

Extracción y determinación de clorofilas totales de material vegetal

Para la determinación del contenido de clorofilas totales de la biomasa se utiliza el método espectrofotométrico propuesto por Hansmann (1973).

Material:

- Tubos de ensayo
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de 1,2,5 y 10 mL
- Espectrofotómetro y cubetas de 1 cm
- Centrifuga
- Acetona: agua 90% (v/v)

Procedimiento:

La muestra (2 g) se tritura y suspende en un volumen determinado (5-10 ml) de acetona-agua al 90% (v/v) como disolvente extractor de los pigmentos. Se agita y se deja reposar en la oscuridad a 4 °C durante 24 h. Después de este periodo se lleva a temperatura ambiente, se repone el disolvente que pueda haberse evaporado y se centrifuga a 2700xg durante 5 minutos. Se mide la densidad óptica del sobrenadante a 665, 645 y 630 nm, comprobando que no existe turbidez ni partículas en suspensión. Como blanco se utiliza el propio disolvente.

Cálculos:

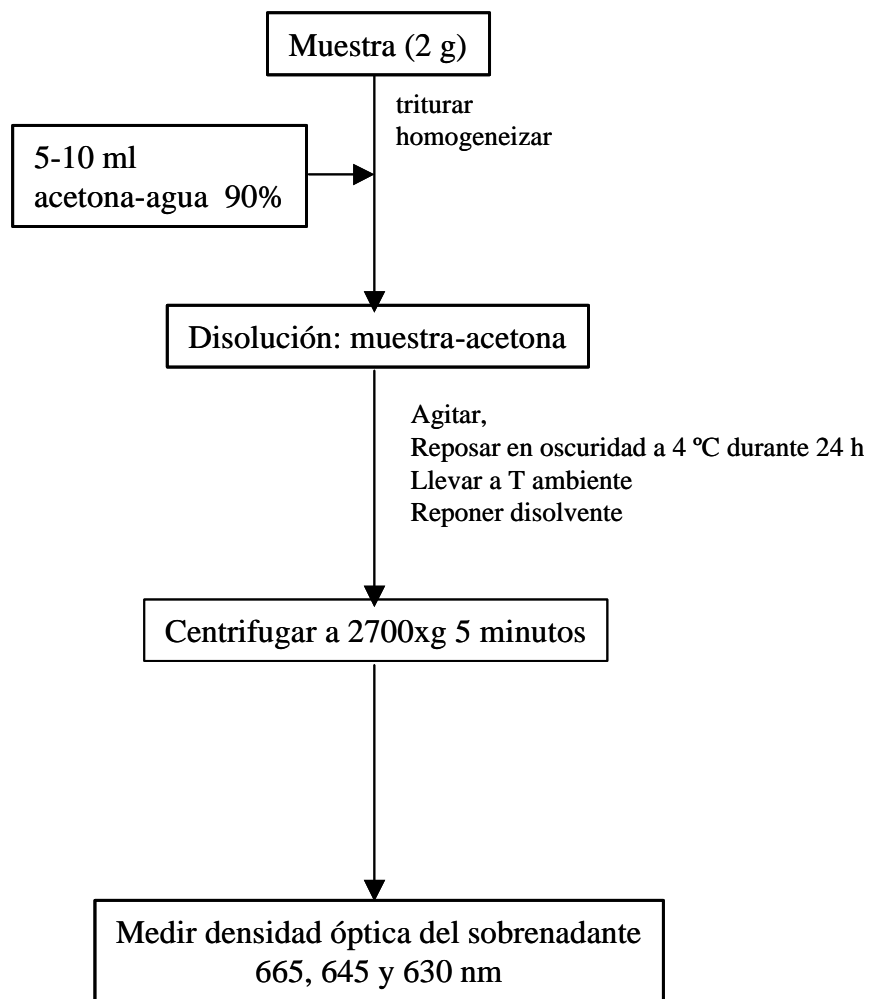
Para la cuantificación se utiliza la ecuación propuesta por Parsons y Strickland (1965):

$$Ca \text{ (mgAl}^{-1}\text{)} = 11,6AD.O.665 - 1,31 D.O.645 - 0,14 D.O.630$$

$$Cb \text{ (mgAl}^{-1}\text{)} = 20,7AD.O.645 - 4,34 D.O.665 - 4,42 D.O.630$$

$$Cc \text{ (mgAl}^{-1}\text{)} = 55,0 D.O.630 - 4,64 D.O.665 - 16,3 D.O.645$$

Donde Ca, Cb y Cc son las concentraciones de clorofila a, b y c respectivamente, y D.O. es la densidad óptica medida.



Resultados:

Extracción y determinación de carotenoides en material vegetal

El método utilizado para la determinación del contenido en carotenoides es una modificación del empleado por Whyte (1987).

