

VENTAJAS DE LA UTILIZACIÓN DEL DIMETILSULFÓXIDO EN LA DETERMINACIÓN DE CLOROFILAS Y FEOFITINAS EN LÍQUENES

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

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

RESUMEN: Los pigmentos fotosintéticos de *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. se extraen por trituración ó inmersión del talo con acetona (80%) y dimetilsulfóxido (DMSO). El solvente DMSO es más adecuado que la acetona (80%) para la extracción de clorofilas ya que la extracción es completa y la absorción óptica de los extractos permanece constante durante períodos de tiempos largos.

Palabras clave: *Ramalina fraxinea*, clorofilas, feofitinas, DMSO.

INTRODUCCIÓN

El DMSO es uno de los solventes más utilizados en la última década para la extracción de pigmentos fotosintéticos en diferentes tejidos vegetales (HISCOX & ISRAELSLAM, 1947; BURNINSON, 1980; RONEN & GALLUN, 1984). La utilización de este solvente es debido a la estabilidad de los extractos y su gran poder de extracción.

El objetivo de este trabajo es comprobar si las fórmulas para el cálculo de clorofilas (Chl) y feofitinas (Phaeo) en DMSO (VALLE-TASCÓN & *al.* 1993) son aplicables a extractos de *Ramalina fraxinea*, comparar la capacidad de extracción del DMSO y la acetona (80%) y finalmente estudiar la estabilidad de los extractos en DMSO durante el almacenamiento a -5°C y 20°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se ha llevado a cabo con el liquen *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. recolectado en la cuenca del río Curueño (Sopeña, León) sobre corteza de *Quercus pyrenaica* Willd. La extracción de los pigmentos fotosintéticos se realiza por inmersión del talo ó

trituration y posterior centrifugación. La extracción por inmersión se realiza incubando el talo liquénico (1 g peso seco/10 mL) en el solvente durante 1 a 12 horas. La extracción por trituration se realiza triturando el talo en un mortero con el solvente (10 mg peso seco/mL), el extracto crudo se centrifuga 10 min a 5000g y el sobrenadante se ensaya inmediatamente o se almacenan a -5°C ó 20°C .

Talos de apariencia similar se utilizan para realizar un experimento factorial 2×7 en el que se desea comparar dos temperaturas (-5°C ó 20°C) y siete períodos de almacenamiento (2, 5, 10, 24, 48, 120, 900 horas). 1.5 g de peso seco de los talos se extrae con 150 mL de DMSO y se realizan 3 réplicas de cada uno de los 14 tratamientos. Las concentraciones de Chl *a* y *b* se calculan empleando los coeficientes de extinción presentados por VALLE TASCÓN & *al.*, (1993). Los datos se analizan mediante el análisis de la varianza (dos vías). El área bajo el espectro de absorción se calcula por integración numérica (método de Simpson).

OBSERVACIONES

El espectro de absorción de *R. fraxinea* en DMSO presenta máximos a 667, 618, 459 y 435 nm y un hombro a 488 nm (Fig. 1A). No se observan cambios en la absorción cuando este extracto se mantiene a temperatura ambiente durante 48 horas. La absorción debida a la Chl *a* y *b* se resta del espectro de absorción, llamado espectro residual (Fig. 1B). Este espectro de diferencias (extracto de *R. fraxinea* menos Chl *a* y *b*) presenta dos máximos a 460 y 484 nm (Fig. 1B); el área bajo la banda Soret de Chl *a* y *b* y del residuo tienen una relación 4.25:1.00. La acidificación del extracto induce una disminución de las bandas de absorción a 667, 608 y 560 nm, aumento a 416 y la aparición de un hombro a 434 nm; estos cambios indican la presencia de Phaeo *a* y Phaeo *b* (Fig 2A). El espectro residual (espectro del extracto acidificado menos la absorción de Phaeo *a* y *b*) presenta máximos a 442, 461 y 487 nm (Fig. 2B). El área bajo las bandas de absorción de Phaeo y el residuo tienen una relación de 2.40:1.0.

La absorción a 667 y 649 nm y el contenido en Chl en extractos de *R. fraxinea* obtenidos por trituration e inmersión –DMSO y acetona (80%)– (Tabla 1) indican que la homogeneización con DMSO extrae el 98% de la Chl. La acetona (80%) no es tan efectiva en la extracción de Chl como el DMSO ya que únicamente el 58% de la Chl es extraída. La relación Chl *a*/Chl *b* es mayor en DMSO (3.43) que en acetona (80%) (2.65); esta diferencia es debida, posiblemente, a una menor extracción de Chl por la acetona (80%). El solvente DMSO extrae la Chl del talo intacto, aunque esta extracción depende del tiempo de incubación; la totalidad de las Chl son extraídas al cabo de 5 horas de incubación en oscuridad a temperatura ambiente. En resumen, el DMSO (trituration e incubación durante 5 horas) puede emplearse para determinar la concentración de Chl en talos de *R. fraxinea*. La acetona (80%) es aparentemente inadecuada.

