilar, se realizó utilizando el procedimiento de extracción de SPME en tubo con columna capilar abierta. El mismo sistema de SPME en tubo con columna de extracción acoplado a la HPLC convencional fue utilizado en la HPLC capilar.

En el sistema de SPME en tubo acoplado a HPCL capilar, las muestras inyectadas fueron soluciones estándar de las clorofilas “a” y “b” en etanol y extractos de la muestra en etanol. Para este sistema fueron evaluadas diversas modalidades en el procedimiento de inyección de la muestra:

- a) En el primer procedimiento se procesan diferentes volúmenes en el bucle de muestra e inmediatamente se rota la válvula a la posición de inyección. Este procedimiento corresponde a inyección directa.

- b) En el segundo procedimiento, se hace pasar aire con la jeringa a través del bucle de inyección previamente cargado con la muestra. Los analitos no retenidos pasan a desecho. Luego se lava el loop con 25  $\mu\text{L}$  de agua 18 m $\Omega$  e inmediatamente se rota la válvula de inyección para transferir los analitos retenidos hacia la columna analítica.
- c) En el tercer procedimiento, se añaden diferentes porcentajes de agua (10 y 25 %) a las soluciones de Clorofila en etanol, previo a ser inyectadas. Para realizar la inyección de la muestra se utilizan los dos procedimientos descritos anteriormente.

Las condiciones experimentales utilizadas para la SPME en tubo-HPLC capilar y las condiciones de separación cromatográfica se indican en la tabla 3.25. De forma de incrementar el factor de pre-concentración de los analitos fueron procesados diferentes volúmenes de muestras entre 25 y 100  $\mu\text{L}$ , a través de bucles de 18, 25 y 50  $\mu\text{L}$ .

**Tabla 3.25** Condiciones Experimentales utilizadas en la SPME en tubo -CL capilar

Parámetros	Tamaño del Loop TRB-5 (μL)			
	18 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>	25 <sup>b</sup>	50 <sup>c</sup>
Volúmenes de muestra (μL)	25	25	25	50
	50	50	50	
	75		75	
	100		100	
Solvente	A: 95% etanol-5% agua			
Flujo(μL min <sup>-1</sup> )	20			
Programa	Elusion isocrática 100%A			
Columna Analítica	Agilent, Zorbax SB C18, 150 mm x 0.5 mm de di., diámetro de partícula de 5 μm			
Detector	Absorbancia 430 y 660 nm Clo “a” 460nm Clorofila “b”			
Muestras Inyectadas	Soluciones estándar de la Clo “a” y la Clo “b”, en etanol. Soluciones estándar con diferentes porcentajes de agua añadida.			

**a** Se realiza la inyección de las soluciones de clorofila, en etanol.

**b** Se realiza la inyección de las soluciones de clorofila, con un 25 % de agua en su composición.

**c.** Se realiza la inyección de las soluciones de clorofila, con un 10 % de agua en su composición.

### 2.3 Aplicación de los sistemas de pre-concentración de pigmentos acoplados a HPLC convencional y HPLC Capilar sobre los extractos de muestra.

En esta etapa experimental se evaluó la eficiencia de los sistemas de pre-concentración previamente optimizados en la sección anterior, de SPME en tubo y SPE en columna empacada acoplados a HPCL convencional en la determinación de Clo “a” y Clo “b” mediante el análisis de extractos de muestras.

Los extractos de las muestras analizadas por los sistemas de pre-concentración de los pigmentos, fueron obtenidos mediante tres procedimientos de separación del fitoplancton y extracción de los pigmentos fotosintéticos. Estos procedimientos fueron:

- ◆ Separación con filtro de nylon: 1F-0,45.
- ◆ Retención del fitoplancton sobre cartucho C-18: 2 SPE-C18
- ◆ Retención del fitoplancton sobre disco de extracción C-18 , 3 Emp C-18.

Los dos primeros procedimientos ya han sido descritos en la sección de metodología experimental 2.2 del capítulo 3 parte II. En el último procedimiento de extracción, se utilizó un disco de extracción de fase sólida C-18, éste se recortó a un diámetro aproximado de 13mm. Al igual que en los otros procedimientos de extracción, se hace pasar 10 mL de la muestra y luego se transfiere el disco a un vial ámbar de 5 mL que contenía 0,25 mL de etanol. La extracción de los pigmentos en etanol se realiza por solubilidad. Se utilizaron factores de pre-concentración entre diez y cuarenta veces. Se ensayan diversas condiciones experimentales en los procesos de extracción de los pigmentos de forma de incrementar la sensibilidad en la determinación de Clo “a” y Clo “b” mediante el análisis de los extractos con los sistemas de pre-concentración en línea.

Se realizó la identificación cualitativa de las clorofilas por comparación de los tiempos de retención obtenidos en cromatogramas de soluciones estándar de los analitos puros y aquellos obtenidos en cromatogramas de muestras de aguas contaminadas con estos analitos.

#### **2.4. Influencia de los diferentes procedimientos de Extracción de pigmentos en la recuperación de Clo “a” en las muestras.**

De forma de escoger el método óptimo entre los procedimientos de 1F-0,45, SPE C-18 y 3 SPE Empore C-18 se evaluó el porcentaje de recuperación de Clo “a” obtenido al aplicar estos procedimientos en el análisis de varias réplicas de muestras contaminadas. Para ello fueron utilizados diferentes volúmenes del solvente en cada procedimiento de extracción para generar diferentes factores de pre-concentración y evaluar así el efecto de esta variable en la recuperación del analito. Se utilizó el sistema de SPME en tubo en un bucle de 50  $\mu\text{L}$  y un volumen de muestra de 125  $\mu\text{L}$  en el análisis de los extractos de muestra. La recuperación del analito fue estimada por comparación entre las cantidades extraídas y la cantidad del analito añadido en la muestra.

#### **2.5 Validación del Método**

##### **2.5.1 Límites de Detección**

Los límites de detección, LODs, fueron establecidos como la concentración de analito que produce una relación señal a ruido de tres(3), para cada sistema HPLC. Estos LODs son instrumentales ya que se estiman mediante el uso de soluciones estándares de los analitos. Para el análisis de las muestras, se definen los límites de detección estimados,  $\text{LOD}_{\text{est}}$ , los cuales son referidos a la muestra, según el método de extracción y los factores de pre-concentración utilizados.

### 2.5.2 Repetitividad y Reproducibilidad

La precisión en los sistemas cromatográficos, se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de variación, intra-diario e inter-diario. Para el estudio intra-diario, se realizó la inyección de tres réplicas consecutivas de soluciones estándar de Clo "a". Para el estudio inter-diario, se realizó la inyección de una misma solución estándar durante seis días consecutivos.

### 2.5.3 Recuperación

#### 2.5.3.1 HPLC Convencional

Para evaluar la recuperación de la Clo "a" en muestras de agua de mar, fueron analizadas cuatro muestras contaminadas con concentraciones conocidas de Clo "a" desde 1 a 4 ppb. Se utilizó el método de extracción de los pigmentos 1F-0,45. El factor de preconcentración utilizado fue de 10:1. Los extractos de las muestras fueron analizadas simultáneamente por el sistema de SPME en tubo-HPLC convencional con un bucle de muestra de 50  $\mu\text{L}$  y por fluorescencia.

Las cantidades extraídas del analito en las muestras contaminadas fueron estimadas a partir del área de pico registrada en los cromatogramas y la ecuación de calibración obtenida para la inyección directa de 125  $\mu\text{L}$  de soluciones estándares de Clo "a" en un intervalo de concentración de 14 a 100  $\mu\text{g}\text{L}^{-1}$

#### 2.5.3.2 HPLC Capilar

Se evaluó la recuperación de Clo "a" en el sistema de SPME en tubo-CL capilar mediante el análisis de tres muestras de agua de mar contaminadas con esta clorofila a diferentes concentraciones. El procedimiento de extracción de pigmento utilizado fue el 1F- 0,45, con un factor de pre-concentración de 10.



Las concentraciones de la Clo “a” extraídas fueron calculadas a partir de la ecuación de calibración obtenida por inyección directa de 50 $\mu$ L de soluciones patrones de Clo “a” con un 10% de agua añadido a cada solución, en un loop de columna capilar TRB-5 de 50 $\mu$ L.

### **2.6 Análisis de Muestras**

#### **2.6.1 Análisis de Muestras de Agua de Mar**

Fueron analizadas diversas réplicas de las muestras, mediante análisis con el sistema de SPME en tubo-HPLC convencional con bucles de muestra de 25 y 50  $\mu$ L y mediante SPME en tubo- HPLC capilar. Para la obtención de los extractos de las muestras, se utilizaron los procedimientos 1F-0,45 y 3Emp C-18.

#### **2.6.2 Análisis de Muestras de Agua de Reservorio**

Se realizó el análisis de muestras de aguas de reservorio, aplicando el método de extracción 1F 0,45 $\mu$ m y posterior análisis de los extractos de muestra con el sistema SPME en tubo-LC convencional con bucle de muestra de 50  $\mu$ L y por fluorescencia. Se analizaron en total seis réplicas de muestra de agua de reservorio, tres que se contaminan con una concentración conocida de Clo “a” y tres sin contaminar.

#### **2.6.3 Análisis de Muestras de aguas de vertido de planta depuradora.**

Fueron filtrados 100 mL de muestra de agua mediante un filtro de nylon de 0,45 $\mu$ m. Los filtros fueron cortados en tres trozos pequeños y se realiza la extracción de los pigmentos en 1 mL de etanol. Estas muestras fueron analizadas únicamente por el sistema de SPME en tubo-CL capilar con loop de muestra de 50  $\mu$ L.

En estas muestras, se realizó la identificación de Clo "a" y Clo "b" y sus feopigmentos: feofitina "a" y feofitina "b", mediante comparación del tiempo de retención y área de pico obtenido con soluciones patrones de estos analitos. También se comparó el espectro de absorción molecular de los componentes de estas muestras con los obtenidos con soluciones estándares de estos analitos. Las soluciones patrones de la feofitina "a" y la feofitina "b" fueron obtenidas por acidificación de 5 mL de soluciones patrones de Clo "a" y Clo "b" de 1ppm con 0,15 mL de HCL 0,1 M, se alcanza una concentración de 0,003 M en HCl. Para la medición de las feofitinas en las muestras se realiza el mismo procedimiento de acidificación anterior.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **3.1 Optimización de los Procedimientos de pre-concentración en línea, acoplado al Sistema de HPLC convencional**

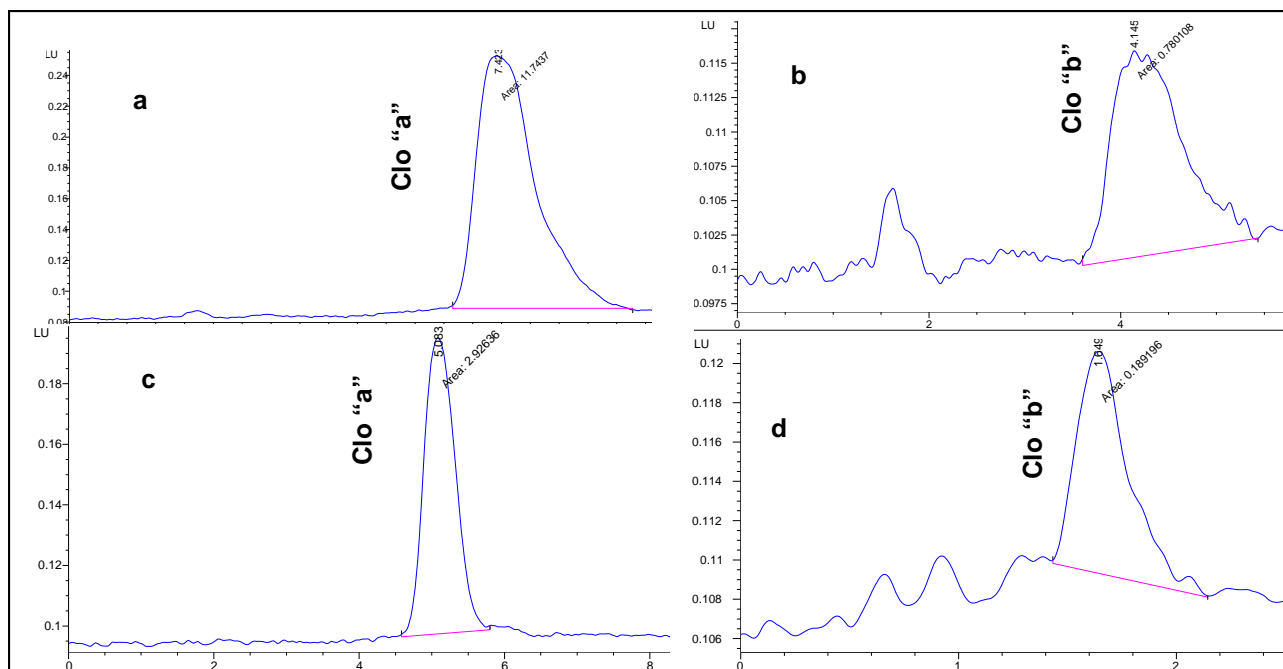
##### **3.1.1 SPME en tubo con columna abierta-HPLC convencional**

Para evaluar los efectos del tamaños de loop de muestra y el volumen de muestra procesado en el sistema de SPME en tubo, fueron registrados los cromatogramas de las soluciones patrones de clorofilas "a" y "b" de 1ppm, ver figura 3.20 , luego que se llevó a cabo la SPME sobre la fase estacionaria PDMS de una columna de extracción. Durante esta etapa de pre-concentración se utilizaron las condiciones experimentales indicadas en la tabla 3.23 de la sección experimental 2.1.2.

Para la obtención de los cromatogramas de las figuras 3.20 a y 3.20 b se utilizó un loop de muestra de 100  $\mu$ L mientras que para las figuras 3.20 c y 3.20 d el tamaño del loop de muestra fue de 25  $\mu$ L.

Se observó en los cromatogramas de la figura 3.20, que la Clo “b” eluye más rápidamente que la Clo “a”, esto se debe a que la Clo “b” es más polar que la Clo “a”. También se evidencia que la Clo “a” presenta una mayor sensibilidad que la Clo “b”, según los valores de áreas obtenidos para cada analito. Estos resultados están acorde con lo reportado en la literatura, todos los métodos de HPLC muestran en su separación cromatográfica que la Clo “b” eluye más rápidamente que la Clo “a”<sup>1</sup>. Por otro lado, la Clo “a” presenta un coeficiente de extinción molar( $\epsilon$ ) de  $78,75 \times 10^3$  M (a 662,7 nm en acetona al 100%), mientras que la Clo “b” tiene un valor de  $46,61 \times 10^3$  M (a 646,8 nm en acetona al 90%), lo cual explica que la Clo “a”, presente una mayor sensibilidad en la detección por fluorescencia que la Clo “b”<sup>2</sup>.

En la tabla 3.26, se presentan los resultados obtenidos en la estimación de los parámetros cromatográficos de área de pico, tiempo de retención (Tr), factor de capacidad (k), número de platos (N), altura de plato (h) en los cromatogramas de soluciones patrones de la Clo “a” y la Clo “b” de 1 ppm de la figura 3.20 . Estos parámetros permitieron escoger las condiciones óptimas respecto al volumen de muestra procesado y el tamaño del loop de columna para la mejor eficiencia de la SPME con columna abierta.



**Figura 3.20. Sección de Cromatogramas obtenidos en SPME en tubo –HPLC convencional.**

Cromatogramas registrados con el bucle de muestra de 100  $\mu$ L: a) Solución de Clo “a” de 1ppm y b) Solución de Clo “b” de 1ppm utilizando un volumen de inyección de muestra de 100  $\mu$ L. Cromatogramas registrados con el bucle de muestra de 25  $\mu$ L: c) 500 $\mu$ L de Solución de Clo “a” de 1ppm d) 500 $\mu$ L de Solución de Clo “b” de 1ppm .