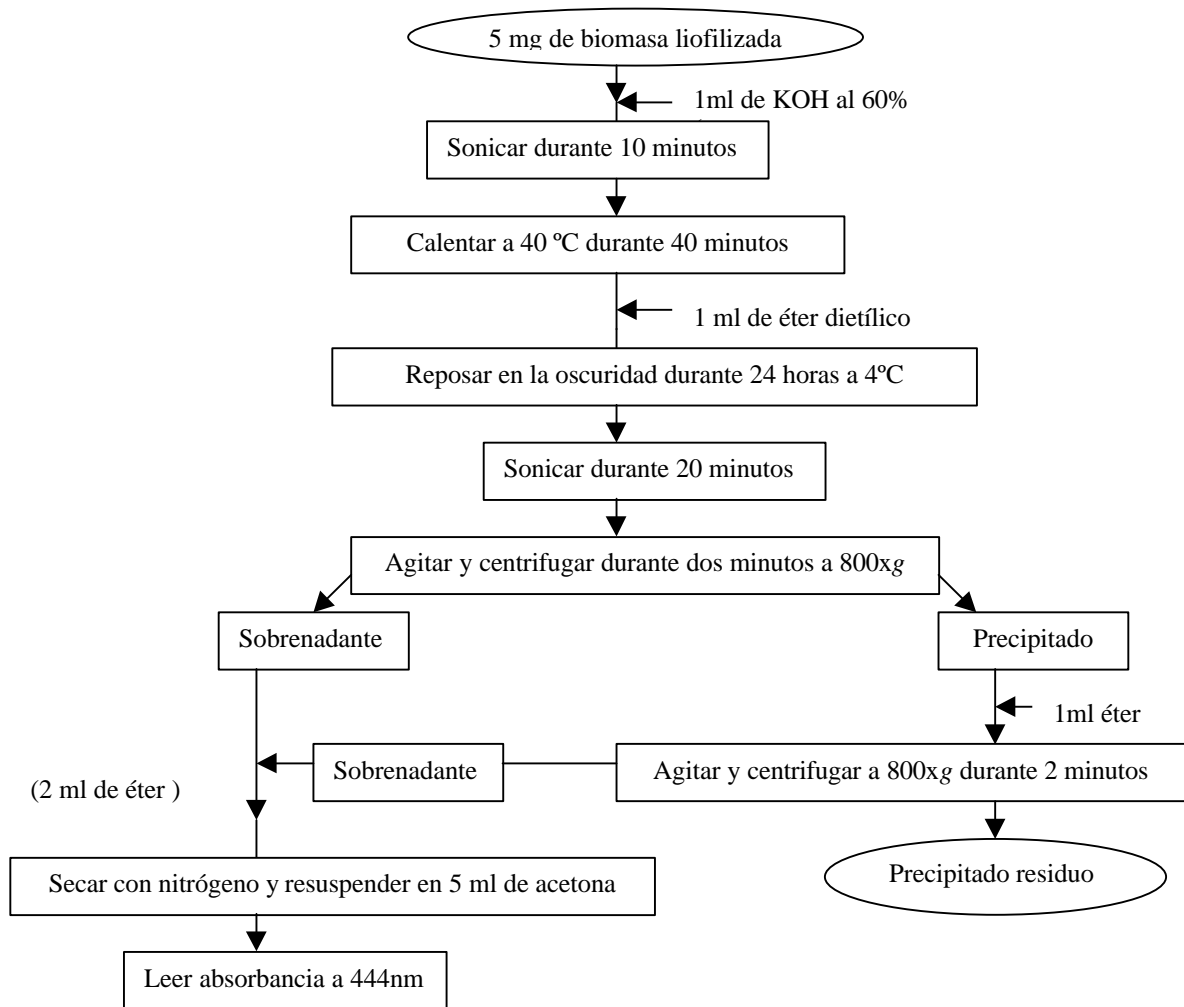
- Tubos de ensayo
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de 1,2,5 y 10 mL
- Espectrofotómetro y cubetas de 1 cm
- Centrífuga
- KOH 60% (p/p)
- Éter dietílico
- Éter de petróleo
- Acetona

Procedimiento:

A 100 mg de material vegetal, triturado y dispuesto en un tubo de ensayo, se le añaden 1 ml de KOH 60% (p/p). Se somete a ultrasonidos durante 10 minutos. El homogeneizado se calienta a 40 °C durante 40 minutos, se agita y se deja reposar en oscuridad a 4 °C durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo, se lleva a ultrasonidos de nuevo durante 20 minutos y se extraen los pigmentos con 1 ml de éter dietílico tras centrifugar a 800xg durante 2 minutos. Se realiza una segunda extracción con éter dietílico, para a continuación llevar a sequedad bajo corriente de nitrógeno, resuspendiendo finalmente en 5 ml de acetona. Se mide la densidad óptica a una longitud de onda de 444 nm en cubetas de vidrio de 1 cm de paso de luz utilizando acetona como blanco.

La concentración en mgAl^{-1} se obtiene mediante la recta patrón, realizada con β -caroteno como soluto y acetona como disolvente:

$$C (\text{mgAl}^{-1}) = 0.0051A_{\text{D.O.444}} + 0.00003 \quad r^2 = 0.999$$



Resultados: