

Cuantificación del contenido de clorofila A y B en *Lenma sp.*

Aaron Llerena Arroyo

aaron.llerena@unmsm.edu.pe

Departamento de Botánica
Laboratorio de Fisiología Vegetal
Ciudad Universitaria, UNMSM; Lima Perú.

R e s e a r c h | P a p e r

Resumen

Evaluar el efecto de diferentes sustratos sobre las características foliares de *Lenma sp.* y la producción de clorofila A y clorofila B.

Metodología

Para la cuantificación del contenido de clorofila se utilizó como muestra a *Lenma sp.*, Junto a la muestra se observó la presencia de algas, las cuales proliferaron debido al exceso de nutrientes para el tratamiento T₂ y T₄. Por ello el primer paso que se tomó en cuenta fue el enjuagar con un colador y agua de caño, posteriormente se secó con papel toalla y se pesó.

Lavado: Con la finalidad de eliminar impurezas antes de pesar la muestra se enjuagó y seco cuidadosamente. De cada tratamiento se extrajo una muestra significativa. Para el tratamiento T₀ se pesó 44 mg, 45 mg para el T₂ y 47 mg de T₄. (Img 1)



Imagen 1.

Trituración: La muestra fue triturada con ayuda de un mortero y un pilón, este proceso ayuda a destruir las células vegetales y de esta forma liberar la clorofila incluida en los cloroplastos. Posteriormente se agregará alcohol poco a poco y se vacía en un tubo de ensayo. (Img2, Img3)



Img 2. (arriba), Img 3.(abajo)

Extracción: El tubo debe ser cubierto con papel aluminio para que la clorofila no se oxide con la presencia de luz. Seguir agregando alcohol para favorecer el desprendimiento de clorofila. El alcohol es utilizado como un material de extracción debido a que tiene afinidad con la clorofila, este puede actuar como un disolvente polar, el cual permite que la clorofila se libere.

Para la eliminación de sustancias que puedan interferir en el posterior análisis (tales como la celulosa de la pared celular o proteínas) se utilizó la técnica de concentración por centrifugado. La centrifugación se dio a 3000 rpm durante 5 min. (Img 4.)

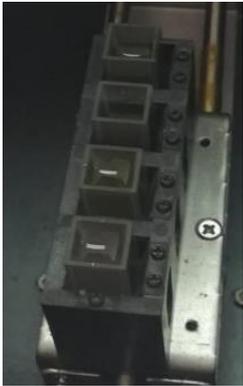


Img 4.

Antes del análisis espectrofotométrico se mide el volumen para poder hallar la concentración. Se obtuvo 9.8 ml del tratamiento T₀, 9.7 ml del T₂ y 9.8 del T₄.



Gráfico 1: Comparación de la concentración de nutrientes de 0, 2ml/l y 4 ml/l que se le suministró a la especie *Lemna sp.* con las diferentes absorbancias de 645, 649 y 665 nanómetros. De este gráfico se obtiene que en el tratamiento de 2ml/l hubo mayor absorbancia e, incluso en las diferentes longitudes de onda, este tratamiento se establece como el más eficaz.



Análisis espectrofotométrico:
Debido a que las plantas contienen clorofilas a y b, las cuales presentan un rango de absorción distinto, es necesario el análisis a tres longitudes de ondas.

