

COEFICIENTES DE EXTINCIÓN DE CLOROFILAS Y FEOFITINAS (*a* y *b*) EN DMSO Y ECUACIONES PARA EL CÁLCULO DE SUS CONCENTRACIONES

S. DEL VALLE TASCÓN, M. J. SANZ, A. CALATAYUD & E. BARRENO

Dpto. de Biología Vegetal, Fac. Ciencias Biológicas, Universitat de Valencia. 46100 Burjassot, Valencia, España.

RESUMEN: Se han observado inconsistencias en las fórmulas utilizadas en la determinación de clorofilas (Chl) en dimetilsulfóxido (DMSO), estas fórmulas fueron calculadas para Chl disuelta en acetona (80%). Los coeficientes de extinción (E) de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) y feofitina *b* (Phaeo *b*) se han obtenido por regresión lineal.

Palabras clave: clorofilas, feofitinas, DMSO.

INTRODUCCIÓN

Los pigmentos fotosintéticos son habitualmente determinados por métodos espectrofotométricos en solventes orgánicos (BRUISNA, 1963; HOLDEN, 1976; McKINNEY, 1941; VERNON, 1960).

La acetona (80%) ha sido el solvente más utilizado para la extracción de clorofilas (ARNON, 1949; MOSS, 1967) ya que el coeficiente de extinción ha sido cuidadosamente calculado (McKINNEY, *l.c.*; VERNON, *l.c.*; LICHTENTHALER, 1987).

La extracción con acetona (80%) requiere triturar el material vegetal y posterior centrifugación. Este tipo de extracción puede dar lugar a errores en la determinación de clorofilas (JOSLYN & McKINNEY, 1938; MORETH & YENTSCH, 1970); por otro lado, la presencia de productos de degradación convierte en inestables estos extractos. SCHOAF & LIUM (1976) demostraron que el solvente DMSO es más adecuado que la acetona (80%) en la extracción de pigmentos fotosintéticos en varias especies de algas. Sin embargo, los coeficientes de extinción de clorofilas en DMSO no han sido publicados y se han utilizado los E obtenidos para la acetona (80%) (RONEN & GALLUN, 1984).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las medidas espectrofotométricas se realizan con un espectrofotómetro Simadzu modelo 240 con 2.0 nm de rendija y paso de luz de 10 mm. La posición de las longitudes de onda en el espectrofotómetro se calibran con un filtro de óxido de holmio. Cuatro lotes de 1 mg de Chl *a* (esencialmente libre de Chl *b*) y cuatro lotes de 1 mg de Chl *b* (esencialmente libre de Chl *a*) se disuelven en 0.5 mL de etanol. 10-20 μ L de esta solución se añaden a 3.0 mL de acetona (80%) ó DMSO; la concentración de etanol en estas soluciones es inferior a 0.7% (v/v) y por ello su afecto en el espectro de absorción se considera despreciable. La concentración de Chl en Acetona (80%) se calcula empleando los E dados LICHTENTHALER (1989) y la concentración de Chl *a* y *b* en las soluciones originales se calcula con esta referencia. Los E en DMSO se calculan por regresión lineal. La conversión de Chl a Phaeo se realiza mediante la adición de 15 μ L de HCl 10.1 N a 3.0 mL de solución.

OBSERVACIONES

RONEN & GALLUN (1984) sugirieron que el espectro de absorción de las Chl en DMSO era igual al obtenido en acetona (80%) y que por tanto las ecuaciones de ARNON (1941) se podían utilizar en los extractos de DMSO empleando la absorción a 663 nm en lugar de la absorción a 665 nm. Dado que no se presentan estadísticos, sino únicamente un espectro de absorción, la validez de estas ecuaciones se comprueba con soluciones de Chl *a* y *b* puras (Tabla 1).

| Compuesto | Referencia | Long de onda (nm) | E | Concentración (μ g/ml) |
|--------------|-------------------------|----------------------|-------|--------------------------------|
| Chl <i>a</i> | Lichtenthaler (1987) | 663.2 | 86.30 | 1.497 \pm 0.023 |
| | | 646.8 | 20.49 | 1.521 \pm 0.024 |
| | McKinney (1941) | 663.0 | 82.04 | 1.575 \pm 0.024 |
| | | 645.0 | 16.75 | 1.600 \pm 0.055 |
| | Vernon (1960) | 665.0 | 90.80 | 1.499 \pm 0.021 |
| 649.0 | 23.40 | 1.579 \pm 0.047 | | |
| Chl <i>b</i> | Lichtenthaler (1987) | 663.2 | 11.20 | 2.146 \pm 0.103 |
| | | 646.8 | 48.18 | 1.041 \pm 0.048 |
| | McKinney (1941) | 663.0 | 9.27 | 2.105 \pm 0.101 |
| | | 645.0 | 45.60 | 1.049 \pm 0.045 |
| | Vernon (1960) | 665.0 | 10.80 | 1.807 \pm 0.086 |
| 649.0 | 52.50 | 0.999 \pm 0.047 | | |

Tabla 1. Concentraciones de Chl *a* (1.703 \pm 0,026 mg/ml) y de Chl *b* (1.164 \pm 0,048 mg/ml) en DMSO empleando el E dado para la Acetona 80%. La concentración es la media de 8 réplicas con su desviación típica.

| Compuesto | Coeficientes de Extinción (mg/ml cm) | | | | | |
|--------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|------|------|
| | 1667 | 1666 | 1654 | 1649 | 1558 | 1536 |
| Chl <i>a</i> | 79.31 | 79.84 | 36.08 | 23.74 | 4.05 | 3.64 |
| Chl <i>b</i> | 13.36 | 15.00 | 39.98 | 44.65 | 6.45 | 4.74 |

Tabla 2. Coeficiente de Extinción mg/ml de Chl *a* y Chl *b* disueltos en DMSO

| Compuesto | Coeficientes de Extinción (mg/ml cm) | | | | | |
|----------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|------|-------|
| | 1667 | 1666 | 1654 | 1649 | 1558 | 1536 |
| Phaeo <i>a</i> | 46.29 | 46.08 | 22.04 | 13.53 | 4.52 | 10.24 |
| Phaeo <i>b</i> | 9.87 | 11.70 | 31.97 | 24.60 | 7.94 | 11.58 |

Tabla 3. Coeficiente de Extinción para Phaeo *a* y *b* en DMSO para los máximos de absorción relativos y absolutos

Las pruebas estadísticas HDS y anova indican la existencia de diferencias significativas entre la concentración de Chl estimada y la Chl calculada empleando los E de MCKINNEY (1941), VERNON (1969) y LICHTENTHALER (1987). Esta inconsistencia es analizada posteriormente mediante el análisis del espectro de absorción. El espectro de absorción de la Chl *a* en DMSO presenta máximos a 666, 614, 584 y 433 nm, mínimos a 637 y 543 nm y un hombro a 415 nm. El espectro de la Chl *b* en DMSO presenta máximos a 649, 601, 462 nm, mínimos a 622, 518, 403 nm y un hombro a 425 nm. El espectro de diferencias -Chl en DMSO menos Chl en acetona (80%)- presenta diferencias en la localización de los máximos y de intensidad; se aprecia que las absorciones en el rojo y en el azul son diferentes en ambos solventes. La localización de bandas de absorción en el rojo y sus E están representados en la Tabla 2. Debido a que los espectros de absorción de Chl *a* y *b* en DMSO se solapan la cuantificación de Chl no es posible sino se establece un sistema lineal no-homogéneo de dos ecuaciones a dos longitudes de onda diferentes:

$$A_{666} = 79.8464 * Ca + 15.0080 * Cb \quad (1)$$

$$A_{649} = 21.6020 * Ca + 44.6528 * Cb \quad (2)$$

donde A es la absorción registrada a la longitud de onda del subíndice, C_a y C_b representan las concentraciones de Chl a y b respectivamente en mg/mL.

Las concentraciones de Chl a y b , Chl $a+b$ se obtienen de la solución del sistema de ecuaciones siguientes:

$$C_a = 13.77 * A_{666} - 4.63 * A_{649} \quad (3)$$

$$C_b = 24.63 * A_{649} - 6.66 * A_{666} \quad (4)$$

$$C_t = 7.11 * A_{666} + 20.00 * A_{649} \quad (5)$$

La validez de las fórmulas (3) y (4) se comprueban con soluciones de Chl a y b y mezclas de Chl a y b ; la concentración de Chl a y Chl b se calculan con las fórmulas (3) y (4). Los resultados obtenidos son consistentes.

Los E en las soluciones acidificadas se determinan en la banda de rojo (Tabla 3). Los datos obtenidos permiten establecer las siguientes ecuaciones:

$$A_{667} = 46.29 * F_a + 9.87 * F_b \quad (6)$$

$$A_{654} = 22.04 * F_a + 31.71 * F_b \quad (7)$$

donde A es la absorción a la longitud de onda indicada en el subíndice. F_a y F_b son las concentraciones de Phaeo a y Phaeo b respectivamente en mg/mL.

La solución de las ecuaciones por el método de Cramer permite calcular F_a y F_b :

$$F_a = 25.32 * A_{667} - 7.81 * A_{654} \quad (8)$$

$$F_b = 36.66 * A_{654} - 17.46 * A_{667} \quad (9)$$

$$F_t = 7.86 * A_{667} + 28.85 * A_{654} \quad (10)$$

La concentración de Phaeo en soluciones acidificadas calculadas con las ecuaciones (8) a (10) son comparables a las concentraciones obtenidas antes de acidificar las soluciones.

