

LA LUTEÍNA COMO MARCADOR DE PROCEDENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL ESTUARIO DEL RÍO PALMONES (BAHÍA DE ALGECIRAS)

M^a Ángeles Arrojo Agudo / Dep. Ecología y Geología, Fac. de Ciencias, Universidad de Málaga.

Carlos Jiménez / Dep. Ecología y Geología, Fac. de Ciencias, Universidad de Málaga.

F. Xavier Niell Castanera / Dep. Ecología y Geología, Fac. de Ciencias, Universidad de Málaga.

RESUMEN

Se realizó un estudio en el estuario del río Palmones para determinar el uso del pigmento luteína como indicador de materia orgánica en el sedimento procedente de rodófitas, clorofitas o plantas vasculares. Se analizó el contenido de materia orgánica, clorofila *a* y luteína en el sedimento. Los valores del índice luteína / clorofila *a* se encuentran en el intervalo 0,007- 1,57 siendo más altos que los que se presentan en aguas oceánicas e incluso, en algunas muestras, más elevados que los presentes en el plancton. Las variaciones obtenidas en las distintas estaciones muestreadas se debieron a la desaparición de los pigmentos por el efecto del lavado por las corrientes en algunas estaciones y en otros casos por la descomposición ellos. Los valores similares en la tasa de degradación de materia orgánica y luteína (17,2 y 20% anual respectivamente) permite utilizar la luteína como indicador cualitativo de la materia orgánica en el sedimento que tiene su origen en rodófitas, clorofilas o plantas vasculares.

Palabras claves: luteína, sedimento, marcador

	Cyanophyta	Prochlorophyta	Glaucophyta	Rhodophyta	Heterokontophyta /Chrysophyceae	Heterokontophyta /Xanthophyceae	Heterokontophyta /Eustigmatophyceae	Heterokontophytaq/ Bacillariophyceae	Heterokontophyta /Raphidophyceae	Heterokontophyta /Dictyochophyceae	Heterokontophyta /Phaeophyceae	Haptophyta	Cryptophyta	Dinophyta I	Dinophyta II	Euglenophyta	Chlorarachniophyta	Chloriophyta
Clorofilas																		
Clorofila a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Clorofila b		*														*	*	*
Clorofila c ₁					*	+		*	*		*	*			*			+
Clorofila c ₂					*	+		*	*	*	*	*	*	*	*			+
Clorofila c ₃					±			*			*							+
Carotenoides																		
α-caroteno				*	+							+	*		+			±
β-caroteno	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	±	*	*	*		*
γ-caroteno																±		±
ε-caroteno					+		+				+		±					
Xantofilas																		
Zeaxantina	*	*	*	*	+		±		+		±		+			±		+
Myxoxantina	*																	
Oscilaxantina	*																	
β-criptoxantina	+	+	+	±		±	±									±		±
Luteína	■	■	■	+	■	■	■	■	■	+	■	■	■	■	■	■	+	*
Anteroxantina				±	+		+				+							+
Violoxantina				±	+		*		+		*						+	*
Fucoxantina					*		*	*	*	*	*	*			*			
Diatoxantina					+	*	*	*	+	+	*				*	±		
Diadinoxantina					+	*	*	*	+	+	*			*	*	+		
Alloxantina												*						
Piridinina														*				
Neoxantina					+	+	+	+	+		+					*	+	*
Ficobilinas																		
Ficocianina	*		*	*									*					
Aloficocianina	*		*	*														
Ficoeritrina	*		*	*								*						
Ficobilisomas	*		*	*														

* Pigmento importante + Pigmento presente ± Pigmento que aparece raramente o en poca cantidad
 Dinofita I: Dinofita normal Dinofita II: Dinofita con endosimbiosis

Tabla I.- Distribución de pigmentos en las algas (van den Hoek, 1995).

INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de pigmentos vegetales que se pueden agrupar en grandes grupos: clorofilas, ficobilinas y carotenoides.

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides liposolubles presentes en todos los organismos fotosintéticos cuyo color va del amarillo al rojo. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y se han identificado más de 630 diferentes. Por su naturaleza química se pueden dividir en dos grandes grupos, los carotenos (hidrocarbonatos cíclicos o acíclicos) y las xantofilas (derivados oxigenados de los carotenos). Entre los carotenos está el β -caroteno y entre las xantofilas más importantes tenemos la zeaxantina, luteína, cantaxantina y astaxantina (Lotan y Hirschberg, 1995) así como la violoxantina, fucoxantina y diatomoxantina.

