

ECUACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS TRICROMATICAS  
PARA LA DETERMINACION DE CLOROFILAS a, b y c  
Y SUS FEOFITINAS.

por:

ROBERTO MILLAN NUÑEZ

SAUL ALVAREZ BORREGO

Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada, B.C.  
Espinoza 843, Ensenada, B.C.

RESUMEN.

Utilizando los coeficientes específicos de absorbancia para clorofilas a, b y c reportados por Parsons y Strickland (1963), y las razones de absorbancia de estas clorofilas y sus feofitinas reportadas por Lorenzen (1967), se plantearon seis ecuaciones básicas lineales de absorbancia en función de las concentraciones de estos seis pigmentos. Tres de ellas corresponden a los máximos de absorbancia de estos pigmentos en acetona al 90%, y las otras tres corresponden a las absorbancias después de acidificar. La solución de este sistema de ecuaciones nos permite calcular las concentraciones en función de las absorbancias. Para evitar la acumulación de errores numéricos debido a la imprecisión de los coeficientes específicos, después de un primer cálculo con las seis ecuaciones se puede decidir cuales pigmentos tienen concentración significativamente mayor de cero (v.g.: mayor que  $0.1 \text{ mg/m}^3$ ), y utilizar un sistema de ecuaciones que solamente los considere a ellos. Para esto, se diseñó un programa de computadora que incluye una serie de sistemas de ecuaciones, desde con seis incógnitas hasta con una incógnita. Para evitar problemas de turbidez al acidificar se sugiere el uso de una solución de 50% de acetona al 90% y 50% de dimetil sulfóxido, de acuerdo con Shoaf y Lium (1976).

## ECUACIONES PARA CLOROFILAS Y SUS FEOFITINAS

### ABSTRACT.

Using the chlorophylls a, b and c specific absorbance coefficients of Parsons and Strickland (1963), and the chlorophyll to phaeophytin absorbance ratios of Lorenzen (1967), six linear equations of absorbance as a function of pigment concentration were established. Three correspond to the absorbance maxima of these pigments in 90% acetone, and three correspond to the absorbances after acidification. Solving this equation system we obtained expressions for the concentration of the six pigments. After a first calculation, one can decide which pigments have concentrations significantly above zero (i.e.: greater than  $0.1 \text{ mg/m}^3$ ), and then recalculate them with an equation system that only considers them. This way "noise" is minimized. To do this, a computer program was made to consider a series of equation systems, from one with six variables to one with one variable. To avoid turbidity problems after acidification we use a solution with 90% acetone and dimethyl sulfoxide in a one to one volume ratio as suggested by Shoaf and Lium (1976).

### INTRODUCCION.

La determinación precisa de las diferentes clorofilas y sus productos de degradación puede ser de utilidad para estimar la biomasa de fitoplancton. La proporción relativa de las diferentes clorofilas nos puede dar una idea a "grosso modo" de los grupos taxonómicos dominantes (Richards y Thompson, 1952). Y la proporción relativa de las clorofilas y sus productos de degradación es indicador de la edad y estado fisiológico de las poblaciones fitoplanctónicas, y de la intensidad del pastoreo por el zooplancton (Margalef, 1974). Ryther y Yentsch (1957) propusieron un método para estimar la productividad orgánica primaria por fitoplancton en el océano, conociendo la concentración de clorofila a y la intensidad de luz solar en el agua. Este método fue modificado por Small, Curl y Glooschenko (1972) para permitir el considerar que la concentración de clorofila a varía en función del tiempo, durante el día.