Gráfico 1. Concentración de nutrientes vs Absorbancia

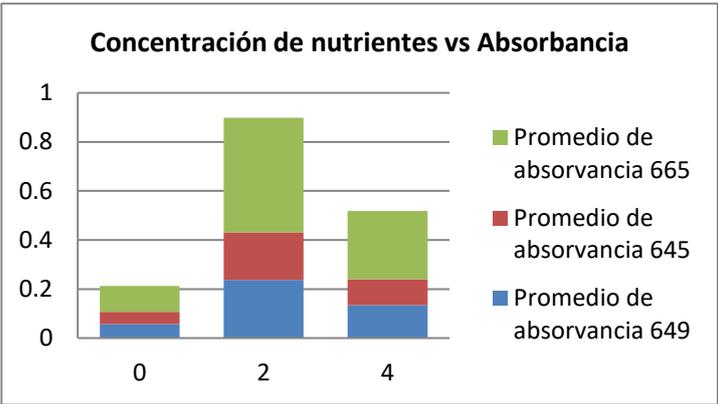
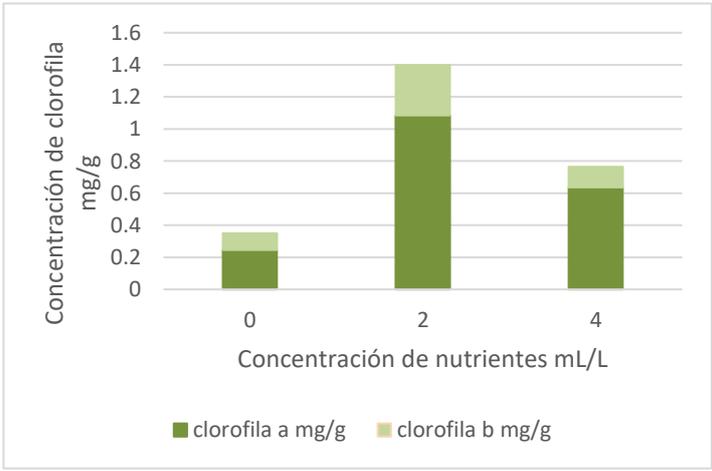


Gráfico 2: En este gráfico se hace la comparación de la concentración de nutrientes que se le suministró a la planta *Lemna sp.* con la concentración de clorofila que se encontró en las concentraciones de 0,2ml/l y 4ml/l. Encontrando una mayor de concentración de ambas clorofilas en el tratamiento de 2ml/L. Además, es notable que, en los 3 tratamientos, se obtuvo una mayor obtención de clorofila A en esta especie de planta.

Gráfico 2: Concentración de clorofila vs. Concentración de nutrientes



Resultados

Tabla 1: En esta tabla podemos apreciar el análisis espectrofotométrico de los tres tratamientos de *Lemna sp.* Se concluye que el tratamiento de 2 ml en un litro presenta mejores resultados tanto para clorofila a y clorofila b.

Tabla 1. Cuantificación de clorofila a y b.

CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA							
Concentración de nutrientes ml/l	absorbancia 645 nm	absorbancia 649 nm	absorbancia 665 nm	peso muestra (g)	vol final extracto (mL)	clorofila a mg/g	clorofila b mg/g
0	0.049	0.058	0.105	0.044	9.8 ml	0.24598445	0.10383545
2	0.194	0.237	0.467	0.045	9.7 ml	1.08484369	0.31384889
4	0.106	0.134	0.279	0.047	9.8 ml	0.63605336	0.12810894

Discusión

Considerando los resultados se puede observar que no necesariamente una mayor cantidad de nutrientes implicará una mayor producción de clorofila, inclusive, un exceso de nutrientes en el sustrato disminuirá la cantidad de clorofila máxima que la especie *Lenma sp.* es capaz de producir. Podemos inferir que existe un rango de clorofila máximo que podría producir cada especie. Estos resultados, además, concuerdan con otros ensayos realizados en la bibliografía consultada.

Valenzuela (2013), como parte de sus ensayos sobre sensibilidad toxicológica de la especie *Lenma valdiviana*, cuantificó mediante el método espectrofotométrico la cantidad de clorofila a y b producida en sustratos con diferentes concentraciones de contaminantes, a las longitudes de onda de 647, 664 y 655 nm.

Si bien no se evaluó la concentración óptima de nutrientes para la producción de clorofila, podemos extrapolar que cualquier variación –fuera del rango óptimo de la planta- de compuestos en el sustrato de la especie *Lenma*, afectará disminuyendo su producción de clorofila a y b, ambas producidas en la misma proporción que en este artículo (mayor producción de clorofila a, en comparación a la clorofila b.)