Existe una cierta especificidad de entre pigmentos y grupo vegetal (tabla I), lo que ha favorecido que se utilicen estos pigmentos como marcadores específicos, tanto en la columna de agua como en sedimentos recientes e incluso en estudios de cambios históricos en la producción del fitoplancton así como las asociaciones que se dieron (Sanger, 1988; Millie *et al.*, 1993; Leavitt y Hodgson, 2001).

Los sedimentos de la costa y los estuarios contienen materia orgánica tanto terrestre como acuática (Ertel y Hedger, 1985; Hedger *et al.*, 1988). Los pigmentos vegetales contenidos en ellos pueden usarse para reflejar estas diferentes fuentes de entrada (Watts *et al.*, 1975; Bianchi y Findlay, 1990). La utilidad de los pigmentos como trazadores de fuentes de materia orgánica va a depender, de una manera importante, de la magnitud de las entradas, sus índices de descomposición y la especificidad de la fuente en particular (Repeta, 1989; Bianchi y Findlay, 1991; Sun *et al.*, 1991).

La luteína se encuentra en cantidades apreciables exclusivamente en las plantas verdes, pero hasta el momento, no se ha utilizado como marcador de entrada de materia orgánica en el sedimento que tenga esta procedencia, por lo que en este trabajo, se ha abordado la tarea de usar este pigmento con este fin en el estuario del río Palmones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Zona de estudio

El estuario del río Palmones se localiza en la costa sur de España (bahía de Algeciras, 36° 10' N, 5° 27' W) en el término municipal de Los Barrios (Cádiz), al final de una cuenca de pequeño tamaño de 302 km². Tiene una longitud aproximada de 5,5 km. Comprende desde la desembocadura hasta el azud de CELUPAL, aguas arriba del puente de la carretera N-340 y del paso de la vía férrea. Su anchura aproximada es de 0,5 km. El río discurre por un canal principal muy sinuoso, formando varios meandros de diferente curvatura desde la

desembocadura hasta el azud, propio de los tramos bajos de los ríos con pendiente del cauce casi nula (0,1%). La anchura media del canal es de 75 metros, aunque en la zona cercana a su desembocadura puede llegar a alcanzar los 130 m en contraposición a los 45 m de la zona fluvial del estuario. Es un estuario poco profundo, con una profundidad máxima de 3,5 m y una profundidad media de 1,5 m en marea baja. Se clasifica como bien mezclado (Clavero *et al.*, 1997a). En el margen derecho de la desembocadura se presenta una flecha arenosa; a sus espaldas se sitúa la marisma de Palmones, espacio de 58 hectáreas surcado por canales secundarios (canchones) encargados de drenar las aguas de pleamar hacia en el cauce principal. Esta orilla se encuentra también urbanizada hasta la playa. En el margen izquierdo, casi en la orilla del río, se encuentra la pedanía de Palmones.

El estuario del río Palmones se encuentra sometido a movimientos de mareas que tienen un máximo de amplitud de 2 m, emergiendo durante la marea baja, amplias zonas de lodo.

Toma de muestras, manipulación y técnicas analíticas

Para la toma de muestras se establecieron siete estaciones (figura 1) cuyas características figuran en la tabla II:

