

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



**DETERMINACIÓN DE CLOROFILA-a EN AGUA
SUPERFICIAL UTILIZANDO EXTRACTO DE ESPINACA POR
ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE,
DESARROLLADO EN EL INSTITUTO BOLIVIANO DE
METROLOGÍA - IBMETRO**

Trabajo Dirigido para obtener el Título de Licenciado en Química Industrial

POR: HEBERT ZEGARRUNDO ZARATE

TUTORA: LIC. MATILDE T. CALLISAYA TICONA

COTUTOR: M.Sc. MARCO L. QUINO HUASCO

LA PAZ - BOLIVIA

2023

DEDICATORIA

*A Dios por guiarme en todo momento de mi vida y llegar a este punto tan importante
trascendental.*

*A mi mamá Tomasa Zarate Quispe quien me dio fuerzas para concluir y conseguir una
meta en esta vida.*

*A mi papá Pedro Zegarrundo Condori quien me dio motivación constante y aliento para
continuar y cumplir un sueño en esta vida.*

*A mi hermano Alvaro Zegarrundo Zarate por aconsejarme y guiarme en este proceso de
cumplir mi objetivo.*

*A todas las personas quienes me motivaron cuando más lo necesitaba les quedo muy
agradecido desde el más profundo de mi ser.*

HEBERT ZEGARRUNDO ZARATE

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios por darme iluminación para llegar con éxito y cumplir con mi meta.

A mi Facultad de Tecnología de la Universidad Mayor de San Andrés y a mi querida poderosa carrera de Química Industrial.

A mis queridos docentes quienes me enseñaron con sabiduría en las diferentes asignaturas impartidas en clases sus conocimientos para prepararme y afrontar los retos en el ámbito profesional.

A mis padres, hermano por estar siempre en los momentos más difíciles de mi vida y concluir con éxito mi objetivo trazado.

A mi tutora Lic. Matilde T. Callisaya Ticona quien me dio su enseñanza, apoyo, consejos y asesoramiento para la culminación del trabajo de grado.

A mi cotutor M.Sc. Marco L. Quino Huasco quien me apoyo constantemente durante el proceso y desarrollo del trabajo de grado.

A mi Lic. Mabel Delgado por sus sabios consejos y motivación para emprender nuevos retos.

A la institución de metrología IBMETRO por darme la oportunidad y confianza para el desarrollo de uno de sus proyectos de investigación.

A mis tribunales quienes me dieron sabios consejos, orientaciones para el desarrollo y culminación de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

1. GENERALIDADES.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes	2
1.3. Planteamiento del problema.....	5
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo General	5
1.4.2. Objetivos Específicos.....	5
1.5. Justificación	6
1.5.1. Justificación teórica.....	6
1.5.2. Justificación social.....	6
1.5.3. Justificación ambiental	6
1.6. Delimitación	7
1.6.1. Geográfica o Espacial.....	7
1.6.2. Macrolocalización.....	7
1.6.3. Microlocalización.....	8
1.7. Alcance	8
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Metrología	10
2.1.1. Instituto Boliviano de Metrología-IBMETRO	10
2.1.1.1. Misión	10
2.1.1.2. Visión.....	11

2.1.2. Material de referencia certificado - IBMETRO.....	12
2.2. Agua superficial	12
2.2.1. Laguna Charani (segundo lago) municipio de Achocalla.....	14
2.2.1.1. Macrolocalización.....	14
2.2.1.2. Microlocalización	15
2.2.2. Reseña histórica de la laguna Charani.....	15
2.2.3. Características generales laguna Charani	17
2.3. Clorofila	20
2.4. Espinaca.....	21
2.5. Clorofila-a.....	23
2.5.1. Fitoplancton	25
2.5.1.1. Clasificación del nivel de eutrofia según OCDE.....	26
2.5.1.2. Algas	28
2.6. Eutrofización	29
2.7. Espectrofotometría Ultravioleta Visible	33
2.7.1. Radiación electromagnética	33
2.7.2. Leyes de la espectrofotometría.....	35
2.7.2.1. Transmitancia.....	35
2.7.2.2. Absorbancia	36
2.7.2.3. Ley de Lambert-Beer	36
2.8. Principio del método Espectrofotométrico para Clorofila-a	37
2.9. Procedimiento del método ISO 10260:1992	37

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	40
3.1. Descripción del trabajo.....	40
3.1.1. Equipos	40
3.1.2. Materiales y reactivos	40
3.1.3. Determinación inicial de Clorofila-a en la espinaca.....	41
3.1.4. Preparación de diluciones para la concentración de Clorofila-a.....	43
3.1.4.1. Cálculos para la concentración real estándar de 100 µg/L.....	43
3.1.4.2. Cálculos para la concentración real estándar de 75 µg/L.....	44
3.1.4.3. Cálculos para la concentración real estándar de 50 µg/L.....	44
3.1.4.4. Cálculos para la concentración real estándar de 25 µg/L.....	44
3.1.4.5. Cálculos para la concentración real estándar de 1 µg/L.....	45
3.1.5. Flujograma determinación de Clorofila-a en agua superficial	46
4. RESULTADOS	48
4.1. Norma ISO 10260:1992.....	48
4.2. Determinación de Clorofila-a en hoja de espinaca	48
4.3. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 100 µg/L	50
4.3.1. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 75 µg/L	50
4.3.2. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 50 µg/L	51
4.3.3. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 25 µg/L	52
4.3.4. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 1 µg/L	52
4.4. Clorofila-a en agua superficial laguna Charani municipio de Achocalla.....	53
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61

5.2. Conclusiones	61
5.3. Recomendaciones	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macroubicación geográfica.....	7
Figura 2. Microubicación geográfica.....	8
Figura 3. Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO.....	11
Figura 4. Sala de Calibración y Balanzas.	11
Figura 5. Material de Referencia Certificado - IBMETRO.....	12
Figura 6. Agua superficial laguna Charani.	13
Figura 7. Ubicación segundo lago Achocalla.	14
Figura 8. Presa laguna Charani.....	16
Figura 9. Desemboque laguna Charani.....	17
Figura 10. Características generales laguna Charani municipio de Achocalla.....	17
Figura 11. Concentración de Clorofila de diferentes hierbas comestibles.....	22
Figura 12. Estructura de la Clorofila.	22
Figura 13. Curva de absorción de luz de Clorofila.	23
Figura 14. Estructura de Clorofila y feofitina.....	24
Figura 15. Estructuras de Clorofila-a, Clorofilida-a y Feoforbida-a.	25
Figura 16. Valores límites de la OCDE de clasificación trófica.....	27
Figura 17. Niveles tróficos.....	27
Figura 18. Distribución de probabilidad de nivel trófico basado en Clorofila-a.	28
Figura 19. Esquema de Eutrofización.	30
Figura 20. Cuenca con Eutrofización.....	30
Figura 21. Laguna Charani.....	31

Figura 22. Espectro electromagnético.	35
Figura 23. Flujograma del proceso.....	41
Figura 24. Filtración al vacío.	43
Figura 25. Flujograma del proceso.....	46
Figura 26. Curva de calibración de Clorofila-a sin ajuste.	54
Figura 27. Curva de calibración de Clorofila-a con ajuste.	55
Figura 28. Curva de calibración de Clorofila-a sin ajuste.	57
Figura 29. Curva de calibración de Clorofila-a con ajuste.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de algas.	29
Tabla 2	Datos obtenidos para la concentración de Clorofila-a.	48
Tabla 3	Datos obtenidos para 100 µg/L.	50
Tabla 4	Datos obtenidos para 75 µg/L.	50
Tabla 5	Datos obtenidos para 50 µg/L.	51
Tabla 6	Datos obtenidos para 25 µg/L.	52
Tabla 7	Datos obtenidos para 1 µg/L.	52
Tabla 8	Datos obtenidos laguna Charani.	53
Tabla 9	Resta de absorbancias a 665nm antes y después de acidificar.	54
Tabla 10	Resta de absorbancias a 665nm antes y después de acidificar.	55
Tabla 11	Resta de absorbancias a 665nm y 750nm antes y después de acidificar. ..	56
Tabla 12	Resta de absorbancias a 665nm y 750nm antes y después de acidificar. ..	57

RESUMEN

La importancia de las Clorofilas como medida para conocer la producción en biomasa de los ecosistemas acuáticos por la proliferación de microalgas y algas se ha convertido en un tema de vital importancia para la preservación de la vida acuática, salud animal y humana. Ya que estos sistemas acuáticos están sujetos a procesos de eutrofización según al estado en el que se encuentran. La Clorofila-a se encuentra en todos los grupos de algas, siendo el indicador más importante para estimar la biomasa fitoplanctónica y el estado trófico de un cuerpo de agua. En este sentido se realizó la determinación de Clorofila-a con extracto de la hoja de espinaca. Se utilizó el Espectrofotómetro Ultravioleta Visible para determinar Clorofila-a, a una longitud de onda de 665 nm y 750 nm bajo la norma ISO 10260:1992. Se logró determinar Clorofila-a en un rango de 1 $\mu\text{g/L}$ a 100 $\mu\text{g/L}$. Por otro lado, se realizó la determinación de Clorofila-a de la laguna Charani comunidad Marquirivi zona Anari del municipio de Achocalla dando como resultado una concentración de 7,5 $\mu\text{g/L}$ lo que indica que se encuentra en un estado mesotrófico, es decir, el nivel de materia orgánica es intermedia e inferior a la transparencia de agua de un sistema oligotrófico de baja productividad en biomasa.

SUMMARY

The importance of Chlorophylls as a measure to know the biomass production of aquatic ecosystems due to the proliferation of microalgae and algae has become an issue of vital importance for the preservation of aquatic life, animal and human health. Since these aquatic systems are subject to eutrophication processes depending on the state in which they are found. Chlorophyll-a is found in all groups of algae, being the most important indicator to estimate the phytoplankton biomass and the trophic state of a body of water. In this sense, the determination of Chlorophyll-a was carried out with spinach leaf extract. The Visible Ultraviolet Spectrophotometer was used to determine Chlorophyll-a, at a wavelength of 665 nm and 750 nm under the ISO 10260:1992 standard. It was possible to determine Chlorophyll-a in a range of 1 µg/L to 100 µg/L. On the other hand, the determination of Chlorophyll-a of the Charani lagoon, Marquirivi community, Anari area of the municipality of Achocalla, was carried out, resulting in a concentration of 7,5 µg/L, which indicates that it is in a mesotrophic state, that is, the level of organic matter is intermediate and lower than the transparency of water in an oligotrophic system with low biomass productivity.

CAPÍTULO I

1. GENERALIDADES

1.1. Introducción

Las clorofilas son moléculas responsables de la vida existente en las plantas, se encuentran en orgánulos específicos como los cloroplastos, también se encuentran en las cianobacterias y en todos aquellos organismos que contienen plastos en sus células, lo que incluye a las plantas y a los diversos grupos de protistas que son llamados algas. La Clorofila es la encargada de absorber la luz necesaria para que la fotosíntesis pueda ser llevada a cabo. Las plantas absorben agua del suelo, dióxido de carbono de la atmósfera, forman sustancias orgánicas energéticas como la glucosa y es el pigmento de color verde presente en plantas y algas.

Su presencia es la más universal entre los seres productores primarios; aunque hay otros muchos fotopigmentos, tanto de tipo Clorofila como de otras naturalezas químicas: carotenoides, xantofilas, ficocianinas, ficoeritrinas, etc. De manera práctica es una medida esencial para conocer la producción en biomasa de los ecosistemas acuáticos debido a la proliferación de microalgas; y se expresa generalmente en microgramos/litro.

La Clorofila es el pigmento fotosintético presente en todas las plantas. Los tres tipos de clorofilas que comúnmente se encuentran en las algas planctónicas son las clorofilas a, b y c. La Clorofila-a (Chl-a) se encuentra en todos los grupos de algas y es uno de los indicadores más usados para estimar la biomasa fitoplanctónica y el estado trófico de un cuerpo de agua (Wetzel, 1983, Axler y Owen 1994).

La Clorofila es la más común ya que se encuentran en todos los organismos fotosintéticos, plantas terrestres y acuáticas. Los tipos más comunes de clorofilas son la A y B. La de tipo A supone dentro de las plantas verdes alrededor del 75% de todas las clorofilas ($C_{55}H_{72}MgN_4O_5$) es la estructura más abundante e importante de la familia; capturan la energía luminosa dentro del espectro rojo y violeta. Por su parte, la clorofila de tipo B es un pigmento de menor cantidad que no absorbe la luz dentro de la longitud de onda más común (Ramírez-Mérida et al., 2014).

A finales de la década de 1980 se ha detectado la necesidad de ejecutar y aprender una técnica espectrofotométrica para la correcta medición de Clorofila-a y para completar estudios de eutrofización en lagos y embalses. En 1989 se tomaron muestras de diversos embalses con el fin de tener un amplio rango de calidades de agua y estados tróficos; desde hace casi treinta años, se tiene la experiencia de estimar la Clorofila-a, como parámetro clave para establecer un indicador del grado de alteración o mejora de los cuerpos de agua (Inclán et al., 2014).

La Clorofila-a es un pigmento que absorbe todos los colores menos el verde a causa de los enlaces dobles conjugados, lo que nos ayuda a visualizar su color como tal. Se encuentra en una longitud de onda de 665nm por Espectrofotometría región Visible exactamente para su determinación.

1.2. Antecedentes

Yupanqui (2012) en su tesis demuestra por Fluorometría de Welschmeyer que la concentración está en función al lugar de estudio. El mismo consiste en la transformación de

Clorofila-a en feofitina después de una acidificación para luego ser leídas por el Fluorómetro. Análisis realizado en el Laboratorio de Calidad Ambiental (L.C.A.).

El fitoplancton son los seres vivos de origen vegetal que viven flotando en la columna de agua, presentan gran biodiversidad y dan inicio a la eutrofización. La determinación de Clorofila “a” en muestras de agua nos permite una estimación suficiente de la concentración de algas fitoplanctónica (algas microscópicas) e indirectamente la actividad biológica con la que se desarrollan los procesos de eutrofización debido a que es el principal componente de la productividad primaria, que está directamente relacionado pigmento fotosintético presente en las algas. La Clorofila-a también es un indicador del grado de contaminación de los ecosistemas acuáticos y un importante índice del estado fisiológico del fitoplancton (Yupanqui, 2012, p.1).

Rojas (2017) para la determinación de Clorofila-a utilizó la técnica de fluorimetría para evaluar el estado trófico y comprender la dinámica de la biomasa clorofílica durante un ciclo de muestreo anual en el lago Atexcac, Puebla (febrero 2013-enero 2014).

Callisaya (2018) determina la concentración de Clorofila-a, que a través de la sonda FLUOROPROBE BBE, que consiste en sumergir la sonda para medir la fluorescencia como un proxy (sustituto) de la biomasa fitoplanctónica, la fluorescencia como una concentración en equivalente a $\mu\text{g/L}$.

Por el análisis espacio-temporal del comportamiento de Clorofila-a mediante imágenes satelitales de un determinado lugar (Embalse Aguada Blanca, Perú). Bellido (2019) en su tesis “determina la concentración de Clorofila-a para los meses enero, febrero, marzo, abril, julio,

agosto, septiembre, octubre y noviembre para el año 2017 al aplicar los algoritmos correspondientes por monitoreo” (p.47).

Escobar E., Alcocer J., Aguirre R., Carmona J., & Osquera L. (2003) estudia la relación de la concentración de Clorofila-a en unidades de $\mu\text{g/L}$ (mg/m^3) obtenida de las imágenes de satélite SeaWiFS muestreo en determinados recorridos prefijados durante los meses de mayo y junio del 2002.

Los valores máximos de Clorofila-a se localizan comúnmente en la base de la zona eufótica con concentraciones entre $0,01\mu\text{g/L}$ - $1,82\mu\text{g/L}$, y $0,01\mu\text{g/L}$ - $2,85\mu\text{g/L}$, determinadas respectivamente por HPLC y fluorometría (Bianchi et. al., 1995).

Hernández (2016) en su tesis indica el método utilizado para medir la Clorofila-a fue el fluorométrico (límite de detección (DLM) de $0,025 \mu\text{g/L}$) realizando un estudio comparativo de 9 lagos en verano de 2014 e invierno de 2015 con el fin de llevar a cabo la evaluación de su estado trófico.

El uso del espectrofotómetro portable es la técnica más practica comparado con aquellas que requieren colectas de la hoja, solventes y traslado a laboratorio, cuando el tiempo es clave en la variación del estado natural del contenido de pigmentos (Guzmán, et. al., 2015). El espectrofotómetro detecta el haz espectral incidente de la muestra a una longitud de onda seleccionada (Weidner y Jack, 1980). La energía radiada se caracteriza por el tamaño y frecuencia que puede ser reflejada, absorbida o transmitida.

Las herramientas más comunes para determinar la tasa de fotosíntesis, el estado de los procesos fotoquímicos de la fotosíntesis y el contenido de pigmentos, son el IRGA (analizador de gases en infrarrojo), el fluorómetro y el espectrofotoradiómetro (medidor de clorofila *in situ*) (Solarte et. al., 2010).

1.3. Planteamiento del problema

La determinación de Clorofila-a se utiliza para estimar la biomasa planctónica, por los mismos se encuentran en gran cantidad en algas; motivo por el cual se necesita determinar Clorofila-a en el control y monitoreo de agua superficial. El Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO como referente en mediciones, requiere tener un método de medición para dicho parámetro.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Determinar Clorofila-a en agua superficial utilizando como solución de trabajo extracto de espinaca por Espectrofotometría Ultravioleta Visible.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Realizar el extracto de Clorofila-a de espinaca.
- Estandarizar el método para determinar Clorofila-a en agua superficial considerando las variables necesarias según la ISO 10260:1992.
- Aplicar el método en muestras de agua superficial.

1.5. Justificación

El siguiente trabajo tiene como finalidad obtener un procedimiento y posterior aplicación de la medición para determinar Clorofila-a en agua superficial por análisis Espectrofotométrico región Visible para la medición de Clorofila-a, de esta manera se podrá controlar el posible desarrollo de una eutrofización, mejorando el nivel de vida de la población y los ecosistemas acuáticos.

1.5.1. Justificación teórica

El siguiente trabajo tiene como finalidad obtener un procedimiento para la determinación de Clorofila-a para aguas superficiales por análisis instrumental utilizando Espectrofotómetro Ultravioleta Visible.

1.5.2. Justificación social

Se debe realizar un monitoreo de los medios acuáticos para que la población no se vea afectada en su desarrollo agrícola, pesquero y ganadero. Por medio de la determinación de Clorofila-a se podrá evitar el desarrollo de eutrofización.