Al realizar los análisis en muestras de agua de mar, muy a menudo se ha asumido que solamente se pueden encontrar presentes las clorofilas a, b y c, sin considerar los productos de degradación (Richards y Thompson, 1952; Parsons y Strickland, 1963). Vernon (1960) presentó ecuaciones espectrofotométricas para la determinación de clorofilas a y b y sus feofitinas en extractos de plantas terrestres. Lorenzen (1967) propuso ecuaciones para determinar clorofila a y su feofitina. De acuerdo con Lorenzen (1967) el intentar la determinación de las tres clorofilas y sus feofitinas

no es deseable ya que sería muy alta la incertidumbre de los valores calculados para las clorofilas b y c y sus feofitinas. El asumir que en aguas del océano abierto sólo se encuentran presentes la clorofila a y su feofitina posiblemente no induce a un grave error. Sin embargo, en las lagunas costeras y bahías de Baja California, donde existen intensos gradientes de temperatura y salinidad (Chávez de Nishikawa y Alvarez Borrego, 1974), y por lo tanto hay mayor diversidad de especies (Alvarez Borrego y López Alvarez, 1974), el asumir solamente la presencia de clorofila a sí puede ser grave. Lara Lara y Alvarez Borrego (1975), utilizando las ecuaciones de Parsons y Strickland (1963), encontraron concentraciones altas de clorofila b y c en Bahía San Quintín, y utilizando las ecuaciones de Lorenzen (1967) determinaron concentraciones relativamente altas de feofitina a. Esto nos indica que es conveniente desarrollar un sistema de ecuaciones espectrofotométricas que considere las tres clorofilas y sus tres feofitinas. Este es el objetivo del presente trabajo.

#### ECUACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS.

Utilizando los coeficientes específicos de absorbancia para las clorofilas a, b y c reportados por Parsons y Strickland (1963), y las razones de absorbancia de estas clorofilas y sus feofitinas reportadas por Lorenzen (1967), se pueden plantear sistemas de ecuaciones que consideren los seis pigmentos de interés, o menos, hasta incluso aquella que considere sólo la presencia de clorofila a. Estas ecuaciones expresan las absorbancias en función de las cantidades de los pigmentos presentes en el solvente. Las absorbancias corresponden a las longitudes de onda donde se tienen los máximos para cada clorofila. Esto es, 665 nm para clorofila a, 645 nm para clorofila b, y 630 nm para clorofila c. Los coeficientes específicos están dados en por microgramo de pigmento, por cm de longitud de celda ( $\mu\text{gr}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Para la determinación de las feofitinas se obtienen lecturas de absorbancia, a las mismas longitudes de onda, después de acidificar (para más detalle véase Lorenzen, 1967).

El caso más completo, que es el de un sistema de seis ecuaciones lineales simultáneas, con las cantidades de los seis pigmentos como incógnitas, se muestra en la parte superior de la Tabla I, y su solución se muestra en la parte inferior de la misma.  $A_{665}$ ,  $A_{645}$  y  $A_{630}$  son las absorbancias de la muestra a 665 nm, 645 nm y 630 nm, respectivamente, utilizando acetona al 90% como solvente, u otro solvente con las mismas propiedades espectrofotométricas en relación a estos pigmentos. Con el subíndice "a" las A's simbolizan las absorbancias después de acidificar la muestra con ácido clorhídrico.  $Q_1$ ,  $Q_2$  y  $Q_3$  son las cantidades de las clorofilas a, b y c respectivamente, expresadas en microgramos, y  $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$  son las de las respectivas feofitinas. La letra E seguida de un número significa

## ECUACIONES PARA CLOROFILAS Y SUS FEOFITINAS

el factor diez elevado a un exponente de acuerdo con la notación científica. En las Tablas I y III, los coeficientes con notación científica son de un orden de magnitud despreciable (v.g.:  $10^{-23}$ ), sin embargo se incluyeron para presentar los resultados completos. Pero al realizar los cálculos se ignoran. Para calcular las concentraciones de los pigmentos en el agua de mar se usa la muy conocida expresión:

$$C_i = Q_i(v/V) \mu\text{gr/litro o mg/m}^3$$

donde  $C_i$  es la concentración en el agua de mar,  $v$  el volumen en litros del solvente utilizado y  $V$  es el volumen en litros del agua de mar filtrada para obtener la muestra.

