

Part I

Pigments liposolubles: separació i anàlisi

Introducció

Els carotenoides i les clorofil·les són pigments liposolubles amb propietats especials que reflecteixen les seves estructures químiques. Una d'aquestes propietats que fins i tot podem apreciar macroscòpicament és el color. El tret estructural més característic responsable del color observat en carotenoides i clorofil·les és el sistema que presenten de dobles enllaços conjugats. Els electrons d'aquest sistema d'enllaços són els responsables de la capacitat de la molècula per absorbir llum en la banda del visible o, en alguns casos, en la regió de la radiació ultraviolada (UV). L'espectre d'absorció en l'UV-visible s'utilitza com a primer criteri d'identificació tot i que existeixen altres tècniques que proporcionen informació de caràcter estructural més detallada i que són utilitzades per a la caracterització estructural completa, com ara l'espectrometria de masses. L'absorció intensa de la llum en aquestes molècules també proporciona la base per a la seva determinació quantitativa. En mostres d'origen natural, la mesura de l'espectre d'absorció en un extracte de la mostra realitzat amb un dissolvent orgànic correspon a la suma dels espectres d'absorció de tots els pigments presents en la mostra. Per conèixer l'espectre de cadascun d'ells per separat és necessari utilitzar tècniques cromatogràfiques que permeten la separació física dels pigments de l'extracte.

El principi teòric en que es basen les tècniques cromatogràfiques es troba descrit en diverses obres monogràfiques (p.e. Miller, 1988). Es tracta d'un procés de separació que es basa en la utilització de dos fases, una d'estacionària i una de mòbil. La barreja de compostos que es vol separar s'introdueix en la fase mòbil (pot ser un gas o un líquid) i és arrossegada a través del sistema. A mesura que la fase mòbil passa per sobre o a través la fase estacionària, cada component de la barreja assoleix un equilibri de distribució entre les dues fases, i això es tradueix en unes taxes de migració diferencial a través del sistema. Les tècniques cromatogràfiques es classifiquen segons la naturalesa de les dos fases o bé segons el disseny i configuració del sistema experimental. Els pigments són molècules tèrmicament poc estables i per aquest motiu és més adequat utilitzar una fase mòbil líquida. La cromatografia líquida (LC), en les seves diferents formes, proporciona el mètode de separació més important en carotenoides. La separació es pot assolir en un sistema planar, com passa en la cromatografia de capa fina (TLC) i en la cromatografia sobre paper (PC), o en una columna, com en la cromatografia de columna oberta (CC) o la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

La tècnica de l'HPLC: fonament teòric i instrumentació

La tècnica de l'HPLC consisteix en injectar al sistema cromatogràfic una petita quantitat d'un extracte filtrat que conté els pigments que volem separar i quantificar i fer-lo circular a través d'una columna reblerta amb un material porós (fase estacionària). La força d'elució per arrossegar la mostra dins la columna cromatogràfica la proporciona una barreja de dissolvents orgànics que constitueix la fase mòbil i que circula empesa per un sistema de bombeig. Els dissolvents entren al sistema per dos o tres canals diferents (per exemple A i B en l'esquema, Figura 1.1) i es barregen en diferents proporcions seguint el gradient programat prèviament en l'aparell. Els dissolvents més típicament utilitzats inclouen metanol (amb un índex de polaritat de 6.6), acetona (5.4), acetonitril (6.2) i aigua (9) i poden estar o no modificats amb determinats reactius de parell iònic com l'acetat d'amoni, l'acetat de tertbutilamoni, o altres agents com ara l'etil acetat (amb índex de polaritat de 4.3) o la piridina. En l'HPLC de fase reversa (RP-HPLC), es combina una fase estacionària no polar (com ara octil C8 o bé octildecil C18) amb una fase mòbil polar.

El principi de la separació cromatogràfica es basa en l'afinitat que presenten les substàncies que volem separar, els pigments en aquest cas, per la fase estacionària no polar per on les fem passar i de la seva solubilitat en la fase mòbil. La mostra una vegada injectada s'introdueix a la columna mitjançant la combinació de dissolvents més polar. Donat que els pigments més polars es veuen més fortament atrets pels dissolvents polars que no per la fase estacionària no polar, aquests pigments més polars circulen per la columna cromatogràfica més ràpidament i són els primers en sortir d'ella i entrar al detector de UV-visible que en mesura l'espectre i l'absorbància. Per contra, els pigments no polars es veuen més atrets per la fase estacionària i no es redissoldran en la fase mòbil fins que la polaritat d'aquesta disminueixi, el que s'aconsegueix alterant-ne la composició de dissolvents que entren pels diferents canals.

Instrumentació

Un sistema cromatogràfic com el de la figura 1.1 està constituït per: (i) un sistema de bombeig; (ii) un d'injecció; (iii) una columna cromatogràfica; (iv) un detector; i (v) un sistema d'adquisició de dades i control dels aparells.

(i) Sistema de bombeig

En el sistema que s'ha utilitzat al llarg d'aquest treball, el subministrament d'eluent es realitzava mitjançant un sistema de gradients quaternaris Waters 600E constituït per una bomba de doble pistó i una vàlvula quaternària programable que realitzava la barreja d'eluent que constitueixen la fase mòbil. La barreja es produïa a baixa pressió abans d'entrar a la bomba. La pressió de treball variava en funció del flux de fase mòbil i de les característiques de la columna cromatogràfica utilitzada.

Els dissolvents utilitzats eren de qualitat HPLC *gradient* i eren desgasats contínuament amb heli (25 mL min^{-1}) durant l'anàlisi per evitar la formació de bombolles de gas dins la bomba causades per la barreja de dissolvents, o en el detector, on la pressió cau fins assolir l'atmosfèrica. L'aigua utilitzada en la fase mòbil es destil·lava i desionitzava mitjançant un sistema Milli-Q de Millipore.

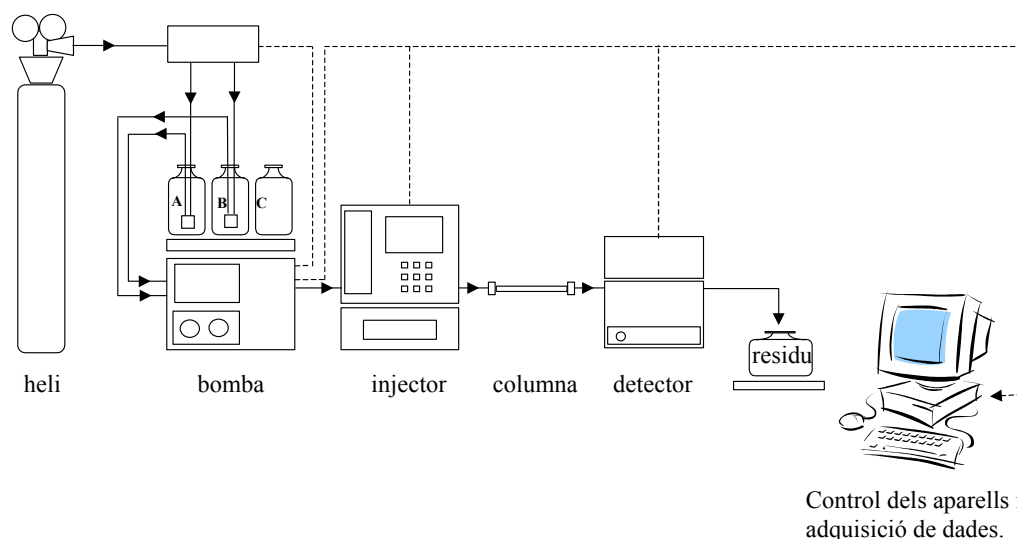


Figura 1.1. Esquema del sistema cromatogràfic. Les línies contínues són les connexions per on circula la fase mòbil amb la mostra, les discontinues corresponen a connexions elèctriques que permeten controlar els aparells i adquirir les dades.

(ii) Sistema d'injecció

La injecció de la mostra tenia lloc dins un injector automàtic Waters 717 que disposava d'un carro on se situaven els vials que contenien cada extracte. Un sistema de refrigeració permetia mantenir les mostres a 4°C mentre esperaven el torn per ser injectades. L'injector disposava d'una xeringa que omplia un *loop* de $200 \mu\text{L}$ i després el dispensava en funció del volum de mostra que havia estat programat de subministrar (normalment entre $20\text{-}100 \mu\text{L}$).

