

INFLUENCIA DE DEFICIENCIAS MINERALES SOBRE LOS PIGMENTOS  
EN LOS PLASTIDIOS DE CAFE (Coffea arabica L.)

Tesis de Grado de Magister Scientiae

Carlos Fernando Estrada Castillo



Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA  
Centro Tropical de Enseñanza e Investigación  
Turrialba, Costa Rica  
Abril, 1971

INFLUENCIA DE DEFICIENCIAS MINERALES SOBRE LOS PIGMENTOS  
DE LOS PLASTIDIOS DE CAFE (Coffea arabica L.)

Tesis

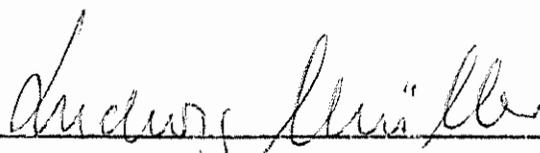
Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados  
como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

en el

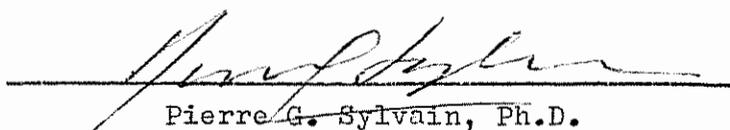
Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA:



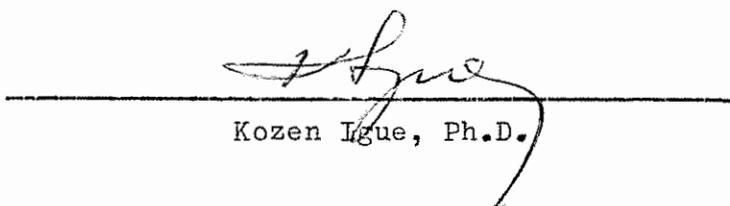
Ludwig E. Müller, Ph.D.

Consejero



Pierre G. Sylvain, Ph.D.

Comité



Kozen Igue, Ph.D.

Comité



Leslie R. Holdridge, Ph.D.

Comité

Abril, 1971

A la memoria de mi Madre

A Ady y Héctor Fernando

## AGRADECIMIENTOS

El autor deja constancia plena de su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, por cuanto sin su decidida colaboración el presente estudio no hubiera llegado a ser una realidad.

Al Dr. Ludwig E. Müller, Consejero Principal, por su encomiable y total apoyo, orientación y dedicación.

A los señores miembros del Comité Consejero: Dr. Pierre G. Sylvain, Dr. Kozen Igue y Dr. Leslie R. Holdridge por el asesoramiento y revisión prestados.

A los señores: Dr. José Fargas y Dr. Oscar Hidalgo-Salvatierra, por su amplio y muy valioso espíritu de colaboración.

A los señores: Ing. Javier Becerra, Dr. Héctor Muñoz, Dr. Jorge Soria y M.S. Arnold L. Erickson, funcionarios del CTEI, por toda la atención brindada.

A los señores: Alí José Ureña, Alfredo Eddie Salazar, José Joaquín Salazar, Antonio Castro, Hernán Granados y Arturo Coto, por la ayuda facilitada en trabajos de campo y laboratorio.

Al personal Técnico, Administrativo y Auxiliar del CTEI.

A la Sra. Mireya de Vega, por su excelente trabajo mecanográfico.

Al Centro Tropical de Enseñanza e Investigación del IICA, por haber otorgado la beca.

A la Zona Norte del IICA, en ciudad de Guatemala, especialmente a los señores: Ing. José A. Torres e Ing. Leopoldo Sandoval, por toda su colaboración.

A los señores Ing. Edgar Lionel Ibarra Arriola e Ing. René Castañeda Paz, Decano y ex-Decano de la Facultad de Agronomía de Guatemala, por su gran apoyo para obtener la licencia de estudios.

A la Universidad Autónoma de San Carlos de Guatemala, por haber concedido el permiso para continuar estudios.

A los señores: Lic. Elías Herrera Ayala e Ing. Luis Felipe Escobar por la colaboración que se sirvieron brindarme.

## BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Quetzaltenango, República de Guatemala, C. A., el 20 de enero 1940.

Se graduó de Bachiller en Ciencias y Letras en el Colegio Privado "La Patria" en 1957. Obtuvo el título profesional de Ingeniero Agrónomo, en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas, en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de San Carlos en 1968.

Siendo aún estudiante, trabajó cuatro años consecutivos como asistente técnico del laboratorio de Horticultura y Semillas, de la citada facultad.

Prestó sus servicios como Técnico de Estudios Experimentales II, en el Ministerio de Agricultura.

Ocupó el cargo de Segundo Vice-Presidente del Instituto Nacional de Transformación Agraria. Actualmente labora como catedrático de tiempo completo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos.

Durante su vida estudiantil, entre otros cargos, fue Presidente de la Asociación de Estudiantes de Bachillerato de Occidente, Presidente de la Asociación de Estudiantes de Agronomía, Sub-Secretario de Cultura y Presidente de la Comisión de Radio de la Asociación de Estudiantes Universitarios, Delegado Estudiantil ante el Consejo

Superior Universitario. Además se hizo acreedor a varios diplomas de Honor al Mérito y Medallas de Oro por obtener el primer lugar en varios concursos de Oratoria. Dentro de sus actividades profesionales, fue Directivo del Colegio de Ingenieros Agrónomos de Guatemala.

En enero de 1970 ingresó al Centro Tropical de Enseñanza e Investigación del IICA, mediante una beca concedida por el mismo, para continuar estudios de postgrado en el Departamento de Cultivos y Suelos Tropicales, con especialización en Fisiología Vegetal, egresando en abril de 1971.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION .....	1
2. REVISION DE LITERATURA .....	3
2.1. Clorofilas .....	3
2.1.1. Importancia de las clorofilas en las fotosíntesis	3
2.1.2. Tipos de clorofila .....	4
2.1.3. Distribución de las clorofilas .....	5
2.1.4. Biosíntesis y degradación de las clorofilas .....	6
2.1.5. Propiedades de las clorofilas .....	7
2.1.6. Espectro de absorción de las clorofilas .....	8
2.1.7. Extracción de las clorofilas .....	10
2.2. Carotinoides .....	11
2.2.1. Importancia de los carotinoides .....	11
2.2.2. Tipos de carotinoides .....	12
2.2.3. Biosíntesis y degradación de los carotinoides ..	13
2.2.4. Propiedades de los carotinoides .....	16
2.2.5. Distribución de los carotinoides .....	17
2.2.6. Separación de los carotinoides .....	19
2.3. Elementos minerales y su relación con los pigmentos	20
2.3.1. Nitrógeno .....	20
2.3.2. Fósforo .....	21
2.3.3. Potasio .....	21
2.3.4. Calcio .....	22
2.3.5. Magnesio .....	22
2.3.6. Azufre .....	23
2.3.7. Hierro .....	23
2.3.8. Boro .....	24
2.3.9. Manganeso .....	24
2.3.10. Zinc .....	24
2.4. Otros factores que influyen en el contenido de cloro filas .....	25
2.4.1. Temperatura .....	25
2.4.2. Luz .....	26
2.4.3. Edad .....	28

	<u>Página</u>
3. MATERIALES Y METODOS .....	29
3.1. Localización y características del lugar .....	29
3.2. Recolección de muestras .....	30
3.2.1. Nitrógeno .....	30
3.2.2. Fósforo .....	31
3.2.3. Potasio .....	31
3.2.4. Calcio .....	31
3.2.5. Magnesio .....	32
3.2.6. Azufre .....	32
3.2.7. Hierro .....	32
3.2.8. Manganeso .....	32
3.2.9. Boro .....	33
3.2.10. Zinc .....	33
3.3. Preparación del extracto para la separación de los pigmentos .....	34
3.4. Separación de los pigmentos mediante cromatografía en capa fina .....	35
3.4.1. Preparación de placas .....	35
3.4.2. Disolvente para la separación .....	36
3.4.3. Método .....	36
3.5. Separación de carotinas únicamente .....	37
3.6. Análisis cuantitativo de los pigmentos .....	39
4. RESULTADOS .....	41
4.1. Contenido de pigmentos en hojas normales de café ( <i>Coffea arabica</i> L.) .....	41
4.2. Tipo y contenido de carotinas en hojas normales de café .....	43
4.3. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de nitrógeno .....	45
4.4. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de fósforo .....	50
4.5. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de potasio .....	54
4.6. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de calcio .....	61
4.7. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de magnesio .....	66
4.8. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de azufre .....	70
4.9. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de hierro .....	77

	<u>Página</u>
4.10. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visi- bles de deficiencia de manganeso .....	82
4.11. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visi- bles de deficiencia de boro .....	86
4.12. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visi- bles de deficiencia de zinc .....	93
5. DISCUSION .....	99
5.1. Contenido de pigmentos en hojas normales de café ...	99
5.2. Tipo y contenido de carotinas en hojas normales de café .....	100
5.3. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en nitró- geno .....	100
5.4. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en fósfo- ro .....	101
5.5. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en pota- sio .....	102
5.6. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en cal- cio .....	103
5.7. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en magne- sio .....	104
5.8. Contenido de pigmentos en hojas con deficiencia de azufre .....	105
5.9. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en hie- rro .....	106
5.10. Contenido de pigmentos en hojas deficientes de manga- neso .....	107
5.11. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en boro.	109
5.12. Contenido de pigmentos en hojas deficientes de zinc.	110
6. CONCLUSIONES .....	113
7. RESUMEN .....	116
8. SUMMARY .....	118
9. LITERATURA CITADA .....	120
APENDICE .....	124

## LISTA DE CUADROS

Cuadro N <sup>o</sup>		<u>Página</u>
1	Contenido de pigmentos en hojas normales de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco) .....	41
2	Tipo y contenido de carotinas en hojas normales de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco) .....	43
3	Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de nitrógeno de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco) .....	45
4	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficiencia de nitrógeno en relación a una hoja normal a pleno sol .....	48
5	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	49
6	Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de fósforo de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g peso fresco) ..	50
7	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficiencia de fósforo en relación a una hoja normal a plena autosombra .....	53
8	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	55
9	Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de potasio de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) (mg/100 g de peso fresco).	57
10	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficiencia de potasio en relación a una hoja normal de autosombra intermedia .....	58
11	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	60
12	Contenido de pigmentos de hojas con síntomas visibles de deficiencia de calcio de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco) .....	61

Cuadro N <sup>o</sup>		<u>Página</u>
13	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficiencia de calcio en relación a una hoja normal de autosombra intermedia .....	64
14	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	65
15	Contenido de pigmentos en hojas con síntomas <u>vi</u> sibles de deficiencia de magnesio de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco)	66
16	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficiencia de magnesio en relación a una hoja normal de autosombra intermedia .....	69
17	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	71
18	Contenido de pigmentos en hojas con síntomas <u>vi</u> sibles de deficiencia de azufre de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco) .....	73
19	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficiencia de azufre en relación a una hoja normal a plena autosombra .....	75
20	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	76
21	Contenido de pigmentos en hojas con síntomas <u>vi</u> sibles de deficiencia de hierro de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco) .....	77
22	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficiencia de hierro en relación a una hoja normal de autosombra intermedia .....	80
23	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	81
24	Contenido de pigmentos en hojas con síntomas <u>vi</u> sibles de deficiencia de manganeso de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco)	82
25	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficiencia de manganeso en relación a una hoja normal de autosombra intermedia .....	85

Cuadro Nº		<u>Página</u>
26	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	87
27	Contenido de pigmentos de hojas con síntomas <u>vi</u> sibles de deficiencia de boro en café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco) .....	89
28	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficien- cia de boro en relación a una hoja normal de autosembra intermedia .....	91
29	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	92
30	Contenido de pigmentos en hojas con síntomas <u>vi</u> sibles de deficiencia de zinc de café ( <u>Coffea arabica</u> L.). (mg/100 g de peso fresco) .....	93
31	Contenido de pigmentos en hojas de café ( <u>Coffea arabica</u> L.) con diferentes grados de deficien- cia de zinc en relación a una hoja normal de autosembra intermedia .....	96
32	Relaciones de concentración $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .....	97

## LISTA DE FIGURAS

Figura Nº		<u>Página</u>
1	Contenido de pigmentos en hojas normales de café .....	42
2	Tipo y contenido de carotinas en hojas normales de café a plena autosombra .....	44
3	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en nitrógeno .....	46
4	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en fósforo .....	51
5	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en potasio .....	56
6	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en calcio .....	62
7	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en magnesio .....	67
8	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en azufre .....	72
9	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en hierro .....	78
10	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en boro .....	83
11	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en manganeso .....	88
12	Contenido de pigmentos en hojas deficientes en zinc .....	94

## 1. INTRODUCCION

El café (Coffea arabica L.) es el principal producto de exportación de muchos países africanos y latinoamericanos. Una adecuada respuesta al equilibrio entre producción y consumo del mismo en el mundo entero, ante una posible reducción del área actual bajo cultivo, hace indispensable mantener el nivel óptimo de producción en las áreas destinadas a subsistir como tales. Para ello se requiere que la capacidad transformadora de energía de la planta no experimente o sufra daño o detrimento alguno por la falta de elementos minerales que intervienen directa o indirectamente en tal proceso. La transformación energética se debe al proceso de fotosíntesis, considerándose esta como una secuencia de reacciones en que las plantas absorben energía luminosa, la transforman en energía química y la almacenan como carbohidratos ricos en energía. Estos, posteriormente pueden ser utilizados por la planta para sintetizar su propia sustancia. Como se nota, la fotosíntesis es un factor básico e indispensable para la producción. Para que el proceso fotosintético se lleve a cabo, es esencial la presencia de clorofilas y la asociación con éstas, dentro del cloroplasto, con ciertos pigmentos accesorios (carotinas y xantofilas).

El objetivo general de este trabajo consiste en establecer qué influencias ejercen las deficiencias minerales sobre la concentración de los pigmentos en los plastidios de las hojas del cafeto (Coffea arabica L.).

Los objetivos específicos estriban en determinar si las deficiencias de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre,

hierro, boro, manganeso y zinc, observables individualmente en las plantas de café, inciden en la presencia o ausencia, disminución o aumento de carotinas, clorofila a, clorofila b, luteína, epóxido de luteína, violaxantina y neoxantina en cada uno de los casos.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Clorofilas

Las clorofilas son pigmentos típicos de las plantas autótrofas, a las cuales proporcionan su coloración verde. Sin embargo faltan en algunos grupos, los que a consecuencia tienen un metabolismo heterótrofo.

#### 2.1.1. Importancia de las clorofilas en la fotosíntesis

De acuerdo con Wilson y Loomis (48) los plastidios que ocupan quizás el 20% del volumen total de la hoja, comprenden los cloroplastos (verdes), los cromoplastos (colores distintos del verde) y los leucoplastos (incolores). Los cloroplastos deben su coloración verde a la presencia de clorofila. Según Ray (37) los cloroplastos, y por tanto la hoja, aparecen verdes porque las moléculas de clorofila absorben principalmente la parte roja y azul del espectro visible, en tanto que absorben debilmente la luz verde. El nombre clorofila fue dado inicialmente a aquellos pigmentos verdes implicados en la fotosíntesis de plantas (1). Desde que Jan Ingen-Housz descubrió los pigmentos activos de la fotosíntesis hasta nuestros días, se ha considerado que el principal pigmento fotosintéticamente activo es la clorofila "a", mientras que las demás clorofilas y pigmentos accesorios (carotinoides y ficobilinas) son también fotosintéticamente activos pero en menor escala. Esto puede comprobarse pues en ausencia de la clorofila "a" no se lleva a cabo la fotosíntesis en plantas superio-

res (25, 34, 36). Ray (37) indica que en la fotosíntesis existe una relación estrecha entre el espectro de absorción de la clorofila y la efectividad de las diferentes longitudes de onda de la luz. Si rayos de luz de igual intensidad pero de diferentes longitudes de onda se hacen incidir sobre una planta verde, se encuentra que la intensidad fotosintética varía con la longitud de onda, casi paralelamente con el espectro de absorción de la clorofila. La fotosíntesis alcanza valores máximos en las longitudes de onda donde la clorofila presenta también su máxima absorción. De esto se concluye con que la luz absorbida por la clorofila es la activa en la fotosíntesis.

#### 2.1.2. Tipos de clorofila

Según Kamen (26) se han logrado aislar 4 tipos distintos de clorofila: "a", "b", "c" y "d". Además existe en bacterias la bacterioclorofila (3). La diferencia entre clorofila "a" y "b" radica en el reemplazo del grupo metilo por un grupo aldehídico. Investigaciones recientes indicaron que la clorofila "a" puede existir en varios estados físicos. Así, Strain y Svec (42) describió en el alga Chlorobium dos tipos de clorofila: Chlorobium Clorofila 660 y Chlorobium Clorofila 650. Estas clorofilas de composición incierta son los principales pigmentos de las bacterias verdes que utilizan el azufre. Algunas veces son acompañadas por bacterioclorofila (42). Whittingham (47) indicó que Brown y French analizaron el espectro de absorción de las plantas verdes "in vivo" y lograron establecer la existencia de 3 distintas formas de clorofila "a" que denominaron cloro-

fila 673, clorofila 683 y clorofila 695, atendiendo a la posición de sus máximos de absorción. Jensen y Kavaljian (25) afirman que Kok descubrió y separó de las otras clorofilas una forma que absorbe radiación infraroja de casi 700 nm. Por esta razón se le denomina P-700. Investigadores como Jensen y Kavaljian (25) creen que es el verdadero centro activo de la fotosíntesis.

### 2.1.3. Distribución de las clorofilas

Kamen (26) señala que la clorofila "a" se presenta universalmente en los granos de los cloroplastos de los organismos fotosintéticos: plantas verdes superiores y algas. Es acompañada por otras clorofilas en las algas azules, en algas pardas y en algunas algas rojas. La clorofila "b" aparece en plantas verdes superiores y algas verdes. Existe así en menor proporción en el género Euglena. La clorofila "c", en cambio, existe solamente en algas pardas, diatomeas y dinoflagelados. La clorofila "d" fue encontrada en las algas rojas. La clorofila "a" se halla en todas las plantas que producen oxígeno por fotosíntesis (29). En una investigación basada en estudios cromatográficos de aproximadamente 500 especies de plantas australianas la clorofila "a" fue ratificada como el principal pigmento verde (42).

En más de 200 análisis de plantas superiores Willstätter, citado por Miller (29) comprobó que la cantidad de clorofila "a" ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ) normalmente es 3 veces la de clorofila "b" ( $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ ) en plantas superiores.

#### 2.1.4. Biosíntesis y degradación de las clorofilas

De acuerdo con Bogorad (3) la probable trayectoria para la formación de clorofila "a" involucra varias reacciones, siendo la materia prima: GLICINA + SUCCINIL-COENZIMA A, y sustancias intermedias tales como PROTOPORFIRINOGENO, PROTOPORFIRINA, MAGNESIO-PROTOPORFIRINA.

El origen de la clorofila "b" fue estudiado por Seybold y Egle, citados por Bogorad (3), mediante observaciones sobre la existencia de protoclorofilas separables cromatográficamente, efectuadas en la cubierta de semillas de calabaza. No podían asegurar la existencia de una protoclorofila "b" y por tanto deben considerarse precursores de esta clorofila.

Muchas evidencias, algunas contradictorias se han acumulado para poder cimentar que la clorofila "b" se forma a partir de la clorofila "a". Godnev et al. citados por Bogorad (3) utilizaron clorofila "a" marcada con  $^{14}\text{C}$  y lo introdujeron en hojas de cebolla, disolviendo la clorofila "a" en aceite de girasol. Ellos encontraron dos días más tarde al extraer las hojas con acetona como disolvente y después de purificar el extracto que se había formado clorofila "b" radiactiva.

Al ser tratada la clorofila con un ácido, el hidrógeno de este sustituye al magnesio como átomo central, dándole un color verde pardo al producto final. De esta manera se ha efectuado la transformación de las clorofilas en las feofitinas respectivas. El cobre, hierro o zinc, pueden también reemplazar al magnesio de la clorofila.

Cuando la sustitución de magnesio es efectuada por el cobre, el color verde se vuelve más brillante y más estable.

La clorofila es degradada rápidamente cuando se le expone a la luz. Tales alteraciones varían con el solvente (42).

#### 2.1.5. Propiedades de las clorofilas

De acuerdo con Aronoff (1) la historia inicial de la química de la clorofila fue descrita por Willstätter y Stoll. Según estos autores comenzó con Berzélius, quien observó la retención de color en el extracto de hojas a pesar de la acción de un fuerte alcalí o de un ácido. La conversión de clorofila hacia pigmentos rojos indujo a Verdeil a sugerir una relación entre clorofila y hemes, especialmente desde que sus análisis de clorofila erróneamente mostraron contener hierro (además de potasio y fósforo), conclusión que fue mantenida hasta las investigaciones de Willstätter. La partición de los pigmentos de plastidios entre una solución de éter, conteniendo los carotinoides amarillos, y una solución acuosa ácida de feofitina azul-verdosas y de feoforbides (que él llamó "filocianinas") fue según Aronoff (1) primero lograda por Fremy aunque este autor aparentemente pensó que esa clorofila "verde" era una mezcla de 2 tipos de pigmentos: uno azul-verde y otro amarillo. Casi al mismo tiempo Stokes citado por Aronoff (1) sugirió como resultado de sus observaciones espectroscópicas que la clorofila consistía de 2 componentes: después de la extracción de los carotinoides queda una mezcla constituida de dos diferentes sustancias, ambas verdes y ambas exhibiendo

fluorescencia roja.

Una propiedad característica de las clorofilas es la fluorescencia. La clorofila es verde en la luz transmitida, y así cuando un frasco que contiene solución de clorofila se coloca entre el observador y la fuente de luz, el color de la solución es verde oscuro. Pero si el observador se coloca de espaldas a la fuente de luz, verá que el color de la solución de clorofila es rojo (29). Esto se debe a la reradiación de luz de mayor longitud de onda (luz roja) a la de la luz incidente (blanca).

De acuerdo con Smith y Benítez (41) la clorofila "a" es soluble en ciertos alcoholes, benceno, eter y acetona. Cuando la clorofila es pura, es solo levemente soluble y únicamente en éter de petróleo. Es insoluble en agua. La clorofila "b" se comporta en forma similar.

Ambas clorofilas ("a" y "b") constan estructuralmente de 4 anillos pirrólicos con un átomo de magnesio en el centro. La clorofila "b" difiere de la "a" en que tiene un grupo  $\text{CHO}$  en lugar del radical  $\text{CH}_3$  (29). Según Holt (22) la presencia del grupo formilo en la clorofila "b" desplaza la máxima absorción en rojo de 660 nm a 643 nm con los cambios correspondientes de coeficientes de extinción. Una medida de la pureza de las clorofilas es la proporción de absorción máxima en el rojo y en el azul.

#### 2.1.6. Espectro de absorción de las clorofilas

Los componentes de la luz blanca son diferenciados por sus longitudes de onda así: luz azul de 430 a 470 nm, luz verde de 500 a

560 nm y luz roja de 650 a 760 nm (29, 37).

Mediante el uso del espectrofotómetro se dirigen bandas angostas de luz de diferente longitud de onda, hacia las soluciones en estudio y se mide el porcentaje de luz absorbida en cada longitud de onda, se ha establecido que las clorofilas tienen dos picos de máxima absorción o absorbancia, uno en la región azul violeta y el otro en la región roja (29); este último según Holden (20) se encuentra entre 670 nm y 683 nm. La clorofila "b" in vivo tiene máxima absorbancia en 650 nm (22).

Mackinney (1940) citado por Smith (41) al usar acetona como disolvente, estimó las siguientes longitudes de onda para absorción máxima y coeficientes específicos de absorción para la clorofila "a":

Longitud de onda en nm	663	615	580	535	430	410
Coef. esp. de abs. en lts/g x cm	84,0	15,7	8,67	3,88	106	77,1

Para la clorofila "b" los valores correspondientes son:

Longitud de onda en nm	645	595	455
Coef. esp. de abs. en lts/g x cm	51,8	11,3	146,9

Según Strain y Svec (42) utilizando éter como disolvente y a una temperatura de 25 °C, las clorofilas "a" y "b", presentaron las siguientes propiedades espectrales:

	"a"	"b"
Longitud de onda máxima en rojo	660,5	642,0
" " " " " "	660,0	642,5
" " " " " "	662,0	644,0
Coefficiente de absorción en rojo	96,6	61,8
" " " " "	102,1	56,8
" " " " "	100,9	62,0
Longitud de onda máxima en azul	428,5	452,5
" " " " " "	429,0	453,0
" " " " " "	430,0	455,0
Coefficiente de absorción en azul	125,1	175,3
" " " " "	135,0	171,0
" " " " "	131,5	174,8

#### 2.1.7. Extracción de las clorofilas

Todos los métodos para la determinación cuantitativa de las clorofilas dependen de su extracción del material vegetal. No existe un disolvente único o mezcla de disolventes, que extraería los pigmentos inalterados rápidamente de todas las especies vegetales.

Material fresco debe ser extraído con disolventes que remuevan la mayor parte del agua antes de comenzarse la extracción de los pigmentos. Así, los disolventes útiles para la extracción de clorofilas de material vegetal fresco son aquellos que son miscibles con agua (42): piridina, metanol, acetona y etilacetato. Estos disolventes al mismo tiempo sirven para la estimación directa en los mismos

extractos. También permiten ulterior transferencia a éter dietílico ó éter de petróleo para mediciones de la absorción espectral. Generalmente el empleo de una mezcla de metanol y éter de petróleo es muy satisfactorio para la extracción de material vegetal fresco, pues el metanol renueva el agua antes de la extracción de los pigmentos (42).

El material vegetal debe macerarse para lograr una extracción cuantitativa. Esto se logra mediante una licuadora eléctrica (42) o trituración con arena de cuarzo en un mortero. Para evitar en un tejido vegetal ácido la transformación de las clorofilas en feofitinas, es preciso añadir un material neutralizante tales como: carbonatos de calcio o magnesio, bicarbonato de sodio o amoníaco (42).

Para asegurarse que los extractos de las plantas contienen clorofilas inalteradas, es esencial examinar los pigmentos por varios métodos independientes, por ejemplo: por espectroscopía, colorimetría y varias modificaciones de cromatografía. Recíprocamente si diversos pigmentos son encontrados, es conveniente establecer si son constituyentes normales de las plantas, o si fueron formados mediante reacciones secundarias (42).

## 2.2. Carotinoides

### 2.2.1. Importancia de los carotinoides

Los carotinoides abarcan carotinas de color anaranjado y xantofilas, de color amarillo, ambos grupos se encuentran también en los cloroplastos. Las carotinas en parte sirven de precursor para la

síntesis de vitamina A. Además existen pruebas de que los carotinoides funcionan como pigmentos accesorios y protegen la clorofila de su destrucción por la luz solar (48). Los pigmentos accesorios absorben luz para la fotosíntesis. Hay evidencias de que su función, en parte, consiste en transferir la energía luminosa que absorben a la clorofila a, en la cual se realiza con la intervención del pigmento P-700 (37).

Los cromoplastos, que pueden ser plastidios de los cuales desapareció la clorofila, o bien plastidios que nunca fueron verdes, producen en flores, frutos y semillas tonalidades amarillas, anaranjadas y rojizas, debido a que contienen diversos carotinoides. También se debe a ellos la coloración amarilla rojiza deficiente (48).

En el cuerpo de los animales la  $\beta$ -carotina produce por hidrólisis 2 moléculas de vitamina A, mientras que la  $\alpha$  y  $\gamma$ -carotina solo produce una molécula de vitamina A cada una. Se ha supuesto además que la  $\alpha$  carotina quizás sea un precursor de la clorofila (29).

### 2.2.2. Tipos de carotinoides

Los carotinoides, químicamente se dividen en dos grupos: 1) carotinas: hidrocarburos de cadena larga y 2) xantofilas que son productos oxidados de los anteriores (29, 30).

La fórmula química sumaria de las carotinas es  $C_{40}H_{56}$  (29, 30). En trabajos de laboratorio, los químicos no han logrado transformar carotinas a xantofilas, lo que no descarta de manera alguna la probabilidad de que tal reacción ocurra dentro de la célula de las plantas. Tanto así que como la cantidad de xantofilas en la hoja, es

generalmente el doble de la de carotinas presentes.

Se conocen en las plantas 4 carotinas isómeros:  $\beta$ -carotina,  $\alpha$ -carotina,  $\gamma$ -carotina y el licopeno. El licopeno es el pigmento principal de tomates maduros (Lycopersicum sp.). La  $\gamma$ -carotina no muy difundida, se halla principalmente en la raíz de zanahoria (Daucus carota) y en la Cúscuta salina.

Anteriormente se creía que la pigmentación amarilla de las hojas era causada siempre por una misma substancia, a la que se denominó xantofila. Miller (29) indicó que ha logrado identificar 12 xantofilas, de las cuales la principal es la luteína.

### 2.2.3. Biosíntesis y degradación de los carotinoides

El estudio químico de los carotinoides data del año 1920. En la siguiente década la estructura y algunos de los más importantes aspectos de ellos fueron determinados. Entre los trabajos relacionados con carotinoides, cabe mencionar el clásico trabajo de Karrer, y otros importantes investigadores realizados bajo la dirección de Kuhn, Zechmeister, Heilbron y sus respectivos colaboradores, citados por Weedon (46).

Investigaciones biosintéticas realizadas durante los pasados diez años, tienen la suficiente consistencia para demostrar que los terpenoides son sintetizados a partir de unidades básicas que contienen 5 carbonos. Dentro de ese proceso y con alguna reserva, mediante una serie de reacciones complejas se forma el Fitoeno (C-40) que es considerado el precursor de los carotinoides (15). Trabajos re-

cientes demostraron que es necesaria la presencia de glucosa para la formación de  $\beta$ -carotina (6).

Casi toda la evidencia disponible acerca de inserción de oxígeno para la formación de xantofilas, indica que es el último paso en la secuencia biosintética. Las informaciones acerca de que las xantofilas son reducidas hacia  $\beta$ -carotina mediante aislamiento de cloroplastos, aún requiere confirmación (15).

Experimentos realizados con la mutante 5/520 de Chlorella vulgaris indicaron que sintetiza principalmente fitoeno cuando crece en oscuridad y bajo condiciones heterótrofas, bajo iluminación pero en ausencia de oxígeno, esta sintetiza carotinoides coloreados; si los cultivos son luego colocados en la oscuridad en presencia de oxígeno la formación de xantofilas ocurre paralelamente con la desaparición de carotinas (15).

Con la ayuda de  $^{18}\text{O}_2$  y de  $\text{H}_2\ ^{18}\text{O}$ , Yamamoto et al. según Goodwin (15), demostraron que en Chlorella el oxígeno de la luteína proviene del oxígeno molecular  $^{18}\text{O}_2$  y no del agua  $\text{H}_2\ ^{18}\text{O}$ . Por otro lado, el oxígeno del grupo epoxi de la violaxantina, se derivó del oxígeno del agua. La síntesis de carotinoides en tejidos fotosintéticos está relacionada con factores como la temperatura, luz y control metabólico. A medida que la temperatura desciende, decrece la síntesis de carotinoides. Por ejemplo, si se presenta un día con temperatura de 4 grados centígrados, esta temperatura, es fisiológicamente equivalente a oscuridad.

A una temperatura constante de día las variaciones de temperatura en la noche tienen un efecto muy pequeño sobre la génesis de

carotinoides. La Chlorella vulgaris en condiciones heterótrofas produce en ausencia de luz muchos carotinoides. Por otra parte Euglena gracilis var. bacillaris, aislada y creciendo bajo condiciones heterótrofas, solo produce cantidades pequeñas de carotinoides. Tal descubrimiento fue realizado por Goodwin y Jamikorn en 1954 (15).

Es bien conocido que el aislamiento de retoños produce únicamente trazas de carotinoides, las mayores de las cuales son xantofilas (15). Bajo iluminación los carotinoides son rápidamente sintetizados como en las plantas verdes superiores. Si brotes de maíz (Zea mays) aislados durante cuatro días son expuestos a luz roja (660 nm) durante 5 minutos, y luego son retornados a oscuridad, un examen de ellos 24 horas después, indicará que contienen más carotinoides que los retoños bajo control en la oscuridad (15).

Davies (6) indicó que en lo concerniente al control metabólico, los brotes o retoños sintetizan considerables cantidades de esteroides, cuando germinan en la oscuridad, pero de carotinoides aparecen únicamente trazas. Bajo iluminación sin embargo, la parte verde de los retoños y el desarrollo funcional de los cloroplastos produce una síntesis masiva, no solo de carotinoides, sino de otros componentes esenciales para la fotosíntesis, entre ellos terpenoides de cadena lateral-clorofila (fitol), plastoquinona (solasesol (c 45)), vitamina K<sub>1</sub> (fitol) y tocofenoles (fitol) esto es, sin embargo, que no hay síntesis concomitante del esteroide. El mayor problema es como puede causar la luz la canalización de los terpenoides intermedios hacia la síntesis del esteroide, dentro de la síntesis de los "terpenoides fotosintéticos" que incluye los carotinoides (6, 15).

En las xantofilas, el oxígeno puede presentarse como grupos hidroxilo, metoxi, epoxi y carboxi (6, 26).

Se ha comprobado que las longitudes de onda más eficaces para promover la síntesis de clorofila (espectro de acción) son asimismo las más eficaces para destruir los carotinoides de las hojas. Tales longitudes de onda son absorbidas fuertemente por el precursor final de la clorofila: la protoclorofila.

#### 2.2.4. Propiedades de los carotinoides

Los carotinoides son pigmentos amarillos solubles en éter y otros solventes de grasas. Se encuentran en los cloroplastos, pero encubiertos por las clorofilas; por eso las plantas adquieren un color amarillo o anaranjado cuando la clorofila es destruida. Los plastidios que contienen solamente carotinoides son denominados cromoplastos (29, 48).

En las hojas caedizas de los árboles cuando la clorofila se destruye a un ritmo mayor del que se ha formado, los carotinoides se tornan visibles. El cambio de color verde hacia amarillo durante la maduración de muchos frutos, es similar al proceso de amarillamiento que ocurre en las hojas verdes. El color amarillo que presentan muchas plántulas que han crecido en ausencia de luz, indica que la planta ha producido carotinoides y no clorofilas (29). Deben su coloración amarillenta a la absorción de principalmente las partes violeta-azules del espectro, como lo demuestran los valores de las máximas de absorción (6, 13):

<u>Pigmento</u>	<u>Longitud de onda</u>	<u>Solvente</u>	<u>Referencia</u>
$\beta$ -carotina	425,451,482	Hexano	Goodwin, 1955
Luteína	420,446,5,476	Etanol	Karrer y Jucker, 1950
Epóxido de luteína	418,442,471	Etanol	Karrer y Jucker, 1950
Violaxantina	420,441,471	Etanol	Karrer y Jucker, 1950
Neoxantina	417,438,467	Etanol	Krinsky y Goldsmith, 1960

Cabe agregar que la longitud de onda (expresada en nm) para máxima absorción, varía con el solvente a utilizar.

#### 2.2.5. Distribución de los carotinoides

Las hojas de todas las plantas verdes contienen los mismos carotinoides mayores:  $\beta$ -carotina, luteína, violaxantina y neoxantina. Estos pigmentos están localizados específicamente en los granos de los cloroplastos, en forma de cromoproteidos.

El relativo aumento de cada pigmento varía de especie en especie, pero las xantofilas siempre predominan sobre las carotinas (14, 29).

Un completo análisis cuantitativo de los pigmentos de las hojas no se ha llevado a cabo en muchas especies. Sin embargo, un resultado típico aparece en la siguiente tabla:

Distribución Cuantitativa de Xantofilas en alfalfa:  
(Bickoff et al. 1954) (14)

<u>Pigmento</u>	<u>% de xantofilas total</u>
Cryptoxantina	4
Luteína	40
Zeaxantina	2
Violaxantina	34
Neoxantina	19

En relación al contenido de  $\alpha$  y  $\beta$ -carotina en diferentes géneros y especies de plantas, Goodwin (14) indica que Wierzchowski et al. 1962, encontraron lo siguiente:

(Concentración expresada en mg/100 g de materia seca)

<u>Planta</u>	<u><math>\alpha</math>-carotina</u>	<u><math>\beta</math>-carotina</u>
<u>Acer campestre</u>	6,8	20,3
<u>Bougainvillea glabra</u>	18,8	39,2
<u>Calycanthus occidentalis</u>	12,1	33,9
<u>Ficus elastica</u>	3,8	12,4
<u>Hedera helix</u>	10,1	33,6
<u>Magnolia acuminata</u>	10,6	21,7
<u>Taxodium distichum</u>	10,0	15,6

Un estudio completo de los carotinoídes en diferentes partes de las flores de Delonix regia demostró la variada distribución de los pigmentos, en pétalos, sépalos, filamentos y anteras del citado

árbol. El estudio en mención reportado por Goodwin (14), fue efectuado por Jungalwala y Cama en 1962:

(% por peso total de carotinoides presentes)

<u>Pigmento</u>	<u>Pétalos</u>	<u>Sepalos</u>	<u>Filamentos</u>	<u>Anteras</u>
β-carotina	34,05	32,85	12,55	1,73
Luteína	2,48	3,36	21,7	--
Epóxido de luteína	0,82	--	3,7	--
Violaxantina	0,85	1,77	4,43	0,29
Neoxantina	0,2	0,4	--	--

Según Miller (29) α-carotina constituye el 10% de la carotina presente en una hoja verde y la β-carotina constituye el 90% restante.

#### 2.2.6. Separación de los carotinoides

Para la identificación y análisis cuantitativo de los carotinoides especialmente si es necesario detectarlos en cantidades pequeñas, dentro de una mezcla de pigmentos que presente impurezas, como generalmente ocurre, debería utilizarse la cromatografía en capa fina (6, 16, 17).

Para la determinación cuantitativa de los carotinoides individuales, normalmente el método que se sigue es el de espectrofotometría. Este método requiere el conocimiento del coeficiente de extinción molecular ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ), de cada pigmento para la longitud de onda de absorción máxima y para el solvente específico a utilizar (6, 13):

<u>Pigmento</u>	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ <u>Coef. de Ext. Mol.</u>	<u>Solvente</u>	<u>Referencia</u>
$\beta$ -carotina	2650	Hexano	Zechmeister, 1934
$\beta$ -carotina	2450	Hexano	Smakula, 1934
$\beta$ -carotina	2580	Hexano	Zscheille <u>et al.</u> 1934
Luteína	2480	Etanol	Zscheille, White, Beadly y Roach, 1942
Luteína	2600	Etanol	Strain, 1938
Epóxido de luteína	2400	Etanol	Strain, 1938
Violaxantina	2550	Etanol	Karrer y Jucker, 1943
Violaxantina	2250	Etanol	Strain, 1938
Neoxantina	2270	Etanol	Strain, 1938

### 2.3. Elementos minerales y su relación con los pigmentos

Estudios bioquímicos del metabolismo celular han revelado que la mayoría de los elementos minerales requeridos por la planta se necesitan como parte de enzimas para los procesos metabólicos (37) o también como constituyentes de la sustancia propia de la célula.

#### 2.3.1. Nitrógeno

Bonner (4) calificó al nitrógeno como "otro de los componentes esenciales de la molécula de clorofila". Este autor indicó que su deficiencia conduce a la formación de hojas con escaso contenido clorofílico. Según Wallace (44) el nitrógeno es el responsable de la coloración verde de las hojas debido a la formación de clorofila. Su deficiencia se manifiesta a través de un contenido relativamente

bajo de clorofila, lo que induce una clorosis típica. Malavolta (28) resaltó que en hojas deficientes en nitrógeno, los cloroplastos se presentaron en menor cantidad y menor tamaño que en las normales. Según Hopp (23) el contenido de nitrógeno en el cafeto incrementa significativamente del interior hacia el exterior del arbusto.