Para evitar la acumulación de errores numéricos debidos a la imprecisión de los coeficientes específicos, después de un primer cálculo con las seis ecuaciones se puede decidir cuales pigmentos tienen concentración significativamente mayor de cero, por ejemplo mayor que  $0.1 \text{ mg/m}^3$ . Luego, se pueden recalcular utilizando un sistema de ecuaciones que solamente los considere a ellos. Para ésto, hemos resuelto una serie de sistemas de ecuaciones simultáneas. Cada sistema considera una combinación diferente, desde los seis pigmentos juntos hasta el que tiene solamente a la clorofila a. La Tabla II muestra la secuencia en que son considerados estos sistemas de ecuaciones en el programa de computadora que usamos para los cálculos. C y F

$$A_{665} = 0.089 Q_1 + 0.05235 P_1 + 0.0063 Q_2 + 0.0063 P_2 + 0.0007 Q_3 + 0.0007 P_3$$

$$A_{665a} = 0.05235 Q_1 + 0.05235 P_1 + 0.0063 Q_2 + 0.0063 P_2 + 0.0007 Q_3 + 0.0007 P_3$$

$$A_{645} = 0.0218 Q_1 + 0.01557 P_1 + 0.054 Q_2 + 0.0236 P_2 + 0.0043 Q_3 + 0.00215 P_3$$

$$A_{645a} = 0.01557 Q_1 + 0.01557 P_1 + 0.0236 Q_2 + 0.0236 P_2 + 0.00215 Q_3 + 0.00215 P_3$$

$$A_{630} = 0.0139 Q_1 + 0.00695 P_1 + 0.0164 Q_2 + 0.0082 P_2 + 0.0195 Q_3 + 0.00629 P_3$$

$$A_{630a} = 0.00695 Q_1 + 0.00695 P_1 + 0.0082 Q_2 + 0.0082 P_2 + 0.00629 Q_3 + 0.00629 P_3$$

$$Q_1 = 27.285 A_{665} - (2.0E-24) A_{645} - (1.0E-23) A_{630} - 27.285 A_{665a} - (3.3E-12) A_{645a} - (3.8E-12) A_{630a}$$

$$Q_2 = -4.786 A_{665} + 34.405 A_{645} - 5.599 A_{630} + 4.786 A_{665a} - 34.405 A_{645a} + 5.599 A_{630a}$$

$$Q_3 = -11.383 A_{665} - 21.356 A_{645} + 79.176 A_{630} - 11.383 A_{665a} + 21.356 A_{645a} - 79.176 A_{630a}$$

$$P_1 = -27.285 A_{665} - (1.0E-11) A_{645} - (1.0E-12) A_{630} + 48.049 A_{665a} - 5.379 A_{645a} - 0.472 A_{630a}$$

$$P_2 = 4.786 A_{665} - 34.405 A_{645} + 5.599 A_{630} - 17.960 A_{665a} + 85.901 A_{645a} - 21.735 A_{630a}$$

$$P_3 = 11.384 A_{665} + 21.356 A_{645} - 79.176 A_{630} - 17.153 A_{665a} - 82.546 A_{645a} + 259.716 A_{630a}$$

Tabla I. Sistema de seis ecuaciones de absorbancias en función de las concentraciones de los pigmentos (parte superior), y su solución mostrando estas últimas en función de las primeras (parte inferior) (para explicación véase texto).