1.5.3. Justificación ambiental

Es de prioridad llevar a cabo un control estricto en las diferentes aguas superficiales, dando una mejor calidad de vida al ser humano y animal. Debido a que en los últimos tiempos las contaminaciones en aguas superficiales han incrementado de manera exponencial, manifestando el riesgo de la vida acuática, animal y humana.

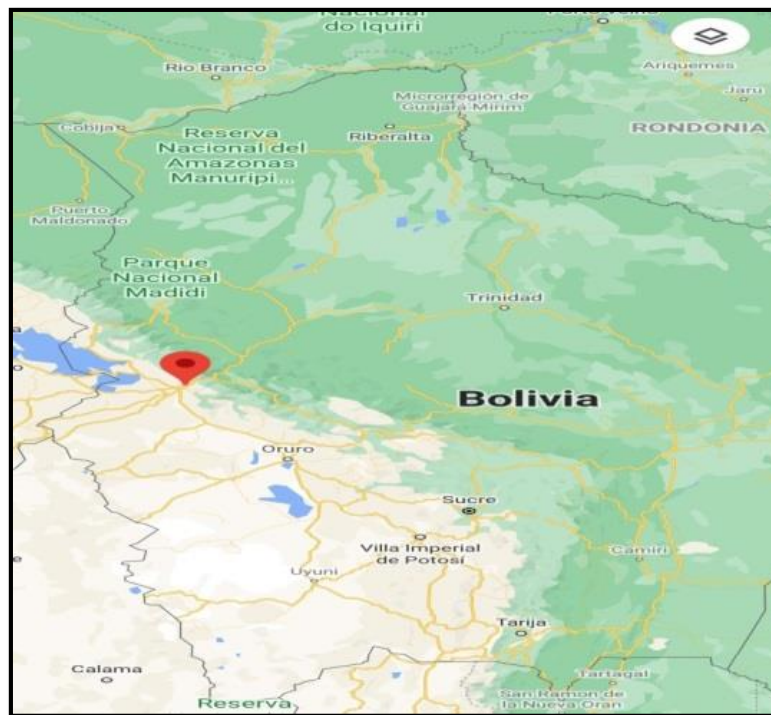
1.6. Delimitación

1.6.1. Geográfica o Espacial

La institución donde se desarrolló el trabajo es en el Instituto Boliviano de Metrología IBMETRO que se encuentra en la ciudad de La Paz, Av. Camacho, N° 1488.

1.6.2. Macrolocalización

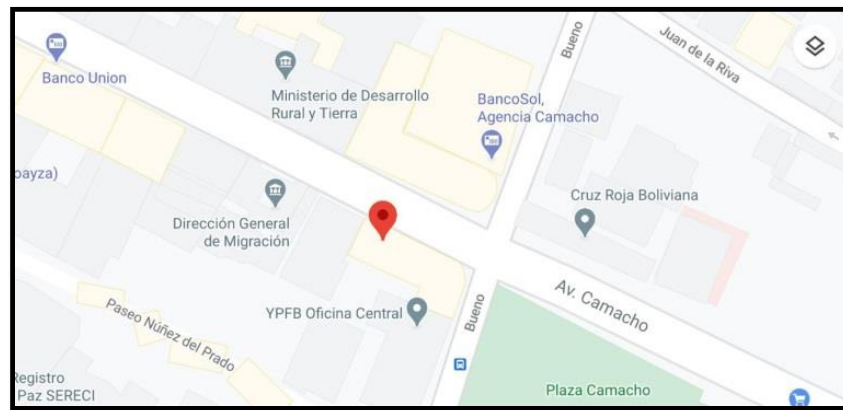
Figura 1. Macroubicación geográfica.



Fuente: Google Maps

1.6.3. Microlocalización

Figura 2. Microubicación geográfica.



Fuente: Google Maps

1.7. Alcance

En el laboratorio de Metrología Química de la Dirección de Metrología Industrial y Científica-DMIC del Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO, se realizó la determinación de Clorofila-a en extracto de espinaca y se puso en prueba la medida en agua superficial.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Metrología

La metrología es la ciencia de la medición y sus aplicaciones. Se utiliza un léxico acordado internacionalmente por medio del Vocabulario Internacional de Metrología (VIM). Es el conjunto de acciones que persiguen el desarrollo de patrones primarios de medición para las unidades de base y derivadas del Sistema Internacional de Unidades, S.I., instrumentos para la ejecución de estas mediciones.

2.1.1. Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO

Es la referencia nacional para todas las mediciones, con un sistema Integrado de Gestión de Calidad en base a las normas ISO 9001, ISO/IEC 17025, ISO 17034 e ISO/IEC 17020, así como convenios y reconocimientos internacionales, efectuando trabajos conjuntos y coordinados con pares a nivel internacional. Custodia y mantiene los patrones nacionales de medición. Fue creado en 1997 (D.S. 24498), para regir el Servicio Metrológico Nacional (SERMETRO).

2.1.1.1. Misión

El Instituto Boliviano de Metrología – IBMETRO, es referente en materia de calidad, contribuyendo al fortalecimiento del modelo económico social comunitario y productivo, promoviendo la innovación, garantizando competencia técnica, confianza y transparencia, con servicios de excelencia.

2.1.1.2. Visión

Ser reconocido por el Estado y la sociedad, como actor fundamental de la calidad, promotor del desarrollo tecnológico y la productividad, para el crecimiento integral del país.

Figura 3. Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO.



Fuente: Propia

Figura 4. Sala de Calibración y Balanzas.



Fuente: Propia

2.1.2. Material de referencia certificado - IBMETRO

El Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO, ofrece diversos materiales de referencia certificados en diferentes matrices desarrollados en el laboratorio de metrología química, los cuales se utilizan principalmente como patrones de medición.

Figura 5. Material de Referencia Certificado - IBMETRO.

	Presentación	Parámetros
Soluciones de pH	250 ml	1,68; 4,00; 6,86; 7,00; 7,41; 9,18; 10,00
Solución Mono o multi elemental de metal (es) pesado (s)	125 ml	A requerimiento del solicitante
Conductividad electrolítica	250 ml	5 μ S/cm ; 84 μ S/cm ; 143 μ S/cm ; 1413 μ S/cm; 12,88 mS/cm
Solución Hidroalcoholica	500 ml	Concentración: Alta, media, Baja (Soluciones para Calibración etilómetros)
Agua Potable	500 ml	Parámetros Físico Químicos
Quinoa	100 g	Humedad, Ceniza, Grasa, Proteína
Agua pura	125 ml	Cloro Residual (0–2 mg/l)
Agua	125 ml	Turbidez (10–200 NTU)
Cereales	1 kg	Humedad
Metales concentrados	No aplica	Material de Ensayos de Aptitud

Fuente: <http://www.ibmetro.gob.bo/material-de-referencia>

2.2. Agua superficial

Son aquellas tales como las aguas de lagos, lagunas, pantanos, arroyos de aguas permanentes y/o ríos y sus afluentes, nevados de glaciares ubicados en la superficie del planeta

terrestre. Producido por escorrentía generada por la precipitación o afloramiento de agua subterránea, las masas de agua que van en la misma dirección también se denominan aguas lénticas.

Rothschuh, U. (2022) argumenta que las aguas superficiales son aquellas que se mantienen sobre la tierra y en contacto con la atmósfera, es decir, en la superficie. Para identificarlas fácilmente son aquellas que podemos ver a simple vista o que no están bajo tierra. Estos cuerpos de agua recogen el agua de las lluvias, nacimientos de agua y de los escurrimientos que provienen de otras fuentes de agua.

Figura 6. Agua superficial laguna Charani.



Fuente: Propia (2021).

2.2.1. Laguna Charani (segundo lago) municipio de Achocalla

El riego en las zonas de los valles interandinos, constituye una práctica muy antigua cuyas fuentes naturales no son suficientes para cubrir las necesidades de agua de los cultivos, por tal razón se van construyendo diferentes estanques y obras de almacenamiento, uno de estos sistemas tradicionales se encuentra en la zona Anari de la comunidad Marquirivi del municipio de Achocalla (Torrez, 2012).

Figura 7. Ubicación segundo lago Achocalla.



Fuente: Google Earth

2.2.1.1. Macrolocalización

El municipio de Achocalla, área de interés del presente estudio, es la capital de la tercera sección de la provincia Murillo del departamento de La Paz. Según el Instituto Geográfico Militar (1994), geográficamente se encuentra localizada entre los 16°33' y 16°37' de Latitud Sur y entre

los 68°06' y 68°11' de Longitud Oeste del meridiano de Greenwich. A una altura aproximada de 3.700 m.s.n.m (Torrez, 2012).

2.2.1.2. Microlocalización

La comunidad Marquirivi se divide en 5 zonas: Viscachani, Umalaca, Carcanavi, Huayhuasi y Anari, dentro estas cinco zonas funcionan cinco sistemas de riego, tres de estos tienen como fuente de agua la laguna de Allancacho, uno como fuente de agua el lago Negro con un área de 0,69 hectáreas, y el último la laguna Charani (segundo lago) con un área de 3,38 hectáreas aproximadamente de espejo de agua (Torrez, 2012).

2.2.2. Reseña histórica de la laguna Charani

Las aguas de las lagunas Jachcha Khota (3730 m) y Charani Khota (3720 m) son del tipo eutrófico y mesotrófico, respectivamente y se desarrollaron a partir de lagunas oligotróficas (tipo primario de lagunas altoandinas) (Franken, 1991), además, son poco profundas y muy productivas (Marín et al., 2015).

El clima de la hoyada de la ciudad de La Paz que caracteriza también al valle de Achocalla, tiene una temperatura promedio anual de 12,3 °C, precipitación promedio total anual de 552 mm y predominancia de vientos del sud, sud-este la mayor parte del año y del oeste, nor-oeste en julio (Miranda et al., 2015).

La laguna Charani fue embalsada, en la época de las haciendas con la construcción de una presa para derivar agua para uso de riego y consumo de animales. Esta presa al presentar problemas

de funcionamiento, en 1972 fue remplazada con la construcción de una segunda presa que se encuentra a 43 metros por delante de la anterior (Torrez, 2012).

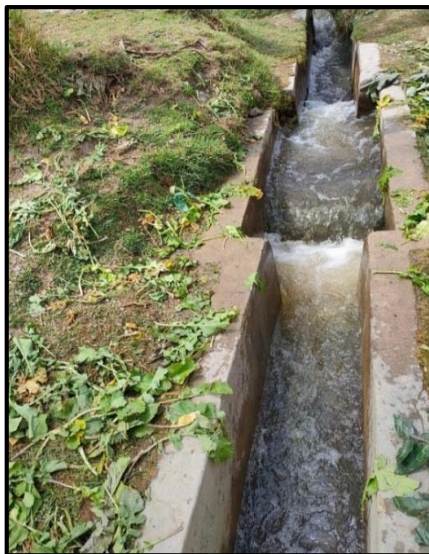
Figura 8. Presa laguna Charani.



Fuente: Propia (2021).

En la figura figura 8, se muestra la presa que fue construida en el año 1972 y es utilizada para el riego de sus sembradíos de la comunidad Marquirivi.

Figura 9. Desemboque laguna Charani.



Fuente: Propia (2021).

En la figura 9, se observa el desemboque de la laguna Charani para el riego de la agricultura, así como: zanahoria, nabo, arveja, haba y papa.

2.2.3. Características generales laguna Charani

Figura 10. Características generales laguna Charani municipio de Achocalla.

Tamaño del sistema de Riego	➤ Pertenece a la categoría microsistema de riego. (PRONAR, 2000) con un área inferior a las 10 hectáreas.
Zonas beneficiadas	➤ Zona de Anari Comunidad Marquirivi, zona de Cañuma.
Condiciones de acceso	➤ Vía troncal El Alto – Mallasilla, 7 km camino asfaltado. Acceso estable durante todo el año.
Altitud Zona agroecológica	➤ 3720 m.s.n.m. Cabecera de valle, clima templado.

Aspectos climáticos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Temperatura media 10,4 °C y la precipitación media anual 488 mm. Humedad relativa del ambiente oscila entre 50% y 70%. Heladas en entre mayo a agosto. Granizo entre septiembre a noviembre y nevadas entre agosto y septiembre.
Fuente de agua	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Laguna Charani, superficie de 3,38 hectáreas, profundidad aproximada de 2 metros, volumen de 67600 m³, calidad de agua buena.
Fisiografía y suelos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Paisaje compuesto por serranías y valles, suelos coluvio aluviales, con permeabilidad moderada. Con pH que varía de 7 a 8. ➤ Texturas Franco-Arcillo-Limoso, Arcillo-Arenoso, Franco-Limoso y Franco-Arcillo-Limoso.
Infraestructura	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Presa reguladora de hormigón ciclópeo (H°C°) ancho de muro 0,25 m, largo 7 m y altura 2,3 m. <p>Canal principal de sección rectangular de 30 x 25 cm, de hormigón ciclópeo (H°C°) con una longitud de 790 m. Canal secundario de tierra 858 m de longitud.</p>
Área bajo Riego	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Área de influencia del sistema de riego 13,53 hectáreas. ➤ Área bajo riego 8,52 hectáreas. ➤ Área Bajo Riego Optimo ABRO: 10,64 ha.
Tradición de riego	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Con amplia experiencia en riego, 60 años.
N° de usuarios	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 94 usuarios. ➤ 2 de modo provisional (nueva figura de los últimos años).
Organización para riego	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Alcalde de agua, Jilaqata, usuarios.
Derechos de agua	<p>Tienen derecho al agua todos aquellos que están inscritos en la lista de usuarios del libro de actas y hacen uso de este derecho, su expresión es demanda por turnos, es decir, se riega hasta terminar la parcela y se prioriza según la necesidad del cultivo. Solo en épocas de escasez se limita el turno por horas, con el uso de bombas.</p>

Acceso al agua	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tenencia de tierra, herencia, trabajo al partido y alquiler de tierra.
Modalidad de distribución	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Por turnos según la lista con intervalos de una semana.
Épocas de riego	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Riego suplementario, desde mayo hasta el inicio de las lluvias, la distribución es bajo lista. ➤ Riego complementario los meses que no se riega bajo lista hasta el final de la época de lluvias, la solicitud es de modo personal hacia el Alcalde de agua.
Tipo de mantenimiento	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preventivo y rutinario. Dos veces por año. ➤ 1ra limpieza: mediados del mes de abril. ➤ 2da limpieza: mediados del mes de agosto. ➤ Ambas con fecha fija para el mantenimiento.
Aportes	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Jornales y dinero (cuotas y multas).
Cultivos bajo riego	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Siembra grande: zanahoria, nabo, arveja, haba y papa ➤ Siembra postrera: papa, nabo, cebada, etc.
N° de cosechas por año	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dos cosechas por año.
Épocas de siembra	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Siembra grande: junio a agosto. ➤ Siembra postrera: diciembre a enero.
Destinos de la producción	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Zanahoria, nabo, arveja y haba para la venta en los mercados de El Alto y La Paz. ➤ Papa para autoconsumo y semilla. ➤ Cebada como forraje para ganado lechero.
Tipos de riego	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparación: para barbecho y para la siembra. ➤ Riego al cultivo.
Métodos de riego	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Inundación y surcos.

Caudales manejados	➤ De 10 a 23 L/s.
Idioma	➤ Aymara y castellano principalmente.
Actividades económicas principales	➤ Agricultura, comercio y transporte.

Fuente: Torrez (2012).

2.3. Clorofila

Proviene del vocablo chloros que significa “verde” y fylon que significa “hoja”. Fue descubierta en 1817 por Caventou y Pelletier quienes lograron aislarla de las hojas de las plantas. Existen diferentes tipos de Clorofila, como la Clorofila-a que se encuentra presente en la mayoría de los vegetales y es la encargada de absorber la luz durante la fotosíntesis; la Clorofila-b que se encuentra presente en los cloroplastos, se encarga de absorber la luz de otra longitud y transfiere la energía a la Clorofila-a; la Clorofila-c está presente en los cloroplastos de las algas pardas, las diatomeas y, por último, la Clorofila-d se halla únicamente en las algas rojas (Fernandez, 2010).

Oliveros (2014) argumenta en su tesis que es el pigmento que da color verde a los vegetales y los organismos autótrofos la utilizan para absorber la energía luminosa, siendo la más común la Clorofila-a. La Clorofila absorbe toda la luz roja, violeta y azul pero refleja la verde. Debido a que los organismos fotótrofos poseen Clorofila-a, su concentración proporciona un indicador de la biomasa fitoplanctónica. Medir la concentración de Clorofila-a resulta mucho más sencillo que medir biomasa directamente, por lo que es un método muy utilizado para estimar la eutrofización de un sistema.

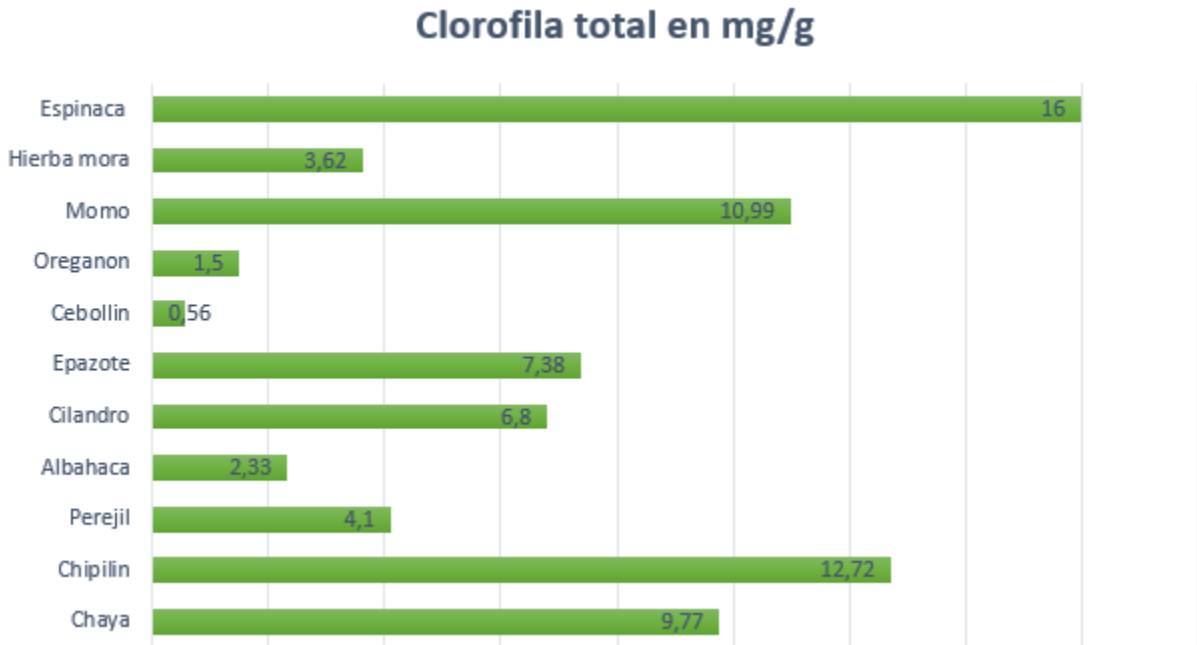
2.4. Espinaca

La espinaca, cuyo nombre científico es *Spinacea oleracea*, pertenece a la familia de las amarantáceas crecen muy bien en climas templados. Una de las fuentes más grandes de Clorofila es la espinaca, ya que contiene entre 300 y 600 miligramos por onza (Ruiz, et al., 2019).

