

|                                                                                   |                                                                                                      |                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|  | <b>MÉTODO ANALÍTICO DETERMINACIÓN<br/>ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CLOROFILA a,<br/>SM 10150 A, B, 2b.</b> |                          |
|                                                                                   | Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá                                                  |                          |
|                                                                                   | Código: D-7.2-58                                                                                     | Versión: 05              |
|                                                                                   | Revisó: Subdirector de Planeación y O.T.                                                             | Aprobó: Director General |
|                                                                                   | Fecha: 20/04/2026                                                                                    | Fecha: 20/04/2026        |
|                                                                                   | Resolución: 300-03-10-23-0797                                                                        | Páginas: 1 de 8          |

## 1. DESCRIPCIÓN

La clorofila es un pigmento verde encontrado en diferentes plantas, algas y varios grupos de procariotas como son las cianobacterias. Este pigmento se encarga de la transferencia de energía lumínica a aceptores químicos (Levent A, 2011; Pareek sunil et al, 2017). Su nombre se derivado del griego Cloros - verde y Phyllon - hoja (Levent A, 2011; Pareek sunil et al, 2017), la molécula de clorofila está formada químicamente por átomos de carbono y nitrógeno con un solo átomo de magnesio en la posición central (Pareek sunil et al, 2017), consiste en un anillo de porfirina o núcleo de tetrapirrol, desde el cual se extiende una cola formada por un grupo de 20 carbonos llamado fitol (Levent A, 2011). El pigmento de clorofila absorbe luz azul y luz roja de la radiación solar a 430 nm y 660 nm, respectivamente, y refleja el espectro verde (Levent A, 2011; Pareek sunil et al, 2017).

La clorofila a, es la forma más abundante de clorofila y se utiliza para estimar en forma indirecta la biomasa de comunidades fitoplanctónicas (Rivera Carlos, 2005). La concentración de clorofila a es un indicador del grado de contaminación de los ecosistemas acuáticos por aumento de nutrientes; es así como, los cuerpos de agua superficial con alta concentración de clorofila contienen altas concentraciones de nutriente como fosforo y/o nitrógeno que a su vez, pueden ser indicadores de contaminación por fuentes artificiales, como fugas del sistema séptico, plantas de tratamiento de aguas residuales que funcionan mal o escorrentía de fertilizantes, al igual de ser indicadores de condiciones neríticas y aumento de temperatura por fenómeno del niño (Peña Viviana, 2002). Su estimación es de gran interés a nivel científico ya que permite conocer que tan saludable es un cuerpo de agua, su composición y estado ecológico.

## 2. ALCANCE

El método de determinación espectrofotométrica de clorofila a, es aplicable a matrices de agua superficial y marina.

## 3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

### 3.1 Principio

El método se fundamenta en la extracción de la clorofila a, a partir del extracto acetónico que contiene los pigmentos y la diferencia entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda (664, 647, y 630 nm).

### **3.1. Interferencias**

La clorofila es muy sensible a los pH bajos. En muestras que contiene pH bajos la clorofila es tendiente a degradarse produciendo feofitina a. De igual forma, una exposición prolongada a la luz puede degradar con rapidez la molécula de clorofila, por esto es recomendable realizar los análisis en un ambiente que tenga luz tenue.

Feoforbidas a y Feofitinas a, dos productos comunes de degradación de la clorofila a, pueden interferir con la determinación de la clorofila a porque ellos absorben la luz y la fluorescencia en la misma región que el espectro de la clorofila a lo hace.

## **4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO**

Para la toma de muestra, se recomienda el empleo de botellas de vidrio o polietileno opacas, ya que incluso una breve exposición a la luz durante el almacenamiento altera los valores de clorofila. Si la muestra es recolectada en aguas superficiales o estuarina es recomendable que el volumen de muestra oscile entre 300 y 500 mL, para agua marinas se recomienda que sea mayor a 1L en zonas costera y entre 4L y 10L mar adentro. Los botellones se llenan en su totalidad evitando que quede aire al interior de los mismos.

Transportar y almacenar la muestra en oscuridad y a una temperatura de 4°C.

## **5. MATERIALES Y EQUIPOS**

- Centrifuga Clay Adams Placa 0035.
- Tubos Falcon de 15 mL tapa rosca.
- Nevera MABE Placa 0143.
- Espectrofotómetro, Evolution 300 UV VIS PLACA 0107.
- Cubeta de Cuarzo de 1cm.
- Equipo de filtración.
- Bomba de Vacío.
- Vasos de Filtración.
- Pinzas de disección.
- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 0.7 µm de porosidad y 47 mm de diámetro.