(iii) Columnes cromatogràfiques

Una fase estacionària C18, consisteix en partícules de sílice a les que s'uneixen covalentment cadenes de 18 carbonis. La major part dels mètodes en RP-HPLC utilitzen recobriments monomèrics de C18, això vol dir que la superfície de sílice queda recoberta per una sola capa de C18 (p.e. Nova-Pak C18, Taula 1.1). El recobriment però deixa alguns grups silanol que queden lliures mantenint les interaccions polars i interferint en la reproduïbi-

litat de la columna. Les columnes més genèriques pel que fa a ventall d'aplicacions presenten aquests grups silanol desactivats per un procés anomenat *end-capping* (p.e. la Nova-Pak).

Taula 1.1. Característiques de les columnes utilitzades.

Columna	Partícules				Superfície (m ² .g ⁻¹)	% Càrrega de C	End- capped	Classificació
	Mida (mm)	Mida (µm)	Forma	Ø de porus (Å)				
Nova-Pak (Waters)	150x3.9	4	esfèrica	60	120	7	si	Monomèrica C18
YMC30 ¹ (YMC)	250x4.6	5	esfèrica	200	200	19.41	no	Polimèrica C30
Spherisorb-ODS1 (Waters)	250x4.6	5	esfèrica	80	200	6.2	no	Intermèdia C18

¹s'utilitzava una precolumna amb la mateixa fase estacionària

Altres paràmetres importants de la columna són la mida i la forma de les partícules que constitueixen la fase estacionària, que poden ser esfèriques o irregulars, el diàmetre de porus i la superfície de cobertura. Els avantatges d'utilitzar una mida de partícula petita (< 4 µm) són que s'augmenta l'eficiència i es pot disminuir el consum de dissolvent, ja que una separació comparable pot ser obtinguda utilitzant una columna més curta. Però també comporta desavantatges, com ara una baixa vida de la columna ja que s'obtura amb més facilitat i això pot provocar pujades de pressió importants que augmenten el desgast de les bombes. Aquests desavantatges es poden reduir filtrant totes les mostres abans de ser injectades i utilitzant precolumnes situades entre l'injector i la columna.

Una altra característica és la forma de les partícules que rebleixen la columna, la forma esfèrica permet uniformitzar la mida de la partícula i això fa augmentar la reproduïbilitat. Els efectes del diàmetre de porus i la superfície de cobertura en la separació de carotenoides no estan ben documentats. S'acostumen a utilitzar superfícies de cobertura altes ja que n'augmenten la retenció. La manera d'augmentar la càrrega de carboni és augmentant la superfície de la base de sílice mitjançant partícules de diàmetre de porus petit. És convenient però, trobar un òptim adequat al tipus de molècula que volem separar ja que si el porus és massa petit pot passar que la molècula no hi pugui entrar per interaccionar amb la fase C18 de dins els porus.

(iv) Detector

El detector que es va utilitzar era un Waters 996 PDA (Photodiode Array). Aquest tipus de detector té una làmpada de deuteri que emet llum policromàtica i la fa passar a través de la mostra que absorbeix la llum a unes determinades longituds d'ona. Una retícula de difracció en dispersa l'espectre en paquets de 1.2 nm de longitud d'ona que són projectats

en una filera de 512 fotodíodes. Cada fotodíode suporta una quantitat fixa de càrrega i el que fa la llum que prové de la retícula de difracció és descarregar cada fotodíode en major o menor quantitat en funció de la llum que li arriba. El que llegeix el detector és el corrent necessari per recarregar altre cop cada díode en un temps determinat. Amb aquest tipus de detector el que s'obté finalment és un mapa de contorns en tres dimensions que són el temps en l'anàlisi o temps de retenció (t_R ; min), l'absorbància (AU; 1volt = 1AU) i la longitud d'ona (λ ; nm) (Figura 1.2). Durant l'anàlisi s'adquireix un espectre per segon amb una resolució de 1.2 nm en el rang fixat entre 300-800 nm.

(v) Sistema d'adquisició de dades

Un ordinador equipat amb el programa Millennium 2.15 de Waters permetia el control automatitzat del sistema i en recollia els resultats en una base de dades de tipus Oracle. El programa permet treballar amb el mapa en tres dimensions. La gran quantitat de dades recollides amb aquest tipus de detector poden ser mostrades de diferent manera. Per a la quantificació dels pigments separats ens interessa treballar amb cromatogrames. Els cromatogrames s'obtenen fixant la longitud d'ona (Figura 1.2), de manera que si el pigment separat presenta absorció en la longitud d'ona fixada veurem com apareix un pic en el cromatograma. A partir del cromatograma podem obtenir dos tipus d'informació: el temps de retenció del pigment (t_R) i l'àrea o alçada del pic que és proporcional a la quantitat de pigment.

El programa permet fer el càlcul de l'àrea de cada pic (A; μ Vsec), informació que després s'utilitzarà per a la quantificació.

Els paràmetres que defineixen la qualitat de la separació són el factor de capacitat (k') i la resolució de pic (R). El factor de capacitat es defineix com:

$$k' = t'_R / t_0 = (t_R - t_0) / t_0 \quad (1)$$

on t_0 és el temps que triga la fase mòbil en travessar la columna cromatogràfica i t_R és el temps de retenció del compost, és a dir, el temps entre la injecció de la mostra i el màxim del pic. Factors de capacitat entre 1 i 5 són els desitjables.

La resolució entre dos pics veïns, 1 i 2, es defineix com:

$$R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (2)$$

on w_1 i w_2 són les amplades de cada pic a la seva base.

El principal objectiu d'una separació és aconseguir una bona resolució de pics en un temps curt d'anàlisi. Existeixen tota una sèrie de factors que afecten la resolució (Meyer, 1988). En cas d'obtenir una resolució inadequada es pot seguir la següent seqüència d'accions: (i) calcular k' ; si $k' < 1$ cal canviar la polaritat de la fase mòbil; (ii) canviar la columna per una de nova; (iii) canviar la columna per una de més llarga; (iv) optimitzar el flux de la fase mòbil; (v) utilitzar una fase estacionària o mòbil diferent.