### 2.3.2. Fósforo

Wallace (44) afirmó que el fósforo está involucrado en una serie de reacciones bioquímicas inherentes al metabolismo de los carbohidratos. A veces por eso se presentan síntomas de deficiencia similares a las del nitrógeno. Sin embargo, en el cafeto se ha observado (32) que a veces las manchas cloróticas toman una tonalidad rojiza en caso de una deficiencia avanzada. Citando a Müller, Malavolta (28) indicó que el contenido de fósforo en las hojas es mayor cuando hay deficiencia de hierro. El contenido de fósforo en el cafeto es significativamente menor en la parte superior del arbusto que en la parte media y la parte baja (23).

### 2.3.3. Potasio

Se dice que el potasio contribuye a la fotosíntesis, especialmente bajo condiciones de intensidad lumínica baja (44). Una fuerte deficiencia potásica se manifiesta en café por una necrosis amarillo rojiza del borde de las hojas (24). Malavolta (28) encontró que el potasio tiene estrecha asociación con el contenido de almidón en el cafeto. Asimismo confirmó la relación inversa entre los contenidos

de potasio y de magnesio. Según Hopp (23), su contenido no varía con la posición dentro del arbusto de café.

#### 2.3.4. Calcio

El calcio actúa como regulador de la actividad de los iones de potasio; tiene también importancia en la absorción de nitrógeno, y por ende indirectamente en la formación de clorofila (44). El contenido de calcio en el cafeto decrece de la parte baja hacia la parte superior del arbusto y de adentro hacia afuera. El mayor contenido de calcio está en el interior del arbusto, en la parte baja, y el menor contenido se encuentra en la parte externa especialmente en las hojas jóvenes superiores del cafeto (23).

#### 2.3.5. Magnesio

El único elemento metálico presente en la molécula de clorofila es el magnesio (38). Cuando en una planta se manifiesta una deficiencia de este elemento, la clorofila se forma sólo en pequeñas cantidades, tomando las hojas de tal planta un color amarillo (4, 44). La deficiencia de magnesio en el café, según Bendix (2), se demuestra en la propensidad de la planta a enfermedades, mal desarrollo de su clorofila y con eso mermas en la producción, poca resistencia a la luz solar y calor, factores importantes que determinan la agricultura tropical. Existe un antagonismo fuerte entre magnesio y otros cationes especialmente de potasio, y calcio. La pérdida de magnesio en el suelo es intensificada por fuertes lluvias, las cuales pueden lavarlos (2). Fiester (7) encontró que la concentración de magnesio

en las hojas del cuarto nudo, en café fue significativamente mayor que la correspondiente a las hojas de los nudos basales. En plantas de café, deficientes en magnesio, Malavolta (28) halló que los cloroplastos no presentaron el típico color verde. De acuerdo con Hopp (23) la distribución de magnesio en el cafeto es similar a la ya descrita para el calcio.

#### 2.3.6. Azufre

De acuerdo con Miller (29) el azufre es indispensable para la formación de clorofila. Cuando se detecta deficiencia de este elemento en plantaciones de café, aun cuando no aparecen síntomas visibles la floración puede ser normal pero no hay formación de grano (28).

#### 2.3.7. Hierro

Robbins (38) indicó que el hierro es esencial para la formación de clorofila, añadiendo que las plantas desprovistas de hierro, potasio, fósforo y zinc no alcanzan normalmente a formar clorofila. Según Wallace (44), el hierro está íntimamente asociado con la formación de clorofila pero no es constituyente de ella. La deficiencia de hierro es muy común en los lugares donde se cultiva café, porque la falta de un drenaje adecuado y valores extremos de pH hacen que se efectúen cambios de valencia en los compuestos de hierro del suelo y que el manganeso se comporte como un elemento limitador (12, 28). En el arbusto de café, el contenido de hierro decrece del interior hacia la posición exterior del árbol (23).

### 2.3.8. Boro

Tanto para el boro, como para el cloro no se ha establecido aún el papel exacto que desempeñan en el metabolismo celular. Sin embargo, cuando la ausencia total o la deficiencia de ellos se presenta en la planta, ésta sufre graves trastornos y puede llegar hasta morir (37). En el cafeto estos trastornos se manifiestan en una leve clorosis, principalmente en algunas hojas viejas. Común, en cambio, son la muerte de la yema y deformación foliar, sin pérdida aparente de los pigmentos (32).

### 2.3.9. Manganeso

Según Ray (37) el manganeso se utiliza en la formación de  $O_2$  en la fotosíntesis. Bonner (4) estipuló que el manganeso y el cobre son esenciales para la formación de clorofila.

Lo anterior es corroborado por Hoagland (19), al indicar que el manganeso desempeña una labor tanto en el proceso fotosintético como en la formación de clorofila. La acumulación de materia orgánica en los cafetales produce un efecto desfavorable para la absorción del manganeso (28). En el arbusto de café, la porción central tiene un alto contenido de manganeso, mucho mayor al que existe en el interior y el exterior del arbusto (23).

### 2.3.10. Zinc

Resultados provenientes de experimentos realizados con deficiencia incipiente de zinc (19), determinaron un marcado efecto retardador sobre la síntesis de proteínas. Había una rápida reanudación de

la síntesis proteínica cuando fue adicionado zinc. La síntesis de almidón fue asimismo retardada por la deficiencia de zinc, aún cuando el contenido de azúcares en la planta no disminuyó. Esto contrasta con los efectos producidos por la deficiencia del boro (19). En plantaciones de café la absorción de zinc se ve limitada por el exceso de manganeso (28). La deficiencia de zinc en el cafeto, además de la siguiente sintomatología: entrenudos de las ramas secundarias extremadamente cortos, hojas de tamaño reducido, a veces con las márgenes del limbo volteadas hacia la parte ventral de la hoja, coloración desde verde normal hasta clorosis acentuada, formación de rosetas, etc., produce muerte regresiva ("die-back") de las ramas. Cuando la deficiencia de zinc es muy acentuada y hay frutos presentes en la rama, el tamaño de esos frutos es menor que el de los normales (9).

#### 2.4. Otros factores que influyen en el contenido de clorofilas

##### 2.4.1. Temperatura

De acuerdo con Franco (10) es frecuente observar en cafetales hojas con manchas irregulares, blanquecinas, que se presentan siempre en hojas pares de la misma edad. Así por ejemplo, si en una rama es el quinto par de hojas el que presenta los síntomas, en otras ramas de la misma planta o en ramas de plantas contiguas, será también el quinto par de hojas las afectadas. Las áreas blanquecinas en el limbo foliar son muy variables e irregulares yendo desde una pequeña franja a lo largo del margen foliar hasta cubrir la totalidad

del área de la hoja. Frecuentemente las hojas que presentan los síntomas aludidos son de tamaño menor que las normales y un tanto deformadas. El hecho de que la decoloración se presentó siempre en pares de hojas de la misma edad, sugería que se trataba de un fenómeno causado por un factor climático, que actuaba cuando ese par de hojas se hallaba en cierto estado de desarrollo. En el Brasil el frío no se presentaba como la causa más probable en vista de las condiciones climáticas del lugar. Sometiendo cafetos jóvenes cultivados en maceta a bajas temperaturas, poco arriba de 0°C se obtuvieron síntomas similares a los observados en el campo, generalmente de 3 a 7 días después del tratamiento. Las hojas más severamente afectadas no recobraron su estado normal, permaneciendo de menor tamaño, deformadas y con áreas despigmentadas. Un examen microscópico de estas regiones reveló destrucción de los cloroplastos. Las hojas sensibles a los tratamientos fueron las hojas nuevas, pero ya con algunos centímetros de crecimiento. No se obtuvo decoloración en hojas adultas o con menos de 2,5 cm de crecimiento.

#### 2.4.2. Luz

La luz es esencial para la formación de clorofila con excepción de pocas plantas tales como ciertas algas, musgos, helechos y plántulas de coníferas en las cuales se forma clorofila también en la oscuridad. Plántulas de loto acuático y varias especies de Citrus, que han crecido en la oscuridad, también contienen clorofila (29).

En relación al contenido de clorofilas se sabe que entre éstas, la luz y la fotosíntesis existe una estrecha asociación. En café se

ha llegado a establecer que una fuerte intensidad luminosa provoca incluso el cierre de los estomas (35). Las hojas amarillentas reflejan más energía que las hojas verdes (31).

En cuanto al efecto de la sombra, Franco (8) indicó que las hojas de árboles testigos expuestos al sol, tenían menos clorofila que las hojas de árboles sombreados. Las hojas de cafetos sombreados con Madre de Cacao (Gliricidia) tenían mayor cantidad de clorofila que los testigos al sol, pero menor cantidad que hojas de cafetos sometidos a otros tipos de sombreamiento. Las hojas de cafetos sombreados con Eucalyptus sp. y las hojas internas de árboles testigos al sol, no difieren entre sí en cuanto al contenido de clorofila. Ambas podrían tener mayor cantidad de clorofila que la contenida en los cafetos ya discutidos, sólo siendo inferior su contenido al de las hojas de cafetos sombreados con techo de madera. En conclusión, las hojas de cafetos sombreados con techadumbre de madera son las que presentan mayor cantidad de clorofila:

Porcentaje de clorofila (8)

Cafetos sombreados con <u>Gliricidia</u>	Media general: 0,248
Cafetos testigos al sol	Media general: 0,176
Cafetos testigos al sol (hojas internas)	Media general: 0,338
Cafetos sombreados con <u>Eucalyptus</u>	Media general: 0,319
Cafetos sombreados con madera, techado	Media general: 0,392

El mismo autor (8) señaló que la cantidad de clorofila aumentó con la intensidad de la sombra. Naturalmente, habra en la curva un

punto que representa la intensidad óptima de sombra en cuanto a producción de clorofila. A partir de ese punto, que según este investigador (8) estaría abajo de 2843 lux, la curva tendría que descender marcadamente ya que la planta en ausencia completa de luz no forma clorofila.

#### 2.4.3. Edad

Según Namken y Lemon (33) el contenido de clorofila en maíz (Zea mays) aumenta con las primeras etapas de desarrollo de la hoja, y luego tiende a disminuir. La edad de la hoja a la cual correspondió la mayor concentración de clorofila, la denominaron "fase de madurez fotosintética". En café (Coffea arabica L.) Weaver y Clements (45) indicaron que el contenido de clorofila en una misma especie y aún en una misma planta, varía con la edad de ésta. Sëstak y Vaclavik (40) encontraron que la edad tiene efecto tanto sobre el contenido de clorofila como sobre la actividad fotosintética. Sëstak y Catzsky (39) señalan que hojas jóvenes bien desarrolladas contienen mayor cantidad de clorofila que hojas viejas o adultas.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Localización y características del lugar

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal del CTEI; áreas cafetaleras de Tucurrique, la Suiza, Jesús María y terrenos del Centro Tropical de Enseñanza e Investigación del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA (IICA-CTEI) ubicado en el cantón de Turrialba, provincia de Cartago, República de Costa Rica. El valle de Turrialba se encuentra en una zona subtropical húmeda (21) a una altura de 602 metros sobre el nivel del mar. Su situación geográfica es de 9 grados 53 minutos latitud Norte y 83 grados 39 minutos longitud Oeste. El clima presenta las siguientes características:

a) Precipitación: promedio anual es de 2581 mm. Los promedios máximos y mínimos mensuales fluctúan de 342 a 65 mm valores que corresponden a los meses de diciembre y marzo, respectivamente. El mes de diciembre es por eso el más lluvioso y los meses de marzo y abril corresponden a un período de menor precipitación. Sin tomar en consideración los valores extremos puede decirse que hay bastante uniformidad de precipitación a través de todo el año.

b) Temperatura: el promedio diario anual es de 22,5°C. Las temperaturas máxima y mínima promedio alcanzan valores de 28°C durante el día y 17°C durante la noche, respectivamente. La temperatura máxima absoluta se registró en el mes de mayo con 32°C y la mínima en el mes de enero con 10°C.

c) Brillo solar: el promedio mensual de luminosidad es de 140 horas. El máximo corresponde a marzo con 174 horas y el mínimo a julio con 102 horas. El promedio diario de horas sol es de 4,37.

d) Humedad relativa: el promedio mensual es de 87%, con un máximo y un mínimo de 90 y 83% en los meses de julio y marzo respectivamente. Generalmente durante la noche la humedad relativa alcanza valores entre 98 y 100%, en tanto que a medio día es de 65% (5).

### 3.2. Recolección de muestras

Para establecer un patrón del contenido de pigmentos en hojas normales de café (Coffea arabica L.) se muestrearon 5 arbustos. De cada arbusto se tomaron por duplicado hojas en tres posiciones: a pleno sol, autosombra intermedia y a plena autosombra, que se analizaron por separado. Generalmente tales hojas correspondieron al tercer par, contando desde la parte terminal de la rama. Una vez obtenido el patrón normal de concentración de pigmentos, se colectaron por duplicado hojas de cafeto que presentaban síntomas visibles de deficiencias minerales específicas; seguidamente se les clasificó en tres grados de deficiencia: inicial, intermedia y avanzada. Para esta identificación de campo se siguió la "Clave de los síntomas visibles de las Deficiencias" elaborado por Müller (32), así:

#### 3.2.1. Nitrógeno

En el estado inicial de deficiencia se observó una franja angosta, fuertemente amarilla, a lo largo del borde de la hoja (32). En

el estado intermedio de deficiencia aumentó el área amarilla de la hoja y por consiguiente disminuyó el área verde de la misma. Muy avanzada la deficiencia la hoja apareció totalmente amarillenta.

### 3.2.2. Fósforo

En el estado inicial de deficiencia la hoja presentó pequeñas manchas amarillo-rojizas.

Al progresar la deficiencia, el área amarillo-rojizo de la hoja se extendió notablemente.

El estado avanzado se caracterizó por una marcada clorosis con manchas amarillentas con tonalidades rojizas.

### 3.2.3. Potasio

De acuerdo con Müller (32) "la necrosis es el síntoma más típico de la deficiencia de potasio". Según el tamaño del área necrótica y de la pequeña faja amarillenta, ubicada entre el tejido necrótico marginal o apical y el área central, no afectada, se establecieron 3 estados de deficiencia.

### 3.2.4. Calcio

Bajo condiciones de deficiencia, la hoja presentó clorosis en forma irregular "dejando un área endentada verde oscuro a lo largo del nervio principal y deformación convexa de la lámina" (32). Atendiendo a la magnitud del área clorótica se establecieron tres estados de deficiencia.

### 3.2.5. Magnesio

Müller (32) indicó que la deficiencia de magnesio se manifiesta por una clorosis que empieza cerca del nervio central y se expande entre los nervios principales laterales, dejando a ambos lados de ta les nervaduras una faja siempre verde. Agregó el citado autor que en casos avanzados de deficiencia el área clorótica ocre-amarillo llega a cubrir la totalidad de la hoja. La clasificación en tres es tados de deficiencia se basó en tal premisa.

### 3.2.6. Azufre

Malavolta (28), citando a Müller, indica que la deficiencia de azufre se manifiesta por una clorosis que abarca el nervio principal y se extiende hacia la mitad de la hoja. De acuerdo con la intensificación de la clorosis, se clasificó la deficiencia de azufre en 3 estados.

### 3.2.7. Hierro

Los 3 estados de deficiencia, calificados según la clave de Müller (32), incluyeron a) hojas verde claro, b) amarillentas, c) casi blancuzcas. Al mismo tiempo se dio consideración al aspecto reticulado de las mismas.

### 3.2.8. Manganeso

El estado inicial presentó hojas con reticulado grosero sobre fondo verde claro. El intermedio se denotó por la presencia de hojas

con nervaduras verdes produciendo reticulación sobre fondo amarillento, en tanto que en estado avanzado las hojas fueron totalmente amarillas.

### 3.2.9. Boro

La sintomatología no fue muy típica. Sin embargo, atendiendo la "Clave de los síntomas visuales de las Deficiencias" de Müller (32) se le clasificó en 3 estados, de acuerdo con el tamaño de las hojas y el grado de deformación de las mismas.

### 3.2.10. Zinc

Los 3 estados de deficiencia presentaron hojas de menor tamaño que las normales y un retículo verde que se destaca sobre un fondo verde claro o amarillento, llegando a tener una coloración amarillo-blanquecina, en casi toda la hoja en estado avanzado (32).

La comprobación de las deficiencias encontradas se realizó por medio de análisis foliar, con los resultados que se incluyen en el Apéndice.

Puesto que los síntomas de deficiencia se presentan en hojas expuestas a diferentes intensidades lumínicas, según el caso específico (p.e. N en hojas jóvenes, a pleno sol; P en hojas viejas de plena autosombra), se decidió efectuar las comparaciones del caso con los patrones respectivos:

Deficiencias:	Patrón:
N, hojas jóvenes asoleadas	Hojas normales a pleno sol
P, hojas adultas de sombra intensa	Hojas normales a plena autosombra
K, hojas adultas de sombra media	Hojas normales de autosombra intermedia
Ca, hojas jóvenes y adultas de sombra media	Hojas normales de autosombra intermedia
Mg, hojas adultas de sombra media	Hojas normales de autosombra intermedia
S, hojas jóvenes y adultas *	Hojas normales de plena autosombra
Fe, hojas jóvenes de sombra media	Hojas normales de autosombra intermedia
Mn, hojas jóvenes y adultas de sombra media	Hojas normales de autosombra intermedia
B, hojas jóvenes y adultas de sombra media	Hojas normales de autosombra intermedia
Zn, hojas jóvenes y adultas de sombra media	Hojas normales de autosombra intermedia

### 3.3. Preparación del extracto para la separación de los pigmentos

Un gramo de materia fresco se sumergió durante 1 minuto en agua destilada para desnaturalizar las clorofilasas y otras enzimas. En los casos de deficiencia de hierro y de manganeso se añadió a esta agua una pequeña cantidad de carbonato de calcio, por ser el material ácido. (Esto se repitió también durante la trituration). Luego

---

\* Las hojas deficientes en azufre fueron comparadas con hojas de plena autosombra, porque se les obtuvo en condiciones de invernadero, es decir bajo techo.

se trituro el material con un poco de arena de cuarzo en un mortero; se le agregó cierta cantidad de acetona y se siguió triturando. Se pasó la masa a un filtro de vidrio fundido, tipo M (mediano) colocado sobre un frasco de filtración. Se aplicó vacío. Se agregó otra pequeña cantidad de acetona al mortero, se lavó y se pasó el líquido al filtro, removiendo la masa en este. Se repitió el procedimiento varias veces, gastando un total de 25 ml de acetona. Después se completó el volumen del filtrado a 25 ml, lavando al mismo tiempo el frasco Büchner.

### 3.4. Separación de los pigmentos mediante cromatografía en capa fina

Para la separación de los pigmentos de los cloroplastos se utilizó el método de cromatografía en capa fina propuesto por Hager y Bertenrath (16). Los pigmentos separados fueron sometidos a un análisis cuantitativo mediante el proceso de espectrofotometría.

#### 3.4.1. Preparación de placas

a) Se pesaron juntos:

12 g Kieselgur G (tierra sílice, E. Merck. No. 8129)

3 g silicagel 0,08 mm (E. Merck No. 7729)

3 g carbonato de calcio

0,02 g hidróxido de calcio

b) Se preparó una solución de ácido ascórbico al  $5 \times 10^{-3}$  M.

c) Se midieron 55 ml de la solución de ácido ascórbico, los que se mezclaron con el material adsorbente pesado, bajo agitación constante. Se continuó agitando vigorosamente durante 60 segundos.

Luego se vertió la masa en un aplicador de cromatografía (marca UNOPLAN, tipo BP. 945,868, de la firma Shandon Scientific Co. Ltd.), y se le esparció sobre placas de vidrio, dándole un espesor de 0,25 mm. Las placas se dejaron secar sin moverlas, durante unos 10 minutos. Luego se les llevó a secamiento por 90 minutos, en una estufa, con ventilación adecuada, a una temperatura de 50°C para su activación.

#### 3.4.2. Disolvente para la separación

Se mezclaron 100 ml de gasolina (ligroína) con un punto de ebullición de 100 a 140°C con 10 ml de isopropanol y 0,25 ml agua destilada. De esta mezcla se colocó suficiente cantidad en una cámara cromatográfica de vidrio, con tapadera esmerilada superpuesta para llenar el fondo hasta unos 0,5 cm de altura.