- Transferpipetas de 1-10 mL.
- Transferpipetas de 100 a 1000 uL.

## 6. REACTIVOS

- Acetona 90%.
- Agua destilada estéril Filtrada.
- Carbonato de Magnesio  $\text{MgCO}_3$  1%

## 7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Acetona al 90%:** para preparar 1000mL de solución, mezclar 900mL de acetona grado analítico con 100mL de agua destilada estéril (filtrada).
- **Carbonato de Magnesio  $\text{MgCO}_3$ :** adicionar 1 gr de carbonato de magnesio en polvo fino a 100 mL de agua destilada.
- **Stock de Solución Estándar de Clorofila:** El estándar de clorofila a debe ser conservado a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  a luz tenue. Para su preparación, transferir todo el contenido de la ampolla a un balón volumétrico de 25mL. Diluya el volumen con acetona al 90%, cubra el recipiente con aluminio y rotúlelo adecuadamente. El stock de solución estándar es estable por 6 meses.

**NOTA:** El estándar de Clorofila a se utilizó para la verificación del Método y no constituye un control de calidad aplicado a la realización rutinaria del ensayo.

## 8. PROCEDIMIENTO

### 8.1. Filtración

- Antes del filtrado, realizar lectura del pH: los filtros tomados de aguas con  $\text{pH} > 6$ , pueden conservarse en el ultracongelador a  $\leq -18^\circ\text{C}$  por 28 días, sin que haya variaciones significativas en la concentración de Clorofila a; aquellos ítems de ensayo con  $\text{pH} < 6$  deben procesarse rápidamente, para prevenir la degradación de la clorofila por acción del agua ácida residual que queda en el filtro. El agua naturalmente ácida tiene pH por  $< 6$  debido al ácido húmico o a los contenidos de células senescentes no preservadas.
- El valor del pH de la muestra se registra en el formato R-7.4-39 CAPTURA DE DATOS CLOROFILA a - TRICROMÁTICO

- Concentrar el ítem de ensayo filtrando lo antes posible después de su llegada al laboratorio, el volumen de muestra a filtrar está condicionado por la carga de material particulado en suspensión presente en el cuerpo de agua. En los ítems con alta concentración de sólidos, la capacidad de retención del filtro se ve rápidamente comprometida, provocando su saturación y una disminución significativa del flujo. En tales casos, el volumen de filtración debe restringirse hasta el punto en que el paso de agua a través del filtro sea prácticamente nulo, lo cual generalmente corresponde a volúmenes comprendidos entre 100 y 500 mL. Por el contrario, los ítems con contenido particulado reducido permiten filtrar volúmenes mayores sin riesgo de obstrucción, en estas condiciones, es posible emplear volúmenes de 500 a 1000 mL.
- Si el proceso debe retrasarse, mantener las muestras a 4°C protegiéndolas de la exposición a la luz. Si se utiliza la totalidad del contenido del recipiente, enjuagarlo con aproximadamente 20 mL de agua de laboratorio libre de materia orgánica y pasarlo por el mismo filtro para asegurarse de que se recogen todas las células.
- Adicionar 2 mL de carbonato de Magnesio al 1% justo antes de terminar el proceso de filtrado de la muestra, para que actúe como un tampón de pH y evitar la degradación de la clorofila.
- Doblar el filtro con el filtrado hacia adentro y disponerlo en un tubo Falcon cubierto con aluminio. Si la muestra se va a congelar, guarde el filtro en un pequeño sobre de aluminio.

**Nota:** Para aguas costeras, estuarinas y continentales se recomienda emplear filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (0,7  $\mu\text{m}$ ) de 47mm de diámetro; para el análisis de aguas oceánicas se recomienda filtros de membrana de celulosa con tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  y diámetro de 47mm.

Los filtros de fibra de vidrio son preferidos para remover las algas del agua. La fibra de vidrio ayuda a romper las células durante la molienda, grandes volúmenes de agua pueden ser filtrados, y no hay formas precipitadas después de acidificación. Membrana de filtro inerte, tales como filtro de poliéster, pueden ser usados cuando este factor es irrelevante.