1	Ca, Cb, Cc, Fa, Fb, Fc	8	Ca, Cb, Fa, Fb
2	Ca, Cb, Cc, Fa, Fb	9	Ca, Cb, Fa
3	Ca, Cb, Cc, Fa, Fc	10	Ca, Cb
4	Ca, Cb, Cc, Fa	11	Ca, Cc
5	Ca, Cc, Fa, Fc	12	Ca, Fa
6	Ca, Cc, Fa	13	Ca
7	Ca, Cb, Cc		

Tabla II. Pigmentos cuya presencia consideran los diferentes sistemas de ecuaciones. Los números indican el orden en que estos sistemas están arreglados en el programa de computadora.

simbolizan las concentraciones de clorofilas y feofitinas respectivamente. La Tabla III muestra los valores de los coeficientes de las absorbancias para los diferentes sistemas de ecuaciones de la Tabla II.  $K_1$  es el coeficiente de la absorbancia de la muestra a 665 nm antes de acidificar ( $A_{665}$ ),  $K_2$ ,  $K_3$ ,  $K_4$ ,  $K_5$  y  $K_6$  son los coeficientes de  $A_{645}$ ,  $A_{630}$ ,  $A_{665a}$ ,  $A_{645a}$  y  $A_{630a}$  respectivamente. Los números del 1 al 13 de la segunda columna de la Tabla III corresponden al orden de los sistemas de ecuaciones de acuerdo con la Tabla II.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Estos sistemas de ecuaciones se han utilizado para el cálculo de pigmentos en muestras del Estero de Punta Banda y Bahía San Quintín, Baja California. El método utilizado para muestreo y análisis es básicamente el de SCOR-UNESCO (1966). Acidificando con HCl al 10%, y utilizando un solvente preparado con acetona al 90% y dimetil sulfóxido en proporción de uno a uno en volumen, como lo han sugerido Shoaf y Lium (1976) para evitar problemas de turbidez. Se hicieron lecturas de 750 nm para correcciones de celda a celda y de turbidez. Para las lecturas se usó un espectrofotómetro Spectronic UV 210 digital de la Shimadzu y Bausch & Lomb. Se usaron celdas de 1 cm.

ECUACIONES PARA CLOROFILAS Y SUS FEOFITINAS

		K1	K2	K3	K4	K5	K6	
Q <sub>1</sub>	1	27.285	-2.0E-24	-1.0 E -23	-27.285	-3.3 E -12	-3.8 E -12	
	2	27.285	3.1 E -13	-1.2 E -12	-27.285	-4.5 E -12		
	3	27.285	-1.3 E -12	2.2 E -13	-27.285		-4.6 E -12	
	4	27.285	-1.6 E -12	-1.2 E -12	-27.285			
	5	27.285			-27.285		-4.8 E -12	
	6	27.285		-1.5 E -12	-27.285			
	7	11.577	-1.312	-0.126				
	8	27.285			-27.285	-4.6 E -12		
	9	27.285	-1.9 E -12		-27.285			
	10	11.566	-1.349					
	11	11.299		-0.406				
	12	27.285			-27.285			
	13	11.236						
Q <sub>2</sub>	1	-4.786	34.405	-5.599	4.786	-34.405	5.599	
	2	-5.032	33.945	-3.893	5.156	-32.625		
	3	-2.869	20.625	-3.357	-2.407		-3.106	
	4	-2.662	20.473	-4.317	-2.854			
	7	-4.304	20.336	-4.330				
	8	-5.592	32.895		5.592	-32.895		
	9	-3.261	19.184		-2.445			
	10	-4.669	19.063					
	Q <sub>3</sub>	1	-11.383	-21.356	79.176	-11.383	21.356	-79.176
		2	-7.913	-14.846	55.039	6.155	-3.808	
3		-12.574	-12.803	77.784	15.849		-73.772	
4		-7.637	-16.418	54.989	-7.637			
5		-14.355		75.700	14.355		-75.700	
6		-9.771		51.528	2.930			
7		-4.632	-16.167	55.013				
11		-8.054		51.571				
P <sub>1</sub>	1	-27.285	-1.0 E -11	-1.0 E -12	48.049	-5.379	-0.472	
	2	-27.264	0.039	-1.144	48.019	-5.529		
	3	-26.985	-2.154	0.351	46.925		-1.833	
	4	-26.863	-2.244	-0.221	46.661			
	5	-27.285		-7.0 E -12	46.674		-2.158	
	6	-27.154		-0.689	46.348			
	8	-27.285	1.0 E -11		48.035	-5.539		
	9	-26.892	-2.309		46.682			
	12	-27.285			46.387			
	P <sub>2</sub>	1	4.786	-34.405	5.599	-17.960	85.901	-21.735
		2	5.739	-32.618	-1.027	-19.396	78.993	
		8	5.592	-32.895		-19.281	78.922	
P <sub>3</sub>	1	11.384	21.356	-79.176	-17.153	-82.546	259.716	
	3	15.984	-11.705	-73.795	-34.412		238.829	
	5	14.355		-75.700	-35.778		237.067	