“La Clorofila por su alta concentración se extrae generalmente de las espinacas, berro y acelgas, aunque se hace necesario el estudio de otras variedades con posibilidad de uso” (Ruiz, et al. 2019, p. 891). Una de las fuentes más grandes de Clorofila es la espinaca ya que contiene 16 mg/g en promedio (QuimiNet, 2013).

La muestra de espinaca se compró de una única productora del vegetal, que lo vende en el mercado Rodríguez “Canchón”, la misma afirma que lo cosecha por el sector del Illimani ya que tiene mayor conservación para la venta al consumidor.

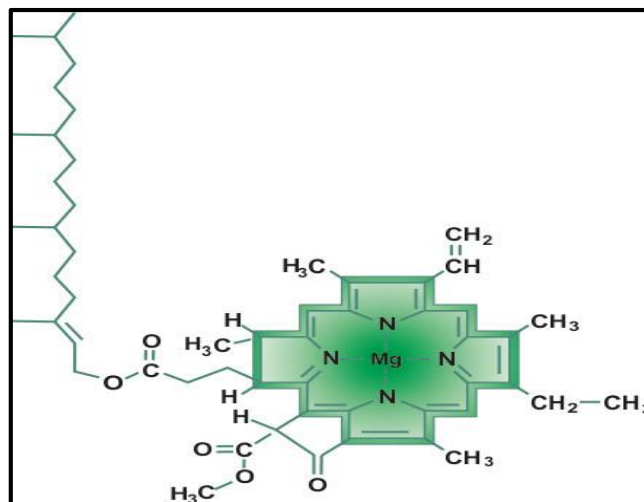
Figura 11. Concentración de Clorofila de diferentes hierbas comestibles.



Fuente: Ruiz (2019).

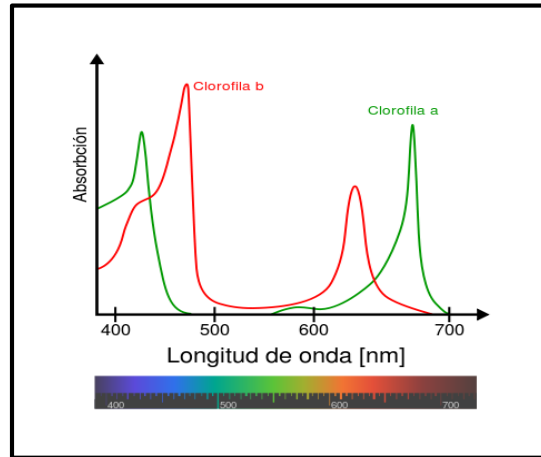
Para su extracción y cuantificación existen tres métodos: el Espectrofotométrico, fluorométrico y por cromatografía líquida. Para la extracción industrial de la Clorofila se utilizan hojas de color verde intenso como lo son las espinacas y el berro (Val et al. ,1985).

Figura 12. Estructura de la Clorofila.



Fuente: Koolman & Röhm (2005).

Figura 13. Curva de absorción de luz de Clorofila.



Fuente: <https://eltamiz.com/elcedazo/2013/06/30/la-biografia-de-la-vida-07-rudimentos-de-gestion-energetica/>

En la figura 13, se observa las Clorofilas que se encuentran en dos grupos de absorción en el espectro visible:

- ✓ Zona azul con longitud de onda (400 nm a 500 nm).
- ✓ Zona roja con longitud de onda (600 nm a 700 nm).

Estas reflejan la zona verde de color verde que se encuentra en una longitud de onda de (500 nm a 600 nm).

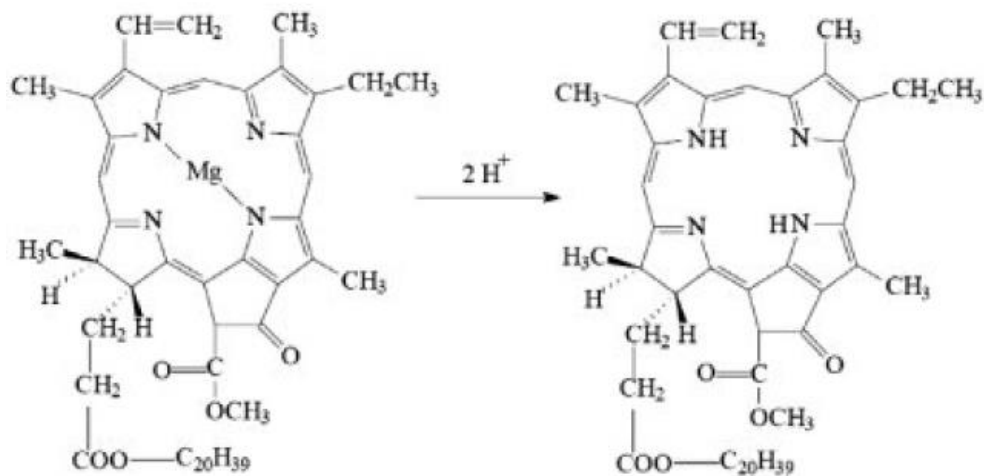
2.5. Clorofila-a

La concentración de Clorofila-a se utiliza para estimar en forma indirecta la biomasa de las comunidades fitoplanctónicas, debido a que es el principal pigmento fotosintético presente en las algas, también es un indicador del estado fisiológico del fitoplancton y del estado trófico de los sistemas acuáticos (Gregor y Marsálek, 2004).

“La Clorofila-a también es un indicador del grado de contaminación de los ecosistemas acuáticos y un importante índice del estado fisiológico del fitoplancton” (Pinto et al., 2001).

Para estimar la Clorofila existen diferentes métodos, procedimientos y modelos matemáticos, desarrollados con el objeto de minimizar los errores ocasionados por la presencia de otros pigmentos fotosintéticos y de algunos compuestos químicos en el agua (APHA, 1998).

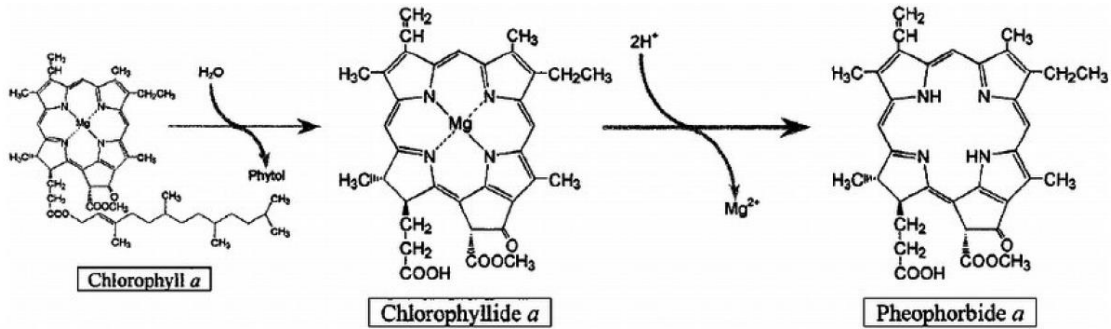
Figura 14. Estructura de Clorofila y feofitina.



Fuente: Calvo (s.f.).

En la figura 14, hay una representación esquemática de la conversión de Clorofila a feofitina a través de hidrólisis ácida. La Clorofila puede sufrir distintos tipos de alteraciones. La más frecuente, y la más perjudicial para el color de los alimentos vegetales que la contienen, es la pérdida del átomo de magnesio, formando la llamada feofitina, de un color verde oliva con tonos marrones, en lugar del verde brillante de la Clorofila. Esta pérdida del magnesio se produce por sustitución por dos iones H^+ , y consecuentemente se ve favorecida por el medio ácido (Calvo, s.f.).

Figura 15. Estructuras de Clorofila-a, Clorofilida-a y Feoforbida-a.



Fuente: Hernández (1999).

En la figura 15, se observa la degradación de la Clorofila-a a Clorofilida-a y Feoforbida-a (pérdida de la cadena de fitol). Por otro lado, por acción del calentamiento del agua en un tiempo determinado se inactiva la clorofilasa y acelera la lisis de los pigmentos.

2.5.1. Fitoplancton

El fitoplancton son los seres vivos de origen vegetal que viven flotando en la columna de agua. Son organismos autótrofos capaces de realizar la fotosíntesis. Su importancia es fundamental dado que son los productores primarios más importantes en el océano. La distribución del fitoplancton queda restringido a la capa más superficial del océano dada las condiciones que requiere de presencia de luz para poder realizar la fotosíntesis.

El Fitoplancton es el conjunto de microorganismos fotosintéticos que están en todas las aguas del planeta y son el inicio de la cadena alimenticia. Es el conjunto de algas y cianobacterias que habitan los sistemas acuáticos, contribuye a la producción primaria de dichos sistemas a través de la fotosíntesis. Se dividen de acuerdo a su tamaño en (Arrigo, 2005):

- ✓ Picofitoplancton (0,2 μm a 2 μm)
- ✓ Nanofitoplancton (2 μm a 20 μm)
- ✓ Microfitoplancton (20 μm a 200 μm)

Se distribuye por todos los mares y océanos del planeta tierra siendo fundamentales en el mantenimiento de la concentración de oxígeno en el océano y en la atmósfera. Son organismos que constituyen el primer nivel trófico de los océanos; en otras palabras, son la base que sustenta de manera directa o indirecta la vida del resto de los organismos marinos, además de tener una participación fundamental en el ciclo del carbono. Al ser organismos autótrofos se encuentran en la zona superficial de los océanos y hasta la región donde penetran los rayos solares (0-200m), conocida como capa eutrófica (López, et al., 2016).

El fitoplancton presenta una gran biodiversidad, encontrándose diversas especies en función de las condiciones naturales del lugar y de la presencia o ausencia de nutrientes, episodios de eutrofización.

2.5.1.1. Clasificación del nivel de eutrofia según OCDE

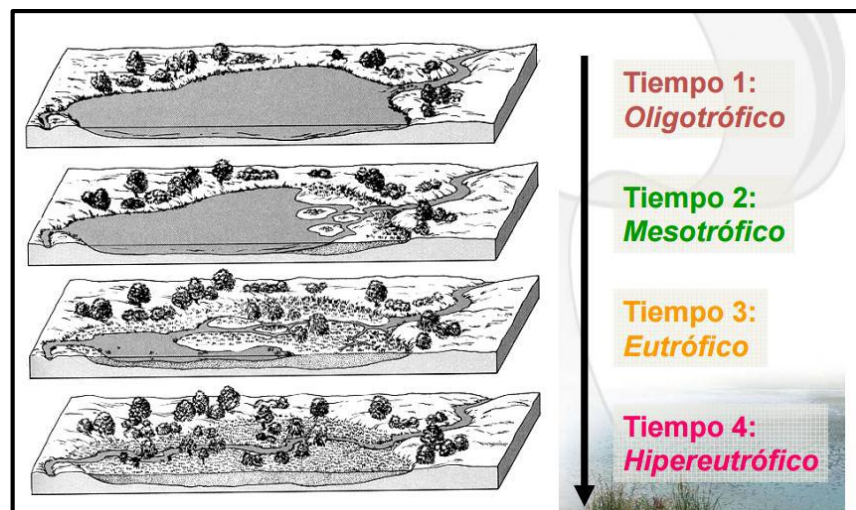
Olivos (2010), indica luego de un estudio de cinco años que abarcó 200 ambientes en 22 países de Europa occidental, EEUU, Japón y Australia el comité de Eutrofización de la Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE), propuso una clasificación del grado de eutrofia de lagos y embalses, de acuerdo a los valores que alcanzan las variables de Clorofila.

Figura 16. Valores límites de la OCDE de clasificación trófica.

Grado de eutrofia	Clorofila ($\mu\text{g/L}$)
Ultraoligotrófico	<1
Oligotrófico	1-2,5
Mesotrófico	2,5-8
Eutrófico	8-25
Hipereutrófico	>25

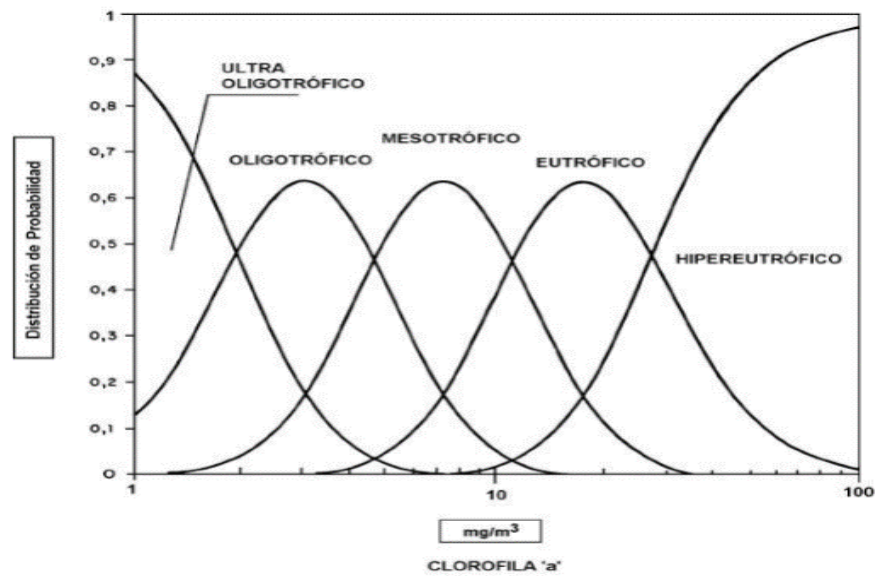
Fuente: OCDE (1982).

Figura 17. Niveles tróficos.



Fuente: Urrutia (2009).

Figura 18. Distribución de probabilidad de nivel trófico basado en Clorofila-a.



Fuente: Vollenweider y Kerenkes (1981).

2.5.1.2. Algas

Son organismos acuáticos fotoautótrofos oxigénicos poco complejos morfológicamente que las plantas terrestres, contienen Clorofila y por ello son de color verde teniendo variedad en cuanto a su pH. Habitan en aguas dulces como saladas también en peceras artificiales.

Las algas fotosintéticas se encuentran en toda la profundidad de la zona fótica de las grandes masas de agua, la Clorofila-a y los pigmentos propios que intervienen en la fotosíntesis son los que determinan los colores distintivos de las algas. Para clasificarlas se utilizan criterios como la naturaleza de las Clorofilas, los polímeros carbonados que utilizan como reserva, la estructura de la pared celular y el tipo de movilidad (Brock, et al. 2005).

Tabla 1*Clasificación de algas.*

Grupo	Nombre	Morfología	Pigmento	Hábitat
Chlorophyta	Alga verde	Unicelular con ramificación	Clorofila a y b	Agua dulce y suelo
Chrysophyta	Diatomea	Unicelular	Clorofila a y c	Agua dulce, marina y suelo
Dinoflagellata	Dinoflagelado	Unicelular con flagelado	Clorofila a y c	Marinas
Phaeophyta	Alga parda	Filamentosa con ramificación	Clorofila a y c, xantofilas	Marinas
Rhodophyta	Alga roja	Unicelular, filamentosa con ramificación	Clorofila a y d, ficocianina y ficoeritrina	Marinas

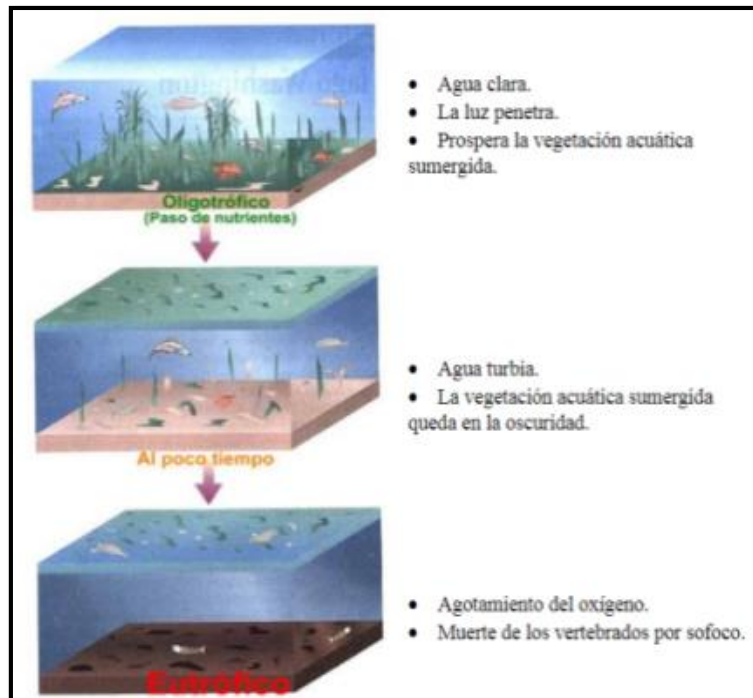
Fuente: Tortora (2010).

2.6. Eutrofización

Es el enriquecimiento en nutrientes de las aguas. Produce un crecimiento excesivo de algas, las cuales al morir se depositan en el fondo de los ríos o lagos, generando residuos orgánicos que, al descomponerse, consumen gran parte del oxígeno disuelto y de esta manera pueden afectar a la vida acuática y producir la muerte por asfixia de la fauna y flora, hasta el punto de matar el río o

lago por completo. Las algas se desarrollan cuando encuentran condiciones favorables: temperatura, sol y nutrientes (Romero, 2010).

Figura 19. Esquema de Eutrofización.



Fuente: Bernard J. Nebel y Richard T. Wright

Figura 20. Cuenca con Eutrofización.



Fuente: Romero (2010).

Figura 21. Laguna Charani.



Fuente: Propia (2021).

En la figura 21, se observa que existe un crecimiento de plantas acuáticas casi en toda su superficie que lo rodea, dándonos una advertencia a futuro de una posible eutrofización y pérdida de los seres acuáticos que lo habitan.