**Tabla 3.26** Parámetros cromatográficos estimados en los cromatogramas de las figuras 1 y 2 obtenidos de la SPME en columna capilar TRB-5 modificando las variables del tamaño del bucle y volumen de muestra procesado.

Tamaño del Loop TRB-5 y volumen de muestra ( $\mu\text{L}$ )	Analito	Área (u.a)	Tr (min.)	Factor de retención K	Número de Platos (N)	Altura de Plato H
Loop de 100 $\mu\text{L}$ <sup>a</sup>	Clo “a”	11,74	7,43	18	616	0,020
Vol. = 100 $\mu\text{L}$	Clo “b”	0,78	4,14	16	368	0,034
Loop de 25 $\mu\text{L}$ <sup>b</sup>	Clo “a”	2,93	5,08	12	1660	0,0030
Vol = 500 $\mu\text{L}$	Clo “b” <sup>b</sup>	0,19	1,64	4	560	0,0089
Loop de 50 $\mu\text{L}$ <sup>a</sup>	Clo “a”	4,92	2,45	2	422	0,012
Vol: 50 $\mu\text{L}$	Clo “b”	0,52	1,45	2	164	0,031
<b>Loop de 50 <math>\mu\text{L}</math><sup>a</sup></b>	<b>Clo “a”</b>	<b>5,89</b>	<b>1,88</b>	<b>2</b>	<b>249</b>	<b>0.020</b>
<b>Vol = 125 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Clo “b”</b>	<b>0,69</b>	<b>1,65</b>	<b>1</b>	<b>150</b>	<b>0.033</b>
Loop de 50 $\mu\text{L}$ <sup>a</sup>	Clo “a”	5,16	2,55	6.09	370	0.014
Vol: 250 $\mu\text{L}$	Clo “b”	0,69	1,63	1	160	0.031

<sup>a</sup> Columna Analítica Lichosphere RP-8 (12,5 cm  $\times$  4 mm i.d., diámetro de partícula 5  $\mu\text{m}$ )

<sup>b</sup> Columna Analítica Génesis C18 (5cm  $\times$  4.6 mm i.d., diámetro de partícula 4  $\mu\text{m}$ )

Se escoge la columna analítica b, para la separación de los analitos en todos los casos, excepto para el loop de 100  $\mu\text{L}$ .

Se observó que la sensibilidad en la detección de las clorofilas “a” y “b” se incrementa a medida que aumenta el tamaño del bucle de muestra. El máximo valor de área registrado se obtiene para el bucle de 100  $\mu\text{L}$ , mientras que la menor sensibilidad en la detección de los analitos se obtiene para un tamaño de bucle de 25  $\mu\text{L}$ . Por otro lado, se observó en el bucle de 50  $\mu\text{L}$  que el aumento en el volumen de muestra procesado produce un incremento en el área de pico. Esto coincide con lo reportado en la literatura<sup>3,4</sup>, que indica que la SPME en tubo presenta mayor eficiencia cuando hay un aumento en el volumen interno de la columna capilar de CG y en el volumen de muestra procesado.

Con respecto a los parámetros cromatográficos de la tabla 3.26, se observa que se alcanzó la mejor eficacia cromatográfica con el bucle de 25  $\mu\text{L}$ , ya que se obtiene el mayor número de platos teóricos (N) y la menor altura equivalente de platos (H), no obstante este sistema es el menos sensible (ver área). Para el bucle de 100  $\mu\text{L}$  se obtiene la máxima sensibilidad pero los picos obtenidos ( ver figura 3.20 a y 3.20 b) son asimétricos y además se obtienen valores del factor de retención, K, que están por encima del rango óptimo de trabajo, con lo cual se obtienen tiempos de retención muy altos.

Para un tamaño de bucle de 50  $\mu\text{L}$  y volumen de inyección de muestra de 125  $\mu\text{L}$ , se alcanzan los valores óptimos de los parámetros cromatográficos: el factor de capacidad esta dentro del rango óptimo, entre 1 y 5, alcanzándose así los mejores tiempos de retención para los analitos. Se alcanza la máxima sensibilidad según los valores de áreas registrados y el número de platos teóricos y la altura equivalente de platos es comparable al resto de los demás sistemas. Según estos resultados, un tamaño del loop 50  $\mu\text{L}$  y volumen de muestra 125  $\mu\text{L}$  representan las condiciones óptimas para llevar a cabo la SPME en tubo con columna capilar en este sistema de HPLC convencional.

#### 3.1.2 SPE en línea- HPLC convencional

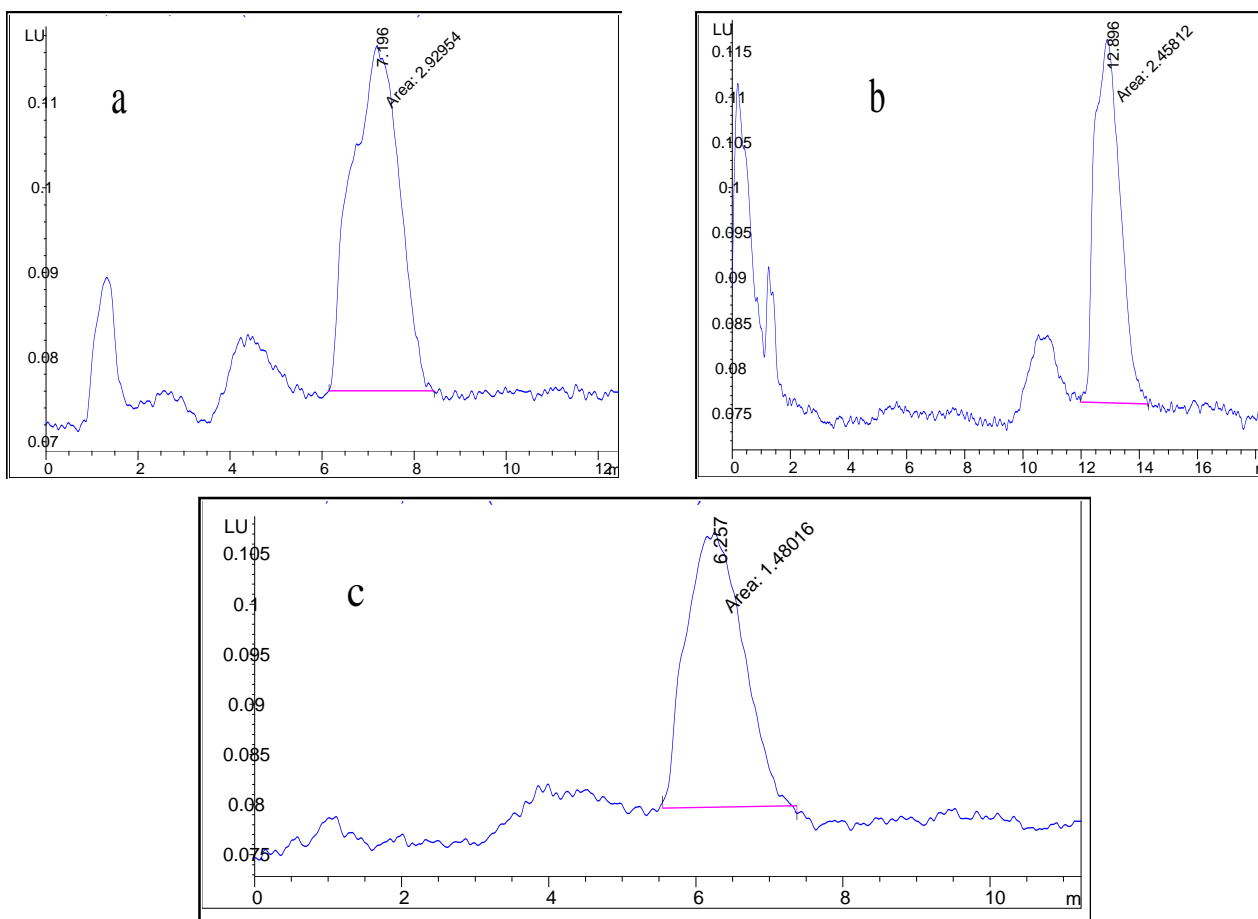
En la figura 3.21, se presentan los cromatogramas de una solución patrón de Clo “a” de 50 ppb disuelta en etanol, obtenidos mediante el procedimiento de SPE en línea de las clorofilas “a” y “b” sobre una columna empacada, mediante diferentes modalidades de inyección de muestra, bajos las condiciones experimentales indicadas en la tabla 3.24 de la sección experimental 2.1.3. En la figura 3.21 a, se utilizó un bucle de 400  $\mu\text{L}$  y se realizó el llenado parcial del mismo con un volumen de inyección de 400  $\mu\text{L}$ .

En la figura 3.21b, se utilizó un bucle de 200  $\mu\text{L}$  y la inyección de la muestra se realizó inyectando 200  $\mu\text{L}$  dos veces, por último en la figura 3.21c, se utilizó un bucle de 200  $\mu\text{L}$  y se realiza una inyección de 200  $\mu\text{L}$ . Bandas anchas con una pobre resolución se observan en la figura 3.21 a. Se obtienen picos más simétricos, cuando se disminuye el tamaño del bucle a 200  $\mu\text{L}$  y se inyecta dos veces un mismo volumen de solución de 200  $\mu\text{L}$ , ver figura 3.21b. En la figura 3.21c, se observa una buena resolución en la banda cromatográfica con una sensibilidad relativamente inferior a la que se obtiene en los otros cromatogramas.

En la tabla 3.27 se muestran los valores de áreas registrados para los cromatogramas de la figura 3.21. Para efectos de comparación, también se indican los valores de áreas obtenidos por SPME en tubo con columna capilar modificando el tamaño de bucle. Se observa que para el sistema de SPE en línea la sensibilidad alcanzada en este sistema es prácticamente independiente del tamaño del bucle y del volumen de inyección de muestra. No obstante, se considera como condiciones óptimas para llevar a cabo la SPE en línea un tamaño de bucle de 200  $\mu\text{L}$  y volumen de inyección de 200  $\mu\text{L}$  ya que se obtiene una mayor simetría en la banda cromatográficas, se gasta menos volumen de muestra y desde el punto de vista experimental es más sencillo y estable un bucle de tamaño pequeño sin que se afecte la sensibilidad del sistema.

**Tabla 3.27** Optimización del tamaño de bucle y volumen de inyección, para una solución de Clo “a” de 50 ppb, analizada por un sistema de HPLC de pre-columna-columna analítica.

Tipo de bucle	Tamaño del loop ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de Inyección( $\mu\text{L}$ )	Tiempo retención (min.)	Área (u.a.)
Columna de extracción	25	25	2.16	0.18
	50	125	1.95	0.41
Sistema de SPE en línea-HPLC convencional.	400	400	7.19	2.93
	200	200 (dos veces)	12.89	2.46
	200	200	6.26	1.60



**Figura 3.21 Optimización del tamaño del bucle en el sistema SPE en línea-HPLCconvencional. Los cromatogramas se obtienen realizando una inyección de una solución de Clorofila “a” de 50 ppb en etanol . a) Inyección de 400µL en bucle de sílice de 400 µL. b) Inyección de 200 µL dos veces en bucle de sílice de 200 µL. c) Inyección de 200 µL en bucle de sílice de 200 µL.**

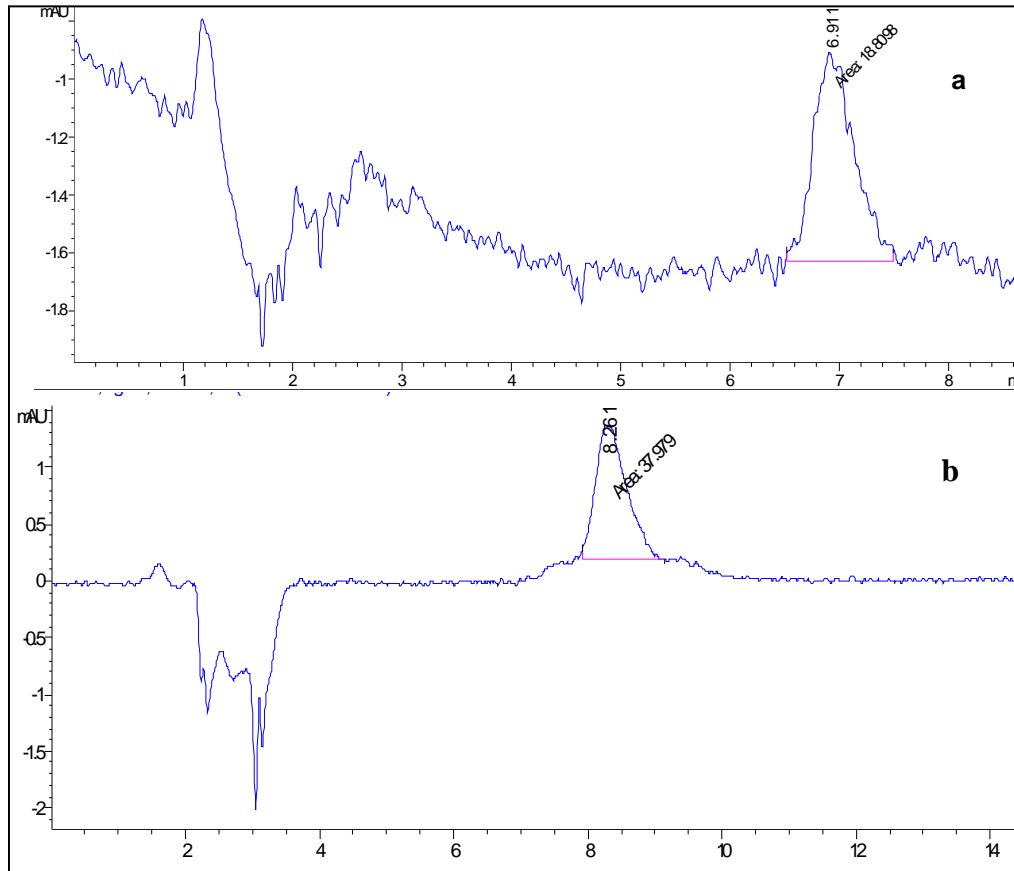


La sensibilidad alcanzada en la detección de la Clo “a” mediante el sistema de SPE en línea sobre columna empacada, es de cuatro a nueve veces mayor a la obtenida con el sistema de SPME en tubo según los valores de áreas obtenidos. Esto se debe a que en la columna empacada el volumen de la fase estacionaria, donde se lleva a cabo la SPE es superior al de la fase PDMS de la columna capilar aumentando así la pre-concentración de los analitos y por tanto la sensibilidad del sistema.

#### 3.1.3 Optimización del sistema SPME en tubo - HPLC capilar

En la figura 3.22, se representa una sección de cromatogramas de una solución estándar de clorofila “a” de 100ppb en etanol, utilizando bucles de muestra de 25  $\mu$ L para el sistema de SPME en tubo-CL capilar. Las condiciones experimentales utilizadas son las indicadas en la tabla 3.30 de la sección experimental 2.2.1.

En el cromatograma 3.22 a, se hacen pasar 25  $\mu$ L de una solución de Clo “a” de 100 ppb en etanol a través del loop de muestra, luego éste se vacía con aire, así los analitos quedan retenidos en la fase estacionaria de PDMS del loop de muestra y las especies no retenidas pasan a desecho. Después se lava el loop de muestra con 25  $\mu$ L agua y finalmente los analitos retenidos en el loop de inyección se desorben con 20 $\mu$ L de etanol y se transfieren hacia la columna analítica. Mediante este procedimiento de inyección se alcanza una disminución en el ancho de banda obtenido, ya que únicamente eluyen los analitos que quedan retenidos sobre la fase de PDMS de la columna capilar. En la figura 3.22 b, se registra el cromatograma de una solución de Clo”a” de 90 ppb, en cuya composición tiene un 10% de agua como solvente, se utiliza el mismo procedimiento para la SPME que el cromatograma 9b. Se observa que el pico cromatográfico registrado es de mayor área comparado con el cromatogramas 3.22a, además de observarse una señal con menor contribución de ruido.



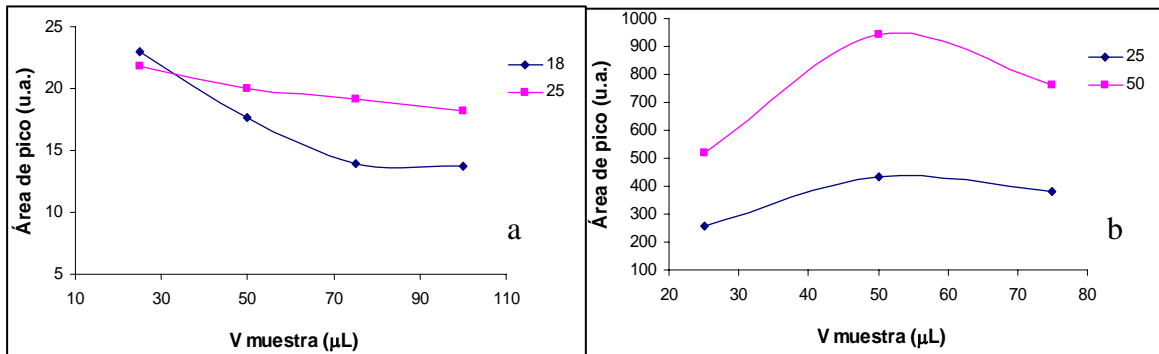
**Figura 3.22 Sección de Cromatogramas, para evaluar la inyección del analito, Clo “a”, en el sistema de SPME en tubo-CL.** a) 25  $\mu$ L de Solución de Clo “a” de 100ppb en etanol, vaciado de bucle con aire, se hacen pasar 20  $\mu$ L de agua y 25  $\mu$ L de etanol b) 25  $\mu$ L de Solución de Clo “a” de 90 ppb en etanol con un porcentaje de agua del 10%, vaciado de bucle con aire, 20  $\mu$ L de agua y 10  $\mu$ L de etanol (bucle de 25  $\mu$ L).

Según los resultados anteriores, se observa que el mejor procedimiento para la inyección de muestra es el que utiliza el vaciado del loop con aire, en conjunto con la dilución de la muestra con agua previo a inyección. En este procedimiento de inyección el analito posee mayor interacción con la fase estacionaria PDMS de la columna capilar y por tanto es más fuertemente retenida. Esto se debe se aumenta la polaridad del medio de disolución de la clorofila.

En investigaciones realizadas por Wright y colaboradores<sup>5</sup>, se ha evaluado la influencia de la dilución de la muestra con agua previo a la inyección en métodos cromatográficos para la separación de pigmentos del fitoplancton marino. Ellos encontraron que la dilución con agua mejora la forma de pico de los componentes más polares, pero reduce el área de los otros picos si el volumen de inyección se mantiene constante. En este estudio la dilución con agua en soluciones patrones de Clo “a” en etanol incrementa la sensibilidad en su detección y muestra un efecto positivo sobre la forma de los picos. El proceso de SPME realizada previo a la separación cromatográfica permite compensar las pérdidas de sensibilidad que se obtienen cuando se realiza la detección directa de los pigmentos. El efecto que ejerce en extractos de la muestra, se mostrará en las secciones posteriores.

En la figura 3.23 se representa el efecto de las variables del tamaño del loop y del volumen de muestra procesado sobre el sistema de SPME en tubo con columna capilar acoplado a HPLC capilar. En las figuras 3.23a y 3.23b se representa el efecto del volumen de muestra procesado sobre el área de pico, utilizando diferentes tamaños de bucle de inyección (18, 25 y 50  $\mu\text{L}$ ). Se utilizó el procedimiento de vaciado de loop en todos los casos, para la figura 3.23b se añade un 25% de agua en la disolución de Clo “a” a inyectar.

Se observa en la figura 3.23 a, que a medida que aumenta el volumen de muestra procesado de una solución de Clo “a” de 100ppb en etanol, sobre un loop de inyección de 18  $\mu\text{L}$ , el área de pico disminuye hasta que alcanza un valor constante para un volumen de muestra de 100  $\mu\text{L}$ . Cuando se aumenta el tamaño de bucle a 25 $\mu\text{L}$  se observa que el área de pico es prácticamente independiente del volumen de muestra procesada. La tendencia observada en la figura 3.23 a indica se alcanza un aumento en el factor de pre-concentración del analito aun cuando se incremente el volumen de muestra procesado y el tamaño del loop de muestra.



**Figura 3.23 Optimización del volumen de muestra y del tamaño de bucle.** a) Solución de Clo "a" de 100 ppb en etanol, con tamaño de bucle de 18 y 25 µL. b) Solución de Clo "a" de 750 ppb, con 25% de agua añadido, con tamaño de bucle de 25 y 50 µL.

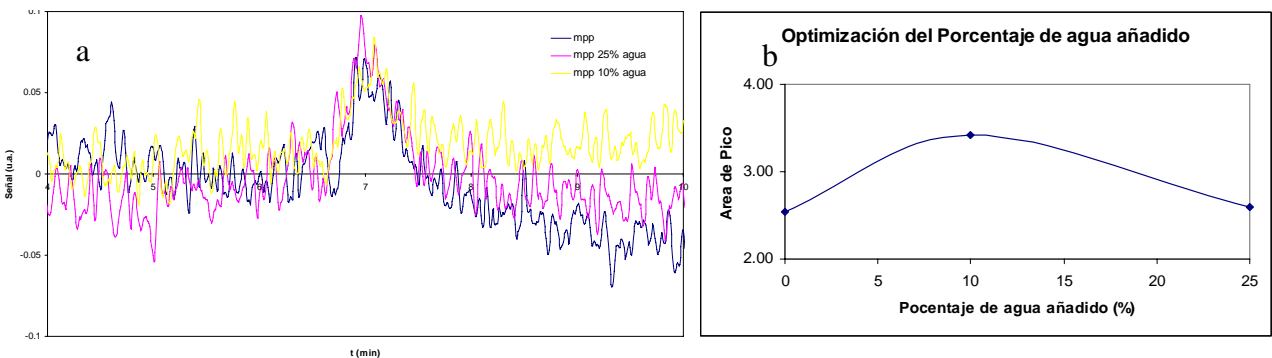
En la figura 3.23 b, se presenta los resultados cuando se inyecta una solución de 750 ppb de Clo "a" con un 25% de agua añadido previo a inyección. Se observa que tanto en el bucle de 25µL como el de 50µL hay un incremento en el área de pico cuando el volumen de muestra procesado aumenta de 25 a 50 µL, disminuyendo el valor de área cuando el volumen de muestra es de 75 µL. Se obtiene la máxima sensibilidad en el área de pico obtenida, para un tamaño de bucle de 50 µL y un volumen de muestra procesado de 50µL. La adición de agua en la disolución de analito a inyectar, mejora notablemente la sensibilidad del análisis.

### 3.1.3.1 Optimización del Sistema de SPME en tubo – HPLC Capilar en el análisis de muestras.

En la optimización del sistema de sistema de SPME en tubo-HPLC capilar, también fueron evaluadas las mejores condiciones experimentales que permitiesen una separación cromatográfica eficiente de la Clo "a" y la Clo "b" en las muestras reales.

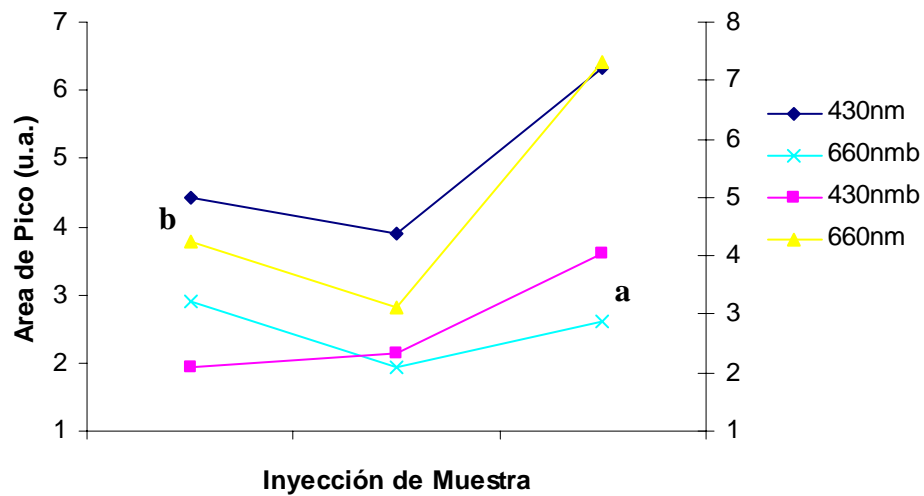
Se realizó la extracción de los pigmentos en las muestras, mediante el procedimiento 1F- 0,45, utilizando un factor de pre-concentración de 10:1. Inicialmente se estudió el efecto que produce añadir diferentes porcentajes de agua en los extractos de las muestras antes de su inyección al sistema cromatográfico. Los extractos de muestra fueron procesados mediante el procedimiento de vaciado del bucle.

En la figura 3.24a, se presentan los cromatogramas correspondientes a la adición de 0 , 10 y 25 % de agua en los extractos de muestras analizadas. Se observa que la sensibilidad para la detección de la Clo “a” se ve poco afectada por la adición de agua a la muestra a inyectar. No obstante, en la figura 3.24 b, se observa que hay un ligero aumento en el área de pico registrada cuando el porcentaje de agua añadido es de un 10% en el extracto de muestra analizado. Esto confirma que el aumento en la polaridad del solvente de la muestra inyectada favorece la SPME en tubo.



**Figura 3.24 Optimización del porcentaje de agua, añadido en los extractos de muestra.** a) Cromatogramas obtenidos para los extractos de muestras analizadas. b) Efecto del Porcentaje de agua añadido en los extractos de muestras sobre el área de pico registrada.

Posteriormente se evaluó la influencia del procedimiento de inyección de muestra sobre el área de pico. Múltiples réplicas de las muestras reales, fueron analizadas mediante los procedimientos de inyección de (uno) vaciado del bucle e inyección posterior de los analitos y (dos) inyección directa. En ambos procedimientos los extractos de muestra fueron inyectados añadiendo un 10% de agua. En la figura 3.25, se observa el efecto del procedimiento de inyección sobre la sensibilidad del sistema cuando se realiza la detección de la Clo “a”. Se observa, que para la inyección directa de la muestra (ver figura 3.25 a), se obtiene menos sensibilidad que para la inyección con vaciado de bucle (figura 3.25 b). No obstante, el procedimiento de inyección directa resultó ser más reproducible que el de vaciado de bucle.



**Figura 3.25 Optimización del procedimiento de inyección de muestra, sobre la sensibilidad alcanzada en la detección de Clo “a” en muestras reales (factor de preconcentración: (10:1)). a)** Inyección directa de 50  $\mu$ L de muestra con un 10% de agua añadida. **b)** Inyección de 50  $\mu$ L de muestra, vaciado del loop con aire, inyección con jeringa de 20 $\mu$ L de agua, 10  $\mu$ L de etanol e inyección directa a la columna analítica.

Ya que no hay diferencias estadísticamente significativas en el área de pico registrada por ambos procedimientos de inyección, ver tabla 3.28, se escoge el de inyección directa. Este último procedimiento de inyección es más rápido y ya que hay menos etapas involucradas, resulta ser más reproducible.

**Tabla 3.28** Comparación de la sensibilidad, alcanzada por el sistema cromatográfico, mediante inyección directa y de vaciado de loop.

Procedimiento de Inyección	430nm		660nm	
	Media	S <sup>2</sup>	Media	S <sup>2</sup>
A(inyección directa)	2,83	1,14	2,48	0,23
B (vaciado del loop)	4,89	1,64	4,89	4,72
F calculado	<b>1,44</b>		<b>20,21</b>	
T calculado	<b>2,14</b>		<b>1,88</b>	
Valores críticos (dos colas). $\nu$ (grados de libertad) $n=3$ .	F crítico=39 $\nu=2$ $p= 0.05$		t crítico= 2,78 $\nu=4$ $p= 0.05$	
<b>Conclusión</b>	Se acepta la hipótesis nula (Ho), ya que $F_{cal} < F_{crítica}$ y $t_{cal} < t_{crítico}$ . Por tanto no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las áreas de pico, registras por ambos procedimientos de inyección.			

De los resultados anteriores, se desprende que las condiciones óptimas para el sistema de SPME en tubo-HPLC capilar son las siguientes: a) inyección directa de la muestra con un 10% de agua añadido previo a inyección, b) tamaño de bucle y volumen de muestra de 50 $\mu$ L, c) detección del analito a las longitudes de onda de absorción de 430 y 660 nm para la Clo "a" y 460 nm para la Clo "b".

### **3.2 Aplicación de los sistemas de pre-concentración en línea de los pigmentos sobre los extractos de muestra.**

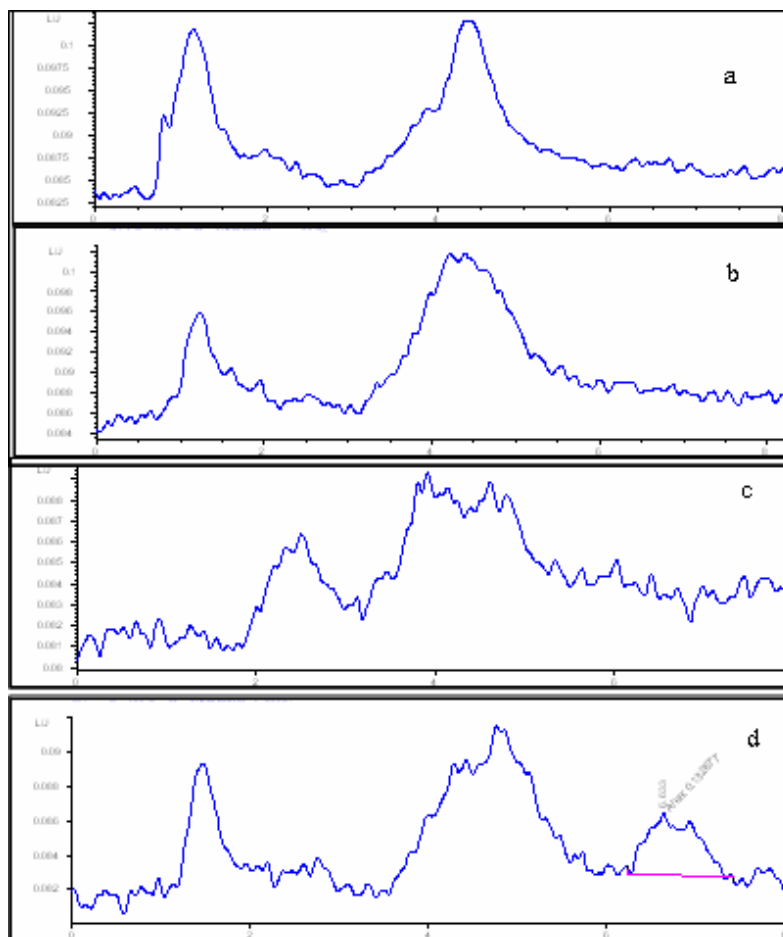
Fueron evaluados los sistemas de SPME en tubo y SPE en línea acoplados a HPLC convencional , con las condiciones experimentales óptimas obtenidas en la sección anterior, en la determinación de Clo “a” y Clo “b” en extractos de pigmentos provenientes de los métodos 1F-0,45 , SPE C-18 y Emp C-18.

#### **3.2.1 Sistema SPE en línea**

En las figuras 3.26 a y 3.26 b, se presentan los cromatogramas obtenidos después que se lleva a cabo la SPE en línea sobre extractos de muestras provenientes de los métodos de extracción SPE 2C-18 y 1F-0,45 respectivamente. Los cromatogramas de las figuras 3.26 c y 3.26 d corresponden a una solución patrón de Clo “a” de 5 ppb y del blanco respectivamente.

En el cromatograma de la figura 3.26c se indica el pico cromatográfico correspondiente a la Clo “a”, el cual eluye a un tiempo de retención de 6,63 minutos. Para los cromatogramas de los extractos de muestras tanto por SPE como por filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ , ver figura 3.26 a y 3.26 b, no se observa ningún pico cromatográfico a este tiempo de retención, esto indica que este sistema de SPE en línea no es lo suficientemente sensible para la determinación de la Clo “a” en las muestras .





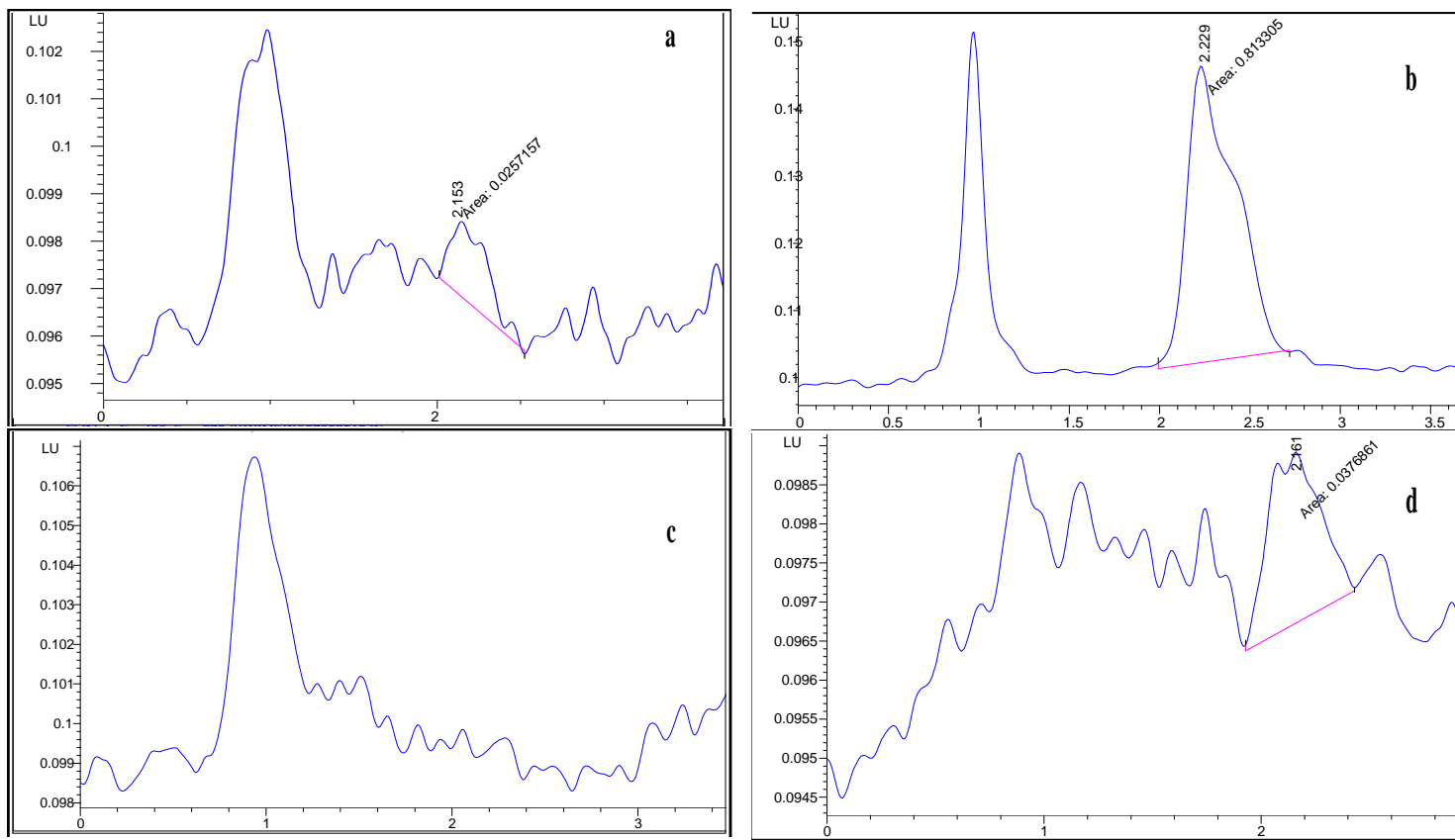
**Figura 3.26. Cromatogramas de Extractos de Muestra, obtenidos con el sistema de SPE en línea, con bucle de 200  $\mu$ L.** a) Extracto de Muestra con SPE C-18 (10:1). b) Extracto de muestra, con 1F-0.45 (10:1) c) Cromatograma de etanol, d) Cromatograma de Solución patrón de Clo “a” de 5 ppb.

### 3.2.2 Sistema SPME en tubo - HPLC Convencional

En la figura 3.27 se presentan los cromatogramas de los extractos de muestras obtenidos después que se lleva a cabo la SPME en tubo. La figura 3.27 a y figura 3.27 b, corresponde a los cromatogramas de extractos de muestra obtenidos mediante el procedimiento de extracción 1F-0,45. En la figura 3.27 b el extracto proviene de una muestra contaminada con 30 ppb de Clo “a”.

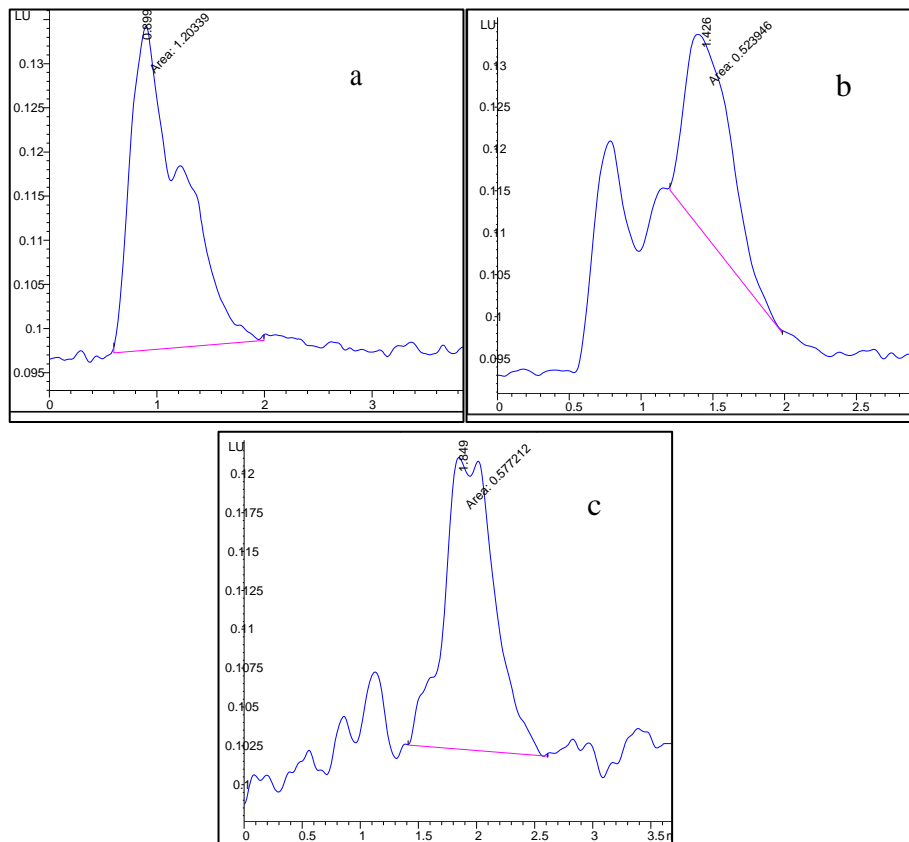
En la figura 3.27 c, el cromatograma corresponde a un extracto de muestra obtenido del procedimiento de extracción SPE C-18 con una preconcentración de quince veces. En la figura 3.27 d, se muestra el cromatograma de la solución patrón de clo “a” de 5 ppb en etanol. Se observa que hay coincidencia en los tiempos de retención, 2,15 min, obtenidos en los picos observados en los cromatogramas de los extractos de muestra (ver figuras 3.27 a y 3.27 b) y el pico de la Clo “a” en el cromatograma de la solución patrón de este analito (ver figura 3.27 d). Esto es indicativo de la detección de la Clo “a” en estos extractos de muestras. La confirmación de la identificación del pico de la Clo “a” en el cromatograma del extracto de muestra, ver figura 3.27 a, se verifica por el aumento en el área del pico registrada para el cromatograma de la figura 3.27 b. El valor de área obtenido para la Clo “a” (0,026 u.a.) en el cromatograma de la figura 3.27 a, se encuentra por debajo del valor de área (0,038 u.a.) del cromatograma de la solución patrón de 5ppb, esto indica que la sensibilidad en la detección de la Clo “a” en el extracto de la muestra de agua de mar es bastante baja. En consecuencia, la cuantificación de este analito en la muestra de agua de mar con el sistema de SPME con columna capilar-CL, esta sujeta a un alto grado de incertidumbre y no hay confiabilidad en la exactitud de los resultados.

La Clo “a” no fue detectada en el extracto de muestra obtenido por el método de extracción 2C-18, ver figura 3.27 c, ya que no se observa ningún pico que eluya en el tiempo de retención al cual eluye este analito. Se obtienen que con el procedimiento de SPE C-18, aún con un factor de pre-concentración de 15 veces no hay una extracción efectiva de la Clo “a”.



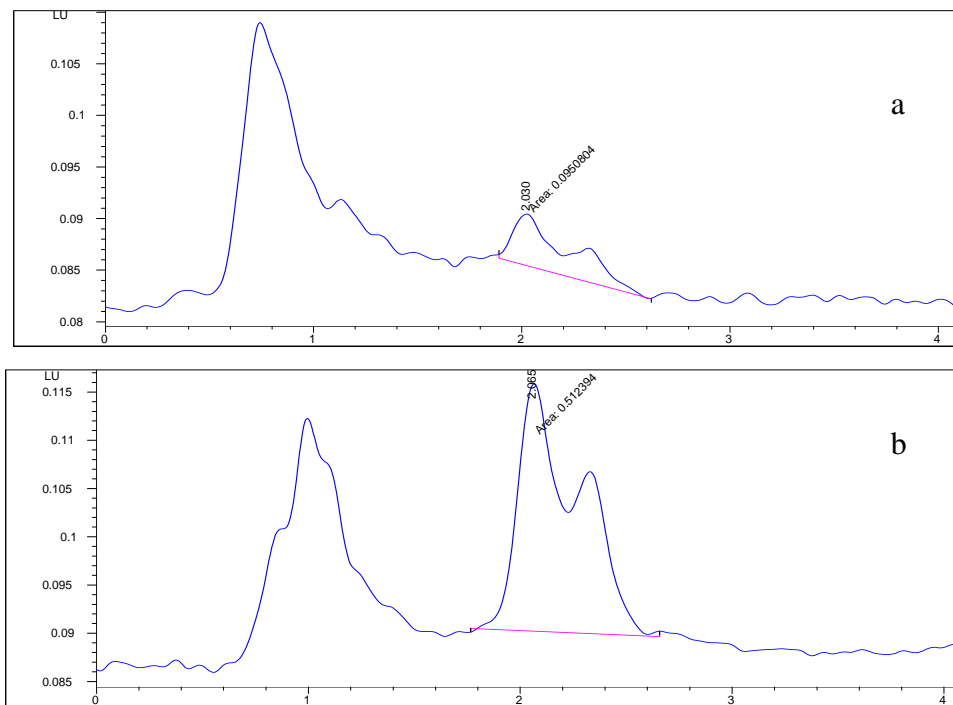
**Figura 3.27. Cromatogramas de Extractos de Muestra de agua de mar, obtenidos con el sistema SPME en tubo- HPLC Convencional.** a) Extracto de Muestra 1F- 0.45 (10:1) b) Extracto de muestra contaminada con 30 ppb de Clo “a”, 1F-0.45 (10:1) c) Extracto de muestra, SPE C-18 (15:1). d) Cromatograma de Solución patrón de Clo “a” de 5 ppb.

También fueron registrados los cromatogramas de los extractos de las muestras para la identificación cualitativa de la Clo “b”, ver figura 3.28. Al comparar el cromatograma de la figura 3.28 a del extracto de muestra con respecto a la figura 3.28c de la solución patrón de Clo “b”, se observa que no hay detección de la Clo “b” en el extracto de muestra. En las figuras 3.28b, que corresponden al cromatogramas del extracto de muestras contaminado con 1 ppm de Clo “b”, se observa el pico correspondiente a este analito, pero solapado lo cual indica la presencia de interferentes en la muestra.



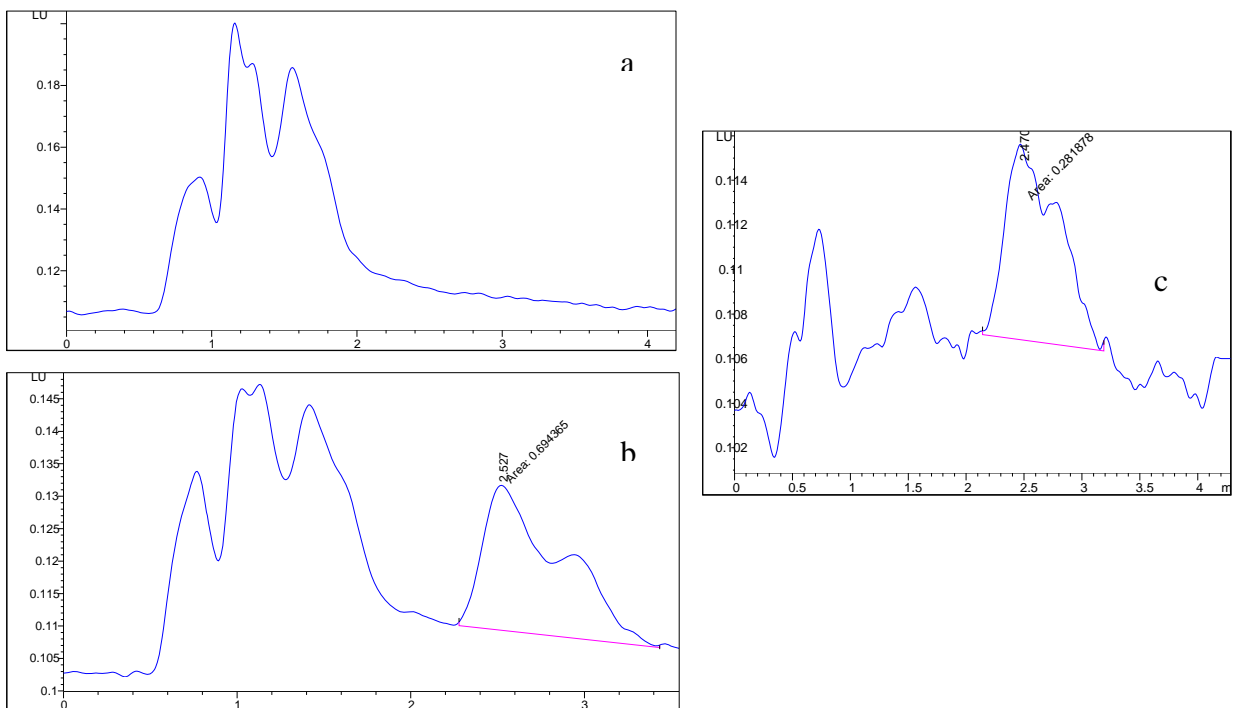
**Figura 3.28. Cromatogramas de Extractos de Muestra de agua de mar, obtenidos con el sistema HPLC, con bucle de 50  $\mu$ L.** a) Extracto de Muestra con SPE C-18 (10:0.25) b) Cromatograma de extracto de muestra, contaminada con 1ppm de Clo “b”, con SPE C-18 (10:0.25). d) Cromatograma de Solución patrón de Clo “b” de 1 ppm.

