

Porfirinas en semillas de *Pinus pinea* germinantes

por

M. SANZ MUÑOZ y M.^a M. MENDEZ MARCO

Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.
Madrid-3

S U M M A R Y

Protoporphyrin and coproporphyrin were detected and identified by thin layer chromatography and spectrophotometry in *Pinus pinea* seed non-stratified and stratified and at different stages of germination after stratification.

Cold stratification and much more germination, exert an influence on the biosynthesis of porphyrins, but this influence is lesser than when the extracts obtained from seeds at different stages of germination are incubated with a mixture of compounds as glycine, pyridoxalphosphate, magnesium chloride, ATP and succinate, that stimulate formation of d-aminolevulinic acid.

En la semilla de *Pinus pinea* se detectaron sus dos clorofilas *a* y *b* y se estudió la evolución cuantitativa de las mismas durante el curso de la pregerminación y germinación propiamente dicha (Sanz Muñoz y Pozo Hernández, 1979). Igualmente se demostró la presencia de las enzimas d-ALA sintetasa y d-ALA dehidrasa que intervienen en las primeras fases de la biosíntesis de porfirinas y estudiaron sus principales características enzimáticas. En este trabajo se ha tratado de detectar e identificar la existencia y clase de porfirinas que pudiesen haber en semillas no germinadas y en semillas durante el proceso de la germinación, y la evolución cuantitativa de las mismas en diferentes estadios de pregerminación y germinación propiamente dicha.

1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1. Material

El material que se ha empleado ha sido semillas de *Pinus pinea* procedentes de Coca (Segovia) con una capacidad germinativa del 95 por 100. La estratificación en frío se realizó poniendo capas alternantes de vermiculita humedecida con agua y piñones completos,

es decir con cubiertas a una temperatura de 4° C durante diferentes períodos de tiempo. La germinación se verificó en cámara de Jacobson a grado de humedad constante y a 29-30° C.

Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro Beckman modelo D. U. Para las centrifugaciones se usó una centrifuga refrigerada R-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge. Para la sonicación se utilizó un aparato Omni-Mixer Serval y para las incubaciones el baño Gallenkamp regulable a varias temperaturas. Para visualizar las manchas de porfirinas en las placas de cromatografía en capa delgada se empleó la lámpara de luz ultravioleta Hanovia-Lange. Para las medidas de pH se utilizó el potenciómetro de Radiometer Copenhagen pH Meter 22.

1.2. Métodos

1.2.1. Porphirinas libres. Su identificación

1.2.1.1. Identificación previa

Para su reconocimiento hemos tratado de identificarlos en embriones realizando extracciones en las cuales se puede detectar por su banda de absorción en el visible a 500, 540, 580 y 620 nm. Pero todas ellas incluso las metalo y hematoporfirinas tienen una banda de absorción en el U. V. próximo, llamada de Soret que permite determinarlas con una mayor sensibilidad de 10-20 veces más que en el visible y en cubetas de 1 cm de espesor y llegar a caracterizarlas a concentraciones del orden de 10^{-6} mg/ml. En soluciones clorhídricas 2 N las bandas de Soret, con los máximos de absorción respectivos, son los siguientes: uroporfirina, 405 nm; coproporfirina, 402 nm; protoporfirina, 409 nm; deutoporfirina, 404 nm, y mesoporfirina, 401 nm.

1.2.1.2. Límites de sensibilidad de visualización de la fluorescencia roja de porfirinas libres

Empleando protoporfirina sódica de la casa Sigma en solución acuosa y coproporfirina Sigma en CIH 0,1 N y llevada a pH 8 con amoníaco diluido y una mezcla de ambas, logramos obtener dos manchas por cromatografía en capa delgada perfectamente separadas de diferentes Rf e intensa fluorescencia roja a la luz U. V. Como límite de sensibilidad de visualización de las manchas de las manchas de las soluciones patrones preparadas con la sal sódica de protoporfirina a concentraciones de 1 µg/µl, 0,1 µg/µl, 0,01 µg/µl, y 0,001 µg/µl aplicadas en los frentes de partida de las placas en can-

alidad de 5 µl, sólo hasta la diluida al 1/100 se visualiza su fluorescencia a la luz U. V., pero no la diluida al 1/1.000, es decir que la fluorescencia roja solo se detecta hasta los 0,05 µg = $5,10^{-2}$ µg, pero no a los 0,005 µg = $5,10^{-3}$ µg. Los cromatogramas en capa delgada se efectúan como se indica en el apartado 1.2.1.2; para más detalles véase la tesis doctoral (Mercedes Méndez Marco, 1979) «Delta aminolevulinato sintetasa, Delta aminolevulinato dehidrasa y Porphirinas en semillas de *Pinus pinea* germinantes». Los eluatos de estas manchas preparados con CIH 2 N dieron los máximos de absorción característicos de las bandas de Soret correspondientes de 409 y 402 nm a proto y coproporfirina respectivamente.