La estabilidad de los extractos en DMSO de *R. fraxinea* se estudia mediante la medida de las concentraciones de Chl *a* y *b* (Tabla 2). A temperatura ambiente la concentración de Chl *a* es constante durante 48 horas; la concentración de Chl *b* no varía significativamente durante 15 días. Cuando los extractos se almacenan a -5°C las concentraciones de Chl *a* y *b* no se modifican durante 15 días.

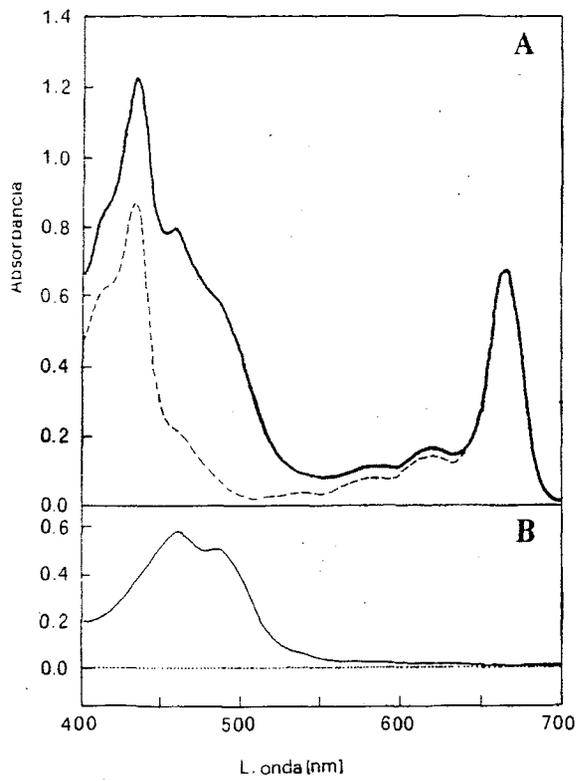
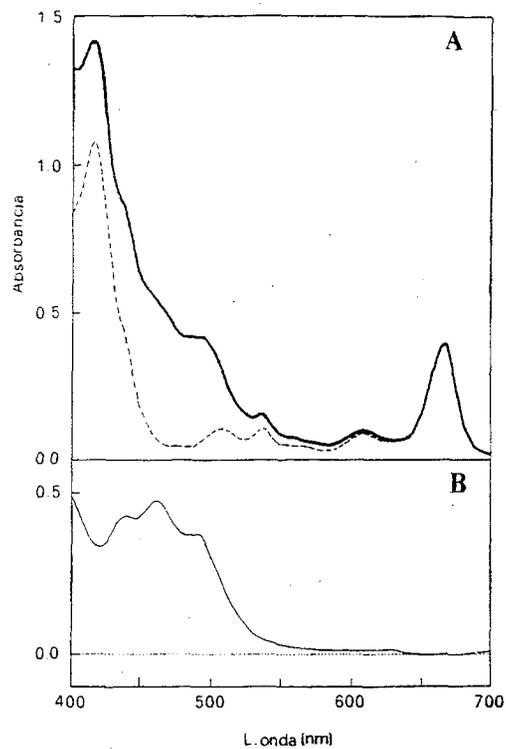


Figura 1. Espectro de absorción de un extracto de *R. fraxinea* (L.) Ach. en DMSO (10 mg/mL). (A) la línea gruesa representa la absorción del extracto y la línea fina la absorción en el caso de que los únicos compuestos que absorbiesen fueran clorofila a y b. (B) diferencia de los espectros de absorción que aparecen en la parte A de la figura

Figura 2. Espectro de absorción de un extracto de *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. en DMSO (10 mg/mL). (A) la línea gruesa representa la absorción del extracto y la línea fina la absorción en el caso de que los únicos compuestos que absorbiesen fueran feofitina a y b. (B) diferencia de los espectros de absorción que aparecen en la parte A de la figura



Tratamiento	A (667 nm)	A(649 nm)	Chl <i>a</i> (µg/ml)	Chl <i>b</i> (µg/ml)
A				
DMSO	0.832	0.342	9.878	2.880
Acetona 80%	0.481	0.297	6.632	2.388
B				
DMSO	0.634	0.238	7.632	1.637
Acetona 80%	0.025	0.018	0.325	0.169

Tabla 1. Absorción a 667 nm y 649 nm en extractos preparados por (A) trituración y centrifugación y (B) inmersión del talo de *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. a temperatura ambiente

T (C)	Tiempo (h)						
	2	5	10	24	48	120	900
Chl <i>a</i>							
20°C	8.824	8.813	8.742	8.719	8.741	8.643	8.317
-5°C	8.795	8.851	8.795	8.831	8.812	8.793	8.833
LSD= 0.072							
Chl <i>b</i>							
20°C	2.068	2.036	1.996	2.029	2.054	2.145	2.037
-5°C	2.134	2.100	2.090	2.106	2.134	2.120	2.131
LSD= 0.121							

Tabla 2. Efecto de las condiciones de almacenamiento en la concentración medida (µg/mL) de clorofila *a* y *b* de un extracto de *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. en DMSO (LSD, $p < 0.005$)

DISCUSIÓN

El espectro del residuo (Fig. 1B) también ha sido observado en otros solventes y por ello no parece estar asociado al uso del DMSO. La naturaleza del espectro residual no es conocida. La interpretación más probable es que sea debido a la presencia de ácidos liquénicos (MOSS, 1967), sustancias fenólicas y carotenoides. No obstante, es necesaria experimentación adicional para permitir la interpretación de este espectro residual.

Los talos de *R. fraxinea* contienen ácido úsnico (ARROYO, 1991), este ácido liquenico es extraíble fácilmente y puede degradar la Chl a Phaeo (BROWN, & HOOKER, 1976). Los extractos de *R. fraxinea* no presentan una feofitinización apreciable incluso al cabo de 48 horas en oscuridad y temperatura ambiente. Esta escasa feofitinización puede ser debida a las velocidades relativamente bajas de feofitinización en este solvente. Por otro lado, el cambio del espectro de absorción del residuo cuando se añade HCl (Fig. 1B), hace que la determinación de Chl empleando la banda Soret sea inadecuada. Este problema puede resolverse cuantificando la concentración de Chl a partir de la absorción en el rojo.

Los extractos de *R. fraxinea* en DMSO son estables al menos durante 15 días cuando las soluciones se mantienen a -5°C (Tabla 2). Estos resultados experimentales están de acuerdo con resultados previos en los que extractos de hoja de guisante (HISCOX & ISRAELHAM, 1949) y talos de *Ramalina duriei* (RONEN & GALLUN, 1984) eran estables durante 5 días. La estabilidad de los extractos en DMSO (15 días a -5°C y 48 horas a temperatura ambiente) permiten períodos largos para la extracción de los talos y flexibilidad para el análisis espectrofotométrico. Los datos resumidos en la Tabla 1 sugieren que el DMSO debe usarse en lugar de la acetona (80%) ya que la extracción de las Chl *a* y *b* es completa y los pigmentos fotosintéticos poseen una gran estabilidad. El DMSO extrae los pigmentos fotosintéticos en el liquen intacto y por tanto se evita la pérdida de pigmentos que tiene lugar durante la trituration y centrifugación. Por otra parte, el tiempo transcurrido entre la extracción y la determinación espectrofotométrica aparentemente no es muy crítica. La toxicidad del DMSO es relativamente baja pero debido a su interacción con la piel debe ser manejado con cuidado (JACOBS *et al.* 1971; MERCK, 1983). Los métodos (trituration e inmersión) empleados en la determinación de Chl en *R. fraxinea* son prácticos y sencillos y pueden ser aplicados a otras especies.

CONCLUSIONES

1. Los extractos en DMSO de *R. fraxinea* pueden ser utilizados para la determinación de Chl y Phaeo.
2. El DMSO es un solvente más efectivo que la acetona (80%) en la extracción de los pigmentos fotosintéticos.
3. Los extractos de *R. fraxinea* (L.) Ach. en DMSO son estables durante al menos 15 días a la temperatura de -5°C ó 48 h a temperatura ambiente.

AGRADECIMIENTOS

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

BIBLIOGRAFÍA

- ARROYO, M.R. (1991): *El género Ramalina Ach. en la Península Ibérica: Química, Quimiotaxonomía, Morfología, Anatomía y Distribución*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- BURNISON, B.K. (1980): Modified dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction of chlorophyll *a* and *b* from algae using dimethyl sulfoxide. *Limnology Oceanography* 21: 926-928.
- BROWN, D.H. & T.N. HOOKER (1977): The significance of acidic lichen substances in the estimation of chlorophylls and phaeophytin in lichens. *New Phytologist* 78: 617-624.
- 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.
- JACOB, S.W., E.E. ROSENBAUM & D.C. WOOD (1971): *Dimethyl sulfoxide*. Vol. 1 Basic Concepts of DMSO. pp. 134. Darker.
- MERCK (1983): *The Merck Index*. 3 edition. Merck & Co.
- MOSS, B. (1967): A spectrophotometric methods for the estimation of percentage degradation of chlorophyll to phaeo-pigments in extracts of algae. *Limnology Oceanography* 12: 335-340.
- RONEN, R. & M. GALLUN (1984): Pigment extractions from lichens with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Pollution* 24(3): 239-245.
- VALLE TASCÓN, S., A. CALATAYUD, M.J. SANZ & E. BARRENO (1993): Coeficientes de extinción de clorofilas y feofitinas (*a* y *b*) en DMSO y ecuaciones para el cálculo de sus concentraciones. *Studia Botanica* 13.

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