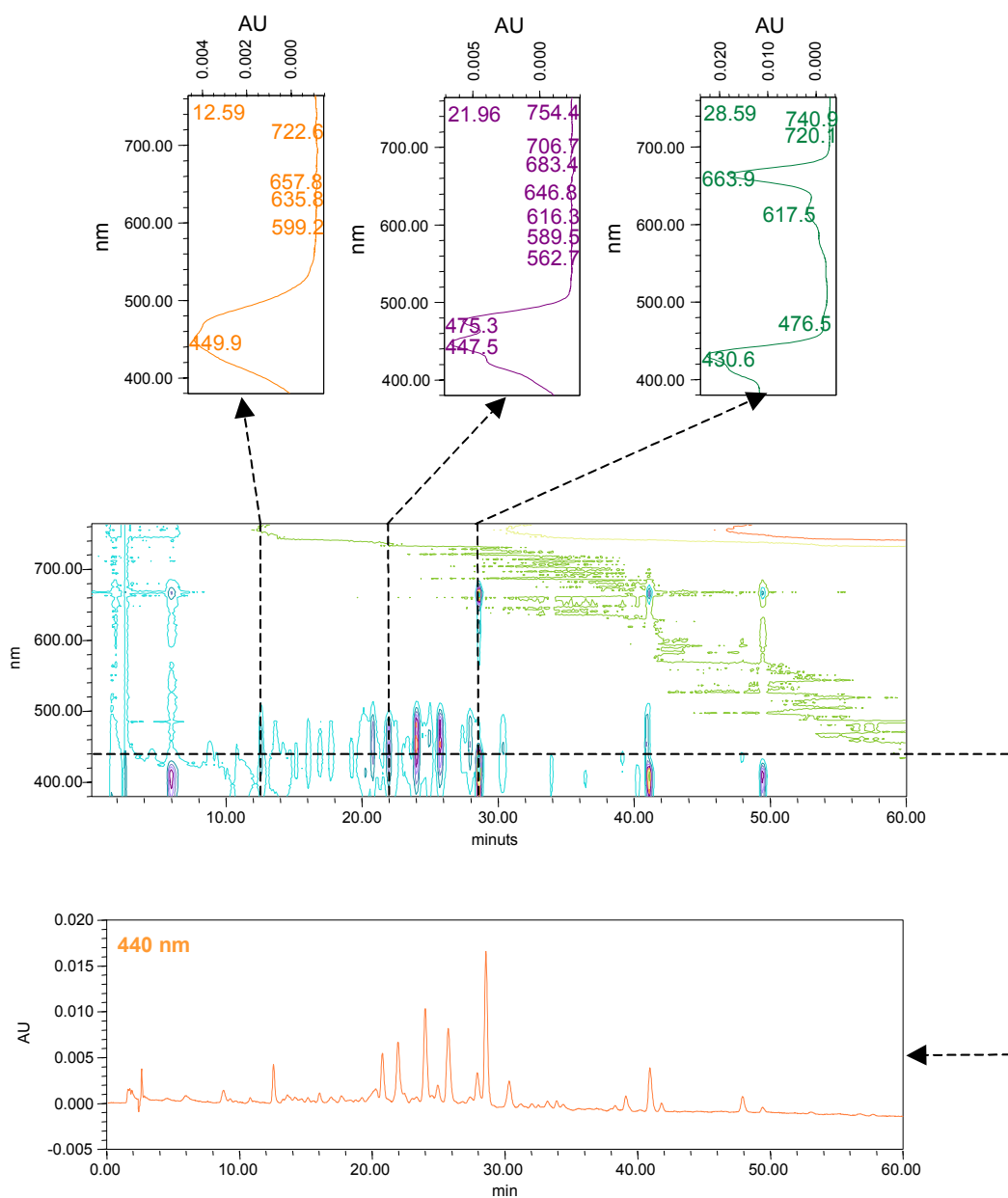


Figura 1.2. La figura central és un mapa de contorns a partir del qual es poden extreure cromatogrames a diferent longitud d'ona (p.e. 440 nm). Els pics que apareixen en el cromatograma corresponen als pigments separats. L'àrea de cada pic s'utilitzava per a la quantificació. Cada pic està caracteritzat per un t_R i un espectre d'absorció. Per exemple, el pic que apareix amb un $t_R = 12.59$ en el cromatograma i té un espectre d'absorció amb $\lambda_{max} = 449.9$ correspon a la fucoxantina.

Composició de pigments en mostres de referència

Per a la identificació dels pics d'un cromatograma, donat que els patrons comercials de pigments són escassos, es va analitzar la composició de pigments en mostres de referència. La composició de pigments en aquestes mostres era característica i coneguda (Taula I; Introducció general) (Liaaen-Jensen, 1964; Goodwin, 1980; Rowan, 1989; van den Hoek *et al.*, 1995; Jeffrey *et al.*, 1997). Com a mostres de referència es van utilitzar cultius algals i de bacteris fotosintètics del sofre, també es van analitzar mostres de camp d'algues bentòniques, molles i macròfits i de tres espècies de zooplàncton. Amb aquesta informació es va construir un catàleg amb informació de l'espectre d'absorció i τ_{R} de cada pigment segons el sistema cromatogràfic en que havia estat analitzat. A aquesta informació s'afegia l'obtinguda a partir de la bibliografia respecte el pes molecular del pigment i coeficient d'extinció en un determinat dissolvent.

Després d'un mes de mantenir els cultius en les condicions descrites més endavant, es filtrava un volum de cultiu entre 50-300 mL segons l'espècie. Al filtre s'afegia 5 mL d'acetona 90 % i, per accelerar el procés d'extracció dels pigments, s'aplicava ultrasons utilitzant una sonda de 4 mm de diàmetre que s'introduïa directament en el dissolvent que contenia el filtre amb la mostra. Un cop teníem els pigments en dissolució, l'extracte es feia passar a través d'un filtre de membrana Anodisc de 0.1 μm ($\varnothing = 25$ mm) i s'analitzava amb l'HPLC. Les mostres corresponents als cultius algals monoespecífics, als de bacteris fotosintètics del sofre i les mostres de zooplàncton es van analitzar en dues columnes cromatogràfiques diferents (YMC30 i Spherisorb-ODS1), amb una fase mòbil basada en el mètode de Kraay *et al.* (1992) amb algunes modificacions en el gradient per ajustar-lo a cada columna (taules de la figura 2.10; Capítol 2).

Cultius monoespecífics

Es van cultivar 7 espècies de microalgues planctòniques d'aigües dolces (Taula 1.2) amb diferent composició pigmentària de les divisions o classes: Chlorophyta (1 espècie), Dinophyta (1sp.), Cryptophyta (1sp.), Bacillariophyceae (1sp.) i Cyanobacteria (3sp.). També es van obtenir dos cultius de bacteris fotosintètics, un amb bacteris del gènere *Chromatium* que pertany al grup de les cromatiàcies o bacteris vermells del sofre i un altre amb *Chlorobium limicola* que pertany al grup de les clorobiàcies o bacteris verds del sofre.

Els cultius de microalgues provenien de la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), UK, i els de bacteris fotosintètics del sofre van ser cedits pel Dr. C. Borrego de l'Institut d'Ecologia Aquàtica de la Universitat de Girona.

Pels cultius de microalgues es van utilitzar dos tipus de medi de cultiu, el Jaworski's Medium (JM) i el Diatom Medium (DM). Els medis eren preparats utilitzant 1 mL de cadascuna de les solucions estoc de la taula 1.3 i portant-ho a 1L amb aigua Milli-Q. Després, el medi era autoclavat durant uns 15 minuts. En el medi DM el pH s'ajustava a 6.9. Els elements traça eren quelats mitjançant l'EDTA per tal de disposar d'un reservori de cations complexats i per assegurar el subministrament constant de baixes concentracions

d'aquests elements. Un cop el medi havia estat autoclavat, era col·locat, o bé en flascons de poliestirè transparent de 40 mL de capacitat amb tap de rosca per als cultius de manteniment, o bé, en el cas dels cultius de creixement, en bosses de plàstic amb capacitat per a 1L de medi i amb aireació. Tot el material utilitzat per a la manipulació dels medis i dels cultius també havia estat autoclavat. El cultiu de *Microcystis aeruginosa* no creixia bé en els flascons i per a aquesta espècie en particular es van utilitzar bosses, tant pels cultius de manteniment com pels de creixement. Els flascons amb els cultius de manteniment eren il·luminats amb dos fluorescents de 18 W cadascun, seguint un cicle de llum:fosc de 12:12 hores, la temperatura de l'habitació en que es trobaven oscil·lava entre els 20-25 °C. No es va fer el seguiment de les fases de creixement dels cultius, tot i que sí que es controlava periòdicament al microscopi l'estat de les seves cèl·lules. També de manera periòdica, aproximadament un cop al mes, aquests cultius eren novament sembrats en medi fresc. Les condicions de creixement eren lleugerament diferents en el cas dels cultius de creixement de les bosses. Per accelerar-ne el creixement se'ls va aplicar una intensitat de llum continuada sense períodes de fosc. La temperatura era la mateixa que els de manteniment i disposaven d'un sistema d'aireació.

Els cromatogrames obtinguts presentaven en general una bona resolució de pics (figures de la 1.3 a la 1.8). Els t_R per un mateix pigment canviaven segons el sistema cromatogràfic utilitzat i en alguns casos fins i tot canviava l'ordre en que apareixien els pigments en el cromatograma. Alguns exemples de canvi d'ordre en l'elució d'un pic es troben en el cromatograma obtingut a partir de l'extracte de *Fragilaria crotonensis* var. *prolongata* (Figura 1.3) on el pic 5 que correspon al pigment fucoxantina eluïa entre els pics 3 i 5b (Chl-c1 i Chl-c2 respectivament) en la YMC30 mentre ho feia després d'aquests en la Spherisorb-ODS1. La mostra amb l'extracte del cultiu de *F. crotonensis* var. *prolongata* analitzada amb la Spherisorb-ODS1 presentava clars indicis de deteriorament.

1. PIGMENTS LIPOSOLUBLES: SEPARACIÓ I ANÀLISI

Taula 1.2. Espècies cultivades. La temperatura era mantinguda entre els 20-25 °C i la intensitat de llum era de uns 150 µE m⁻² seg⁻¹.

Divisió/Classe	Espècie	Codi procedència CCAP	Medi de cultiu ¹
Bacillariophyceae	<i>Fragilaria crotonensis var. prolongata</i>	1029/17	DM
Chlorophyta	<i>Eudorina sp</i>	24/9	JM
Cryptophyta	<i>Cryptomonas sp.</i>	979/66	JM
Cyanobacteria	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	1401/5	JM
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	145/15	JM
	<i>Oscillatoria rubescens</i>	1459/40	JM
Dinophyta	<i>Ceratium hirundinella fo. furcoides</i>	1110/4	DM

¹(Tompkins *et al.*, 1995)

Taula 1.3. Solucions estoc per a elaborar els medis de cultiu .

Jaworski's Medium (JM) - solucions estoc		g per 200 mL
(1)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	4
(2)	KH ₂ PO ₄	2.48
(3)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10*
(4)	NaHCO ₃	3.18
(5)	EDTAFeNa	0.45
	EDTANa ₂	0.45
(6)	H ₃ BO ₃	0.496
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.278
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.2
(7)	Cianocobalamina	0.008
	Tiamina HCl	0.008
	Biotina	0.008
(8)	NaNO ₃	16
(9)	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7.2
Diatom Medium (DM) - solucions estoc		g per 200 mL
(1), (2), (4), (5), (6), (7)		les mateixes quantitats
(3)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
(8)DM	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	11.4

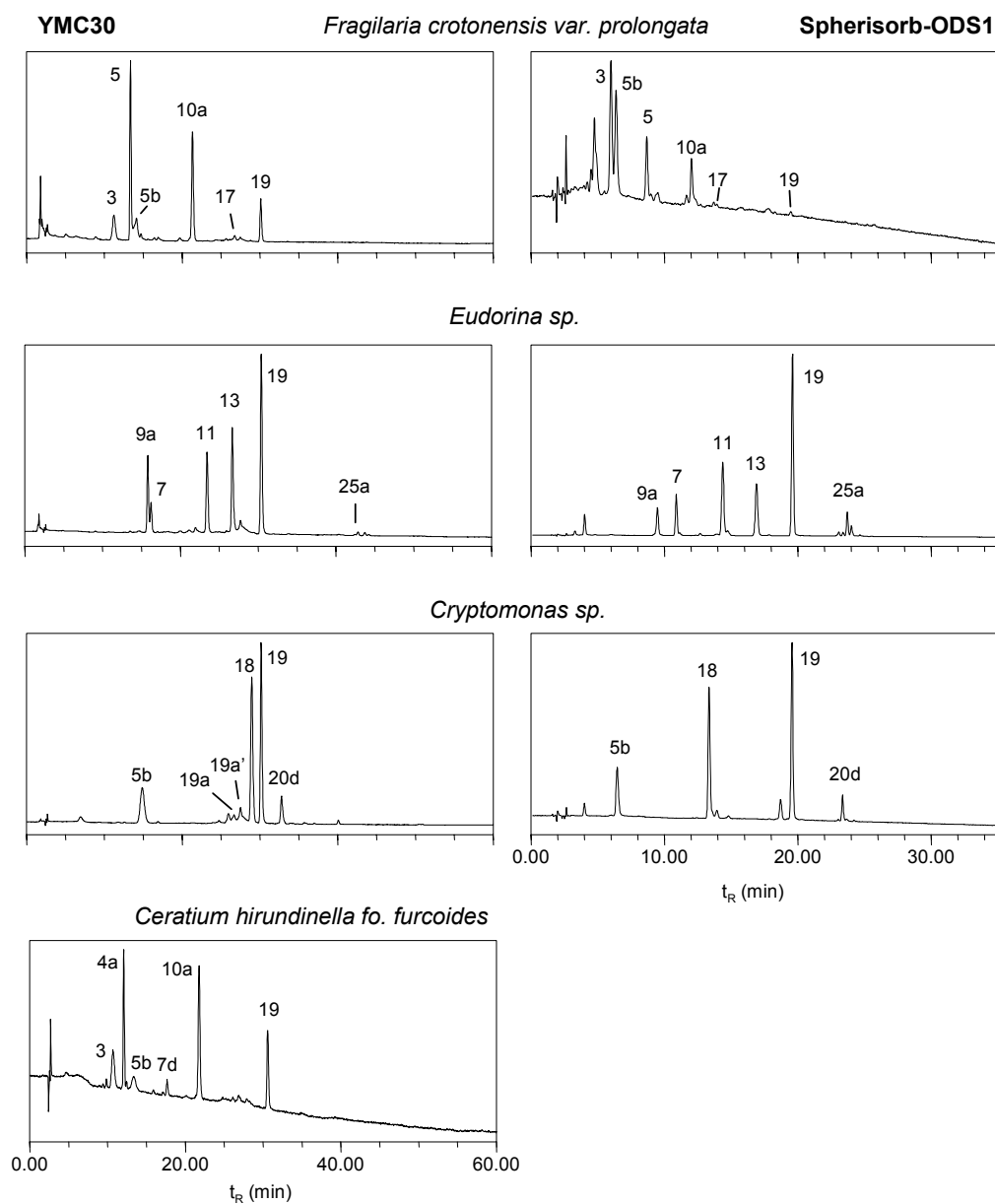


Figura 1.3. Cromatogrames obtinguts en cada columna cromatogràfica a partir dels cultius mono-específics. Detecció a 440 nm. Els codis corresponen als pigments Chl-c1 (3), fucoxantina (5), peridina (4a), Chl-c2 (5b), neoxantina (9a), violaxantina (7), dinoxantina (7d), diadinoxantina (10a), luteïna (11), diatoxantina (17), Chl-b (13), àlomer 1 de Chl-a (19a), àlomer 2 de Chl-a (19a'), al·loxantina (18), Chl-a (19), β,ϵ -carotè (20d), β,β -carotè (25a). La mostra amb l'extracte del cultiu de *F. crotonensis var. prolongata* analitzada amb la Spherisorb-ODS1 presentava clars indicis de deteriorament.

També en els cromatogrames obtinguts a partir del cultiu de *Cryptomonas sp.* es veia com el pic 18 (al·loxantina) eluïa abans del pic 11 (luteïna) en la Spherisorb-ODS1 mentre ho feia just abans del pic 19 (Chl-a) en la YMC30. El pic 16 (cantaxantina) present en tots els cultius de cianobacteris (Figura 1.4), eluïa després del pic 17d (mixoxantofil·la) en la Spherisorb-ODS1, mentre ho feia just abans en la YMC30.

En general però, les dues columnes separaven el mateix nombre de pics, només hi va haver una excepció que fou el pic 8 (oscil·laxantina) trobat en el cultiu d'*Oscillatoria rubescens*, que amb la YMC30 només es va poder detectar de manera temptativa.

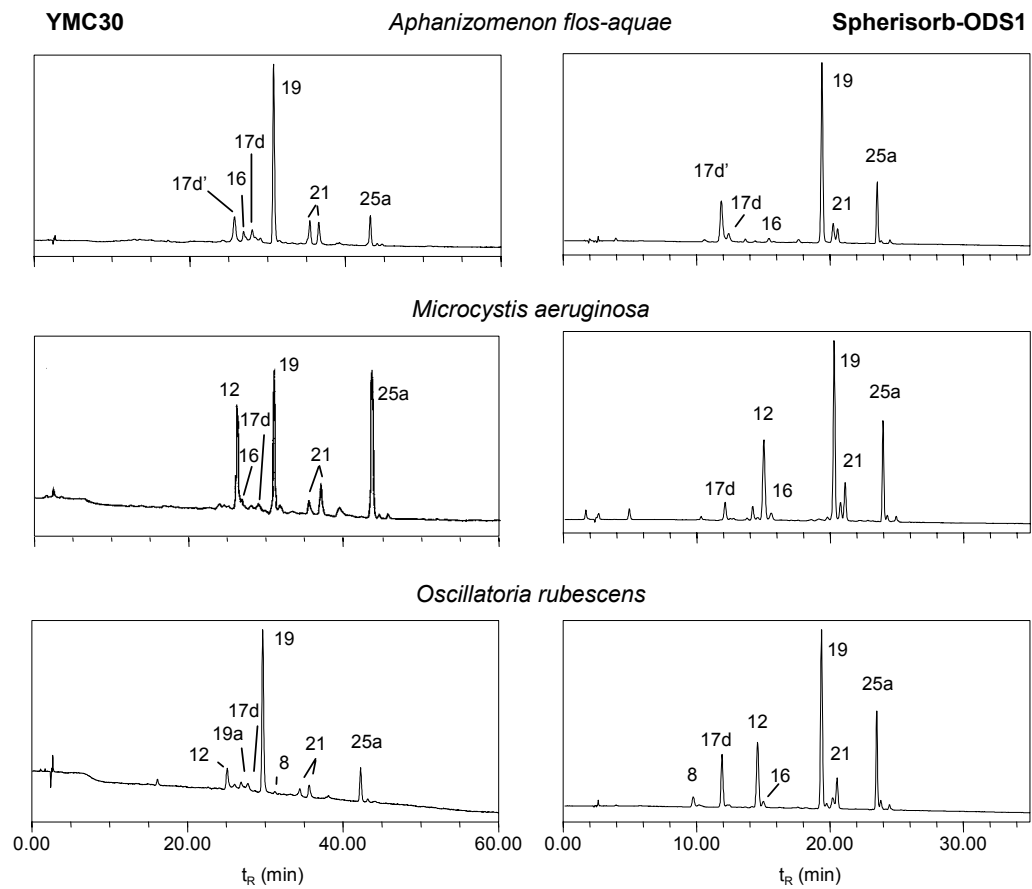


Figura 1.4. Cromatogrames obtinguts en cada columna cromatogràfica a partir dels cultius mono-específics de cianobacteris. Detecció a 440 nm. Els codis corresponen als pigments oscil·laxantina (8), zeaxantina (12), afanizofil·la (17d'), cantaxantina (16), mixoxantofil·la (17d), alòmer 1 de Chl-a (19a), Chl-a (19), equinenona (21) i β,β -carotè (25a).