1.2.1.3. Límite de sensibilidad de visualización de la fluorescencia roja de protoporfirina IX al estado de ester

Para ello se emplearon protoporfirina IX dimetilester de hemina de buey de la firma Sigma y otra esterificada por nosotros a partir de la protoporfirina sal sódica, la cual se puso en contacto durante 24 horas con 20 ml de metanol que llevaba incorporado 1 ml de SO_4H_2 concentrado. Después de diluir con 20 ml de agua se extrae con una mezcla de éter sulfúrico (50 ml) y cloroformo (20 ml) y reextrae con más Cl_3CH . Los extractos reunidos se lavan con agua amoniacal al 2 por 100 y después con más agua. La capa etérea después de desecación con SO_4Na_2 anhidro se evapora al vacío para concentrar y por último los 20 ml restantes se dejan evaporar hasta sequedad. Resulta un polvo oscuro con curvas de absorción en campana y un pico correcto en 409 nm empleando como disolvente tanto cloroformo como CIN 2 N.

Para investigar el límite de sensibilidad se emplearon placas de cromatografía en capa delgada de $10 \times 6,6$ cm de la casa Eastman Kodak, siendo el adsorbente de revestimiento, gel de sílica. Las aplicaciones realizadas de 20 µl de cada una de las soluciones con contenido de 0,9, 0,8, 0,7, etc. hasta 0,1 µg/ml. El desarrollo del cromatograma se efectuó según la técnica de Chu y Chu (1966). Los Rf de cada una de las manchas fueron muy semejantes y solo se deja de percibir fluorescencia roja en aquellas soluciones de aplicación menor de 0,4 µg/ml. Por consiguiente el límite de sensibilidad fue de $0,008 \mu\text{g} = 8,10^{-3}$.

De los resultados obtenidos descritos en este apartado y en el 1.2.1.2 se infiere que existe más alta sensibilidad para la detección de fluorescencia roja en los esteres de protoporfirina que en las protoporfirinas libres y que para niveles más bajos de detección de fluorescencia roja, aunque ésta no se detecte, sin embargo se pueden captar todavía sus máximos de absorción por espectrofotometría.

1.2.1.4. Extracciones de porfirinas libres

Las extracciones se realizan a partir de un gramo de embriones exactamente pesados, triturando en mortero con 3 cc de fosfato buffer 0,1 M de pH 6,9 (enfriando mientras con hielo a 0° C) y con arena lavada, enfriada igualmente con hielo hasta estar muy bien homogenizado. El líquido se pasa por filtro de papel de filtrar jarabes o por lienzo de muselina a un matraz aforado (5 ml). Se reextrae por trituración del residuo que queda en el mortero con otros 2 ml de buffer y se pasa al matraz aforado todo el líquido y después de escurrido el residuo del mortero se exprime bien y por último se afora a 5 ml. En una parte alícuota (1 ml) se determinan proteínas según Lowry (1951) y en otra (2 ml) se efectúa una incubación con arreglo al método de Kikuchi, Kumar y col. (1958) con sustancias que favorecen la formación de d-ALA (y por ende la de porfirinas) como glicocola 50 μ mol, piridoxalfosfato 0,25 μ mol, Cl_2Mg 2 μ mol, succinato 2 μ mol y ATP 2 μ mol. Después de incubar 80 minutos a 34° C y parar la reacción con 1/5 del volumen de ácido tricloroacético al 20 por 100 y centrifugar a 1.200 r/p durante 15 minutos se pasa el sobrenadante por una columna de Dowex 50 W (200-400 mallas) y eluye con acetato amónico 1 M hasta 5 ml. Una parte alícuota del eluato (1 ml) se lleva a 10 ml de ClH 2 N y determinan espectralmente las bandas de Soret en longitudes de onda comprendidas entre 380 y 430 nm. Los residuos de las respectivas centrifugaciones anteriores se agitan intensamente con 5 ml de ClH 2 N, centrifugan a 1.200 r/m durante 15 minutos y en los sobrenadantes se determinan igualmente las porfirinas. Las determinaciones cuantitativas se han realizado como se indica más adelante en el apartado 1.3 y en este caso de porfirinas libres se pueden referir además de μ g por g de peso húmedo a la cantidad de proteínas expresadas en mg.