## 8.2. Extracción de Pigmentos

**Nota:** si la muestra filtrada ha sido congelada, atemperar el filtro en un área de

luz tenue y luego continúe con el proceso de extracción descrito a continuación:

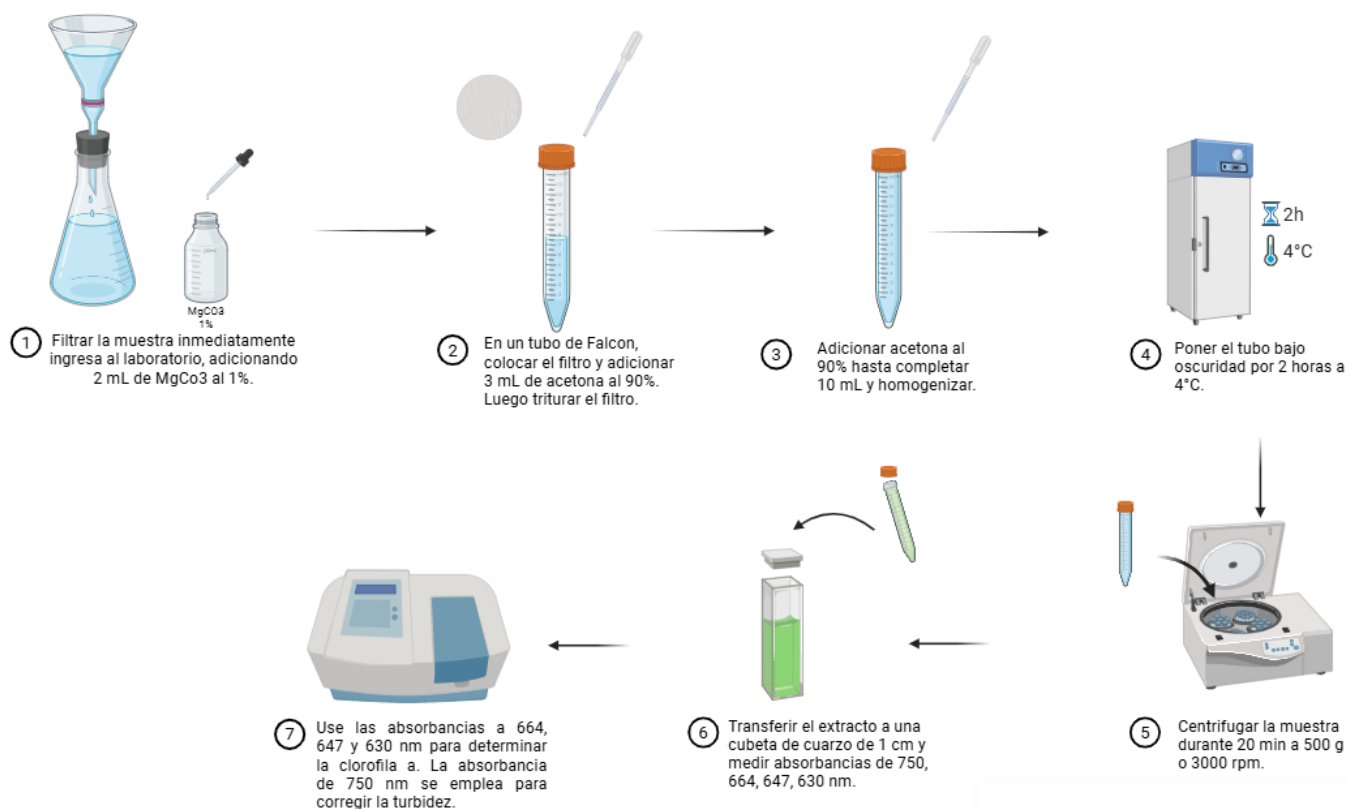
- Transfiera el filtro a un tubo Falcon y adicione 3 mL de acetona al 90%, triture el filtro con un triturador de tejidos u otro instrumento que cumpla con esta función.
- Enjuague el molinillo con unos pocos mililitros de acetona al 90% y ajuste el volumen total a 10 mL. Use el solvente con moderación y evite la dilución excesiva de los pigmentos.
- Poner el tubo bajo oscuridad y refrigeración por 2 horas a 4°C.
- Pasadas las 2 horas de extracción, centrifugar la muestra durante 20 min a 500g o 3000rpm.
- Decantar el extracto clarificado o sobrenadante a un tubo de centrifuga con tapa rosca de 15 mL, limpio y medir el volumen total.

**Nota:** El proceso de extracción de clorofila se debe llevar a cabo en lugares con luz tenue para evitar la degradación de la misma. Usar contenedores opacos o recipiente envueltos con aluminio.

