

**Identificación de biomarcadores fitoplanctónicos utilizando espectrometría de masas
MALDI TOF con matrices de transferencia electrónica**

Luis Miguel Díaz Sánchez, Químico

Trabajo de grado presentado para obtener el título de Magister en Química

Directora:

Marianny Combariza Montañez, Química, Ph.D.

Co-director:

Cristian Blanco Tirado, Químico, Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A mis padres Piedad y William, porque al mirar hacia atrás siempre recuerdo cariño, guía y amor.

“Life is a fascinating journey. But sometimes the journey is more exciting than the destination”

Agradecimientos

A mi familia, por su apoyo en cada una de las etapas de mi vida.

A mi hermano Andrés, a Samuel por ser fuente de alegría.

A mi tío Carlos, por su vida de empatía hacia los demás.

A Leonardo, por acompañarme en este proceso.

A los profesores Marianny Y. Combariza y Cristian Blanco, por su guía y disponibilidad para el desarrollo de la investigación.

A mis compañeros y amigos del Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental (GIFTEX).

A todos mis amigos, por compartir su tiempo conmigo.

A la Universidad Industrial de Santander.

A COLCIENCIAS, por el apoyo financiero.

Tabla de contenido

Introducción	19
2. Marco referencial.....	22
2.1 Corales mesofóticos	22
2.2 Organismos fitoplanctónicos	24
2.3 Técnicas de extracción de pigmentos presentes en fitoplancton	31
2.4 Caracterización química de pigmentos presentes en fitoplancton	33
2.5 Espectrometría de masas	34
2.6 Antecedentes	39
3 Materiales y métodos.....	43
3.1 Materiales y reactivos	43
3.2 Recolección de las muestras de agua y análisis microscópico	45
3.3 Extracción sólido-líquido de los pigmentos fitoplanctónicos.....	47
3.4 Cromatografía líquida acoplada a espectroscopia ultravioleta visible.....	50
3.5 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF	52
4. Resultados y análisis	53
4.1 Análisis microscópico de las muestras de agua	53
4.3 Análisis por HPLC/UV-Vis del extracto crudo de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.	66
4.4 Análisis por espectrometría de masas LDI-TOF y MALDI TOF las fracciones polar y apolar de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.	75
4.6 Análisis por espectrometría de masas MALDI TOF de los pigmentos presentes en el extracto fitoplanctónico de agua de mar	101
5. Conclusiones	107
6. Recomendaciones	108
Referencias bibliográficas.....	109
Apéndices.....	116

Lista de Tablas

Tabla 1. Reactivos, materiales y equipos de laboratorio utilizados en la investigación.	43
Tabla 2. Variables y condiciones de extracción evaluadas en el diseño experimental.	48
Tabla 3. Condiciones para la obtención de los extractos de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos de muestras de agua fresca.	49
Tabla 4. Principales pigmentos reportados en microorganismos que pertenecen al género <i>Euglena</i> .	54
Tabla 5. Análisis microscópico de la muestra de agua de mar recolectada en el Caribe colombiano.	57
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos medidos en el momento de la toma de la muestra de agua de mar.	59
Tabla 7. Contenido de clorofila a en los extractos de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos de muestras de agua dulce.	62
Tabla 8. Identificación y cuantificación de pigmentos presentes en el extracto crudo de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca por HPLC/UV-Vis.	67

Tabla 9. Pigmentos presentes en la muestra de agua fresca y su asociación con microorganismos presentes en fitoplancton (tomado y modificado de Jeffrey et al. [28]).	72
Tabla 10. PI y masas para compuestos fotosintéticos característicos en fitoplancton.	77
Tabla 11. Pigmentos fitoplanctónicos identificados en la muestraa de fitoplancton de agua fresca, utilizando las matrices ET MALDI	90
Tabla 12. Comparación entre los pigmentos identificados análisis vía HPLC y MALDI TOF MS.	97
Tabla 13. Pigmentos fitoplanctónicos identificados en una muestra de fitoplancton de agua de mar, utilizando la matriz ET MALDI DCTB.	102
Tabla 14. Pigmentos específicos y representativos presentes en la muestra de agua de mar, relacionados con los diferentes grupos de fitoplancton (tomado y modificado de Jeffrey et al. [28]).	103

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de la clasificación taxonómica del fitoplancton	25
Figura 2. Estructuras químicas de algunas clorofilas presentes en fitoplancton.	27
Figura 3. Estructura química de los carotenoides.	28
Figura 4. Estructuras de interés en fitoplancton, clorofila a y ficocianina.	36
Figura 5. Esquema general de una fuente de ionización MALDI.	37
Figura 6. Estructura química de los derivados de α -cianofenilenvinilenos (α -CNFVs), reportados por el GIFTTEX como matrices MALDI de transferencia electrónica, donde R= - H, -Cl, -CH ₃ , -OCH ₃ , -N(CH ₃) ₂ o -NPh ₂ .	38
Figura 7. Número de publicaciones acerca de biomarcadores fitoplanctónicos. Periodo de búsqueda: 2000-2019. Fuente: Scopus (Elsevier). Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“phytoplankton AND biomarkers”). Fecha de consulta: 22 de septiembre de 2019.	39
Figura 8. Ubicación de las seis estaciones (Monito 1 a 6) establecidas por el PNN CPR en su programa de monitoreo en la localidad de Bajo Frijol.	46
Figura 9. Estructura química de la clorofila a (C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg), estándar externo utilizado para la cuantificación de clorofila a en los extractos de fitoplancton de agua fresca por espectroscopia UV-Vis.	50

Figura 10. Estructura química de luteína (C ₄₀ H ₅₆ O ₂), estándar interno utilizado para la cuantificación de carotenoides presentes en los extractos de fitoplancton por HPLC/UV-Vis.	51
Figura 11. Imágenes de microscopía óptica de las especies de fitoplancton presentes en las muestras de agua fresca recolectadas en el campus central de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.	53
Figura 12. Imágenes de microscopía óptica de las especies de fitoplancton presentes en las muestras de agua de mar recolectada en el Caribe colombiano.	58
Figura 13. Espectros UV-Vis de las fracciones no polar (A) y polar (B) de un extracto de pigmentos fitoplanctónicos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.	63
Figura 14. Gráfica de Pareto mostrando la influencia de factores experimentales individuales y sus combinaciones sobre la concentración de clorofila a presente en la fracción polar de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.	65
Figura 15. Coordenadas experimentales obtenidas a partir del diseño experimental 23 para la extracción de clorofila a presente en la fracción polar de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.	67
Figura 16. Cromatograma HPLC del extracto de pigmentos fitoplanctónicos obtenido mediante radiación de ultrasonidos con las mejores condiciones del	70

diseño experimental 2³, columna AT Eclipse XDB-C18 de 4,6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula en fase reversa, flujo: 1 mL/min, detector UV-Vis (λ=450 nm).

Figura 17. Estructuras químicas de la clorofila a (C₅₅H₇₂O₅N₄Mg) y la clorofila b (C₅₅H₇₀O₆N₄Mg), pigmentos fotosintéticos identificados y cuantificados mediante HPLC/UV-Vis en los extractos de pigmentos de fitoplancton en muestras de agua fresca. 71

Figura 18 A. Estructura química de la diadinoxantina (C₄₀H₅₄O₃), carotenoide de tipo xantofila identificado y cuantificado por HPLC/UV-vis en los extractos de pigmentos de fitoplancton en muestras de agua fresca. 75

Figura 18 B. LDI-TOF MS del extracto crudo de pigmentos fitoplanctónicos, las fracciones polar y no polar y la mezcla de ambas fracciones, utilizando soluciones a 5 mM de cada muestra, las líneas color naranja (-) entre m/z 500 y m/z 600 corresponden a señales correspondientes a carotenoides, las líneas color verde (-) entre m/z 860 y m/z 940 corresponden a las clorofilas. 78

Figura 19. Espectro LDI-TOF MS de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca utilizando una solución a 5 mM. 78

Figura 20. Estructura química de los derivados de α-cianofenilvinileno (α-CNFVs), reportados por el GIFTEx como matrices MALDI de transferencia electrónica, donde R= - CH₃ o -OCH₃ 80

- Figura 21.** Estructura química del trans-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB), matriz estándar de transferencia electrónica en MALDI MS. 80
- Figura 22.** Espectros MALDI-TOF MS de la fracción polar y no polar de pigmentos fitoplanctónicos; utilizando CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB como matrices ET MALDI, en relación M:A 100:1. 82
- Figura 23.** Ventana de acercamiento, entre m/z 530 y 550, del espectro de masas MALDI de la fracción no polar de pigmentos fitoplanctónicos, utilizando CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB como matrices de transferencia electrónica. 83
- Figura 24.** Superposición del patrón isotópico calculado en el software Compass Isotope Pattern (Bruker Daltonics) y el patrón isotópico experimental obtenido a partir de los ensayos MALDI del ion molecular del b-caroteno M⁺. = 536,4382, identificado en la fracción no polar, utilizando DCTB, relación M:A 100:1. 85
- Figura 25.** Valores de relación señal/ruido (S/N), medidos para el ion molecular correspondiente a la clorofila a, [M]⁺ = 892,5353, utilizando las matrices ET MALDI CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB, proporciones M:A: 100:1. 87
- Figura 26.** Superposición del patrón isotópico calculado en el software Compass Isotope Pattern (Bruker Daltonics) y el patrón isotópico 88

experimental obtenido a partir de los ensayos ET MALDI para ion molecular de la clorofila a m/z 892,5353, utilizando las matrices CNFVOCH₃ y DCTB, a una proporción 100:1 M:A.

Figura 27. Espectros MALDI-TOF MS de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos; utilizando DCTB como matriz ET MALDI, en relación M:A 100:1. 89

Figura 28. Descriptores analíticos medidos para el ion molecular de la clorofila a m/z 892,5353 de la fracción polar del extracto de fitoplancton, a diferentes valores de energía del láser, utilizando DCTB como matriz ET MALDI y una proporción M:A 100:1. 92

Figura 29. Estructura química de los principales pigmentos fitoplanctónicos identificados en la muestra de agua fresca por espectrometría de masas MALDI, utilizando las matrices CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB. 94

Figura 30. Acercamiento a las señales de iones metaestables en el rango m/z 650 a 715 del espectro de masas MALDI TOF, de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca, utilizando la matriz ET MALDI DCTB. 95

Figura 31. Espectros ET MALDI TOF MS de las fracciones de pigmentos colectados del cromatograma HPLC del extracto de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca. 99

Figura 32. Espectro MALDI-TOF MS de la mezcla de la fracción polar y no polar del extracto de pigmentos fitoplanctónicos presentes en la muestra de agua de mar, utilizando DCTB como matriz ET MALDI, relación M:A 100:1. 101

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

α -CNFV	α -Cianofenilenvinilenos
ANOVA	<i>ANalysis Of Variance</i> (Análisis de Varianza)
<i>ca.</i>	Circa (Aproximadamente)
CHCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> (Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico)
CHEMTAX	<i>CHEMical TAXonomy</i>
CNFVCH ₃	<i>α-Methyl-cyanophenylenevinylene</i> (α -Metilo-cianofenilenvinileno)
CNFVOCH ₃	<i>α-Methoxyl-cyanophenylenevinylene</i> (α -Metoxi-cianofenilenvinileno)
CPCD	<i>Coupled Physical and Chemical Dynamics</i> (Dinámica Física y Química acoplada)
DCTB	<i>trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene] malononitrile</i> (<i>trans-2-[3-(4-tert-Butilfenil)-2-metil-2-propenilideno]</i> malononitrilo)
DMF	Dimetilformamida
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EI	<i>Electronic Ionization</i> (Ionización electrónica)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electrospray)

BIOMARCADORES QUIMIOTAXONÓMICOS EN FITOPLANCTON

ET	<i>Electronic transfer</i> (Transferencia electrónica)
GIFTEX	Grupo de investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i> (Es decir)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Desorción/Ionización láser asistida por matriz)
MCE	<i>Mesophotic Coral Reef Ecosystems</i> (Ecosistemas de arrecifes de coral mesofófitos)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
PNN CPR	Parque Nacional Natural Corales de Profundidad
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TOF	<i>Time-of-flight</i> (Tiempo de Vuelo)
THF	Tetrahidrofurano

Resumen

Título: Identificación de biomarcadores fitoplanctónicos utilizando espectrometría de masas MALDI TOF con matrices de transferencia electrónica*

Autor: Luis Miguel Díaz Sánchez**

Palabras clave: Pigmentos, Biomarcadores, Clorofilas, Carotenoides, Espectrometría de Masas, MALDI, Transferencia electrónica.

Descripción: Los microorganismos fotosintéticos son la base de las cadenas tróficas y se encargan de fijar casi el 40% del CO₂ atmosférico. Adicionalmente, se estima que, como resultado de esta fijación, se produce gran parte del oxígeno atmosférico.

El objetivo de este trabajo fue identificar biomarcadores fitoplanctónicos (pigmentos fotoprotectores y fotosintéticos), en muestras de agua, utilizando matrices de transferencia electrónica en espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las muestras de agua fueron filtradas en filtros Whatman® de microfibra (GF/F, 47 mm, poro: 0.7 µm) para retener los microorganismos. Los pigmentos se extrajeron por radiación de ultrasonidos de los filtros usando una mezcla de EtOH:THF, 1:1(v/v), 0,1% NH₄OH, previa realización y análisis de un diseño experimental 2³. Los extractos se analizaron por UV-Vis, HPLC, LDI-MS y MALDI-MS. El análisis UV-Vis de los extractos mostró un espectro típico de absorción para clorofilas (400-800 nm) y carotenoides (400-500 nm). El análisis por HPLC permitió separar los principales componentes del extracto, identificar algunos pigmentos fitoplanctónicos y cuantificarlos. El análisis ET MALDI de los extractos mostró principalmente señales correspondientes a cationes radicales de pigmentos como: clorofila a y sus derivados, y carotenoides de tipo xantofila. Se evaluó el desempeño de diferentes matrices MALDI para el análisis de los pigmentos fitoplanctónicos.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora: Marianny Y. Combariza, Química Ph.D.
Co-director: Cristian Blanco Tirado, Químico Ph.D.

Abstract

Title: Identification of phytoplankton biomarkers using MALDI TOF mass spectrometry with electronic transfer matrices**

Author: Luis Miguel Díaz Sánchez**

Key words: Pigments, Biomarkers, Chlorophylls, Carotenoids, Mass Spectrometry, MALDI, Electronic Transfer.

Description: Photosynthetic microorganisms are the basis of trophic chains and are responsible for fixing almost 40% of atmospheric CO₂. Additionally, it is estimated that, as a result of this fixation, much of the atmospheric oxygen is produced.

The objective of this work was to identify phytoplanktonic biomarkers (photoprotective and photosynthetic pigments), in water samples, using electronic transfer matrices in MALDI-TOF mass spectrometry.

Water samples were filtered on Whatman® microfiber filters (GF/F, 47 mm, pore: 0.7 µm) to retain the microorganisms. The pigments were extracted by ultrasonic radiation from the filters using a mixture of EtOH:THF, 1:1 (v/v), 0.1% NH₄OH, after realization and analysis of an experimental design 23. The extracts were analyzed by UV -Vis, HPLC, LDI-MS and MALDI-MS. UV-Vis analysis of the extracts showed a typical absorption spectrum for chlorophylls (400-800 nm) and carotenoids (400-500 nm). The HPLC analysis allowed separating the main components of the extract, identifying some phytoplankton pigments and quantifying them. The ET MALDI analysis of the extracts showed mainly signals corresponding to radical cations of pigments such as chlorophyll a and its derivatives, and xanthophyll type carotenoids. The performance of different MALDI matrices for the analysis of phytoplankton pigments was evaluated.

*Final Project

**Science Faculty, Chemistry School, Director: Marianny Y. Combariza, Chemist, Ph.D.

Co-director: Cristian Blanco Tirado, Chemist, Ph.D.

Introducción

Los arrecifes de coral son ecosistemas subacuáticos complejos, formados por una estructura rígida de carbonato de calcio (CaCO_3), en una de sus formas cristalinas más abundante, la aragonita. Estas estructuras se forman principalmente, por aglomeraciones de esqueletos depositados por el coral *i.e.*, una colonia de organismos pequeños denominados pólipos (Delgadillo-Garzón & Zapata-Ramírez, 2009). La tasa de crecimiento y el tamaño de la estructura de CaCO_3 dependen de las condiciones ambientales; a saber, temperatura, basicidad, turbidez, entre otros (Sekerci & Petrovskii, 2015). Los ecosistemas de arrecifes coralinos están distribuidos en mares tropicales y subtropicales someros, con una gran diversidad de especies a lo largo de los océanos Atlántico, Pacífico e Índico (Andréfouët et al., 2006). Se clasifican en bordeantes, los cuales pueden convertirse en arrecifes de barrera, como la gran barrera de coral, con cerca de 3000 km de longitud, situada en el Este de Australia, el arrecife de coral más extenso del mundo, en el que habitan *ca.* 1500 especies de peces; el segundo en tamaño es el Sistema Arrecifal Mesoamericano, con una longitud de 800 km aprox., situado frente a las costas de Honduras, Guatemala, Belice y México; y los atolones, arrecifes circulares, que se encuentran lejos de la costa (Carlos, Botello, & Frejomil, 2009). Los arrecifes son considerados ecosistemas mega diversos, y son comparados con las selvas altas perennifolias, ubicadas en México; debido a que ambas son zonas con alta concentración de especies, que proporcionan refugio y alimento a los animales que las habitan (Delgadillo-Garzón & Zapata-Ramírez, 2009).

El Caribe colombiano, con aprox. 2900 km² de área coralina (Delgadillo-Garzón & Zapata-Ramírez, 2009), es una zona marítima que aparte de poseer gran belleza natural, es el hábitat de una gran cantidad de especies con alto valor económico y ambiental para el país. La

sobrevivencia de las especies marinas depende de cadenas tróficas robustas donde exista disponibilidad de nutrientes y alimentos para todos los integrantes del ecosistema, la base de estas cadenas la constituyen organismos fotosintéticos autótrofos como el fitoplancton que se encargan de fijar casi el 40% del CO₂ atmosférico. Adicionalmente, se estima que, como resultado de esta fijación, se produce gran parte del oxígeno atmosférico (Sekerci & Petrovskii, 2015).

Existen muchos estudios taxonómicos de fitoplancton, pero el número de investigaciones relacionadas con la caracterización molecular directa (en un solo paso) y detallada de los pigmentos fitoplanctónicos, es aún muy bajo. La mayoría de las investigaciones relacionadas con este tema, utilizan métodos de separación cromatográfica acoplados con espectroscopía UV-Vis; los cuales, requieren procedimientos complejos de preparación de la muestra, con múltiples etapas, alto consumo de solventes y de tiempo, además, en algunos casos, debido a la complejidad y variada naturaleza química de la muestra, estas metodologías no permiten detectar todos los componentes presentes.

En este documento se reportan los resultados de investigación relacionados con el desarrollo de una metodología de análisis directo (en un solo paso) para caracterizar los pigmentos aislados de muestras de fitoplancton marino, utilizando espectrometría de masas con fuente de ionización MALDI. Considerando que los pigmentos fotoprotectores y fotosintéticos presentes en el fitoplancton son moléculas lábiles, termoinestables, que se degradan fácilmente bajo condiciones normales de operación en otras fuentes de ionización, el uso de MALDI con matrices de transferencia electrónica asegura un proceso de ionización suave que garantiza la

sobrevivencia del ion molecular, como ha sido reportado anteriormente (Castellanos-García et al., 2017; Castellanos-Garcia, Combariza, & Blanco-Tirado, 2015; Ramírez-pradilla, Castellanos-garcía, Blanco-tirado, & Combariza, 2018). Utilizando esta aproximación analítica fue posible obtener información composicional de forma rápida, confiable y sin excesivo consumo de solventes, que permitió correlacionar los perfiles pigmentarios de las muestras de fitoplancton con la presencia de familias características de estos microorganismos en muestras de agua de mar.

El desarrollo de este proyecto contribuye al estudio de las comunidades fitoplanctónicas en Colombia y demuestra que es posible generar estrategias alternativas de análisis con aplicaciones interdisciplinarias. Por otra parte, el trabajo se enmarca dentro del proyecto de investigación *Ionización por transferencia electrónica en MALDI-MS: derivados ciano de fenilenvinileno y fluoreno como matrices para el análisis de compuestos lábiles, optoelectrónicos y polímeros*, financiado por Colciencias y el proyecto *Estudio de la comunidad zooplanctónica y caracterización molecular de fitoplancton en los ecosistemas de arrecifes coralinos mesofóticos del PNN Corales de Profundidad, Caribe colombiano* financiado por la VIE-UIS; ambos proyectos son ejecutados por el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales y el Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental, GIFTEX, de la Universidad Industrial de Santander. Como resultados adicionales a los presentados en el documento, se realizó una presentación en modalidad de poster en el 67th *ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, organizado por la Asociación Americana de Espectrometría de Masas (ASMS) en junio de 2019.

2. Marco referencial

2.1 Corales mesofóticos

Los arrecifes de coral son ecosistemas subacuáticos, formados principalmente por aglomeraciones de esqueletos depositados por organismos marinos invertebrados como el coral, que en su turno es una colonia de pólipos (Delgadillo-Garzón & Zapata-Ramírez, 2009). Los tejidos blandos de estos organismos alojan una población de algas llamadas zooxantelas, que habitan en relación simbiótica con el coral, así el pólipo protege a las algas y éstas le proporcionan alimento y oxígeno (Cortés, Murillo, Guzmán, & Acuña, 1984). Las zooxantelas, entre otras cosas, son las responsables de las tonalidades que se observan en el arrecife coralino, por lo que una disminución en su población, hace que el coral se vea blanco *i.e.*, *bleaching* del coral (Cortés et al., 1984). La tasa de crecimiento y la densidad de la estructura del coral, dependen de las condiciones ambientales; a saber, temperatura, basicidad, turbidez, entre otros (Bádenas & Aurell, 1999).

Dependiendo de la profundidad, los arrecifes de coral pueden clasificarse como someros o MCE (*Mesophotic Coral Reef Ecosystems*), estos últimos, ubicados entre los 30 y 200 m de profundidad, solo reciben una proporción muy pequeña de la radiación total que incide sobre la superficie marina. Los MCE se caracterizan por la presencia de corales zooxantelados, azooxantelados, esponjas, microalgas y una gran cantidad de microorganismos (Kahng et al., 2010), pero a diferencia de los arrecifes someros, presentan menor concentración de especies en un área coralina mayor. La baja intensidad lumínica bajo la que se desarrollan ha provocado

una serie de adaptaciones ecológicas, que permiten la vida fotótrofa a estas profundidades (Quiroga et al., 2015). Estas adaptaciones incluyen alteración en la velocidad de crecimiento que permiten maximizando el área de exposición para así recibir una mayor cantidad de radiación, lo que conduce a aumentar la relación fotosintética en condiciones de baja luminosidad. Adicionalmente, también se ha propuesto que algunos corales mesofóticos aumentan su tasa de heterotrofia *i.e.*, consumen zooplancton como mecanismo de adaptación [10][11](Bessell-Browne et al., 2014).

Estos ecosistemas naturales sufren amenazas tanto ambientales como antrópicas. Entre las primeras se encuentran la depredación, las tormentas, la competencia entre organismos y los ciclones; y las segundas corresponden a buceo, anclaje de botes, contaminación atmosférica y acuática, pesca excesiva, entre otros (Bongaerts et al., 2010). La contaminación atmosférica, particularmente el incremento de CO₂, ocasiona calentamiento del aire y el agua lo que afecta negativamente la simbiosis alga-coral produciendo la muerte de las zooxantelas y el blanqueamiento del arrecife (Lamb et al., 2018). De esta forma más del 70% de los arrecifes coralinos en el mundo han sido destruidos. Ante este panorama es fundamental desarrollar herramientas analíticas que permitan obtener información rápida y confiable que permita toma de decisiones informadas con relación, por ejemplo, a procesos de restauración de los arrecifes afectados.

Debido a la importancia de los MCE y, con el objetivo de proteger este tipo de ecosistemas marinos, en el 2013 se creó el Parque Nacional Natural Corales de Profundidad (PNN CPR) frente al golfo de Morrosquillo y al archipiélago de San Bernardo, Sucre y

aproximadamente a 30 km de la península de Barú, Bolívar. El parque cuenta con *ca.* 140 mil hectáreas, entre 30 y 800 m de profundidad (Maldonado & Cuervo-Sánchez, 2016) y abarca el 67% de las formaciones coralinas de profundidad del Caribe colombiano (“Parque Nacional Natural Corales de Profundidad,” 2018). Además, se ha reportado una aproximación de la comunidad zooplanctónica en el sector de Bajo Frijol del parque, que sugiere que los grupos zooplanctónicos propios de los MCE, difieren de los que se encuentran en zonas someras del arrecife (Contreras, Henao, & Navas, 2017), estos resultados muestran la necesidad de estudiar estos ecosistemas en nuestro país.

2.2 Organismos fitoplanctónicos

El fitoplancton es una comunidad de organismos con amplia diversidad, modulada por los cambios a escala temporal que ocurren en las zonas donde se encuentren. Los organismos que componen la comunidad fitoplanctónica exhiben amplias variaciones en tamaños y volúmenes, factores que determinan sus tasas de crecimiento, hundimiento, evasión a la depredación y captura de nutrientes, entre otros (Capblancq & Catalan, 1994). El fitoplancton responde al cambio constante de las condiciones físicas y químicas de su ambiente, presentando fluctuaciones en sus características poblacionales como abundancia y composición de especies. Por ejemplo, en el trópico la composición del fitoplancton varía significativamente en las épocas de lluvias y sequía (Horne & Goldman, 1994).

La característica común de estos organismos está en su capacidad fotosintética; sin embargo, las investigaciones sobre la estructura y dinámica ecológica del fitoplancton dependen en gran parte de estudios taxonómicos donde se agrupan los organismos a nivel de clase u orden

(Traverso, Schau, Lehmann, & Finkbeiner, 2011). No obstante, en muchos casos los organismos que se encuentran relacionados filogenéticamente usualmente no presentan los mismos requerimientos ambientales, como tipo de nutrientes o luz (Webb & Ackerly, 2002). Aunque aún existen desacuerdos sobre su clasificación, en la actualidad hay consenso en que el fitoplancton está compuesto por algas (eucariotas) y cianobacterias (procariotas), como se muestra en la **Figura 1** (“Fundamentals of Environmental Measurements,” 2014). Por lo tanto, el enfoque taxonómico no es el más preciso para reflejar el desempeño ecológico de los organismos en el ambiente (Figueredo & Giani, 2009).