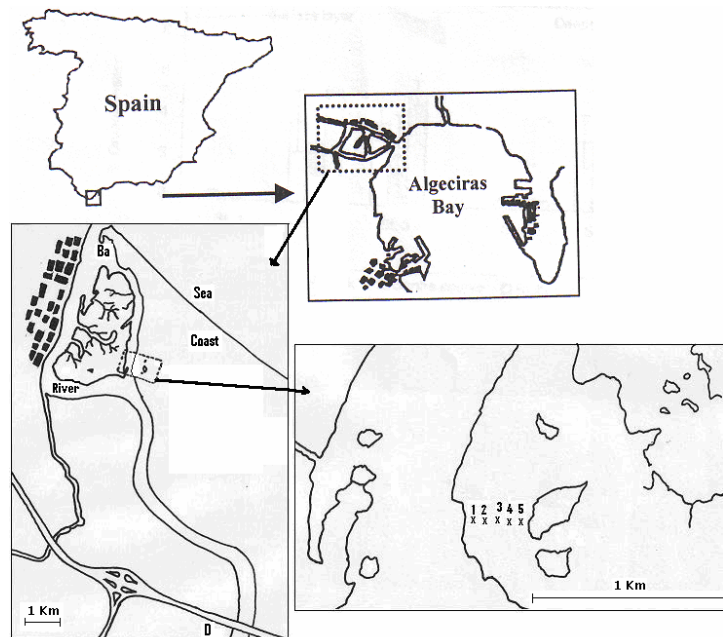


Figura 1.- Situación de la zona de muestreo

Estación	Coordenadas UTM		Altura sobre el nivel 0 se marea (cm)	Sustrato	Vegetación
	X	Y			
Presa (Pr)	0279445,07	4006436,06	0	Fango	<i>Juncus maritimus</i>
Barra (Ba)	0281306,08	4005951,15	0	Arena	Sin vegetation
1	0280581,09	4005767,33	0	Fango	Sin vegetation
2	0280582,28	4005764,17	45	Fango	<i>Halimiones portulacoide</i> <i>Sarcocornia fruticosa</i>
3	0280583,47	4005759,81	60	Fango	<i>Sarcocornia fruticosa</i>
4	0280585,06	4005755,05	50	Fango	<i>Sarcocornia fruticosa</i>
5	0280586,64	4005750,07	45	Fango	<i>Sarcocornia fruticosa</i> <i>Sarcocornia perennis</i> <i>subsp. alpini</i>

Tabla II.- Características de las estaciones de muestreo.

Las muestras se tomaron en marea baja. Para ello se introdujo, a mano en el sedimento, cilindros de 4,5 cm de diámetro y 20 cm de longitud para extraer cores de 7 a 10 cm de altura, en los que la estructura presente en el suelo no se alterase. Los cilindros se cerraron por ambos extremos y se metieron en neveras portátiles para su transporte al laboratorio, donde se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Se hicieron rodajas de sedimento de 1cm de grosor hasta los 5 cm de profundidad. En estas rodajas se determinó el contenido en materia orgánica, índice C/N, y contenido en pigmentos (clorofila *a* y luteína fundamentalmente).

El contenido orgánico del sedimento se determinó mediante las pérdidas por ignición a 450°C durante cuatro horas. La materia orgánica del sedimento se expresó como porcentaje de pérdida por ignición frente al peso seco total.

La determinación del carbono y nitrógeno total se realizó empleando un analizador elemental CNHS LECO-932 (Michigan, EE.UU.) a 1.050°C, que emplea un detector de infrarrojos. Como patrón se empleó EDTA. Se analizaron muestras secas.

La extracción de los pigmentos se realizó a partir una fracción homogeneizada de 2 g de sedimento húmedo a la que se agregó 8 ml de acetona pura con carbonato sódico a saturación para evitar modificaciones de pH. Se sonicó 20 seg. y se mantuvo en agitación continua 48 horas a 4°C en oscuridad. Pasado este tiempo se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 minutos y así se obtuvo el extracto. El sedimento se sometió a sucesivos lavados con 4 ml de acetona hasta que el líquido obtenido quedaba incoloro, incorporándose la acetona de los enjuagues al extracto de cada muestra. Los pigmentos se transfirieron a eter dietílico para lo cual se separaron en fracciones de 4 ml a los que se agregaba 2 ml de agua y 2 ml de eter dietílico. El extracto etéreo obtenido de este modo se evaporó en corriente de nitrógeno. Durante todo el proceso de extracción de

pigmentos se deben mantener en frío y oscuridad ya que los pigmentos se degradan con facilidad por acción de la luz, la temperatura y el oxígeno.

La determinación de los pigmentos se realizó por HPLC, método más utilizado para la determinación cuantitativa de carotenoides, clorofilas y sus derivados presentes en ecosistemas acuáticos y sus sedimentos (revisión en Millie *et al.*, 1993; Pfander & Riesen, 1995; Mantoura *et al.*, 1997 b; Jeffrey *et al.*, 1999).

Los picos se identificaron en función de los tiempos de retención de los pigmentos en la columna, y de los máximos de absorción de sus espectros. Para ello se compararon con patrones de clorofila a y b (Sigma) y luteína (Fluka) así como con información obtenida de otros autores (Brotas, 1995; Bianchi *et al.*, 1993; Cartaxana and Brotas, 2003; Rowan, 1989) (tabla III).

Pigmento	Máximo de absorción			Tiempo de retención
	I	II	III	
Luteína	(429)	448,8	476,6	22,726- 26,257
Clorofila <i>a</i>	431,9	662,5	-	31,120-35,794
Clorofila <i>b</i>	462	647,9	-	26,257- 30,739

Tabla III.- Los valores entre paréntesis corresponden a *hombros*, no a máximos de absorción. Los tiempos de retención están expresados en minutos y milésimas de minuto.