Concentración de contaminante (Dicromato de potasio)	Longitudes de onda			volum en ml	peso gr	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila total	
	647	664	665						
CONTROL	R1	0,396	0,984	0,971	3	0,0728	467,633	143,511	617,580
	R2	0,461	1,127	1,11	3	0,0692	562,064	179,747	749,540
	R3	0,417	1,023	1,01	3	0,0611	578,767	183,041	769,769
	R4	0,426	1,054	1,038	3	0,0639	569,834	177,119	754,792
	R5	0,412	1,031	1,019	3	0,0831	429,874	129,436	565,227
	R6	0,517	1,265	1,246	3	0,0682	640,211	204,302	853,317
0,04mg/L	R1	0,373	0,912	0,9	3	0,0912	345,488	110,195	460,434
	R2	0,365	0,896	0,886	3	0,08	387,507	122,142	514,979
	R3	0,385	0,94	0,927	3	0,0631	514,417	164,762	686,253
0,08 mg/L	R1	0,365	0,865	0,855	3	0,0791	377,067	129,093	511,339
	R2	0,381	0,921	0,907	3	0,0754	421,102	138,296	565,186
	R3	0,450	1,085	1,068	3	0,0806	463,853	153,337	623,565
0,17 mg/L	R1	0,180	0,428	0,422	3	0,0652	226,111	77,041	306,258
	R2	0,235	0,550	0,542	3	0,0827	228,674	80,818	312,630
	R3	0,193	0,427	0,422	3	0,0785	186,309	74,248	263,108
0,35 mg/L	R1	0,085	0,186	0,184	3	0,0557	114,310	46,583	162,458
	R2	0,097	0,217	0,213	3	0,0618	119,952	47,021	168,617
	R3	0,095	0,214	0,212	3	0,0634	115,968	44,345	161,903
0,70 mg/L	R1	0,070	0,144	0,143	3	0,038	129,158	59,538	190,459
	R2	0,053	0,109	0,107	3	0,0368	100,311	46,799	148,479
	R3	0,066	0,147	0,146	3	0,0338	149,465	58,409	209,922
1,41 mg/L	R1	0,044	0,078	0,076	3	0,0241	107,257	66,780	175,489
	R2	0,045	0,078	0,078	3	0,0279	93,735	59,377	154,381
	R3	0,049	0,095	0,093	3	0,0273	116,895	61,364	179,848
2,82 mg/L	R1	0,033	0,057	0,057	3	0,0215	88,849	56,637	146,687
	R2	0,038	0,076	0,074	3	0,0185	138,079	68,612	208,573
	R3	0,033	0,067	0,065	3	0,0195	115,449	55,897	172,920

Santiago et al. (2019), en el proyecto “Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco”, cuantificó la producción de clorofila a y b en 10 especies de **diferentes familias** de hierbas, mediante el **método espectrofotométrico**, encontrando lo siguiente:

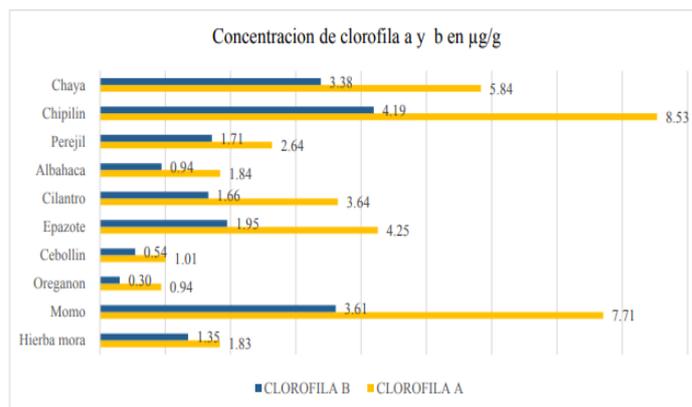


Figura 3: Concentración de clorofila A y B (µg/g)

Al tratarse de especies de **diferentes familias**, observamos que la mayor producción de clorofila a respecto a la b, es una constante al menos en estas especies, al igual que en *Lenma sp.*

Conclusión

Se concluye que el tratamiento de 2ml/l de concentración de nutrientes provocó mayor producción de unidades foliares de estas plantas y menos algas después de una semana, obteniendo estas mismas hojas mayor concentración de clorofila de 1.397 mg/g a comparación de los otros dos tratamientos, el cual fue evaluado con ayuda de un espectrofotómetro.

Referencias bibliográficas

- Valenzuela Perez, J. CALIBRACION Y ESTIMACION DE LA SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA DE *Lemna valdiviana* Phil (Araceae) EN LA REALIZACIÓN DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD CRÓNICA MEDIANTE DICROMATO DE POTASIO Y SULFATO DE COBRE COMO TOXICOS DE REFERENCIA. (Tesis. Biología Marina). Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile: 2013. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcv1611c/doc/fcv1611c.pdf>
- Santiago Ruiz et al. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA EN HOJAS COMESTIBLES DEL ESTADO DE TABASCO. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos (Vol. 4). Universidad Tecnológica de Tabasco, División de Procesos Industriales. Tabasco, México: 2019. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/10/12/6.pdf>