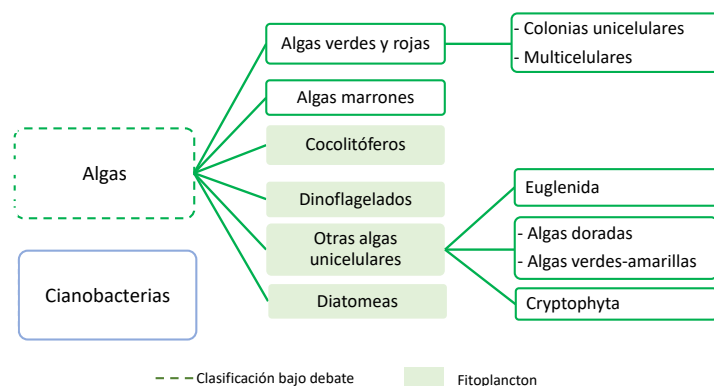


Figura 1. Esquema de la clasificación taxonómica del fitoplancton (tomado y modificado de (“Fundamentals of Environmental Measurements,” 2014)).

El fitoplancton hace parte fundamental del ecosistema coralino debido a que son los principales productores primarios, capaces de fijar carbono disuelto mediante reacciones fotosintéticas, y forman parte de la dieta de muchos de invertebrados bentónicos. Además, su estudio es de gran utilidad ya que constituyen un excelente bioindicador, pues responden rápidamente a los cambios que ocurren en las masas de agua por procesos naturales y antrópicos (Castresana-Pérez, Villamizar, Varela, & Fuentes, 2014). Las reacciones fotosintéticas involucran la absorción de energía solar, en forma de fotones de radiación visible, mediante

pigmentos especializados que inician una cascada de reacciones que finalizan con la biosíntesis de moléculas complejas del tipo $C_nH_{2n}O_n$. Debido al rol fundamental de estos organismos en los ciclos del carbono, del agua y del oxígeno, el monitoreo de su actividad y composición ya sea mediante mediciones satelitales o la determinación directa de los pigmentos -para análisis quimiotaxonómico- son de vital importancia en estudios oceanográficos.

El fitoplancton contiene en general tres tipos de pigmentos fotosintéticos, clorofilas, carotenoides y biliproteínas, con la capacidad de absorber radiación solar además de servir como fotoprotectores (Simon Wright & Jeffrey, 2006). Las estructuras químicas y propiedades de estos compuestos se han reportado en la literatura, al igual que su metabolismo, su biosíntesis y algunas de sus aplicaciones en oceanografía (Larkum, 2006)(Roy, Llewellyn, Skarstad, & Johnsen, 2011)(Jeffrey, Mantoura, & Wright, 1997). El fitoplancton contiene uno o más tipos de clorofilas, que hacen parte de los complejos que permiten la absorción de luz en los cloroplastos. Las clorofilas son complejos de coordinación de magnesio con tetrapirroles cíclicos conjugados con un quinto anillo isocíclico, y a menudo un alcohol esterificado de cadena larga, como se muestra en la **Figura 2** (Simon Wright & Jeffrey, 2006). En las clorofilas, el átomo de magnesio central está unido a los átomos de nitrógeno de los anillos del pirrol, pero también puede unirse en cualquier lado del plano del macrociclo a moléculas donoras de electrones (*e.g.* agua, proteínas o uno de los grupos ceto de otra molécula de clorofila). Las clorofilas se diferencian por el tipo de cadenas laterales y por el estado de oxidación del macrociclo, el cual puede ser una porfirina, con anillos insaturados (familia de clorofila c); una clorina, con un anillo reducido (clorofilas a, b y d); o una bacterioclorina, con dos anillos reducidos (Simon Wright & Jeffrey, 2006). La clorofila b se diferencia

estructuralmente de la clorofila a, por tener un aldehído en lugar de un metilo como ramificación de un carbono del macrociclo, este cambio estructural altera sus propiedades espectrales y aumenta su polaridad y estabilidad a la fotooxidación (Larkum, 2006).

Por otra parte, los carotenoides, comprenden una amplia familia de pigmentos de tipo isoprenoide que presentan coloración amarilla, naranja o roja, entre los que se encuentran los carotenos (hidrocarburos) y las xantofilas (derivados de carotenoides oxigenados). Muchos de estos compuestos participan en la absorción de luz con longitudes de onda azul y verde ($\lambda = 420\text{-}550\text{ nm}$). Además, algunos carotenoides son fotoprotectores, especialmente violaxantina, antraxantina y zeaxantina en algas verdes. Estos pigmentos son taxonómicamente útiles, pero varían cuantitativamente debido a que su abundancia puede cambiar rápidamente como respuesta a variaciones en la intensidad de la radiación (Simon Wright & Jeffrey, 2006).

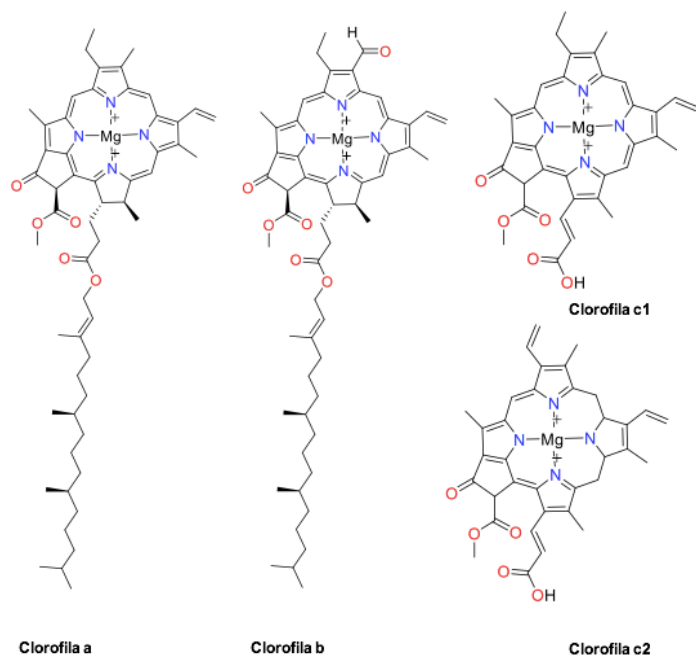


Figura 2. Estructuras químicas de algunas clorofilas presentes en fitoplancton.

La mayoría de los carotenoides tienen como estructura básica una cadena C_{40} con enlaces simples y dobles alternados que constituyen la unidad cromófora, responsable de las características espectrales de la molécula (Véase **Figura 3**). Estos compuestos son particularmente lábiles pues se hidrolizan fácilmente. Casi todos los carotenoides presentes en el fitoplancton se encuentran en su forma *trans*-, correspondiente a moléculas lineales. Sin embargo, al ser extraídos con solventes orgánicos, se forma una mezcla *cis*- y *trans*-, en equilibrio, donde la forma *cis*- está doblada exponiendo sus cadenas intermedias (generalmente hidrofóbicas), lo que dificulta la separación cromatográfica debido a que cambia la interacción con la fase estacionaria, retardando la elución en sistemas de HPLC de fase inversa, produciendo picos adicionales que dificultan el análisis de mezclas de pigmentos [23][25].

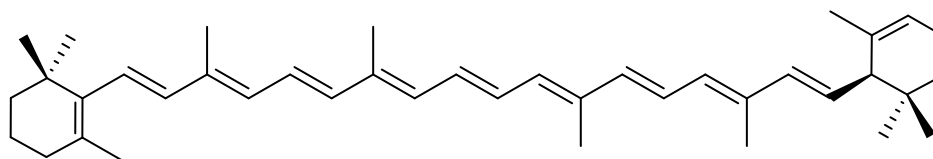


Figura 3. Estructura química de los carotenoides.

Muchos derivados de los pigmentos fitoplanctónicos se encuentran de forma natural en las vacuolas de las células; sin embargo, se pueden formar algunos artefactos durante el proceso de extracción. Por ejemplo las feofitinas, clorofilidas y feoforbidas se producen cuando la clorofila pierde el átomo de Mg central, la cadena de fitol o ambas, respectivamente. Adicionalmente estos pigmentos pueden reorganizarse espontáneamente produciendo

epímeros. Por estas razones, cuando se trata de su análisis molecular, es necesario encontrar condiciones de extracción que minimicen la formación de este tipo de artefactos (Simon Wright & Jeffrey, 2006).

En investigación oceánica, los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores actúan como biomarcadores para elucidar el estado del ecosistema. Debido a la gran diversidad taxonómica de las especies que componen el fitoplancton, existe una cantidad considerable de pigmentos, por ejemplo, el análisis detallado de pigmentos en una muestra de agua o sedimento marino permite no solo determinar la variabilidad taxonómica y composición de la microbiota, sino también establecer relaciones en la cadena trófica, flujo másico, radiación UV, y en algunos casos impactos antropogénicos sobre los ecosistemas [25][26]. La mayoría de los estudios sobre pigmentos se basan en métodos analíticos espectrofotométricos y cromatográficos, aunque también existen algunas investigaciones basadas en métodos genómicos, estudios cristalográficos de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS). Sin embargo, como se ha expuesto en este documento, aún hay muchos problemas y falencias en el análisis de pigmentos en fitoplancton, que pueden ser mejoradas con el desarrollo y uso de nuevas metodologías analíticas que permitan obtener información sobre la distribución, estructura y composición de estas moléculas (T. Suzuki, Midonoya, & Shioi, 2009)(Persson et al., 2000).

Además de los análisis de las estructuras de los pigmentos fitoplanctónicos, mediante las técnicas mencionadas anteriormente, también se han reportado correlaciones taxonómicas de comunidades enteras de fitoplancton, utilizando inicialmente análisis de componentes

principales (PCA), una técnica muy utilizada en estadística, para describir grandes conjuntos de datos (Kaneta, Levandowsky, & Esaias, 1985). En estos estudios se puede relacionar la abundancia de taxones de fitoplancton con variables ambientales como salinidad, temperatura del agua, profundidad y especies presentes (Gould, Balmori, & Fryxell, 1986). Con el uso de este tipo de métodos multivariados es posible describir patrones de evolución y dinámicas de las comunidades fitoplanctónicas. Adicionalmente, se han utilizado análisis de varianza (ANOVA-bidireccional) para establecer diferencias entre las poblaciones verticales y estacionales (LIRA, MOURA, VILAR, CORDEIRO-ARAÚJO, & BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2014).

Actualmente, para determinar si hay o no asociaciones entre el fitoplancton y variables ambientales, se utilizan técnicas estadísticas como el Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) (LIRA et al., 2014), que permite establecer relaciones multidimensionales entre múltiples variables independientes y dependientes. Adicionalmente, gracias a programas más sofisticados como *CHEMical TAXonomy* (CHEMTAX) (Goela et al., 2014) se puede llegar a diferenciar entre las clases más pequeñas del fitoplancton (0-20 μm), que no pueden identificarse por el microscopio fácilmente (Goela et al., 2014). El CHEMTAX, que es uno de los métodos más utilizados para derivar información taxonómica a partir de datos cuali- y cuantitativos relacionados con los pigmentos presentes en muestras de fitoplancton. El programa calcula la abundancia de clases de microorganismos presentes en una muestra de fitoplancton a partir de datos sobre clorofilas y carotenoides derivados de análisis cromatográfico. CHEMTAX usa análisis factorial y un algoritmo de descenso acelerado para determinar la composición taxonómica de la muestra con base en estimaciones iniciales de las

clases de microorganismos presentes (Goela et al., 2014). Este método no presenta las dificultades propias de los algoritmos anteriores (Gieskes, Kraay, Nonthi, Setiapermana, & Sutomo, 1988), los cuales no consideraban posibles cambios en las proporciones de los pigmentos, relacionados con la adaptación a la luz, lo cual imposibilitaba el uso de estos compuestos como huellas para la diferenciación entre las clases de fitoplancton (Goela et al., 2014).

2.3 Técnicas de extracción de pigmentos presentes en fitoplancton

La caracterización de los pigmentos fitoplanctónicos depende de la efectividad de la técnica de extracción. Sin embargo, a pesar de la importancia de este paso, es difícil establecer condiciones de operación estándar, por lo que normalmente se usan técnicas de extracción con diferentes rendimientos. Aún existe discusión acerca de las mejores técnicas físicas de extracción (*e.g.* molienda, maceración, sonicación o remojo) y los solventes más adecuados (*e.g.* acetona, etanol, metanol, dimetilformamida (DMF)). Los criterios más relevantes en el proceso de aislamiento de los pigmentos son el pretratamiento de la muestra, la capacidad (rendimiento) de extracción, la compatibilidad del extracto obtenido con la técnica analítica y la estabilidad de los pigmentos en el solvente de extracción (Simon Wright & Jeffrey, 2006).

La extracción líquido-líquido, una de las técnicas de pre-concentración más antiguas, es ampliamente utilizada para la separación de pigmentos. Entre las ventajas de esta técnica se encuentra su aplicación en muestras que contengan concentraciones variables (desde altas concentraciones hasta trazas) de los compuestos de interés, aunque una de las desventajas es su

difícil automatización (Müller, Berger, Blass, & Sluyts, 2005). El solvente orgánico utilizado, debe ser escogido dependiendo de la naturaleza y concentración del analito, estas variables afectan tanto la selectividad, necesaria para la limpieza de la muestra, como la capacidad de cuantificar el analito extraído (Müller et al., 2005). En algunos casos, cuando la muestra es liofilizada, se puede realizar una extracción sólido-líquido, donde se separan unos componentes que hacen parte de la muestra. El solvente debe ser seleccionado dependiendo del tipo de moléculas a separar con el fin de aumentar la transferencia de masa desde la matriz hacia el solvente, y se pueden modificar las variables que intervienen en este proceso (temperatura, agitación, presión, tiempo de extracción y tipo de solvente) (Vinatoru, 2001).

En la literatura existen muchas metodologías para la extracción de pigmentos presentes en el fitoplancton, que involucran en su mayoría el uso de solventes como etanol, acetona o acetonitrilo (Serive et al., 2017)(Krajewska, Szymczak-Żyła, & Kowalewska, 2017)(Sumanta, Haque, Nishika, & Suprakash, 2014). Además, de procedimientos analíticos para la determinación de carotenoides en sedimentos marinos (Krajewska et al., 2017), los cuales, en algunos casos implican estudio de variables como la influencia de la temperatura de la columna cromatográfica, la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil (metanol, acetonitrilo, etanol, agua y buffers de acetato de amonio), sobre la separación de los pigmentos, para una posterior optimización.

En general estas metodologías combinan extracción asistida por ultrasonido, maceración con un solvente orgánico (*e.g.*, acetona) o con un molino de bolas, filtración sobre membranas de vidrio o centrifugación para formar *pellets* (Sumanta et al., 2014), seguidas por extracción líquido-líquido con mezclas de compuestos orgánicos (*e.g.*, metanol, acetona, éter, benceno), para su posterior análisis por HPLC (Krajewska et al., 2017). Actualmente, también

se reportan extracciones de pigmentos fitoplanctónicos con fluidos supercríticos (Macías-sánchez, Serrano, Rodríguez, & Martínez, 2009), utilizando CO₂ como fluido supercrítico y etanol como co-solvente. Esta es una técnica de extracción revolucionaria que minimiza los contaminantes emitidos al ambiente, y no necesita altas temperaturas que podrían acelerar la degradación de los compuestos de interés.

En general, para la caracterización de pigmentos fitoplanctónicos en un análisis de rutina, se realiza una filtración al vacío de las muestras de agua de mar, utilizando filtros de vidrio, seguida por una extracción asistida por radiación de ultrasonido con acetona como solvente por aprox. 20 min. Finalizada la extracción, la muestra se filtra nuevamente y se analiza, ya sea espectrofotométricamente a $\lambda = 664$ y 750 nm para determinar clorofila, o por HPLC para determinar los pigmentos presentes (Roy et al., 2011).

2.4 Caracterización química de pigmentos presentes en fitoplancton

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la técnica estándar para el análisis cuali- y cuantitativo de pigmentos presentes en el fitoplancton marino. El HPLC posee ventajas como facilidad de operación y adaptación de uso en naves de investigación (barcos), sin embargo, con esta técnica sólo algunos pigmentos se pueden determinar y usar como marcadores quimiotaxonómicos confiables (Serive et al., 2017)(M Zapata, Rodriguez, & Garrido, 2000)(S. Wright, 1991)(Van-Heukelem, Lewitus, Kana, & Craft, 1995)(Van-Heukelem, Lewitus, Kana, & Craft, 1992)(Claustre et al., 2004).

Las optimizaciones de los métodos de separación por HPLC han demostrado que, además de los pigmentos mayoritarios presentes en estas mezclas, existen muchos pigmentos de tipo clorofila y carotenoide que se encuentran en pequeñas concentraciones. Estos pigmentos, debido a su baja abundancia y a los procedimientos complejos que se requieren para su purificación y análisis, típicamente no se caracterizan y no se utilizan como biomarcadores alternativos. Recientemente, Serive, *et. al* reportan que este tipo de pigmentos desconocidos, presentes en bajas concentraciones, son los que probablemente corresponden a biomarcadores robustos (que pueden confiablemente ser asignados a géneros o clases características de microorganismos) para el análisis quimiotaixonómico de fitoplancton (Serive et al., 2017). Los autores también mencionan la necesidad de desarrollar protocolos alternativos que permitan realizar una identificación rápida de estos compuestos.

2.5 Espectrometría de masas

La técnica de espectrometría de masas (MS) permite, mediante la ionización de especies moleculares y atómicas, determinar su relación masa/carga después de procesos de separación y detección. La MS proporciona información composicional, a partir de las masas moleculares (o atómicas) de un analito, que puede ser suficiente para identificar los elementos presentes y determinar la fórmula molecular del compuesto. Para la identificación por MS no solo se usa la masa, también se emplean las distribuciones isotópicas que muestran la abundancia relativa de los isotopólogos que contribuyen a la fórmula molecular observada. Adicionalmente, bajo ciertas condiciones, es posible extraer información estructural a partir de procesos de fragmentación controlada. Estos procesos permiten determinar la conectividad de los átomos

en una molécula, identificar grupos funcionales, determinar la secuencia de los constituyentes de macromoléculas, y en algunos casos determinar estructuras tridimensionales (Gross, 2004).

Las aplicaciones de MS son muy amplias y abarcan ciencias biológicas, ciencias de materiales (orgánicos e inorgánicos), petroleómica, lipidómica, foodómica, ciencias forenses, ciencias espaciales, entre otras. En general, la selección de los métodos de ionización y análisis en MS depende de la aplicación. En el caso de moléculas lábiles, de peso molecular variable, termoinestables y fotoactivas (como en el caso de los pigmentos fitoplanctónicos) se debe escoger una técnica de ionización suave que preserve la estructura y composición química de estas moléculas. La ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), desarrollada a finales de los 80's del siglo pasado, es una de las metodologías más suaves dentro del abanico de técnicas de ionización disponibles en MS (Karas, Bachmann, Bahr, & Hillenkamp, 1987).

Debido a su naturaleza reactiva, los pigmentos fotosintéticos presentes en el fitoplancton se degradan fácilmente, no sólo durante el proceso de extracción sino también durante su análisis. Por ejemplo, la clorofila a (Véase **Figura 4**) (S. Wright, 1991), que tiene como centro metálico un átomo de magnesio, exhibe un alto grado de descomposición cuando es extraída de los cloroplastos para su análisis. Generalmente, para la caracterización de este tipo de moléculas en los sistemas acuáticos se usan técnicas espectroscópicas *in situ* del tipo absorción/emisión, que permiten mapear grandes superficies (Vasilkov et al., 2001). Sin embargo, para realizar un análisis molecular detallado de estas moléculas es necesario preservar su estructura. Por ejemplo, debido al alto grado de demetalación y a la pérdida de fitol que presentan las clorofilas,

las técnicas de ionización energéticas como ionización electrónica (EI), o las que requieran solubilizar la muestra en solventes reactivos como la electronebulización (ESI, *electrospray ionization*), no son convenientes, debido a que no permiten observar las moléculas intactas en fase gaseosa. Por otra parte, MALDI es una técnica versátil para la caracterización de moléculas lábiles pues la preparación de la muestra no involucra uso de soluciones reactivas, con adición de ácidos o bases como en ESI, ni el uso de agentes ionizantes (Calvano et al., 2017b).

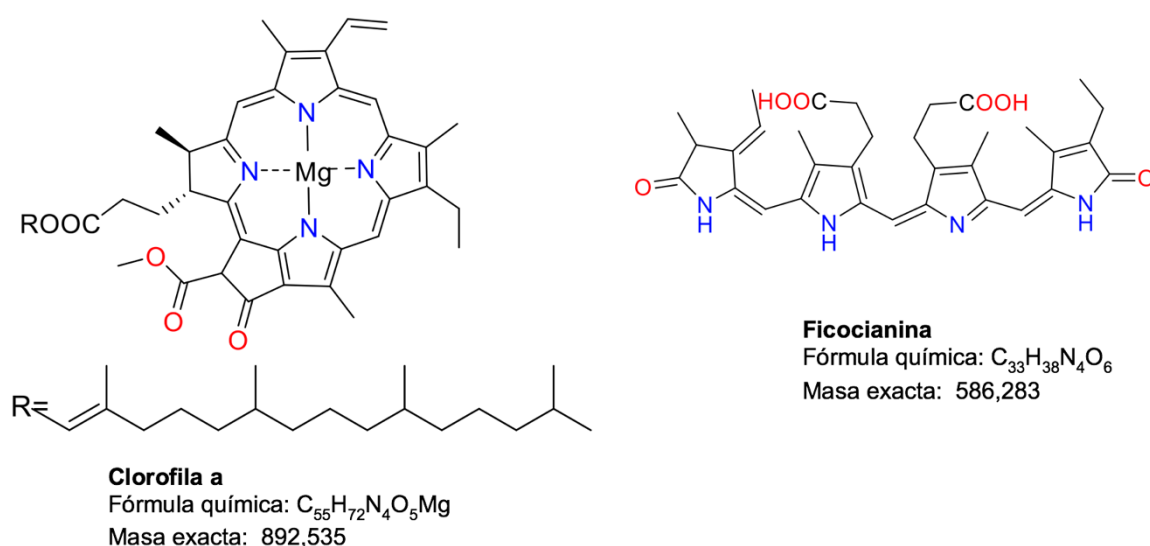


Figura 4. Estructuras de interés en fitoplancton, clorofila a y ficocianina.

La técnica MALDI, utiliza una matriz que comúnmente es un compuesto orgánico con características fisicoquímicas definidas (*e.g.* absorción UV, potencial de ionización, afinidad protónica, cristalización, entre otras), que se encuentra co-cristalizada con los analitos que se irradia por un láser (comúnmente de Nd:YAG, $\lambda = 355$ nm) como se observa en la **Figura 5**. En MALDI, los procesos de ionización involucran la formación de iones primarios de la matriz seguidos de reacciones de transferencia de protones, cationes y electrones, siendo este último mecanismo el menos explorado, debido a su complejidad (Karas et al., 1987).

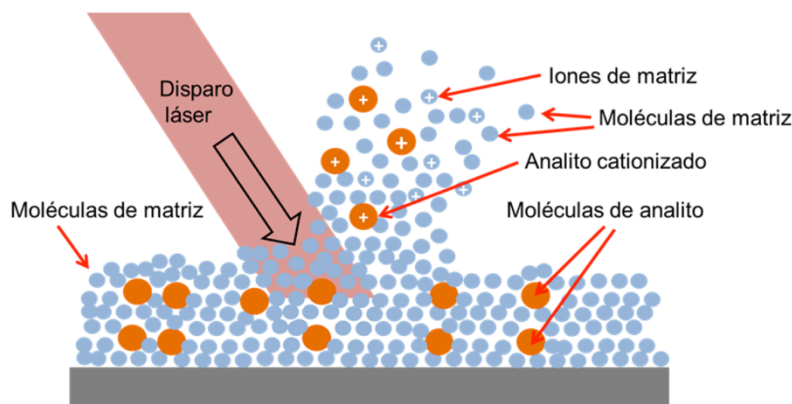


Figura 5. Esquema general de una fuente de ionización MALDI.

En el proceso de transferencia electrónica, la matriz se ioniza a través de un mecanismo de “pooling” tal y como se postula en el modelo CPCD (*Coupled Physical and Chemical Dynamics*) (R. Knochenmuss & Zenobi, 2003)(Richard Knochenmuss, 2014). Una vez formados, los iones de la matriz pueden abstraer un electrón del analito neutro para formar un ion secundario del analito (en modo de ionización positivo); esta reacción solo es posible si el potencial de ionización del analito es menor que el potencial de ionización (PI) de la matriz, como se muestra a continuación (véase Ecuación 1) (Mccarley, Mccarley, & Limbach, 1998):



Esta reacción en fase gaseosa, puede ser utilizada para el análisis de una gran cantidad de analitos que no son susceptibles a adquisición de carga por otros métodos como: compuestos no volátiles, lábiles, polímeros, poliaromáticos, complejos metálicos, entre otros (Ramírez-pradilla et al., 2018). No obstante, la aplicabilidad de la ionización por transferencia electrónica,

está estrechamente relacionada con la naturaleza de la matriz utilizada en el análisis (Calvano et al., 2017a).

El grupo de investigación GIFTEX, ha reportado la síntesis y el uso de nuevos compuestos basados en un núcleo de fenilenvinileno (Véase **Figura 6**), como matrices MALDI de transferencia electrónica, con PI entre 7,9 y 8,5 eV (Castellanos-García et al., 2017; Castellanos-Garcia et al., 2015; Giraldo-Dávila, Chacón-Patiño, Ramirez-Pradilla, Blanco-Tirado, & Combariza, 2018; Ramírez-pradilla et al., 2018).

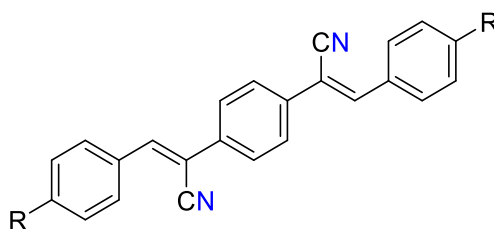


Figura 6. Estructura química de los derivados de α -cianofenilenvinilenos (α -CNFVs), reportados por el GIFTEX como matrices MALDI de transferencia electrónica, donde R= -H, -Cl, -CH₃, -OCH₃, -N(CH₃)₂ o -NPh₂.

Entre los resultados reportados por el GIFTEX con estas nuevas matrices MALDI (α -CNFVs), se señala que cuando R son grupos -CH₃ o -OCH₃, se aumenta significativamente de capacidad de formar iones secundarios de los analitos. Entre los analitos susceptibles de análisis con estas matrices, se encuentran porfirinas, petroporfirinas, compuestos poliaromáticos, ftalocianinas y algunos colorantes a base de trifenilamina, compuestos con estructuras y estabilidades similares a las de los pigmentos fitoplanctónicos (PI < 6,5 eV) (Castellanos-García et al., 2017; Castellanos-Garcia et al., 2015; Giraldo-Dávila et al., 2018; Ramírez-pradilla et al., 2018).

2.6 Antecedentes

Para determinar, de manera aproximada, el número de artículos científicos que han sido publicados acerca de la identificación de biomarcadores fitoplanctónicos (pigmentos fotoprotectores y fotosintéticos), se utilizó la base de datos *Scopus (Elsevier)*, en el periodo de tiempo desde el año 2000 hasta el 2019 (septiembre). La búsqueda se realizó el 22 de septiembre de 2019, utilizando la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (“*phytoplankton AND biomarkers*”). (Véase **Figura 7**).

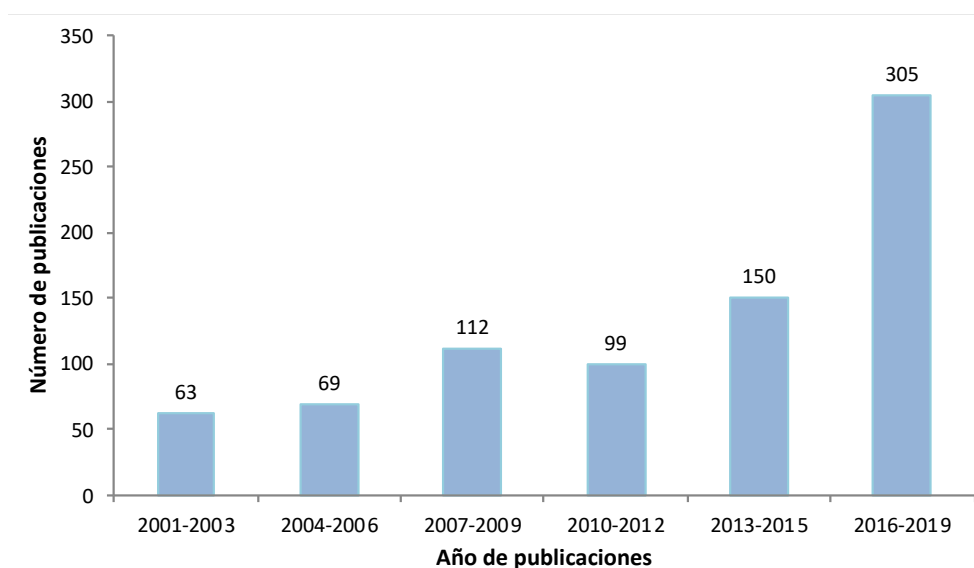


Figura 7. Número de publicaciones acerca de biomarcadores fitoplanctónicos. Periodo de búsqueda: 2000-2019. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“*phytoplankton AND biomarkers*”). Fecha de consulta: 22 de septiembre de 2019.

De acuerdo con los resultados arrojados por esta base de datos (Véase **Figura 7**), se observó una relación creciente entre el número de publicaciones científicas y sus años correspondientes, desde el año 2000 hasta el año 2019. La base de datos muestra un total de 969 artículos, lo que quiere decir que los biomarcadores fitoplanctónicos han sido objetivo de un gran número de investigaciones, sin embargo, solo 43 (3,4%) de estos estudios tienen un enfoque químico. También se pudo observar que, en este periodo de búsqueda, el número de publicaciones científicas relacionadas con biomarcadores fitoplanctónicos ha ido aumentando. En la revisión bibliográfica se encontraron diferentes estudios relacionados con la caracterización de pigmentos fitoplanctónicos, entre las investigaciones más citadas, se encuentran las realizadas en EE.UU. y Francia.

Entre las investigaciones más relevantes se encuentra el desarrollo de una metodología analítica por HPLC utilizando un *software* de modelamiento cromatográfico que le permitió a los autores mejorar la separación entre los picos cromatográficos, además, evaluaron nueve fases estacionarias y reportaron que los mejores resultados fueron obtenidos utilizando fase reversa (XDB C8 o LC 318 C18) (Heukelem & Thomas, 2001). Por otra parte, Juin, C. et al. (Juin et al., 2015) identificaron 30 metabolitos fitoplanctónicos presentes en extractos etanólicos de *Porphyridium purpureum*, por UPLC-MS, previa construcción de una base de datos realizada con 22 pigmentos estándar. Este reporte concuerda con Suzuki, K. et al. (K. Suzuki, Kamimura, & Hooker, 2015), donde se concluye que la técnica UHPLC puede llegar a reemplazar las metodologías convencionales de HPLC, para el análisis de clorofilas y carotenoides derivados del fitoplancton marino. Sin embargo, Juin et al también establecieron que algunos de los compuestos no identificados en sus muestras correspondían a pigmentos hidroxilados, que se producen como artefactos durante el proceso de extracción.

Frassanito, R. *et al.* (Frassanito, Cantonati, Tardio, Mancini, & Guella, 2005) identificaron metabolitos secundarios presentes en extractos de microalgas, obtenidos con una solución de extracción acetona-metanol 1:1, v/v, mediante HPLC-DAD-APIMS, esta técnica permite realizar análisis rápidos de muestras de agua dulce y marina, caracterizando una amplia gama de pigmentos fitoplanctónicos *e.g.* carotenoides y derivados de clorofila. Además, también mostraron que en el mismo análisis, se pueden detectar otros compuestos, como galactolípidos, alcaloides y esteroides.

Con relación a metodologías analíticas basadas en espectrometría de masas, Sleno, L.; Volmer, D. (Sleno & Volmer, 2005) describieron el procedimiento de análisis de toxinas presentes en fitoplancton por MALDI MS, incluyendo la búsqueda de los mejores parámetros experimentales *i.e.* matriz orgánica, concentración, solvente, relación matriz-analito, y observaron el impacto sobre la intensidad de las corrientes iónicas obtenidas para el compuesto de referencia, 13-desmetil-C. Los autores reportan que el tiempo que tomó el análisis de cada punto de muestra (por MALDI) fue menor que 5 s. Además, investigaron su aplicación en el análisis cuantitativo de muestras de fitoplancton, 13-desmetil spirocladina C se cuantificó en las muestras, en concentraciones de 0,05 a 90,4 µg/mL.

La técnica MALDI ya ha sido utilizada para analizar pigmentos lábiles (*e.g.*, clorofilas, derivados de ficocianina y carotenoides), utilizando el mecanismo mostrado en la Ecuación 1. Por ejemplo, Suzuki, T. *et al.* (T. Suzuki et al., 2009), reportan el análisis de clorofilas y sus derivados, utilizando cuatro matrices MALDI: ácido sinapínico, ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 2,2':5',2''-tertiofeno (TER) y 3-aminoquinolina. Los autores observaron que TER fue la matriz más eficiente para el análisis de estos pigmentos pues no causa la pérdida de iones metálicos, aunque en algunos casos se observó fragmentación del enlace fitol-éster, de las

clorofilas. Por otra parte, Calvano, C. *et al.* (Calvano et al., 2017b) compararon DCTB, (TER), antraceno (ANT), 9,10-difenilantraceno (DP-ANT) y 1,5-diaminonaftaleno (DAN), como matrices MALDI de transferencia electrónica, para el análisis de un pigmento fotosintético, y determinaron que utilizando la matriz DAN se obtiene un rendimiento de ionización mayor y baja fragmentación. Además, reportan el análisis en modo de iones negativos y muestran que el grupo fitol presenta una fragmentación diferente, en este caso es una pérdida como radical, en lugar de neutro como reportan en modo de iones positivos.

Recientemente, el grupo de investigación GIFTEX-UIS, ha reportado la síntesis y uso de novedosas matrices ET MALDI, basadas en α/p -CNFVs (cianofenilenvinilenos) (Castellanos-García et al., 2017)(Ramírez-pradilla et al., 2018)(Castellanos-Garcia et al., 2015), con ventajas sobre matrices ET ya establecidas (*e.g.* DCTB) como altas absorptividades molares en la región del UV, distancias de apilamiento cristalino menores que 10 Å, eficiente producción de iones primarios a bajos umbrales de energía del láser, alto potencial de ionización ($> 8,5$ eV), incremento de la sobrevivencia de los iones moleculares, mejores relaciones S/N, entre otras. Considerando que los pigmentos fitoplanctónicos son moléculas de mediano peso molecular, termoinestables y lábiles, el uso de MALDI con matrices de transferencia electrónica asegura un proceso de ionización suave que garantiza la sobrevivencia del ion molecular, como ha sido reportado por GIFTEX (Castellanos-Garcia et al., 2015; Ramírez-pradilla et al., 2018).

3 Materiales y métodos

3.1 Materiales y reactivos

En la **Tabla 1**, se reportan los reactivos, materiales y equipos de laboratorio que fueron utilizados en esta investigación, con sus especificaciones respectivas.

Tabla 1.

Reactivos, materiales y equipos de laboratorio utilizados en la investigación.

Reactivos y solventes	Especificaciones
<i>n</i> -Heptano	Pureza: 99%, <i>Sigma Aldrich</i> ((Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.).
Etanol	Pureza: 99.8%; <i>Mallinckrodt Baker Inc.</i> (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.).
Metanol, MeOH	Pureza: 99%; <i>Merck</i> (Darmstadt, Alemania).
Acetonitrilo, ACN	Pureza: $\geq 99.9\%$; <i>Honeywell Burdick & Jackson</i> (New Jersey, EE.UU.).
Clorofila a	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Clorofila b	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Clorofila c1	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Feofitina a	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Diadinoxantina	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
α -Caroteno	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
β -Caroteno	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).

Tabla 1.*Continuación*

Astaxantina	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Aloxantina	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Cantaxantina	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Fucoxantina	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Luteína	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Peridina	Pureza: 99%; <i>DHI</i> (Hørsholm, Denmark).
Material de laboratorio	
Pipetas Pasteur	230 mm; <i>Brand GMBH Co.</i> (Wertheim, Alemania).
Viales para cromatografía	2 mL; <i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, California, EE.UU.).
Equipos de laboratorio	
Balanza analítica	Mettler Toledo AL204 (Nänicon, Suiza).
Baño de ultrasonido	Elmasonic E30H (Elma, Alemania).
<i>MS2 Minishaker</i>	<i>Compac II Centrifuge, Clay Adams</i> (Sparks, M.D. EE.UU.).
Centrífuga	
Filtros Whatman® de microfibra (GF/F, 47 mm, poro: 0.7 µm)	<i>Merck Millipore Ltd.</i> (Tullagreen, Irlanda).
Sonda multiparamétrica Hach	Hach Company (Colorado, EE.UU.)
Microscopio óptico vertical BX53	Microscopia Olympus (Tokio, Japón)

3.2 Recolección de las muestras de agua y análisis microscópico

Toma de muestras de agua

Área de estudio: El sector de Bajo Frijol, se encuentra ubicado hacia el nororiente del Parque Nacional Natural Corales de Profundidad (PNN CPR), Caribe colombiano, es un banco asociado a una elevación del terreno desde los 150 m hasta 34 m de profundidad, tiene una extensión de 8,2 km con un ancho aproximado de 1,4 km, en el que destaca la presencia de especies de algas, esponjas y corales (Alonso et al., 2015)(Henao-Castro & Marrugo-Pascuales, 2017)(Cedeño-Posso et al., 2015)(Sánchez, Dueñas, Gonzales, Gómez, & Andrade, 2015). El PNN CPR estableció en su programa de monitoreo seis estaciones fijas a lo largo del sector de Bajo Frijol en donde se llevó a cabo la toma de muestras, teniendo en cuenta la profundidad en la que inicia la zona mesofótica (Véase *Figura 8*).

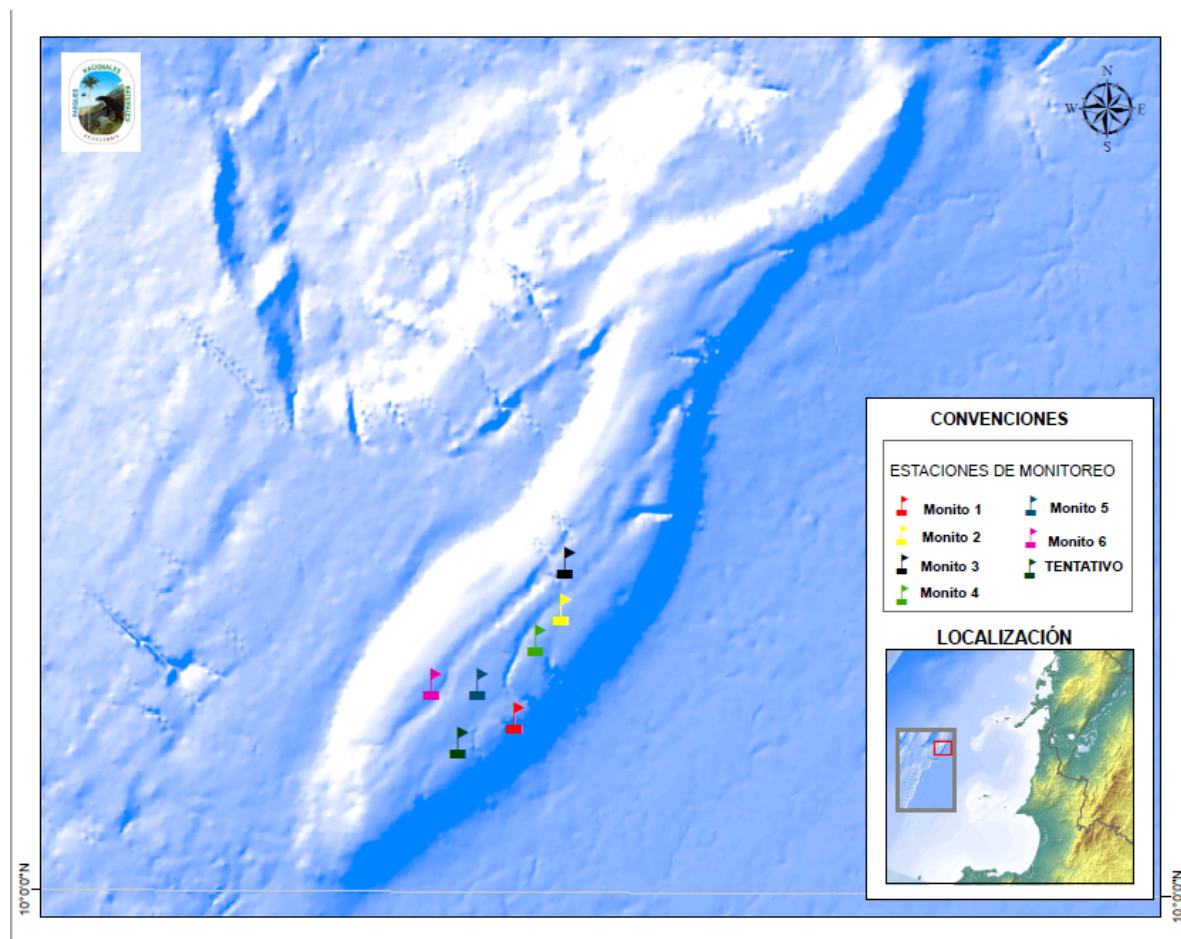


Figura 8. Ubicación de las seis estaciones (Monito 1 a 6) establecidas por el PNN CPR en su programa de monitoreo en la localidad de Bajo Frijol.

Se realizó un muestreo diurno en la estación E 2, establecida previamente. La muestra de agua fue recolectada a una profundidad de cero m sobre el nivel del mar, que corresponde a la zona fótica. Para la recolecta de fitoplancton y parámetros oceanográficos, se tomaron en la estación dos muestras de agua con una botella Niskin de 1,2 L y se registraron los valores de presión, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH mediante una sonda multiparamétrica Hach. Las muestras de agua recolectadas fueron utilizadas para análisis y caracterización de fitoplancton por microscopía óptica utilizando claves taxonómicas y determinación de perfiles pigmentarios mediante espectrometría de masas MALDI-TOF vía ionización por transferencia

electrónica. Para las muestras de fitoplancton marino, alícuotas de muestras de agua de mar fueron filtradas utilizando filtros Whatman® de microfibra (GF/F, 47 mm, poro: 0.7 µm) que se almacenaron inmediatamente a -80 °C, hasta la extracción.

Debido a la baja disponibilidad de muestras de fitoplancton marino el establecimiento de los métodos de preparación de muestras y de análisis por HPLC y MALDI-TOF se realizaron utilizando muestras de fitoplancton de agua fresca provenientes del lago localizado en el campus central de la Universidad Industrial de Santander, en la ciudad de Bucaramanga: latitud: 7° 8' 28.271" N, longitud: -73° 7' 14.731" O y altitud sobre el nivel del mar: 1009 m. Las muestras de agua fresca fueron recolectadas en la zona fótica, a una temperatura de 25 °C y a una profundidad de cero m. Se recolectaron *ca.* 50 L de agua, los cuales fueron filtrados utilizando filtros con un tamaño de poro de 10 µm y llevados a un volumen de 120 mL. Luego, la muestra de agua junto con fitoplancton fue centrifugada a 1500 rpm durante 5 min y el pellet formado fue almacenado hasta los análisis. Para la extracción con solventes, la muestra se secó bajo corriente de Ar a 25 °C y se almacenó protegida de la luz a -80 °C, hasta la extracción.

3.3 Extracción sólido-líquido de los pigmentos fitoplanctónicos

La extracción con solventes se realizó siguiendo la metodología descrita por Wright *et al.* (2006) (Simon Wright & Jeffrey, 2006), con algunas modificaciones. Debido al amplio rango de polaridades y de estructuras moleculares que caracterizan los compuestos a analizar, se propuso obtener un extracto crudo de la muestra utilizando *n*-heptano:THF:EtOH, 2:1:1 v/v en una relación material:solvente (2:1, mg/mL). Además, se obtuvieron fracciones por separado, una fracción no polar utilizando *n*-heptano en una relación material:solvente (2:1, mg/mL) para aislar compuestos de tipo caroteno y una fracción polar; para la cual, debido a que

en esta fracción se esperaba aislar clorofilas y xantofilas, se realizó un diseño experimental ²³, con cuatro replicas en el centro y tres variables: relación THF:EtOH, temperatura de extracción y porcentaje de hidróxido de amonio (NH₄OH). El observable del diseño experimental fue la absorbancia de la fracción medida a una longitud de onda $\lambda = 667$ nm (longitud de onda de absorción de la clorofila a). En la **Tabla 2** se pueden observar los niveles para cada una de las variables de estudio.

Tabla 2.

Variables y condiciones de extracción evaluadas en el diseño experimental.

Variable	Niveles		
	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (+1)
X1: Relación EtOH:THF, v/v	10:0	5:5	0:10
X2: NH ₄ OH, %	0	0,05	0,1
X3: Temperatura, °C	15	40	60

Las extracciones se realizaron mediante radiación de ultrasonidos (Baño de ultrasonido, Branson, *Ultrasonics*TM CPX 1800) de 37 kHz de frecuencia y 35 W de potencia ultrasónica, por 10 minutos a las condiciones mostradas en la **Tabla 3**.

Tabla 3.

Condiciones para la obtención de los extractos de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos de muestras de agua fresca.

Nº	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

Una vez obtenido el extracto, el residuo se separó y el extracto final se almacenó bajo refrigeración a 4 °C, en frascos ámbar por no más de 24 horas, hasta su análisis. Para la caracterización de los extractos por espectroscopia Ultravioleta Visible, se utilizó un equipo GENESYS 10S (*Thermo Scientific*, Billwrica, MA, EE.UU.), equipado con una lámpara de

xenón, el cual se utilizó un rango de medición de 200 nm a 800 nm. Para todos los ensayos se utilizó una celda de cuarzo de camino óptico de 1 cm y todos los extractos fueron analizados disueltos en MeOH, previa construcción de una curva de calibración con un estándar certificado de clorofila a (Véase **Figura 9** y **Ecuación 2**), Donde; X, representa la concentración de clorofila a y, Y, la absorbancia medida.

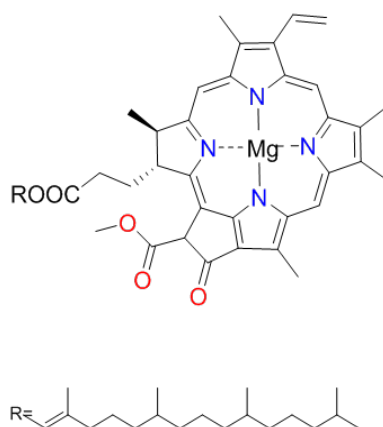


Figura 9. Estructura química de la clorofila a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$), estándar externo utilizado para la cuantificación de clorofila a en los extractos de fitoplancton de agua fresca por espectroscopia UV-Vis.

$$Y = 0,0211X - 1,1582$$

Ecuación 2.

3.4 Cromatografía líquida acoplada a espectroscopia ultravioleta visible

La identificación de los pigmentos fitoplanctónicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), siguiendo la metodología descrita por Seville, B. *et al.* (Seville *et al.*, 2017), con algunas modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo líquido *Rainin*, equipado con un detector UV-Vis. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna *Agilent*

Technologies Eclipse XDB-C₁₈ de 4,6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula en fase reversa. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: fase móvil A, agua (H₂O); fase móvil B, metanol (MeOH). El flujo fue de 1 mL/min, el volumen de inyección fue de 10 µL. La condición inicial del gradiente fue de 100%, para B, y 0%, para A, cambiando linealmente hasta 90%, para B, en 20 min, el tiempo total de la corrida fue de 50 min, a temperatura ambiente. La detección de carotenoides y clorofilas se realizó a una longitud de onda $\lambda = 450$ nm. La identificación de los compuestos se realizó por la comparación de sus tiempos de retención con los de patrones certificados.

La cuantificación de los pigmentos identificados en los extractos se realizó por el método de estándar externo, se construyó una curva de calibración de cada uno de los patrones certificados identificados en la muestra, diadinoxantina (C₄₀H₅₄O₃), clorofila b (C₅₅H₇₀O₆N₄Mg), clorofila a (C₅₅H₇₂O₅N₄Mg) y β -caroteno (C₄₀H₅₆); para los demás compuestos identificados, la cuantificación se realizó por el método del estándar interno, donde se utilizó el carotenoide de tipo xantofila, luteína (C₄₀H₅₆O₂) a una concentración de 5 µg/L, (Véase **Figura 10**).

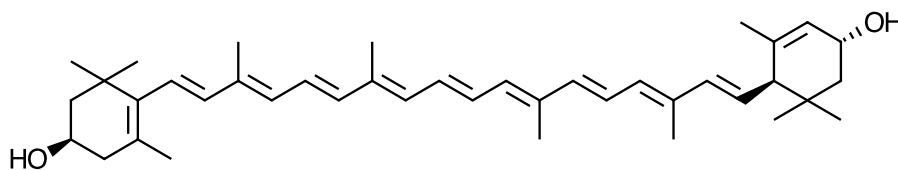


Figura 10. Estructura química de luteína (C₄₀H₅₆O₂), estándar interno utilizado para la cuantificación de carotenoides presentes en los extractos de fitoplancton por HPLC/UV-Vis.

3.5 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Para todos los experimentos MALDI y LDI se utilizó un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF Bruker Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA), equipado con un láser en estado sólido *Smart Beam* de Nd:YAG ($\lambda = 355$ nm), con frecuencia de 1 kHz y una salida máxima de energía de aproximadamente 85 μ J por disparo, un pulso de duración de 6 ns con ancho de *spot* de 10 μ m a 100 μ m, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En general los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 100 a 1000 en modo reflectrón usando voltaje de aceleración de 25 kV, con extracción pulsada de iones (PIE) de 100 ns. La calibración del equipo en el rango de masas especificado se realizó usando las señales del ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y de la serie de péptidos estándar: leucina-enkefalina, bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Todos los resultados de medición de la energía por pulso del láser se determinaron a partir del promedio de diez mediciones.

La preparación de la muestra se realizó con soluciones de las matrices (DCTB – estándar- α -CNFVOCH₃ y α -CNFVCH₃) 5 mM en THF. Las soluciones se sometieron a agitación para asegurar que los compuestos se disolvieran. Se prepararon soluciones de los extractos y de los pigmentos estándar que se mezclaron con las matrices para obtener relaciones molares analito:matriz (A:M) de 1:1, 1:10, y 1:100, respectivamente. Las muestras se prepararon usando el método de *dried droplet*, por lo tanto, se mezclaron 15 μ L de la matriz (5 mM), con un volumen del analito (en cada una de las tres relaciones estudiadas) y se agitaron en un vórtex por 2 min a 1500 rpm. Se aplicaron cinco *spots* de cada muestra, para cada una de las relaciones A:M. Se tomaron los espectros de masas en el rango de m/z 100 a 1000. Cada

espectro compuesto corresponde a 3000 espectros, tomados en 6 adquisiciones de 500 disparos cada una, de esta forma es posible hacer análisis estadístico de los resultados obtenidos.

A partir de los espectros de masas, en los cuales se relaciona la abundancia de iones con la relación masa-carga, y las tablas de composición pigmentaria de clases de fitoplancton compiladas por Roy, *et al.* (Roy et al., 2011) se identificaron los compuestos presentes en las mezclas de pigmentos.

4. Resultados y análisis

4.1 Análisis microscópico de las muestras de agua

Las muestras de agua para el análisis microscópico del fitoplancton fueron obtenidas a cero m de profundidad. La microscopía óptica permitió establecer la presencia de microorganismos pertenecientes al género *Euglena* en la muestra de agua fresca, la cual fue recolectada en el *campus* central de la Universidad Industrial de Santander, en la ciudad de Bucaramanga, como se describe en la **Sección 3.2** (Véase **Figura 11**).