Finalmente se evaluó la SPME en tubo, en los extractos de muestras provenientes del procedimiento de extracción de los pigmentos 3 Emp C-18. En la figura 3.29, se presenta una sección de los cromatogramas obtenidos. La figura 3.29 a corresponde al cromatograma del extracto de muestra de agua de mar y la figura 3.29 b, corresponde al cromatograma de un extracto de muestra de agua de mar contaminado con 50 ppb de Clo “a”. Se identifico la presencia de la Clo “a” a un  $t_r$  de 2 min en los cromatogramas anteriores. Un incremento en la sensibilidad de la detección de la Clo “a” fue observado en el cromatograma 3.29 a, según el valor de área obtenido: 0,095 u.a., superior al valor de área de 0,026 u.a. obtenido en el cromatograma de la figura 3.28 a, del extracto de muestra de agua de mar analizada por el método 1F-0,45 con .



**Figura 3.29 Sección de Cromatogramas, obtenidos para los extractos de muestras de agua de mar, utilizando el método de extracción Empore C-18 y el sistema SPME en tubo con bucle de 50  $\mu$ L. a) Cromatograma de Extractos de Muestra, (10:0.25) b) Cromatograma de extracto de muestra, contaminada con 50ppb de Clo “a”.**

También fueron registrados los cromatogramas de los extractos de muestras obtenidos desde el procedimiento de extracción con el disco empore C-18 a las condiciones de excitación y emisión de fluorescencia óptimas para la Clo “b”, ver figura 3.30. La figura 3.30 a, corresponde al cromatograma del extracto de muestra y la figura 3.30 b, representa el cromatograma del extracto de muestra contaminada con 1 ppm de Clo “b”. En la figura 3.30 c, se muestra el cromatograma de una solución patrón de 1ppm de Clo “b”. Se observa en la figura 16a que la Clo”b” no es detectable en las muestras de agua de mar, aun utilizando el disco empore C-18 que permitió mejorar la sensibilidad en la detección de la Clo”a”.



**Figura 3.30 Cromatogramas de Extractos de Muestra, obtenidos con el sistema HPLC, con bucle TRB-5 de 50  $\mu$ L con disco empore, c-18 (10:0.25).** a) Cromatograma de Extracto de Muestra b) Cromatograma de extracto de muestra, contaminada con 50ppb de Clo “b” c) Cromatograma de Solución Patrón de 1ppm.

De los resultados obtenidos anteriormente en la detección de la Clo “a” y la Clo “b” en los extractos de muestras mediante la aplicación de los sistemas de pre-concentración en línea acoplados a HPLC Convencional, se observa que sólo es posible detectar la presencia de la Clo “a” en estos extractos cuando se utiliza el sistema de SPME en tubo, ya que en este sistema se produce una interacción química entre la Clo “a” y la fase estacionaria PDMS de la columna capilar de CG que posee afinidad por analitos de baja polaridad. En consecuencia se produce la retención de este pigmento sobre dicha fase. Se registra entonces un aumento en la sensibilidad del análisis, debido a la pre-concentración adicional de los analitos en el bucle de muestra antes de alcanzar la columna analítica. Se desprende además, que el sistema más sensible es el de SPME en tubo con bucle de 50 $\mu$ L y el mejor método de extracción de los pigmentos es el que utiliza el disco de extracción empore C-18, obteniéndose la sensibilidad adecuada para la detección de Clo “a”. Ninguno de los procedimientos utilizados permite la identificación cualitativa de la Clo “b” en las muestras de agua de mar analizadas.

#### **3.3 Influencia de los diferentes procedimientos de Extracción de pigmentos en la recuperación de Clo “a” utilizando SPME en tubo- HPLC Convencional.**

Se evaluó el efecto de los procedimientos de extracción de pigmentos, 1F-0.45, SPE C-18 y empore C-18 sobre la recuperación de Clo “a” en muestras reales. Para ello fueron utilizados diferentes factores de pre-concentración. Las muestras son analizadas por el sistema de SPME en tubo-LC con un bucle de 50  $\mu$ L y volumen de inyección de muestra de 125  $\mu$ L. En la tabla 3.29 se presentan los resultados obtenidos en las cantidades extraídas de Clo “a” respecto a las cantidades añadidas de este analito sobre las muestras.

**Tabla 3.29** Comparación de las concentraciones de Clo “a” obtenidas mediante diferentes procedimientos de extracción de pigmentos en muestras de agua de mar contaminadas con este analito.

Factor de Pre-concentración	Métodos de Extracción de Pigmentos			
	Concentración de Clo “a” añadida ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	SPE c-18	Filtro de Nylon de 50 $\mu\text{m}$	Disco de SPE Empore C-18
		Concentración de Clo “a” Predicha ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
10:0.25	0,48 $\pm$ 0,01	-	-	0,50 $\pm$ 0,01
	1,00 $\pm$ 0,01	-	-	0,60 $\pm$ 0,01
	1,99 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	1,70 $\pm$ -0,01-	
10:0.5	3,85 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01	-	
	0,99 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,01	
	1,99 $\pm$ 0,01	1,45 $\pm$ 0,01	1,72 $\pm$ 0,01	
10:1	1,99 $\pm$ 0,01	2,19 $\pm$ 0,01	1,64 $\pm$ 0,01	
	2,91 $\pm$ 0,01	2,14 $\pm$ 0,01	2,37 $\pm$ 0,01	

Se observa que las cantidades de Clo “a” extraídas en las muestras de agua utilizando el filtro de nylon de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , son independientes del factor de pre-concentración utilizado. Para este sistema, se observó que las concentraciones de Clo “a” extraídas están acordes en magnitud a las concentraciones añadidas de este analito. La eficiencia en la extracción de la Clo “a” utilizando el cartucho C-18 mejora con el incremento en el volumen del solvente de extracción, siendo la mejor relación en volúmenes 10 mL de muestra a 1mL de solvente. No obstante, en este sistema se observa que cuando se incrementa la concentración añadida para el mismo factor de pre-concentración disminuye la capacidad de extracción del analito.

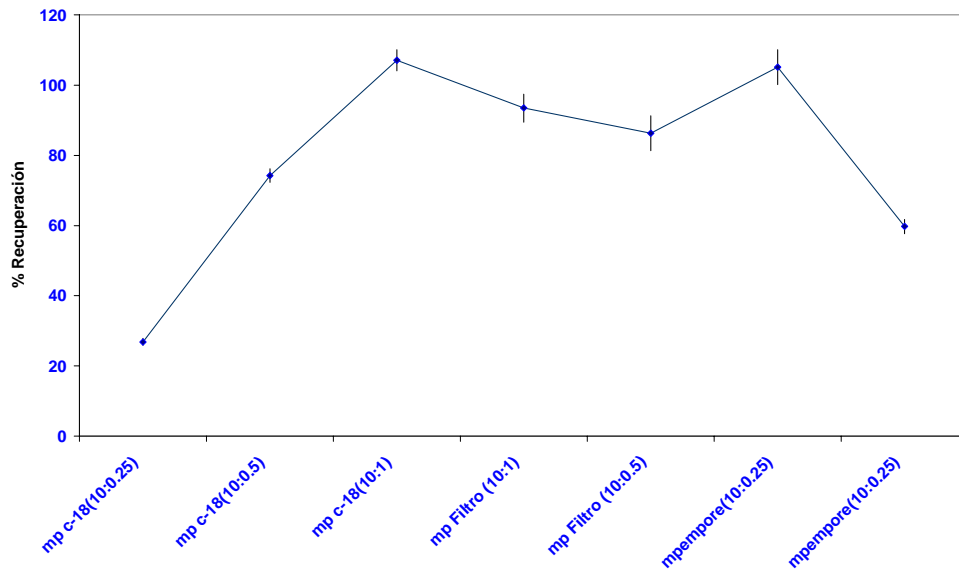


Esta misma tendencia, se observa cuando se utiliza el disco de SPE empore C-18, y sólo se logra la extracción de la Clo “a”, cuando se utiliza el factor de pre-concentración de 10mL muestra: 0,25mL etanol. Estos resultados indican que el mecanismo de extracción de los pigmentos que opera sobre los organismos de fitoplancton retenidos en el cartucho C-18 y el disco Empore C-18 es ineficiente ya que el solvente añadido no es capaz de realizar la extracción de la Clo “a” retenida. Mientras que con el uso del filtro de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  en todos los casos se logra una extracción eficiente de la Clo “a” en etanol.

En nuestro estudio no se aplica ningún procedimiento físico para la extracción de los pigmentos y es probable que esto afecte la extracción con el C-18 y el disco empore C-18, donde no se logra extraer adecuadamente los pigmentos probablemente porque quedan fuertemente retenidos y el paso de solvente a través del sistema no es suficiente para la extracción eficiente de los pigmentos.

El argumento de esta hipótesis se basa en que los tres medios de retención utilizados para el fitoplancton tienen diámetros de poro similares, alrededor de 0,45  $\mu\text{m}$  ya que la biomasa del fitoplancton en aguas superficiales de océanos es dominada por las células del picoplancton (0,2 -2,0 $\mu\text{m}$ ), entonces todos los organismos deberían ser retenidos. No obstante en el cartucho C-18 y el disco empore C-18 las células quedan atrapadas a través de los espacios internos del relleno y sobre la superficie del mismo, es decir actúan como si fuesen filtros de profundidad, donde normalmente suelen aplicarse procedimientos mecánicos para la destrucción del filtro y posterior extracción de los pigmentos<sup>7</sup>. Mientras que el filtro de nylon es una membrana donde los analitos son retenidos en su totalidad en la superficie del mismo y la extracción de los pigmentos en etanol en nuestro estudio, se realizó casi en su totalidad simplemente con la adición de solvente.

En la figura 3.31, se presenta la tendencia en el porcentaje de recuperación de Clo “a” calculado a partir de los datos de la tabla 3.34. Se observa que con el método de método de extracción que utiliza el filtro de nylon se obtiene la máxima recuperación del analito y la mejor reproducibilidad aun cuando varíen las condiciones de extracción. Experimentalmente, se toma como factor de pre-concentración óptimo el de 10:1.



**Figura 3.31** Influencia de diferentes procedimientos de extracción en la recuperación de Clo “a” en muestras de agua de mar, calculados desde una muestra contaminada con 1,99 ppb de Clo “a”.

De los resultados obtenidos en esta sección, se desprende que el método de extracción de pigmentos óptimo en la detección de la Clo “a” en muestras de agua de mar es el 1F-0,45, con una relación de volumen de muestra a volumen de solvente de 10 a 1 mL. Este resultado esta acorde con lo reportado en la literatura<sup>7</sup> donde el uso del filtro de nylon con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  está ampliamente reportado para los procedimientos de extracción de pigmentos fotosintéticos tanto en muestras de aguas marinas como de agua dulce.

Knefelkamp y col<sup>6</sup>, encontraron que un filtro de membrana de nylon de tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  es el que suministra los mejores resultados en la retención de Clo “a” provenientes de muestras de aguas de mar, no obstante en este estudio las etapas de almacenamiento de los filtros y un tratamiento mecánico es utilizado, además del gasto de grandes volúmenes de muestra.

En nuestro procedimiento experimental se alcanzó una extracción eficiente de la Clo “a” mediante un procedimiento simple de filtrado y extracción con el solvente en una muy baja relación de volúmenes (10:1). Se disminuyó el gasto de muestra, tiempo y costo de análisis. La aplicación de la SPME en tubo con columna capilar abierta como método de extracción en línea de la Clo “a” sobre los extractos de muestras permitió incrementar la sensibilidad en la detección de este analito en las muestras reales.

### 3.4 Validación del Método

#### 3.4.1 Linealidad, límites de Detección y Reproducibilidad

Bajos las condiciones óptimas obtenidas para cada sistema de pre-concentración en línea, se evaluó la linealidad del análisis cromatográfico utilizando soluciones estándares de la Clo “a” en etanol. Para el sistema de SPME en tubo acoplada a HPLC capilar, se utilizaron soluciones estándares en etanol de Clo “a” con un porcentaje de agua añadido del 10%. Se realizó el ajuste matemático entre los valores de área obtenidos para cada solución estándar y su concentración.

En la tabla 3.30 se presentan los parámetros analíticos obtenidos, por regresión lineal para la Clo “a para los sistemas utilizados. Para el sistema de SPME en tubo con columna capilar-CL se utilizaron bucles de 25 µL y 50 µL con volúmenes de inyección de 500 µL y 125 µL respectivamente. Para el sistema de SPE en línea con columna empacada el tamaño del bucle y el volumen de inyección fueron de 200 µL.

**Tabla 3.30** Parámetros Estadísticos obtenidos en los sistemas de Extracción en tubo acoplados a CL Convencional y CL Capilar bajo las condiciones experimentales óptimas.

Sistema de Extracción	$b \pm s_b$ (µg-1 L)	$a \pm s_a$	$S_{y/x}$	$R^2$	Lod (µgL <sup>-1</sup> )	Working Range (µgL <sup>-1</sup> )	Precisión RSD (%)	
							Intra (n=3)	Inter (n=6)
SPME 25 µL CL Convencional	0.0032 ± 0.0008	-0.027± 0.015	0.011	0.9957	10	(34 a 100)	10	10
SPME 50 µL CL Convencional	0.0091 ± 0.0002	-0.027± 0.010	0.012	0.9992	4	(14 a 100)	0,5	6
SPE en línea- Loop de Sílice de 200 µL CL Convencional	0.0324± 0.0008	-0.08 ± 0.04	0.061	0.9982	6	(19 a 100)	12	Nd
SPME 50 µL CL capilar (430nm)	3,68 ± 0,09	7 ± 1	0,568	0,9987	0,46	(0,8 a 10)	2	10
SPME 50 µL CL Capilar (660nm)	3,37 ± 0,12	6 ± 1	0,744	0,9973	0,66	(2 a 10)	17	25

Se observa que para el sistema de HPLC capilar el intervalo de concentraciones esta entre 0,8 y 10 ppb un orden de magnitud inferior a lo reportado para los sistemas de SPME en tubo y SPE en línea acoplados a HPLC convencional de 14 a 100 ppb, esto indica la elevada sensibilidad de la HPLC Capilar respecto al de HPLC Convencional. Los LODs reportados en la tabla 3.35 corresponden a los LODs instrumentales alcanzados por cada sistema. Los mejores LODs corresponden al sistema de SPME en tubo - CL Capilar, estos fueron en magnitud de  $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$  para  $\lambda=430\text{nm}$  y  $0,66 \mu\text{g L}^{-1}$  para  $\lambda=660\text{nm}$ . La pre-concentración de los pigmentos mediante la SPME en tubo, debido a la afinidad de los pigmentos por la fase estacionaria de PDMS y la elevada sensibilidad típica de los sistemas de CL capilar permiten suministrar estos bajos LODs.