Ibarra (2008) indica en su tesina, el proceso provocado por la gran cantidad de nutrientes (nitratos y fosfatos principalmente), estimula el crecimiento de fitoplancton, lo que provoca la pérdida de transparencia del agua (que disminuye la fotosíntesis por la falta de luz) y aumenta así la descomposición de la materia orgánica. Todo a su vez, hace que disminuya la concentración de oxígeno. Esta disminución de oxígeno provoca la muerte de organismos aerobios. Si no hay

oxígeno se incrementan las fermentaciones y como resultado se desprenden gases tóxicos como el metano y el amoníaco. Todo esto conduce a una degradación del medio acuático y a la disminución significativa de la calidad de vida de los seres que lo habitan.

Vadillo (2010) argumenta que la eutrofización es un proceso natural que puede acelerarse evidentemente a partir del grado de incidencia de factores relacionados con el cuerpo de agua y la acción del hombre. Menciona los siguientes factores con el cuerpo de agua:

- ✓ Se considera que los cuerpos de aguas pocos profundas y/o de bajo caudal son proclives al desarrollo del proceso de eutrofización, debido al transporte de nutrientes por erosión del suelo.
- ✓ Del clima se toma en cuenta los factores que afectan la temperatura del agua, como es la dirección y la velocidad del viento, la cantidad de precipitaciones y los factores que controlan la producción del fitoplancton.
- ✓ Los sedimentos del fondo, ya que parte de los nutrientes importados son retenidos en los sedimentos que actúan de sumidero, si se enriquecen con fósforo a lo largo del tiempo, la liberación de este elemento en dichos sedimentos puede superar el flujo hacia los mismos, especialmente si el fondo se vuelve anóxico, provocando una proliferación masiva de algas, sin necesidad de un aporte externo de nutrientes.

Factores por la acción del ser humano:

- ✓ Las descargas de origen urbano principalmente, se caracterizan por el contenido de nitrógeno (nitratos, nitritos y amonio) y fosfatos (principalmente procedentes de restos de detergentes).
- ✓ Las descargas de origen agrícola y ganadero. El uso de la tierra y fertilizantes de una cuenca de drenaje puede ocasionar diferencias importantes en la composición química de las aguas de la esorrentía de cada área.

2.7. Espectrofotometría Ultravioleta Visible

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Días et al., s.f.).

2.7.1. Radiación electromagnética

La radiación electromagnética parte de una naturaleza ondulatoria para describir su movimiento, describir las ondas con parámetros como:

➤ Frecuencia $\left[\frac{1}{s} \right]$

➤ Longitud de onda [m]

- Numero de ondas $\left[\frac{1}{cm} \right]$
- Amplitud [cm]
- Velocidad $\left[\frac{cm}{s} \right]$

Donde : $c = 3 \times 10^{10} \text{ cm / s}$
 $c = \text{velocidad de la luz}$

No obstante, para explicar los fenómenos asociados con la absorción o emisión es necesario considerar la radiación electromagnética como un flujo de partículas discretas de energía llamadas *fonones*. La energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación según la ecuación:

$$E = h \cdot \nu$$

E: energía del fotón.

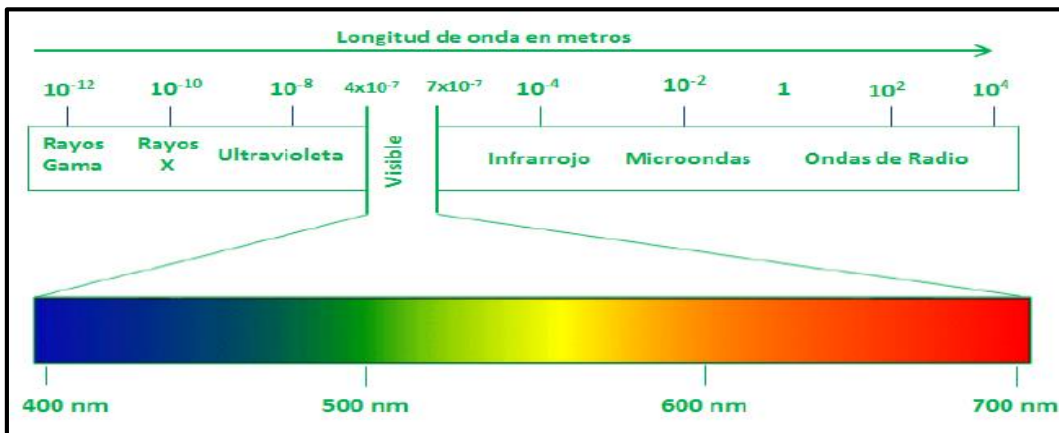
h: es la constante de Planck ($h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J. s.}$).

ν : frecuencia.

Así, las radiaciones de mayor frecuencia del espectro electromagnético (rayos X o rayos γ), son más energéticas que las de baja frecuencia (radiofrecuencia o microondas), y en su interacción con la materia provocaran alteraciones más importantes en cuanto al cambio energético asociado. El espectro electromagnético cubre un amplio rango de frecuencias, y por tanto de energías. Dentro de él, y en intervalos limitados de frecuencias, operan las diferentes técnicas espectroscópicas, dependiendo de los procesos y cambios energéticos implicados (Martínez, 2017, p.2).

El espectro electromagnético que se muestra en la figura 22, cubre una amplia categoría de frecuencias, por lo tanto, también de energías. Dentro de él y dentro de los rangos de frecuencias, operan las diferentes técnicas espectroscópicas dependiendo de los procesos de cambios de energía involucrados.

Figura 22. Espectro electromagnético.



Fuente: Oliveros (2014).

2.7.2. Leyes de la espectrofotometría

2.7.2.1. Transmitancia

La **transmitancia** (**T**) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, I_t , y la cantidad de luz que incidió sobre ella, I_o , y se representa normalmente en tanto por ciento: $\%T = \frac{I_t}{I_o} \times 100\%$. La transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra (Rubinson, 2001).

2.7.2.2. Absorbancia

La **absorbancia** (**A**) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de $\frac{1}{T}$, por lo que:

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_o}.$$

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_o = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda.

2.7.2.3. Ley de Lambert-Beer

Rige la absorción de todos los tipos de radiación electromagnética, aplicable a disoluciones y también a gases y sólidos. Nos dice que la absorbancia de radiación electromagnética producida por una especie absorbente es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la disolución y a la concentración en ésta de la sustancia que produce la absorción (Skoog y Nieman, 2001).

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Donde:

$$\log \left[\frac{P_o}{P} \right] = a \cdot b \cdot c = -\log \left[\frac{P}{P_o} \right] = -\log T$$
$$\frac{P}{P_o} = 10^{-a \cdot b \cdot c}$$

a: constante de proporcionalidad, absorptividad, es una propiedad intensiva de la materia y por tanto relacionada únicamente con la naturaleza de la misma.

b: trayectoria de la radiación a través de la muestra (cm)

c: concentración (g/L), entonces a tiene unidades de $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$

La absorptividad pasa a denominarse absorptividad molar y se expresa con el símbolo ϵ , cuando la concentración está en (moles/litro) y b en (cm), siendo sus unidades $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

2.8. Principio del método Espectrofotométrico para Clorofila-a

La espectrofotometría UV-VIS es un método experimental que facilita la identificación de concentraciones de diversas sustancias mediante la obtención de la absorbancia, determinación de calidad de agua (Espinoza, 2016).

El proceso que realiza la espectrofotometría UV-VIS inicia desde los colores que observa el ojo humano ya que es un fenómeno físico que describe la absorción de una parte del espectro de luz visible mientras otra se refleja o se transmite (Curtis et. al., 2008).

El presente trabajo de investigación relaciona a la espectrofotometría conceptos de espectro de luz, absorbancia y pigmentos, lo que hace referencia a la absorbancia que originan los pigmentos propiamente dicho, en este caso la Clorofila extraída de *Spinacia oleracea* (espinaca).

2.9. Procedimiento del método ISO 10260:1992

La Clorofila-a es el pigmento fotosintético esencial presente en todas plantas verdes. El contenido de Clorofila de un agua superficial es un indicador de su estado trófico. La determinación de la concentración de Clorofila-a proporciona información sobre la cantidad y la potencial actividad fotosintética de las algas. Los metabolitos más importantes de las Clorofilas

son feofitinas y feoforbidos. La relación de Clorofila a los feopigmentos es indicativa del estado fisiológico de las algas (ISO 10260, 1992).

El procedimiento especificado puede aplicarse al fitoplancton en aguas superficiales naturales y para analizar el crecimiento de algas en bioensayos. Utilizando un muestreo apropiado, también se puede aplicar a comunidades fitobentónicas. El principio es la recolección de algas por filtración, extracción de pigmentos de algas, determinación espectrofotométrica de la concentración de Clorofila-a en el extracto, evaluación de la concentración de Clorofila-a y feopigmento a partir de la diferencia de absorbancia a 665 nm antes y después de la acidificación del extracto (ISO 10260, 1992).

El procedimiento de extracción con etanol implica calentar a 75°C durante 5min para inactivar la clorofilasa, enzima encargada de eliminar al fitol de la molécula de Clorofila y acelerar la lisis o desaparición gradual de los pigmentos. Por otro lado, el procedimiento implica filtración o centrifugación para aclarar el extracto final, puede quedar una ligera turbidez. La etapa de acidificación también causa turbidez. Por lo tanto, la absorbancia medida a 665nm debe corregirse por turbia restando la absorbancia medida a 750nm (ISO 10260:1992).

CAPÍTULO III

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. Descripción del trabajo

El siguiente trabajo se realizó en el Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO laboratorio de Metrología Química, dependiente de la Dirección de Metrología Industrial y Científica-DMIC con materiales calibrados y reactivos para análisis, bajo la estandarización de la norma ISO 10260:1992.

3.1.1. Equipos

- Espectrofotómetro Ultravioleta Visible-Cary 100 WinUv.
- Balanza analítica con una precisión de 0,0001 g – Metler Toledo, XS 204.
- Centrifugadora.
- Equipo de filtración al vacío.
- Equipo de baño maría.

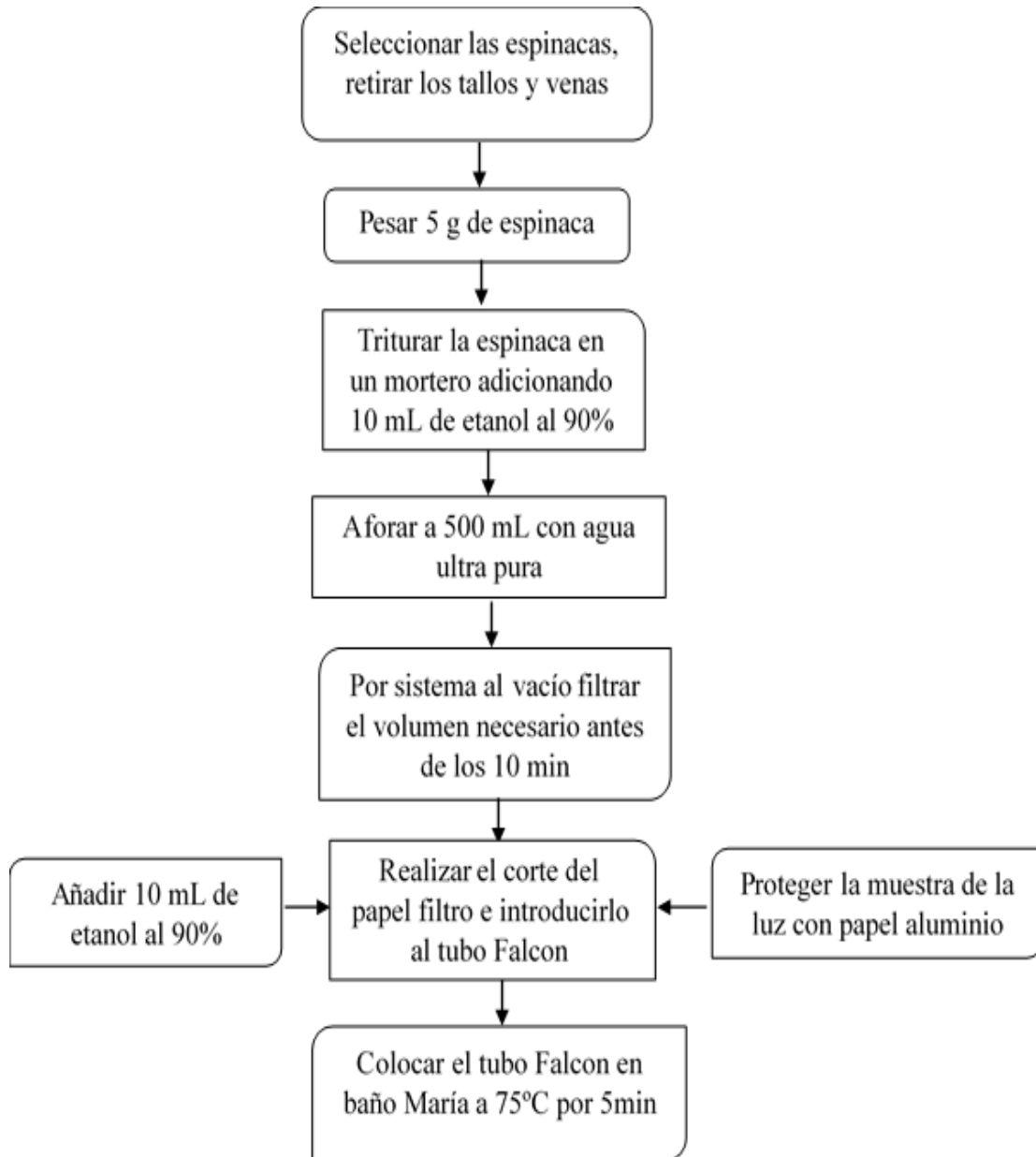
3.1.2. Materiales y reactivos

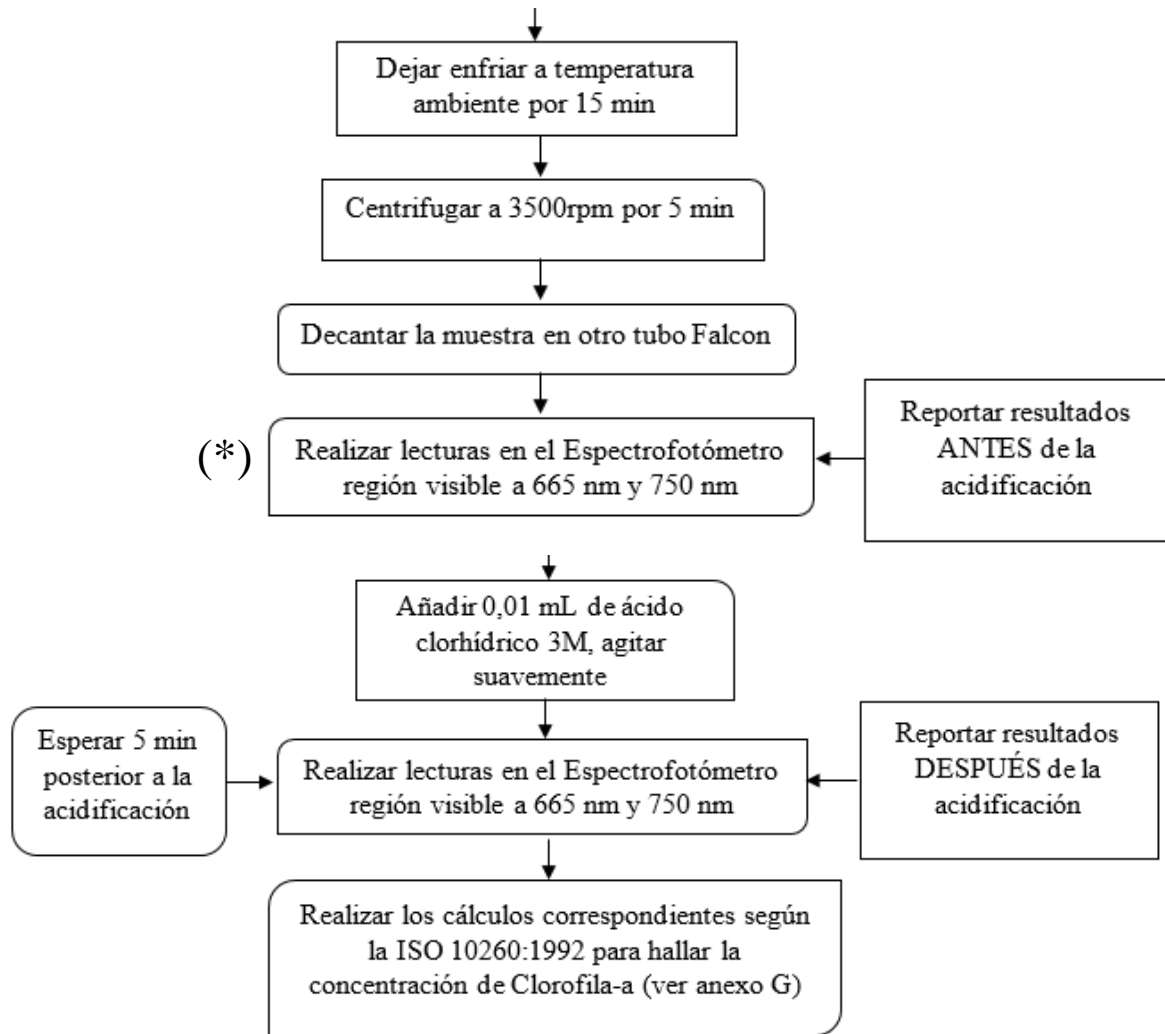
- Matraz aforado 25mL, 100mL, 250mL, 500mL.
- Vasos de precipitado 25mL, 50mL, 100mL, 250mL.
- Pipetas 5mL,10mL, 25mL.
- Probeta 100mL.
- Micro pipetas 1mL,5mL.
- Tubos Falcon de 50mL.
- Etanol al 90%.

- Ácido clorhídrico 3 M - Merck.
- Varilla de vidrio.

3.1.3. Determinación inicial de Clorofila-a en la espinaca

Figura 23. *Flujograma del proceso.*

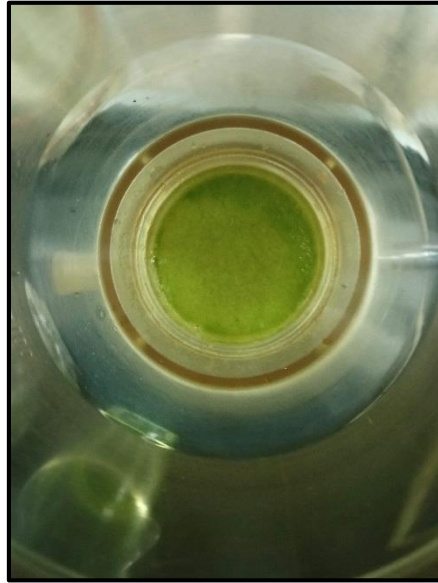




Fuente: Propia

A partir de la concentración calculada según norma ISO 10260:1992 realizar las diluciones de 100µg/L, 75µg/L, 50µg/L, 25µg/L, 1µg/L y las lecturas correspondientes a 665nm y 750nm a partir de (*).