#### 3.4.3. Método

Del extracto de pigmentos, se aplicó con una pipeta 1 ml en una franja angosta (menos de 1 cm de ancho) sobre la base de la placa. La aplicación se hizo con muy poca luz, dando tiempo a que la acetona se secase durante la misma. Luego se dejaron secar las placas por pocos segundos y se colocaron en la cámara cromatográfica con el solvente. Se tapó la cámara y enseguida se le cubrió totalmente con una caja de madera. La separación de los pigmentos duró de 40 a 60 minutos. La secuencia de los pigmentos en la placa, desde arriba, o sea el frente hacia abajo, fue la siguiente:

<u>Pigmento</u>	<u>Color</u>
carotinas	anaranjado
clorofila "a"	verde azulado
clorofila "b"	verde
luteína	amarillo fuerte
epóxido de luteína	amarillo
violaxantina	amarillo
neoxantina	amarillo
(línea de base)	

Después de la separación, cada una de las franjas correspondientes a un pigmento, mediante una espátula con el material adsorbente, fue trasladada a una batería de filtros friteados colocados sobre frascos color ámbar, diseñados para aplicarles vacío. Del embudo, el filtrado pasó a un matraz aforado de 10 ml. Estando este matraz dentro del frasco ámbar. Para la elución se utilizaron los disolventes que se citan: hexano para carotinas; acetona para las clorofilas "a" y "b" y etanol para luteína, epóxido de luteína, violaxantina y neoxantina. El aforo del matraz se efectuó luego con el solvente respectivo.

### 3.5. Separación de carotinas únicamente

Para determinar que tipos de carotinas se presentaron en el cromatograma obtenido anteriormente, se utilizó el método de Hager y Meyer-Bertenrath (17):

a) Preparación de placas: Se pesaron juntos:

29,5 g de  $\text{CaCO}_3$  (E. Merck No. 2066)

6,0 g de MgO (E. Merck No. 5865)

5,0 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (E. Merck No. 2047)

Se mezclaron con 60 ml de una solución acuosa de KOH al 1,7%.

Las placas se dejaron secar algún tiempo al aire y luego durante 45 minutos, en una estufa a una temperatura de 110°C.

b) Solvente para separación: Se mezclaron 100 ml de gasolina (ligroína) con un punto de ebullición de 100 a 140°C, con 3 ml de cloroformo.

c) y d) La preparación de los pigmentos y el método: Se utilizó el mismo extracto de pigmentos, utilizado para la separación de todos los pigmentos (3,3). De él se aplicó 1 ml sobre la base de la placa activada. La secuencia de carotinas obtenida fue:

-----

$\beta$ -carotina

$\gamma$ -carotina

-----

-----

(línea de base)

Para la extracción de ambas carotinas se empleó cloroformo, según el método descrito (3.4.3.).

### 3.6. Análisis cuantitativo de los pigmentos

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman, modelo B. Con cada pigmento se determinó la máxima absorbancia (densidad óptica) para una longitud de onda específica. La absorbancia máxima del pigmento fue medida en relación a la del disolvente puro, respectivo. Para calcular matemáticamente la concentración es necesario conocer, para cada pigmento, el coeficiente de extinción molecular, que es una función de soluto, del disolvente y de la longitud de onda. Para proceder al análisis se contó con los siguientes datos (11, 13, 16, 17, 41):

<u>Pigmento</u>	<u>Disolvente</u>	<u>Longitud de onda para máxima absorbancia</u>	<u>Coefficiente de Ext. Molecular</u>
Carotinas	Hexano	450 nm	2450
Clorofila "a"	Acetona	430 nm	106
Clorofila "b"	Acetona	455 nm	146,9
Luteína	Etanol	446,4 nm	2540
Epóxido	Etanol	418 nm	2400
Violaxantina	Etanol	420 nm	2250
Neoxantina	Etanol	438 nm	2270
$\beta$ -carotina	Cloroformo	456 nm	2420
$\gamma$ -carotina	Cloroformo	456 nm	2200

Con el propósito de expresar la concentración de pigmentos en mg/100 g de peso fresco del material, se empleó la fórmula (17):

$$C = \frac{E. a. z. 10}{E_{1\%}^{1\text{cm}} \cdot b. w.} \times 100$$

en la cual:

- C = concentración del pigmento en mg/100 g de peso fresco
- E = absorción máxima o densidad óptica máxima del pigmento
- $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  = coeficiente de extinción molecular de cada pigmento
- a = ml del extracto crudo de pigmentos en acetona (= 25 ml)
- b = ml de extracto crudo aplicado sobre la placa (= 1 ml)
- z = ml de disolvente utilizado para la elución de cada pigmento (= 10 ml)
- w = peso fresco del material con que se inició la extracción (= 1 g)
- 10 = factor constante
- 100 = coeficiente para expresar la concentración sobre 100 g de peso fresco.

En las condiciones del presente trabajo la fórmula puede transformarse de la manera siguiente:

$$C = \frac{E}{E_{1\text{ cm}}^{1\%}} \times 2,5 \times 10^5$$

#### 4. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los datos obtenidos en el análisis de hojas normales a pleno sol, autosombra intermedia y plena autosombra, lo mismo que los resultados provenientes del análisis de hojas con síntomas de deficiencias minerales.

##### 4.1. Contenido de pigmentos en hojas normales de café

(Coffea arabica L.)

Tal como se muestra en la Figura 1 y Cuadro 1, en las hojas normales a pleno sol fue donde se encontró el menor contenido de todos los pigmentos.

Cuadro 1. Contenido de pigmentos en hojas normales de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g de peso fresco).

Pigmento	Posición de la hoja					
	Pleno sol		Autosombra intermedia		Plena autosombra	
	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$\bar{x}$	$S\bar{x}$	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
Carotinas	8,4	± 0,39	13,0	± 1,64	15,8	± 1,67
Clorofila a	537,0	± 45,00	1188,0	± 133,00	1162,0	± 100,00
Clorofila b	237,0	± 22,00	537,0	± 52,00	398,0	± 79,00
Luteína	17,0	± 1,11	26,3	± 2,34	25,1	± 2,33
Epóxido de luteína	3,1	± 0,42	6,3	± 0,94	3,9	± 0,41
Violaxantina	3,7	± 0,28	4,2	± 0,37	4,0	± 0,40
Neoxantina	3,4	± 0,28	7,3	± 0,88	6,8	± 1,08

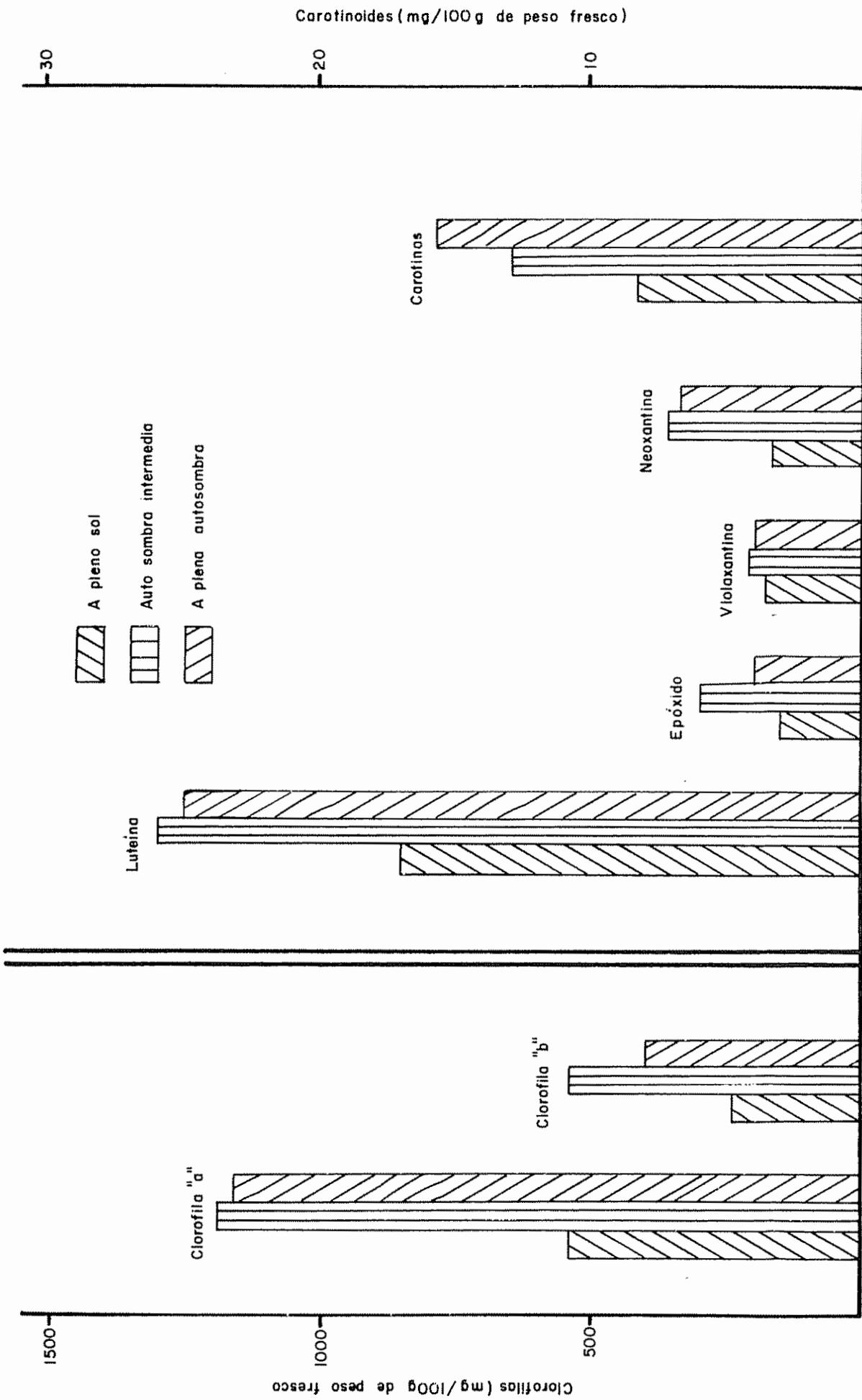


Fig. 1 Contenido de pigmentos en hojas normales de café

En las hojas normales de autosombra intermedia se halló la mayor concentración de clorofila "a", clorofila "b", luteína, epóxido de luteína, violaxantina, neoxantina. El contenido de carotinas fue también mayor que en hojas a pleno sol, pero menor que el correspondiente a hojas normales de plena autosombra.

En hojas normales de plena autosombra se notó la mayor concentración de carotinas. El contenido de clorofilas "a" y "b", así como de xantofilas (luteína, epóxido de luteína, violaxantina y neoxantina) era inferior al de las hojas de autosombra intermedia.

#### 4.2. Tipo y contenido de carotinas en hojas normales de café

El Cuadro 2 y la Figura 2 exhiben los tipos de carotinas ( $\beta$  y  $\gamma$ -carotina) presentes en una hoja normal de café a plena autosombra y su respectiva concentración. Se observa así que el contenido de  $\beta$ -carotina es mayor que el de  $\gamma$ -carotina.

Cuadro 2. Tipo y contenido de carotinas en hojas normales de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g de peso fresco).

Tipo de carotinas	Concentración
$\beta$ -carotina	6,7
$\gamma$ -carotina	4,6

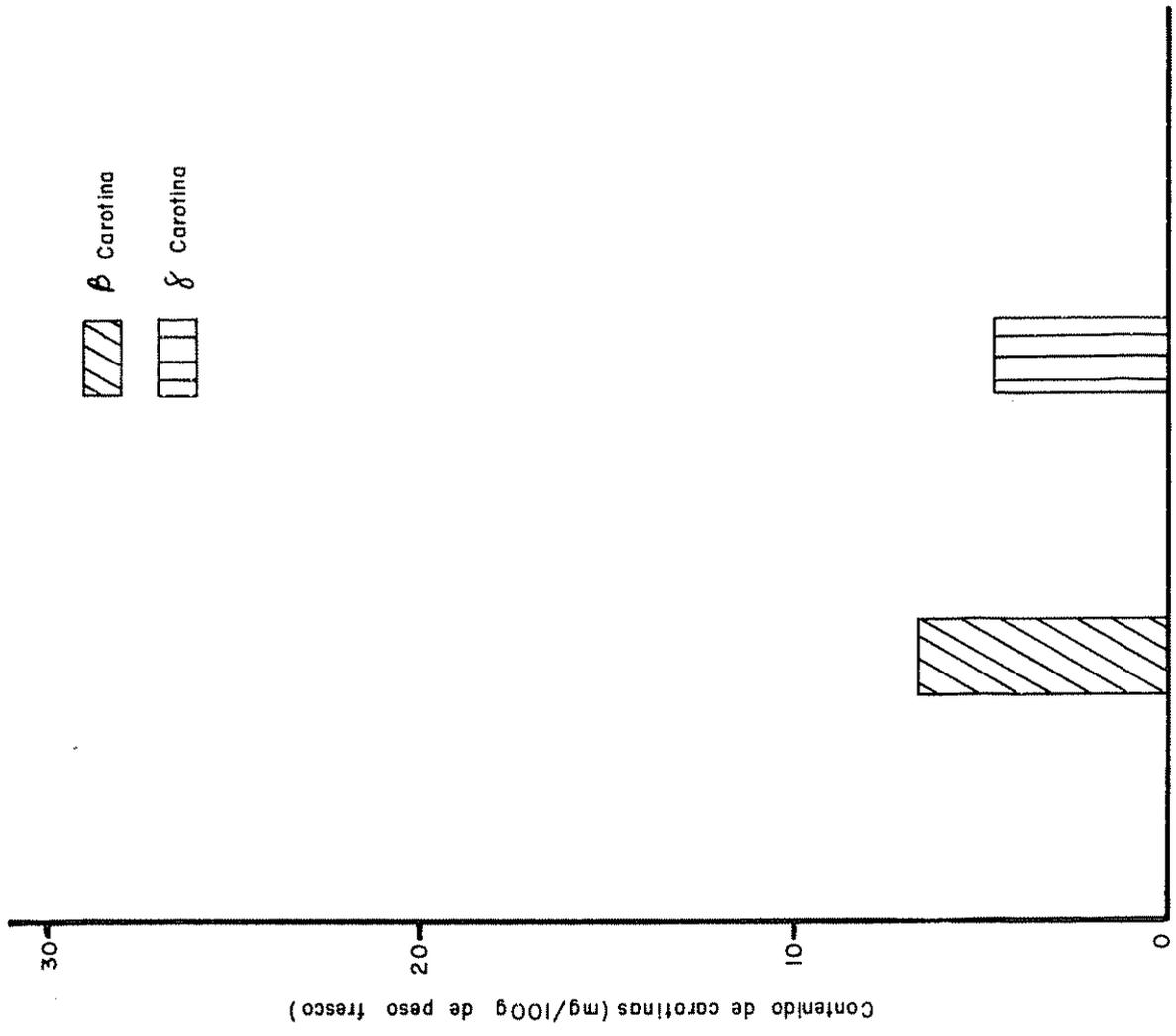


Fig.2 Tipo y contenido de carotinas en hojas normales de café a plena autosombra

4.3. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de nitrógeno

En el Cuadro 3 y en la Figura 3 se observa que en el estado inicial de la deficiencia las clorofilas "a" y "b", son las que presentaron mayor concentración, siguiéndoles (en orden decreciente) luteína, carotinas, violaxantina, epóxido de luteína y neoxantina.

Cuadro 3. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de nitrógeno de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	6,4	3,3	1,0
Clorofila a	400,0	189,0	106,0
Clorofila b	162,0	106,0	38,0
Luteína	16,2	9,1	9,6
Epóxido de luteína	3,9	2,1	1,3
Violaxantina	4,4	1,4	1,9
Neoxantina	3,3	1,4	1,1

En el estado intermedio hubo disminución general del contenido de pigmentos con respecto al estado inicial de deficiencia. Las clorofilas "a" y "b" presentaron la mayor concentración en estas hojas siguiéndoles luteína, carotinas, epóxido de luteína, violaxantina, neoxantina; las dos últimas con igual concentración.

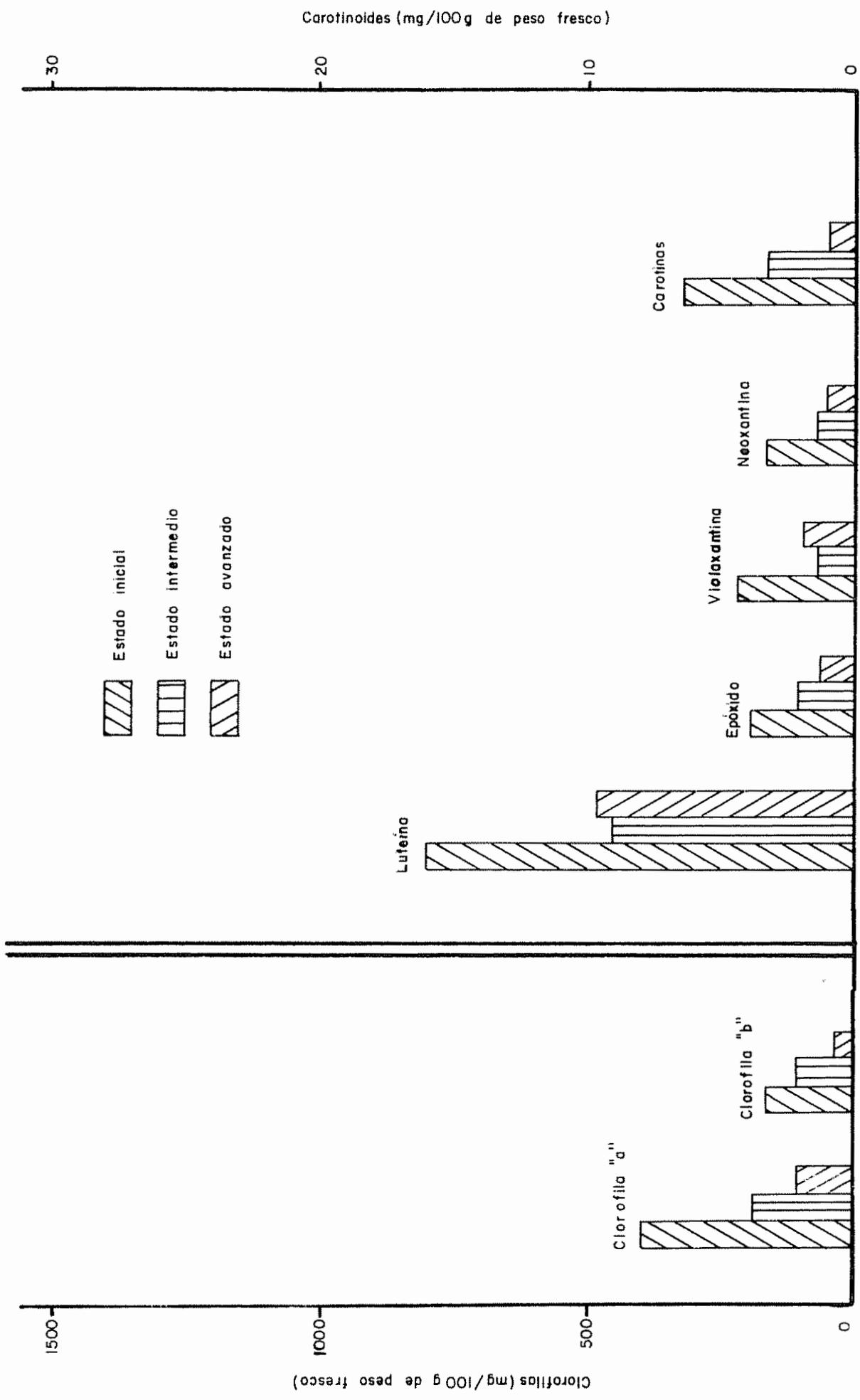


Fig. 3 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en nitrógeno

En el estado avanzado continuó la disminución general del contenido de pigmentos con respecto al estado inicial. La mayor concentración correspondió otra vez a las clorofilas "a" y "b", siguiéndole luteína, violaxantina, epóxido de luteína, neoxantina, carotinas. En relación al estado intermedio hubo aumento de luteína y violaxantina.

En el Cuadro 4 se aprecia que hubo disminución de carotinas, clorofila "a", clorofila "b", total de clorofilas ("a" y "b"), luteína, neoxantina. Se observa aumento de epóxido de luteína, violaxantina, total de xantofilas.

En el estado intermedio se nota disminución de todos los pigmentos. La mayor disminución corresponde (orden decreciente) a clorofila "a", total clorofilas ("a" y "b") y violaxantina (con el mismo %), carotinas y neoxantina (con igual %), clorofila "b", luteína, total de xantofilas, epóxido de luteína.

En el estado avanzado se aprecia disminución general de los pigmentos. La mayor disminución corresponde a carotinas, siguiéndole en orden decreciente clorofila "b", clorofila "a" y total clorofilas ("a" y "b") con igual porcentaje; neoxantina, epóxido de luteína, violaxantina, total xantofilas, luteína.

En el Cuadro 5 están indicados los contenidos del total de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales, a pleno sol, y en cada uno de los 3 estados de hojas deficientes en nitrógeno. Como se observa la relación de xantofilas a carotinas en hojas normales es menor que en cualquiera de los tres estados de

Cuadro 4. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de nitrógeno en relación a una hoja normal a pleno sol.

Pigmento	Hojas normales a pleno sol %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	77	40	12
Clorofila "a"	100	75	35	19
Clorofila "b"	100	68	45	14
Clorofilas ("a" y "b")	100	73	38	19
Luteína	100	95	53	56
Epóxido de luteína	100	127	68	42
Violaxantina	100	120	38	53
Neoxantina	100	96	40	32
Total xantofilas	100	108	54	54

Cuadro 5. Relaciones de concentración  $\left( \frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b} \right)$ .

	Hojas normales		Hojas con síntomas visibles de deficiencia de nitrógeno		
	A pleno sol	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado	Estado avanzado
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	8,4	6,4	3,3	1,0	1,0
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	27,2	27,8	14,0	13,9	13,9
Total clorofilas ("a" y "b") mg/100 g de peso fresco	764,0	562,0	295,0	144,0	144,0
Xantofilas a carotinas	3.2:1	4.3:1	4.2:1	13.9:1	13.9:1
Clorofila "a" a clorofila "b"	2.3:1	2.5:1	1.8:1	2.8:1	2.8:1

deficiencia. En las hojas deficientes se nota que la relación más alta corresponde al estado avanzado, disminuyendo en el estado inicial e intermedio respectivamente.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales a pleno sol es menor que la correspondiente a los estados inicial y avanzado de la deficiencia, pero es mayor que la del estado intermedio. En hojas deficientes la relación más alta se observa en el estado avanzado.

#### 4.4. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de fósforo

En el Cuadro 6 y en la Figura 4 se observa que en el estado inicial de deficiencia, el mayor contenido corresponde a clorofila "a" siguiéndole en orden decreciente clorofila "b", luteína, carotinas, violaxantina, neoxantina, epóxido de luteína.

Cuadro 6. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de fósforo de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	10,7	3,0	4,3
Clorofila a	737,0	242,0	0,0
Clorofila b	638,0	85,0	2,0
Luteína	30,0	14,0	20,9
Epóxido de luteína	3,6	3,1	3,9
Violaxantina	7,5	2,2	2,8
Neoxantina	4,7	1,9	1,4

Carotinoides (mg/100 g de peso fresco)

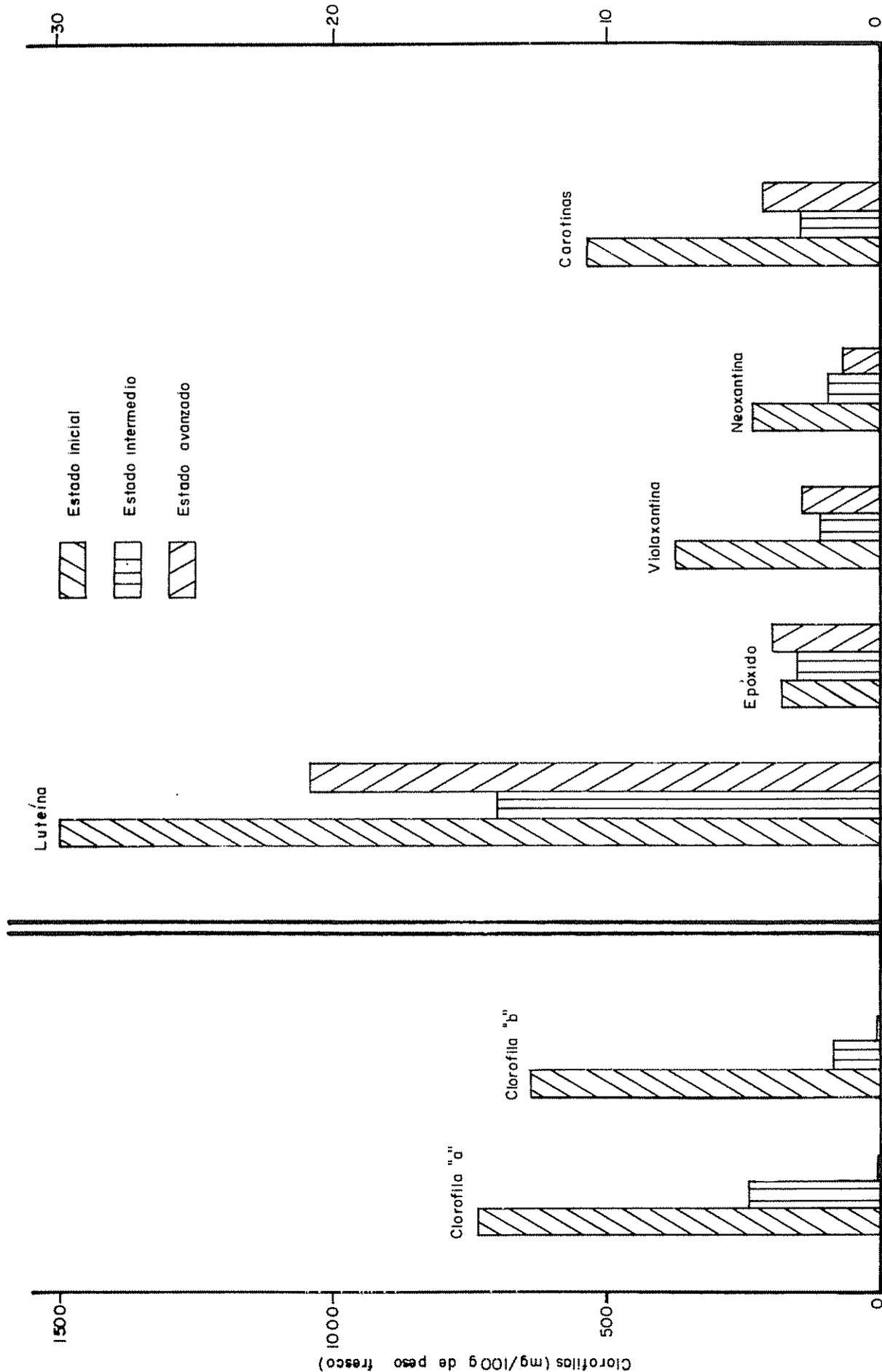


Fig. 4 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en fósforo

En el estado intermedio se nota un descenso general del contenido de pigmentos con respecto al estado inicial de deficiencia. La concentración en orden decreciente se establece de la siguiente manera: clorofila "a", clorofila "b", luteína, epóxido de luteína, carotinas, violaxantina, neoxantina.

El estado avanzado presentó aún mayor descenso global con relación al contenido de pigmentos en el estado inicial. Al hacer la comparación con el estado intermedio, hubo aumento de luteína, carotinas, epóxido de luteína, neoxantina. Se observa ausencia de clorofila "a", disminución de clorofila "b" y de neoxantina. En este estado la mayor concentración corresponde a luteína, siguiéndole carotinas, epóxido de luteína, violaxantina, neoxantina.

En el Cuadro 7 se observa que en el estado inicial hubo disminución (en orden decreciente) de clorofila "a", carotinas, neoxantina, total de clorofilas ("a" y "b") y epóxido de luteína. Se nota un aumento (en orden creciente) de xantofilas totales, luteína, clorofila "b" y violaxantina. En el estado intermedio se observa disminución general de pigmentos en el siguiente orden: carotinas; clorofila "a", clorofila "b" y total de clorofilas ("a" y "b") con el mismo porcentaje; neoxantina, total de xantofilas, luteína y violaxantina con igual porcentaje, epóxido de luteína.

En el estado avanzado se observa disminución (en orden decreciente) de clorofila "a", neoxantina, clorofila "b" y total de clorofilas ("a" y "b") con el mismo porcentaje, carotinas, violaxantina, total de xantofilas, luteína. Hubo sin embargo un aumento de epóxido de luteína.

Cuadro 7. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de fósforo en relación a una hoja normal a plena autosombra.

Pigmento	Hojas normales a plena autosombra %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	68	19	27
Clorofila "a"	100	63	21	0
Clorofila "b"	100	160	21	4
Clorofilas ("a" y "b")	100	88	21	4
Luteína	100	120	56	83
Epóxido de luteína	100	95	81	101
Violaxantina	100	187	56	69
Neoxantina	100	69	28	2
Total xantofilas	100	115	54	73

En el Cuadro 8 se muestra el contenido de pigmentos en hojas normales a plena autosombra en relación a cada uno de los 3 estados de hojas deficientes en fósforo. La relación de xantofilas a carotinas en hojas normales de plena autosombra es mayor que cualquiera de las correspondientes a los 3 estados de deficiencia. En hojas deficientes la mayor relación se observa en el estado intermedio, seguida por la del avanzado y la del inicial.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales de plena autosombra es mayor que la correspondiente a cualesquiera de los estados de deficiencia. En hojas deficientes la proporción más amplia corresponde al estado intermedio, disminuyendo en el estado inicial y toma valor cero en el estado avanzado.

#### 4.5. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de potasio

En el estado inicial, tal como lo muestra la Figura 5 y el Cuadro 9 el mayor contenido corresponde a clorofila "a", siguiéndole en orden decreciente clorofila "b", luteína, carotinas, epóxido de luteína, neoxantina y violaxantina.

En el estado intermedio se notó una disminución de todos los pigmentos con relación al estado inicial. Su contenido, en orden de de creciente, se presenta así: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.



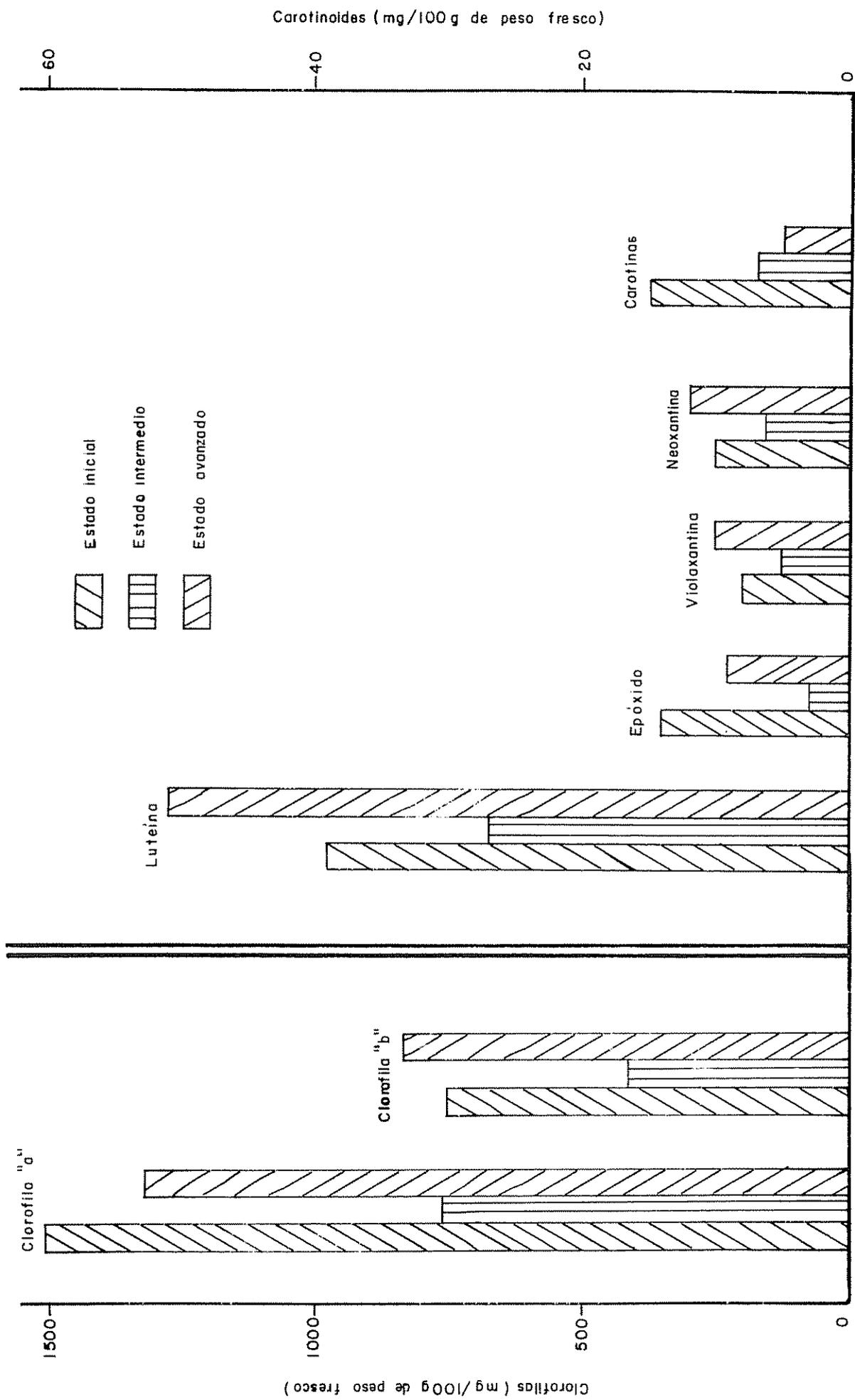


Fig. 5 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en potasio

Cuadro 9. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de potasio de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	15,3	6,6	5,1
Clorofila a	1509,0	755,0	1321,0
Clorofila b	749,0	408,0	834,0
Luteína	39,4	24,6	51,2
Epóxido de luteína	14,6	2,6	8,8
Violaxantina	8,3	5,0	10,5
Neoxantina	9,9	6,0	12,1

En el estado avanzado de deficiencia se observó un descenso de carotinas con respecto a los estados inicial e intermedio. La clorofila "a", clorofila "b", luteína, violaxantina y neoxantina aumentaron con relación a los estados inicial e intermedio. El epóxido de luteína aumentó en comparación al estado intermedio, pero decreció en cuanto al estado inicial. Su contenido de pigmentos en orden decreciente así: clorofila "a", clorofila "b", luteína, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

Se observa en el Cuadro 10 que el estado inicial presenta aumento general de pigmentos, en orden creciente: carotinas, clorofila "a", total clorofilas ("a" y "b"), neoxantina, clorofila "b", luteína, total xantofilas, epóxido de luteína.

Cuadro 10. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de potasio en relación a una hoja normal de autosombra intermedia.

Pigmento	Hojas normales de autosombra intermedia %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	117	51	39
Clorofila "a"	100	127	64	111
Clorofila "b"	100	139	76	155
Clorofilas ("a" y "b")	100	131	67	125
Luteína	100	150	94	195
Epóxido de luteína	100	229	41	139
Violaxantina	100	196	118	248
Neoxantina	100	135	83	165
Total xantofilas	100	163	87	187

En el estado intermedio se notó que había una disminución de los pigmentos, exceptuando la violaxantina. La disminución en orden decreciente se detalla así: epóxido de luteína, carotinas, clorofila "a" total clorofilas ("a" y "b"), clorofila "b", neoxantina, total xantofilas, luteína.

En el estado avanzado se observó un aumento general de pigmentos con excepción de las carotinas. El aumento de pigmentos en orden creciente se presenta así: clorofila "a", total clorofilas ("a" y "b"), epóxido de luteína, clorofila "b", neoxantina, total xantofilas, luteína, violaxantina.

El Cuadro 11 exhibe la concentración total de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales de autosombra intermedia y en cada uno de los estados de hojas deficientes en potasio.

La relación de xantofilas a carotinas en hojas normales de autosombra intermedia, era mayor que la correspondiente a los estados de deficiencia. En hojas deficientes la relación más amplia correspondió al estado avanzado. Le siguen la del estado intermedio e inicial respectivamente.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales de autosombra intermedia era mayor que la correspondiente a los estados de deficiencia. En hojas deficientes la mayor relación correspondió al estado inicial, seguida por la del intermedio y la del avanzado.

Cuadro 11. Relaciones de concentración  $\left(\frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b}\right)$ .

	Hojas normales		Hojas con síntomas visibles de deficiencia de potasio		
	Autosombra intermedia	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado	Estado avanzado
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	13,0	15,3	6,6		5,1
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	44,1	72,2	38,2		82,6
Total clorofilas ("a" y "b") en mg/100 g de peso fresco	1725,0	2258,0	1163,0		2155,0
Xantofilas a carotinas	3.4:1	4.7:1	5.8:1		16.2:1
Clorofila "a" a clorofila "b"	2.2:1	2.0:1	1.8:1		1.6:1

4.6. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de calcio

En el Cuadro 12 y en la Figura 6 se observa que en el estado inicial el mayor contenido de pigmentos corresponde a clorofila "a", siguiéndole en orden decreciente: clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

Cuadro 12. Contenido de pigmentos de hojas con síntomas visibles de deficiencia de calcio de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	17,2	11,2	6,6
Clorofila "a"	1085,0	778,0	507,0
Clorofila "b"	502,0	425,0	306,0
Luteína	28,0	21,6	13,0
Epóxido de luteína	4,7	1,8	1,3
Violaxantina	6,1	3,0	1,6
Neoxantina	8,8	4,7	3,3

En el estado intermedio se notó que todos los pigmentos habían disminuido con respecto al estado inicial. La mayor concentración correspondió a clorofila "a", siguiéndole en orden decreciente: clorofila "b", carotinas, luteína, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

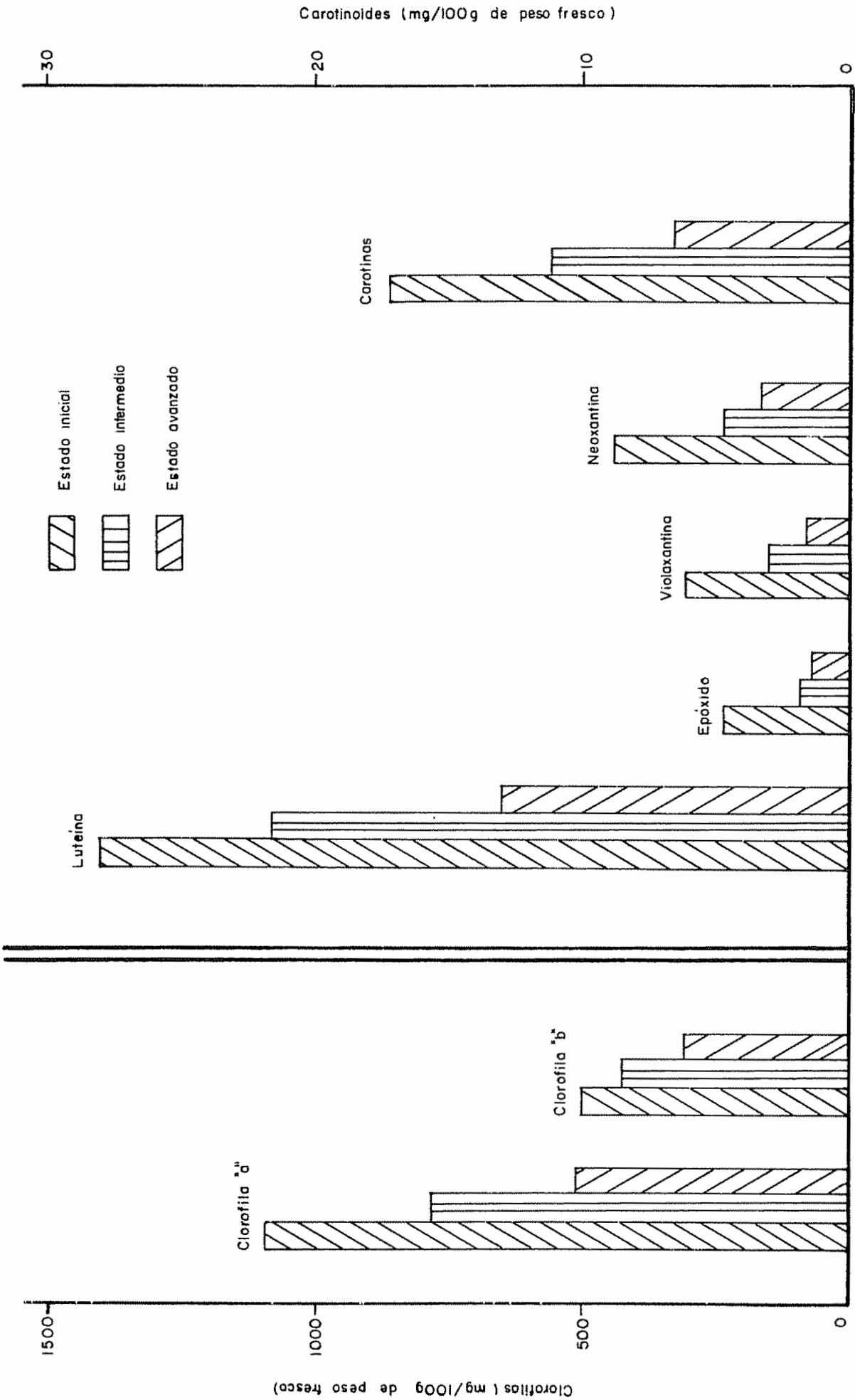


Fig. 6 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en calcio

El estado avanzado presentó disminución general del contenido de pigmentos en comparación a los estados inicial e intermedio. Su mayor contenido corresponde a clorofila "a", seguida por clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

En el Cuadro 13 se observa que en el estado inicial hubo disminución de epóxido de luteína, clorofila "a", total de clorofilas ("a" y "b"), pero aumentaron la luteína, el total de xantofilas, neoxantina, violaxantina y carotinas.