También se ha realizado la extracción de porfirinas libres a partir de piñones mediante la técnica de Tait y Gibson (1961), después de triturar aquellos con arena de mar lavada y desengrasar fraccionadamente con acetona hasta desaparición de la grasa. Del extracto final de acetato de etilo, se toma una parte alícuota y evapora al vacío en matraz de color topacio hasta muy pequeño volumen para realizar C. C. D. y otra parte alícuota se evapora totalmente y el residuo se disuelve en ClH 2 N y determina sus espectros de absorción entre 380 y 430 nm para averiguar sus máximos.

Las cromatografías en capa delgada se efectúan según Gajdos-Török (1969) en placas de celulosa sin indicadores de fluorescencia N-6064 de 160 μ de espesor sobre resina poliéster de 190 μ en hojas de 10 $\times$ 6,6 cm. Como líquido de desarrollo se utilizan lutidina 2-6: agua (10:3) y vapores de amoníaco concentrado hasta lograr satura-

ción de los mismos en la cubeta. Después de la aplicación de patrones y problemas en la placa, ésta se desecó con aire caliente y a la luz U. V. se visualizan las manchas con fluorescencia roja.

1.2.2. Identificación de porfirinas al estado de esteres

Las porfirinas que se han podido encontrar en vegetales, algas o bacterias fotosintéticas, han solido ser protoporfirina o coproporfirina; por eso en el estudio de las porfirinas seminales hemos tratado de separar por cromatografía en capa delgada sus esteres metílicos correspondientes, realizar sus curvas de absorción y valoración. De los resultados obtenidos (véase apartado 1.2.2.1) se infiere que existe mayor sensibilidad para la detección de fluorescencia roja en los esteres de protoporfirina que en los de protoporfirinas libres y es aún mayor si se detecta por espectrofotometría que por fluorescencia. Estas son las causas que aconsejan determinarlas en forma de esteres. Los esteres más utilizados son los metanólicos y para su esterificación requieren la presencia de ácido sulfúrico concentrado (véase apartado 1.2.2.1).

1.2.2.1. Esterificación, extracción e identificación

Consiste en partir de una cantidad exactamente pesada de piñones de 1 a 10 g privados de cubierta (embriones más endospermos), triturarlos en presencia de arena lavada con la mínima cantidad de metanol-ácido sulfúrico concentrado (95:5) para que se forme una pulpa homogénea; después se cubre con mezcla de metanol sulfúrico y deja 12 horas en la oscuridad; se centrifuga a 6.000 r/p durante 15 minutos y el sobrenadante se extrae repetidamente con cloroformo y los extractos clorofórmicos se reúnen y lavan con solución acuosa de amoníaco al 2 por 100 hasta la eliminación de la acidez. Después la solución clorofórmica se escurre en ampolla de decantación para eliminar el agua, se deseca con sulfato sódico anhidro y evapora al vacío. Todas las manipulaciones hay que verificarlas a 0° C y con luz difusa. El residuo se disuelve en Cl_2CH (45 ml) y con la solución se realizan C. C. D. haciendo aplicaciones de 20-25 μ l y con el volumen total se determinan sus espectros de absorción entre 380 y 430 nm en medio clorofórmico por una parte y en solución ClH 2 N después de evaporado el cloroformo y disolución en dicho ácido, por otra.

1.2.2.1.1. Cromatografía en capa delgada

Está basada en la técnica de Chu y Chu (1966). Con los eluatos clorofórmicos de las manchas se determinan las curvas de absorción entre 380 y 430 nm. Las soluciones clorofórmicas se evaporan al vacío

y disuelven en CIH 2 N y determinan igualmente sus espectros de absorción.

1.3. Determinación cuantitativa

Se ha realizado expresando en protoporfirina las densidades ópticas halladas en los problemas. Para ello se ha tomado como patrón la densidad óptica de la máxima absorción 0,532 (pico en 409 nm, banda de Soret) de una solución que contenía 10 µg/1 ml.

RESULTADOS

En la tabla I se consignan los resultados de porfirinas libres en diversos estadios de germinación de la semilla haciendo referencia a los líquidos sobrenadantes, residuos y a la suma de ambos expresados en µg/g de peso húmedo.