Figura 24. Filtración al vacío.



Fuente: Propia

En la figura 24, se observa la filtración al vacío del extracto de la hoja de espinaca en un tiempo menor a 10 minutos bajo las condiciones de no exponerlo por mucho tiempo al ambiente ni a la luz (ver p. 41).

3.1.4. Preparación de diluciones para la concentración de Clorofila-a

Para proceder con los puntos de concentración de Clorofila-a se realizó diluciones progresivas desde: 100 μ g/L, 75 μ g/L, 50 μ g/L, 25 μ g/L, 1 μ g/L respectivamente.

3.1.4.1. Cálculos para la concentración real estándar de 100 μ g/L

La utilización de los estándares que se prepararon en función al extracto de espinaca es para tener conocimiento de los límites de determinación máximo y mínimo.

Por dilución $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

Donde: $C_1 = 800,5 \mu\text{g/L}$ $V_1 = ?$ $C_2 = 100 \mu\text{g/L}$ $V_2 = 250\text{mL}$

$800,5 \mu\text{g/L} \cdot V_1 = 100 \mu\text{g/L} \cdot 250\text{mL}$

$V_1 = 31,2\text{mL}$

3.1.4.2. Cálculos para la concentración real estándar de 75 $\mu\text{g/L}$

Por dilución $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

Donde: $C_1 = 100 \mu\text{g/L}$ $V_1 = ?$ $C_2 = 75 \mu\text{g/L}$ $V_2 = 250\text{mL}$

$100 \mu\text{g/L} \cdot V_1 = 75 \mu\text{g/L} \cdot 250\text{mL}$

$V_1 = 187,5\text{mL}$

3.1.4.3. Cálculos para la concentración real estándar de 50 $\mu\text{g/L}$

Por dilución $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

Donde: $C_1 = 75 \mu\text{g/L}$ $V_1 = ?$ $C_2 = 50 \mu\text{g/L}$ $V_2 = 250\text{mL}$

$75 \mu\text{g/L} \cdot V_1 = 50 \mu\text{g/L} \cdot 250\text{mL}$

$V_1 = 166,7\text{mL}$

3.1.4.4. Cálculos para la concentración real estándar de 25 $\mu\text{g/L}$

Por dilución $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

Donde: $C_1=50 \mu\text{g/L}$ $V_1=?$ $C_2= 25 \mu\text{g/L}$ $V_2=250\text{mL}$

$$50 \mu\text{g/L} * V_1 = 25 \mu\text{g/L} * 250\text{mL}$$

$$V_1 = 125\text{mL}$$

3.1.4.5. Cálculos para la concentración real estándar de $1 \mu\text{g/L}$

Por dilución $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$

Donde: $C_1= 25\mu\text{g/L}$ $V_1=?$ $C_2= 1 \mu\text{g/L}$ $V_2=250\text{mL}$

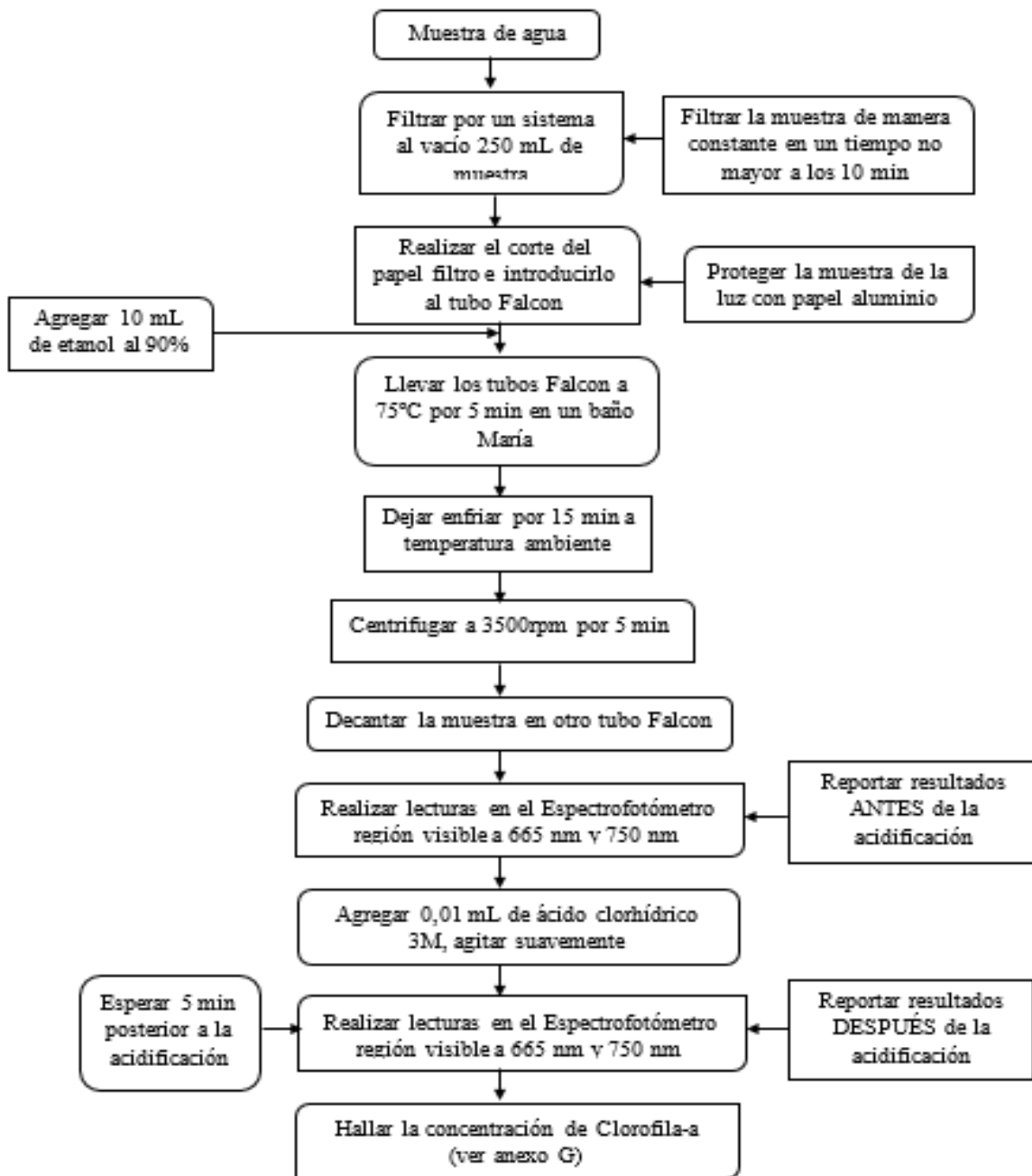
$$25\mu\text{g/L} * V_1 = 1 \mu\text{g/L} * 250\text{mL}$$

$$V_1 = 10\text{mL}$$

Se tomó como referencia el estándar de trabajo mínimo de $1\mu\text{g/L}$ y como máximo $100\mu\text{g/L}$ para determinar la concentración de Clorofila-a en agua superficial. La toma de muestra de la laguna Charani se realizó en el mes de noviembre del 2021 correspondiente a la estación de primavera.

3.1.5. Flujograma determinación de Clorofila-a en agua superficial

Figura 25. Flujograma del proceso.



Fuente: Propia

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1. Norma ISO 10260:1992

La determinación de Clorofila-a a partir de la solución de trabajo extracto de espinaca nos permite obtener resultados tomando en cuenta la ISO 10260:1992 (ver Anexo G) como referencia para todas las mediciones y estandarización del método para una correcta determinación en aguas superficiales.

4.2. Determinación de Clorofila-a en hoja de espinaca

Con una masa de 5,0013 g de espinaca se procedió a la determinación de Clorofila-a.

Tabla 2

Datos obtenidos para la concentración de Clorofila-a.

	Antes de acidificar		Después de acidificar	
	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$
	0,7234	0,2234	0,5560	0,2208
	0,7245	0,2239	0,5598	0,2209
	0,7255	0,2278	0,5606	0,2221
	0,7282	0,2283	0,5609	0,2245
	0,7329	0,2301	0,5614	0,2259
Promedio	0,7269	0,2267	0,5597	0,2228

Fuente: Elaboración propia.

Cálculo de la concentración de la Clorofila-a en $\mu\text{g/L}$ aplicando la fórmula de la ISO 10260:1992.

$$[\text{Chl}-a] = \frac{(A_{665} - A_{750})_{\text{antes de acidificar}} - (A_{665} - A_{750})_{\text{después de acidificar}}}{K_{\text{Chl}-a}} \times \frac{R}{R-1} \times \frac{1000(V_{\text{extraido}})}{V_{\text{filtrado}}(d_{\text{cubeta}})} = \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right]$$

Donde:

- $(A_{665} - A_{750})_{\text{antes de acidificar}}$: Absorción del extracto antes de acidificar.
- $(A_{665} - A_{750})_{\text{después de acidificar}}$: Absorción del extracto después de acidificar.
- $K_{\text{Chl}-a} = 82 \text{ L} / \mu\text{g} \cdot \text{cm}$: Coeficiente específico de absorción de la Clorofila-a en etanol a 665nm.
- R: relación de A / A_a de una solución de Clorofila pura que transforma a feofitina por acidificación (a 665nm).
- V_{extraido} : Volumen de etanol (mL).
- V_{filtrado} : Volumen de muestra filtrada (L).
- d: distancia del camino óptico de la cubeta (cm).

$$\text{Chl}-a = \frac{(0,7269 - 0,2267)_{\text{ANTES}} - (0,5597 - 0,2228)_{\text{DESPUÉS}}}{82} * \frac{1,2987}{1,2987 - 1} * \frac{1000(10)}{0,10816(1)}$$

$$\text{Chl}-a = 800,5 \mu\text{g} / \text{L}$$

4.3. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 100 µg/L

Tabla 3

Datos obtenidos para 100 µg/L.

	Antes de acidificar		Después de acidificar	
	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$
	0,2272	0,0301	0,1608	0,0242
	0,2294	0,0269	0,1617	0,0246
	0,2316	0,0311	0,1617	0,0246
	0,2323	0,0313	0,1622	0,0250
	0,2326	0,0326	0,1625	0,0253
Promedio	0,2306	0,0304	0,1618	0,0247

Fuente: Elaboración propia.

4.3.1. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 75 µg/L

Tabla 4

Datos obtenidos para 75µg/L.

	Antes de acidificar		Después de acidificar	
	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$
	0,1611	0,0339	0,1219	0,0301
	0,1631	0,0346	0,1247	0,0334

	0,1639	0,0368	0,1255	0,0344
	0,1640	0,0375	0,1294	0,0383
	0,1650	0,0377	0,1297	0,0388
Promedio	0,1634	0,0361	0,1262	0,0350

Fuente: Elaboración propia.

4.3.2. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 50 µg/L

Tabla 5

Datos obtenidos para 50µg/L.

	Antes de acidificar		Después de acidificar	
	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$
	0,1666	0,0564	0,1189	0,0388
	0,1673	0,0583	0,1196	0,0421
	0,1698	0,0620	0,1198	0,0428
	0,1728	0,0634	0,1200	0,0428
	0,1744	0,0638	0,1212	0,0434
Promedio	0,1702	0,0608	0,1199	0,0420

Fuente: Elaboración propia.

4.3.3. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 25 µg/L

Tabla 6

Datos obtenidos para 25µg/L.

	Antes de acidificar		Después de acidificar	
	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$
	0,0498	0,0143	0,0380	0,0151
	0,0501	0,0149	0,0382	0,0152
	0,0506	0,0151	0,0387	0,0155
	0,0509	0,0155	0,0391	0,0157
	0,0514	0,0159	0,0395	0,0160
Promedio	0,0506	0,0151	0,0387	0,0155

Fuente: Elaboración propia.

4.3.4. Datos de absorbancia antes y después de acidificar para 1 µg/L

Tabla 7

Datos obtenidos para 1µg/L.

	Antes de acidificar		Después de acidificar	
	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$
	0,0182	0,0161	0,0160	0,0145
	0,0183	0,0165	0,0167	0,0151

	0,0184	0,0165	0,0168	0,0152
	0,0187	0,0172	0,0178	0,0158
	0,0200	0,0180	0,0185	0,0168
Promedio	0,0187	0,0169	0,0172	0,0155

Fuente: Elaboración propia.

4.4. Clorofila-a en agua superficial laguna Charani municipio de Achocalla

Se realizó una filtración constante con un volumen de 250 mL para la determinación de Clorofila-a.

Tabla 8

Datos obtenidos laguna Charani.

	Antes de acidificar		Después de acidificar	
	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 665\text{nm}$	Absorbancias $\lambda = 750\text{nm}$
	0,0143	0,0102	0,0091	0,0077
	0,0145	0,0104	0,0093	0,0080
	0,0151	0,0108	0,0095	0,0097
	0,0151	0,0118	0,0104	0,0100
	0,0154	0,0120	0,0126	0,0102
Promedio	0,0149	0,0110	0,0102	0,0091

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9

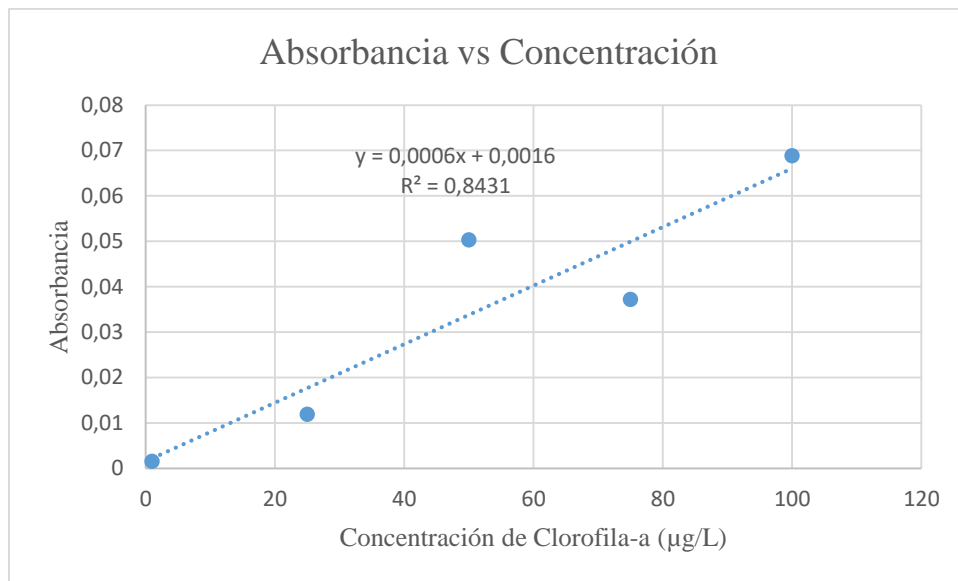
Resta de absorbancias a 665nm antes y después de acidificar.

Concentración Clorofila-a ($\mu\text{g/L}$)	^a Absorbancias
1	0,0015
25	0,0119
50	0,0503
75	0,0372
100	0,0688

Nota: Con base a datos obtenidos Microsoft Excel 2016.

^aResta de absorbancias de los promedios en función a cada concentración de Clorofila-a.

Figura 26. Curva de calibración de Clorofila-a sin ajuste.



Fuente: Elaboración propia.

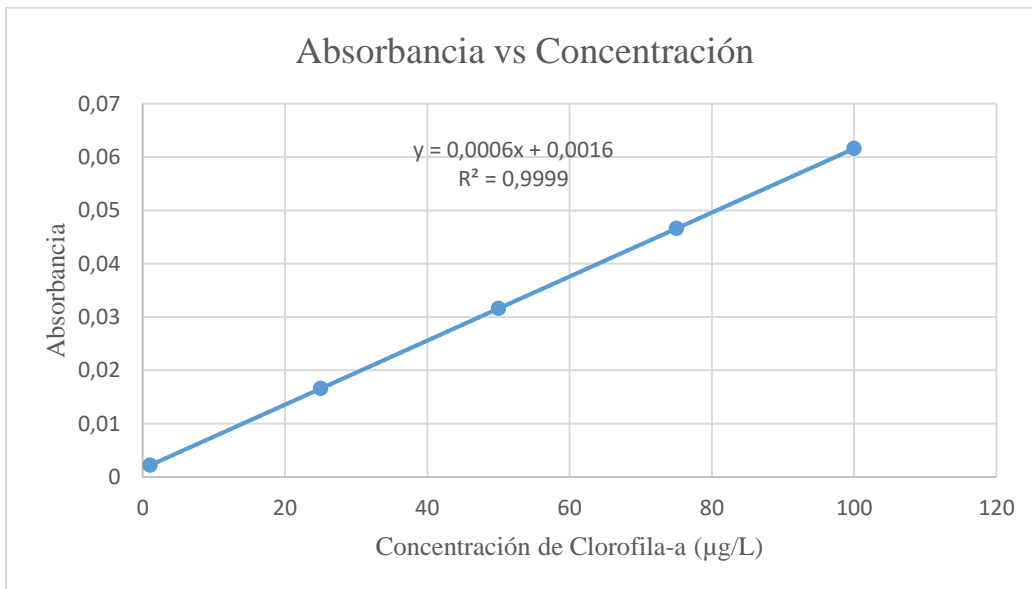
Tabla 10

Resta de absorbancias a 665nm antes y después de acidificar.

Concentración Clorofila-a ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancias
1	0,0022
25	0,0166
50	0,0316
75	0,0466
100	0,0616

Fuente: Elaboración propia.

Figura 27. Curva de calibración de Clorofila-a con ajuste.



Fuente: Elaboración propia.