Con síntomas de deficiencia intermedias se notó disminución general de pigmentos (en orden decreciente): epóxido de luteína, neoxantina, clorofila "a", clorofilas ("a" y "b"), violaxantina, total de xantofilas, clorofila "b", luteína, carotinas.

El estado avanzado presentó disminución general de pigmentos (en orden decreciente): epóxido de luteína, violaxantina, clorofila "a", total xantofilas, neoxantina, clorofilas ("a" y "b"), luteína, carotinas, clorofila "b".

El Cuadro 14 abarca el total de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales de autosombra intermedia y en cada uno de los 3 estados de hojas deficientes en calcio. La relación de xantofilas a carotinas en hojas normales fue superior a la correspondiente a cualesquiera de los 3 estados de deficiencia. El estado avanzado de deficiencia presentó mayor relación que el inicial e intermedio que son idénticas.

Cuadro 13. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de calcio en relación a una hoja normal de autosombra intermedia.

Pigmento	Hojas normales de autosombra intermedia %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	145	86	51
Clorofila "a"	100	91	66	43
Clorofila "b"	100	94	79	57
Clorofilas ("a" y "b")	100	92	70	47
Luteína	100	107	82	50
Epóxido de luteína	100	74	29	21
Violaxantina	100	143	72	39
Neoxantina	100	120	64	45
Total xantofilas	100	108	75	44

Cuadro 14. Relaciones de concentración  $\left( \frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b} \right)$ .

	Hojas normales		Hojas con síntomas visibles de deficiencia de calcio		
	Autosembra in- termedia	Estado inicial	Estado inter- medio	Estado avan- zado	
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	13,0	17,2	11,2	6,6	
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	44,1	47,6	31,1	19,2	
Total clorofilas ("a" y "b") en mg/100 g de peso fresco	1725,0	1587,0	1203,0	813,0	
Xantofilas a carotinas	3.4:1	2.8:1	2.8:1	2.9:1	
Clorofila "a" a clorofila "b"	2.2:1	2.2:1	1.8:1	1.6:1	

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales era idéntica a la del estado inicial de deficiencia y superior a la de los estados intermedio y avanzado respectivamente. En hojas deficientes la mayor relación correspondió al estado inicial, siguiéndole la de los estados intermedio y avanzado.

4.7. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de magnesio

El Cuadro 15 y la Figura 7 demuestran que en el estado inicial de deficiencia el contenido mayor de pigmentos correspondió a clorofila "a", siguiéndole en orden decreciente: clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

Cuadro 15. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de magnesio de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	12,2	8,1	5,6
Clorofila "a"	1179,0	979,0	311,0
Clorofila "b"	536,0	536,0	132,0
Luteína	25,8	22,1	8,8
Epóxido de luteína	2,3	3,0	1,3
Violaxantina	2,5	3,3	1,1
Neoxantina	5,8	5,5	1,5

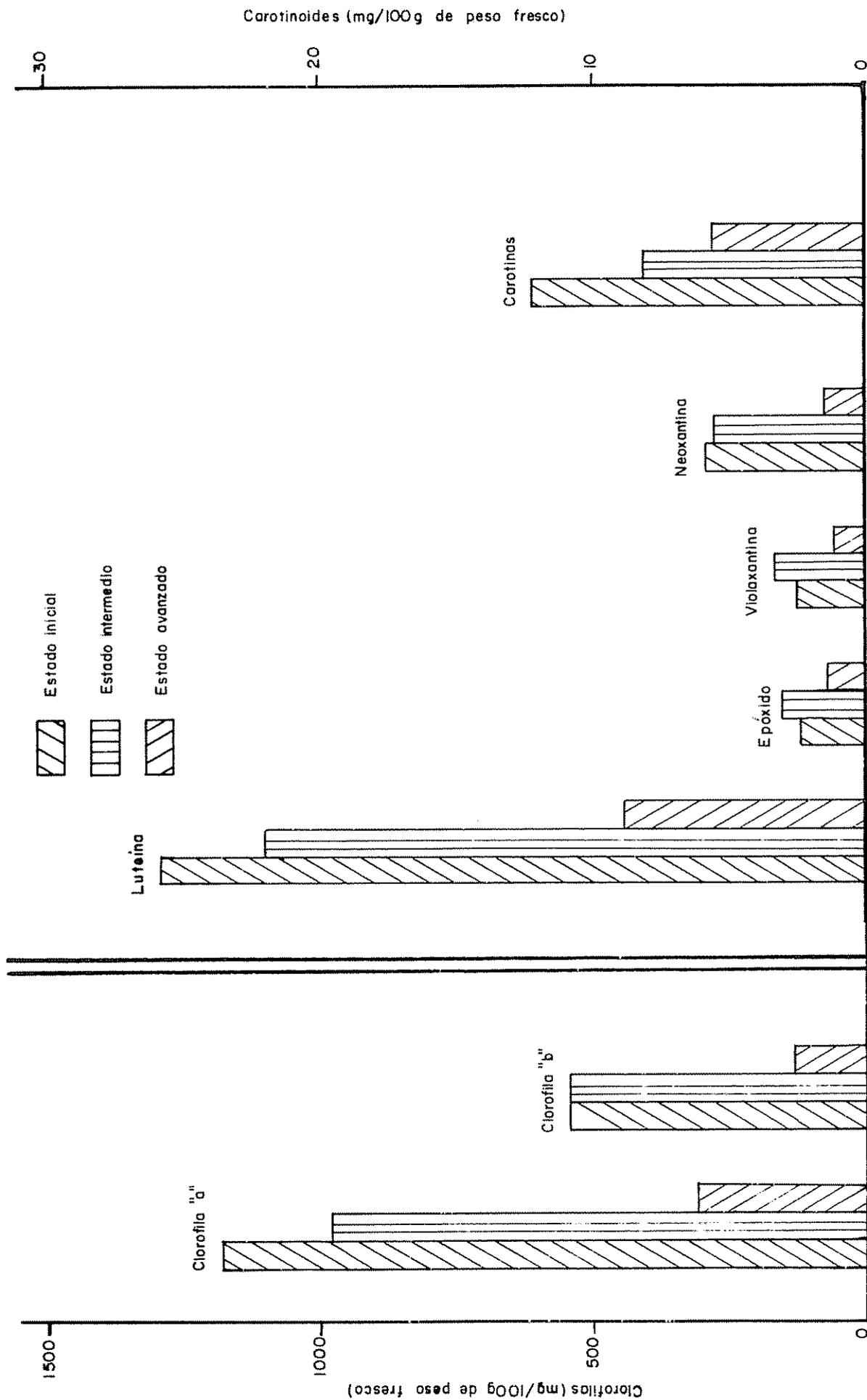


Fig. 7. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en magnesio

En el estado intermedio el contenido se presentó así: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína. Con respecto al estado inicial se observa disminución de carotinas, luteína, y neoxantina. Se notó un aumento de epóxido de luteína y de violaxantina. La clorofila "b" mantuvo su concentración.

En el estado avanzado se apreció disminución general del contenido con relación a los estados inicial e intermedio. La concentración, en orden decreciente correspondió así: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, epóxido de luteína, violaxantina.

El Cuadro 16 demuestra que en el estado inicial hubo disminución del contenido de pigmentos, exceptuando clorofila "b". La disminución en orden decreciente se presentó así: epóxido de luteína, violaxantina, neoxantina, total de xantofilas, carotinas, luteína, clorofila "a" y total clorofilas ("a" y "b"). La clorofila "b" mantuvo su concentración.

El estado intermedio exhibió disminución general del contenido de pigmentos exceptuando clorofila "b". La disminución en orden decreciente correspondió a: epóxido de luteína, carotinas, neoxantina, total de xantofilas, violaxantina, clorofila "a", luteína, clorofilas ("a" y "b"). El contenido de clorofila "b" no cambió.

En el estado avanzado se apreció un descenso general del contenido de pigmentos. El orden decreciente de disminución abarcó: neoxantina, epóxido de luteína, clorofila "b"; clorofila "a", total

Cuadro 16. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de magnesio en relación a una hoja normal de autosombra intermedia.

Pigmento	Hojas normales de autosombra intermedia %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	94	63	43
Clorofila "a"	100	99	82	26
Clorofila "b"	100	100	100	25
Clorofilas ("a" y "b")	100	99	88	26
Luteína	100	98	84	34
Epóxido de luteína	100	37	57	21
Violaxantina	100	59	78	26
Neoxantina	100	79	75	20
Total xantofilas	100	83	76	29

clorofilas ("a" y "b") y violaxantina, con igual porcentaje de las tres; total xantofilas, luteína, carotinas.

En el Cuadro 17 aparecen los datos relativos al total de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales de auto-sombra intermedia y en cada uno de los 3 estados de hojas deficientes en magnesio. La relación de xantofilas a carotinas en hojas normales fue mayor que la correspondiente a los estados inicial y avanzado de deficiencia, pero menor que la del estado intermedio. En hojas deficientes la mayor relación se observó en el estado intermedio, seguida por la de los estados inicial y avanzado respectivamente.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales fue similar a la correspondiente al estado inicial de deficiencia, mayor que la del estado intermedio, pero menor que la del estado avanzado. En hojas deficientes la mayor relación correspondió al estado avanzado, seguida por la de los estados inicial e intermedio respectivamente.

#### 4.8. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de azufre

En la Figura 8 y en el Cuadro 18 se observa que al estado inicial de deficiencia correspondió, en orden decreciente, el siguiente contenido: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, epóxido de luteína, violaxantina.

Cuadro 17. Relaciones de concentración  $\left( \frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b} \right)$ .

	Hojas normales		Hojas con síntomas visibles de deficiencia de magnesio	
	Autosombra intermedia	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	13,0	12,2	8,1	5,6
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	44,1	36,4	33,9	12,7
Total clorofilas ("a" y "b") en mg/100 g de peso fresco	1725,0	1715,0	1515,0	443,0
Xantofilas a carotinas	3.4:1	3.0:1	4.2:1	2.3:1
Clorofila "a" a clorofila "b"	2.2:1	2.2:1	1.8:1	2.3:1

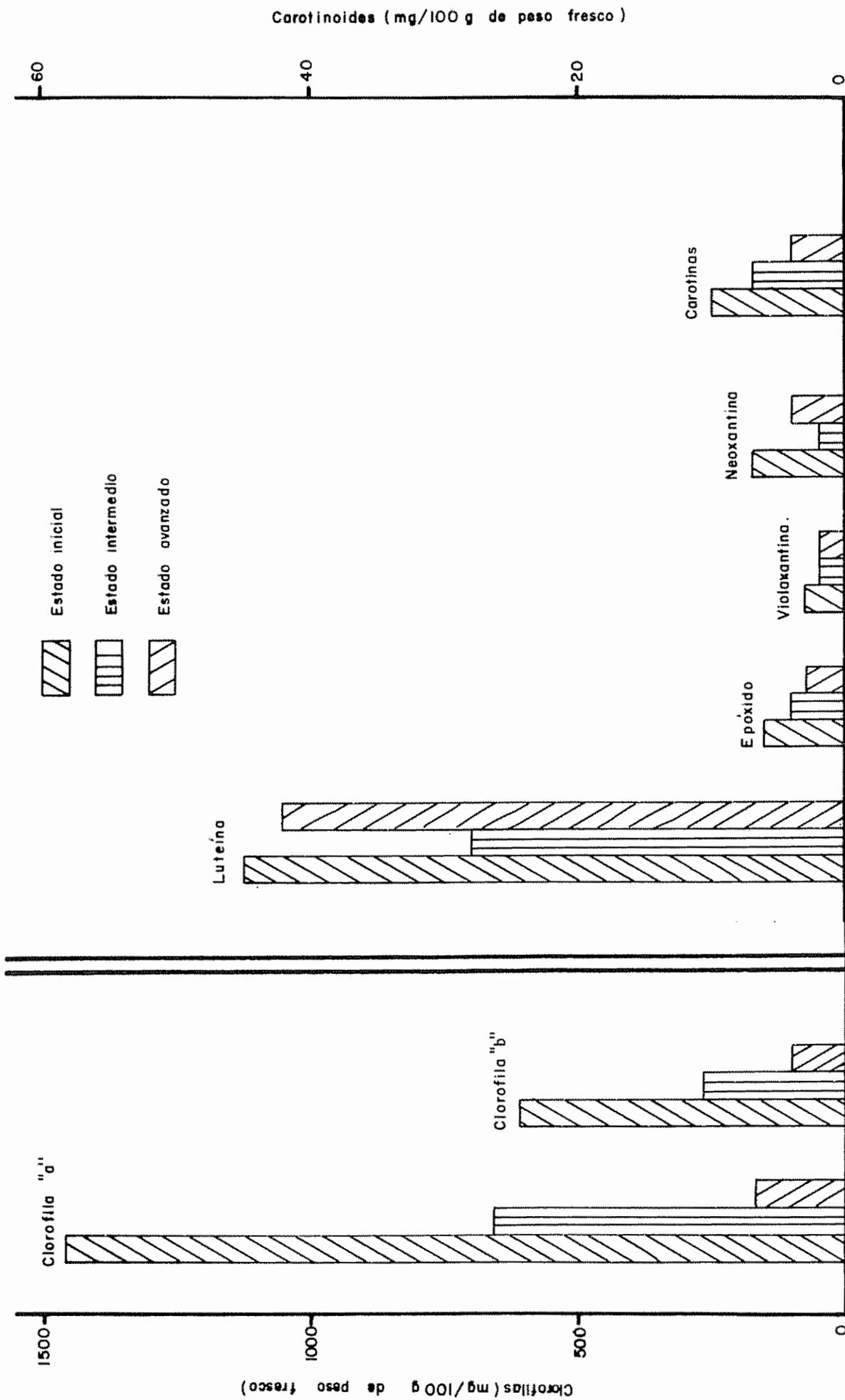


Fig. 8 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en azufre

Cuadro 18. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de azufre de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	10,2	7,1	4,1
Clorofila "a"	1462,0	660,0	165,0
Clorofila "b"	613,0	272,0	102,0
Luteína	45,3	28,5	43,3
Epóxido de luteína	6,2	4,1	3,1
Violaxantina	3,3	2,2	2,2
Neoxantina	7,7	2,2	4,4

En el estado intermedio se apreció disminución general del contenido de pigmentos con respecto al estado inicial. El contenido en orden decreciente, se estableció así: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, epóxido de luteína, violaxantina y neoxantina con igual concentración.

En el estado avanzado se notó disminución general del contenido con relación al estado inicial. Con respecto al estado intermedio se apreció disminución de carotinas, clorofila "a", clorofila "b", epóxido de luteína. Se ve aumento de luteína y neoxantina. La neoxantina mantuvo una concentración idéntica a la que presentó en el estado intermedio.

El Cuadro 19 demuestra que en el estado inicial de deficiencia había disminución de carotinas y violaxantina. Se apreció un aumento, en orden creciente, de neoxantina, clorofila "a", total clorofilas ("a" y "b"), clorofila "b", total de xantofilas, epóxido de luteína, luteína. En el estado intermedio disminuyeron, en cambio en orden decreciente: neoxantina, carotinas, violaxantina, clorofila "a", total clorofilas ("a" y "b"), clorofila "b", total de xantofilas. Al contrario, hubo aumento, de epóxido de luteína, y luteína.

El estado avanzado denotó descenso del contenido de pigmentos, siendo el orden el siguiente: clorofila "a", clorofilas ("a" y "b"); clorofila "b" y carotinas con igual porcentaje, violaxantina, neoxantina, epóxido de luteína. Se aprecia aumento, en orden creciente, de xantofilas totales y de luteína.

En el Cuadro 20 se comparan el total de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales a plena autosombra con los de los 3 estados de hojas deficientes en azufre.

La relación de xantofilas a carotinas en hojas normales era menor que la correspondiente a cualesquiera de los 3 estados de deficiencia. En hojas deficientes la mayor se apreció en el estado avanzado, seguida por la de los estados inicial e intermedio.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" fue superior a la que presentaron los 3 estados de deficiencia. En hojas deficientes la mayor relación correspondió a los estados inicial e intermedio, la menor al estado avanzado.

Cuadro 19. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de azufre en relación a una hoja normal a plena autosombra.

Pigmento	Hojas normales a plena autosombra %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	65	45	26
Clorofila "a"	100	126	57	14
Clorofila "b"	100	154	69	26
Clorofilas ("a" y "b")	100	133	60	17
Luteína	100	180	114	173
Epóxido de luteína	100	162	108	81
Violaxantina	100	83	56	56
Neoxantina	100	114	33	65
Total xantofilas	100	157	94	134

Cuadro 20. Relaciones de concentración  $\left( \frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b} \right)$ .