Tabla III. Coeficientes de las ecuaciones espectrofotométricas. Para explicación ver texto.

MILLAN NUÑEZ - ALVAREZ BORREGO

En otro trabajo reportaremos los resultados de una manera más amplia. Aquí solamente presentamos los resultados comparativos de tres muestras en que se han calculado las concentraciones de los pigmentos mediante las ecuaciones de Parsons y Strickland (1963), de Lorenzen (1967) y con las nuestras (Tabla IV). En la primera muestra se puede apreciar que con la presencia de concentraciones relativamente altas de feofitinas, se puede incurrir en un error porcentualmente alto al calcular las clorofilas con las ecuaciones de Parsons y Strickland (1963). La clorofila a se estimó en 3.3 mg/m<sup>3</sup> al ignorar las feofitinas, y el valor bajó a 2.4 y 2.5 al considerar la feofitina a con las ecuaciones del Lorenzen (1967) y las nuestras, respectivamente. Además, la concentración de clorofila c es más alta que la de clorofila a, por lo cual se vé que es importante considerarla a pesar de la relativamente pobre precisión. Con estos ejemplos se puede apreciar que se tiene una información más completa y exacta con nuestras ecuaciones.

Es importante dejar bien claro que nuestro procedimiento implica poco trabajo extra al que implica por ejemplo el sugerido por Lorenzen (1967), en cuanto al análisis se refiere, porque sólo hay que hacer algunas lecturas más de absorbancia, lo cual es muy sencillo. Una vez contando con el programa de computadora, el trabajo extra del cálculo sólo implica el manipular más datos de absorbancias.

	Ca	Cb	Cc	Fa	Fb	Fc
Parsons y Strickland (1963)	3.3	0.8	3.6			
Lorenzen (1967)	2.4			1.5		
Este trabajo	2.5	0.5	3.8	1.3	0.4	
Parsons y Strickland (1963)	3.9	1.0	5.1			
Lorenzen (1967)	3.8			0.4		
Este trabajo	3.8	0.9	5.0	0.2		0.5
Parsons y Strickland (1963)	4.0	1.8	6.4			
Lorenzen (1967)	4.5			-0.8		
Este trabajo	4.0	1.8	6.4			

Tabla IV. Resultados del análisis de tres muestras. Las concentraciones están en mg/m<sup>3</sup>. C simboliza las concentraciones de clorofilas y F las de feofitinas.