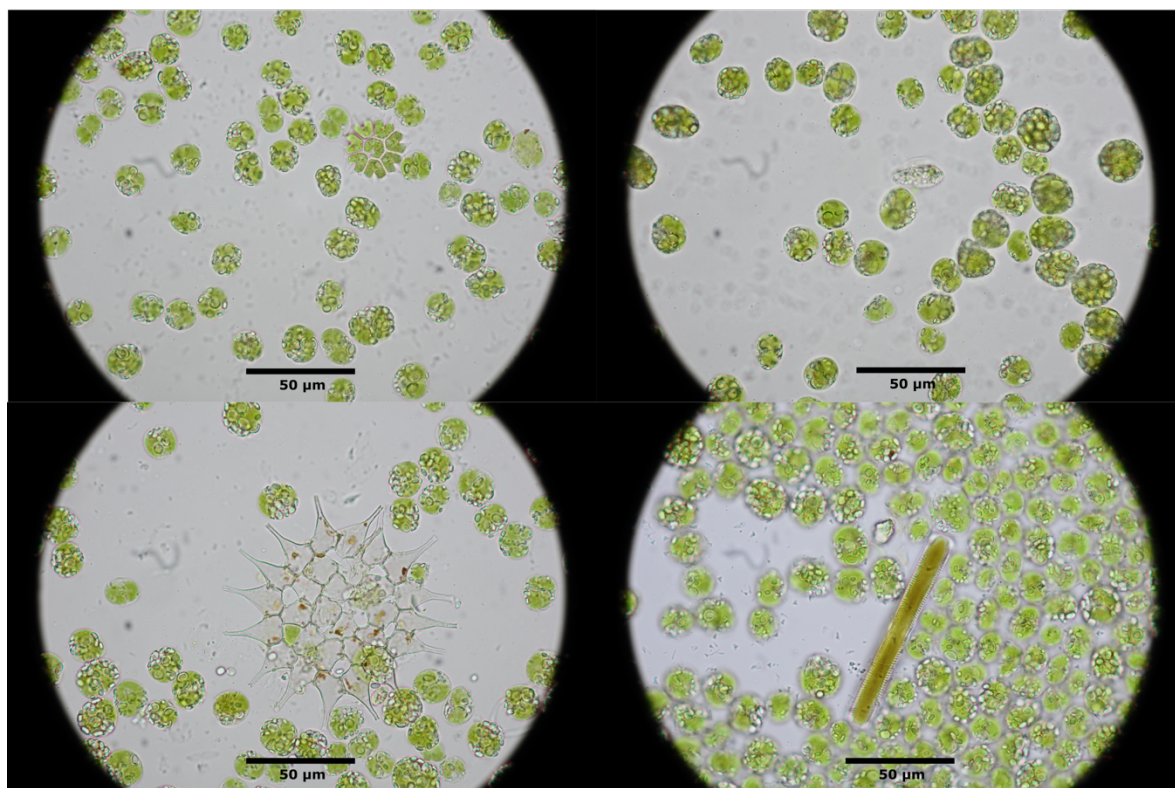
MICROSCOPIO OLYMPUS BX53

Figura 11. Imágenes de microscopía óptica de las especies de fitoplancton presentes en las muestras de agua fresca recolectadas en el *campus* central de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

Las Euglenofitas, son microorganismos unicelulares fotosintéticos que se encuentran principalmente en cuerpos de agua fresca con altas concentraciones de materia orgánica, aunque también se pueden encontrar en ambientes marinos. La mayoría de estos microorganismos tienen una película flexible, que permite el movimiento por deformación. Las Euglenofitas presentan uno o dos flagelos, iguales o desiguales en longitud. Son de coloración verde y algunas especies tienen una mancha ocular por fuera del cloroplasto, producto del

almacenamiento de un polímero cristalino de glucosa β -1,3 denominado paramilo (Roy et al., 2011). Entre los pigmentos reportados por otros autores en algunos microorganismos que hacen parte del género *Euglena*, se encuentran los mostrados a continuación (Véase **Tabla 4**).

Tabla 4.

Principales pigmentos reportados en microorganismos que pertenecen al género *Euglena*.

Pigmento	Fórmula	Masa exacta	Referencia
Clorofila a	$C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$	892,5353	(Roy et al., 2011)(Jeffrey et al., 1997)(Schagerl, Pichler, & Donabaum, 2000)
Clorofila b	$C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$	906,5145	(Roy et al., 2011)(Jeffrey et al., 1997)(Schagerl et al., 2000)

Tabla 4*Continuación*

Clorofilida b	C ₃₅ H ₃₂ N ₄ O ₆ Mg	628,2172	(Cartaxana & Brotas, 2003)
Feofitina a	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	870,5659	(Cartaxana & Brotas, 2003)
Neoxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Roy et al., 2011)(Jeffrey et al., 1997)(Schagerl et al., 2000)
Diadinoxantina	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	582,4072	(Roy et al., 2011)(Jeffrey et al., 1997)(Schagerl et al., 2000)
Diatoxantina	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4123	(Roy et al., 2011)(Jeffrey et al., 1997)(Schagerl et al., 2000)
Heteroxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Jeffrey et al., 1997)
α-Caroteno (trazas)	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Roy et al., 2011)(Jeffrey et al., 1997)
β-Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Roy et al., 2011)(Jeffrey et al., 1997)(Schagerl et al., 2000)
Anteraxathin	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	584,4229	(Cartaxana & Brotas, 2003)
Zeaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,8483	(“Carotenoids Database, 2019)

Tabla 4*Continuación*

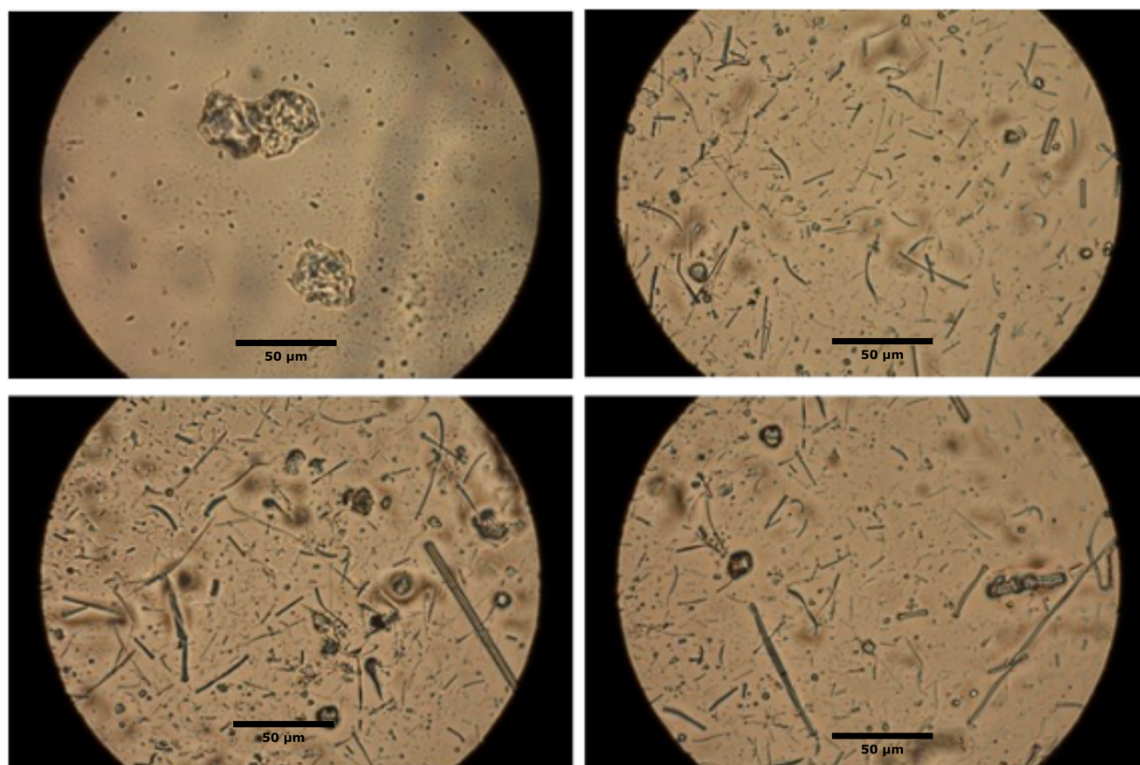
Violaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(“Carotenoids Database, base de datos, disponible en: http://carotenoiddb.jp Fecha de consulta: 24 de septiembre de 2019.” 2019)
Astaxantina	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	596,3865	(“Carotenoids Database, base de datos, disponible en: http://carotenoiddb.jp Fecha de consulta: 24 de septiembre de 2019.” 2019)

Por otra parte, el análisis microscópico de la muestra de agua de mar colectada en el PNN Corales de Profundidad se realizó en la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, Magdalena, Colombia, (Véase **Tabla 5** y **Figura 12**), por el profesor del Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales Dr. Andrés Franco Herrera.

Tabla 5.

Análisis microscópico de la muestra de agua de mar recolectada en el Caribe colombiano.

Filum	Clase	Familia	Género	Cel/L
Miozoa	Dinophyceae	Ostreopsidaceae	<i>Alexandrium</i>	10
Bacillariophyta	Catenulaceae	Catenulaceae	<i>Amphora</i>	20
Bacillariophyta	Mediophyceae	Chaetocerotaceae	<i>Chaetoceros</i>	10
Miozoa	Dinophyceae	Gonyaulacaceae	<i>Gonyaulax</i>	40
Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Thalassionemataceae	<i>Thalassionema</i>	60
Total				140



MICROSCOPIO OLYMPUS BX53

Figura 12. Imágenes de microscopía óptica de las especies de fitoplancton presentes en las muestras de agua de mar recolectada en el Caribe colombiano.

En la muestra de agua de mar recolectada, se identificaron un total de 5 géneros de especies de microorganismos diferentes, como se puede observar en la **Tabla 5**. El volumen de agua analizado fue de 100 mL, lo que quiere decir que el número de células de microorganismos distribuidos sobre el filtro Whatman® de microfibras (GF/F, 47 mm, poro: 0,7 µm) y disponibles para los análisis fue *ca.*, 14 células. Las condiciones fisicoquímicas de la zona de muestreo se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6.

Parámetros fisicoquímicos medidos en el momento de la toma de la muestra de agua de mar.

Profundidad (m)	Salinidad (psu)	% O2 disuelto	Conductividad	Presión (psi)	T (°C)
		μS/cm			
2	36,41	97,1	54726,8	2,6	28,03

4.2 Estudio del efecto de las variables de extracción de la fracción polar de los pigmentos fitoplanctónicos en una muestra de agua dulce

Dentro de cada grupo de pigmentos clorofilas o carotenoides, existe una gran variedad en términos estructurales, lo que les atribuye diferencias marcadas en la polaridad. Tal como se ha mencionado anteriormente, la clorofila a y b son compuestos de naturaleza apolar debido a la presencia del fitol, mientras que las clorofilas c son de naturaleza más polar, debido a que sus estructuras carecen de fitol. De la misma forma, los carotenoides presentan un amplio rango de polaridades, desde carotenos apolares hasta xantofilas, que son más polares (Manuel Zapata & Garrido, 2000).

De acuerdo con lo anterior, fraccionar la muestra de fitoplancton, permite un análisis más detallado de los pigmentos presentes en el extracto y una caracterización molecular más completa. Algunos autores han reportado que el análisis directo del extracto crudo de pigmentos fitoplanctónicos por HPLC puede conducir a una identificación errónea, debido precisamente a la co-elución de los pigmentos (Roy et al., 2011)(M Zapata et al., 2000).

Tomando como base las diferencias entre polaridades de los pigmentos presentes en las muestras de fitoplancton se obtuvieron fracciones no polares y polares. La fracción no polar se extrajo con *n*-heptano, de acuerdo con la metodología propuesta por (Fu, Magnúsdóttir, Brynjólfson, Palsson, & Paglia, 2012); mientras la fracción polar se extrajo con EtOH:THF, como se determinó mediante pruebas preliminares con solventes diversos (acetona, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF) y etanol (EtOH)). En la **Figura 13** se muestra el comportamiento de absorción en la región UV-Vis de las fracciones no polar y polar de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.

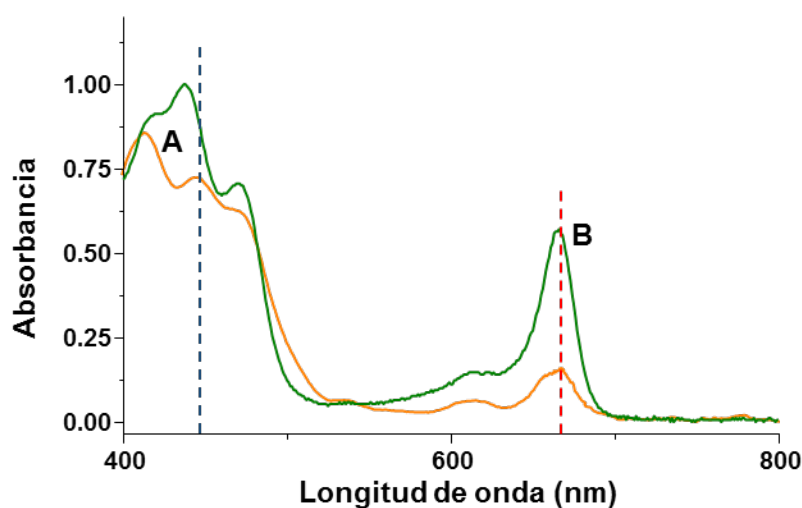


Figura 13. Espectros UV-Vis de las fracciones no polar (A) y polar (B) de un extracto de pigmentos fitoplanctónicos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.

Los espectros mostrados en la **Figura 13** presentan un comportamiento típico de una mezcla de clorofilas (B), las cuales absorben en la zona azul ($\lambda = 400\text{-}500\text{ nm}$) y roja ($\lambda = 600\text{-}700\text{ nm}$) del espectro electromagnético; mientras los carotenoides (A) presentan bandas de fuerte absorción en la región azul ($\lambda = 400\text{-}500\text{ nm}$). En el espectro de la fracción no polar (A),

aunque se observa una fuerte absorción en la zona de mayor energía, también se puede observar una señal en la región de absorción de las clorofilas que indica el arrastre de estos compuestos en esta fracción, aunque en menor concentración que en la fracción polar (Grebenok, Ripa, & Adler, 1991).

Las clorofilas (presentes en la fracción **B**), por ser derivados de la porfirina, tienen dos bandas principales de absorción en el rango visible del espectro electromagnético, consecuencia de la deslocalización π extendida en el esqueleto cíclico del tetrapirrol (Véase **Figura 2**). La zona de absorción fuerte en la sección de baja energía del espectro se conoce como banda Q-; mientras la que se observa en la zona azul del espectro se denomina banda Soret o B (Grebenok et al., 1991)(Milenković, Zvezdanović, & Anđelković, 2012). Las bandas Q- y "Soret" atribuidas a la clorofila a, se encuentran a valores de longitud de onda de 662 y 430 nm, respectivamente. Para la clorofila b estas bandas se ubican a 645 y 470 nm, respectivamente. Consecuentemente, la señal a 470 nm se debe probablemente a la presencia de clorofila b en la fracción **B**. Para el caso de feofitina, los máximos de absorción de las bandas Soret y Q- se ubican a 665 y 415 nm. En el espectro obtenido por espectroscopia ultravioleta visible de la fracción polar **B**, del extracto de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca (Véase **Figura 13**), tomando como referencia las señales de la clorofila a, el máximo de la banda Soret de las feofitinas, se desplaza a longitudes de onda más largas, mientras que los máximos en la región azul (Q-) del espectro electromagnético, se desplazan a longitudes de onda más cortas (Milenković et al., 2012).

Por otra parte, las variables que influyen la concentración de pigmentos extraídos en la fracción polar se analizaron utilizando un diseño experimental 2^3 , con tres variables y dos niveles para cada variable, con cuatro replicas en el centro, tal y como se describió en la **Sección 3.3** de la metodología. La variable de respuesta en esta etapa fue el contenido de clorofila a, que se midió mediante espectroscopía UV-vis.

Tabla 7.

Contenido de clorofila a en los extractos de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos de muestras de agua dulce.

Nº	X1 EtOH:THF, v	X2 NH ₄ OH, %	X3 Temperatura, °C	Absorbancia	Concentración mg/L
1	1:1	0	15	0,507	79
2	1:1	0	60	0,540	80
3	1:1	0,1	15	0,994	102
4	1:1	0,1	60	0,721	89
5	5:1	0	15	0,436	75
6	5:1	0	60	0,501	79
7	5:1	0,1	15	0,846	95
8	5:1	0,1	60	0,605	84
9	3:1	0,05	40	0,594	83
10	3:1	0,05	40	0,532	80
11	3:1	0,05	40	0,691	88
12	3:1	0,05	40	0,645	85

Para el análisis de los datos del diseño experimental 2^3 , se utilizó el *software Statgraphics Centurion* (Statpoint Technologies, Inc., Virginia, EE.UU., Versión XVII), donde los datos usados fueron los valores de la concentración de clorofila a, medida para cada uno de los extractos (Véase **Figura 9** y **Ecuación 2**). Como se puede observar en la **Tabla 7**, la mayor respuesta del observable se obtuvo con la relación EtOH:THF 1:1 (nivel -1), 0,1% de NH_4OH (nivel 1) y temperatura de 15 °C (nivel -1). A continuación (Véase **Figura 14**), se muestra la gráfica de Pareto para la extracción de la fracción polar de pigmentos presentes en muestras de fitoplancton de agua fresca.

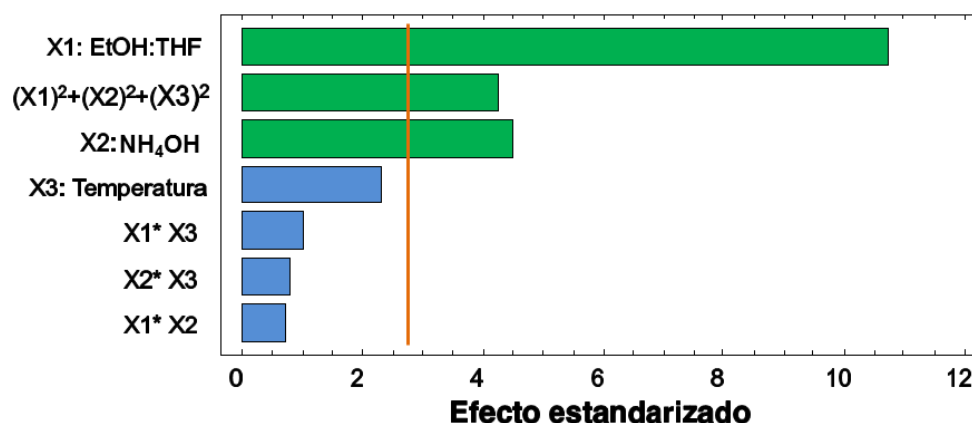


Figura 14. Gráfica de Pareto mostrando la influencia de factores experimentales individuales y sus combinaciones sobre la concentración de clorofila a presente en la fracción polar de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.

El gráfico de Pareto mostrado en la **Figura 14**, muestra cuales son las variables o interacciones de variables que presentan los efectos que contribuyen más a la varianza. Las variables o interacciones de estas que se encuentran en la zona de mayor efecto estandarizado

(zona derecha de la línea roja), explican el 80% de la varianza de los datos. Por el contrario, las variables individuales (o sus interacciones) que se encuentran hacia la zona de menor efecto no contribuyen significativamente en el proceso de extracción de pigmentos fitoplanctónicos polares. En este caso, la relación EtOH:THF presenta el efecto independiente más alto, seguido por el porcentaje de hidróxido de amonio (NH_4OH). Las interacciones entre las variables $X_1 \times X_2$, $X_2 \times X_3$ y $X_1 \times X_3$, no presentan una contribución significativa.

Estos resultados son comparables con los reportados por Wright *et al.* (Simon Wright & Jeffrey, 2006), quienes recomiendan el uso de hidróxido de amonio (NH_4OH) en la extracción de pigmentos del tipo clorofila, para preservar su estructura. Asimismo, algunos autores han reportado la mezcla EtOH:*n*-hexano, como solvente de extracción para el aislamiento de clorofilas y carotenoides a partir de la microalga *Dunaliella salina*, estos autores reportan el desarrollo de una metodología para el análisis rápido de estos pigmentos por UPLC-UV-MS, donde identificaron en total 37 pigmentos (Fu et al., 2012).

El etanol (EtOH) como solvente para la extracción de pigmentos fitoplanctónicos, también fue utilizado por Juin, C., *et al.* (Juin et al., 2015), quienes reportaron el análisis de clorofilas y carotenoides por UPLC-MS, aislados a partir de *Porphyridium purpureum* cultivada en el laboratorio. Los autores reportan la identificación de siete pigmentos o derivados, previa realización de una base de datos con el análisis de 22 pigmentos estándar.

En la **Figura 15**, se muestran las coordenadas experimentales para el diseño experimental 2^3 , el punto donde se obtiene la máxima respuesta del observable corresponde a las coordenadas [-1, 1, -1] y representa las siguientes condiciones de extracción: relación

EtOH:THF (1:1), porcentaje de hidróxido de amonio (NH_4OH): 0,1% y temperatura de extracción de 15 °C.

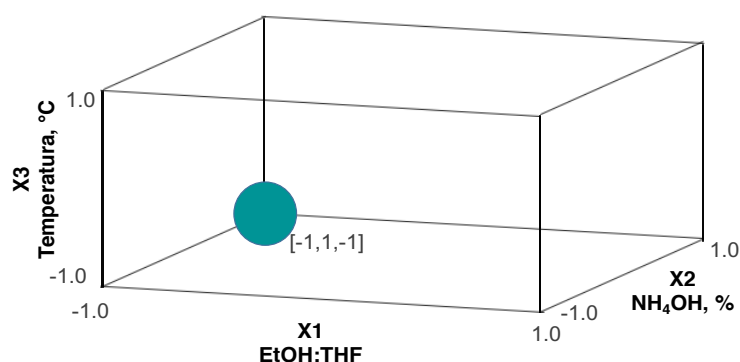


Figura 15. Coordenadas experimentales obtenidas a partir del diseño experimental 2^3 para la extracción de clorofila a presente en la fracción polar de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.

Las condiciones de extracción identificadas, que permiten obtener mayor cantidad de pigmentos a partir de las muestras de fitoplancton, fueron utilizadas para obtener los extractos que se analizan y se discuten en las siguientes secciones del documento.

4.3 Análisis por HPLC/UV-Vis del extracto crudo de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.

La separación por HPLC de los extractos de pigmentos es el “*gold standard*” utilizado para realizar análisis quimiotaconómicos a poblaciones de fitoplancton (Heukelem & Thomas, 2001). En nuestro caso, el análisis por HPLC se utilizó como estándar de comparación para los

resultados obtenidos por espectrometría de masas, como se discute en capítulos posteriores. Los análisis por HPLC se realizaron en fase reversa bajo las condiciones reportadas en la **Sección 3,4** de la metodología. La cuantificación de los compuestos observados en HPLC se realizó por el método del estándar externo, utilizando curvas de calibración con patrones certificados de diadinoxantina, clorofila b, clorofila a y β -caroteno. Los demás compuestos detectados por HPLC, para los cuales no se contaba con un estándar de la molécula, se cuantificaron por el método del estándar interno utilizando la luteína, un carotenoide tipo xantofila ($C_{40}H_{56}O_2$, **Figura 10**), en concentración de 5 $\mu\text{g/L}$ (Véase **Anexo 1**).

En la **Figura 16** se muestra el cromatograma HPLC/UV-Vis del extracto crudo de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca obtenido utilizando extracción L-S asistida con ultrasonido, con *n*-heptano:THF:EtOH, 2:1:1 v/v, como solvente, en una relación material:solvente (2:1, mg/mL), y temperatura de 15 °C por 10 min, como se describió en la **Sección 3,3**. Se identificaron 9 componentes en la muestra de pigmentos, cuatro de los cuales corresponden a moléculas de las cuales se tenían patrones certificados (diadinoxantina, clorofila a, clorofila b y β -caroteno) y cinco de los cuales se identificaron por comparación de tiempos de retención con reportes de literatura (neoxantina, anteraxantina, diatoxantina, zeaxantina y anómero de clorofila a). En la muestra no se identificaron derivados de clorofila como feofitinas, clorofilidas o feoforbidas. En la **Tabla 8** se reportan los datos de identificación y cuantificación de los compuestos mencionados anteriormente.

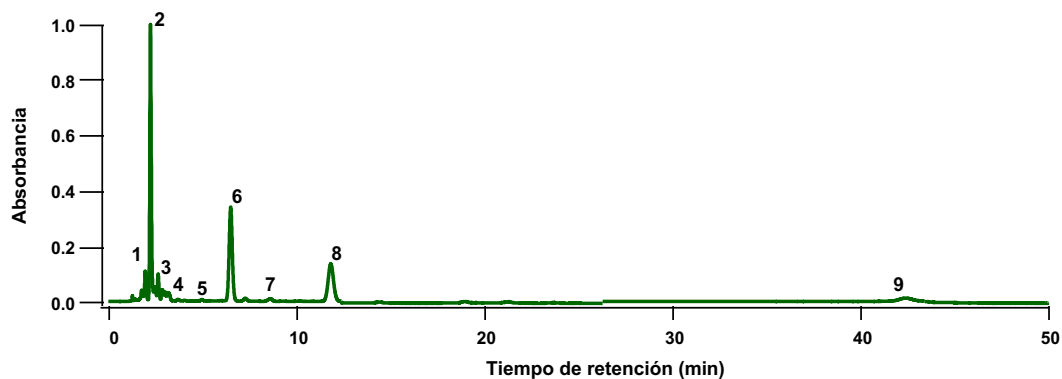


Figura 16. Cromatograma HPLC del extracto de pigmentos fitoplanctónicos obtenido mediante radiación de ultrasonidos con las mejores condiciones del diseño experimental 2³, columna *AT Eclipse XDB-C₁₈* de 4,6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula en fase reversa, flujo: 1 mL/min, detector UV-Vis ($\lambda=450$ nm).

Tabla 8.

Identificación y cuantificación de pigmentos presentes en el extracto crudo de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca por HPLC/UV-Vis.

Nº	Compuesto	Fórmula	t _R , m	Absorción (nm)	mg/L ± SD (n=3)		
1	Neoxantina**	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	1,9	437, 465	0,23	±	0,05
2	Diadinoxatina*	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	2,2	444, 474	9,0	±	0,7
3	Anteraxantina**†	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	3,0	446	0,20	±	0,02
4	Diatoxantina**	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	4,0	451, 478	0,12	±	0,01
5	Zeaxantina**	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	5,5	450, 472	0,17	±	0,01

Tabla 8*Continuación*

6	Clorofila b*	C ₅₅ H ₇₀ O ₆ N ₄ Mg	6,8	468, 652	22	±	1
7	Clorofila a anón	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	8,2	432, 665	0,18	±	0,01
8	Clorofila a*	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	11,6	432, 665	111	±	9
9	β-Caroteno*	C ₄₀ H ₅₆	42,3	450, 476	16	±	2

* Compuestos identificados por comparación de tiempos de retención con los de patrones certificados y cuantificados por el método del estándar externo utilizando una curva de calibración para cada pigmento (Véase **Sección 3.4** y **Anexo 1**).

** Identificación tentativa de los compuestos, por comparación de tiempos de retención con compuestos reportados en la literatura y cuantificados por el método del estándar interno utilizando luteína 5 µg/L (Véase **Sección 3.4** y **Anexo 1**).