TABLA I

Porfirinas libres, expresadas en protoporfirina µg/g de peso húmedo
(Según técnica de extracción 1.2.1.4)

Piñones puestos a germinar	Experimento	Sobrenadante	Residuo	Total
Abiertos.....	1	845,44	306,03	1151,47
Abiertos.....	2	744,16	473,36	1217,52
Embriones apuntando la radícula.	1	96,44	1019,19	1115,63
Embriones apuntando la radícula.	2	56,99	526,03	583,02
Plántulas de radícula 0,5 a 1 cm..	1	63,67	1992,25	2055,92
Plántulas de radícula 0,5 a 1 cm..	2	62,16	1530,13	1612,28
Plántulas de radícula 2 a 2,5 cm..	1	141,68	971,81	1113,49
Plántulas de radícula 2 a 2,5 cm..	2	123,97	533,42	677,39
Plántulas de radícula 3 a 4 cm....	1	14,48	228,81	243,29
Plántulas de radícula 3 a 4 cm....	2	20,77	311,35	331,62

Las extracciones se realizan según el apartado 1.2.1.4 con fosfato buffer 0.1 M de pH 8,0. Los experimentos 1 y 2 se refieren a que las incubaciones según el método de Kikuchi y col. (1958) se realizan con sustancias que favorecen la formación de δ-ALA, respectivamente con glicocola, piridoxalfosfato, Cl₂Mg, ATP y succinato (experimento 1) y con glicocola, piridoxalfosfato, Cl₂Mg y ATP, es decir sin succinato (experimento 2). La determinación cuantitativa se realiza según el apartado 1.3.

El experimento 1 se refiere a que la incubación se realiza con glicocola, piridoxalfosfato, Cl₂Mg, ATP y succinato; y en el segundo se practica sin succinato, es decir con glicocola; piridoxalfosfato, Cl₂Mg y ATP.

A continuación se pueden ver los R_f de las manchas de intensa fluorescencia roja obtenidos en los cromatogramas de los esteres metanólicos de porfirinas procedentes de los diferentes estadios de germinación de las semillas (los eluatos clorofórmicos y los residuos de evaporación de los disolventes clorofórmicos disueltos en CIH 2 N dieron curvas con máximos en 409 y 402 nm de proto y coproporfirina, respectivamente): piñones estratificados sin poner a germinar, abiertos, protoporfirina 0,68, coproporfirina 0,14. Puestos a germinar abiertos, protoporfirina 0,74, coproporfirina 0,15. Estratificados seguidos de germinación sobre la misma vermiculita; germinados con radícula de 2,5-3 cm, protoporfirina 0,66 y coproporfirina 0. Estratificado seguido de germinación sobre la misma vermiculita; germinados con radícula de más de 4 cm, protoporfirina 0,84 y coproporfirina 0,15. Valor medio de protoporfirina 0,73. Valor medio de coproporfirina 0,15.

Se obtuvieron curvas de absorción en diversos estadios de germinación con máximos en 409 para la protoporfirina y 402 para la coproporfirina en solución clorofórmica, entre otros, para piñones estratificados y germinados con radículas de 4 cm en piñones sumergidos tres días en tiamina y δ-ALA estratificados después y puestos a germinar pero cerrados y en piñones sumergidos tres días en tiamina y δ-ALA estratificados y sin poner a germinar pero abiertos.

Otras curvas análogas con picos idénticos a los anteriores se obtuvieron en soluciones clorhídricas 2 N, después de evaporar al vacío el Cl₂CH.

En la tabla II se recogen los datos referentes al contenido de proto y coproporfirina referido a peso fresco de la semilla sin cubierta, en piñones cerrados y abiertos sin estratificar y estratificados puestos a germinar pero sin llegar a la germinación. Las extracciones se efectuaron según el apartado 1.2.2.1.

En la tabla III se incluyen los resultados cuantitativos obtenidos de protoporfirinas y coproporfirinas al estado de esteres metanólicos procedentes de semillas germinadas, después de haberlas sometido a un tratamiento de tiamina por inmersión durante 48 horas en una solución acuosa de tiamina (40 mg/100 ml de agua) estratificando después y puestos a germinar hasta germinación con plántulas con longitudes de radícula de 0-0,5 cm, 0,5-1 cm, 1,5-2 cm, 2,5-3 cm y 3,5-4 cm. Las extracciones para las valoraciones se realizaron según el procedimiento descrito en el apartado 1.2.2.1.