Cálculo de la concentración de Clorofila-a laguna Charani por:

$$\text{Abs}_{\text{Laguna}} = [A_{665}(\text{antes de acidificar}) - A_{665}(\text{después de acidificar})]$$

$$\text{Abs}_{\text{Laguna}} = (0,0149 - 0,0102)$$

$$\text{Abs}_{\text{Laguna}} = 0,0047$$

Por la ecuación de la recta: $y = 0,0006x + 0,0016$

$$\text{Abs}_{\text{Laguna}} = 0,0006[\text{Chl-a}] + 0,0016$$

$$[\text{Chl-a}] = \frac{0,0047 - 0,0016}{0,0006} = 5,2 \mu\text{g/L}$$

Tabla 11

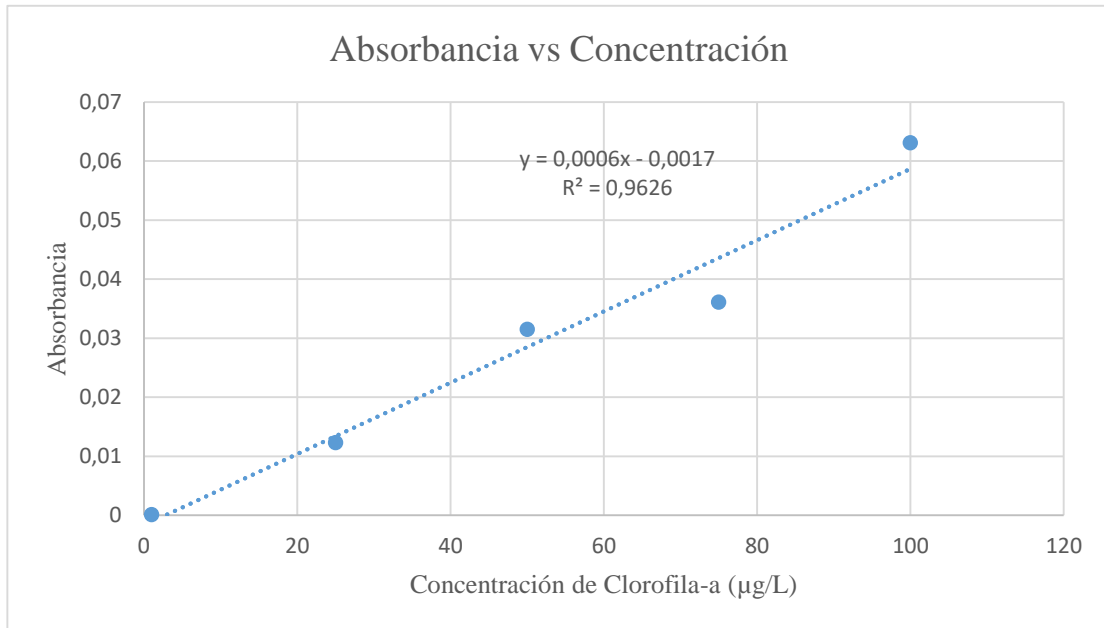
Resta de absorbancias a 665nm y 750nm antes y después de acidificar.

Concentración Clorofila-a ($\mu\text{g/L}$)	^a Absorbancias
1	0,0001
25	0,0123
50	0,0315
75	0,0361
100	0,0631

Nota: Con base a datos obtenidos Microsoft Excel 2016.

^aResta de absorbancias de los promedios en función a cada concentración de Clorofila-a.

Figura 28. Curva de calibración de Clorofila-a sin ajuste.



Fuente: Elaboración propia.

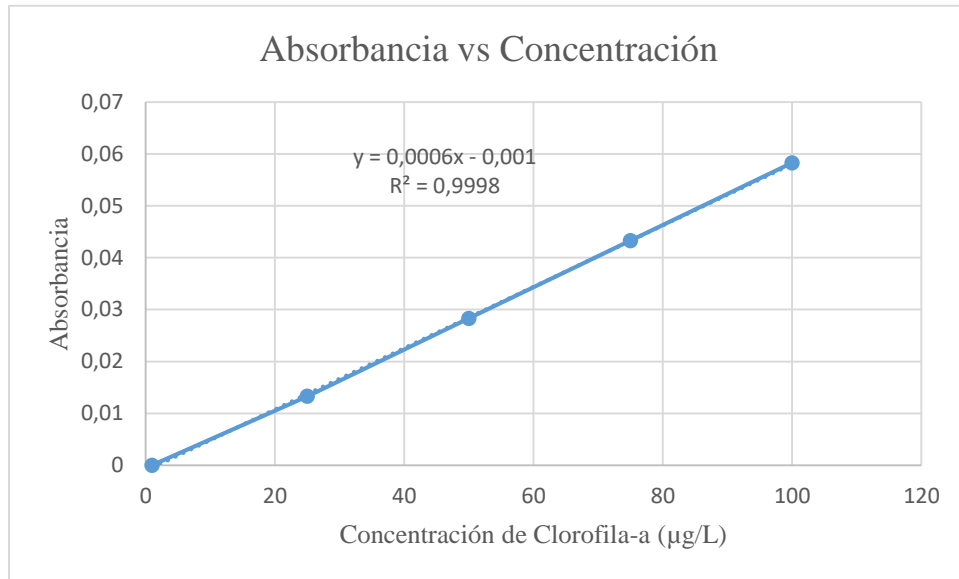
Tabla 12

Resta de absorbancias a 665nm y 750nm antes y después de acidificar.

Concentración Clorofila-a ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancias
1	0,0000
25	0,0133
50	0,0283
75	0,0433
100	0,0583

Fuente: Elaboración propia.

Figura 29. Curva de calibración de Clorofila-a con ajuste.



Fuente: Elaboración propia.

Cálculo de la concentración de Clorofila-a laguna Charani por:

$$\text{Abs}_{\text{Laguna}} = [A_{665} - A_{750}] \text{ (antes de acidificar)} - [A_{665} - A_{750}] \text{ (después de acidificar)}$$

$$\text{Abs}_{\text{Laguna}} = (0,0149 - 0,0110) - (0,0102 - 0,0091)$$

$$\text{Abs}_{\text{Laguna}} = 0,0028$$

Por la ecuación de la recta: $y = 0,0006x - 0,0017$

$$\text{Abs}_{\text{Laguna}} = 0,0006[\text{Chl-a}] - 0,0017$$

$$[\text{Chl-a}] = \frac{0,0028 + 0,0017}{0,0006} = 7,5 \mu\text{g/L}$$

El resultado obtenido de la concentración de Clorofila-a en la laguna Charani de $7,5 \mu\text{g/L}$ es verdadero, ya que se realizó la resta de absorbancias a 665nm y 750nm antes y después de acidificar la muestra según la norma ISO 10260:1992. En este sentido indica que esta en un estado mesotrófico, según los valores de clasificación trófica del comité de Eutrofización de la

Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE), (ver p. 27). Es decir que en la laguna sus niveles de materia orgánica son intermedias.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.2. Conclusiones

De acuerdo al desarrollo y resultados obtenidos en el Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO del trabajo dirigido sobre la determinación de Clorofila-a en agua superficial utilizando extracto de espinaca por Espectrofotometría región visible se puede mencionar las siguientes conclusiones:

- ✓ Se realizó la extracción y determinación de Clorofila-a de espinaca con la operacionalización, ajuste según la norma ISO 10260:1992 obteniendo resultados de concentración por dilución progresiva.
- ✓ Según lo que establece la norma ISO 10260:1992 se estandarizó el método para determinar Clorofila-a en agua superficial. Por otro lado, se logró determinar concentraciones de Clorofila-a en: 1 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L, 75 µg/L, 100 µg/L con la estandarización respectiva.
- ✓ Se estableció la operatividad de trabajo en muestra de agua superficial de la laguna Charani comunidad Marquirivi zona Anari del municipio de Achocalla dando como resultado en concentración de Clorofila-a de 7,5 µg/L, sin embargo, se debe ejecutar el método con mucha precisión para no registrar un desvío en el coeficiente de correlación. Por otro lado, el dato obtenido de la laguna Charani indica que se encuentra en un estado mesotrófico, es decir está en un nivel intermedio de productividad ya que son lagunas comúnmente de aguas claras y lechos de plantas acuáticas sumergidas con niveles medios de nutrientes.

5.3. Recomendaciones

- ✓ Se recomienda tener mucho cuidado con la operatividad de trabajo en cuanto al tiempo, luz y oxígeno para evitar errores en la determinación de Clorofila-a, trabajar con luz tenue.
- ✓ Continuar el presente trabajo utilizando un estándar primario de Clorofila-a para su respectiva validación por Espectrofotometría región visible con los parámetros de desempeño respectivamente.
- ✓ Realizar una valoración adecuada con un muestreo representativo en cinco puntos diferentes de la laguna Charani a diferentes estaciones del año ya que se realizó un solo muestreo debido a las restricciones sanitarias del Covid-19.

BIBLIOGRAFÍA

- Arrigo, K.R. (2005). “*Marine microorganisms and global nutrient cycles*”. Narute. p.349-355
- Axler R. P. & Owen C. J. (1994). Measuring chlorophyll and phaeophytin: ¿Whom should you believe? *Lake and Reservoir Management* **8**(2): 143-151.
- Bellido, J. (2019). *Análisis espacio-temporal del comportamiento de la clorofila a mediante imágenes satelitales en la represa aguada blanca para el año 2017*. Arequipa, Perú.
- Bianchi, S.T., y Ragnar, E. (2000). Desglose de pigmentos de fitoplancton en sedimentos bálticos: efectos de la anoxia y pérdida de macrofauna que se alimenta de depósitos. *Revista de biología, ecología y marina experimental*. p. 161-183
- Brock, M. Martinko, J.M. Parker, J. (2005). “*Biología de los microorganismos*”. 10ª edición. Pearson. Prentice Hall.
- Callisaya, D. (2018). *Análisis de la clorofila-a en el agua con técnicas de teledetección en el lago Titicaca (lago menor)*. La Paz, Bolivia.
- Casas, J. (2014). *Fitoplancton*. Recuperado de: <https://cienciaybiologia.com/fitoplancton>
- Clesceri, L. Greenberg, A. y Trussell, R. (2018). *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Calvo, M. (s.f.). *Bioquímica de los alimentos*. Recuperado de: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/pigmentos/clorofila.html>
- Cubas, P. (2008). *Algas Eucariota*. [Archivo PDF]. Recuperado de: https://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas/4_Algas_texto.pdf

- Curtis, H, Schnek, A, & Massarini, A. (2008). Curtis. Biología. En H. Curtis, A. Schnek, & A. Massarini, *Curtis. Biología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Díaz, N. Bárcena A. Fernández, E. Galván A. Jorrín J. Peinado, J. Melendez, F. & Túnez I. (s.f.). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación de biomoléculas. Córdoba.
- Escobar E., Alcocer J., Aguirre R., Carmona J., & Osquera L. (2003). “*Variación de la concentración de Clorofila-a en aguas oceánicas y sedimento del mar profundo en el golfo de México*”. México.
- Espinosa, T, & Rodríguez, C. (2016). Nota técnica: Determinación del índice de calidad del agua (ICA), de los ríos Moron y Patanemo del Estado Carabobo, en Venezuela.
- Fernández, T. (2010). Propiedades y beneficios de la clorofila. Recuperado de:
<https://www.vix.com/es/imj/salud/2010/04/19/propiedades-y-beneficios-de-la-clorofila>.
- Gregor, J. & Mersálek, B. (2004). “Freshwater Phytoplankton Quantification by Chlorophyll a: A Comparative Study of *in vitro*, *in vivo* and *in situ* Methods”. *Water Res.* Vol. 38. p. 517-522.”
- Guzman, P. Atkinson, P. Dash, J. y Rioja, N. (2015). *Variación espacio-temporal de la concentración de clorofila en manglares utilizando Landsat 8. Teledetección Sensores remotos*.
- Hernández, M. (1999). “*Tratado de nutrición. Madrid*”. España. 1496p.
- Hernández, R. Fernández, C. y Baptista, M. (2014). *Metodología de la Investigación*. México D.F.: McGRAW-HILL
- Hernández, P. (2016). “Concentración y distribución vertical de la Clorofila-a fitoplanctónica de los lagos de Montebello, Chiapas, México”. México, D.F.

- Inclan, B. Alberto, L. Ortiz, T. Cecilia, A. (2014). *Experiencias en la Determinación de Clorofila-a y Feopigmentos por Espectrofotometría*.
- ISO 10260 (Internacional Organization for Standardization), (1992). Water quality - Measurement of biochemical Parameters - Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration.
- Kalamani, P. & Mayta, P. (2021). “Potencial del agroturismo en el municipio de Achocalla”. Bolivia, La Paz.
- Koolman, J. & Röhm, K.-H. (2005). Bioquímica: texto y atlas. Ed. Médica Panamericana. p.129-130.
- López, J. Manzano, M. Hurtado, M. Piña, P. Hernández, O. Guzón, O. y Hernández, F. (2016). *Fitoplancton: pequeños centinelas del océano*.
- Martin, J. & Castañeda, J. (2016). *Análisis de la clorofila de spinacia oleracea y cuantificación de albumina de espagueti utilizando espectrofotometría. UGCiencia 22, 99-109*.
- Oliveros, OJ. (2014). “Aplicación de Percepción Remota para la Detección de Florecimientos de Algas en Valle de Bravo”. México, D.F.
- Pérez, J. & Grey A. (2017). *Definición de algas*. Recuperado de: <https://definicion.de/algas/>
- Pinto, A Von Sperling, E. Moreira, R. (2001). Chlorophyll-a Determination Via Continuous Measurement of Plankton Fluorescence: Methodology Development. Water
- QuimiNet. (2013, enero). Principales fuentes naturales de clorofila. Recuperado de: <https://www.quiminet.com/articulos/las-principales-fuentes-naturales-de-clorofila-3423480.htm#:~:text=Una%20de%20las%20fuentes%20m%C3%A1s,y%20600%20miligramos%20por%20onza.>

- Ramírez-Mérida, L.G., Zepka, Q.L. y Jacob-Lopes, E. (2014). Microalgas y cianobacterias Aplicación en Medicina. Revista Electrónica PortalesMedicos.com. 9(4):149.
- Rivera, C. Zapata, A. Pinilla, G. Donato, J. Chaparro, B. y Jiménez, P. (2005). *Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico*. [Archivo PDF]. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028577004>
- Rojas, C. (2017). “*Evaluación anual de la productividad primaria y del contenido de Clorofila “a” en el lago cráter, Atexcac, Puebla*”. México, C.D.
- Romero, M. (2010). *Proceso de eutrofización de afluentes y su prevención por medio de tratamiento de efluente*. [Archivo PDF]. Recuperado de:
http://www.fgsalazar.net/LANDIVAR/INGPRIMERO/boletin17/URL_17_AMB02_TRATAMIENTO
- Rothschuh, U. (2022). Que son las aguas superficiales: definición y ejemplos. Recuperado de:
<https://www.ecologiaverde.com/que-son-las-aguas-superficiales-definicion-y-ejemplos-3944.html>
- Rubenson, K.A. & Rubinson, J.F. (2001). “*Análisis Instrumental*”. Madrid, Prentice Hall.
- Ruiz, F-L. Ruiz, J.A. Hernández, J.A. García, J. & Valadez, A. (2019). Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco. México, C.D.
- Skoog, D. Holler, F. y Nieman, T. (2001). “*Principios de Análisis Instrumental*”. 5 a ed. Madrid, McGraw-Hill.

- Solarte, M. Moreno, L. y Melgarejo, L. (2010). Fotosíntesis y pigmentos vegetales, en Experimentos en fisiología vegetal. Colombia.
- Torrez, M. (2012). *Caracterización del sistema de riego de la laguna Charaña (Segundo Lago) zona Anari, de la comunidad Marquirivi del municipio de Achocalla*. La Paz, Bolivia.
- Urrutia, R. (2009). Programa de investigación científica para la restauración de los lagos urbanos de la ciudad de Concepción. Concepción, Chile: Universidad de Concepción, Centro EULA.
- Yupanqui, J. (2012). *Determinación de clorofila a, y ensayos fisicoquímicos en aguas del lago Titicaca*. La Paz, Bolivia.
- Vadillo, G. M. C. (2010). “*Evaluación de la vulnerabilidad a la Eutrofización del embalse de Poechos*”. Piura, Perú.
- Val, J. Heras, L. & Monge, E. (1985). Nuevas ecuaciones para la determinación de pigmentos fotosintéticos en acetona. Recuperado de:
http://digital.csic.es/bitstream/10261/13836/1/ANALES_17_3-4-Nuevas%20ecuaciones.pdf.
- Vollenweider, R.A. & Janus, L.L. (1981).” *Statistical models for predicting hypolimnetic oxygen depletion rates*”. National Water Research Institute. Canada Centre for Inland Waters. Ontario. p.38

Weidner, V. & Hsia, J. (1980). NBS *reflectómetro-espectrofotómetro especular*. *Óptica Aplicada*.
p. 1268-1273

Wetzel, R. G. (1983). *Limnology*. 2nd ed. Saunders College. Publishing, 762 pp.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A

Proceso de determinación de Clorofila-a.

Selección de espinacas.



Fuente: Propia

Peso de la espinaca.



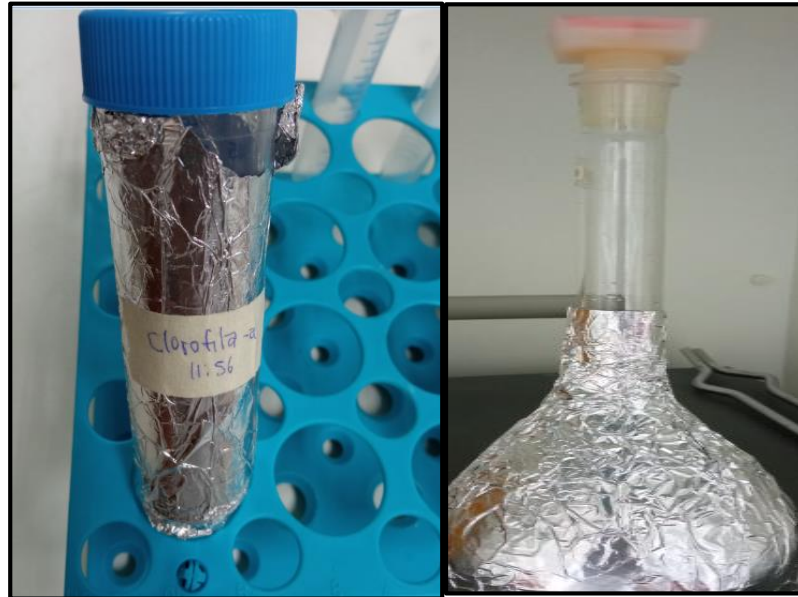
Fuente: Propia

Filtración al vacío.



Fuente: Propia

Material cubierto con papel aluminio.