DISCUSIÓN

Los E de Chl en DMSO no han sido todavía determinados. No obstante, RONEN & GALLUN (1984) y HISCOX & ISRAELSLAM (1979) han propuesto que la concentración de Chl en DMSO puede ser calculada utilizando los E obtenidos en acetona (80%). Los E de Chl en acetona (80%) más empleados son los determinados por MCKINNEY (1941), VERNON (1960) y LICHTENTHALER (1987); probablemente los E obtenidos por Lichtenthaler son correctos o los mejor obtenidos hasta el presente. Por este motivo, la concentración de Chl en acetona (80%) se realiza empleando estos E. Admitiendo que los E en acetona (80%) y DMSO son idénticos se obtienen diferencias significativas en la determinación de Chl (Tabla 1) y en las características de los espectros de la Chl disueltas en ambos solventes.

En este trabajo se han determinado los E de las Chl y Phaeo (Tablas 2 y 3). Se han obtenido las fórmulas para calcular las concentraciones de Chl *a* y Chl *b* - fórmulas (3)-(5) - y Phaeo *a* y Phaeo *b* - fórmulas (7)-(10) - en DMSO de modo parecido a las desarrolladas para otros solventes -KOSKI *et al.* (1948); VERNON (1960); WINTERMANS *et al.* (1965), LICHTENTHALER (1987)-.

La determinación simultánea de Chl *a*, Chl *b*, Phaeo *a* y Phaeo *b* en la misma muestra requiere un sistema lineal de cuatro ecuaciones a cuatro longitudes de onda diferentes. La exactitud de la solución numérica está determinada por el factor de condicionamiento del sistema. Un sistema mal condicionado es aquel que en un cambio relativamente pequeño en un coeficiente da lugar a un cambio importante en la solución. El condicionamiento del sistema lineal puede estimarse por el indicador de condicionamiento (PACHNER, 1984). Un gran número de sistemas de cuatro ecuaciones se plantearon pero en todos los casos el indicador de condicionamiento indica que no existe solución numérica. Por lo tanto, Chl *a*, Chl *b* y Phaeo *a* y Phaeo *b* no pueden ser determinadas simultáneamente y por ello se calcula la concentración de Chl, se acidifica para obtener las concentraciones de Phaeo y las diferencias entre ambas concentraciones (BROWN & HOOKER, 1977).

CONCLUSIONES

1. Los espectros de absorción de la Chl *a* y *b* en DMSO son significativamente diferentes respecto de los obtenidos cuando el solvente es la acetona (80%).
2. Las ecuaciones desarrolladas para el cálculo de la concentración de Chl *a* y *b* en acetona (80%) no son válidas cuando el solvente utilizado es el DMSO.
3. Se han determinado experimentalmente por regresión lineal los E de las Chl *a* y *b*, así como de sus correspondientes derivados ácidos, en DMSO.
4. Se aportan el sistema de ecuaciones lineales y fórmulas que permitan el cálculo de las concentraciones de Chl y Phaeo en DMSO.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto parcialmente financiado por ENDESA-ADEIT, DEICYT PB 890415 e IVEI.

BIBLIOGRAFÍA

- ARNON, D. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1): 1-15.
- BROWN D.H. & T.N. HOOKER (1977): The significance of acidic lichen substances in the estimation of chlorophyll and phaeophytin in lichen. *New Phytologist* 78: 617-624.
- BRUINSMA, J. (1963): The quantitative analysis of chlorophylls *a* and *b* in plant extracts. *Photochemistry Photobiology* 2: 241-249.
- HISCOX, J.D. & G.F. ISRAELSLAM (1979): A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57: 1332-1334.
- HOLDEN, M. (1976): *Chlorophylls*. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, vol 2 (ed by T.W. Goodwin). Academic Press. London.
- JOSLYN, M.A. & G. MCKINNEY (1938): The ratio of conversion of chlorophyll to phaeophytin. *Journal of American Chemistry Society* 60: 1132-1136.
- KOSKI, V.M. & J.H.C. SMITH (1948): The isolation and spectral absorbance properties of protochlorophyll from etiolated barley seedlings. *Journal American Chemistry Society* 70: 3558-3562.
- LICHTENTHALER, H.K. (1987): Chlorophylls and Carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- MCKINNEY, G. (1941): Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal Biology Chemistry* 140: 315-322.
- MORETH, C.M. & C.S. YENTSCH (1970): The role of chlorophyllase and light in the decomposition of chlorophyll from marine phytoplankton. *Journal of Experimental Biology and Ecology* 4: 238-249.
- MOSS, B (1967): A spectrophotometric method for estimation of percentage degradation of chlorophylls to phaeo-pigments extract of algae. *Limnology Oceanography* 12: 335- 340.
- PACHNER, J. (1984): *Handbook of numerical analysis applications, with programs for engineers and scientists*. McGraw-Hill Books Co.
- RONEN, R. & M. GALLUN (1984): Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany* 24(3): 239-245.
- SCHOAF, W.T. & B.W. LIUM (1976): Improved extraction of chlorophyll *a* and *b* algae using dimethyl sulfoxide. *Limnology Oceanography* 21: 926-928.

VERNON, L.P. (1960): Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Annals Chemistry* 32: 1144-1150.

WINTERMANS, J.F. & A. DE MOTS (1965): Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Annals of Chemistry* 32: 1144-1150.

(Aceptado para su publicación el 15.Abril.1994)