Los resultados que se presentan en la **Figura 16** y en la **Tabla 8** concuerdan con los reportes de Brotas & Plante-Cuny (Brotas & Plante-cuny, 2003), quienes reportaron la presencia de diadinoxantina, anteraxantina y diatoxantina, en extractos metanólicos de una Euglenofita *Euglena* sp, cultivada bajo condiciones controladas de temperatura y exposición a la luz solar. Estos autores, también reportan la presencia de clorofilida b y feofitina b en la muestra de *Euglena* sp analizada; sin embargo, estos compuestos no fueron identificados en esta investigación. De acuerdo con reportes previos (Brotas & Plante-cuny, 2003), en un análisis por HPLC en fase reversa la clorofilida b tiene tiempo de retención menor que el de la diadinoxantina (2,2 min, **Figura 16**). De acuerdo con esto, la clorofilida b posiblemente se

encuentre por debajo del límite de detección del método o co-eluida con las señales previas a la diadinoxantina. Adicionalmente, en el microorganismo *Euglena gracilis* han sido reportados pigmentos de tipo carotenoide como la neoxantina, diadinoxantina, diatoxantina, β -caroteno y α -caroteno (Jeffrey et al., 1997)(Manuel Zapata & Garrido, 2000). En esta investigación, se identificaron la neoxantina, diadinoxantina, diatoxantina y β -caroteno.

Entre los pigmentos de tipo clorofila, la clorofila a (111 ± 9 mg/L) se encuentra en mayor abundancia en el extracto de pigmentos aislados de fitoplancton de agua fresca, seguida por la clorofila b (22 ± 1 mg/L) (**Figura 17**). Pese a que la clorofila a y la clorofila b son los compuestos que se encuentran en mayor concentración en la muestra, presentan factores de respuesta bajos comparados con los carotenoides, lo cual se puede observar a partir de las pendientes de las curvas de calibración realizadas, lo anterior debido posiblemente a la longitud de onda utilizada para las mediciones (λ : 450 nm), aunque todos los compuestos de interés absorben a esta longitud de onda, los valores máximos de absorción de las clorofilas se encuentran en 665 y 432 nm, mientras que para β -caroteno y diadinoxantina, las longitudes de absorción máxima son 450 y 444 nm, respectivamente. La concentración de clorofila a, es utilizada en análisis de rutina como una estimación de la biomasa fitoplanctónica debido a que se encuentra presente en todas las microalgas fotosintéticas. En este caso, la alta concentración de clorofila a indica que la muestra de agua se encuentra en un ambiente hipereutrófico (concentración de clorofila a mayor que 40 $\mu\text{g/L}$), este crecimiento desmedido de algas puede llegar a sofocar la fauna que habita el cuerpo de agua y podría llegar incluso a generar zonas muertas bajo la superficie (Moreno-Arbeláez & Ramírez-Restrepo, 2010). La clorofila b no es un pigmento generalizado en los organismos fotosintéticos y se encuentra principalmente en microorganismos de tipo Clorófitas, Euglenoideas y Prochlorales (S. Wright, 1991).

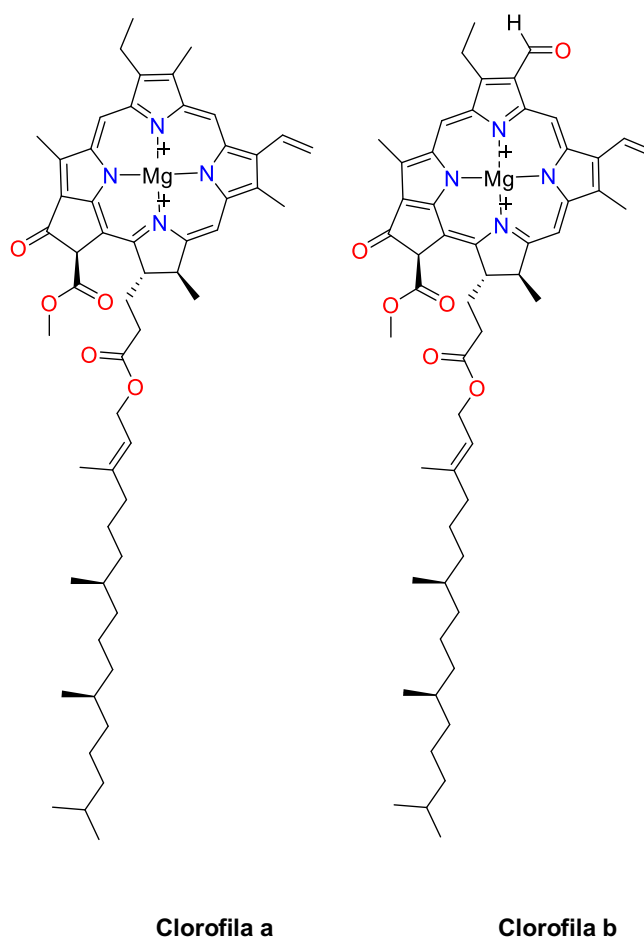


Figura 17. Estructuras químicas de la clorofila a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) y la clorofila b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$), pigmentos fotosintéticos identificados y cuantificados mediante HPLC/UV-Vis en los extractos de pigmentos de fitoplancton en muestras de agua fresca.

Entre los carotenoides presentes en la muestra de fitoplancton de agua fresca, el pigmento tipo xantofila diadinoxantina (Véase **Figura 18**), es del que se reporta más comúnmente en la literatura. La diadinoxantina hace parte del ciclo de la xantofila, un importante ciclo enzimático que funciona como indicador del estado fisiológico de la biomasa vegetal. En este ciclo, ocurre la eliminación enzimática de grupos epoxi por parte de las

xantofilas, para formar xantofilas de-epoxidadas. Además, estos ciclos enzimáticos cumplen un papel fundamental en la disipación de la energía dentro de las proteínas de antena de recolección de luz, mediante el enfriamiento no fotoquímico, un mecanismo para reducir la energía que llega a los centros de reacción fotosintética. En los microorganismos fitoplanctónicos, la diadinoxantina se transforma en diatoxantina (en el caso de diatomeas) o dinoxantina (para dinoflagelados) (Schagerl et al., 2000).

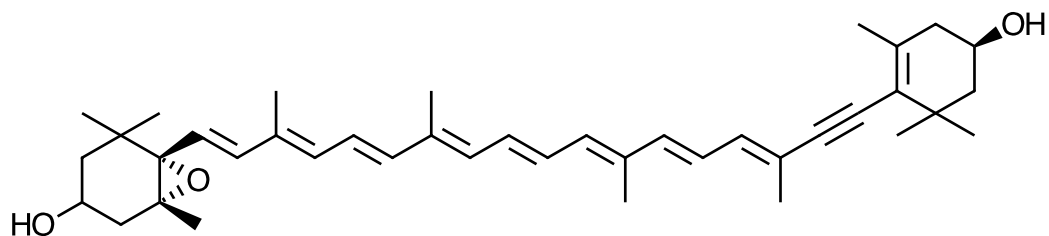


Figura 18. Estructura química de la diadinoxantina ($C_{40}H_{54}O_3$), carotenoide de tipo xantofila identificado y cuantificado por HPLC/UV-vis en los extractos de pigmentos de fitoplancton en muestras de agua fresca.

La identificación y cuantificación de pigmentos en muestras de fitoplancton es fundamental para establecer las familias de microorganismos que lo componen, mediante correlaciones quimiotaconómicas. En la **Tabla 9**, se relacionan los pigmentos identificados en el extracto de la muestra de agua fresca por HPLC/UV-Vis con diferentes grupos de microorganismos que pueden estar presentes en fitoplancton, utilizando como referencia las tablas pigmentarias reportadas por Jeffrey *et al.* (Jeffrey et al., 1997). Tal como se puede observar en la **Tabla 9**, todos los pigmentos identificados en el fitoplancton presente en la muestra de agua fresca, a excepción de la zeaxantina, son propios de microorganismos del grupo Euglenofita, lo cual confirma la identificación taxonómica realizada mediante microscopía óptica (ver **Sección 4,1**).

Tabla 9.

Pigmentos presentes en la muestra de agua fresca y su asociación con microorganismos presentes en fitoplancton (tomado y modificado de Jeffrey et al. (Jeffrey et al., 1997)).

Pigmentos	División algal/Clase
Clorofilas	
Clorofila a	Cianobacterias, Proclorofitas, Rhodofita, Criptofita, Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenofita, Eustigmatofita, Bacillariophyta, Dinofita, Prymnesiophyceae, Chrysophyceae, Raphidophyceae
Clorofila b	Proclorofitas, Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenofita, Dinofita
Carotenos	
β -Caroteno	Cianobacterias, Proclorofitas, Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenofita, Eustigmatofita, Bacillariophyta, Dinofita, Prymnesiophyceae, Chrysophyceae, Raphidophyceae
Xantofilas	
Neoxantina	Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenofita
Diadinoxantina	Euglenofita, Bacillariofita, Dinofita, Prymnesiophyceae, Chlorophyceae, Raphidophyceae
Anteraxantina	Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenofita

Tabla 9*Continuación*

Diatoxantina	Euglenofita, Bacillariophyta, Dinofita, Prymnesiophyceae, Chlorophyceae, Raphidophyceae
Zeaxantina	Cianobacterias, Prochlorofitas, Rhodofita, Chlorophyceae, Eustigmatofita

De acuerdo con las clases algales asociadas a los pigmentos identificados mediante el análisis HPLC, la clase algal *Chlorophyceae*, también está relacionada con los identificados. Los microorganismos que hacen parte de esa clase algal son generalmente unicelulares, pueden llegar a formar colonias simples cuya principal característica es la presencia de coloración verde. En esta clase algal, la forma de los cloroplastos, la disposición y el número de tilacoides dentro de los cloroplastos de las células, es una herramienta muy importante para su identificación taxonómica. Además, los microorganismos que hacen parte de esta clase algal se encuentran distribuidos principalmente en ambientes de agua fresca, aunque también se pueden encontrar en agua marina (Donnell, Fey, & Cottingham, 2013)(Ohnuki et al., 2013).

Los análisis por HPLC de los pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua dulce mostraron la presencia de moléculas fotoactivas características de microorganismos fotosintéticos de tipos *Chlorophyceae* y *Euglenofita*. Se identificaron y cuantificaron nueve compuestos de tipo clorofila y carotenoide en las muestras analizadas.

4.4 Análisis por espectrometría de masas LDI-TOF y MALDI TOF las fracciones polar y apolar de pigmentos aislados de muestras de fitoplancton de agua fresca.

Teniendo como información composicional base los datos derivados de los análisis por HPLC, en esta sección se estudian los extractos de pigmentos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y se comparan los resultados con la información cromatográfica y taxonómica disponible para las muestras. Los análisis MALDI TOF para los extractos obtenidos con solventes polares y no polares se realizaron utilizando matrices de transferencia electrónica. Descriptores analíticos como precisión/exactitud en la masa (**Ecuación 3**), resolución y S/N, además los patrones isotópicos de los iones moleculares o de las moléculas protonadas se utilizaron para la identificación de los compuestos detectados en los extractos de pigmentos (**Tabla 4**).

$$\Delta\text{ppm} = \frac{\text{Masa}_{\text{calculada}} - \text{Masa}_{\text{experimental}}}{\text{Masa}_{\text{calculada}}} \times 10^6 \quad \text{Ecuación}$$

3

Inicialmente, se realizaron experimentos LDI-TOF MS (**Figura 18**) para el extracto crudo, la fracción polar, la fracción no polar y la mezcla de ambas fracciones, para confirmar la presencia de pigmentos fitoplanctónicos en la muestra y en cada una de sus fracciones, y para evaluar la información que se puede obtener bajo condiciones LDI. Los espectros LDI para todos los extractos muestran una clara segregación de las señales; en la región entre m/z 500 y m/z 600 se encuentran las señales correspondientes a carotenoides, mientras las clorofilas se agrupan en la región entre m/z 860 y m/z 940. La Tabla xx contiene información sobre el rango de masas en el cual se observan señales características de estos compuestos.

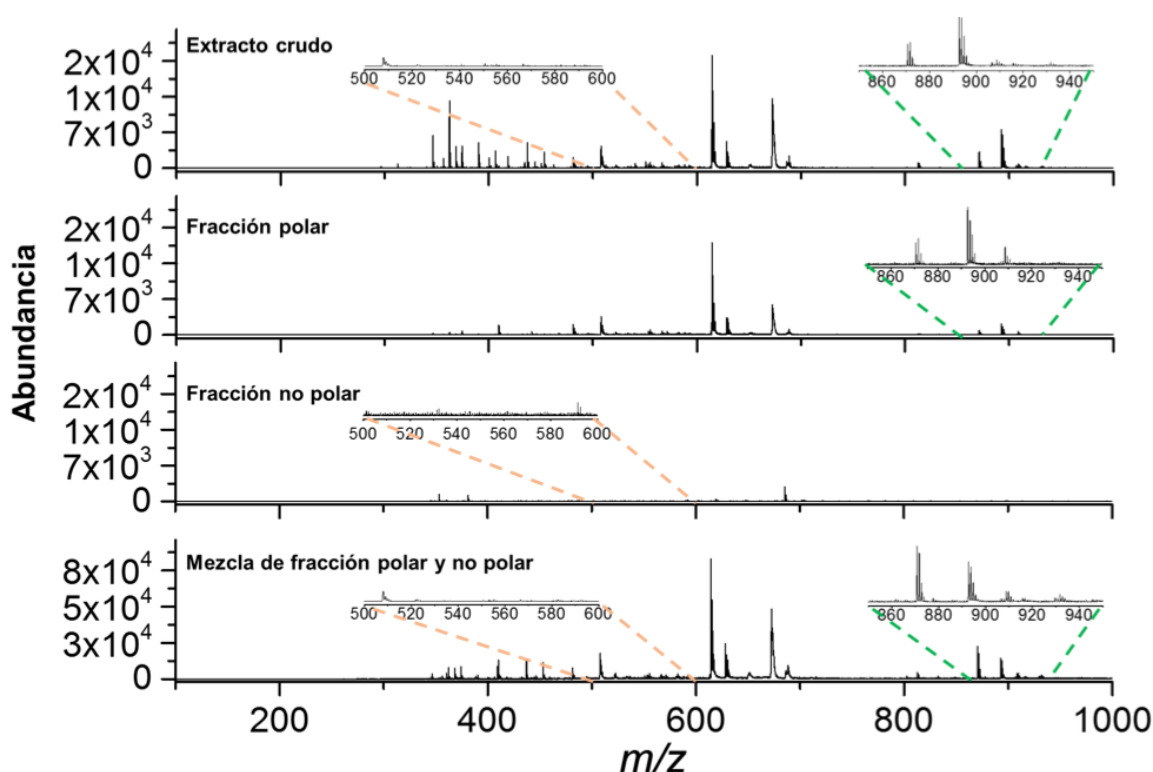


Figura 18. LDI-TOF MS del extracto crudo de pigmentos fitoplanctónicos, las fracciones polar y no polar y la mezcla de ambas fracciones, utilizando soluciones a 5 mM de cada muestra, las líneas color naranja (-) entre m/z 500 y m/z 600 corresponden a señales correspondientes a carotenoides, las líneas color verde (-) entre m/z 860 y m/z 940 corresponden a las clorofilas.

En la técnica LDI no se utiliza una matriz, por lo tanto, los compuestos se ionizan de acuerdo con su capacidad de absorber radiación láser. Típicamente, LDI permite el análisis de moléculas altamente conjugadas como colorantes orgánicos o porfirinas, por lo que es una alternativa útil y rápida a MALDI en el rango de masas bajo. Sin embargo, LDI es una ionización menos suave que MALDI por lo que pueden ocurrir fragmentaciones (Gross, 2004).

La eficiencia de ionización de un compuesto en LDI esta asociada con su potencial de ionización (PI) de tal forma que compuestos con bajos PI pueden ionizarse más fácilmente. Debido a su función en la absorción de fotones, los pigmentos fitoplactónicos de tipo de tipo clorofila y carotenoide se caracterizan por presentar una estructura química altamente conjugada, lo que se traduce en valores de potenciales de ionización relativamente bajos. En la **Tabla 10** se encuentran algunos valores de potenciales de ionización (PI) reportados para pigmentos fitoplanctónicos comunes.

En la **Figura 18** se observan, en el espectro LDI del extracto crudo, señales correspondientes a clorofilas, como clorofila a en m/z 892,5353, clorofila b en m/z 906,5145, derivados como la clorofilida a en m/z 614,2379, la clorofilida b en m/z 628,2172 y feofitina a en m/z 870,5659. En el análisis por LDI-TOF MS del extracto crudo no se logró identificar el carotenoide β -caroteno m/z 536,4382, el cual si fue identificado en el análisis HPLC y está directamente relacionado a los microorganismos presentes en la muestra de agua fresca (**Tabla 9**). En el análisis de la fracción polar del extracto, se identificaron compuestos de tipo clorofila, y se observaron algunos fragmentos como se muestra en la **Figura 19**. Además, en la fracción polar del extracto también se logró ionizar y detectar carotenoides de tipo xantofila como diadinoxantina m/z 582,4072 y diatoxantina m/z 566,4123; los cuales también fueron identificados en los análisis HPLC del extracto crudo (**Sección 4,3 y Tabla 8**).

Tabla 10.*PI y masas para compuestos fotosintéticos característicos en fitoplancton.*

Pigmento	Fórmula	(PI), eV			Referencia
Clorofila a	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	6,10	±	0,20	(Nakato, Chiyoda, & Tsubomi 1974)
Clorofila c2	C ₃₅ H ₂₈ O ₅ N ₄ Mg	6,15	±	0,24	(Jaramillo et al., 2012)
β-Cryptoxantina	C ₄₀ H ₅₆ O	6,34	±	0,10	(Dangles et al., 2018)
Luteína	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	6,57	±	0,10	(Dangles et al., 2018)
Cantaxantina	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	6,75	±	0,10	(Dangles et al., 2018)
Echinenone	C ₄₀ H ₅₄ O	6,53	±	0,10	(Dangles et al., 2018)
Adonixantina	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	6,75	±	0,25	(Dangles et al., 2018)
α-Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	6,35	±	0,10	(Dangles et al., 2018)
β-Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	6,41	±	0,20	(Nakato et al., 1974)(Dangles et al., 2018)
Anteraxathin	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	6,53	±	0,10	(Dangles et al., 2018)
Zeaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	6,43	±	0,10	(Dangles et al., 2018)
Violaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	6,57	±	0,10	(Dangles et al., 2018)
Astaxantina	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	6,67	±	0,10	(Dangles et al., 2018)

En la **Figura 19**, se muestran el espectro MS LDI de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos, en el análisis de esta fracción el ion más intenso (pico de base) es la clorofilida a en m/z 614,2373, que puede corresponder a un artefacto producto del proceso de extracción-ionización (pérdida del grupo fitol por parte de la clorofila a), o puede estar presente inicialmente en la muestra. Por lo que puede ser de origen natural o artefactos del proceso de extracción.

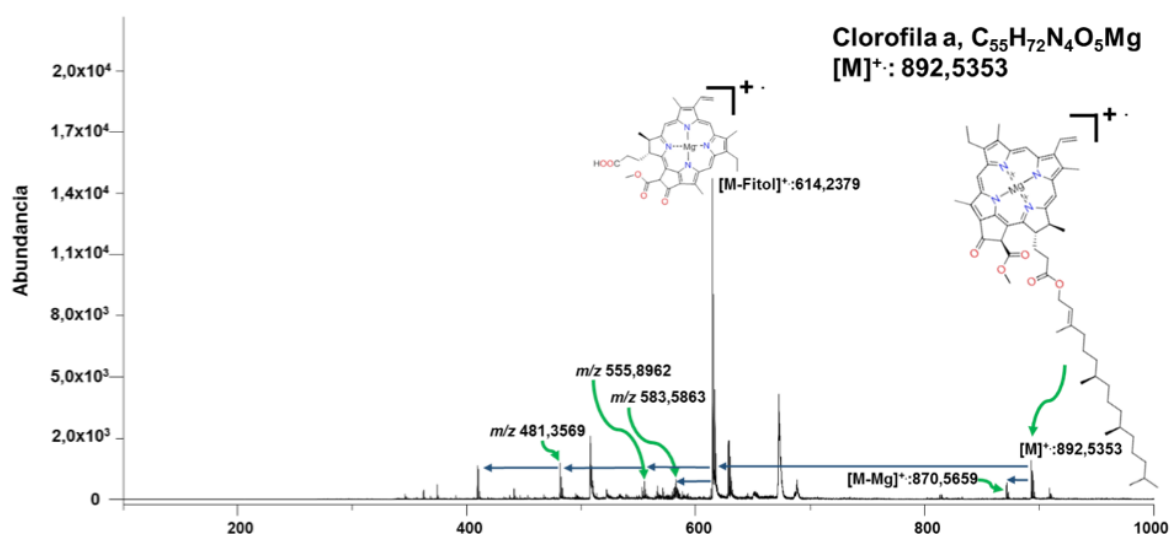


Figura 19. Espectro LDI-TOF MS de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca utilizando una solución a 5 mM.

Por otra parte, en el análisis LDI-TOF MS de la fracción no polar de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca no se logró identificar el carotenoide β -caroteno m/z 536,4382, el cual si fue observado en el extracto crudo analizado mediante HPLC (Véase **Sección 4,3** y **Tabla 8**). El que no se haya observado señal para el β -caroteno en la fracción no polar puede

deberse a que el análisis por LDI-TOF MS no es el adecuado para este tipo de compuestos. De la misma manera, en el análisis LDI-TOF MS de la mezcla de la fracción polar y la fracción no polar del extracto tampoco se logró identificar el compuesto β -caroteno. Lo anterior, sugiere que la estrategia LDI-TOF MS no es suficiente para identificar todos los compuestos presentes en los extractos de pigmentos.

Como conclusión de esta sección se puede afirmar que las señales presentes en los espectros de masas LDI del extracto crudo, la fracción polar, la fracción no polar y la mezcla de ambas fracciones (Véase **Figura 18**) corroboran los resultados obtenidos por espectroscopia UV-vis (**Figura 13**), donde se identificaron bandas de absorción en regiones del espectro electromagnético de 415-470 nm y 645-670 nm, que fueron atribuidas a la presencia de compuestos porfirínicos como pigmentos de tipo clorofila. Estas bandas de absorción se encontraron especialmente para la fracción polar del extracto crudo de pigmentos fitoplanctónicos.

A continuación, se presentan los resultados del análisis de las muestras de extractos de pigmentos utilizando la técnica MALDI-TOF MS mediante ionización por transferencia electrónica (ET). El proceso de ET inicia con la formación de iones primarios de la matriz mediante un mecanismo de “*pooling*” tal y como se expone en el modelo CPCD (*Coupled Physical and Chemical Dynamics*) (R. Knochenmuss & Zenobi, 2003)(Richard Knochenmuss, 2014). Una vez formados, los iones de la matriz pueden abstraer un electrón del analito neutro para formar un ion secundario del analito; esta reacción solo es posible si el PI del analito (A) es menor que el PI de la matriz (M), como se muestra a continuación (**Ecuación 1**) (Mccarley et al., 1998):



Los análisis de las fracciones polar o no polar de pigmentos, aislados de microorganismos fitoplanctónicos de agua fresca, se realizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, siguiendo la metodología que se describe en la **Sección 3.5**. Para las reacciones de intercambio de carga en fase gaseosa se utilizaron las matrices de transferencia electrónica CNFVCH₃ y CNFVOCH₃, sintetizadas y reportadas por el grupo de investigación GIFTEX (**Figura 20**). La selección de estas matrices se hizo con base en sus propiedades fisicoquímicas, como PI que para el CNFVCH₃ es de 8,20 eV y para el CNFVOCH₃ es de 8,19 eV, y su bajo umbral de energía para formación de iones primarios que les confiere capacidad de formar abundantes especies cargadas (Castellanos-García et al., 2017; Castellanos-Garcia et al., 2015; Giraldo-Dávila et al., 2018; Ramírez-pradilla et al., 2018). Adicionalmente, se utilizó la matriz comercial *trans*-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB) (PI: 8,54 eV) (**Figura 21**) debido a sus múltiples aplicaciones en el análisis de compuestos lábiles y termoinestables (Vasil'ev et al., 2006),

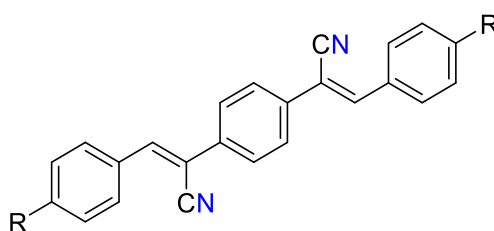


Figura 20. Estructura química de los derivados de α -cianofenilenvinilenos (α -CNFVs), reportados por el GIFTEX como matrices MALDI de transferencia electrónica, donde R= -CH₃ o -OCH₃ (Castellanos-García et al., 2017; Castellanos-Garcia et al., 2015; Giraldo-Dávila et al., 2018; Ramírez-pradilla et al., 2018).

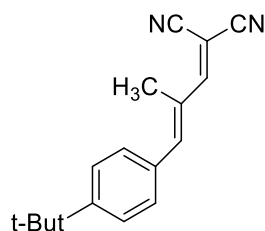


Figura 21. Estructura química del *trans*-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB), matriz estándar de transferencia electrónica en MALDI MS.

Los espectros LDI-TOF MS de cada una de las matrices utilizadas en el análisis MALDI se encuentran en el **Anexo 2**. Los espectros LDI permiten observar el comportamiento de la matriz, particularmente la formación de clusters y aductos que pueden interferir con los análisis en la región de masas bajas. En el caso de las matrices empleadas, se observa que CNFVCH₃ y CNFVOCH₃ no presentan formación de clusters o aductos en la región de masas bajas, que puedan interferir con la observación de compuestos de interés. Los espectros MALDI TOF del extracto crudo de pigmentos fitoplanctónicos, utilizando las matrices MALDI ET CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB, a diferentes proporciones molares Matriz:Analito (M:A) se encuentran en el **Anexo 2**. Para el análisis MALDI se realizaron curvas de aparición midiendo abundancia, relación señal ruido (S/N) y resolución del ion m/z 892,5353 (clorofila a), a diferentes energías del láser.

En la **Figura 22** se muestran los espectros de masas MALDI TOF para la fracción polar y la fracción no polar de pigmentos de fitoplancton, utilizando CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB, como matrices ET MALDI, y una relación M:A 100:1.