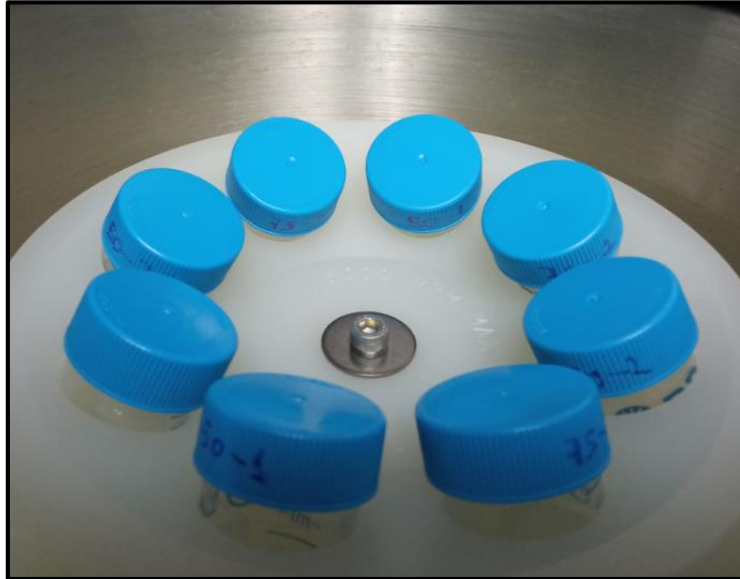
Fuente: Propia

Muestras en baño María a 75 °C.



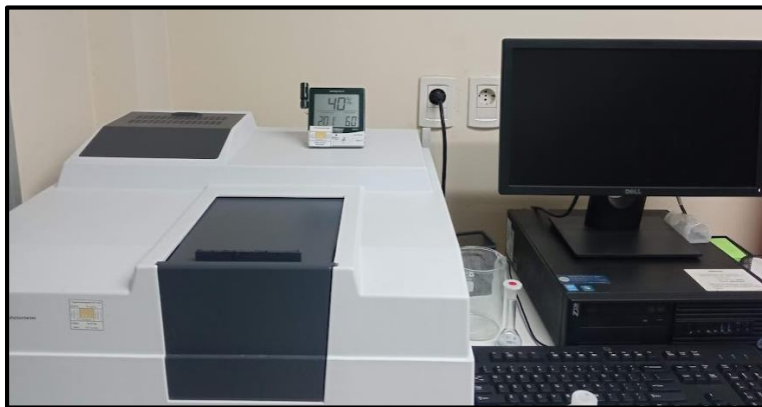
Fuente: Propia

Centrifugación de las muestras.



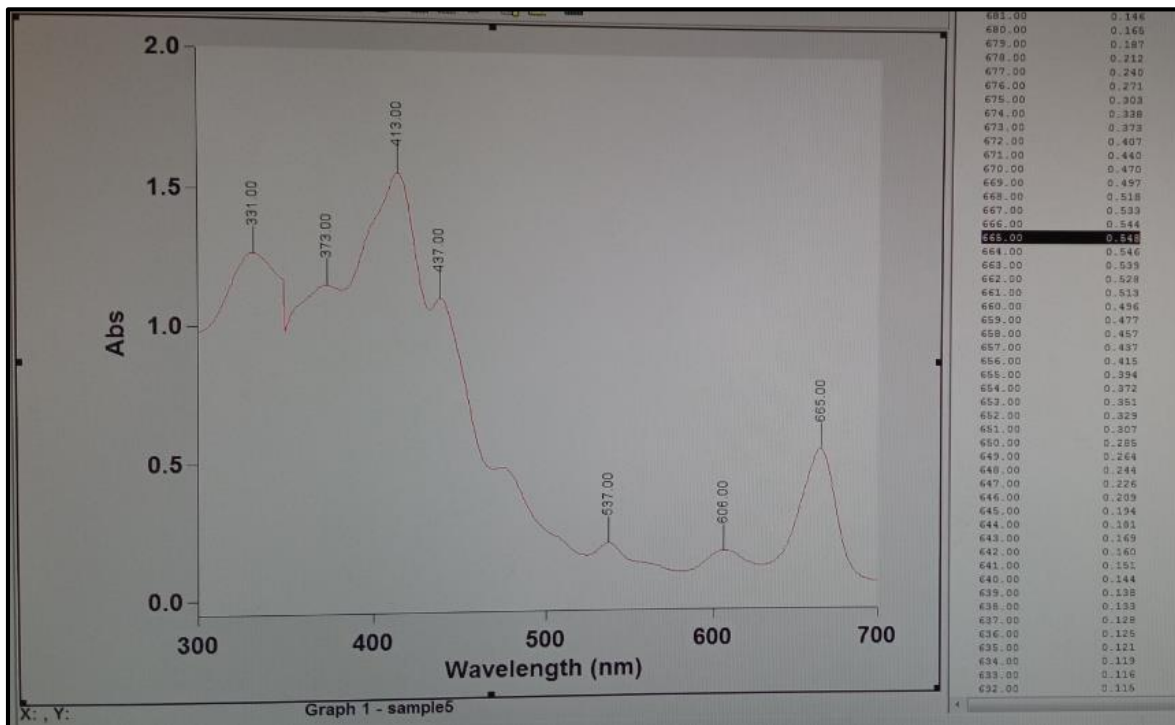
Fuente: Propia

Equipo Espectrofotómetro Ultravioleta Visible.



Fuente: Propia

Barrido espectral de Clorofila-a a 665nm.



Fuente: Propia

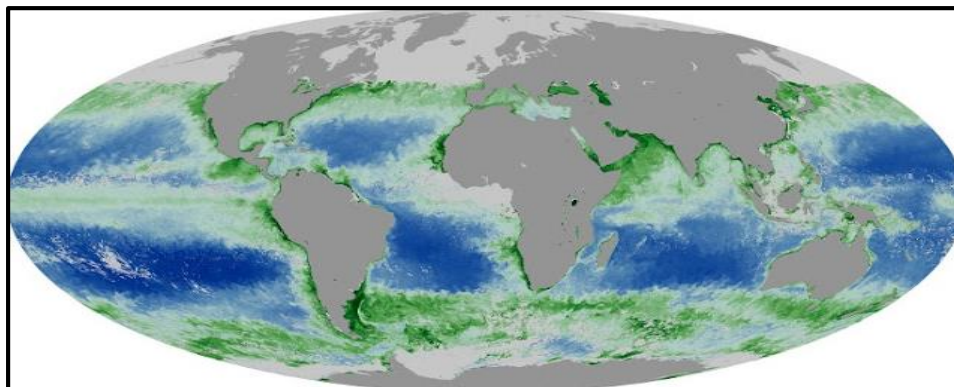
Recolección de muestra de agua superficial laguna Charani.



Fuente: Propia

ANEXO B

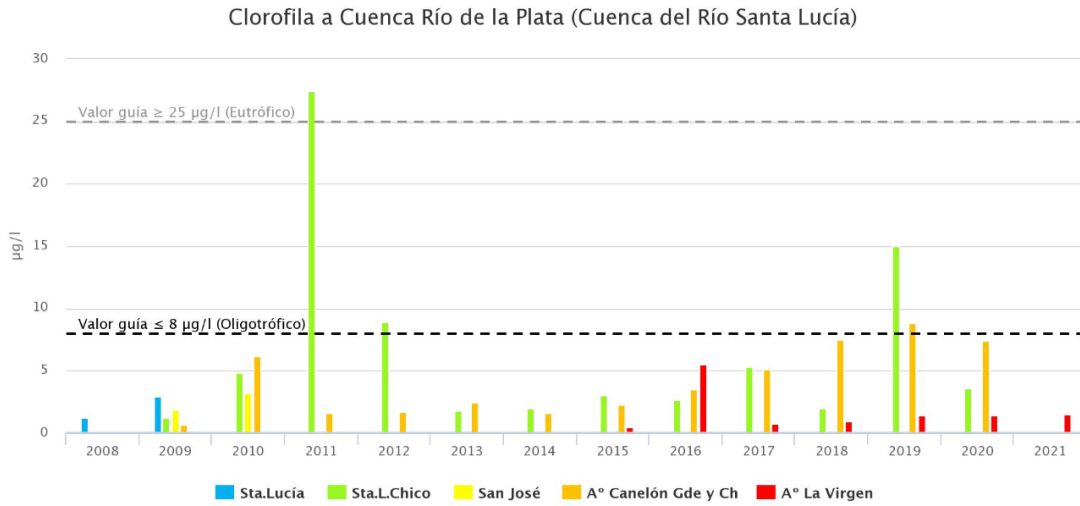
Distribución de Clorofila en los mares y océanos.



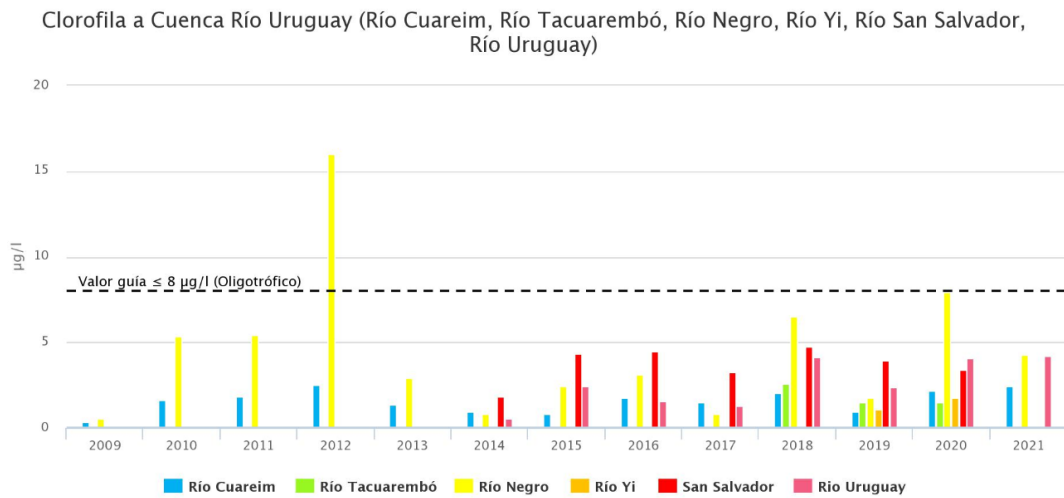
Fuente: NASA Earth Observatory.

Anexo C

Concentración de Clorofila-a en agua superficial.

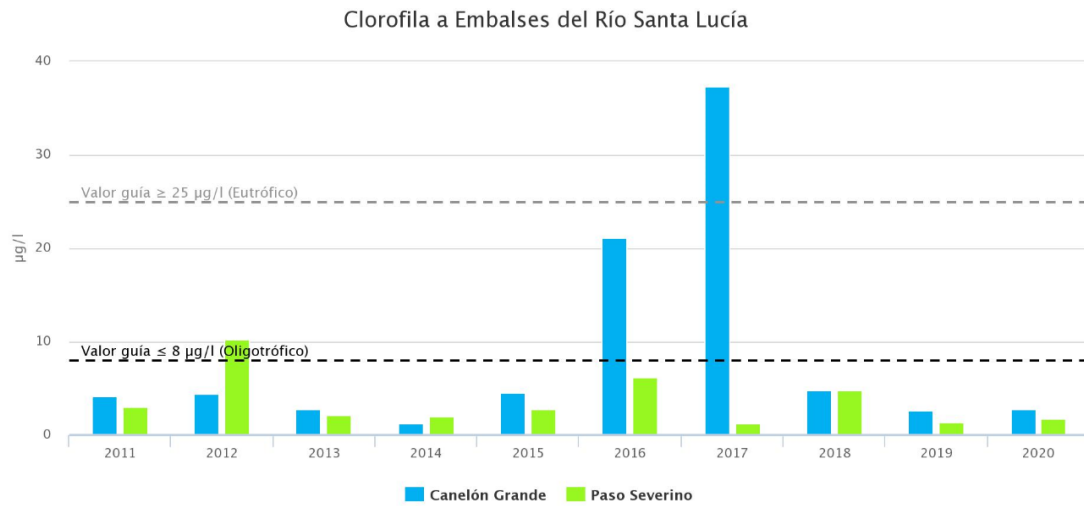


Fuente: MA-DINACEA-División Calidad Ambiental- Departamento de Evaluación Ambiental Integrada (2021).



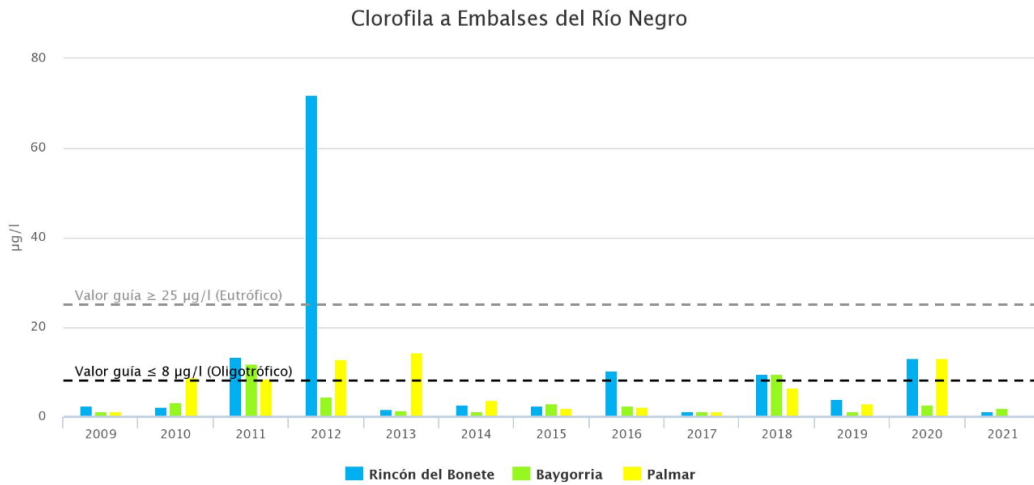
Fuente: MA-DINACEA-División Calidad Ambiental- Departamento de Evaluación Ambiental Integrada (2021).

Concentración de Clorofila-a en agua superficial.



Fuente: MA-DINACEA-División Calidad Ambiental- Departamento de Evaluación Ambiental Integrada (2021).

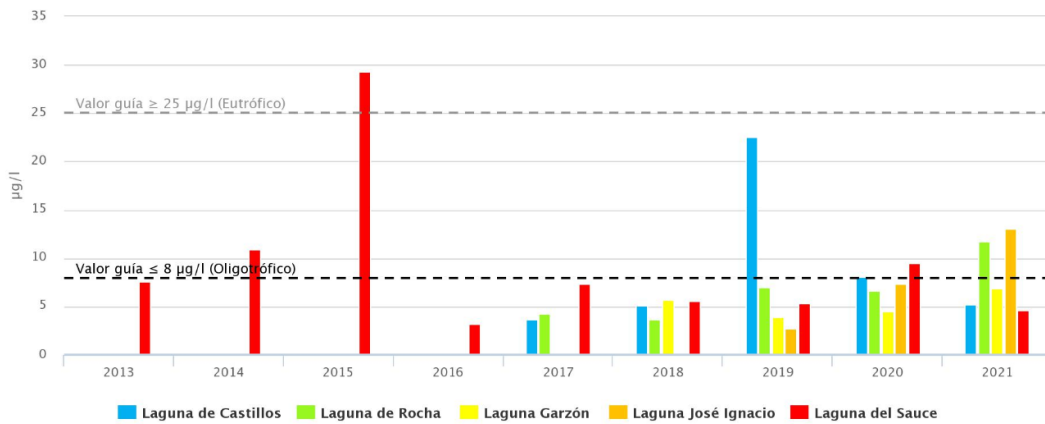
Concentración de Clorofila-a en agua superficial.



Fuente: MA-DINACEA-División Calidad Ambiental- Departamento de Evaluación Ambiental Integrada (2021).

Concentración de Clorofila-a en agua superficial.

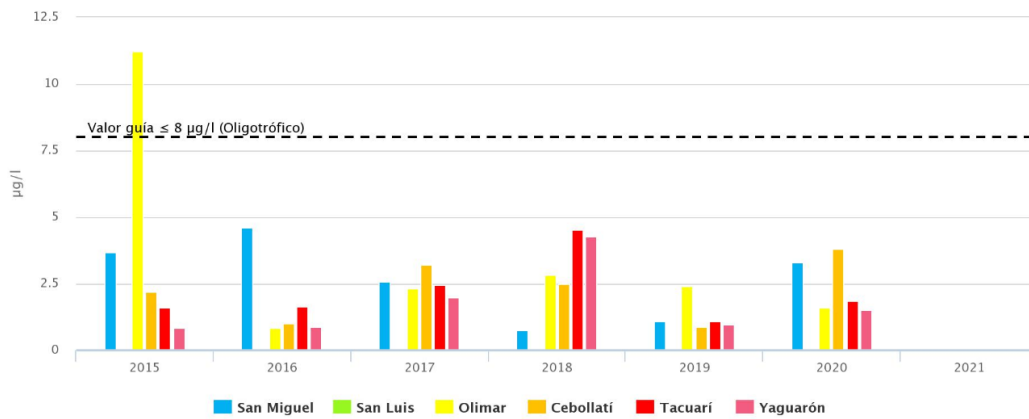
Clorofila a Cuenca del Océano Atlántico (Laguna de Castillos, Laguna de Rocha, Laguna Garzón, Laguna José Ignacio, Laguna del Sauce)



Fuente: MA-DINACEA-División Calidad Ambiental- Departamento de Evaluación Ambiental Integrada (2021).

Concentración de Clorofila-a en agua superficial.