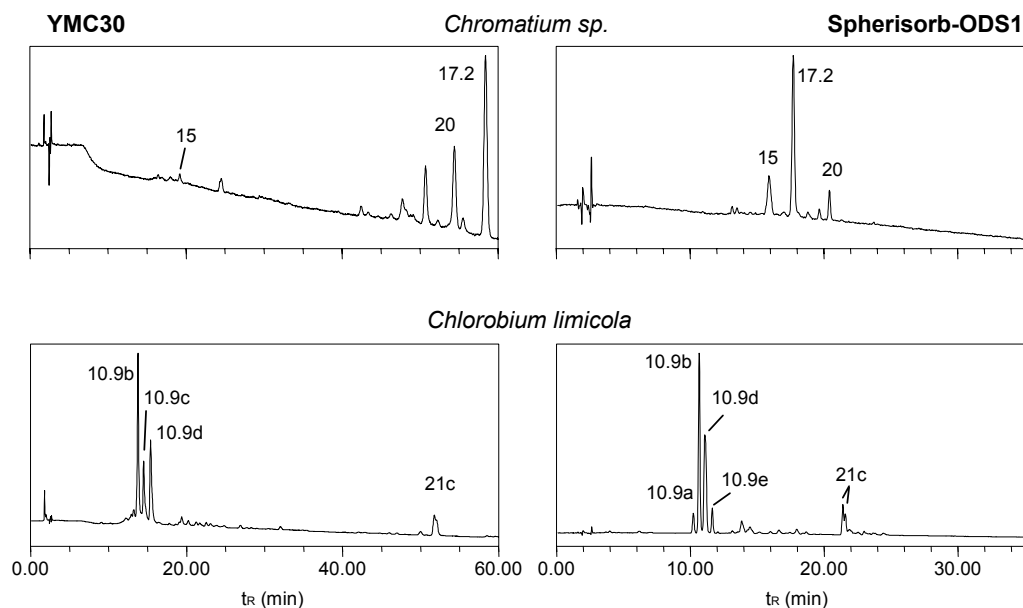


Figura 1.5. Cromatogrames obtinguts en cada columna cromatogràfica a partir dels cultius mono-específics de bacteris fotosintètics. Detecció a 440 nm. Els codis corresponen als pigments bacteriolorofil·la c1 (10.9a), bacteriolorofil·la c2 (10.9b), bacteriolorofil·la c3 (10.9c), bacteriolorofil·la c4 (10.9d), bacteriolorofil·la c5 (10.9e), bacteriolorofil·la a (15), clorobactè (21c), oquenona (17.2) i oquenona2 (-like) (20).

Algues bentòniques, molses i macròfits

Els exemplars de mostres d'origen natural es van congelar amb N₂ líquid immediatament després de la seva recol·lecció. La composició de pigments es va analitzar al laboratori a partir del material fresc i descongelat. Es van analitzar tres exemplars de *Stigonema sp.* (Estigonematàcies, Cianobacteris) mostrejats en tres estanys situats a diferent altitud, i un exemplar de *Nostoc zetterstedtii* (Nostocàcies, Cianobacteris).

Les comunitats bentòniques litorals dels estanys d'alta muntanya reben una forta dosi de radiació ultraviolada (UV) (Vinebrooke i Leavitt, 1996). L'epiliton d'aquests ambients inclou espècies immòbils que no poden escapar a la radiació solar i que han desenvolupat estratègies com la formació de mates o la síntesi de pigments que de manera directa o indirecta absorbeixen l'energia UV, com la melanina, els carotenoides, la escitonemina, i els *mycosporine-like* amino àcids (MAAs).

La escitonemina, ha estat trobada en cianobacteris exposats a altes radiacions (Garcia-Pichel i Castenholz, 1991). Aquest pigment té una característica que el fa particular, el màxim d'absorció del seu espectre es troba situat a 386 nm, on comença la regió de la

llum ultraviolada. L'escitonemina (3a) era present en els quatre exemplars de cianobacteris que es van analitzar (Figura 1.6). La seva composició relativa respecte els altres pigments era inferior en l'estany situat a menor altitud. A l'efecte nociu de l'exposició cal afegir que els estanys d'alta muntanya reben en general un flux de radiació UV solar incident més alt que els estanys situats a menor altitud degut a l'augment natural del flux de radiació UV amb l'altitud (Blumthaler *et al.*, 1992). Així doncs l'efecte de l'altitud en aquests organismes es podria traduir en un augment del contingut relatiu de pigment fotoprotector.

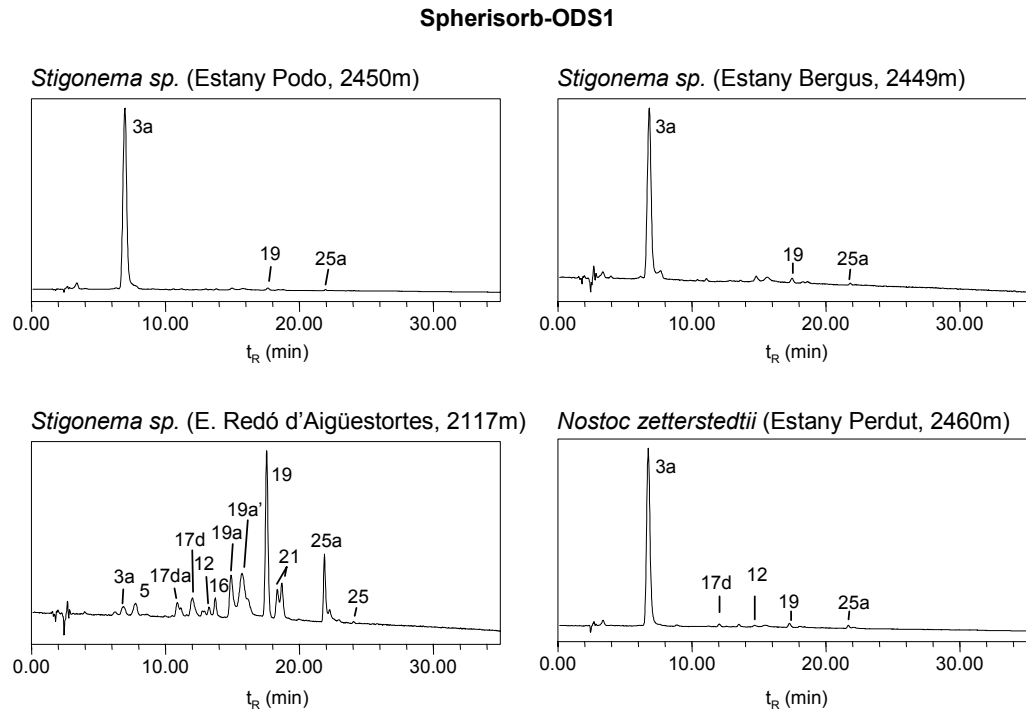


Figura 1.6. Cromatogrames obtinguts a partir de mostres d'origen natural de cianobacteris bentònics agafades en estanys situats a diferent altitud. Els codis corresponen als pigments escitonemina (3a), fucoxantina (5), xantofil·la no identificada (17da), mixoxantofil·la (17d), zeaxantina (12), cantaxantina (16), alòmer 1 de Chl-a (19a), alòmer 2 de Chl-a (19a'), Chl-a (19), equinenona (21) i β , β -carotè (25a). Columna: Spherisorb-ODS1. Detecció a 440 nm.

Els cromatogrames obtinguts d'analitzar l'extracte d'una espècie de molsa, *Fontinalis squamosa* (Fontinalàcies, Briòfits) i d'un macròfit, *Isoetes setacea* (Isoetàcies, Pteridòfits), presentaven com era d'esperar una composició de pigments molt semblant tot i que en la molsa apareixien pics que corresponien a pigments de diatomees com les clorofil·les c1 (3) i c2 (5b) i la fucoxantina (5) degut a la presència d'alguna alga epífita (Figura 1.7). En el cromatograma d'*Isoetes setacea* es detectava feofitina a1 (25), un pigment de degradació

de la clorofil·la a que es pot trobar en petites quantitats en teixits fotosintètics de plantes vasculares (Goodwin, 1980).

En general, en els cromatogrames de tots els exemplars agafats al camp es detectaven petites quantitats d'alòmers de clorofil·la i en alguns casos clorofil·lides, productes tots ells de degradació de les clorofil·les que no havien estat detectats en els cultius monoespècífics.

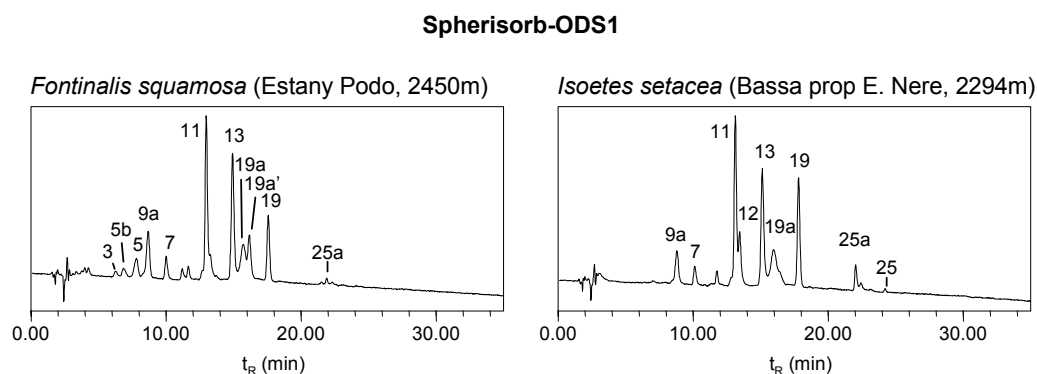


Figura 1.7. Cromatogrames obtinguts a partir de mostres de camp d'una espècie de molsa i d'un macrofit. Als codis de les altres figures cal afegir feofitina a1 (25).

Zooplànton

Es va realitzar un extracte a partir dels individus aïllats de tres espècies de zooplàncton de l'estany Redon seguint el mateix protocol que s'havia seguit per les mostres d'algues. L'anàlisi d'aquest extracte va permetre conèixer el t_R de l'astaxantina (9z) en els dos sistemes cromatogràfics i les diferències en les proporcions de pigments entre les tres espècies. En l'extracte de *Daphnia pulicaria* els pigments majoritaris eren l'equinenona (21) que representava un 34.11% del total de pigments liposolubles, la cantaxantina (16) un 18.35% i l'astaxantina un 11%. Tant en l'extracte de *Cyclops abyssorum* com en el de *Diaptomus cyaneus*, l'astaxantina (9z) era el pigment més abundant (43.8% i 27.07% respectivament). La cantaxantina només representava un 0.6% del total de pigments liposolubles en *Cyclops abyssorum* i no va ser detectat en els extractes de *Diaptomus cyaneus*. En l'extracte de *Diaptomus cyaneus* i també en el realitzat a partir d'una mostra d'ous de la mateixa espècie, apareixien entre els 19 i 28 minuts d'anàlisi tot un conjunt de carotenoides que no van poder ser identificats.

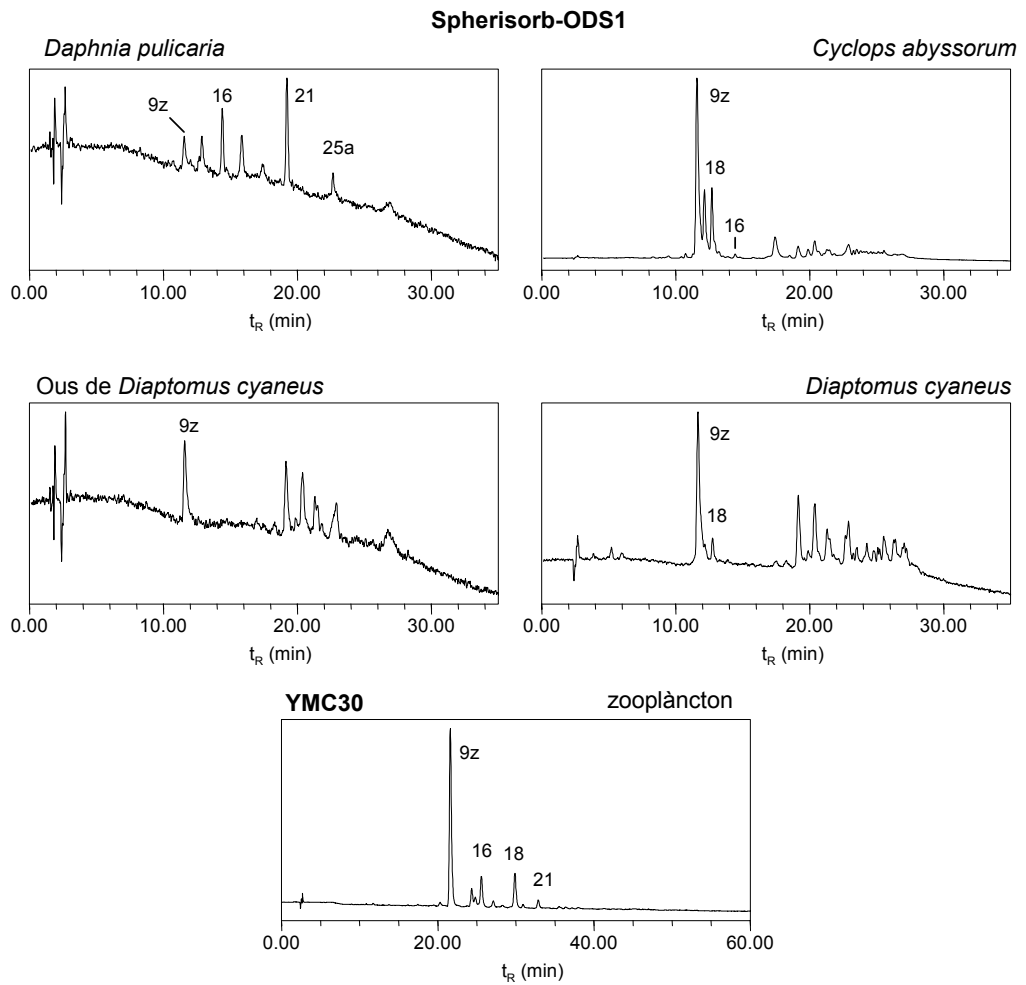


Figura 1.8. Cromatogrames obtinguts a partir de l'anàlisi de tres espècies de zooplàncton de l'estany Redon. Les tres espècies i els ous de *Diaptomus cyaneus* es van analitzar per separat amb la columna Spherisorb-ODS1, mentre que amb la YMC30 es van analitzar conjuntament en una sola mostra. Detecció a 440 nm. Els codis dels pigments corresponen amb els de les figures anteriors, astaxantina (9z).

Identificació i quantificació de pics

Els criteris per a la identificació d'un pic van ser el temps en que apareixia el pic en el cromatograma o temps de retenció (t_R) i l'espectre d'absorció. Els pigments identificats i les seves característiques cromatogràfiques es troben a la taula 1.4.

Els carotenoides i clorofil·les en solució segueixen l'equació de la llei de Beer-Lambert,

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

On A és l'absorbància de la solució (sense unitats donat que $A = \log_{10} I_0/I$, on I_0 i I són la radiació incident i la radiació després de travessar la mostra respectivament), ε l'absortivitat molar o coeficient d'extinció ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l el pas de llum de la cubeta del detector (cm) i c la concentració de solut (mol L^{-1}).

El coeficient específic d'extinció en clorofil·les (α ; $L \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) és l'absorbància que presenta 1 gram de pigment per litre de solució en la longitud d'ona on es dona el màxim d'absorció (λ_{max}) utilitzant una cubeta d'un centímetre de pas de llum. Per als carotenoides és més convencional utilitzar l'extinció d'una solució a l'1% (pes/volum) ($E^{1\%_{1\text{cm}}}$; $100 \text{ mL g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Els coeficients d'extinció han estat calculats per un nombre considerable de pigments (Davies, 1976; Rowan, 1989; Jeffrey *et al.*, 1997; Borrego *et al.*, 1999) tot i que sovint la informació es veu limitada a un nombre reduït de dissolvents.

Límits de detecció i de quantificació

El límit de detecció es defineix com la quantitat de mostra que produeix un senyal dues vegades més alt que el senyal que produeix el soroll de la línia base (Figura 1.9). El límit de detecció depèn del volum extractat, del volum injectat i del pigment en particular (Mantoura i Llewellyn, 1983). Per altra banda, el límit de quantificació es defineix com la quantitat de mostra que produeix un senyal 10 vegades més alt que el produït pel soroll de la línia base, el que assegura una quantificació correcta de quantitats traça amb una variància inferior al 2%.

Protocol d'identificació i quantificació

El protocol que es va seguir per identificar i quantificar els pics dels cromatogrames va ser: (i) es revisaven els cromatogrames i es reintegraven si calia manualment; (ii) s'exportaven les dades a una base de dades Access; (iii) es codificaven tots els pics, el codi era un número que representava el temps de retenció; (iv) s'identificava els pics en base a la informació del catàleg, quan els criteris d'identificació no encaixaven exactament s'afegia el sufix -like (per exemple Cantaxantina-like, és un pigment amb el mateix t_R que la cantaxantina però amb un espectre d'absorció lleugerament diferent), quan un pigment no podia ser identificat s'anomenava amb un codi que incloïa un prefix que l'identificava com a carotenoide (Car) o forbina (Ph) seguit del temps de retenció en que havia eluït en el sistema cromatogràfic en el que primer s'havia trobat; (v) es quantificaven tots els pics utilitzant els coeficients d'extinció de la bibliografia recopilats a la taula 1.5, també es quantificaven els no identificats utilitzant en aquest cas com a valors de coeficient d'extinció $E=2000$ pels carotenoides (Mantoura i Llewellyn, 1983) i el valor d'aquell pigment més semblant pel que fa a característiques espectrals en el cas de pigments clorofil·lics.

Els càlculs de les concentracions de pigment en sediment es van obtenir utilitzant:

$$C = A_p \cdot (1 / V_{inj}) \cdot (V_{ext} / P_{dw}) \cdot F \cdot (1 / 6 \cdot E) \quad (4)$$

on C és la concentració de pigment ($\mu\text{g g}^{-1}$ pes sec), A_p és l'àrea de pic ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$), V_{inj} és el volum injectat (μL), V_{ext} és el volum de l'extracte (mL), P_{dw} és el pes sec de sediment extractat (g), F és el flux en que circula la fase mòbil (mL min^{-1}) i E és el coeficient específic d'extinció ($E^{1\%_{1\text{cm}}}$; $100 \text{ mL g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); tenint en compte que la relació absorbància/voltatge en l'aparell és de 1/1 i el pas de llum del sistema de detecció és de 1 cm.

Per calcular les concentracions en un volum d'aigua es substituïa la variable P_{dw} pel volum d'aigua filtrat (V_{filt} ; L) i la concentració de pigment s'expressava en $\mu\text{g L}^{-1}$.

L'expressió de la concentració de pigment en nmols es va realitzar utilitzant el pes molecular de la taula 1.5. Quan es desconeixia el pes molecular s'utilitzava un valor de 900 i un de 500 per forbines i carotenoides respectivament.

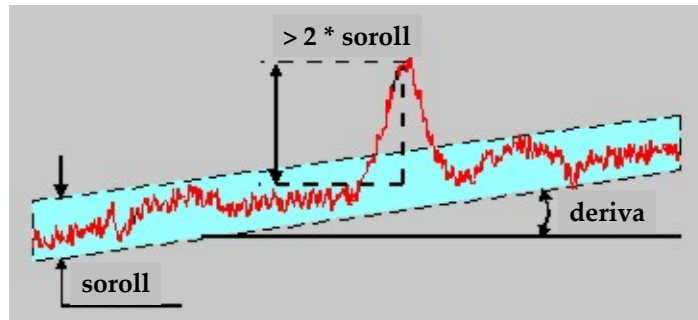


Figura 1.9. Línia base d'un cromatograma on es veu l'amplitud del soroll en relació a l'alçada de pic i la deriva del cromatograma.

Taula 1.4. Pigments separats utilitzant una modificació del mètode de Kraay *et al.* (1992) (vegeu detalls del gradient a la Figura 2.10; Capítol 2). Característiques cromatogràfiques: temps de retenció (t_R) en que eluïa cada pic amb la columna Spherisorb-ODS1 (SPHER) i amb la columna YMC30 (YMC) i espectre d'absorció dividit en 7 regions segons el rang de longitud d'ona (λ ; nm). Tipus de mostra: Cultius (C); Columna d'aigua (W), Sediment (S, RCA144, Bald11YMC), Zooplàncton (Z), Algues bentòniques (Ba), Molles (Mo), Macròfits (Ma). Amb la columna YMC30 l'oscil·laxantina només va poder ser identificada temptativament (31.1*).

SPHER	YMC	codi	pigment	UV-A	λ (nm)						Tipus de mostra
					I	II	III	IV	V	VI	
3.41		3.3	Car3_3	359					673		S
4.17		0	Clorofil·lida a	432					665		W, S
4.90		4.9	UV-A1	383							S
6.29	(11.2)	3	Clorofil·la c1		441				635		C, W, S
6.85	(14.1)	5b	Clorofil·la c2		446				636		C, W, S
7.30	(12.1)	4a	Peridina			472					C, W
7.38	(10.4)	3a (7.8)	UV-A2 (Escitonemina)	387							W, S, Ba, (RCA144)
8.06	(13.3)	5	Fucoxantina		449						C, W, S
9.60	(16.3)	9a	Neoxantina	418	442	468					C, W, S, Mo, Ma
9.86	(4.29)	2	Feofòrbid b1	433					648		S
9.90		9.9a	Bacteriolorofil·la e1			474			663		W, S
10.01	(31.1*)	8	Oscil·laxantina		452	497	531				C, S (Bald11YMC)
10.10		10.9a	Bacteriolorofil·la c1	434					667		C
10.30		9.9b	Bacteriolorofil·la e2			470			650		W, S
10.33	(4.92)	1a	Feofòrbid a1	411					664		S
10.50	(13.8)	10.9b	Bacteriolorofil·la c2	434					666		C
10.55	(8.77)	2a	Feofòrbid b2	435					657		S
10.80		9.9c	Bacteriolorofil·la e3			471			661		W, S

Taula 1.4. Continuació.

SPHER	YMC	codi	pigment	UV-A	λ (nm)						Tipus de mostra	
					I	II	III	IV	V	VI		
10.90	(14.5)	10.9d	Bacterioclorofil·la c3		438					667		C
11.02	(15.8)	7	Violaxantina		417	443	470					C, W, S, Mo, Ma
11.09		1b	Feofòrbid a3		410					668		W, S
11.29	(17.6)	7dP	Dinoxantina			440	472					C
11.43	(9.61)	1	Feofòrbid a2		412					664		W, S
11.50	(15.4)	10.9e	Bacterioclorofil·la c4		435					666		C
11.82	(21.6)	9z	Astaxantina				478					W, S, Z
12.00	(21.3)	10a	Diadinoxantina			448	477					C, W, S
12.03	(25.8)	17d'	Afanizofil·la			450	478	508				C, S
12.30	(27.7)	17d	Mixoxantofil·la			451	476	509				C, W, S
12.60	(28.9)	18	Al·loxantina			453	482					C, W, S
13.16	(26.7)	17	Diatoxantina			451	482					C, W, S
13.30		9.9d	Bacterioclorofil·la e4				471			660		W, S
13.36	(23.4)	11	Luteïna			447	475					C, W, S, Mo, Ma
13.67	(25.1)	12	Zeaxantina			452	482					C, W, S, Mo, Ma
13.99	(25.7)	16	Cantaxantina				472					C, W, S, Z
14.24		16P	Car16P				474					W, S, Z
15.00	(19.2)	15B	Bacterioclorofil·la a	371							780	C
15.50	(26.7)	13	Clorofil·la b				462			649		C, W, S, Mo, Ma
15.59	(26.7)	19a	Al·lomer1 Chla		431					663		Ba, W
16.60		1c	Feofòrbid a4		412					665		W, S
17.00		9.9e	Ph9_9e		440					650		S
17.19	(27.5)	19a'	Al·lomer2 Chla		431					665		Ba, W

Taula 1.4. Continuació.