Para el cálculo de la concentración en μg de pigmentos. g^{-1} de sedimento se empleó la siguiente fórmula, basada en una extensión de la Ley de Lambert-Beer.

$$\mu\text{g. g}^{-1} = \frac{\text{Área}(\mu\text{V}.\text{seg}) * \text{Flujo}(\text{ml}.\text{min}^{-1})}{\varepsilon'(\text{g}^{-1}.\text{l}) * V_{\text{inyección}}(\text{ml}) * PS(\text{mg}) * 60} \quad (\text{Korbee N.}, 2004)$$

El área se refiere al área del pico en el cromatograma.

En la fórmula se ha tenido en cuenta los cambios de unidades, por lo tanto, introduciendo los valores para cada variable en las unidades indicadas entre paréntesis, se llegará al resultado final de la concentración en μg de pigmentos. g^{-1} de sedimento. Esta fórmula es válida sólo cuando la extracción se realiza en 1ml. Dado que la extracción, en este caso, se ha realizado en 8,12 o 16 ml, según sea la extracción con DMF o Acetona y se hayan hecho 1 ó 2 lavados del sedimento, y que estos se han trasferido y posteriormente el extracto se ha llevado a sequedad y reconstituido en 200 μl , tendremos que multiplicar por 0,200 ml.

Los valores del coeficiente de extinción específico son respectivamente (tabla IV):

	Luteína	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>
Coefficiente de extinción específico (l* <i>g</i> ⁻¹)	2540 ⁽¹⁾	75 ⁽²⁾	36,4 ⁽³⁾
⁽¹⁾ Foss et al.(1984); Goodwin (1955); Hager & Meyer-Bertenrath (1966); Hager Starnsky (1970b) en etanol ⁽²⁾ Lentz & Zeitzchel (1968) en metanol ⁽³⁾ MacKinney (1941) en metanol			

Tabla IV.- Valores del coeficiente de extinción específico para luteína, clorofila *a* y *b*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La dificultad para interpretar los cromatogramas es grande, debido a la cantidad de diferentes productos de degradación presentes en el sedimento, y a la falta de todos los patrones necesarios para interpretar los distintos picos (figura 2).

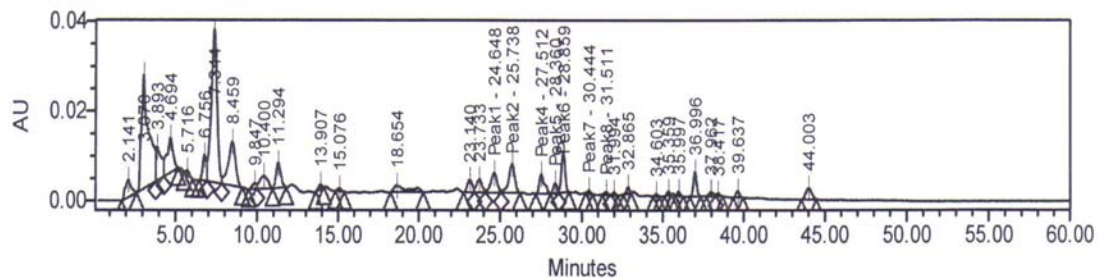


Figura 2.- Cromatograma de la estación 2 en el primer centímetro de profundidad.

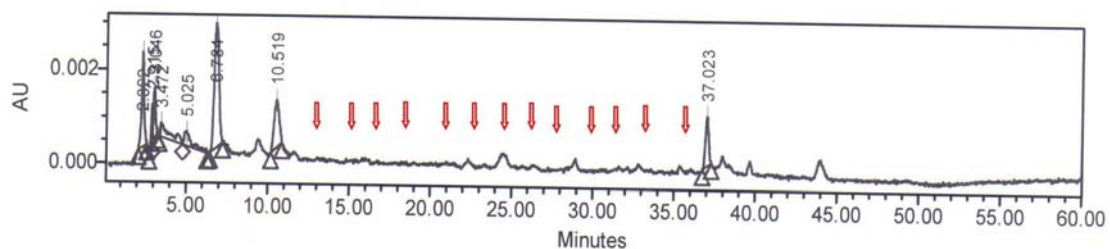


Figura 3.- Cromatograma de la estación 1 a una profundidad de 2 a 3 cm.