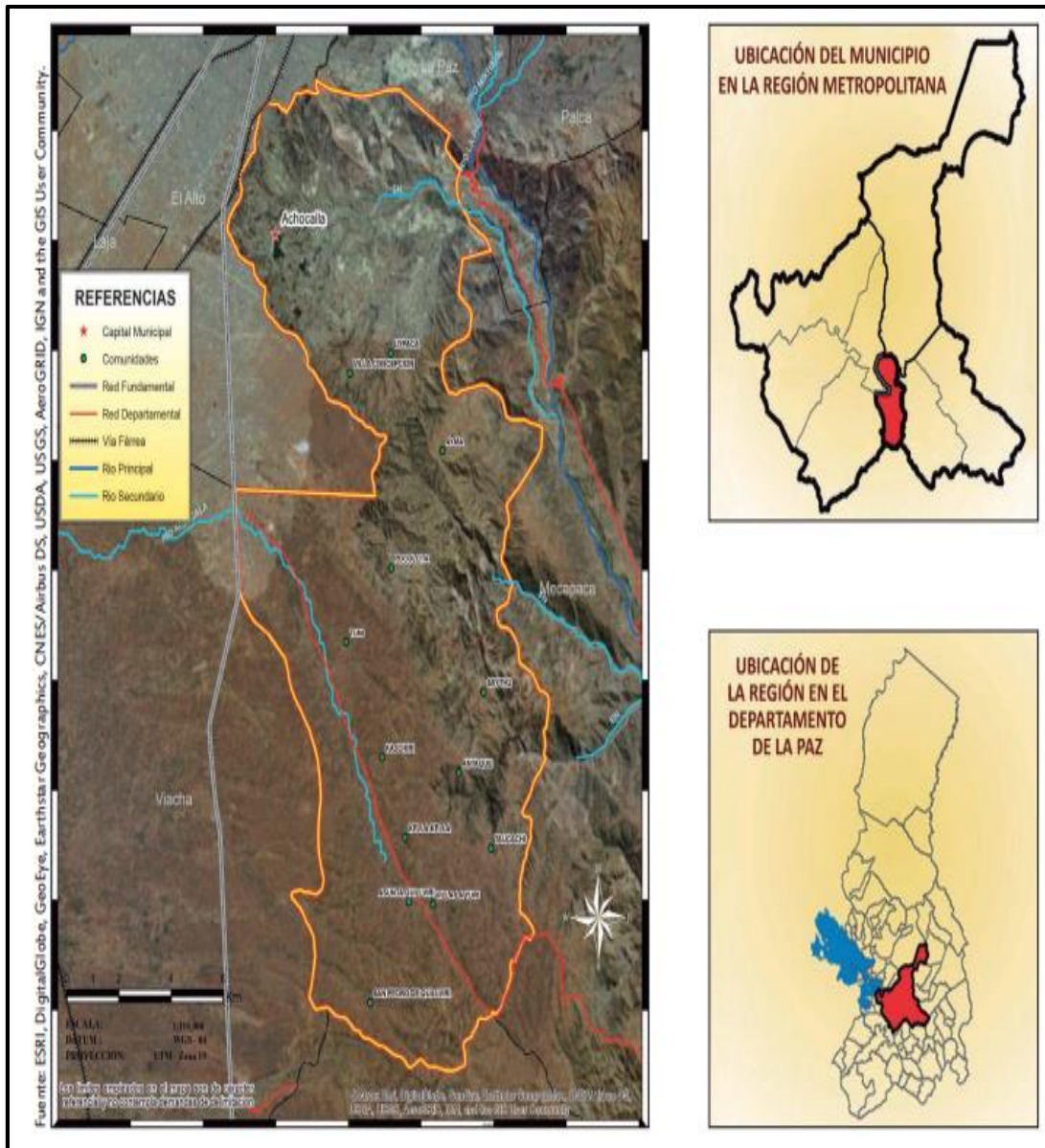
Clorofila a Laguna Merín (Arroyo San Miguel, San Luis, Río Olimar, Río Cebollatí, Río Tacuarí, Río Yaguarón)



Fuente: MA-DINACEA-División Calidad Ambiental- Departamento de Evaluación Ambiental Integrada (2021).

Anexo D

Datos físicos geográficos Municipio de Achocalla.



Fuente: <https://autonomias.gobernacionlapaz.com/sim/municipio-org.php?mn=19>

Anexo E

Datos generales laguna Charani.

Código: 04	ATRACTIVO: LAGUNAS CHARANI	Jerarquía: II
-------------------	-----------------------------------	----------------------

Categoría : 1	SITIOS NATURALES
Tipo : 1.4	LAGOS
Subtipo : 1.4.2	LAGUNAS

UBICACIÓN:

Departamento: La Paz	Provincia: Murillo
Municipio: ACHOCALLA	Sitio de Referencia: COMUNIDAD MARQUIRIVI
Coordenadas: 595283 E- 8160461 S	
Altitud : 3934 m.s.n.m	Distancia Km. desde La Paz: 32 Km

HOSPEDAJE

Tipo	Existencia	Existencia Población Cercana	Cant	Calidad	Cap. Hab.
Alojamiento	Si	Comunidad Pacajes	4	Regular	20
Hotel	No			Regular	
Otros	No				
Posada	Si	Comunidad Pacajes	1	Regular	18
Residencial	Si	Comunidad Pacajes	2	Regular	15

ALIMENTACION

Tipo	Existencia	Existencia Población Cercana	Cantidad	Calidad	Cap Sillas	Cap. Mesas
Cafetería	Si	Comunidad Pacajes	15	Regular	24	10
Comedor Popular	No					
Pensión	Si	Comunidad Pacajes	26	Regular	35	20
Restaurante	Si	Comunidad Pacajes	10	Regular	30	19
Tiendas/Abar	Si	Comunidad Pacajes	28	Regular	15	10

ACCESIBILIDAD

Punto de Partida	Punto de Llegada	Tipo de Via	Calidad	Distancia (Km)	Tiempo (hr)
La Paz-Plaza Murillo Km 0	Ceja de El Alto	Pavimento	Buena	15Km	45Min
Ceja de El Alto	Achocalla	Carretera asfaltada/Tierra	Regular	15 Km	1Hr
Entrada Achocalla	Comandad Marquirivi	Carretera asfaltada/Tierra/empedrado	Regular	1 Km	10 Min

TRANSPORTE

Tipo	Calidad	Frecuencia	Observaciones
Minibús	Regular	Permanente	Salen cada 5 minutos
Taxi	Regular	Permanente	Salen cada 10 a 15 minutos
Bus		0	No existe
Camión		0	No existe
FFCC		0	No existe

DATOS CLIMATOLÓGICOS

Temperatura:	Min 7° y Max 12° c
Humedad relativa	40 - 62
Precipitación Pluvial	250mm

SERVICIOS BÁSICOS

Tipo de Servicio	Existencia	Tipo de Provisión
Agua Potable	Si	Red pública.
Alcantarillado	Si	Red pública parcial, cámaras sépticas
Instalado eléctrico	Si	Red Pública
Atención Médica	Si.	La comunidad de Uyypaca cuenta con un centro de salud
Estación de servicio y gasolina	Si.	La comunidad Pacajes cuenta con una estación de gasolinera
Cambio de moneda	No	

DATOS POBLACIONALES

N° Habitantes:	2671
Grupo étnico:	Aymara
Idiomas:	Aymara-Castellano
Ocupación Principal:	Agríc. / Pro. lechera

COMUNICACIÓN

Tipo	Existencia	Observaciones
Celular	Si	ENTEL, TIGO, VIVA
Internet	Si	LÍNEAS DE RED INALÁMBRICAS PRESTAN SERVICIO DE INTERNET DISPONIBLE. RADIO NACIONALES Y DEPARTAMENTALES CON SEÑAL Y AUDIO MUY NITIDO EN TODO EL MUNICIPIO. ENTRE LAS RADIOEMISORAS LOCALES SE ENCUENTRAN: RADIO "ACHOCALLA" FRECUENCIA DE 1.240 EN AMPLITUD MEDIA Y RADIO "PANORAMA" EN FRECUENCIA DE 1.320 AM.
Radio	Si	
Teléfono	Si	COTEL (Cooperativa de teléfonos automáticos La Paz)

Fuente: Kalamani, Mayta (2021).

Anexo F

Sector agrícola municipio de Achocalla.

Cultivos agrupados por Rubro					Principales cultivos		
RUBRO	SUPERFICIE (Ha)	SUPERFICIE %	VOLUMEN (TM)	VOLUMEN %	CULTIVO	SUPERFICIE (Ha)	VOLUMEN (TM)
TOTAL MUNICIPIO	2.373	100 %	5.950	100 %	TOTAL	2.373	5.950
Tubérculos y raíces	786	33 %	3.794	64 %	Papa	776	3.773
Forrajes	727	31 %	93	2 %	Avena	416	1.102
Cereales	551	23 %	1.270	21 %	Cebada forrajera	143	283
Hortalizas	146	6 %	492	8 %	Alfalfa	137	93
Otros	163	7 %	300	5 %	Otros	901	700

Fuente: <https://autonomias.gobernacionlapaz.com/sim/municipio-org.php?mn=19>

Sector pecuario.

DETALLE	NRO. CABEZAS	%
TOTAL	20.546	100 %
Ovinos	7.571	37 %
Cuyes	5.518	27 %
Bovinos	3.387	16 %
Porcinos de corral	2.789	14 %
Asnos	483	2 %
Otros	798	4 %

Fuente: <https://autonomias.gobernacionlapaz.com/sim/municipio-org.php?mn=19>

Sector avícola.

DETALLE	NRO.	%
TOTAL	11.427	100 %
Aves de granja	8.206	72 %
Aves de corral	3.221	28 %

Fuente: <https://autonomias.gobernacionlapaz.com/sim/municipio-org.php?mn=19>

Anexo G

Norma ISO 10260:1992

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
10260

First edition
1992-07-15

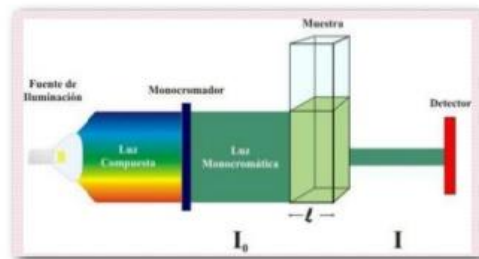
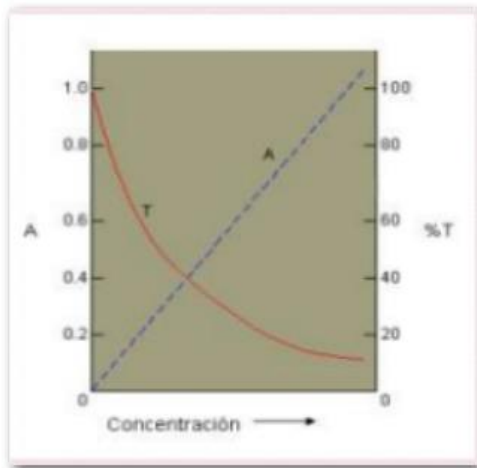
**Water quality — Measurement of biochemical
parameters — Spectrometric determination of
the chlorophyll-a concentration**

*Qualité de l'eau — Mesurage des paramètres biochimiques — Dosage
spectrométrique de la chlorophylle a*



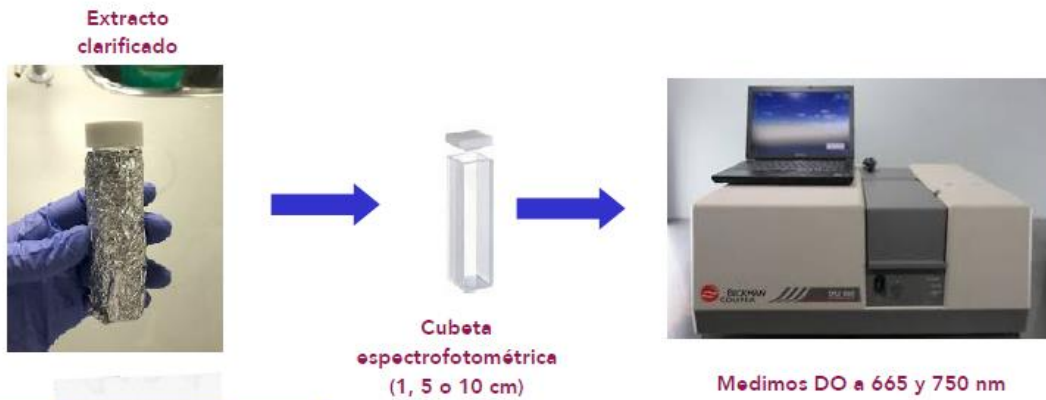
Reference number
ISO 10260:1992(E)

METODOLOGÍA: Norma ISO 10260:1992
 Rango de Absorbancia a 665nm: 0,01 - 0,8
 Solvente de extracción: Etanol 90%



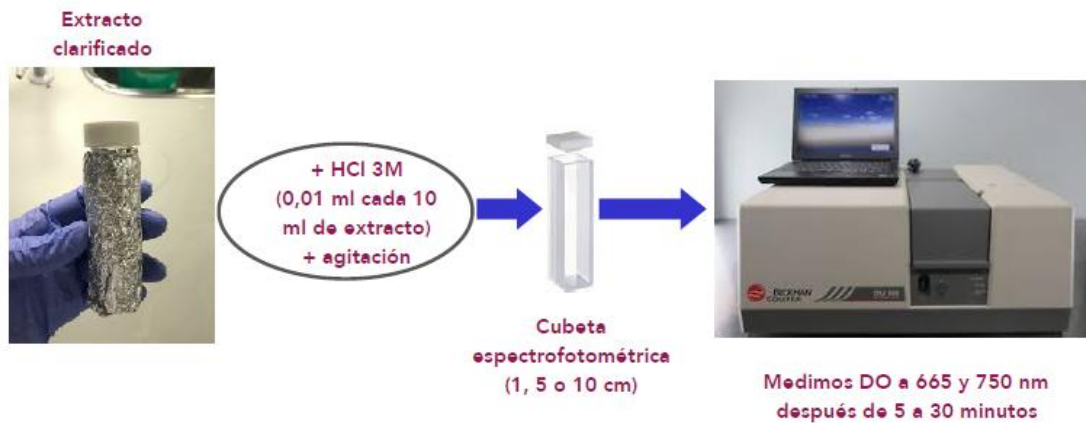
Absorbancia
 Medida de la cantidad de luz
 absorbida por las muestra
 $A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$

METODOLOGÍA: Norma ISO 10260:1992



Es importante acidificar porque la clorofila-a puede ser sobreestimada incluyendo a los feopigmentos, que absorben cerca de la misma longitud de onda que Clorofila-a

METODOLOGÍA: Norma ISO 10260:1992



METODOLOGÍA: Norma ISO 10260:1992

$$Chla \left(\frac{\mu g}{l} \right) = \frac{(OD_{665} - OD_{750})_{ANTES} - (OD_{665} - OD_{750})_{DESPUES}}{K_{Chla}} * \frac{R}{R - 1} * \frac{10^4 * V_{extr}}{V_{filt} * d}$$

$(OD_{665} - OD_{750})_{ANTES}$ = absorción del extracto antes de acidificar

$(OD_{665} - OD_{750})_{DESPUES}$ = absorción del extracto después de acidificar

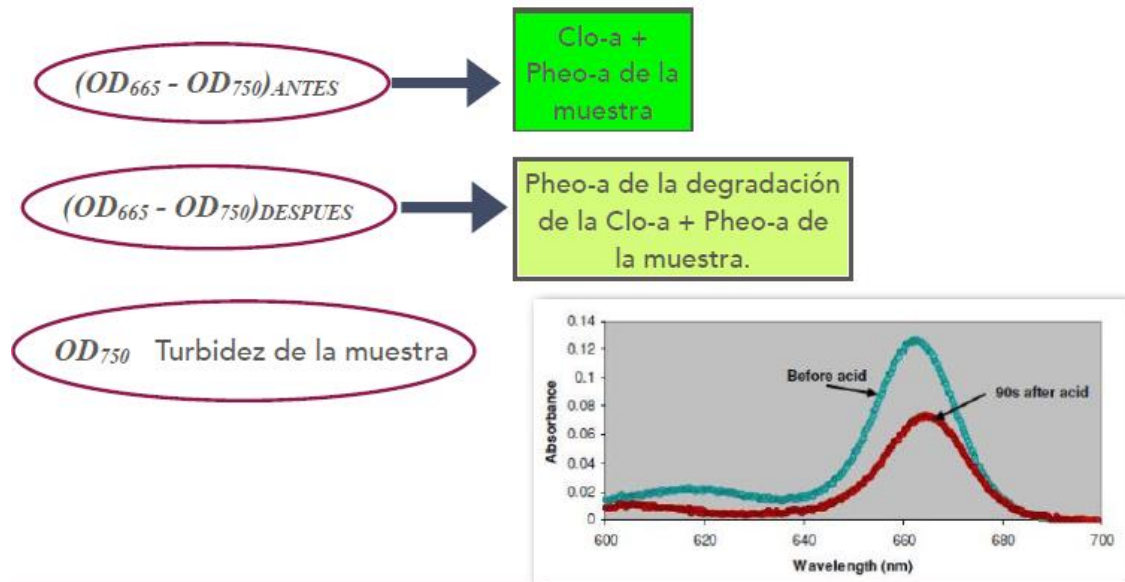
$K_{Chla} = 82 \text{ l} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}$, coeficiente específico de absorción de la clorofila-a en etanol a 665nm

R = Relación de A/A_a de una solución de clorofila pura que transformada a feofitina por acidificación

V_{extr} = Volumen de muestra filtrado (ml)

V_{filt} = Volumen de muestra filtrado (l)

d = distancia del camino óptico de la cubeta (cm)





CERTIFICADO DE PASANTÍA

IBMETRO-DMIC-CP-002/21

El Instituto Boliviano de Metrología certifica que,

Sr. Hebert Zegarrundo Zarate

*Institución: Facultad de Tecnología
Universidad Mayor de San Andrés*

*Ha realizado prácticas profesionales en la
Dirección de Metrología Industrial y Científica -
DMIC, de IBMETRO*

desde el 5 de octubre 2020 hasta el 5 de abril de 2021

La Paz, 09 de abril de 2021



Lic. Marco Quino Huasco
Supervisor Metrología Química
DMIC - IBMETRO



CERTIFICADO

El Instituto Boliviano de Metrología – IBMETRO, certifica que desde el 5 de octubre 2020 hasta el 5 de abril de 2021, el estudiante HEBERT ZEGARRUNDO ZARATE ha realizado las prácticas universitarias en la Dirección de Metrología Industrial y Científica de IBMETRO, exigidas por su carrera profesional

La capacitación brindada al estudiante fue en los siguientes temas:

- Sistema Internacional de Unidades
- Utilización del Vocabulario Internacional de Metrología

En cuanto a la parte práctica el estudiante mostro un excelente desempeño en apoyo a las siguientes actividades en la Unidad de Metrología Química:

- Prácticas de Laboratorio en calibración de instrumentos de medición.
- Recepción y despacho de instrumentos.
- Manejo de certificados de calibración y documentación del Laboratorio de Química.
- Apoyo en la Preparación y caracterización de Material de Referencia.
- Apoyo logístico en Ensayos de Aptitud.
- Apoyo en análisis químico matriz: Cemento
- Análisis de parámetros proximales en matrices alimentarias.
- Apoyo en la cuantificación de clorofila-a en agua por Espectrofotometría UV-Visible como parte del proyecto regional "Medidas exactas de clorofila, fósforo y oxígeno disuelto en diferentes medios acuáticos para la evaluación del monitoreo de la biodiversidad".

El tiempo total de la práctica fue de 6 meses

El estudiante ha mostrado una gran responsabilidad y empeño en las tareas que le fueron encomendadas, demostrando permanentemente iniciativa, diligencia y seriedad, lo que respalda su formación académica.

La Paz, 09 de abril de 2021