Para el sistema de SPME en tubo -HPLC convencional, se observa que los LODs obtenidos mejoran al incrementar el tamaño del bucle de este sistema, esto se debe a que a medida que aumenta el tamaño de bucle aumenta el volumen de la fase estacionaria donde se lleva a cabo la SPME. Se obtiene el mejor LOD instrumental,  $4\mu\text{gL}^{-1}$ , con el bucle de columna capilar de  $50 \mu\text{L}$  y el más alto con el bucle de  $25 \mu\text{L}$  de  $10 \mu\text{gL}^{-1}$ . Para el sistema de SPE en línea el uso de grandes volúmenes de muestra y el volumen de la fase empacada permite obtener LODs comparables al sistema de SPME en tubo. Se observa, que el sistema con mejor repetitividad (RSD de 0,5%) y mejor reproducibilidad (RSD de 6%), es el de SPME en tubo-HPLC convencional, con bucle de  $50 \mu\text{L}$ . Este último sistema, se escoge como el mejor de los tres sistemas de extracción acoplados a HPLC convencional, ya que este sistema suministra los LODs más bajos y la mejor precisión. En el caso de la SPME en tubo- HPLC Capilar, se obtiene la mejor repetitividad (RSD de 2 %) y reproducibilidad (RSD de 10%) a la  $\lambda$ :  $430\text{nm}$ .

En todos los sistemas evaluados se obtienen elevados coeficientes de correlación:  $>0.9957$  para los acoplados a HPLC convencional y  $>0.9973$  para los de HPLC Capilar indicando elevada linealidad en todos los sistemas utilizados.

### 3.4.2 Recuperación

#### 3.4.2.1 SPME en tubo- HPLC Convencional

En la tabla 3.31, se indican los valores en concentración de la Clo “a” extraída en muestras reales mediante aplicación del método de extracción 1F 0,45 $\mu$ m y posterior análisis por el sistema de SPME en tubo con columna capilar abierta- HPLC convencional y por fluorescencia. Se observó en todas las muestras que el método de extracción utilizado suministra valores de concentración cercanos a la concentración añadida, tanto por el análisis por HPLC como por el de fluorescencia, aunque suele observarse en esta última técnica que hay sobre-estimación en los valores obtenidos, respecto del valor real.

La figura 3.32, corresponde a la gráfica de correlación de concentración de Clo “a”, determinada por SPME en tubo-CL convencional y mediante análisis por fluorescencia, se observa que existe una elevada correlación entre los métodos con tendencia similar en la determinación de la Clo “a” (factor de correlación de  $R^2$  de 0,9844,  $n=12$ ).

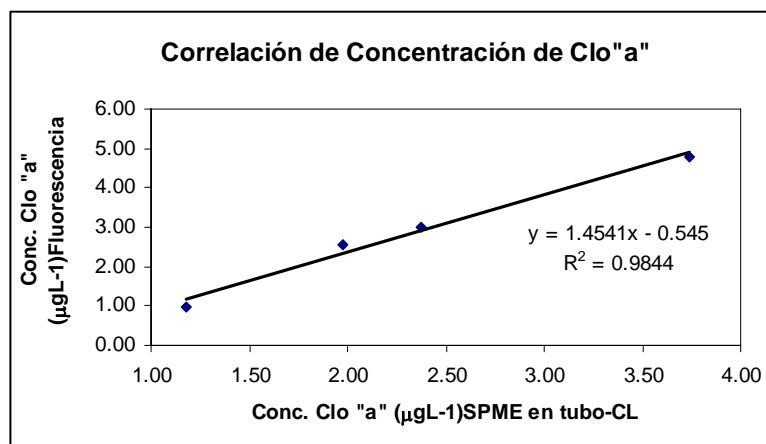
**Tabla 3.31** Concentración de Clo “a” obtenida, en muestras contaminadas, analizadas por SPME en tubo con bucle TRB-5 de 50µL-CL convencional y análisis por Fluorescencia.

Muestra	Concentración de Clo “a” añadida (µg L <sup>-1</sup> )	Concentración Clo “a” predicha		%Recuperación	
		CL* (µg L <sup>-1</sup> )	Fluorescencia	CL	Fluorescencia
1	0,99	1,178± 0,007	0,964± 0,002	119	97
2	1,96	1,973± 0.009	2,69± 0,003	101	131
3	2,91	2,37±0.01	2,98± 0,003	81	102
4	3,84	3,74±0.01	4,78± 0,004	97	122

El número de réplicas analizadas es de tres.

\* CL convencional

Los resultados con mayor exactitud corresponden a los obtenidos por HPLC, ya que el analito se separa del resto de los otros componentes de la muestra que puedan contribuir a la señal analítica total. Mientras que en los resultados obtenidos por el análisis por fluorescencia, no se puede discriminar entre el analito y otras especies interferentes que respondan a las condiciones de excitación y de emisión para la determinación de Clo “a” en la muestra.



**Figura 3.32** Correlación de valores de concentración de Clo “a” (µg L<sup>-1</sup>) determinada por SPME en tubo-CL convencional y Fluorescencia, en muestras de agua de mar. n= 12.

### 3.4.2.2 SPME en tubo- HPLC Capilar

También se evaluó la recuperación de Clo”a” en el sistema de SPME en tubo- HPLC capilar, mediante el análisis de tres muestras de agua de mar contaminadas con este analito a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos en la cuantificación de la Clo “a” en el análisis de las muestras reales, se indican en la tabla 3.32. Se observó que el método utilizado suministra valores de concentración cercanos a la concentración añadida en todas las muestras analizadas. Resultados satisfactorios, fueron obtenidos en los porcentajes de recuperación de la Clo”a”, %Rec. entre 73 y 90% para la  $\lambda_{\text{abs}}$  430nm y entre 61 y 80% a la  $\lambda_{\text{abs}}$  de 660 nm.

**Tabla 3.32** Concentración de Clo “a” obtenida, en muestras de aguas contaminadas, mediante análisis con SPME en tubo (bucle de 50 $\mu$ L) -HPLC capilar. Se aplicó el método de extracción, 1F-0,45.

Muestra	Concentración de Clo “a” añadida ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentración Clo “a” predicha ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por HPLC		%Recuperación	
		430 nm	660 nm	430 nm	660 nm
1	0,9	0,70 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,01	77	66
2	2,7	2,44 $\pm$ 0,03	2,17 $\pm$ 0,02	90	80
3	4,5	3,31 $\pm$ 0,05	2,44 $\pm$ 0,04	73	61

El número de réplicas analizadas es de tres.

## 3.5 Análisis de Muestras

### 3.5.1 Análisis de Muestras de Agua de Mar- SPME en tubo- HPLC Convencional.

Se aplicaron los métodos de extracción 1F-0,45  $\mu\text{m}$  y 3 Emp C-18 para la obtención de los extractos de las muestras, analizados por SPME en tubo -HPLC convencional con bucle de muestra de 25  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$ .



Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.33. Se obtiene que los valores de concentración de Clo “a” en las muestras analizadas, por el método de extracción con filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ , están por debajo de los  $\text{LOD}_{\text{est}}$  reportados, 1 y 4  $\mu\text{g L}^{-1}$  para los sistemas de SPME en tubo con loop de 25 y 50  $\mu\text{L}$  respectivamente. Al igual que con disco de extracción C-18, la concentración de Clo “a” está por debajo del  $\text{LOD}_{\text{est}}$ , 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , esto indica que la SPME en tubo con loop de 50  $\mu\text{L}$  acoplada a HPLC convencional no posee la sensibilidad adecuada para la cuantificación de esta clorofila.

**Tabla 3.33** Concentración de Clo “a” obtenida en muestras de aguas de mar, mediante el sistema SPME en tubo- HPLC convencional.

Analito	Concentración de Clo”a” Determinada. <sup>d</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{Lod}_{\text{est}}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Clo “a”	< $\text{LOD}^{\text{a,b}}$	1 <sup>a</sup>
	< $\text{LOD}^{\text{c}}$	0,4 <sup>b</sup>
		0,1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Análisis de las muestras de agua de mar, utilizando el procedimiento 1F - 0,45, con bucle de 25  $\mu\text{L}$ .

<sup>b</sup> Análisis de las muestras de agua de mar, utilizando el procedimiento 1F - 0,45 con bucle de 50 $\mu\text{L}$ .

<sup>c</sup> Análisis de las muestras de agua de mar, utilizando el procedimiento Emp C-18, con bucle de 50  $\mu\text{L}$

<sup>d</sup> El número de réplicas, utilizados fue de 3.

Se ha reportado<sup>7</sup> que la Clo “a” posee una concentración en aguas superficiales de océanos de 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ , ya que el mejor LOD alcanzado por el sistema de SPME en tubo-CL convencional posee una magnitud de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , ver tabla 3.33, es evidente que no se tiene la sensibilidad adecuada para la cuantificación de este pigmento en las muestras de aguas de mar analizadas las cuales son superficiales.

Con el método desarrollado eventualmente se podrá detectar la presencia de Clo “a” en las muestras que posean una concentración cercano al límite de detección de la misma. En comparación con el LOD reportado para la Clo “a”, 0,1 ng por otros métodos de HPLC isocráticos con detección por fluorescencia<sup>1</sup>, el método de HPLC desarrollado en este trabajo alcanza mejores LODs para la Clo “a” entre 0,02 a 0,05 ng.

#### **3.5.2 Análisis de Muestras de Agua de Reservorio-SPME en tubo CL Convencional**

En la tabla 3.34, se presentan los resultados obtenidos de la determinación de Clo “a” en muestras de reservorio. Se evidencia, que mediante el análisis por fluorescencia, hay una sobre-estimación del 50% en la concentración de Clo “a” de la muestra analizada, ya que se obtiene un valor de concentración dos veces superior en magnitud a la reportada por el sistema de HPLC. Esto se debe a que en esta muestra hay interferencias de la matriz que deben ser compensadas mediante el método de adición de estándar. No obstante, se observa, que las concentraciones de analito, obtenidas en las muestra contaminadas (n=3), están acordes en magnitud, a las concentración de Clo “a” añadida. Esto indica que el método de extracción utilizado mediante análisis cromatográfico de las muestras de agua de reservorio, con el sistema de SPME en tubo permite la extracción eficiente de la Clo “a” con un alto grado de exactitud y precisión.

El sistema de SPME en tubo-CL convencional permite la cuantificación de Clo “a” en muestras de aguas de reservorio, ya que la concentración de Clo “a” en la muestra analizada es del orden de los 28  $\mu\text{g L}^{-1}$ , por encima del límite de cuantificación de este sistema, 1,31  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabla 3.34** Concentraciones de Clo “a” obtenidas en muestras de aguas de reservorio, mediante análisis con SPME en tubo con loop de 50 µL –CL convencional y por fluorescencia.

Muestra	Ecuación	Concentración de Clo “a” añadida (µg L <sup>-1</sup> )	Concentración Clo “a” predicha (µg L <sup>-1</sup> )	
			CL <sup>a</sup>	Fluorescencia <sup>b</sup>
1	$y = 0.0055x - 0.0087^a$	0	28,08 ± 1,04	44,4 ± 0,2
2	$y = 4.9213x + 6.4126^b$	170	140 ± 10	160 ± 30

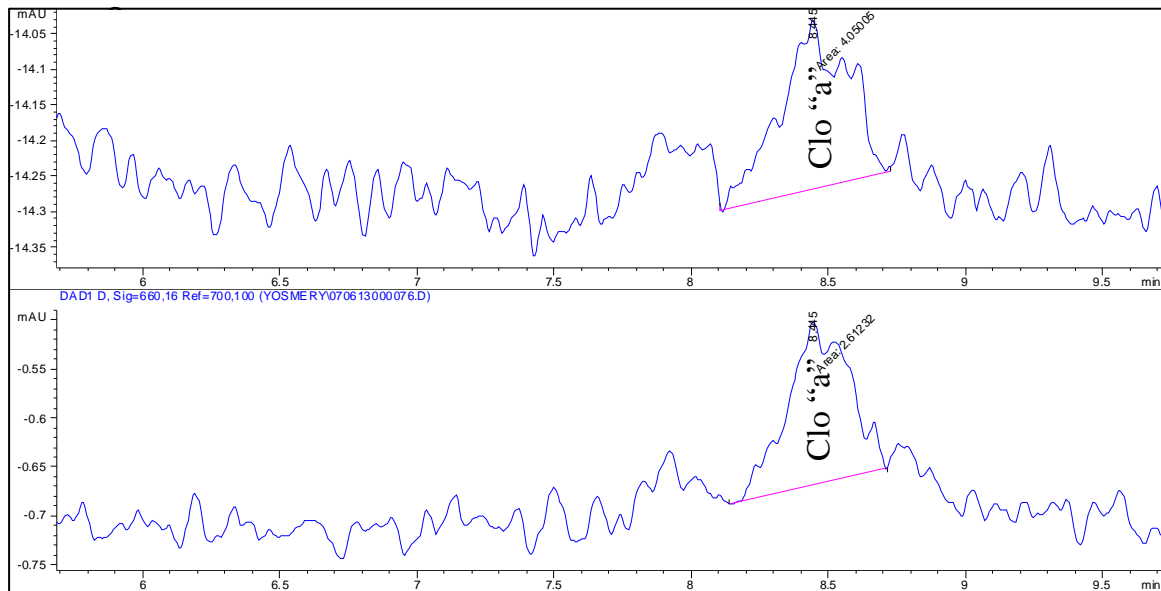
<sup>a</sup> Ecuación correspondiente a la calibración, de soluciones estándares de Clo “a”, utilizando el sistema de SPME en tubo-CL convencional, con loop de columna capilar de CG de volumen interno de 50 µL.

<sup>b</sup> Ecuación correspondiente a la calibración, de soluciones estándares de Clo “a”, por fluorescencia.

### 3.5.3 Análisis de Muestras de Mar- SPME en tubo-HPLC Capilar

Los extractos de las muestras obtenidas mediante el procedimiento 1F-0,45, fueron analizados mediante SPME en tubo-HPLC capilar. En la figura 3.33, se presenta un cromatograma de una réplica de las muestras analizadas. Se observa, un pico cromatográfico a un  $t_r$  de 8 min., que corresponde a la Clo “a”, la detección se realiza a 430 y 660 nm.

La determinación cuantitativa de la Clo “a”, se realizó mediante curva de calibración externa y por adición de estándar. Se obtiene que para estos dos métodos de calibración, no existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 99%, para la concentración de Clo “a” determinada en las muestras de agua de mar por SPME en tubo-CL capilar, lo que indica que no hay efectos de matriz en estas muestras.



**Figura 3.33** Cromatogramas de extractos de muestras de agua de mar, mediante análisis por el sistema de SPME en tubo-HPLC capilar. a) 430nm y b)660nm

La concentración de Clo “a”, hallada fue de  $0,052 \pm 0,017 \mu\text{g L}^{-1}$ , este valor esta acorde con los niveles reportados de este analito, en muestras de aguas de mar superficiales<sup>7</sup> ( $<0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ ). No obstante, ésta determinación es sólo semi-cuantitativa ya que la concentración de Clo “a” determinada se encuentra a niveles muy cercanos del límite de detección  $0,046 \mu\text{g L}^{-1}$ . Si se compara el análisis de muestras de agua de mar mediante SPME en tubo utilizando CL convencional y CL capilar, se observa que el sistema cromatográfico capilar permite alcanzar la sensibilidad adecuada para el análisis de estas muestras aun cuando es necesario mejorar la extracción o pre-concentración de los pigmentos en las muestras de agua de mar para lograr una cuantificación real de los mismos.

### 3.5.4 Análisis de Muestras de Aguas de Vertido de Depuradora - SPME en tubo-HPLC Capilar

El método propuesto para el sistema de SPME en tubo-HPLC capilar también se aplicó sobre una muestra de agua proveniente de de una planta de tratamiento de aguas. En la figura 3.34, se presenta el cromatograma del extracto de muestra obtenido por el procedimiento 1F-0,45 de una de las réplicas analizadas. Se observa en éste, una elevada cantidad de picos cromatográficos, que deben corresponder a todos los compuestos provenientes de la muestra analizada extraídos en etanol y que presentan absorbancia a las longitudes de onda utilizadas en la detección: 430, 460 y 660nm. Es evidente, que la matriz de esta muestra es compleja, comparada con los otros tipos de muestras analizadas.