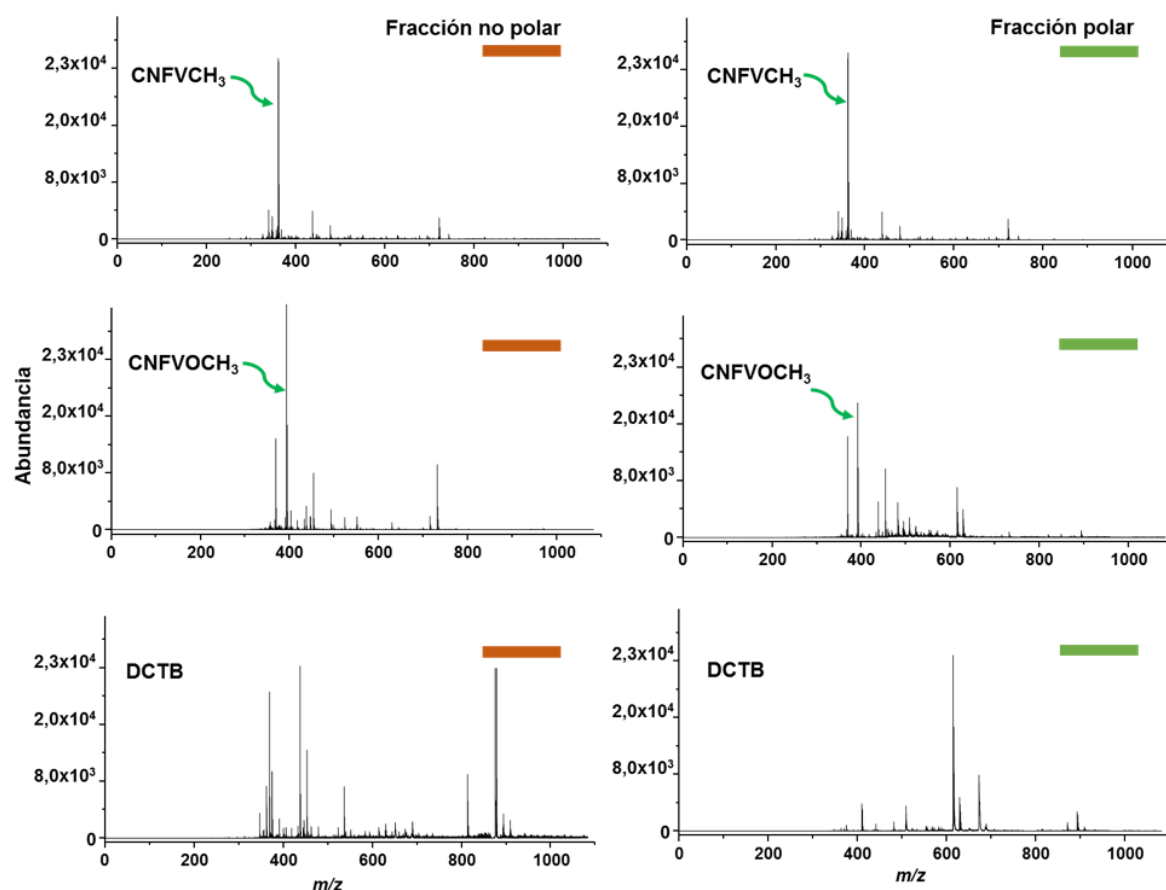


Figura 22. Espectros MALDI-TOF MS de la fracción polar y no polar de pigmentos fitoplanctónicos; utilizando CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB como matrices ET MALDI, en relación M:A 100:1.

Como se puede observar en la **Figura 22**, en los espectros MALDI-TOF MS de la fracción no polar del extracto, el análisis se concentra en la región m/z 500 a m/z 600 (ventana de análisis para los carotenoides) para evaluar el desempeño de cada una de las matrices ET

MALDI utilizadas en los ensayos. Con las matrices CNFVCH₃, CNFVOCH₃ no se observaron señales de carotenoides, mientras que con la matriz DCTB se logró identificar el ion en m/z 536,4382, correspondiente al catión radical de la molécula β -caroteno. Esta observación coincide con los datos recopilados por HPLC. En la **Figura 23** se muestra una ventana de 20 u, entre m/z 530 y 550, correspondiente a la fracción no polar de pigmentos extraídos de organismos fitoplanctónicos de agua fresca, utilizando CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB como matrices MALDI de transferencia electrónica.

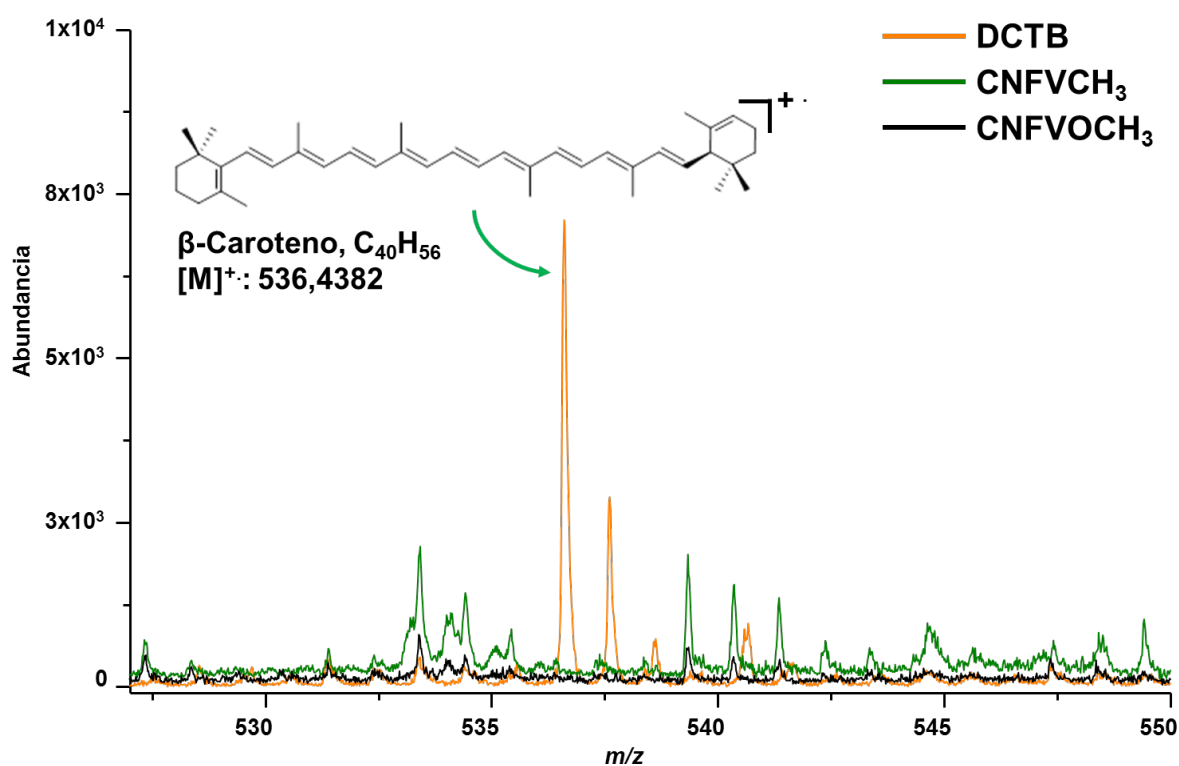


Figura 23. Ventana de acercamiento, entre m/z 530 y 550, del espectro de masas MALDI de la fracción no polar de pigmentos fitoplanctónicos, utilizando CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB como matrices de transferencia electrónica.

Utilizando el patrón isotópico del ion molecular del β -caroteno m/z 536,4382, y las proporciones de cada uno de sus isotopólogos se calculó la formación de la especie química $[M]^+$ y $[M+H]^+$, determinando la contribución de cada especie al patrón isotópico. En la **Figura 24**, se muestra la superposición del patrón isotópico teórico calculado utilizando el *software Compass Isotope Pattern* (Bruker Daltonics) con la distribución isotópica experimental del espectro de masas MALDI, utilizando DCTB como matriz de transferencia electrónica, una relación M:A 100:1. El β -caroteno, presenta un patrón isotópico teórico de M(100): M+1(43.907): M+2(9.405) que coincide con el patrón isotópico experimental en el análisis por MS MALDI M(100): M+1(40,455): M+2(9,957). Esta comparación no solo corrobora la identidad del compuesto, sino que permite además determinar que la señal observada en el espectro de masas MALDI, corresponde al catión radical ($M^{\cdot+}$) del β -caroteno $M^{\cdot+}= 536,4382$. Otros autores, Kaufmann *et al.*, (Kaufmann, Wingerath, Kirsch, Stahl, & Sies, 1996) han reportado la identificación de carotenoides por MALDI MS como $M^{\cdot+}$ durante el análisis de estándares de criptoxantina, zeaxantina, luteína y β -caroteno.

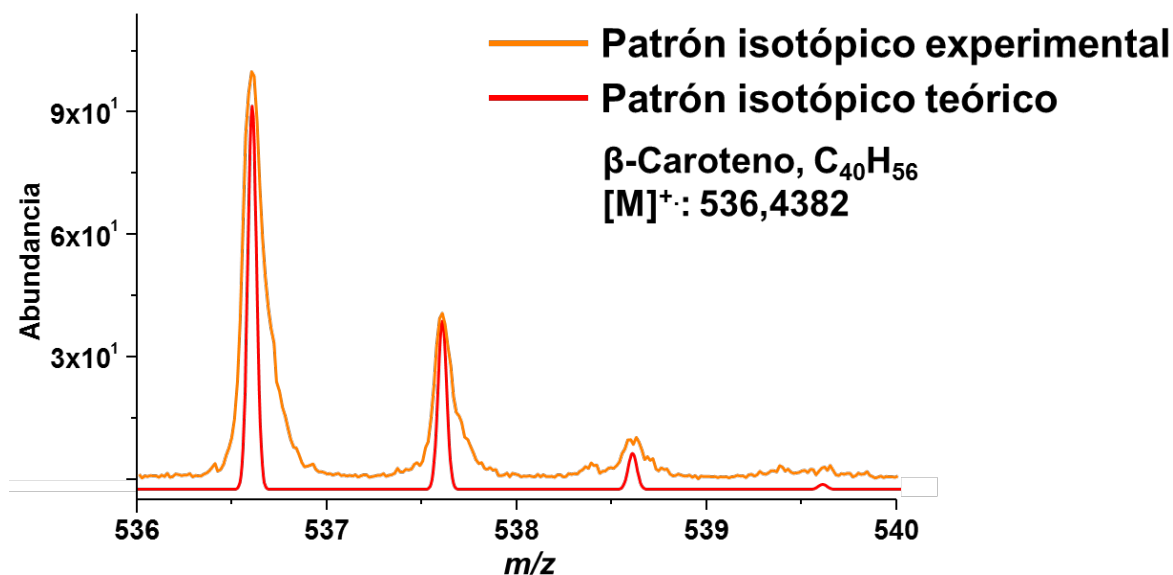


Figura 24. Superposición del patrón isotópico calculado en el *software Compass Isotope Pattern* (Bruker Daltonics) y el patrón isotópico experimental obtenido a partir de los ensayos MALDI del ion molecular del β-caroteno $M^{+} = 536,4382$, identificado en la fracción no polar, utilizando DCTB, relación M:A 100:1.

Adicionalmente, en la fracción no polar del extracto de pigmentos fitoplanctónicos, usando DCTB como matriz de transferencia electrónica, se logró identificar compuestos de tipo clorofila como feofitina a m/z 870,5659 e incluso clorofila a m/z 892,5353 con una baja abundancia, lo cual corrobora los resultados obtenidos en el análisis por espectroscopia ultravioleta visible (**Sección 4,2** y **Figura 13**) donde, en la fracción no polar del extracto (A), el espectro presentó una banda en la región de 650 nm a 700 nm, y se atribuyó a la absorción Q- de las clorofilas, compuestos derivados de la porfirina.

Por otra parte, en el análisis por MALDI-TOF MS de la fracción polar del extracto (**Figura 22**) se pueden observar dos regiones entre m/z 850 a 950 y m/z 600 a 700, las cuales

corresponden a las clorofilas con sus estructuras intactas y a derivados de las clorofilas, respectivamente. Además, una región entre m/z 400 a 550 que corresponde a las xantofilas, *i.e.*, el grupo de carotenoides que poseen uno o más átomos de oxígeno en su estructura química. En análisis de esta muestra con la matriz CNFVCH₃ se identificaron pigmentos de tipo clorofila. Adicionalmente, con la matriz CNFVOCH₃ se observaron abundantes señales en la región del espectro entre m/z 400 a 500, atribuidas a otros compuestos presentes en la fracción polar diferentes a moléculas intactas de carotenoides o clorofilas, los cuales muy posiblemente más adelante ampliarán esta investigación. Al utilizar el compuesto DCTB como matriz MALDI, se obtiene el ion correspondiente a clorofilida a m/z 614,2379, como ion pico de base.

Por otro lado, tal como se puede observar en la **Figura 22**, el ion m/z 892,5353, correspondiente a clorofila a se identificó con todas las matrices utilizadas (CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB) en la fracción polar de pigmentos de fitoplancton y, utilizando DCTB en la fracción no polar, lo cual es significativo pues la sobrevivencia del ion molecular es indispensable para el análisis por espectrometría de masas. Sin embargo, los mejores valores de relación señal/ruido (S/N) se obtuvieron con las matrices CNFVOCH₃ y DCTB como se muestra en la **Figura 25**.

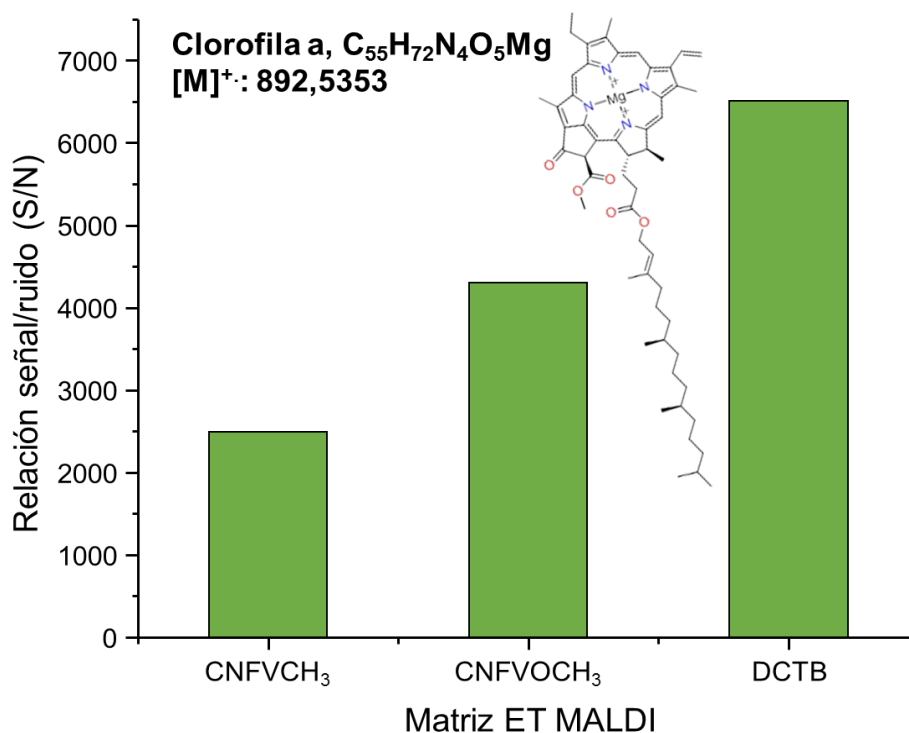


Figura 25. Valores de relación señal/ruido (S/N), medidos para el ion molecular correspondiente a la clorofila a, $[M]^+ = 892,5353$, utilizando las matrices ET MALDI CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB, proporciones M:A: 100:1.

El análisis de los patrones isotópicos (teóricos y experimentales) del ion molecular la clorofila a (m/z 892,5353) en los espectros con las tres matrices, permitió establecer las especies dominantes en el espectro. En la **Figura 26**, se muestra la superposición del patrón isotópico teórico, calculado a partir del *software Compass Isotope Pattern* (Bruker Daltonics) y el patrón isotópico experimental obtenido a partir de los ensayos ET MALDI. Se puede observar que existen dos vías, que dependen de la matriz empleada, para la formación del ion molecular de la clorofila a. Por ejemplo, con el CNFVOCH₃ como matriz la clorofila a se observa como molécula protonada $[M+H]^+$ en m/z 893,5431, mientras que con DCTB la clorofila a se registra como catión radical $[M]^+$ en m/z 892,5353. Lo cual también ocurre en el análisis LDI MS del

compuesto CNFVOCH₃ (Véase **Anexo 2**). Esto puede deberse a que, aunque ambas matrices MALDI (CNFVOCH₃ y DCTB) presentan un hidrógeno ácido en su estructura, CNFVOCH₃ se caracteriza por una estructura química más conjugada con dos átomos de hidrógeno ácidos, comparada con el DCTB. Y debido a que la clorofila a presenta sitios protonables, esto posibilita la ionización vía transferencia protónica.

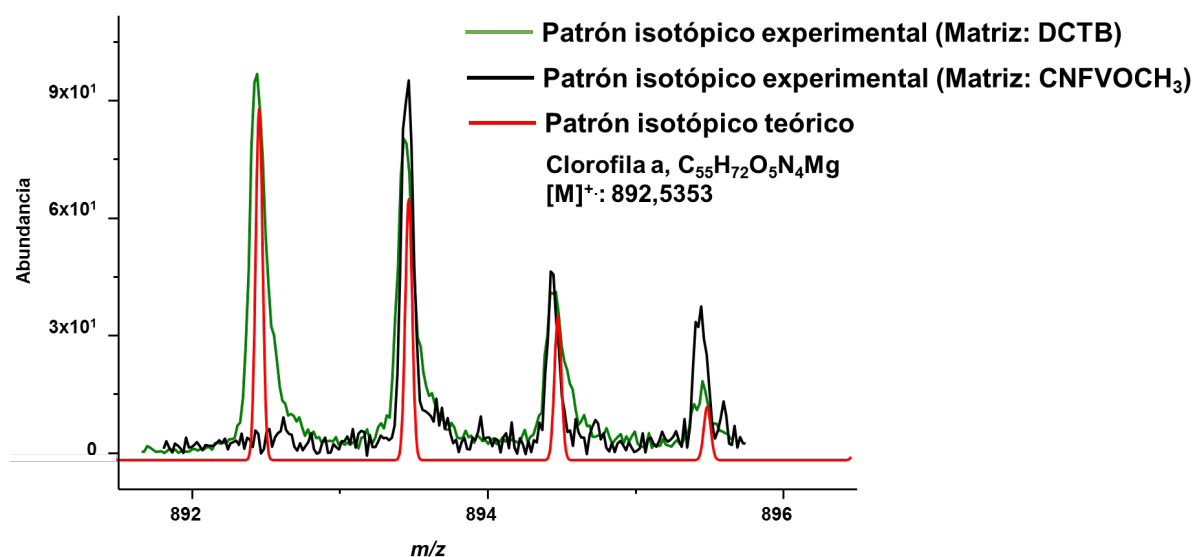


Figura 26. Superposición del patrón isotópico calculado en el *software Compass Isotope Pattern* (Bruker Daltonics) y el patrón isotópico experimental obtenido a partir de los ensayos ET MALDI para ion molecular de la clorofila a *m/z* 892,5353, utilizando las matrices CNFVOCH₃ y DCTB, a una proporción 100:1 M:A.

En la **Figura 27**, se muestra el espectro de masas de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos, utilizando DCTB como matriz ET MALDI, una relación M:A 100:1. En la **Tabla 11**, se encuentran los pigmentos identificados en la muestra de fitoplancton, utilizando

las matrices MALDI CNFVCH₃, CNFVOCH₃ o DCTB, en el análisis de la fracción no polar, la fracción polar.

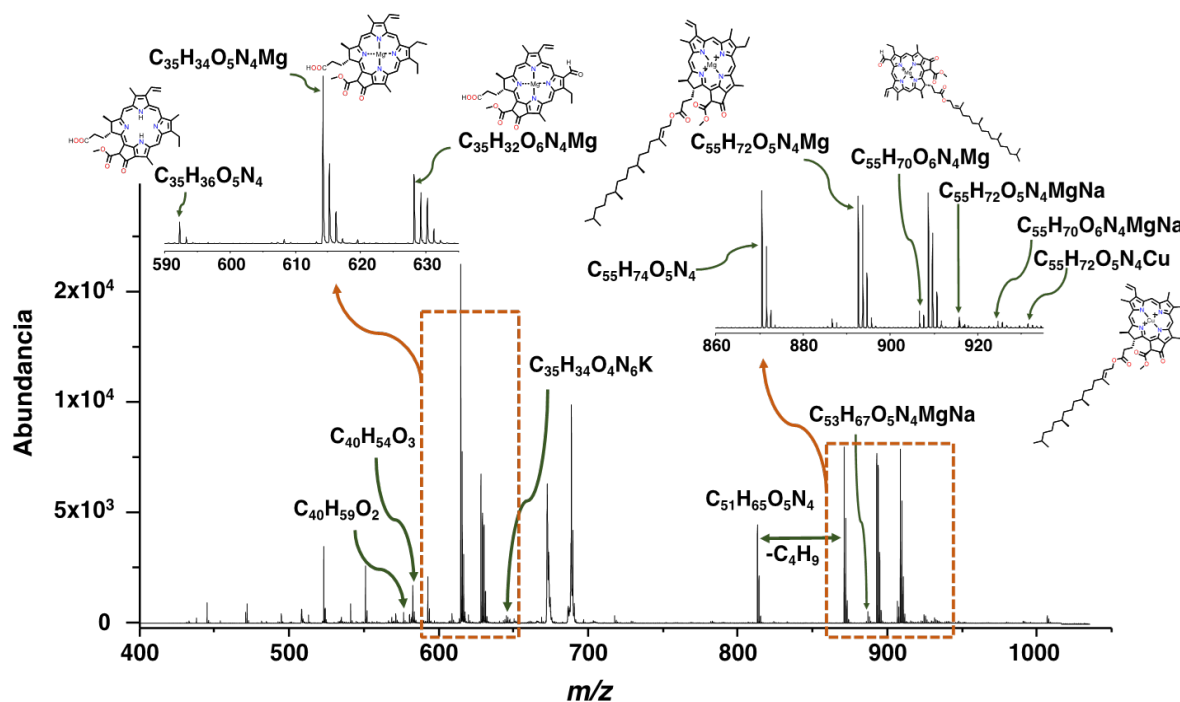


Figura 27. Espectros MALDI-TOF MS de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos; utilizando DCTB como matriz ET MALDI, en relación M:A 100:1.

Tabla 11.

Pigmentos fitoplanctónicos identificados en la muestraa de fitoplancton de agua fresca, utilizando las matrices ET MALDI CNFVCH₃, CNFVOCH₃ o DCTB.

Compuesto, M ⁺	Fórmula	Masas		Δppm	CNFVCH ₃	CNFVOCH ₃	DCTB
		Calculada	Experimental				
Porfirina de cobre	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Cu	931,478	931,452	27	-	-	+
Clorofila b + Na	C ₅₅ H ₇₀ O ₆ N ₄ MgNa	929,504	929,457	50	-	-	+
Clorofila b	C ₅₅ H ₇₀ O ₆ N ₄ Mg	906,514	906,512	2	-	-	+
Clorofila a	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	892,535	892,542	5	+	+	+
Feofitina a	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	870,565	870,564	1	+	+	+
Clorofilida b	C ₃₅ H ₃₂ N ₄ O ₆ Mg	628,218	628,217	1	+	+	+
Astaxantina + Na	C ₄₀ H ₅₂ O ₄ Na	619,380	619,385	14	-	-	+
Clorofilida a	C ₃₅ H ₃₄ N ₄ O ₅ Mg	614,237	614,238	1	-	+	+
Feoforbide a	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	592,268	592,301	55	+	-	+
Anteraxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	584,422	584,456	58	-	+	+

BIOMARCADORES QUIMIOTAXONÓMICOS EN FITOPLANCTON

Diadinoxantina	$C_{40}H_{54}O_3$	582,470	582,513	73	-	+	+
Fenicoxantina	$C_{40}H_{52}O_3$	580,392	580,375	28	-	+	+
Zeaxantina	$C_{40}H_{56}O_2$	568,428	568,421	12	-	-	+
7,8-Dihidroluteina B	$C_{40}H_{59}O_2$	571,251	571,247	7	-	+	+
Diatoxantina	$C_{40}H_{54}O_2$	566,412	566,458	81	-	-	+
Criptoxantina	$C_{40}H_{57}O$	553,440	553,431	16	-	+	+

De acuerdo con la información de la **Tabla 11**, con la matriz ET MALDI DCTB se logró identificar mayor número de pigmentos presentes en el fitoplancton de la muestra de agua fresca. Aún así, DCTB es una matriz que, como se ha reportado anteriormente, puede reaccionar con los analitos. Además, presenta un espectro con *background* alto y con formación de *clusters* (Véase **Anexo 2**), lo que dificulta la identificación de compuestos en masas bajas, como los presentes en esta mezcla compleja. DCTB presenta potencial de ionización (PI) alto, baja estabilidad en el vacío y baja presión de vapor, propiedades que posiblemente beneficiaron la desorción/ionización de los pigmentos fitoplanctónicos, los cuales son en su mayoría compuestos lábiles que se degradan fácilmente.

Utilizando la matriz DCTB, se midieron los descriptores analíticos abundancia de iones, relación señal/ruido (S/N) y resolución para el ion molecular de la clorofila a m/z 892,5353 a diferentes valores de energía del láser y se construyeron las gráficas mostradas en la **Figura 28**.

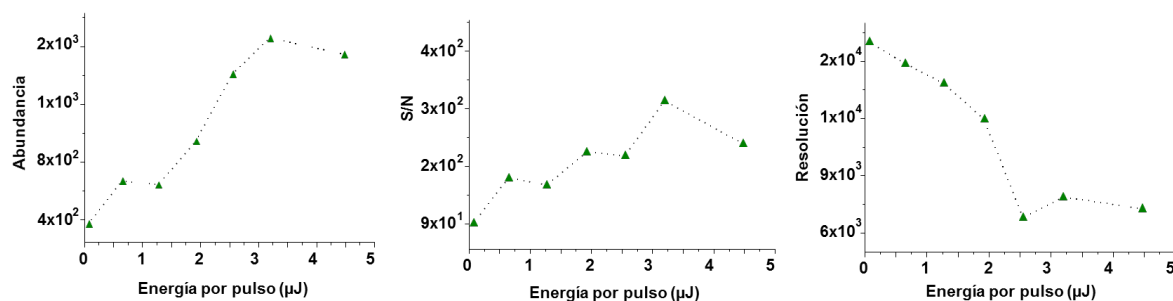


Figura 28. Descriptores analíticos medidos para el ion molecular de la clorofila a m/z

892,5353 de la fracción polar del extracto de fitoplancton, a diferentes valores de energía del láser, utilizando DCTB como matriz ET MALDI y una proporción M:A 100:1.

Típicamente, los espectros MALDI con baja fragmentación deben ser tomados a energías de incidencia del láser ligeramente superiores al umbral de formación de los iones (Gross, 2004). De acuerdo con las mediciones mostradas en la **Figura 28**, se estableció una energía del láser de 2 μ J, como valor de energía adecuado para la toma de los espectros MALDI. A continuación (Véase **Figura 29**), se muestran los principales pigmentos identificados en la muestra de fitoplancton de agua fresca.