TABLA II

Tratamiento	Protoporfirina µg/g		Coproporfirina µg/g		Protop. más coprop. µg/g	
	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión
PIÑONES CERRADOS						
Sin tratamiento, no estratificados....	0,58	5,26	0,71	6,38	1,29	11,65
Estratificados, puestos a germinar...	0,64	5,72	0,72	6,48	1,36	12,20
PIÑONES ABIERTOS						
Sin tratamiento, no estratificados....	0,68	6,13	0,71	6,36	1,39	12,49 17,21 F. R.
Estratificados, puestos a germinar...	1,11	9,98	1,12	10,05	2,23	20,04 22,87 F. R.

Los valores de proto más coproporfirina están expresados en µg de protoporfirina/g de peso fresco de piñón total o seco de embrión. Las extracciones se efectuaron según el apartado 1.2.2.1.

TABLA III

Tratamiento con tiamina y estratificados	Protoporfirina µg/g		Coproporfirina µg/g		Protop. más coprop. µg/g	
	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión	Peso fresco piñón total	Peso seco embrión
Radicula de 0 - 0,5 cm....	1,20	10,82	1,58	14,22	2,78	25,04
Radicula de 0,5 - 1 cm....	2,51	22,62	2,76	24,83	5,27	47,46
Radicula de 1,5 - 2 cm....	2,59	23,30	3,36	30,37	5,95	53,57
Radicula de 2,5 - 3 cm....	3,74	33,64	3,65	32,85	7,39	66,44
Radicula de 3,5 - 4 cm....	4,91	44,17	3,96	35,62	8,86	79,79

Los valores de proto más coproporfirina están expresados en µg de protoporfirina/g de peso fresco de piñón total o seco de embrión. El tratamiento de tiamina fue por inmersión de las semillas (del piñón completo, es decir con cubierta) en una solución acuosa de tiamina (40 mg/100 ml de agua), durante 48 horas, seguido de estratificación y germinación.

DISCUSIÓN

Tanto por los Rf de las manchas detectadas con intensa fluorescencia roja en los cromatogramas como por los máximos de absorción de sus eluatos clorofórmicos y clorhídricos, igualmente que por los espectros de absorción de los extractos que se utilizaron para determinar las porfirinas libres (tabla I) y los máximos de absorción de las curvas se concluye que ambas porfirinas son la proto y coproporfirinas. Por otra parte vemos que ambas porfirinas y por ende la suma de las dos, aumentan significativamente cuando los extractos se incuban con sustancias como glicocola, piridoxalfosfato, Cl_2Mg , ATP y succinato que evidentemente influyen en la formación de d-ALA y por consiguiente en la de porfirinas por ser un precursor de ellas. Ello se aprecia comparando las cifras obtenidas en la tabla I que son mucho mayores con respecto a las de las tablas II y III. Dentro de estos valores se ve que los niveles más altos se logran en los piñones abiertos, para ir después disminuyendo a medida que aumenta la plántula de tamaño y por consiguiente de radícula; esto parece estar de acuerdo con el hecho de que a medida que aumenta la plántula y sub-

siguientemente la radícula, aumentan progresivamente las clorofilas *a* y *b* y éstas se forman a partir de porfirinas.

Por la tabla I se observa que los piñones estratificados ofrecen mayor nivel de porfirinas que los no estratificados ejerciendo por tanto influencia la estratificación sobre el nivel de porfirinas; igualmente el nivel de los abiertos es más alto que el de los cerrados, prueba indicadora que las porfirinas aumentan en el proceso tendente a la germinación y que se corrobora en la tabla III, en la cual los piñones germinados después de estratificados y sometidos a tratamiento con tiamina dan cifras más altas que en los no estratificados y en los estratificados y puestos a germinar; aumentando por otro lado el nivel de porfirinas que incrementa con el tamaño de la plántula y por tanto el de la radícula.

BIBLIOGRAFÍA

- CHU, T. S. y CHU, J. HWA. 1966. «J. Chromatog.», 21, 46-51.
- GAJDOS-TÖRÖK, M.: 1969. «Bull. Soc. Chem. Biol.», 50, núm. 4, 925-928.
- KIKUCHI, G., KUMAR, C. H. T. y SHEMIN, D.: 1958. «J. Biol. Chem.», 237, 1214.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: 1951. «J. Biol. Chem.», 193, 265-275.
- MÉNDEZ MARCO, M.: 1979. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid.
- SANZ MUÑOZ, M. y POZO HERNÁNDEZ, C.: *Chlorophylls in Germinating Pinus pinea Seeds*. 1979. «An. Real Acad. Farm.», 45, núm. 4, 581-588.
- TAIT, G. H. y GIBSON, K. D.: 1961. «Biochem. Biophys. Acta», 52, 614-616.