### 8.3. Determinación de clorofila a – Método Tricromático:

- Transferir el extracto a una cubeta de 1cm y medir absorbancias de 750, 664, 647 y 630 nm.
- Elegir la trayectoria o la dilución que a longitud de onda de 664 de absorbancias entre 0,1 a 1,0.
- Use la absorbancia a 664, 647 y 630 nm para determinar clorofila a.
- La absorbancia 750nm se emplea para corregir la turbidez. Sustraer esta lectura de cada valor de absorbancia obtenido para determinar los pigmentos. Debido a que la absorbancia del extracto a 750nm es sensible a cambios en las proporciones de acetona agua, respete estrictamente la fórmula de 90 partes de acetona: 10 partes de agua (v/v) para la extracción de pigmentos.

## 9. ALGORITMO.



## 10. CÁLCULOS Y RESULTADOS

Para el cálculo tanto de las muestras como del estándar, proceder de acuerdo con la siguiente expresión:

$$Ca = 11,85 (A_{664}) - 1,54 (A_{647}) - 0,08 (A_{630})$$

Donde:

$Ca$  = concentraciones de clorofila a, en mg/L

$A_{664}$ ,  $A_{647}$ ,  $A_{630}$  = Absorbancias corregidas (con una trayectoria de luz de 1 cm) con sus respectivas longitudes de onda.

Después de determinar la concentración de pigmento en el extracto, calcular la cantidad de pigmento por unidad de volumen usando la siguiente formula:

$$\text{clorofila } a = \frac{mg}{m^3} = \frac{Ca * \text{volumen de extracto (L)}}{\text{volumen de muestra (m}^3\text{)}}$$

## 11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

Por lote de muestras menor o igual a 20 unidades, realizar un duplicado aleatorio, donde el RPD sea  $\leq 20\%$ . Adicionalmente, utilizar un blanco de acetona al 90% durante el proceso analítico.

## 12. MANTENIMIENTO

El mantenimiento de los equipos implicados en el proceso de realización del método se lleva a cabo entre 12 a 18 meses de acuerdo con lo establecido por el laboratorio.

## 13. BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braunt-Howland EB, Baxter TE. Eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press;2023.
- Levent A, 2011. Chlorophyll: Structural properties, health benefits and it Occurrence in Virgin olive oils. Akademik Gida 9(2)(2011) 26-32.
- Pareek sunil et al, 2017. Chlorophylls: chemistry and biological functions. Encontrado en <https://www.researchgate.net/publication/320428862>
- Rivera Carlos, 2005. Comparación de la estimación de la clorofila –a mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico. Acta biológica colombiana, vol. 10 No 2, 2005 95.
- Peña Viviana, 2002. Composición, distribución y abundancia de la comunidad fitoplanctónica de la ensenada de Uytía, Pacífico colombiano. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 37 (1): 67-81.

## 14. CONTROL DE CAMBIOS

| Fecha      | Resolución        | Versión | Detalle                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------|-------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19/11/2019 | 300-03-10-23-1429 | 01      | Aprobación inicial con código y nombre "D-7.2-58: MÉTODOS ANALÍTICO DETERMINACION ESPECTOFOTOMETRICA DE CLOROFILA a, SM 10200H 2b Y 2c.                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 18/07/2020 | 300-03-10-23-0792 | 02      | En la sección 6 se agrega el carbonato de magnesio como reactivo y en la 7 se agrega la preparación del mismo. En la sección 8 se agrega el uso de MgCO <sub>3</sub> en la etapa de filtración de la muestra.                                                                                                                                                                                   |
| 12/10/2010 | 300-03-10-23-1426 | 03      | Se modifica el procedimiento de extracción de pigmentos en el análisis de clorofila a                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 09/07/2025 | 100-03-10-23-1338 | 04      | Se cambió la referencia " <i>American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braunt-Howland EB, Baxter TE. Eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press;2023</i> ". Se actualizó la versión SM 10150 B 2b y se actualizó el logo corporativo.                        |
| 20/04/2026 | 300-03-10-23-0797 | 05      | En la viñeta 3 del apartado 8.1. filtración, se anexó el criterio para determinar el volumen de ítem de ensayo a filtrar. Adicionalmente en el apartado 11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD se incluye la presencia del blanco en todas las etapas del proceso.<br>Se actualizó el nombre del método a "MÉTODO ANALÍTICO DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CLOROFILA a, SM 10150 A, B, 2b." |

Última línea-----última línea---- última línea