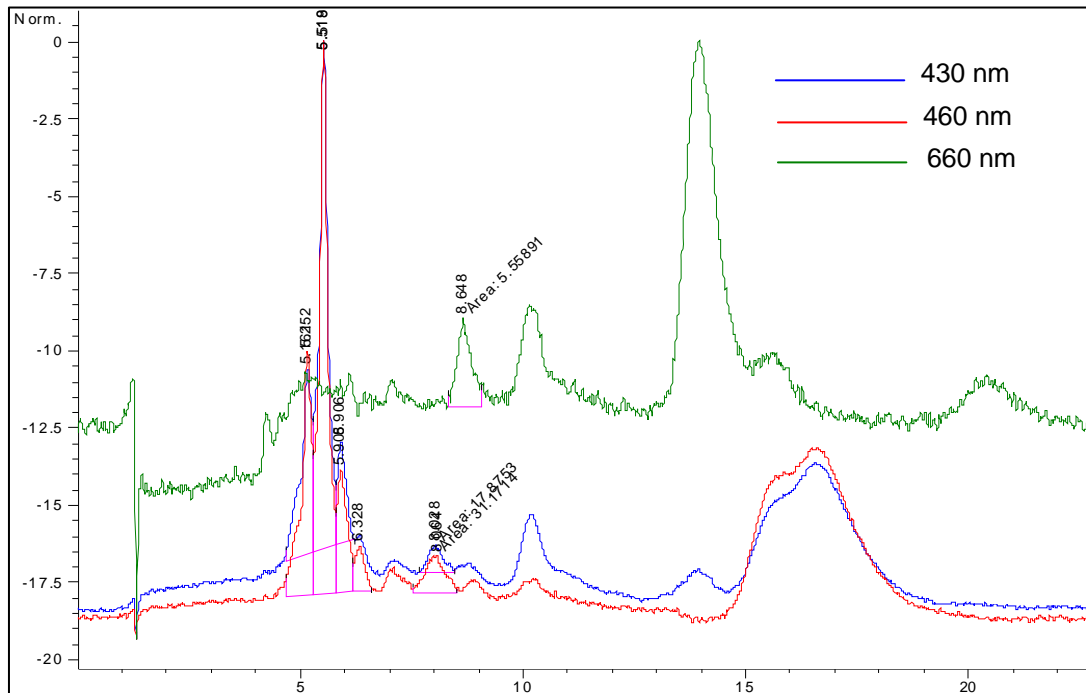


Figura 3.34 Cromatograma de extracto de muestra de agua de planta de tratamiento, obtenida por análisis de SPME en tubo-HPLC capilar.

En las figuras 3.35 y 3.36 se representan los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras contaminadas a dos niveles de concentración con Clo “a” y Clo “b”, respecto a una muestra sin contaminar. Para el extracto de muestra contaminado con 1 ppb de Clo “a” y 10 ppb de Clo “b”, se obtienen los cromatogramas de las figuras 3.35 b y 3.35 d, respectivamente. La figura 3.35 a y 3.35 c corresponde al extracto de la muestra sin contaminar.

En los cromatogramas de las figura 3.35 se identifico los picos cromatográficos de la Clo”b”, tr de 6,8 minutos y de la Clo “a”, tr 8,7 minutos en los extractos de muestra analizados. Se observa un incremento en las áreas de estos picos para los extractos de muestras a los cuales han sido añadidos Clo”a” y Clo “b”, cromatogramas de las figuras 3.35 b y 3.35 c, con respecto al valor de área que se obtiene en el cromatograma de la figura 3.35 a, en la muestra sin contaminar. Existe gran similitud entre los espectros de absorción molecular obtenidos del pico de la Clo”a” y del pico de la Clo”b” en los cromatogramas de los extractos de muestras y los espectros de las disoluciones patrones de los analitos, verificando así la identificación cualitativa de estos, ver figura 3.35 e y 3.35 f.

A la longitud de onda de absorción de 460nm, se registran los cromatogramas mostrados en la figura 3.36, se observa la identificación de la Clo “b” a un tiempo de retención de 7 minutos aproximadamente. Se verifica la presencia de este analito en la muestra por el espectro de absorción obtenido, el cual coincide con el de una solución patrón de Clo “b”, ver figura 3.36 d.

Los resultados obtenidos anteriormente, evidencia que el método de separación cromatográfico propuesto permite la separación e identificación de la Clo “a” y la Clo “b” en una muestra de matriz compleja donde una serie de otras sustancias absorbentes eluyen junto con los analitos de interés.

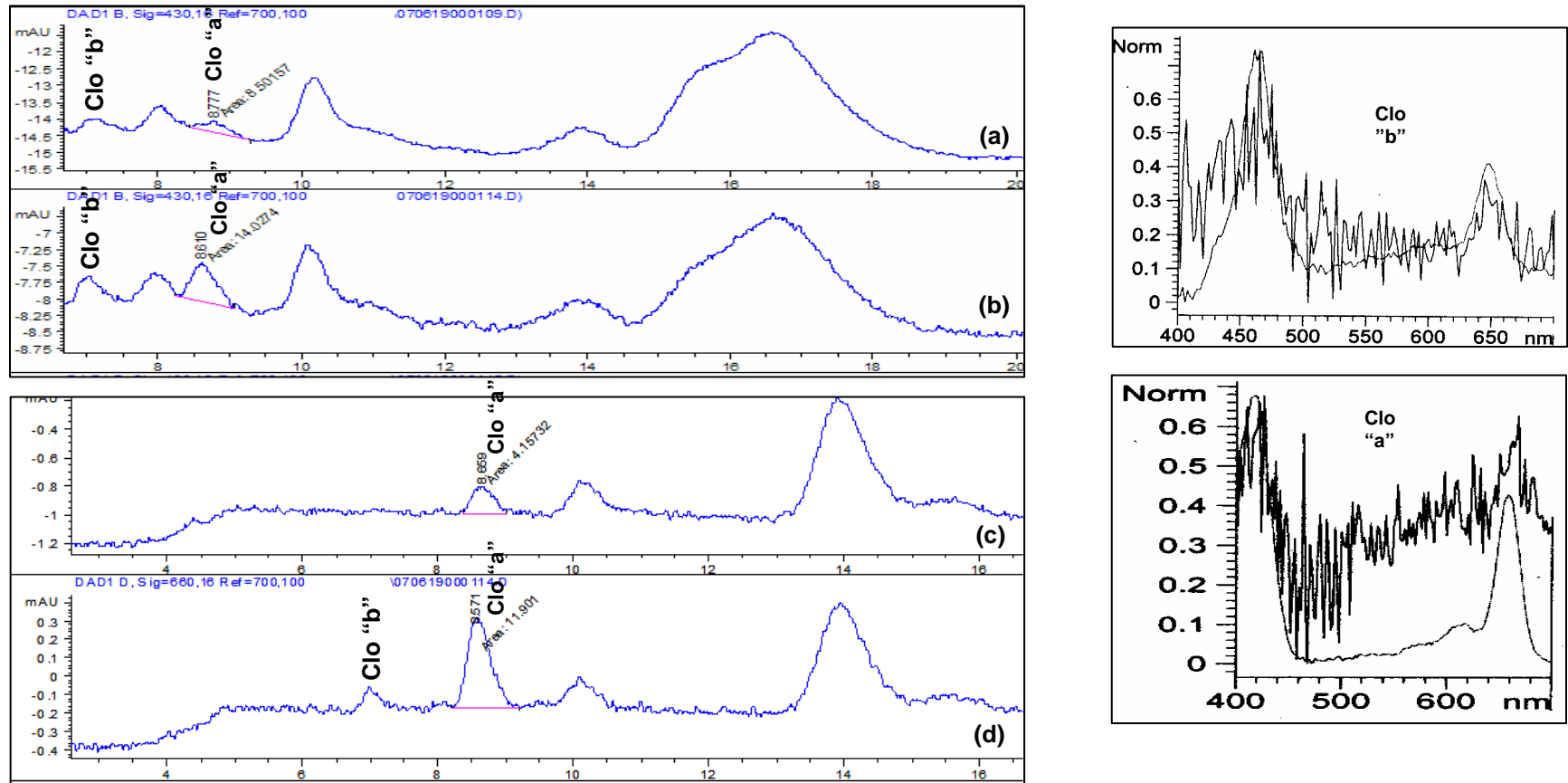
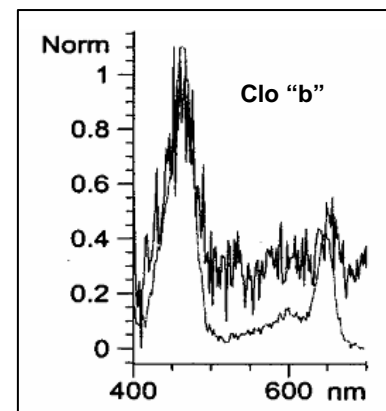
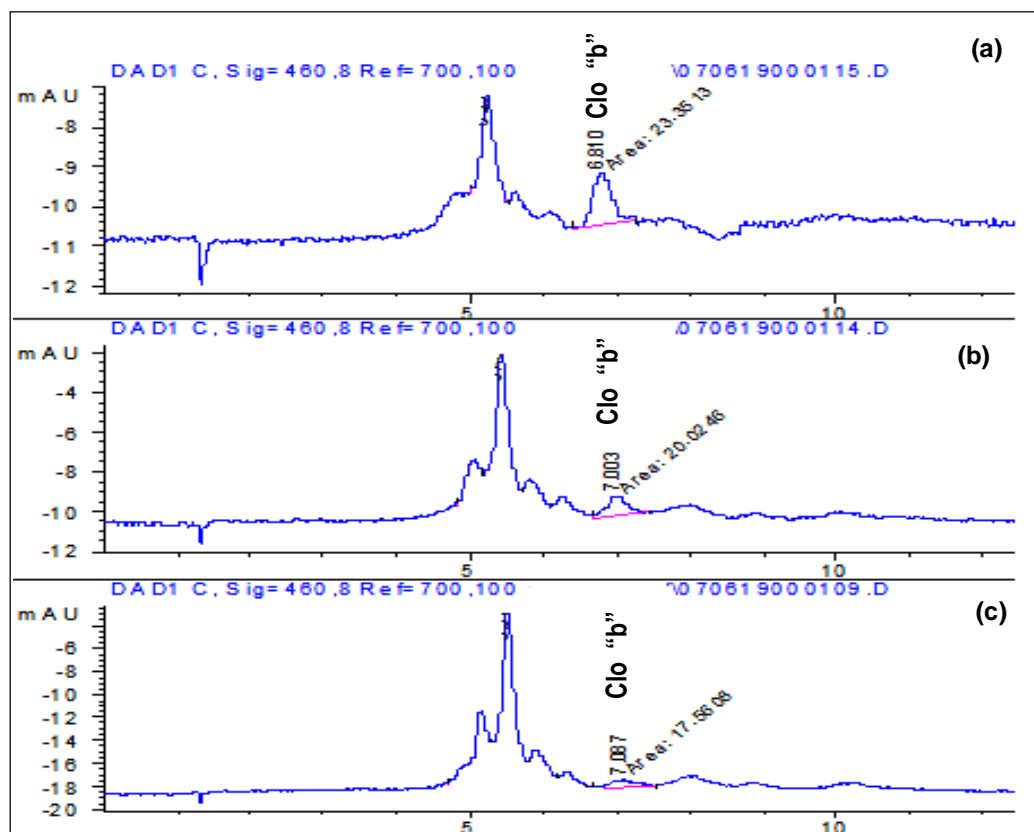


Figura 3.35 Sección de Cromatogramas de extractos de muestra de agua de planta de tratamiento, obtenida por SPME en tubo-HPLC capilar. Los cromatogramas a y b, se obtienen a una  $\lambda_{\text{abs}}$  de 430nm y los cromatogramas c y d a una  $\lambda_{\text{abs}}$  de 660nm. (a) y (c) corresponden al extracto de muestra de agua, sin contaminar, (b) y (d) corresponden al extracto de muestra de agua, con 1 ppb de Clo "a" y 10 ppb de Clo "b" añadida. (e) Espectro de Absorción Clo "a" y (f) Espectro de Absorción Clo "b".



**Figura 3.36** Cromatogramas de extractos de muestra de agua de planta de tratamiento, obtenida por análisis de SPME en tubo-HPLC capilar. La detección se realiza a una  $\lambda_{\text{abs}}$  de 460nm. a) Extracto de muestra de agua, sin contaminar. b) Extracto de muestra de agua, con 10 ppb de Clo “b” añadida. c) Extracto de muestra de agua, con 50 ppb de Clo “b” añadida. A la izquierda se muestra el espectro de absorción molecular de la Clo “b” en la muestra solapado con el espectro de solución patrón de este analito.



En la muestra analizada, se observan una serie de picos que podrían corresponder a los denominados feo-pigmentos, que son productos de degradación de las clorofilas<sup>8</sup>. Los feopigmentos para la Clo “a” es la feofitina “a” y para la Clo “b”. la feofitina “b”. Para la identificación cualitativa de los mismos en la muestra, se realizó la comparación entre los tiempos de retención y el espectro de absorción molecular obtenidos en los picos de cromatogramas para los extractos de muestras analizados y los de disoluciones patrones de estos compuestos. Se realiza la comparación de su.

La obtención de las feofitina “a” y la feofitina “b”, se describe en la sección experimental 2.6.3 . En la figura 3.37, se presenta una sección de cromatogramas de dos réplicas de extractos de muestra analizadas (3.37 a y 3.37 b), una disolución de feofitina “b” de 1ppm (figura 3.37 c) y de una disolución de feofitina “a” de 1ppm (figura 3.37 d), todos los cromatogramas son registrados a una  $\lambda_{\text{abs}}$  de 430nm. En los cromatogramas 3.37 a y 3.37 b, se observan picos que coinciden en los tiempos de retención a los cuales eluyen la Clo”b” , tr: 6,76min y la Clo “a” tr:8,55 min.

La separación cromatográfica de las disoluciones de las feofitinas, indican que estas disoluciones contienen restos de Clo “a” y Clo “b”, ya que también se observa la presencia de los picos correspondientes a estos analitos, ver figura 3.37 c y 3.37 d, presentes en los cromatogramas de las muestras. Dado que la obtención de las feofitinas, es por simple acidificación de soluciones de las clorofilas es probable que estas no se hayan degradado totalmente y aun queden restos de las mismas tal como se registra en los cromatogramas.

En las figuras 3.37 c y 3.37 d, se identifican el pico correspondiente a la Feofitina “b” ,a un tr de 9,9 minutos y el de la Feofitina “a”, a un tr de 13,7 minutos, respectivamente. En los cromatogramas de las muestras, se observan picos que coinciden con el tiempo de retención de los picos observados en los cromatogramas de las disoluciones de las feofitinas. Se infiere entonces que estos picos registrados en los cromatogramas de muestras, corresponden a los productos de degradación de la Clo “a” y la Clo “b” en la muestra analizada. La verificación de la identificación cualitativa de los feo-pigmentos, se realiza por comparación de los espectros de absorción obtenidos para estos picos en las réplicas de las muestras, con aquellos obtenidos en las disoluciones de estos. En la figura 3.37 e, se muestra la coincidencia entre dichos espectros.

Para la identificación de la feofitina “b”, también se registran los cromatogramas de las réplicas de las muestras analizadas y de la disolución de feofitina “b” a la  $\lambda_{\text{abs}}$  de 460nm, se identifica nuevamente la presencia de Clo “b” a un tr de 6,75 minutos y de la feofitina “b” a un tr de 9,9 minutos, ver figura 3.38 c, observándose también la presencia de picos registrados en los cromatogramas de los extractos de muestras a dichos tiempos de retención y confirmando la identificación de estos mediante comparación de los espectros de absorción molecular obtenidos, ver figura 3.38 d.