	Hojas con síntomas visibles de deficiencia de azufre			
	Hojas normales A plena auto- sombra	Estado inicial	Estado inter- medio	Estado avan- zado
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	15,0	10,2	7,1	4,1
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	39,8	62,5	37,0	53,0
Total clorofilas ("a" y "b") en mg/100 g de peso fresco	1560,0	2075,0	932,0	267,0
Xantofilas a carotinas	2.5:1	6.1:1	5.2:1	13.0:1
Clorofila "a" a clorofila "b"	3.0:1	2.4:1	2.4:1	1.6:1

4.9. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de hierro

El Cuadro 21 y la Figura 9 demuestran que en el estado inicial, en orden decreciente, el contenido de pigmentos fue así: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

Cuadro 21. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de hierro de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	9,2	7,1	2,5
Clorofila "a"	1038,0	472,0	235,0
Clorofila "b"	357,0	221,0	145,0
Luteína	18,2	14,3	6,4
Epóxido de luteína	3,1	2,6	1,5
Violaxantina	4,4	3,3	2,8
Neoxantina	6,0	4,8	2,2

En el estado intermedio se observó una disminución general del contenido con relación al estado inicial. El orden decreciente fue el siguiente: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

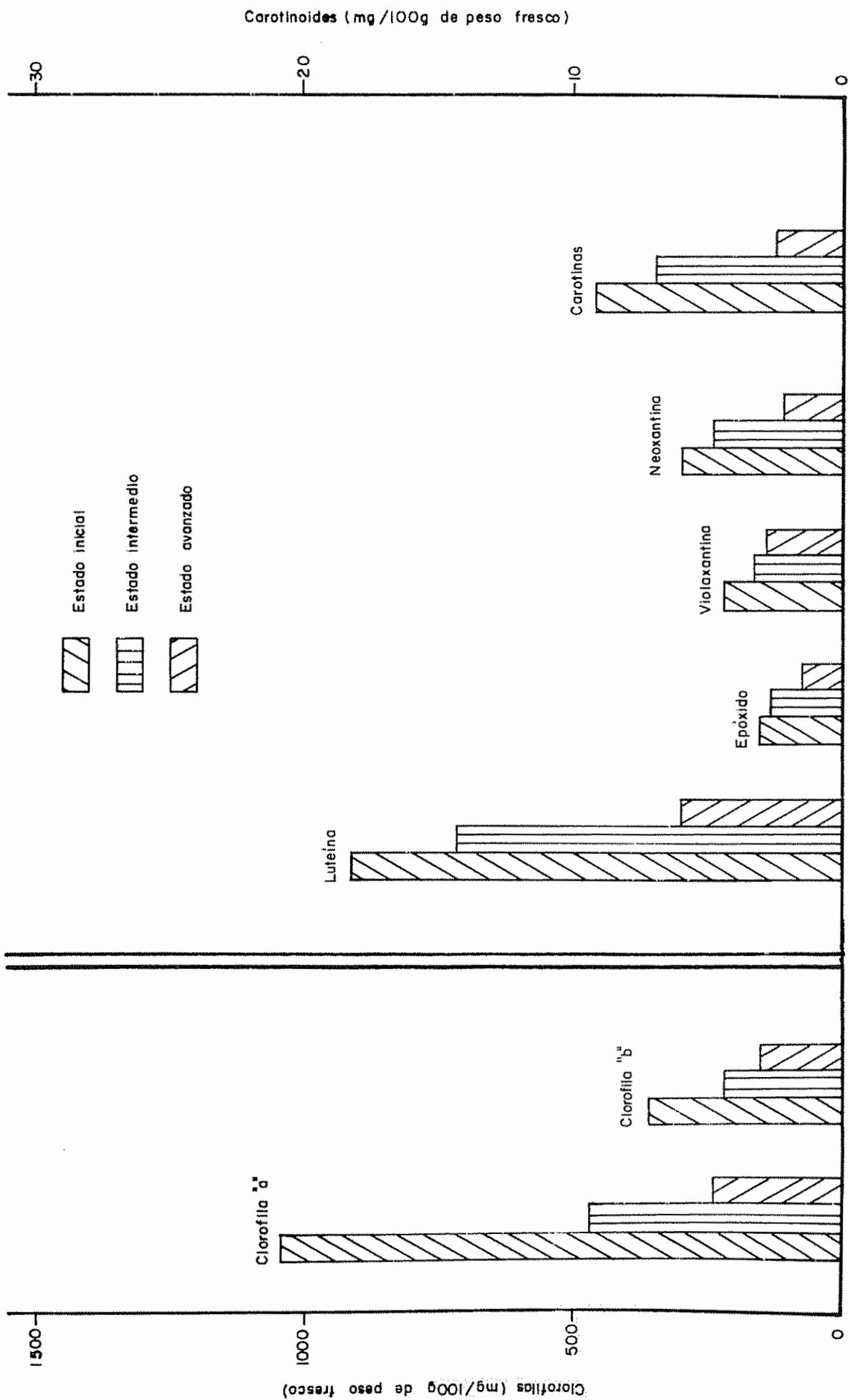


Fig. 9 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en hierro

El estado avanzado denotó disminución del contenido de pigmentos con relación a los estados inicial e intermedio. Su contenido de pigmentos (en orden decreciente) fue el siguiente: clorofila "a", clorofila "b", luteína, violaxantina, carotinas, neoxantina, epóxido de luteína.

El Cuadro 22 muestra que en el estado inicial hubo una disminución del contenido de pigmentos, exceptuando la violaxantina. La disminución, en orden decreciente, se observó así: epóxido de luteína, clorofila "b", luteína, carotinas, total de xantofilas, clorofilas ("a" y "b"), neoxantina, clorofila "a". Se notó en cambio, un aumento de violaxantina.

El estado intermedio presentó disminución general del contenido de pigmentos, en orden decreciente, así: clorofila "a", clorofilas ("a" y "b"), epóxido de luteína, clorofila "b", luteína, carotinas, total de xantofilas, neoxantina, violaxantina.

En el estado avanzado se observó disminución general del contenido, en el orden: clorofila "a" y carotinas con igual porcentaje, clorofilas ("a" y "b"), luteína y epóxido de luteína, con el mismo porcentaje, clorofila "b", total de xantofilas, neoxantina, violaxantina.

El Cuadro 23 exhibe el contenido de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales de autosombra intermedia y en cada uno de los 3 estados de hojas deficientes en hierro. Con respecto a la relación de xantofilas a carotinas en hojas normales, esta fue igual a la del estado inicial de deficiencia, pero menor que

Cuadro 22. Contenido de pigmentos en hojas de café (*Coffea arabica* L.) con diferentes grados de deficiencia de hierro en relación a una hoja normal de autosombra intermedia.

Pigmento	Hojas normales de autosombra intermedia %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	70	55	20
Clorofila "a"	100	87	39	20
Clorofila "b"	100	67	44	27
Clorofilas ("a" y "b")	100	81	40	22
Luteína	100	69	54	24
Epóxido de luteína	100	49	41	24
Violaxantina	100	104	78	65
Neoxantina	100	83	66	30
Total xantofilas	100	72	57	29

1  
∞  
1

Cuadro 23. Relaciones de concentración  $\left( \frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b} \right)$ .

	Hojas con síntomas visibles de deficiencia de hierro			
	Hojas normales	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	13,0	9,2	7,1	2,5
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	44,1	31,7	25,0	12,9
Total clorofilas ("a" y "b") en mg/100 g de peso fresco	1725,0	1395,0	693,0	380,0
Xantofilas a carotinas	3.4:1	3.4:1	3.5:1	5.2:1
Clorofila "a" a clorofila "b"	2.2:1	3.0:1	2.1:1	1.6:1

la de los estados intermedio y avanzado. En hojas deficientes la mayor relación se notó en el estado avanzado, siguiéndole la de los estados intermedios e inicial, respectivamente.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales fue mayor que la correspondiente a los estados intermedio y avanzado, pero menor que la perteneciente al estado inicial de deficiencia. En hojas deficientes la relación más amplia se encontró en el estado inicial, seguida por la de los estados intermedio y avanzado.

#### 4.10. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de manganeso

En el Cuadro 24 y en la Figura 10 se observa que en el estado inicial de deficiencia, el contenido de pigmentos, en orden decreciente, se presentó así: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotininas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

Cuadro 24. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de manganeso de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	6,6	4,1	0,5
Clorofila "a"	896,0	354,0	47,0
Clorofila "b"	357,0	136,0	12,0
Luteína	14,3	7,9	3,9
Epóxido de luteína	0,5	0,5	0,5
Violaxantina	1,6	1,1	0,0
Neoxantina	4,4	1,6	0,0

Carotinoides ( mg/100g de peso fresco)

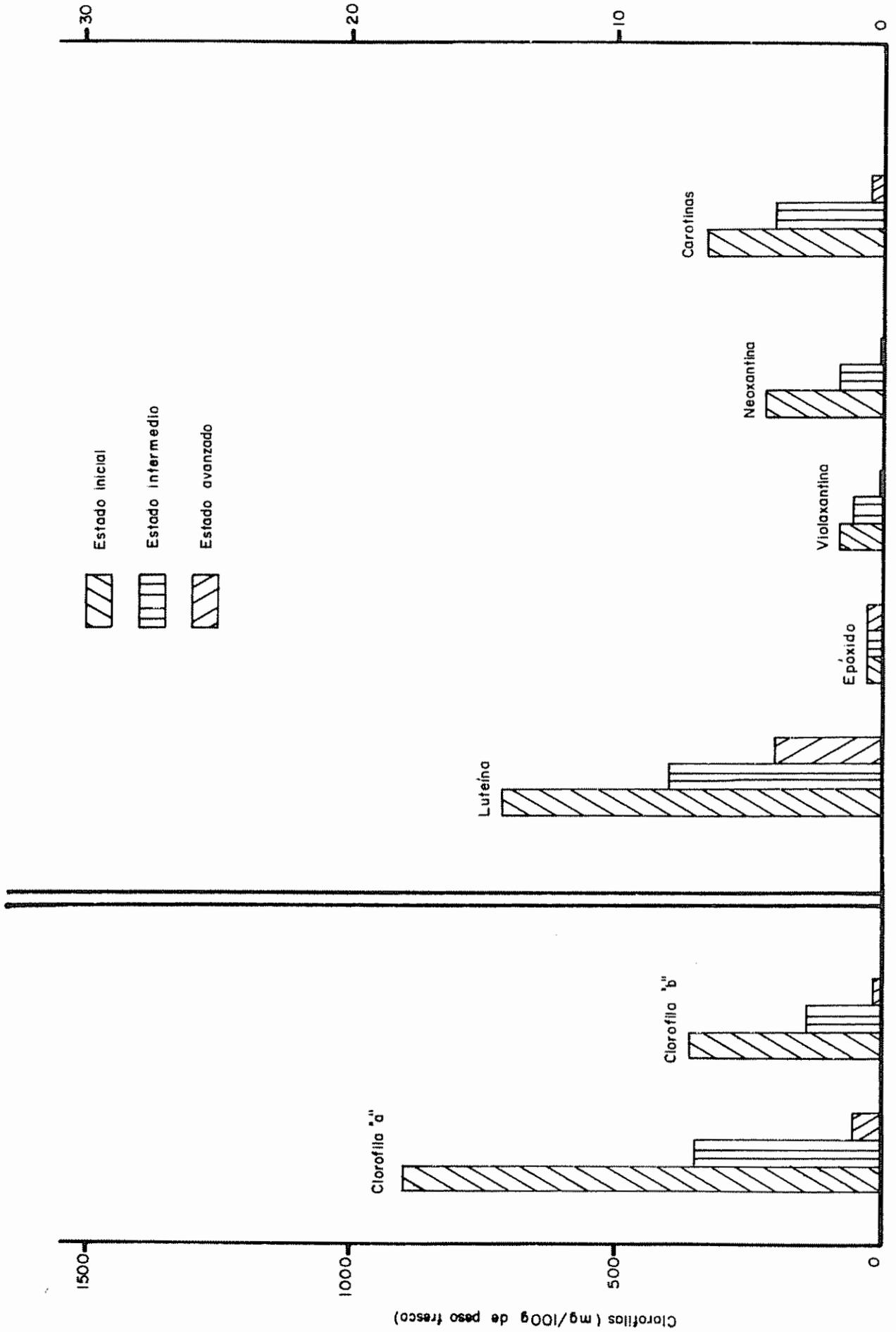


Fig. 10 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en manganeso

El estado intermedio demostró una disminución general, con excepción de epóxido de luteína, que mantuvo su concentración. El contenido, en orden decreciente, fue: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

En el estado avanzado se notó una disminución del contenido de pigmentos con relación a los estados inicial e intermedio, exceptuando al epóxido de luteína que mantuvo una concentración idéntica en los 3 estados de deficiencia. El orden, según el contenido de pigmentos fue: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas y epóxido de luteína con igual concentración; violaxantina y neoxantina ausentes.

En el Cuadro 25 se demuestra que en el estado inicial hubo una disminución general del contenido de pigmentos. En orden decreciente se estableció así: epóxido de luteína, violaxantina, total de xantofilas, carotinas, luteína, neoxantina, clorofila "b", clorofilas ("a" y "b"), clorofila "a".

En el estado intermedio el contenido de pigmentos decreció en el orden siguiente: epóxido de luteína, clorofila "a", neoxantina, clorofila "b" y xantofilas totales con igual porcentaje, violaxantina, clorofilas ("a" y "b"), luteína, carotinas.

En el estado avanzado de deficiencia ocurrió un descenso general en el contenido de pigmentos en la siguiente forma: ausencia de violaxantina y neoxantina, clorofila "a", clorofilas ("a" y "b") y carotinas con igual porcentaje, epóxido de luteína, luteína, clorofila "b".

Cuadro 25. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de manganeso en relación a una hoja normal de autosombra intermedia.

Pigmento	Hojas normales de autosombra intermedia %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	51	31	4
Clorofila "a"	100	75	21	4
Clorofila "b"	100	67	25	22
Clorofilas ("a" y "b")	100	73	28	4
Luteína	100	54	30	15
Epóxido de luteína	100	8	8	8
Violaxantina	100	39	26	0
Neoxantina	100	60	23	0
Total xantofilas	100	47	25	10

En el Cuadro 26 aparece el contenido total de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales de autosombra intermedia y en cada uno de los 3 estados de hojas deficientes en manganeso. La relación de xantofilas a carotinas en hojas normales fue mayor que la correspondiente a los estados inicial e intermedio, pero menor que la del estado avanzado de deficiencia. En hojas deficientes la mayor relación correspondió al estado avanzado, seguida por la de los estados intermedio e inicial, respectivamente.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales fue menor que cualesquiera de las relaciones presentes en los 3 grados de deficiencia. En hojas deficientes la mayor relación se apreció en el estado avanzado, siguiéndole la de los estados intermedio e inicial.

#### 4.11. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de boro

En el caso de esta deficiencia, los síntomas en las muestras recogidas no fueron, debido a la estación del año, muy claramente definidas. Por eso, los datos siguientes deben interpretarse con cierta cautela. Se nota en la Figura 11 y el Cuadro 27 que en el estado inicial de deficiencia el contenido de pigmentos, en orden decreciente, comprendió a: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

Cuadro 26. Relaciones de concentración  $\left( \frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b} \right)$ .

	Hojas normales		Hojas con síntomas visibles de deficiencia de manganeso	
	Autosombra intermedia	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	13,0	6,6	4,1	0,5
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	44,1	20,8	11,1	4,4
Total clorofilas ("a" y "b") en mg/100 g de peso fresco	1725,0	1253,0	490,0	59,0
Xantofilas a carotinas	3.4:1	3.1:1	2.7:1	8.8:1
Clorofila "a" a clorofila "b"	2.2:1	2.5:1	2.6:1	3.9:1

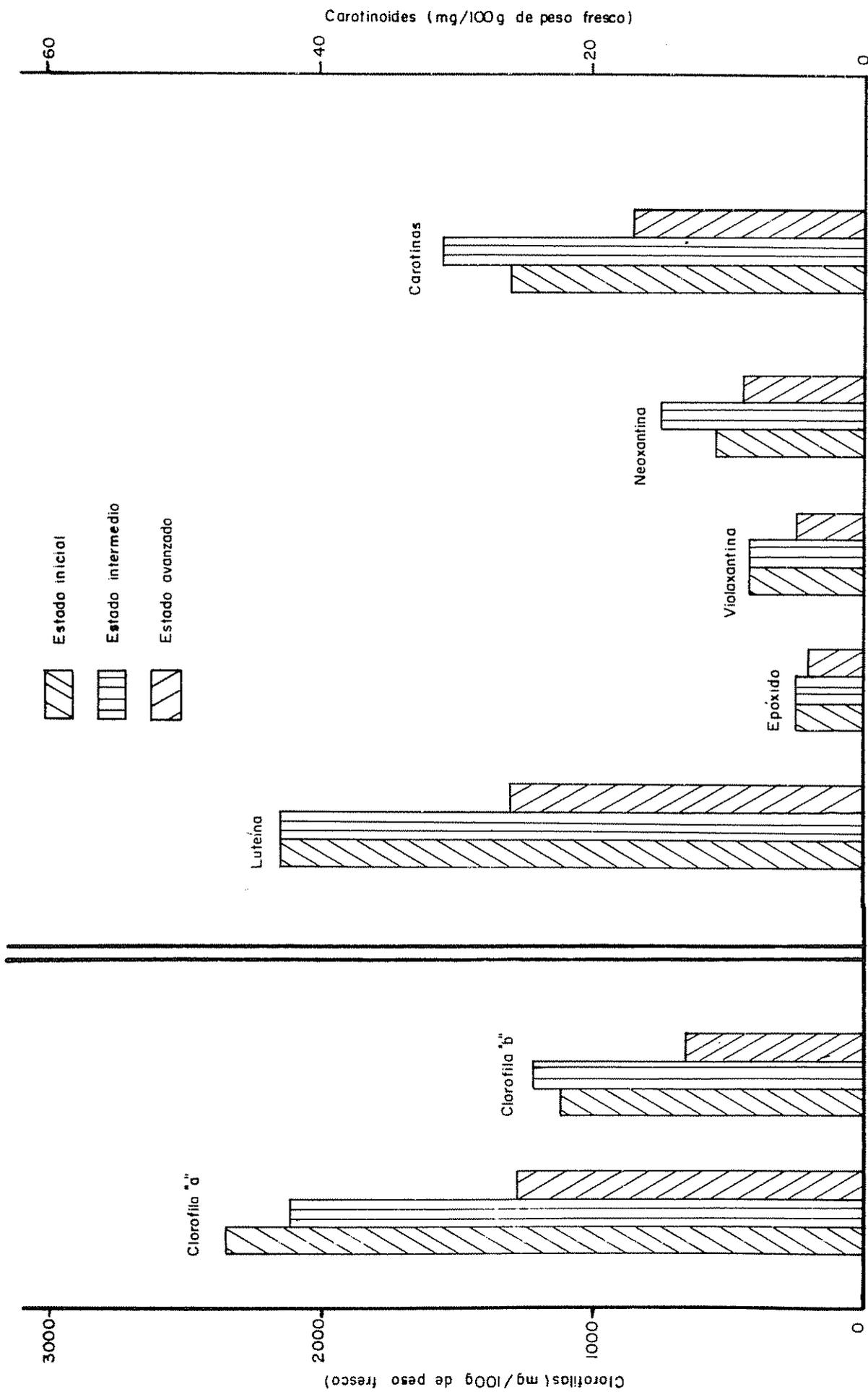


Fig. 11 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en boro

Cuadro 27. Contenido de pigmentos de hojas con síntomas visibles de deficiencia de boro de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	26,5	30,6	17,3
Clorofila "a"	2358,0	2123,0	1273,0
Clorofila "b"	1123,0	1225,0	664,0
Luteína	43,3	43,3	25,6
Epóxido de luteína	4,7	4,7	4,1
Violaxantina	8,3	8,3	5,5
Neoxantina	11,5	14,9	9,3

En el estado intermedio se apreció el contenido de pigmentos (en orden decreciente) así: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína. Con relación al estado inicial se notó un aumento de clorofila "b", carotinas, neoxantina y una disminución de clorofila "a". El epóxido de luteína y la violaxantina mantuvieron su concentración.

El estado avanzado mostró disminución general del contenido de pigmentos con relación a los estados inicial, e intermedio de la deficiencia. El contenido de pigmentos, en orden decreciente, se presentó así: clorofila "a", clorofila "b", carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

En el Cuadro 28 se aprecia que el estado inicial presentó un aumento de los pigmentos, exceptuando epóxido de luteína. El aumento en orden creciente fue así: xantofilas totales, neoxantina, luteína, violaxantina, clorofila "a", clorofilas ("a" y "b"), carotinas, clorofila "b". Sólo el epóxido de luteína disminuyó.

El estado intermedio, con excepción del epóxido de luteína, denotó un aumento del contenido de pigmentos (en orden creciente) así: total xantofilas, luteína, clorofila "a", clorofilas ("a" y "b"), violaxantina, neoxantina, clorofila "b", carotinas. El epóxido de luteína disminuyó.