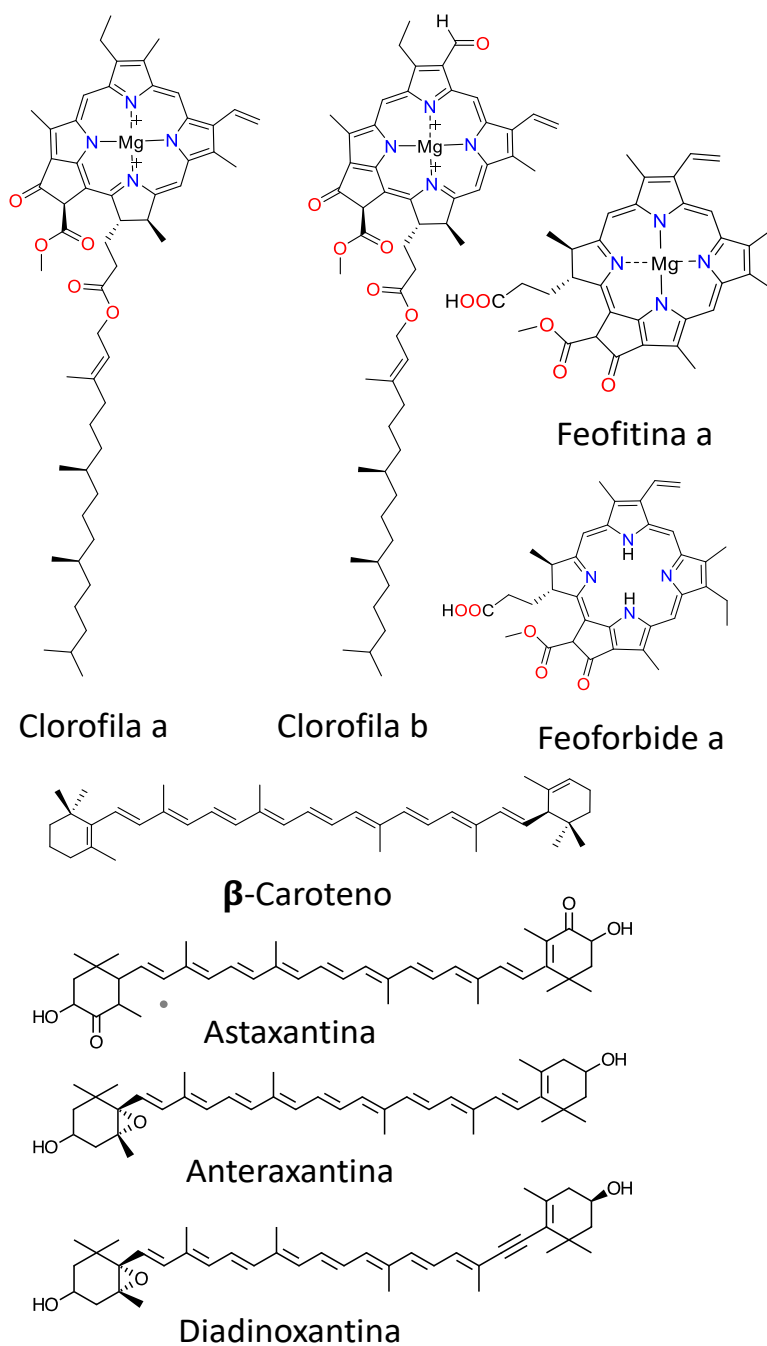


Figura 29. Estructura química de los principales pigmentos fitoplanctónicos identificados en la muestra de agua fresca por espectrometría de masas MALDI, utilizando las matrices CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB.

Adicionalmente, en los análisis por MALDI MS se encontraron iones metaestables (Véase **Figura 30**), los cuales se originan en el trayecto entre la cámara de ionización y el detector, lo que se registra es un ion de una masa aparente, que no es la del ion inicial. Estos iones, suelen detectarse como señales anchas en el espectro lo que permite rápidamente su identificación y como se dijo anteriormente, la masa medida (aparente) es menor comparada con la de los iones que dieron origen a su aparición.

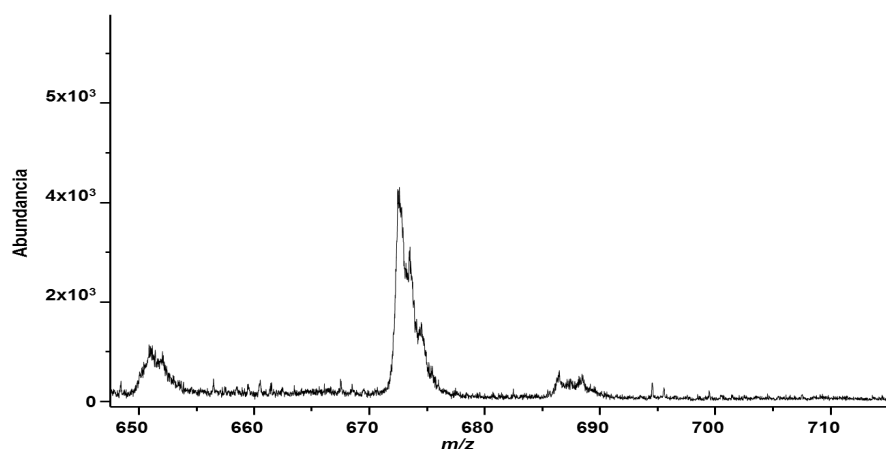


Figura 30. Acercamiento a las señales de iones metaestables en el rango m/z 650 a 715 del espectro de masas MALDI TOF, de la fracción polar de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca, utilizando la matriz ET MALDI DCTB.

La formación de iones metaestables en el análisis de carotenoides y clorofilas ha sido reportado en un número considerable de artículos científicos en el pasado. De esta manera, Baldas, J.; Porter, Q. (Cholnoky, Szabolcs, & Weedon, 1966), reportan una señal típica M-80 debido a la pérdida de C_6H_8 , estas diferencias fueron corroboradas con análisis de alta resolución y observación de los iones metaestables presentes. Por otra parte, autores como Brown, R.; Wilkins, C. (Brown & Wilkins, 1986), sugieren que el comportamiento metaestable de los iones derivados de la clorofila, pueden deberse al

exceso de energía suministrada en el proceso de la desorción, el tiempo que tarda la ionización comparado con la velocidad del analizador TOF o la selectividad del análisis. Otro parámetro que influye en la formación de iones metaestables es el tiempo de extracción de los iones, el cual posiblemente permite que se produzcan descomposiciones metaestables antes del análisis, una probable estructura para el ion m/z 673 (Véase **Figura 30**) es $[M+2K-H-(\text{fitol-H})-H_2O]^+$ (Tabet, Jablonski, & Cotter, 1985).

Con base en los resultados expuestos anteriormente, se propone realizar el análisis de pigmentos por MALDI-TOF MS mezclando en proporciones 1:1 cada una de las fracciones (polar y no polar), para enriquecer la muestra en carotenoides, pues inicialmente (como se mostró en el análisis del extracto crudo) no se logra identificar el ion correspondiente a caroteno. Además, se propone utilizar DCTB como matriz de transferencia electrónica en una proporción M:A 100:1 y una energía de incidencia del láser de 2 μJ .

4.5 Correlación entre los resultados obtenidos por espectrometría de masas MALDI TOF y HPLC de clorofilas y carotenoides presentes en los extractos de fitoplancton de agua fresca

La **Tabla 12** combina toda la información recopilada (análisis microscópico, HPLC, MALDI) hasta este punto sobre los pigmentos presentes en la muestra de fitoplancton.

Tabla 12.

Comparación entre los pigmentos identificados análisis vía HPLC y MALDI TOF MS.

BIOMARCADORES QUIMIOTAXONÓMICOS EN FITOPLANCTON

Pigmento	Fórmula molecular	HPLC	MS TOF	MALDI
Clorofila b + Na	C ₅₅ H ₇₀ O ₆ N ₄ MgNa	-	+	
Clorofila b	C ₅₅ H ₇₀ O ₆ N ₄ Mg	+	+	
Neoxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	+	+	
Clorofila a	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	+	+	
Feofitina a	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	+	+	
Clorofilida b	C ₃₅ H ₃₂ N ₄ O ₆ Mg	-	+	
Astaxantina + Na	C ₄₀ H ₅₂ O ₄ Na	-	+	
Clorofilida a	C ₃₅ H ₃₄ N ₄ O ₅ Mg	-	+	
Feoforbide a	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	-	+	
Anteraxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	+	+	
Diadinoxantina	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	+	+	
Diatoxantina	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	+	-	
Fenicoxantina	C ₄₀ H ₅₂ O ₃	-	+	
Zeaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	+	+	
7,8-	C ₄₀ H ₅₉ O ₂	-	+	
Dihidroluteina B				
Diatoxantina	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	-	+	
Criptoxantina	C ₄₀ H ₅₇ O	-	+	
β-Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	+	+	

El análisis por espectrometría de masas MALDI TOF, con matrices de transferencia electrónica, permite identificar un mayor número de pigmentos fitoplanctónicos en comparación con los resultados de HPLC utilizando una metodología estándar reportada en la literatura (**Sección 4,3**). Por esta razón, se procedió a realizar análisis MALDI MS en fracciones recolectadas de la elución por HPLC con el fin de determinar la posible co-elución de algunos compuestos.

Se recolectaron fracciones de diferentes tiempos de retención del cromatograma HPLC. En dichas fracciones, los pigmentos se encontraban disueltos en la fase móvil usada para el análisis cromatográfico (Fase móvil A: H₂O y, fase móvil B: MeOH), por lo que las fracciones se secaron bajo corriente de Ar a temperatura ambiente, para evitar la posible descomposición de las muestras. Una vez obtenida la muestra libre de metanol, se redisolvió en THF a una concentración *ca.*, 5 mM y se analizó por espectrometría de masas MALDI TOF, utilizando DCTB como matriz en relación M:A 100:1. En la **Figura 31** se

muestra el cromatograma HPLC con cada una de las fracciones de tiempos de retención analizadas por MALDI MS.

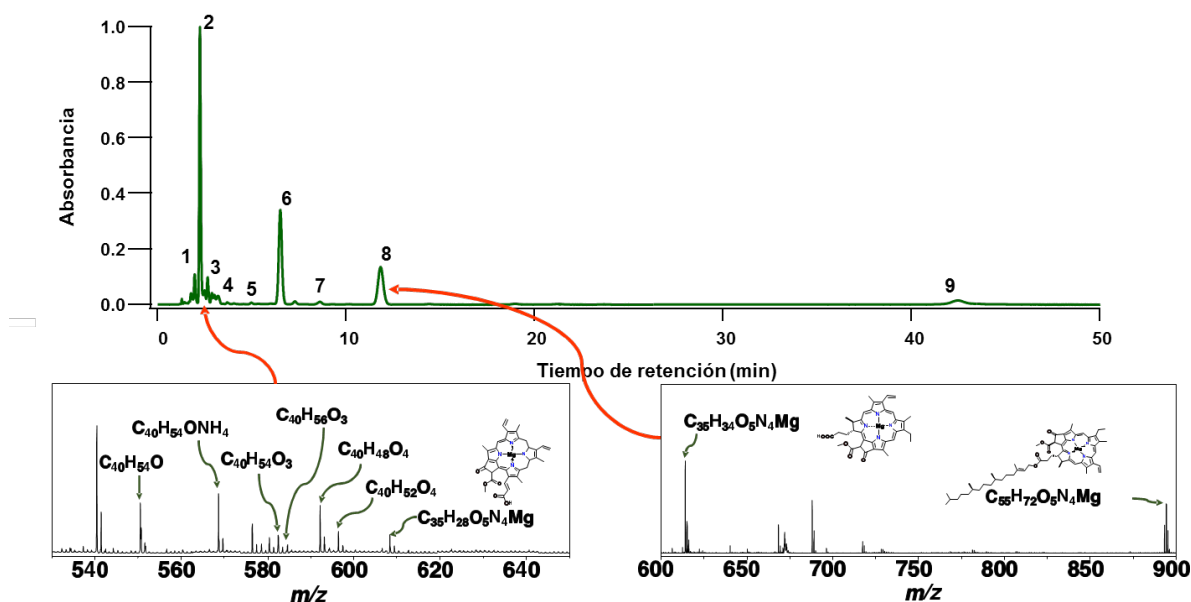


Figura 31. Espectros ET MALDI TOF MS de las fracciones de pigmentos colectados del cromatograma HPLC del extracto de pigmentos fitoplanctónicos de agua fresca.

Como se observa en la **Figura 31** en el cromatograma solo se lograron identificar tres compuestos con tiempos de retención entre dos 2 y 4 min, la neoxantina, diadinoxantina y anteraxantina. Sin embargo, cuando se colecta esta fracción y se analiza por MALDI se observan siete señales identificadas tentativamente como neoxantina ($C_{40}H_{56}O_4$), diadinoxantina ($C_{40}H_{54}O_3$) y anteraxantina ($C_{40}H_{56}O_3$), además de compuestos con fórmulas moleculares $C_{40}H_{54}O$, $C_{40}H_{48}O_4$, $C_{40}H_{52}O_4$ y $C_{35}H_{28}N_4O_5Mg$. Por otra parte, en el análisis MALDI TOF de la segunda fracción recolectada entre el minuto 13 y el minuto 15 de la corrida cromatográfica, se identificó clorofila a m/z 892,5353, que efectivamente se asignó en el análisis por HPLC. Sin embargo, en el

espectro de masas de esta fracción se observó adicionalmente la presencia de clorofilida a, m/z 614,2376. Lo cual indica que la clorofila a se descompuso probablemente durante el proceso de aislamiento y secado de la fracción o durante el análisis MALDI. Cabe aclarar que el tiempo de retención (t_R) de clorofilida a, $C_{35}H_{34}N_4O_5Mg$, es menor, comparado con clorofila a, $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$, debido precisamente a que la pérdida de la cadena hidrofóbica de fitol por parte de la clorofila a, lo que ocasiona que la clorofilida a, sea ligeramente más polar. Lo anterior, descarta la co-elución de ambos pigmentos e indica la poca estabilidad de la clorofila a durante el proceso de aislamiento y secado.

Una vez establecidas las condiciones de análisis de las muestras de pigmentos fitoplanctónicos aislados de muestras de agua dulce, se procedió a realizar el análisis en muestras de agua de mar.

4.6 Análisis por espectrometría de masas MALDI TOF de los pigmentos presentes en el extracto fitoplanctónico de agua de mar

En esta sección se reporta el análisis de una muestra de fitoplancton marino recolectada en el Caribe colombiano, como se describe en la **Sección 3,2** de la metodología. Una alícuota de la muestra fue tomada para realizar el análisis taxonómico por microscopía. Los resultados de estos análisis fueron suministrados por el profesor Andrés Franco Herrera del Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, Magdalena, Colombia (**Tablas 5 y 6**, y **Figura 12**). La muestra de agua analizada presentaba aproximadamente 140 células de fitoplancton/L; considerando que el volumen utilizado para el análisis MALDI fue de 100

mL los resultados que se obtuvieron, y se discuten a continuación, corresponden a los pigmentos contenidos en aproximadamente 15 células. El extracto de pigmentos fitoplanctónicos de la muestra de agua de mar, se obtuvo empleando las condiciones experimentales derivadas del diseño experimental (**Sección 4,2**). Se estudió la mezcla de la fracción polar y la fracción no polar del extracto de pigmentos fitoplanctónicos por espectrometría de masas MALDI TOF utilizando DCTB como matriz de transferencia electrónica. La identificación de los compuestos se realizó a partir de las masas exactas calculadas usando el *software* de datos *flexAnalysis* 3.3 y la exactitud de las masas Δppm (Véase **Ecuación 3**).

En la **Figura 32** se muestran el espectro de masas MALDI TOF para la mezcla de la fracción polar y la fracción no polar del extracto de pigmentos fitoplanctónicos de la muestra de agua de mar, utilizando DCTB como matriz ET MALDI, y una relación M:A 100:1.

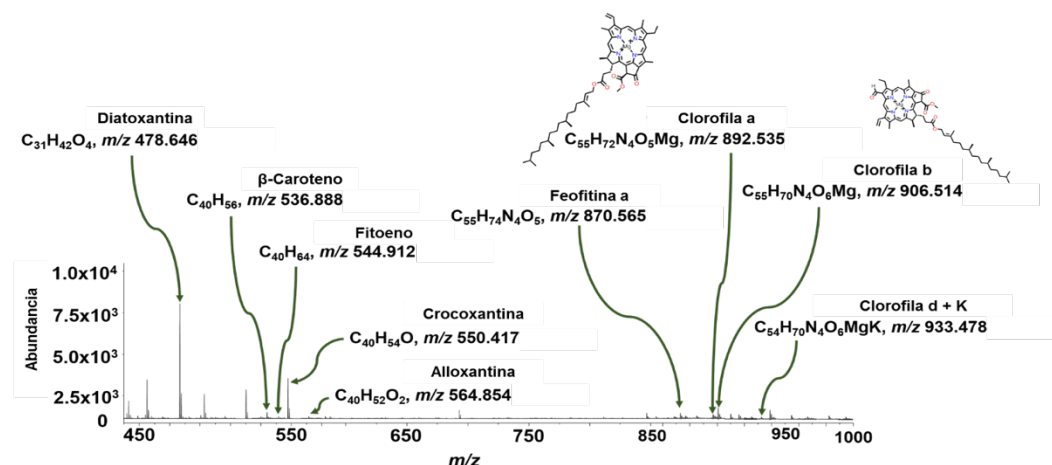


Figura 32. Espectro MALDI-TOF MS de la mezcla de la fracción polar y no polar del extracto de pigmentos fitoplanctónicos presentes en la muestra de agua de mar, utilizando DCTB como matriz ET MALDI, relación M:A 100:1.

Como se puede observar en la **Figura 32**, en el análisis MALDI de la mezcla de la fracción polar y no polar de la muestra de agua de mar, se identificaron pigmentos del tipo clorofila, como clorofila a m/z 892,5353, clorofila b m/z 906,5145, clorofila d m/z $C_{54}H_{70}O_5N_4Mg$ y sus derivados feofitina a m/z 870,565. Así mismo, también se logró identificar carotenoides de tipo xantofila como alloxantina m/z 564,8542, crococoxantina m/z 550,4172, diatoxantina m/z 478,6466, y el carotenoide β -caroteno m/z 536,8882. La **Tabla 13** muestra la información detallada de los pigmentos identificados por MS MALDI TOF utilizando la matriz ET MALDI DCTB, del análisis de la mezcla de la fracción polar y la fracción no polar.

Tabla 13.

Pigmentos fitoplanctónicos identificados en una muestra de fitoplancton de agua de mar, utilizando la matriz ET MALDI DCTB.

Compuesto	Fórmula	Masas		Δ ppm
		Calculada	Experimental	
Diatoxantina	C ₃₁ H ₄₂ O ₄	478,646	478,625	43
β -Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,888	536,879	16
Fitoeno	C ₄₀ H ₆₄	544,912	544,917	9
Crocoxantina	C ₄₀ H ₅₄ O	550,417	550,466	89
Alloxantina	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	564,854	564,856	3
Feofitina a	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	870,565	870,570	6
Clorofila a	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₅ Mg	892,535	892,534	2
Clorofila b	C ₅₅ H ₇₀ N ₄ O ₆ Mg	906,514	906,517	3
Clorofila d + K	C ₅₄ H ₇₀ N ₄ O ₅ MgK	933,478	933,471	8

La identificación de pigmentos de tipo clorofila y carotenoide, en 100 mL de una muestra de agua de mar, permite afirmar que la espectrometría de masas MALDI TOF tiene la capacidad no solo de reducir el tiempo de análisis de este tipo de muestras, sino

también de incrementar el número de especies detectadas. Los pigmentos identificados en la muestra de fitoplancton de agua de mar, se pueden relacionar con ayuda de las tablas reportadas por Jeffrey *et al.* (Jeffrey et al., 1997), con las clases de microorganismos que se muestran a continuación (Véase **Tabla 14**)

Tabla 14.

Pigmentos específicos y representativos presentes en la muestra de agua de mar, relacionados con los diferentes grupos de fitoplancton (tomado y modificado de Jeffrey et al. (Jeffrey et al., 1997)).

Pigmentos	División algal/Clase
Clorofilas	
Clorofila a	Cianobacterias, Proclorofitas, Rhodofita, Criptofita, Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenofita, Eustigmatofita, Bacillariophyta, Dinofita, Prymnesiophyceae, Chrysophyceae, Raphidophyceae
Clorofila b	Proclorofitas, Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenofita, Dinofita
Clorofila d	-
Carotenos	

Tabla 14.*Continuación*

β -Caroteno	Cianobacterias, Prasinophyceae, Bacillariophyta, Chrysophyceae, Raphidophyceae	Prochlorofitas, Euglenofita, Dinofita,	Chlorophyceae, Eustigmatofita, Prymnesiophyceae,
Xantofilas			
Alloxantina	Criptofita		
Crocoxantina	Criptofita		
Diatoxantina	Euglenofita, Bacillariophyta, Dinofita, Prymnesiophyceae, Chlorophyceae, Raphidophyceae		

Tal como se puede observar en la **Tabla 14**, los pigmentos identificados en la muestra de agua de mar se pueden relaciona con la presencia de microorganismos de los grupos Dinofita, Bacillariophyta lo cual confirma parte de la identificación taxonómica realizada.

De acuerdo con las tablas reportadas por Jeffrey *et al.* (Jeffrey et al., 1997), los compuestos alloxantina y crocoxantina, son específicos para los microorganismos que pertenecen a la clase criptofita. Los microorganismos que hacen parte de esta clase algal son generalmente unicelulares, flageladas. Las criptofitas conforman un reducido grupo algal de unas 200 especies que habitan normalmente en aguas marinas y continentales, lo cual concuerda con la procedencia de la muestra de agua analizadas.

Entre los pigmentos reportados en la literatura, presentes en las especies de la clase criptofitas, se encuentran principalmente clorofila a, clorofila b, α -caroteno, β -caroteno y las xantofilas diatoxantina y alloxantina. Estos pigmentos fueron identificados por espectrometría de masas MALDI TOF en la muestra de agua de mar. Lo anterior demuestra que MS MALDI, utilizando matrices de transferencia electrónica como DCTB, CNFVCH₃ o CNFVOCH₃, es una técnica analítica que puede proporcionar información acerca de la caracterización molecular de estos pigmentos fitoplanctónicos de una manera rápida, sin una separación cromatográfica previa.

5. Conclusiones

El análisis de la mezcla completa de pigmentos presentes en los microorganismos fitoplanctónicos, no es una tarea analítica sencilla, debido precisamente a la presencia muchos otros compuestos en los extractos. En este trabajo se reportan las condiciones adecuadas de extracción y análisis de pigmentos fitoplanctónicos obtenidos a partir de muestra de agua fresca o de agua de mar, por espectrometría de masas MALDI TOF, utilizando matrices de transferencia electrónica. Los resultados del proyecto fueron comparados con resultados de metodologías estándar, como el análisis taxonómico de las especies de microorganismos presentes en la muestra y el análisis por cromatografía líquida (HPLC).

En el análisis por espectroscopia UV-Vis del extracto de pigmentos fitoplanctónicos se observaron las señales típicas del espectro de absorción de derivados de clorofilas (400-800 nm) y carotenoides (400-500 nm). El análisis por HPLC permitió

cuantificar cada uno de los pigmentos fitoplanctónicos identificados en la muestra de agua, relacionando la concentración pigmentaria se puede obtener una estimado del estado del ecosistema. El análisis ET MALDI de los extractos mostró principalmente señales correspondientes a cationes radicales de pigmentos de tipo clorofila y carotenoide.

Utilizando las matrices de transferencia electrónica DCTB, CNFVCH₃ y CNFVOCH₃ se logró observar señales relacionadas a iones moleculares de clorofilas intactos. Por otro lado, CNPVOCH₃ y CNFVCH₃ fueron las matrices con las que se obtuvo un espectro MS limpio, importante para la asignación de señales con valores m/z bajos. Sin embargo, los carotenos β -caroteno y α -caroteno, solo fueron identificados en los ensayos MALDI utilizando la matriz comercial DCTB.

La aplicación de espectrometría de masas MALDI en este tipo de muestras, permite un análisis rápido y sencillo de estos importantes biomarcadores del estado de los ecosistemas acuáticos, obteniendo rendimientos analíticos altos, importantes para la toma de decisiones acerca de estos ecosistemas.

6. Recomendaciones

Realizar las mediciones de los pigmentos fitoplanctónicos a diferentes profundidades de la columna de agua, de esta manera se espera conocer como varia este ecosistema en función de los pigmentos *i.e.*, en función de los microorganismos presentes.

Continuar la búsqueda de una matriz MALDI que permita obtener un espectro de masas con menor número de interferencias para realizar el análisis de los pigmentos fitoplanctónicos en un solo paso.

Utilizar el *software ChemTax* para el modelamiento de los resultados obtenidos a partir del análisis por HPLC, lo cual permitiría conocer la variabilidad poblacional de los microorganismos presentes en la muestra de agua.

Realizar mediciones por espectrometría de masas de alta resolución, y así corroborar la identificación de los pigmentos reportados en este documento y dar paso a la creación de una base de datos con el análisis pigmentario de diferentes microorganismos fitoplanctónicos.

Referencias bibliográficas

- Alonso, D., Vides, M., Cedeño, M., Marrugo, M., Henao, A., Sánchez, J., ... Gómez, M. (2015). Parque Nacional Natural Corales de Profundidad: descripción de comunidades coralinas y fauna asociada. *Serie Publicaciones Generales INVEMAR*, 88, 20–21.
- Andréfouët, S., Muller-Karger, F., Robinson, J., Kranenburg, C., Torres-Pulliza, D., Spraggins, S., & Murch, B. (2006). Global assessment of modern coral reef extent and diversity for regional science and management applications: a view from space. *Proceedings of 10th International Coral Reef Symposium*, 1, 1732–1745.
- Bádenas, B., & Aurell, M. (1999). Coral reefs and carbon dioxide concentration: an example on the teaching of climatic change. *Enseñanzas de Las Ciencias de La Tierra*, 7, 21–28.
- Bessell-Browne, P., Stat, M., Thomson, D., & Clode, P. (2014). *Coscinaraea marshae* corals that have survived prolonged bleaching exhibit signs of increased heterotrophic feeding. *Coral Reefs*, 33(3), 795–804.
- Bongaerts, P., Ridgway, T., Sampayo, E., & Hoegh-Guldberg, O. (2010). Assessing the “deep reef refugia” hypothesis: Focus on Caribbean reefs. *Coral Reefs*, 29(2), 1–19.
- Brotas, V., & Plante-cuny, M. (2003). The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities. *Acta Oecologica*, 24, 109–115.
- Brown, R., & Wilkins, C. (1986). Laser Desorption Fourier Transform Mass Spectrometry of Chlorophyll a and Chlorophyll b. *Journal of American Chemical Society*, 108, 2447–2448.