SPHER	YMC	codi	pigment	λ (nm)						Tipus de mostra	
				UV-A	I	II	III	IV	V		VI
17.40		17.3	Car17_3			440	474				S
17.70	(58.4)	17.2	Oquenona				487	516			C, S
17.80		9.9f	Ph9_9f			443			661		S
18.40		9.9g	Ph9_9g			443			665		S
19.00	(30.1)	19	Clorofil·la a		431				663		C, W, S, Ba, Mo, Ma
19.03		19e	Epimer1 Chla		431				663		W, S
19.26		19e'	Epimer2 Chla		433				663		S
19.71		18.9	Isorenieratè			453	480				S
20.00	(35.7)	21	Equinenona			459	462				C, S, Z
20.10		20.1	Isorenieratè2				482				S
20.10	(54.4)	20	Oquenona2 (-like)				489	520			C
20.90		9.9h	Ph9_9h			441					S
21.20		9.9i	Ph9_9i			445					S
21.80	(51.8)	21c	Clorobactè				463	493			C
23.00	(32.8)	20d	β , ϵ -carotè			448	475				C, W, S
23.30	(41)	25a	β , β -carotè			454	480				C, W, S, Ba, Mo, Ma
23.60		9.9K	Ph9_9k			443			660		S
23.70		20d'	Car20d'		432	448	472				W, S
23.73		B'	Bacteriofeofitina a	358	(409)	(439)		(543)		748	S
24.00	(39)	23	Feofitina b1		435				651		W, S
25.00	(41)	25	Feofitina a1		410				665		W, S
26.00	(48)	26	Feofitina b2		436				651		W, S
27.00	(49.5)	28	Feofitina a2		410				665		W, S

Taula 1.5. Coeficients específics d'extinció (E ; $100 \text{ mL g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en la banda d'absorció del blau (E_{SOBRET}) i en la del vermell (E_{QY}) a longituds d'ona determinades (λ ; nm), utilitzats pels càlculs de les concentracions de pigments en aquest estudi. (PM) és el pes molecular del pigment.

Codi	Pigment	E_{SOBRET}	λ (nm)	Ref.	E_{QY}	λ (nm)	Ref.	Formulació	PM
3.3	Car3_3	2000						-	500
0	Clorofil·lida a	687	(440)	[1]	1270	(664)	[2]	$\text{C}_{35} \text{H}_{34} \text{N}_4 \text{O}_5 \text{Mg}$	615
4.9	UV-A1	2000							544
3	Clorofil·la c1	3180	(443)	[2]				$\text{C}_{35} \text{H}_{30} \text{N}_4 \text{O}_5 \text{Mg}$	611
5b	Clorofil·la c2	3740	(443)	[2]				$\text{C}_{35} \text{H}_{28} \text{N}_4 \text{O}_5 \text{Mg}$	609
4a	Peridinina	1360	(446)	[2]				$\text{C}_{39} \text{H}_{50} \text{O}_7$	631
7.8	UV-A2	2000						$\text{C}_{36} \text{H}_{20} \text{N}_2 \text{O}_4 (*1)$	544
5	Fucoxantina	1660	(443)	[2]				$\text{C}_{42} \text{H}_{58} \text{O}_6$	659
9a	Neoxantina	2374	(440)	[1]				$\text{C}_{40} \text{H}_{56} \text{O}_4$	601
2	Feofòrbid b1				464	(657)	[2]	$\text{C}_{35} \text{H}_{34} \text{N}_4 \text{O}_6$	607
9.9a	Bacteriolorofil·la e1	2209	(462)	[3]	584	(649)	[3]	$\text{C}_{50} \text{H}_{60} \text{N}_4 \text{O}_6 \text{Mg}$	837
8	Oscil·laxantina	2000						$\text{C}_{52} \text{H}_{76} \text{O}_{12}$	893
10.9a	Bacteriolorofil·la c1				914	(663)	[3]	$\text{C}_{49} \text{H}_{60} \text{N}_4 \text{O}_5 \text{Mg}$	809
9.9b	Bacteriolorofil·la e2	2173	(462)	[3]	574	(649)	[3]	$\text{C}_{51} \text{H}_{62} \text{N}_4 \text{O}_6 \text{Mg}$	851
1a	Feofòrbid a1	713	(440)	[1]	742	(667)	[2]	$\text{C}_{35} \text{H}_{36} \text{N}_4 \text{O}_5$	593
10.9b	Bacteriolorofil·la c2				898	(663)	[3]	$\text{C}_{50} \text{H}_{62} \text{N}_4 \text{O}_5 \text{Mg}$	823
2a	Feofòrbid b2				464				607
9.9c	Bacteriolorofil·la e3	2138	(462)	[3]	565	(649)	[3]	$\text{C}_{52} \text{H}_{64} \text{N}_4 \text{O}_6 \text{Mg}$	865
10.9d	Bacteriolorofil·la c3				884	(663)	[3]	$\text{C}_{51} \text{H}_{64} \text{N}_4 \text{O}_5 \text{Mg}$	837
7	Violaxantina	2400	(442)	[2]				$\text{C}_{40} \text{H}_{56} \text{O}_4$	601
1b	Feofòrbid a3	713			742				593

Taula 1.5.Continuació

Codi	Pigment	E _{SORET}	λ (nm)	Ref.	E _{QY}	λ (nm)	Ref.	Formulació	PM
7dP	Dinoxantina	2100	(442)	[2]				C ₄₂ H ₅₈ O ₅	643
1	Feoforbid a2	713			742				593
10.9e	Bacterioclorofil·la c4				869	(663)	[3]	C ₅₂ H ₆₆ N ₄ O ₅ Mg	851
9z	Astaxantina	2000						C ₄₀ H ₅₂ O ₄	597
10a	Diadinoxantina	2230	(447)	[2]				C ₄₀ H ₅₄ O ₃	583
17d'	Afanizofil·la	2000						C ₄₆ H ₆₆ O ₈	747
17d	Mixoxantofil·la	1989	(440)	[1]				C ₄₆ H ₆₆ O ₇	731
18	Al·loxantina	2000						C ₄₀ H ₅₂ O ₂	565
17	Diatoxantina	1634	(440)	[1]				C ₄₀ H ₅₄ O ₂	567
9.9d	Bacterioclorofil·la e4	2104	(462)	[3]	556	(649)	[3]	C ₅₃ H ₆₆ N ₄ O ₆ Mg	879
11	Luteïna	2550	(445)	[4]				C ₄₀ H ₅₆ O ₂	569
12	Zeaxantina	2340	(452)	[4]				C ₄₀ H ₅₆ O ₂	569
16P	Car16P	2000							565
15B	Bacterioclorofil·la a				757	(770)	[3]	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₆ Mg	912
13	Clorofil·la b	853	(440)	[1]	544	(647)	[4]	C ₅₅ H ₇₀ N ₄ O ₆ Mg	907
19a	Al·lòmer1 Chla	687			877				894
1c	Feoforbid a4	713			742				593
9.9e	Ph9_9e	1938			512				969
19a'	Al·lòmer2 Chla	687			877				894
17.3	Car17_3	2000							500
17.2	Oquenona	2320		[5]				C ₄₁ H ₅₄ O ₂	579
9.9f	Ph9_9f	1938			512				900
9.9g	Ph9_9g	1938			512				900
19	Clorofil·la a	687	(440)	[1]	877	(664)	[4]	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₅ Mg	894
19e	Epimer1 Chla	687			877				894

Taula 1.5.Continuació

Codi	Pigment	E _{SORET}	λ (nm)	Ref.	E _{Oy}	λ (nm)	Ref.	Formulació	PM
19e'	Epimer2 Chla	687			877				894
18.9	Isorenieratè	2000						C ₄₀ H ₄₈	500
21	Equinenona	1881	(440)	[1]				C ₄₀ H ₅₄ O	551
20.1	Isorenieratè2	2000							500
20	Oquenona2 (-like)	2000							579
9.9h	Ph9_9h	1938			512				900
9.9i	Ph9_9i	1938			512				900
21c	Clorobactè	2000						C ₄₀ H ₅₂	533
20d	β,ε-carotè	2700	(448)	[2]				C ₄₀ H ₅₆	537
25a	β,β-carotè	2209	(440)	[1]				C ₄₀ H ₅₆	537
9.9K	Ph9_9k	1938			512				900
20d'	Car20d'	2700							537
23	Feofitina b1	836	(440)	[1]	318	(657)	[2]	C ₃₅ H ₇₂ N ₄ O ₆	885
25	Feofitina a1	713	(440)	[1]	512	(667)	[2]	C ₃₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	871
26	Feofitina b2	836			318				885
28	Feofitina a2	713			512				871

[1] Mantoura i Llewellyn (1983)

[2] Jeffrey *et al.* (1997)[3] Borrego *et al.* (1999a; 1999b)

[4] Rowan (1989)

[5] Schmidt *et al.* (1965)