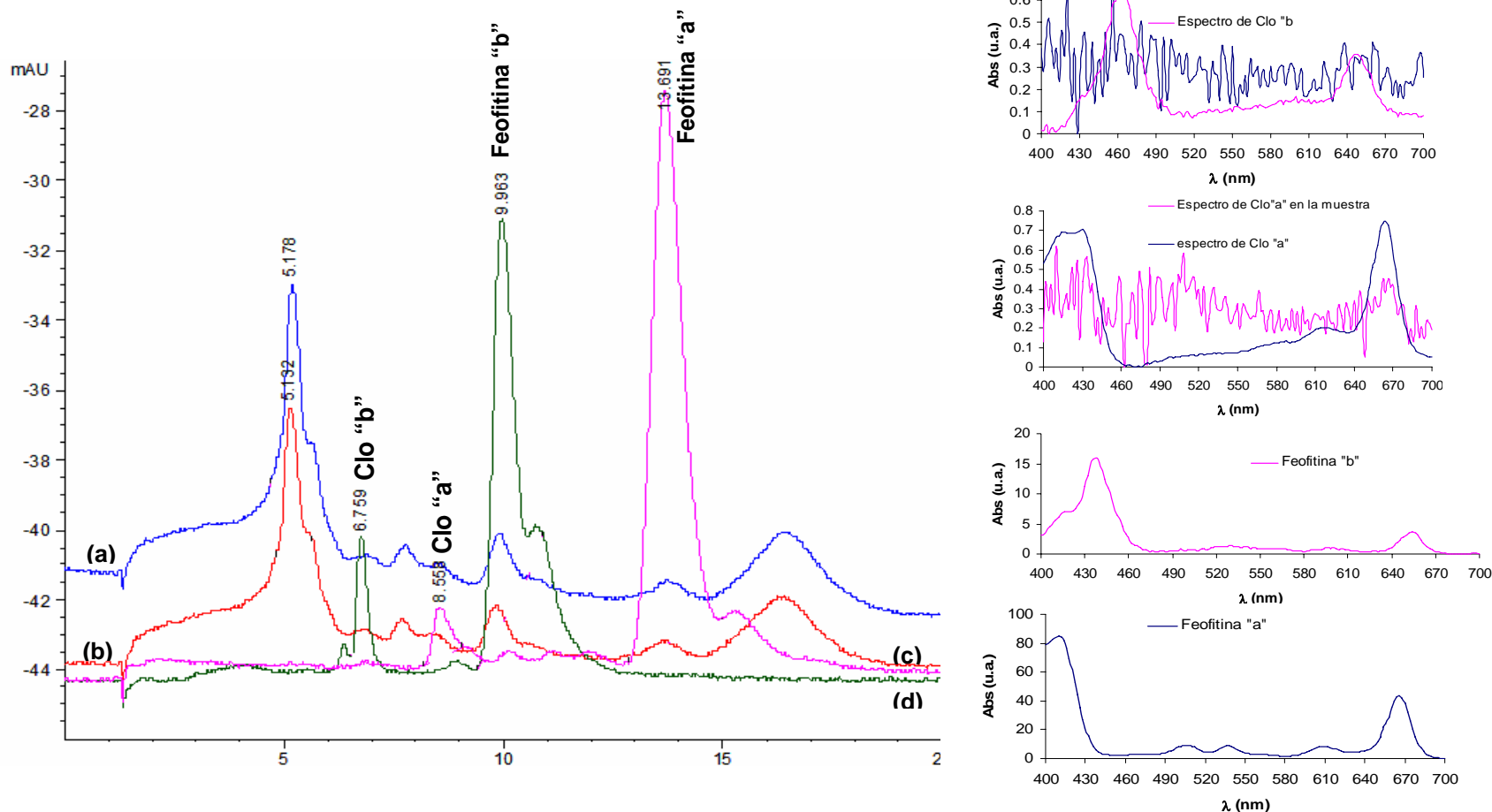
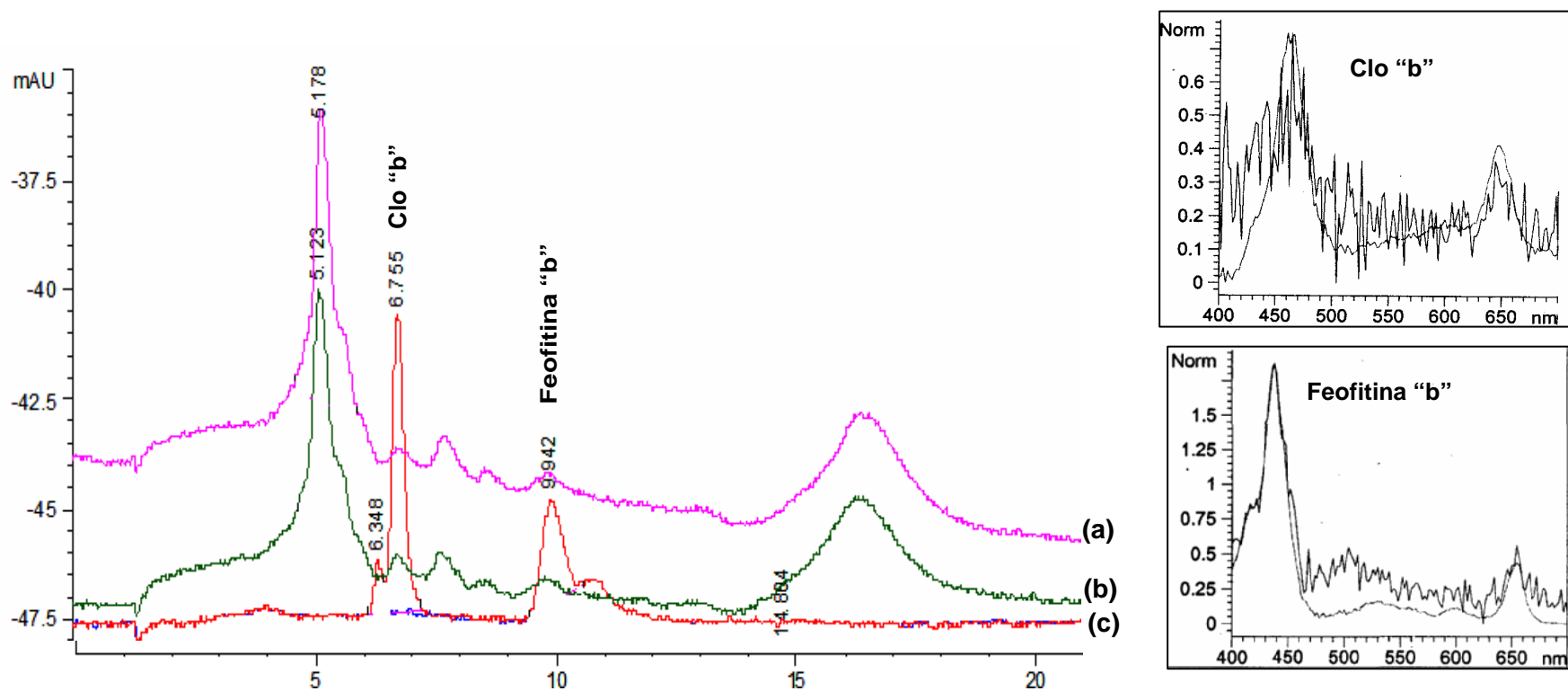


Figura 3.37 Cromatogramas de extractos de muestra de agua de depuradora, obtenida por análisis de SPME en tubo-HPLC capilar. La detección se realiza a una  $\lambda_{\text{abs}}$  de 430nm. a) Extracto de muestra de agua, sin contaminar réplica 1. b) Extracto de muestra de agua, sin contaminar réplica 2. c) Disolución de feofitina "b" de 1ppm. d) Disolución de feofitina "a" de 1 ppm. A la izquierda se muestra el espectro de absorción molecular de los analitos.



**Figura 3.38** Cromatogramas de extractos de muestra de agua de planta de tratamiento, obtenida por análisis de SPME en tubo-HPLC capilar. La detección se realiza a una  $\lambda_{\text{abs}}$  de 460nm. a) Extracto de muestra de agua, sin contaminar réplica 1. b) Extracto de muestra de agua, sin contaminar réplica 2. c) Disolución de feofitina “b” de 1ppm. d) Espectro de Absorción de la muestra (i), comparado a un espectro de solución patrón de Clo “b” (ii)

En la tabla 3.35, se presenta la identificación de los pigmentos fotosintéticos detectados en las muestras, la información mostrada en la tabla se extrae de los cromatogramas de la figuras 3.36, 3.37 y 3.38. Se observa que a la longitud de onda de 430nm todas las especies son detectadas, mientras que a 460 nm sólo es detectable para la Clo “b” y su derivado feofitina “b”, esto esta acorde con resultados previos reportados en la literatura.

**Tabla 3.35** Identificación de pigmentos fotosintéticos en muestras de aguas de plantas depuradora, analizadas por SPME en tubo-CL Capilar, utilizando un bucle de 50  $\mu$ L.

Analito	Tr (min)	
	430 nm	460 nm
Clo “b”	6,77	6,75
Clo “a”	6,81	-
Feofitina “b”	9,96	9,94
Feofitina “a”	13,69	-

Se realizó la determinación cuantitativa de la Clo “a” en las muestras de aguas de plantas de tratamiento utilizando el procedimiento de extracción 1F 0,45  $\mu$ m. Se obtiene que la concentración de Clo “a” hallada en las muestras fue de  $0,12 \pm 0,03$  por HPLC capilar y de  $0,20 \pm 0,02$  por fluorescencia molecular. Se observa, que existe una sobreestimación en la determinación de la Clo “a” por fluorescencia con respecto a los de HPLC, esto debido a la presencia de otros pigmentos que son excitados junto con la Clo “a”, la poca selectividad de la técnica de fluorescencia en los análisis de pigmentos del fitoplancton proporcionan poca exactitud en la cuantificación de los mismos.

#### 4. CONCLUSIONES

◆ Se desarrollaron dos métodos isocráticos de separación por HPLC convencional y HPLC capilar, para la determinación rápida y sensible de Clo “a” en muestras de aguas de mar, de reservorio y de vertido de depuradora. Un aumento en la sensibilidad de la determinación fue alcanzado, acoplado un sistema de pre-concentración en línea de SPME en tubo en una fase estacionaria de PDMS de una columna capilar abierta de Cromatografía de gases (CG) a ambos sistemas cromatográficos.

◆ El acoplamiento de un sistema de SPE en línea a CL convencional, mediante una configuración de column-switching permitió aumentar la sensibilidad de detección de la Clo “a” en soluciones patrones de este analito, no obstante se alcanzó una mejor eficacia en la pre-concentración de la Clo “a” en las muestras de agua de mar mediante la configuración SPME en tubo -CL convencional que en la SPE en línea en columna empacada.

◆ Las condiciones óptimas SPME en tubo - CL convencional fueron 50  $\mu\text{L}$  de volumen interno de la columna capilar de CG, un volumen de muestra de 125  $\mu\text{L}$  y la inyección simple de la solución.

◆ Las condiciones óptimas para la SPME en tubo – HPLC capilar fueron 50  $\mu\text{L}$  de volumen interno de la columna capilar de Cg, un volumen de muestra de 50  $\mu\text{L}$  y dilución previa de la muestra con un 10% de agua, previo a la inyección. En este sistema fueron alcanzados LODs de 0,023 ng para la determinación de Clo “a”.

◆ El sistema de SPME en tubo - HPLC convencional permite estimar niveles de concentración de Clo “a” por encima de  $0,4\mu\text{g L}^{-1}$ , por tanto este sistema sólo permitió la cuantificación de la Clo “a” en muestras de aguas de reservorio.

◆ La SPME en tubo - HPLC capilar suministró mejores LODs de Clo “a” en muestras de agua de mar (0,02 a 0,05 ng) a lo reportado en la literatura (0,1 ng) para métodos de separación de HPLC isocráticos con detección por fluorescencia.

◆ El sistema de SPME en tubo acoplada a CL capilar se aplicó exitosamente en el análisis de muestras de agua de mar, suministrando una concentración de Clo “a” de  $0,052\mu\text{g L}^{-1}$  acorde a lo reportado en la literatura donde la concentración de este pigmento en aguas superficiales es inferior a  $0,05\mu\text{g L}^{-1}$ .

◆ Ninguno de los sistemas cromatográficos utilizados permitió la detección cualitativa de la Clo “b” en las muestras de agua de mar, debido a que estos sistemas no presentan la suficiente sensibilidad en la detección de esta clorofila, que suele encontrarse a muy bajos niveles de concentración en este tipo de muestras. Sólo se logró la identificación de este pigmento en las muestras de aguas provenientes de depuradora analizadas por SPME en tubo-CL capilar.

◆ El procedimiento de extracción de pigmentos con mayor eficacia en la recuperación de Clo “a”, con el sistema de SPME en tubo tanto para CL convencional como capilar, es el de filtración con filtro de nylon de  $0,45\mu\text{m}$ . Los procedimientos de extracción en fase sólida con cartucho C-18 y disco empore C-18 presentan mecanismos de extracción ineficientes para la transferencia de los pigmentos hacia el solvente.

◆ Fueron validados los resultados en la recuperación de Clo “a” en muestras de agua de mar por el método 1F 0,45 mediante análisis HPLC convencional con SPME en tubo; ya que se obtienen elevados porcentajes de recuperación. Se compararon los resultados de HPLC con análisis de fluorescencia en las muestras de agua de mar, obteniendo un elevado coeficiente de correlación entre los métodos de  $r^2$  de 0,9874 .

◆ La implementación del método 1F0,45 resultó ser una metodología rápida, simple y eficaz en la extracción de los pigmentos desde las muestras reales. En este método de extracción, se disminuyeron los consumos en el volumen de muestra filtrado, el volumen del solvente de extracción y el tiempo de análisis. Además se suprime la aplicación de procesos mecánicos durante la extracción.

◆ Se logró la separación e identificación rápida de varios pigmentos: Clo “a”, Clo”b”, feofitina “a” y feofitina “b” en una muestra de agua de un vertido de una planta depuradora mediante la aplicación de SPME en tubo-CL capilar.

◆ La estimación de la concentración de Clo “a” en muestras de reservorio y vertido de depuradora presentan una sobre-estimación por análisis por fluorescencia con respecto a análisis por HPLC.

◆ La SPME en tubo fue un sistema de pre-concentración exitoso de la Clo “a” para su detección en extractos provenientes de muestras de agua de mar, de reservorio y de vertido de depuradoras.



#### 4. BIBLIOGRAFIA

---

- 1 R.F.C. Mantoura, R.G. Barlow. **Sample Isocratic HPLC methods for chlorophylls and their degradation products.** In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods.* S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 307-324 (1997).
- 2 S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura and T. Bjornland. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography : guidelines to modern methods.* S.W.Jeffrey, R.F.Mantoura and S. W. Wright Unesco Publishing. Paris. 307-324 (1997).
- 3 C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández and P. Campíns-Falco. **On fibre solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples.** *Journal of Chromatography A*, 1125. 1-28 (2006).
- 4 C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández and P. Campíns-Falco. In tube- **solid phase microextraction - capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorus pesticides in untreated environmental water samples.** *Journal of Chromatography A*, 1141. 10-21 (2007).
- 5 S.W. Wright, S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura and C.A. Llewellyn. **Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton.** *Marine Ecology Progress Series* 77, 183-196. (1991).
- 6 B. Knefelkamp, K. Carstens, K. Wiltshire. **Comparison of different types on chlorophyll-a retention and nutrient measurements.** *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*, 345. 61-70 (2007).
- 7 S.W. Jeffrey and R.F.C. Mantoura. **Development of pigment 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. 20. (1997).
- 8 Standard methods for the examination of Water and Wastewater, 19th Edition, Section 10200 H, APHA, AWWA, WPCF, Washintong. (1995).