Los cromatogramas obtenidos muestran las diferencias existentes entre las distintas estaciones y profundidades estudiadas (menor concentración e incluso desaparición de pigmentos en profundidad, así como ausencia de algunos pigmentos en función de la estación de muestreo considerada (figura 2 y 3)).

La tabla V y VI resume las concentraciones de luteína y clorofila *a* expresada en ppm respecto al carbono en las diferentes estaciones de muestreo:

Profundidad	Estación presa	Estación 1	Estación 2	Estación 3	Estación 4	Estación 5	Barra
1	0,62	0,01	0,14	0,78	0,14	0,06	1,04
2	0,04	n.d.	0,18	0,02	0,04	n.d.	1,09
3	0,28	n.d.	0,04	0,08	0,03	n.d.	0,60
4	n.d.	n.d.	0,04	n.m.	n.d.	n.d.	0,25
5	n.d.	n.d.	0,03	n.d.	n.d.	0,03	0,21

Tabla V.- Cantidad de luteína respecto al carbono en ppm respecto al carbono.

Profundidad	Presa	Estación 1	Estación 2	Estación 3	Estación 4	Estación 5	Barra
1	5,08	0,39	1,20	7,37	2,77	0,71	1,92
2	0,16	n.d.	0,20	0,28	0,21	1,05	2,25
3	1,01	n.d.	0,81	0,48	0,17	n.d.	0,71
4	n.d.	n.d.	0,63	0,57	0,05	0,85	0,19
5	n.d.	n.d.	0,14	n.d.	n.d.	0,44	0,14

Tabla VI.- Cantidad de clorofila *a* respecto al carbono en ppm.

Los índices de luteína/clorofila *a* obtenidos están resumidos en la tabla VII:

Profundidad	Presa	Estación 1	Estación 2	Estación 3	Estación 4	Estación 5	Barra
1	0,128		0,119	0,105	0,050	0,087	0,540
2	n.m.		0,911	0,068	0,171		0,483
3	0,333		0,048	0,168	0,160		0,853
4			0,064	0,007		n.m.	1,330
5			0,204			0,067	1,572

Tabla VII.- Índice de luteína y sus productos de reciente degradación/clorofila *a* y sus productos de reciente degradación.

Si se representan las concentraciones de luteína y clorofila en las distintas profundidades considerando todas las estaciones respecto la concentración obtenida en superficie se obtiene la figura 4.

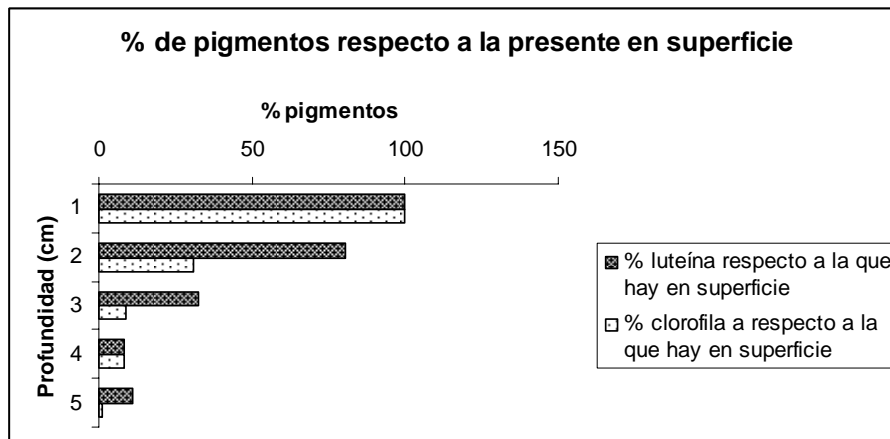


Figura 4.- % de clorofila y luteína en profundidad respecto a la presente en superficie.

Al determinar los valores medios de materia orgánica en las distintas estaciones muestreadas se observa que la marisma está claramente eutrofizadas, mientras que la barra, aún encontrándose en una zona, aparentemente de acumulación, es la estación que presenta menos materia orgánica, pudiéndose considerar limpia (menos del 2%). En cuanto al índice C/N, este alcanza el valor más elevado en la estación “presa” (24,3), (valor que indica que se trata de materia orgánica difícilmente degradable) seguido de la barra (12,39), mientras que en las estaciones del transecto en la marisma, su valor indica que se trata de materia orgánica de relativamente fácil degradación en torno a 11). Todos estos valores sugieren que la marisma se trata de un sistema con una alta productividad, pero en el que prácticamente toda la producción se mineraliza in situ y no existe casi exportación de materia orgánica fuera del sistema, puesto que los valores de materia orgánica encontrados en la barra (zona en principio de acúmulo) es baja.

La mayor concentración de luteína aparece en la estación 3 y esta, es la que también presenta el mayor valor de materia orgánica. Esta estación se encuentra cubierta por vegetación que aporta luteína al sedimento y protege al sedimento de la acción de la luz solar. Al mismo tiempo es la que está a mayor altura sobre el nivel cero de marea, por tanto está menos sometida al efecto del lavado por parte de las corrientes. Todo esto hace pensar que son los procesos de degradación los que controlan, de manera fundamental, la cantidad de luteína que se encuentra en el sedimento en este punto de muestreo.

Las estaciones 4, 2 y 5 están también cubiertas por vegetación que aportan luteína al sedimento al mismo tiempo que lo protegen de la luz solar, pero se encuentran un poco más bajas respecto al nivel cero de la marea, por lo que estarán más sometidas al efecto de lavado de las corrientes.

En la presa el valor de luteína en superficie es de los más elevados de los encontrados, aunque se encuentra situado a nivel topológico bajo, y por tanto sometido al efecto del lavado de las corrientes. En esta estación existe vegetación que, además de aportar luteína al sedimento, protegen al sedimento de la radiación solar por lo que la degradación de los pigmentos es menor.

En la barra, no hay vegetación que proteja a los pigmentos del sedimento de la acción descomponedora de la luz solar pero el aporte de materia orgánica en forma de algas verdes (clorofitas) es importante. Esto propicia que sea en esta estación donde se encuentre más luteína en todas las profundidades.

La estación 1 no tiene vegetación que proteja al sedimento de la luz solar y se encuentra a una altura que hace que continuamente esté sufriendo la acción de lavado por parte de las corrientes. Es este lavado lo que justifica que sea en esta estación donde menos cantidad de luteína se encuentra.

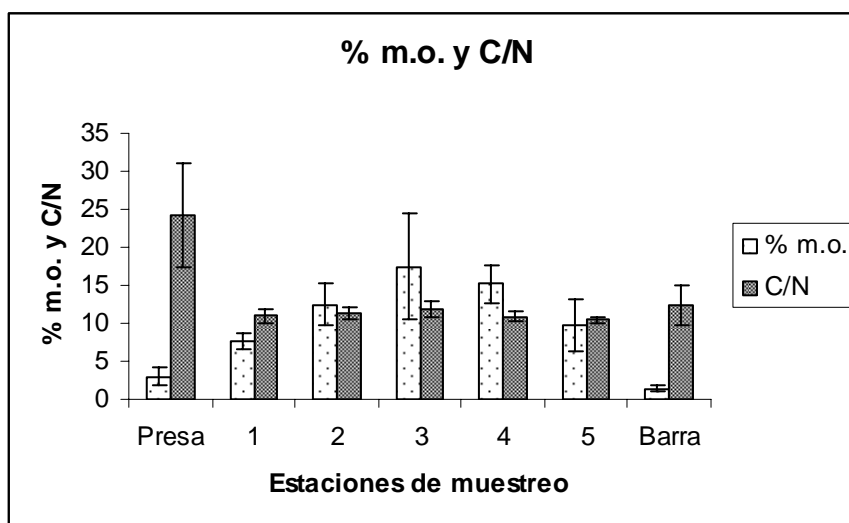


Figura 5.- Representación de los valores medios de % m.o. en sedimento seco y desviaciones estándar en las diferentes estaciones de muestreo.

Analizando los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta la situación y características de cada una de las estaciones muestreadas se pueden dividir las estaciones muestreadas en cuatro grupos distintos (tabla VIII).

Prof.	Est. Pr.	Est. 1	Est. 2	Est. 3.	Est. 4	Est.5	Est. Py
1 ppm lut.	0,62	0,01	0,14	0,78	0,14	0,06	1,04
% m.o.	5,13	5,72	15,35	24,98	16,27	7,21	1,26
C/N	13,04	9,6	11,92	11,57	11,24	9,78	12,73
2 ppm lut.	0,04		0,18	0,02	0,04		1,09
% m.o.	2,5	7,95	14,69	13,72	12,37	7,31	0,96
C/N	25,14	11,93	11,69	11,13	10,31	10,79	9,85
3 ppm lut.	0,28		0,04		0,03		0,60
% m.o.	2,16	7,61	12,9	11,27	12,55	7,52	1,35
C/N	29,84	10,92	11,06	11,25	10,33	10,17	10,67
4 ppm lut.			0,04				0,25
% m.o.	2,4	8,41	8,91	12,11	17,29	13,11	1,52
C/N	29,7	11,83	10,15	11,59	11,82	10,43	12,05
5 ppm lut.			0,03			0,03	0,21
% m.o.	2,91	8,13	10,62	25,36	17,42	13,95	1,96
C/N	23,79	10,77	11,98	13,8	10,59	10,87	16,65

Tabla VIII.- Resumen de los valores de luteína (ppm respecto al carbono), % m.o. y C/N en las diferentes estaciones y profundidades.

Esta división en distintos grupos queda más patente en la figura 6:

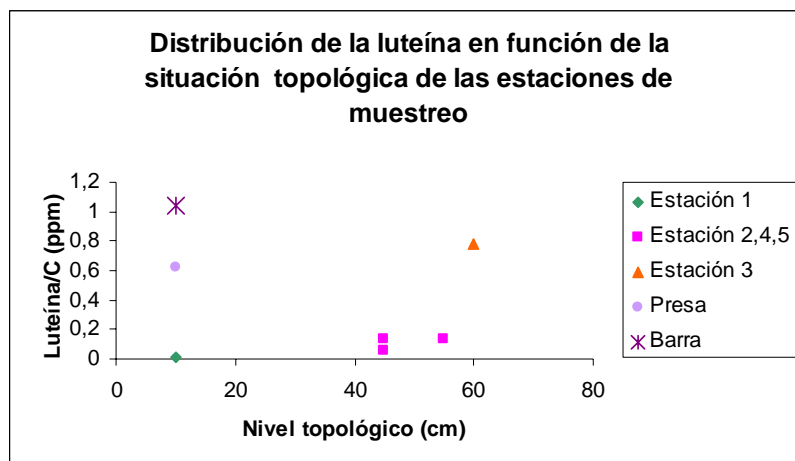


Figura 6.- Concentraciones de luteína no degradada en todas las estaciones en función de su posición topológica.

Teniendo en cuenta que la tasa de sedimentación en el estuario de Palmones de 0,9 cm/ año (Rubio, 2000) y que la velocidad de degradación de la luteína y clorofila *a* son, respectivamente 17,2% y 20%, mientras que la materia orgánica sufre, en los 5 cm más superficiales del sedimento, una acumulación diagenética del 16,7% anual. Con todo se llega a la conclusión de que se puede utilizar la luteína como marcador de procedencia de la materia orgánica que tiene su origen en las clorofilas en esta zona.

Si se comparan los resultados obtenidos en Palmones con los de otros autores en diferentes estudios, como el de Bianchi (1990) en el río Hudson, se observa que el perfil de luteína en las distintas estaciones muestreadas son diferentes (en el río Hudson la cantidad de luteína aumenta en profundidad, mientras que en Palmones disminuye. Bianchi lo explica por el aumento de resto de macrofitas al aumentar la profundidad), mientras los perfiles de clorofila *a* son similares. Hay que tener en cuenta que las características de ambas cuencas son totalmente diferentes.

Comparando los perfiles de luteína y clorofila de Palmones con los obtenidos por Abele (1991) en el sedimento del mar Báltico se observa que son similares.