- Calvano, C., Ventura, G., Trotta, M., Bianco, G., Cataldi, T., & Palmisano, F. (2017a). Electron-Transfer secondary reaction matrices for MALDI MS analysis of Bacteriochlorophyll a in Rhodobacter sphaeroides and its zinc and copper analogue pigments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(1), 125–135.
- Calvano, C., Ventura, G., Trotta, M., Bianco, G., Cataldi, T., & Palmisano, F. (2017b). Electron-Transfer Secondary Reaction Matrices for MALDI MS Analysis of Bacteriochlorophyll a in Rhodobacter sphaeroides and Its Zinc and Copper Analogue Pigments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28, 125–135.
- Capblancq, J., & Catalan, J. (1994). *Phytoplankton: which, and how much?* Barcelona, España.
- Carlos, L., Botello, S., & Frejomil, E. (2009). Impacto ambiental del turismo de buceo en arrecifes de coral. *Cuadernos de Turismo*, 24, 207–227.
- Carotenoids Database, base de datos, disponible en: <http://carotenoiddb.jp> Fecha de consulta: 24 de septiembre de 2019. (2019).
- Cartaxana, P., & Brotas, V. (2003). Effects of extraction on HPLC quantification of major pigments from benthic microalgae. *Arch. Hydrobiol.*, 3, 339–349.
- Castellanos-García, L., Agudelo, B., Rosales, H., Cely, M., Ochoa-Puentes, C., Blanco-Tirado, C., ... Combariza, M. (2017). Oligo p-Phenylenevinylene Derivatives as Electron Transfer Matrices for UV-MALDI. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28, 2548–2560.
- Castellanos-García, L., Combariza, M., & Blanco-Tirado, C. (2015). *Desarrollo de una matriz para espectrometría de masas MALDI basada en sistemas tipo fenilenvinileno y ácidos acrílicos*. Universidad Industrial de Santander.
- Castresana-Pérez, G., Villamizar, E., Varela, R., & Fuentes, Y. (2014). Descripción preliminar del fitoplancton en seis arrecifes coralinos del parque nacional archipiélago de los roques. *Act. Biol. Venez.*, 34, 293–309.
- Cedeño-Posso, C., Alonso, D., Vides, M., Chasqui, L., Aguirre, J., Ballesteros, D., ... Barrios, L. (2015). Caracterización de las comunidades coralinas del Parque Nacional Natural Corales de Profundidad en el Caribe colombiano: una aproximación a la conservación de su biodiversidad. *Informe Técnico Final INVEMAR, PNN, U. Manchester y ANH.*, 1–58.
- Cholnoky, L., Szabolcs, J., & Weedon, B. (1966). Mass Spectrometry of Carotenoid Epoxides and Furanoid Oxides. *Chemistry Communications*, (23), 852–854.
- Claustre, H., Hooker, S., Van-Heukelem, L., Berthon, J., Barlow, R., & Ras, J. (2004). An application to remote sensing and data- base activities. *Marine Chemistry*, 85, 41–61.
- Contreras, L., Henao, A., & Navas, G. (2017). *Zooplankton asociado a arrecifes mesofóticos en la montaña submarina Bajo Frijol, Parque Nacional Natural Corales de profundidad*. Universidad de Antioquia.
- Cortés, J., Murillo, M., Guzmán, H., & Acuña, J. (1984). Pérdida de zooxantelas y muerte de corales y otros organismos arrecifales en el Caribe y Pacífico de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 69, 227–231.

- Dangles, O., Goupy, P., Carail, M., Giuliani, A., Duflot, D., & Caris-veyrat, C. (2018). Carotenoids: Experimental Ionization Energies and Capacity at Inhibiting Lipid Peroxidation in a Chemical Model of Dietary Oxidative Stress. *The Journal of Physical Chemistry*, 5, 1–32.
- Delgadillo-Garzón, O., & Zapata-Ramírez, P. (2009). Evaluación rápida de peces arrecifales y su relación con la estructura del sustrato en las islas del Rosario, área marina protegida del Caribe Colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 33, 273–283.
- Donnell, D., Fey, S., & Cottingham, K. (2013). Nutrient availability influences kairomone-induced defenses in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *J. Plankton Res.*, 35, 191–200.
- Figueredo, C., & Giani, A. (2009). Phytoplankton Community in the Tropical Lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions Favoring a Persistent Bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnological*, 39, 264–272.
- Frassanito, R., Cantonati, M., Tardio, M., Mancini, I., & Guella, G. (2005). On-line identification of secondary metabolites in freshwater microalgae and cyanobacteria by combined liquid chromatography-photodiode array detection-mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography A*, 1082(1 SPEC. ISS.), 33–42.
- Fu, W., Magnúsdóttir, M., Brynjólfson, S., Palsson, B., & Paglia, G. (2012). UPLC-UV-MSE analysis for quantification and identification of major carotenoid and chlorophyll species in algae. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6434-4>
- Fundamentals of Environmental Measurements. (2014). Retrieved from <http://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/algae-phytoplankton-and-chlorophyll>
- Gieskes, W., Kraay, G., Nonthi, A., Setiapermana, D., & Sutomo, W. (1988). Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the banda sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints. *Netherlands Journal of Sea Research*, 22, 123–137.
- Giraldo-Dávila, D., Chacón-Patiño, M. L., Ramirez-Pradilla, J. S., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2018). Selective ionization by electron-transfer MALDI-MS of vanadyl porphyrins from crude oils. *Fuel*.
- Goela, P., Danchenko, S., Icely, J., Lubian, L., Cristina, S., & Newton, A. (2014). Using CHEMTAX to evaluate seasonal and interannual dynamics of the phytoplankton community off the South-west coast of Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 151, 112–123.
- Gould, R., Balmori, E., & Fryxell, G. (1986). Multivariate statistics applied to phytoplankton data from two Gulf Stream warm core rings. *Limnology and Oceanography*, 31(5), 951–968.
- Grebenok, R., Ripa, P., & Adler, J. (1991). Occurrence and levels of ecdysteroids in spinach. *Lipids*, 26(8), 666–668.
- Gross, J. (2004). *Mass Spectrometry* (Primera Ed). Germany.

- Hasegawa, K., & Noguchi, T. (2005). Density Functional Theory Calculations on the Dielectric Constant Dependence of the Oxidation Potential of Chlorophyll : Implication for the High Potential of P680 in Photosystem II †. *Biochemistry*, 680, 8865–8872.
- Henao-Castro, H., & Marrugo-Pascuales, M. (2017). *Información del PNN Corales de Profundidad (PNNCPR). Parques Nacionales Naturales de Colombia* (Primera). Cartagena.
- Heukelem, L., & Thomas, C. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography. A*, 910(1), 31–49.
- Horne, A., & Goldman, R. (1994). *Limnology. Science*. New York: McGraw-Hill.
- Jaramillo, P., Coutinho, K., Costa, B., & Canuto, S. (2012). Ionization of chlorophyll-c 2 in liquid methanol. *Chemical Physics Letters*, 546, 67–73.
- Jeffrey, S., Mantoura, R., & Wright, S. (1997). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Publishing* (Primera, Vol. 48). Paris.
- Juin, C., Bonnet, A., Nicolau, E., Bérard, J. B., Devillers, R., Thiéry, V., ... Picot, L. (2015). UPLC-MSE profiling of phytoplankton metabolites: Application to the identification of pigments and structural analysis of metabolites in *Porphyridium purpureum*. *Marine Drugs*, 13(4), 2541–2558.
- Kahng, S., Garcia-Sais, J., Spalding, H., Brokovich, E., Wagner, D., Weil, E., ... Toonen, R. (2010). Community ecology of mesophotic coral reef ecosystems. *Coral Reefs*, 29(2), 255–275.
- Kaneta, P., Levandowsky, M., & Esaias, W. (1985). Multivariate analysis of the phytoplankton community in the New York Bight. *Marine Ecology Progress Series*, 23(3), 9.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., & Hillenkamp, F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78, 53–68.
- Kaufmann, R., Wingerath, T., Kirsch, D., Stahl, W., & Sies, H. (1996). Analysis of Carotenoids and Carotenol Fatty Acid Esters by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI – Post-Source-Decay Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 128, 117–128.
- Knochenmuss, R., & Zenobi, R. (2003). MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chemical Reviews*, 103, 441–452.
- Knochenmuss, Richard. (2014). MALDI mechanisms: wavelength and matrix dependence of the coupled photophysical and chemical dynamics model. *The Analyst*, 139, 147–156.
- Krajewska, M., Szymczak-Żyła, M., & Kowalewska, G. (2017). Carotenoid determination in recent marine sediments - practical problems during sample preparation and HPLC analysis. *Current Chemistry Letters*, 6, 91–104.
- Lamb, J., Willis, B., Fiorenza, E., Couch, C., Howard, R., Rader, D., ... Harvell, C. (2018).

- Plastic waste associated with disease on coral reefs. *Science*, 359(6374), 26–29.
- Larkum, A. (2006). *The Evolution of Chlorophylls and Photosynthesis. Chlorophylls and Bacteriochlorophylls* (Segunda). University of Sydney, Australia: Springer.
- LIRA, G., MOURA, A., VILAR, M., CORDEIRO-ARAÚJO, M., & BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. (2014). Vertical and temporal variation in phytoplankton assemblages correlated with environmental conditions in the Mundaú reservoir, semi-arid northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 74, 93–102.
- Macías-sánchez, M., Serrano, C., Rodríguez, M., & Martínez, E. (2009). Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO₂ and ethanol as cosolvent. *Chemical Engineering Journal*, 150, 104–113.
- Maldonado, J., & Cuervo-Sánchez, R. (2016). Valoración económica del Parque Nacional Natural Corales De Profundidad. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 45, 99–121.
- Mccarley, T., Mccarley, R. L., & Limbach, P. A. (1998). Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 70, 4376–4379.
- Milenković, S., Zvezdanović, J., & Anđelković, T. (2012). THE IDENTIFICATION OF CHLOROPHYLL AND ITS DERIVATIVES IN THE PIGMENT MIXTURES: HPLC-CHROMATOGRAPHY, VISIBLE AND MASS SPECTROSCOPY STUDIES. *Advanced Technologies*, 1(1), 16–24.
- Moreno-Arbeláez, D., & Ramírez-Restrepo, J. (2010). VARIACIÓN TEMPORAL DE LA CONDICIÓN TRÓFICA DEL LAGO DEL PARQUE NORTE, MEDELLÍN (ANTIOQUIA), COLOMBIA. *Actual Biol*, 32(92), 75–87.
- Müller, E., Berger, R., Blass, E., & Sluyts, D. (2005). Liquid – Liquid Extraction. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1, 1–54.
- Nakato, Y., Chiyoda, T., & Tsubomura, H. (1974). Experimental Determination of Ionization Potentials of Organic Amines, B-Carotene and Chlorophyll a. *Bolletín of the Chemical Society of Japan*, 47, 3001–3005.
- Ohnuki, S., Nogami, S., Ota, S., Watanabe, K., Kawano, S., & Ohya, Y. (2013). Image-Based Monitoring System for Green Algal Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae) Cells during Culture. *Plant Cell Physiol.*, 54(11), 1917–1929.
- Parque Nacional Natural Corales de Profundidad. (2018). Retrieved from <http://www.parquesnacionales.gov.co/portal/es/>
- Persson, S., Sönksen, C., Frigaard, N., Cox, R., Roepstorff, P., & Miller, M. (2000). Pigments and proteins in green bacterial chlorosomes studied by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry*, 267(2), 450–456.
- Quiroga, V., Góngora, E., González, F., Magala-Velásquez, T., Galeano, A., Sánchez, D., & Sánchez, J. (2015). Arrecifes coralinos mesofóticos: descubriendo aspectos clave de la vida coralina en las zonas del crepúsculo. *Hipotesis, Apuntes Científicos Uniandinos*, 18, 42–53.

- Ramírez-pradilla, J., Castellanos-garcía, L., Blanco-tirado, C., & Combariza, M. (2018). Electron transfer ionization of model compounds and mixtures using a-cyanophenylenevinylenes as UV MALDI matrices. *Sometido*, 1, 1–35.
- Roy, S., Llewellyn, C., Skarstad, E., & Johnsen, G. (2011). *Pigments, Oceanography Pigments, Phytoplankton Press, Unesco Committee, Scientific* (First Edit). N.Y.
- Sánchez, J., Dueñas, L., Gonzales, F., Gómez, M., & Andrade, J. (2015). Primeras exploraciones en los arrecifes mesofóticos del PNN Corales de Profundidad mediante recicladoreos (CCR-Trimix), Caribe colombiano. *Informe Preeliminar, Universidad de Los Andes. Departamento de Ciencias Biológicas. BIOMMAR*, 1–24.
- Schagerl, M., Pichler, C., & Donabaum, K. (2000). Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae . 2 . Dinophyta , Euglenophyta , Chlorophyceae and Charales. *Ann. Limnol.*, 39, 49–62.
- Sekerci, Y., & Petrovskii, S. (2015). Mathematical Modelling of Plankton–Oxygen Dynamics Under the Climate Change. *Bulletin of Mathematical Biology*, 1, 1–29.
- Serive, B., Nicolau, E., Bérard, J., Kaas, R., Pasquet, V., Picot, L., & Cadoret, J. (2017). Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *PLoS ONE*, 12, 1–35.
- Sleno, L., & Volmer, D. (2005). Toxin screening in phytoplankton: Detection and quantitation using MALDI triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(5), 1509–1517.
- Sumanta, N., Haque, C., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Journal of Chemical Sciences*, 4, 63–69.
- Suzuki, K., Kamimura, A., & Hooker, S. (2015). Rapid and highly sensitive analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with the first derivative spectrum chromatogram (FDSC) technique. *Marine Chemistry*, 176, 96–109.
- Suzuki, T., Midonoya, H., & Shioi, Y. (2009). Analysis of chlorophylls and their derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 390(1), 57–62.
- Tabet, J., Jablonski, M., & Cotter, R. (1985). TIME-RESOLVED LASER DESORPTION. DECOMPOSITION OF CHLOROPHYLL-a III. THE METASTABLE AND SOME DERIVATIVES. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 65, 105–117.
- Traverso, M., Schau, E., Lehmann, A., & Finkbeiner, M. (2011). Life Cycle in Sustainability Assessment-A Case Study of Remanufactured Alternators. *Sustainability*, 3, 2268–2288.
- Van-Heukelem, L., Lewitus, A., Kana, T., & Craft, N. (1992). High-Performance Liquid Chromatography of Phyto- plankton Pigments Using a Polymeric Reversed-Phase C18 Column. *Journal of Phycology*, 28, 867–872.

- Van-Heukelem, L., Lewitus, A., Kana, T., & Craft, N. (1995). Improved separations of phytoplankton pigments using temperature-controlled high performance liquid chromatography. *Oceanographic Literature Review*, 5, 369–376.
- Vasil'ev, Y., Khvostenko, O., Streletskii, A., Boltalina, O., Kotsiris, S., & Drewello, T. (2006). Electron transfer reactivity in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI): Ionization energy, electron affinity and performance of the DCTB matrix within the thermochemical framework. *Journal of Physical Chemistry A*, 110, 5967–5972.
- Vasilkov, A., Krotkov, N., Herman, J., McClain, C., Arrigo, K., & Robinson, W. (2001). Global mapping of underwater UV irradiances and DNA-weighted exposures using Total Ozone Mapping Spectrometer and Sea-viewing Wide Field-of-view Sensor data products. *JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH*, 106, 205–219.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303–313.
- Webb, C., & Ackerly, D. (2002). Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics Applications Note*, 24, 2098–2100.
- Wright, S. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 77(2–3), 183–196.
- Wright, Simon, & Jeffrey, S. (2006). Pigment Markers for Phytoplankton Production. *Hdb. Env. Chem.*, 2, 71–104.
- Zapata, M, Rodriguez, F., & Garrido, J. (2000). Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series*, 195, 29–45.
- Zapata, Manuel, & Garrido, J. (2000). LA DIVERSIDAD PIGMENTARIA DEL FITOPLANCTON MARINO: IMPLICACIONES ECOLÓGICAS. *Biotecnología y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentados*, 2, 75–94.

Apéndices

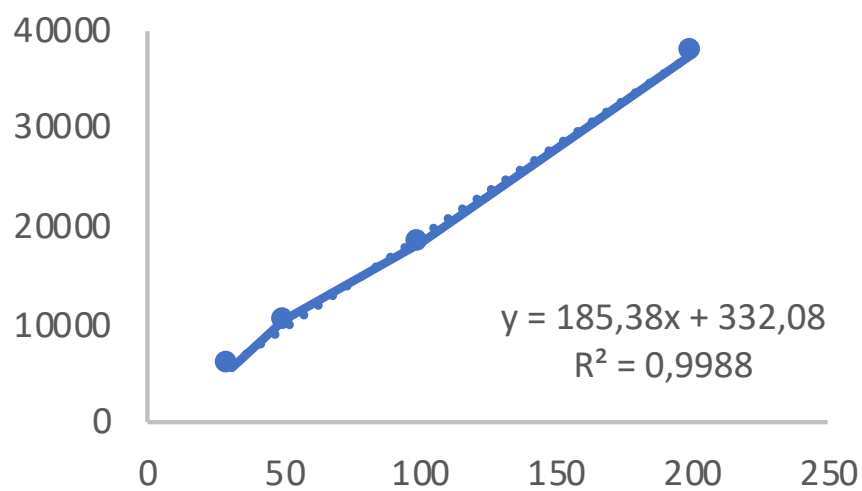
Apéndice 1. Cuantificación HPLC

Cuantificación de los pigmentos fitoplanctónicos identificados en la muestra de agua fresca

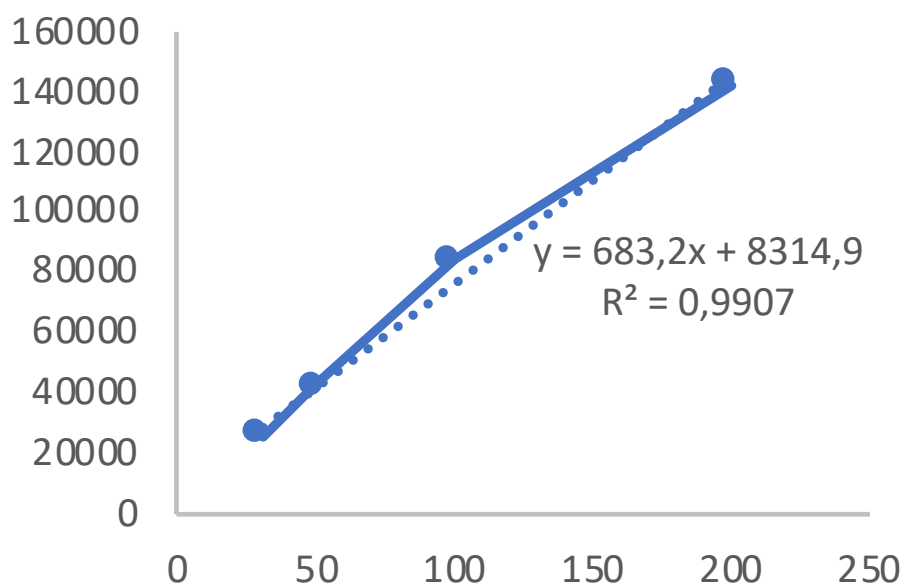
Curvas de calibración para algunos de los pigmentos identificados en la muestra de agua, realizando la cuantificación por el método del estándar externo.

Compuesto	Concentración $\mu\text{g/L}$	Área, cuentas
Clorofila a	30	5683
	50	10201
	100	18327
	200	37560
Clorofila b	30	25128
	50	41787
	100	83928
	200	142033
β -Caroteno	30	32601
	50	60326
	100	104526
	200	201753
Diadinoxantina	30	88258
	50	140254
	100	257362
	200	504349

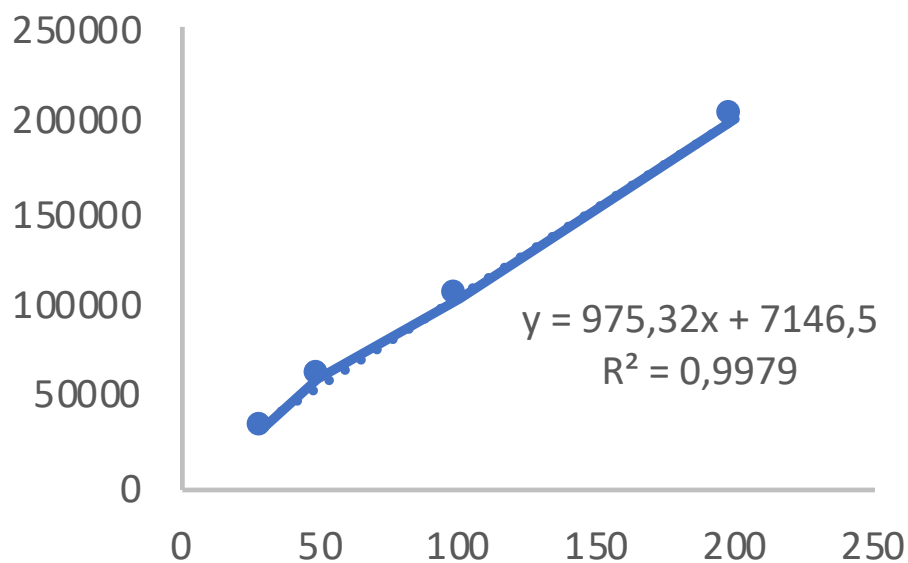
Curva de calibración para la clorofila a.



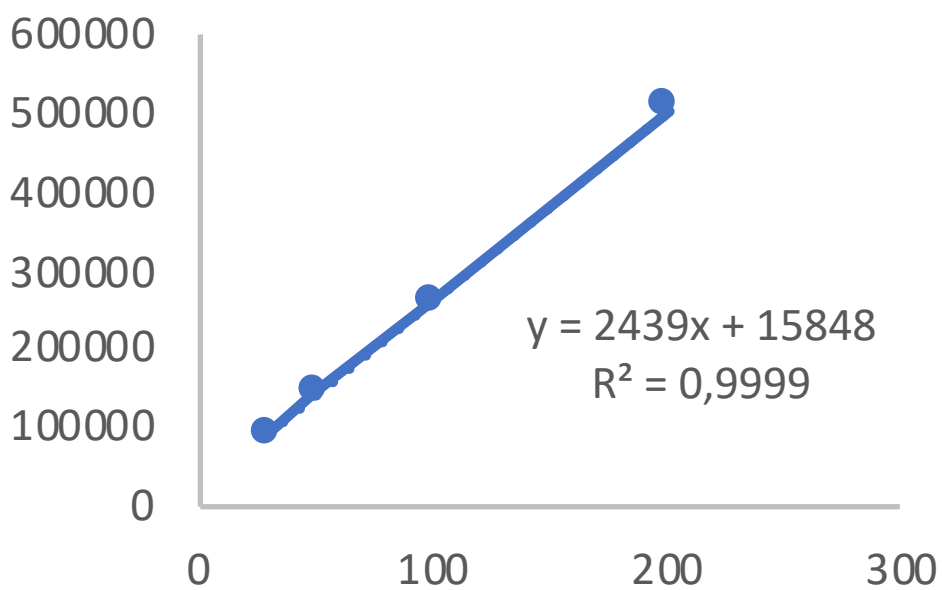
Curva de calibración para la clorofila b.



Curva de calibración para el β -caroteno.

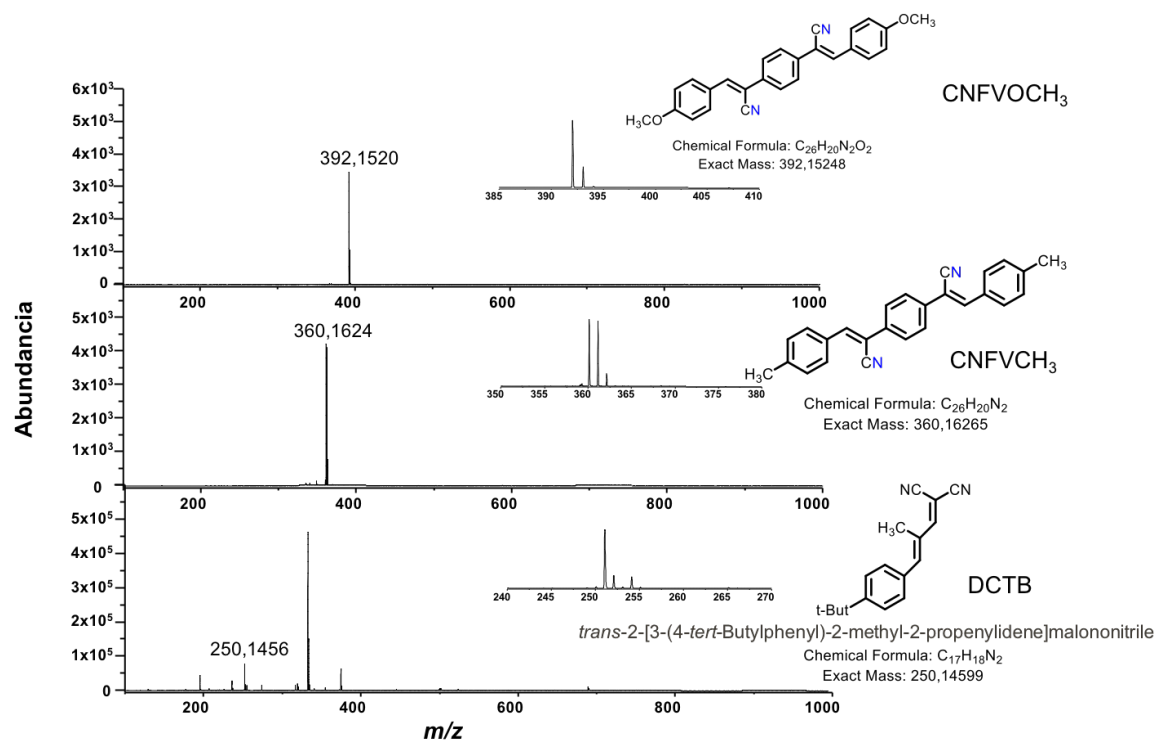


Curva de calibración para la diadinoxantina.



Apéndice 2. Espectros de masas LDI de las matrices utilizadas durante los ensayos por espectrometría de masas MALDI TOF

Espectros experimentales LDI de las matrices utilizadas en los ensayos MALDI.



Apéndice 2. Continuación

A continuación, se muestran los espectros de masas MALDI TOF del extracto con las matrices evaluadas en esta investigación, a diferentes proporciones Matriz:Analito.

Espectros MALDI de los extractos de fitoplancton del lago de la UIS con las matrices MALDI CNFVCH₃, CNFVOCH₃ y DCTB, a diferentes proporciones A:M.