## ECUACIONES PARA CLOROFILAS Y SUS FEOFITINAS

En la Tabla III se puede notar que en los sistemas de ecuaciones donde se considera la presencia de la feofitina a (1,2,3,4,5,6,8,9 y 12), la corrección de la concentración de clorofila a por la presencia de clorofilas b y c y sus respectivas feofitinas es insignificante. Esto significa que al estimar la concentración de clorofila a, corrigiendo por la presencia de feofitina a, las ecuaciones de Lorenzen (1967) (que son el sistema 12) dan los mismos valores que las nuestras aún cuando se considere la presencia de los otros pigmentos en éstas últimas. Sin embargo hay casos como el último de la Tabla IV, en que resultan valores negativos para la concentración de feofitina a con las ecuaciones de Lorenzen (1967), lo cual no es real. Esto implica una sobreestimación de la clorofila a. Con nuestro método este problema se está evitando un tanto forzadamente ya que el programa de computadora, al encontrar un valor menor que  $0.1 \text{ mg/m}^3$ , pasa a otro sistema de ecuaciones que no considera ese pigmento. En este tercer caso (Tabla IV), el sistema de ecuaciones utilizado en nuestro método (7) fué el mismo de Parsons y Strickland (1963) ya que considera la presencia de las tres clorofilas sóloamente. Además de nosotros, otros investigadores han obtenido valores negativos de feofitina a con las ecuaciones de Lorenzen (1967) (Small; Lara Lara, ambos comunicación personal). Es posible que ésto se deba a que en esos casos se están acidificando las muestras en exceso y los pigmentos se están degradando más allá de la transformación a feofitinas. Ya que lo que causa el cálculo de feofitina a negativa son muy bajos valores de absorvancia después de acidificar. Es necesario determinar más apropiadamente cuanto ácido debe agregarse.

No tenemos al momento una idea clara sobre la precisión y la exactitud (errores al azar y errores sistemáticos) de nuestro método. La tecnología que usamos es básicamente la misma que Parsons y Strickland (1963) y Lorenzen (1967) para muestreo y análisis, por lo cual la precisión debe ser similar. Sin embargo, definitivamente nuestra exactitud debe ser mejor que la de estos autores ya que nuestros sistemas de ecuaciones no ignoran ninguno de los seis pigmentos, con excepción del cálculo de la clorofila a con las ecuaciones de Lorenzen (1967) que dan prácticamente los mismos valores que con nuestras ecuaciones cuando los valores de feofitina a no resultan negativos.

### BIBLIOGRAFIA.

Alvarez Borrego, S. Y C. López Alvarez. 1974. Distribución de biomasa de fitoplancton por grupos taxonómicos en Bahía San Quintín, B.C., a través de un ciclo anual (julio de 1973 a julio de 1974). En: Segundo reporte de los estudios bioecológicos y trabajos de ostricultura en Bahía San Quintín, B.C. (II etapa); para la Dirección de Acuicultura de la S.R.H. (no publicado).



- Chávez de Nishikawa, A. G. y S. Alvarez Borrego. 1974. Hidrología de Bahía San Quintín en invierno y primavera. *Ciencias Marinas (Mex)*. 1(2):31-62.
- Lara Lara, J. R. y S. Alvarez Borrego. 1975. Ciclo anual de clorofilas y producción orgánica primaria en Bahía San Quintín, B.C. *Ciencias Marinas (Mex)*. 2(1):77-97.
- Lorenzen, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*. 12(2):343-346.
- Margalef, R. 1974. Modelos experimentales de fitoplancton: nuevas observaciones sobre pigmentos y fijación de carbono inorgánico. *Investigación pesquera*. 26:195-203.
- Parsons, T. R. y J. D. H. Strickland. 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Marine Research*. 21:155-163.
- Richards, F. A. y T. G. Thompson. 1952. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Marine Research*. 11:156-172.
- Ryther, J. H. y C. S. Yentsch. 1957. The estimation of phytoplankton production in the ocean from chlorophyll and light data. *Limnology and Oceanography*. 2(2):281-286.
- SCOR-UNESCO. 1966. Determination of photosynthetic pigments. *Monogr. Oceanogr. Methodol.* 1.18p.
- Shoaf, W. T. y B. W. Liem. 1976. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. *Limnology and Oceanography*, Vol. 21, No. 6:926-928.
- Small, L. H., H. Curl Jr. y W. A. Glooschenko. 1972. Estimates of primary production off Oregon using an improved chlorophyll-light technique. *J. Fish. Rs. Bd. Canada*. 29: 1261-1267.
- Vernon, L. P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Anal. Chemistry*. 32: 1144-1150.

Recibido: 16 de Mayo de 1978.