BIBLIOGRAFÍA

- ABELE D.: "Potential of some carotenoids in 2 recent sediments of Kiel Bight as biogenic indicators of phytodetritus", *Marine Ecology Progress Series* 70 (1), 1991, pp.83-92.
- BIANCHI T.S. y S. Findlay: "Plants pigments as tracers of emergent macrophytes from Hudson River", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 1990, pp. 492-494.
- BIANCHI T.S. y S. Findlay: "Descomposition of Hudson Estuary macrophytes: Photosynthetic pigment transformations and decay constants", *Estuaries*, 14, 1991, pp. 65-73.
- BIANCHI T.S. y otros: "Organic matter sources in the water column and sediments of the Hudson River Estuary: the use of plant pigments as tracers". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 36, 1993, pp. 359-376.
- BROTAS V. y M.R. Plante-Cuny: "Identification et quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes des sédiments marins: un protocole d'analyse par HPLC", *Océanologica Acta*, 19 (6), 1995, pp. 623-634.
- CARTAXANA P. y V. Brotas: "Effects of extraction on HPLC quantification of major pigments from benthic microalgae", *Archiv für Hydrobiologie*, 157 (3), 2003, pp. 339-349.
- CLAVERO V. y otros: "The influence of tidal regime on phosphorus accumulation in a shallow small estuary (Palmones River, Southern Spain)", *Scientia Marina*, 6, 1997a, pp. 59-65.
- CLAVERO V. y otros: "Influence of bacterial density on the exchange of phosphorus between sediment and overlying water", *Hydrobiologia*, 392, 1999a, pp. 55-63.
- ERTEL E.R. y J.I. Hedges: "Sources sedimentary humic substances: structure, genesis and properties", *Reviews in Aquatic Sciences*, 49, 1985, pp. 2097-2107.
- FOSS P. y otros: "Prasinolaxanthin. A chemosystematic marker for algae", *Phytochemistry*, 23, 1984, pp. 1629-33.
- GOODWIN T.W.: "Carotenoids", in *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol 3, K. Paech and M. V. Tracey (Eds), pp. 272-311. Berlin: Springer-Verlag. 1955.
- HAGER A. y T. Meyer Bertenrath: "Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotenoids und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünn-schichten-chromatographischen Methoden", *Planta*, 69: 1966, pp.198-217.

- HAGER A. y H. Stransky: "Das carotionidmuster und die Verbreitungdes lichtenduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen algenklassen. V. Einzelne Vertreter der Cryptophyceae, Euglenophyceae, Bacillariophyceae and Phaeophyceae", *Arch. Mikrobiol.* 73, 1970b, pp. 77-89.
- HEDGES J.I. y otros: "Organic matter sources to the water column and surficial sediments of a marine bay", *Limnology and Oceanography*, 35, 1988, pp. 1116-1136.
- JEFFREY S.W. y otros: "Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplakton pigments", *Marine and Freshwater Research*, 50, 1999, pp. 447-559.
- KORBEE N.: *Fotorregulación y efecto del nitrógeno inorgánico en la acumulación de aminoácidos tipo micosporina en algas rojas*. Tesis doctoral. Servicio de publicaciones de la Universidad de Málaga, 2004. (ISBN: 84-688-6081-6)
- LEAVITT R. y A. Hodgson: "Sedimentary pigments", in Smol J.P., Birks H.J.B. & Last W.M. (Eds.), *Tracking Environmental Change Using Lake sediments. Vol 3: Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2001.
- LENZ J. y B. Zeitzchel: "Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für Chlorophyll a in Methanol", *Kieler Meeresforsch.*, 24, 1968, pp. 41-50.
- MACKINNEY G.: "Criteria for purity of chlorophyll preparations", *Journal of Biological Chemistry*, 132, 1940, pp. 91-190.
- MANTOURA R.F.C. y otros: "Comparison between spectrophotometric, fluorometric and HPLC methods for chloropyll analysis", in Jeffrey S.W., MANTOURA F.C. & WRIGHT S.W. (Eds.) *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. UNESCO, París, 1997, pp. 361-380.
- MILLIE, D.F. y otros: "Microalgal pigment assessments using high-performance liquid chromatography: A synopsis of organismal and ecological applications", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 50, no. 11, 1993, pp. 2513-2527.
- PFANDER H. y R. Riesen: "Hight-performance liquid chromatography", in BRITON G., LIAAEN-JENSEN S. & PFANDER H (Eds.) *Carotenoids. Vol 1A. Isolation and Analysis*. Birkhäuser, Boston, 1995, pp. 145-190.
- REPETA D.: "Early diagenesis of carotenoids in recent marine sediments. II. Degradation of fucoxanthin to loliolides", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 53, 1989, pp. 699-707.
- RUBIO L.: *Distribución vertical del Cs¹³⁷ y cronología del sedimento en el estuario del río Palmones*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Málaga, 2000, pp. 130.
- SANGER J.E.: "Fossil pigments in paleoecology and paleolimnology", *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 62, 1998, pp. 343-359.
- SUN M., y otros : "Early Diagénesis of chlorophyll a in Long Island Sound sediments: Ameasure of carbon flux and particle reworking", *Journal of Marine Research*, 49, 1991, pp. 379-401.
- VAN DEN HOEK C., y otros: *An introduction to phycology*. Cambridge University Press. Cambridge, 1995, pp. 623.
- WATTS C.D. y otros: "The potential of carotenoids as environmental indicators", *Adv. Org. Geochim.*, 1975, pp. 391-413.