En el estado avanzado se registró un aumento de los pigmentos exceptuando epóxido de luteína y luteína. En orden creciente el aumento se estableció así: total xantofilas, clorofila "a", clorofilas ("a" y "b"), clorofila "b", neoxantina, violaxantina, carotinas. En cambio, el epóxido de luteína y la luteína disminuyeron.

Al Cuadro 29 corresponden los contenidos totales de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales de autosombra intermedia y aquellos de cada uno de los 3 estados de hojas deficientes en boro. La relación de xantofilas a carotinas en hojas normales fue mayor que la correspondiente a cualesquiera de los 3 estados de deficiencia en tanto que en hojas deficientes la relación mayor se encontró en el estado avanzado, seguida por la relación de los estados inicial e intermedio respectivamente.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales fue siempre mayor que la relación que presentaron en cualesquiera de

Cuadro 28. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de boro en relación a una hoja normal de autosombra intermedia.

Pigmento	Hojas normales de autosombra intermedia %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	203	234	133
Clorofila "a"	100	198	178	107
Clorofila "b"	100	209	228	123
Clorofilas ("a" y "b")	100	202	194	112
Luteína	100	165	165	98
Epóxido de luteína	100	74	74	65
Violaxantina	100	196	196	130
Neoxantina	100	158	203	128
Total xantofilas	100	135	161	101

Cuadro 29. Relaciones de concentración  $\left( \frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b} \right)$ .

	Hojas con síntomas visibles de deficiencia de boro			
	Hojas normales	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	13,0	26,5	30,6	17,3
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	44,1	67,8	71,2	44,5
Total clorofilas ("a" y "b") en mg/100 g de peso fresco	1725,0	3481,0	3348,0	1937,0
Xantofilas a carotinas	3,4:1	2,5:1	2,3:1	2,6:1
Clorofila "a" a clorofila "b"	2,2:1	2,1:1	1,7:1	1,9:1

los estados de deficiencia. En hojas deficientes la mayor relación correspondió al estado avanzado, seguida por la del inicial e intermedio, respectivamente.

4.12. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de zinc

El Cuadro 30 y la Figura 12 muestran que en el estado inicial de la deficiencia de los contenidos de pigmentos, en orden decreciente, se agruparon de la manera siguiente: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

Cuadro 30. Contenido de pigmentos en hojas con síntomas visibles de deficiencia de zinc de café (Coffea arabica L.). (mg/100 g peso fresco).

Pigmento	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado
Carotinas	14,8	13,3	9,9
Clorofila "a"	1026,0	932,0	536,0
Clorofila "b"	562,0	544,0	276,0
Luteína	29,5	28,5	16,7
Epóxido de luteína	3,9	2,6	2,1
Violaxantina	4,4	2,8	1,6
Neoxantina	6,0	3,8	3,0

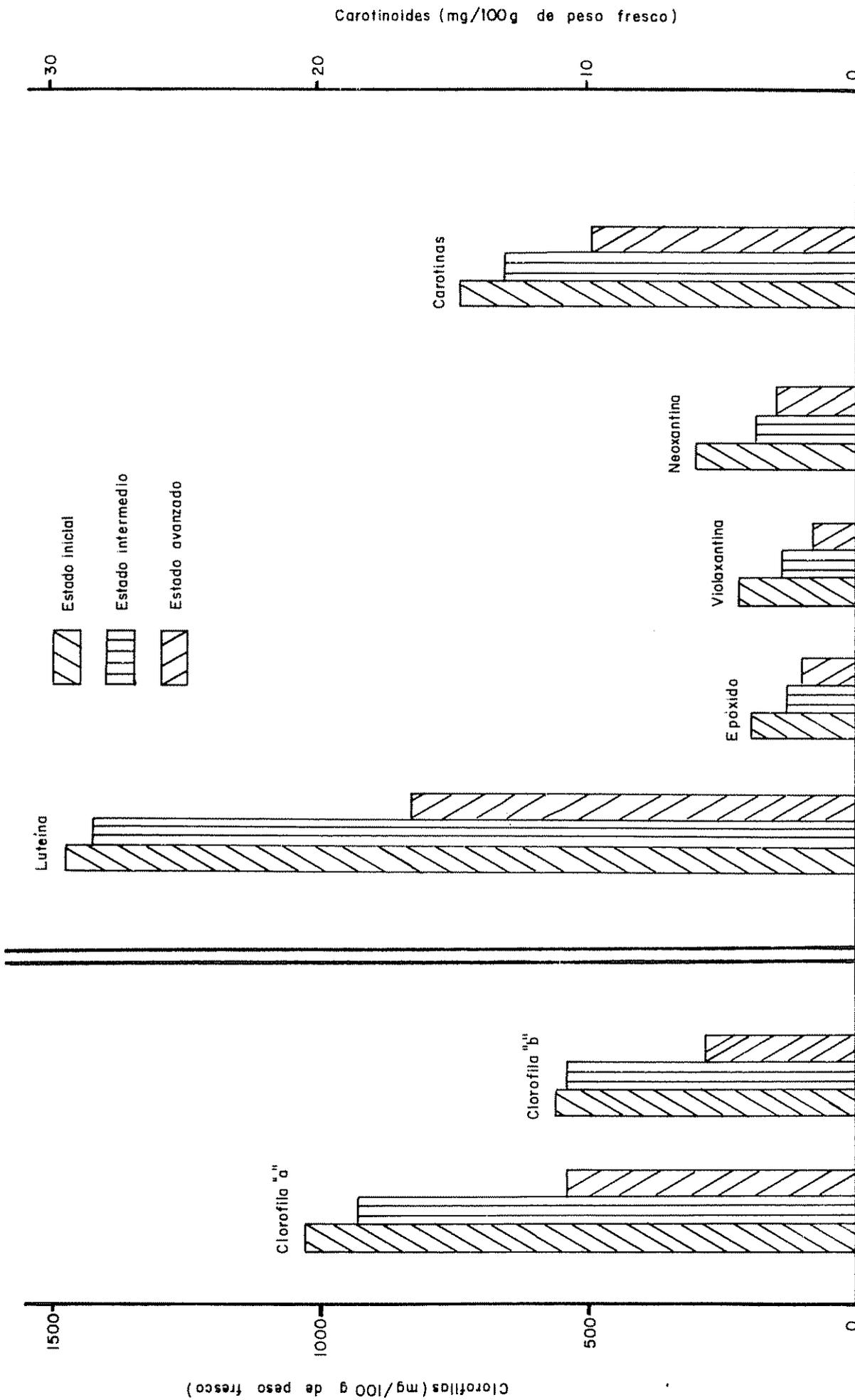


Fig. 12 Contenido de pigmentos en hojas deficientes en zinc

En el estado intermedio se notó una disminución general del contenido de pigmentos con relación al estado inicial. Su orden fue: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, violaxantina, epóxido de luteína.

En el estado avanzado ocurrió un descenso general del contenido de pigmentos con relación a los estados inicial e intermedio, siendo en este caso el orden: clorofila "a", clorofila "b", luteína, carotinas, neoxantina, epóxido de luteína, violaxantina.

En el Cuadro 31 se aprecia que hubo en el estado inicial un aumento, en orden creciente, de los siguientes pigmentos: violaxantina y clorofila "b" con igual porcentaje, luteína, carotinas. Se observaron una disminución de epóxido de luteína, neoxantina, clorofila "a", clorofilas ("a" y "b") y total de xantofilas.

En el estado intermedio se notó un aumento de clorofila "b", carotinas, y luteína, pero se apreció una disminución de epóxido de luteína, neoxantina, violaxantina, clorofila "a", clorofilas ("a" y "b") y total de xantofilas con igual porcentaje.

En el estado avanzado el descenso fue general para todos los pigmentos.

El Cuadro 32 contiene la información con respecto al total de carotinas, xantofilas y clorofilas ("a" y "b") en hojas normales de autosombra intermedia y en cada uno de los 3 estados de hojas deficientes en zinc. La relación de xantofilas a carotinas en hojas normales fue superior a cualesquiera de las correspondientes a los estados de deficiencia. En hojas deficientes la mayor relación se

Cuadro 31. Contenido de pigmentos en hojas de café (Coffea arabica L.) con diferentes grados de deficiencia de zinc en relación a una hoja normal de autosombra intermedia.

Pigmento	Hojas normales de autosombra intermedia %	Estado inicial %	Estado intermedio %	Estado avanzado %
Carotinas	100	113	102	76
Clorofila "a"	100	86	78	45
Clorofila "b"	100	105	101	52
Clorofilas ("a" y "b")	100	92	86	47
Luteína	100	112	109	64
Epóxido de luteína	100	62	41	33
Violaxantina	100	105	65	39
Neoxantina	100	83	53	41
Total xantofilas	100	99	86	53

Cuadro 32. Relaciones de concentración  $\left( \frac{x}{c} \text{ y } \frac{a}{b} \right)$ .

	Hojas normales		Hojas con síntomas visibles de deficiencia de zinc		
	Autosombra intermedia	Estado inicial	Estado intermedio	Estado avanzado	
Total carotinas en mg/100 g de peso fresco	13,0	14,8	13,3	9,9	
Total xantofilas en mg/100 g de peso fresco	44,1	43,8	37,7	23,4	
Total clorofilas ("a" y "b") en mg/100 g de peso fresco	1725,0	1588,0	1476,0	812,0	
Xantofilas a carotinas	3.4:1	3.0:1	2.8:1	2.4:1	
Clorofila "a" a clorofila "b"	2.2:1	1.8:1	1.7:1	1.9:1	

observó en el estado inicial, siguiéndole la de los estados intermedio y avanzado, respectivamente.

La relación de clorofila "a" a clorofila "b" en hojas normales fue superior a aquellas de los estados de deficiencia. En hojas deficientes la mayor relación se encontró en el estado avanzado, siguiéndole la de los estados inicial e intermedio de deficiencia.

## 5. DISCUSION

### 5.1. Contenido de pigmentos en hojas normales de café

En hojas a pleno sol fue donde se encontró la menor concentración de pigmentos, tanto de clorofilas "a" y "b" como de los accesorios. Esto parece confirmar lo indicado por Wilson y Loomis (48) en el sentido de que la luz solar destruye las clorofilas. La menor concentración en hojas a pleno sol coincide con los resultados obtenidos por Franco (8) en el Brasil. El contenido ligeramente mayor de clorofilas "a" y "b" en hojas de autosombra intermedia, está igualmente de acuerdo con lo que el mismo autor señaló, o sea la existencia de un punto óptimo de sombra para la concentración de clorofilas, pasado el cual el contenido tiende a disminuir. Esto último lo confirma el hallazgo de concentración levemente inferior de clorofilas, en hojas de plena autosombra, que en hojas de autosombra intermedia.

El contenido de xantofilas y carotinas en hojas normales a pleno sol, autosombra intermedia y plena autosombra, está muy relacionado con lo reportado por Goodwin (14). Asimismo, en esta tesis se reafirma que la cantidad de xantofilas es siempre superior a la de carotinas, tal como lo indicaron, entre otros, Goodwin (14) y Miller (29). Se corrobora igualmente que la luteína es el principal pigmento entre las xantofilas.

### 5.2. Tipo y contenido de carotinas en hojas normales de café

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación efectuada en hojas normales de café, a plena autosombra, se estableció que las únicas carotinas presentes fueron  $\beta$  y  $\gamma$  carotina. La  $\beta$ -carotina exhibió el mayor porcentaje (59%) en tanto que a  $\gamma$ -carotina correspondió el porcentaje restante (41%). Estos porcentajes no concuerdan con lo indicado por Miller (29) quien atribuye a la  $\beta$ -carotina el 90% de carotinas normalmente presentes en hojas en tanto que el 10% restante lo asigna a la  $\alpha$ -carotina. Sin embargo Hager y Bertenrath (16) al exhibir la separación de pigmentos en el cromatograma, describen la faja anaranjada como: carotinas, especialmente  $\beta$ -carotina. En todo caso la determinación en hojas de café (Coffea arabica L.) establece coincidencia con la de los citados autores, puesto que el mayor porcentaje de carotina correspondió efectivamente, al pigmento  $\beta$ -carotina.

### 5.3. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en nitrógeno

En el estado inicial hubo decrecimiento de carotinas y clorofilas totales. En cambio, el contenido total de xantofilas aumentó con respecto a hojas normales en posición de pleno sol.

El estado intermedio exhibió mayor disminución de clorofilas y carotinas totales y la menor disminución de xantofilas. En este estado la luteína y el epóxido de luteína, ambos de color amarillo, se presentaron en mayor proporción que los demás pigmentos.

En el estado avanzado el porcentaje más elevado correspondió a pigmentos amarillos tales como luteína, violaxantina, epóxido de luteína y neoxantina. En otras palabras, hubo mayor contenido de xantofilas que de carotinas y clorofilas totales. La marcada tendencia de las clorofilas a disminuir conforme aumenta la deficiencia de nitrógeno, coincide perfectamente con lo establecido por Bonner y Galston (4) al señalar al nitrógeno como "otro de los compuestos esenciales de la molécula de clorofila".

En general la deficiencia avanzada de nitrógeno produjo reducción del contenido de pigmentos en relación a hojas normales de pleno sol.

#### 5.4. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en fósforo

En el estado inicial hubo aumento de xantofilas totales (especialmente violaxantina y luteína) y disminución de clorofilas y carotinas totales.

En el estado intermedio de deficiencia se notó un mayor porcentaje de xantofilas totales, que de clorofilas y carotinas totales presente en la hoja.

La más alta concentración de xantofilas comprendió a: epóxido de luteína, violaxantina y luteína. Estos 3 pigmentos son de color amarillo intenso.

Estado avanzado: en este estado hubo mayor porcentaje de xantofilas totales que de carotinas y clorofilas totales. Las carotinas, de color anaranjado, aumentaron con respecto al estado intermedio, pero las clorofilas, por el contrario, decrecieron notablemente, al

extremo de que la clorofila "a" desapareció por completo. Los pigmentos con mayor porcentaje fueron: epóxido de luteína, luteína y violaxantina, todos de color amarillo. La severa acción de la deficiencia fosfórica sobre el contenido de clorofilas puede atribuirse probablemente a su intervención en diversas reacciones bioquímicas relacionadas con tal proceso.

#### 5.5. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en potasio

En el estado inicial hubo aumento de xantofilas y carotinas totales. Los mayores porcentajes de aumento correspondieron a pigmentos amarillos tales como epóxido de luteína, luteína y violaxantina.

El estado intermedio tuvo mayor porcentaje de xantofilas totales que de clorofilas y carotinas totales. Los pigmentos amarillos (xantofilas) de más alto porcentaje fueron: violaxantina y luteína. Este estado de deficiencia presentó descenso general del porcentaje de pigmentos (exceptuando la violaxantina) con relación al patrón de hojas normales de autosombra intermedia.

El estado avanzado, exceptuando carotinas totales, mostró aumento general del porcentaje de pigmentos con respecto al patrón. Hubo sin embargo, mucho mayor porcentaje de xantofilas que de clorofilas totales. Los pigmentos amarillos (xantofilas) con mayor porcentaje fueron violaxantina y luteína. El hecho de que las clorofilas totales "a" y "b" hayan presentado aumento con relación al patrón puede atribuirse al antagonismo existente entre el elemento potasio y los elementos magnesio y nitrógeno, vitales e importantes, respectivamente,

para la formación de clorofila (24, 28). Es importante resaltar que en los 3 estados de deficiencia potásica, la clorofila "b" presentó mayor porcentaje que la clorofila "a", con respecto al patrón establecido.

#### 5.6. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en calcio

En el estado inicial, el mayor porcentaje de aumento con respecto al patrón correspondió a carotinas (color anaranjado) y xantofilas totales (color amarillo).

Los pigmentos amarillos con mayor porcentaje fueron violaxantina, neoxantina y luteína. Por otro lado se observó disminución del porcentaje de ambas clorofilas con respecto al patrón.

El estado intermedio, denotó disminución porcentual de carotinas, xantofilas y clorofilas totales en relación al patrón establecido. Los pigmentos con mayor porcentaje fueron carotinas (color anaranjado) y luteína (color amarillo). El porcentaje de clorofilas totales fue menor que el de carotina y xantofilas totales.

El estado avanzado presentó disminución general del porcentaje de pigmentos con relación al patrón y también con respecto a los estados inicial e intermedio de deficiencia. En este estado hubo mayor porcentaje de carotinas que de clorofilas y xantofilas totales. El pigmento con mayor porcentaje fue la clorofila "b" (verde) seguida por carotina (anaranjado) y luteína (amarillo).

En los tres estados de deficiencia de calcio se encontró mayor porcentaje de clorofila "b" que de clorofila "a" con respecto al

patrón. Puede pensarse entonces que la clorosis producida por la deficiencia de calcio se debe principalmente al relativo aumento de carotina y de luteína, sobre el contenido de clorofila, especialmente, sobre clorofila "a". Este fenómeno de alguna manera está asociado con un decrecimiento de la transpiración y el aumento de la absorción de agua (24).

#### 5.7. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en magnesio

Estado inicial: en relación al patrón (hojas normales) de auto-sombra, intermedia, se observó disminución de clorofilas, carotinas y xantofilas totales. El pigmento que exhibió mayor porcentaje fue clorofila "b" (100%), seguido por clorofila "a", carotina y luteína.

Estado intermedio: con respecto al patrón establecido se observó disminución de carotinas, xantofilas y clorofilas totales. La clorofila "b" mantuvo su concentración (100%), siguiéndole la luteína, clorofila "a", violaxantina.

Estado avanzado: con respecto al patrón se notó descenso (orden decreciente) en el porcentaje de clorofilas, xantofilas y carotinas totales. Los pigmentos que presentaron mayor porcentaje fueron carotinas y luteína, de color anaranjado y amarillo respectivamente. Las clorofilas "a" y "b" disminuyeron notablemente con respecto al patrón establecido.

En los tres estados de deficiencias se notó mayor porcentaje de clorofila "b" que de clorofila "a" (con respecto al patrón). El hecho de que la deficiencia de magnesio produzca un descenso en el porcentaje de clorofilas y el desenmascaramiento de los pigmentos

anaranjados y amarillos, se explica en función de que el magnesio, es el único elemento metálico presente en la molécula de clorofila, el cual constituye, según Malavolta (28), el 2,7% del peso total. De ello se deriva que a menor cantidad de magnesio correspondió un menor contenido de clorofilas.

#### 5.8. Contenido de pigmentos en hojas con deficiencia de azufre

En el estado inicial hubo aumento del porcentaje de xantofilas y clorofilas totales con relación al patrón. Se observó un descenso en el porcentaje de carotinas. De las xantofilas, la luteína tenía el mayor porcentaje, seguido por el epóxido de luteína (ambos de color amarillo). El aumento de clorofilas fue menor que el de xantofilas totales.

En el estado intermedio se notó aumento únicamente de luteína y epóxido de luteína, ambos de color amarillo. Las clorofilas "a" y "b" y los pigmentos restantes decrecieron notablemente en porcentaje. En este estado el porcentaje de xantofilas totales fue mayor que el correspondiente a clorofilas y carotinas, respectivamente.

En el estado avanzado, cuando la hoja fue totalmente clorótica, solamente aumentó el porcentaje de luteína (pigmento amarillo), mientras que las clorofilas "a" (con el menor porcentaje de todos los pigmentos) y "b", y los pigmentos restantes disminuyeron. El porcentaje de xantofilas totales fue extremadamente superior que el correspondiente a carotinas y clorofilas totales.

En los 3 estados de deficiencia el porcentaje de clorofila "b"

con respecto al patrón fue siempre mayor que el porcentaje de clorofila "a". La extrema disminución de clorofilas con la deficiencia avanzada de azufre concuerda con lo que se ha establecido acerca de que el azufre es indispensable para la formación de clorofilas (29). La total coloración amarilla de la hoja puede atribuirse al descenso porcentual de clorofilas, especialmente clorofila "a" y al notable incremento de luteína.

#### 5.9. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en hierro

En el estado inicial el porcentaje de clorofilas totales fue mayor que el de xantofilas y carotinas. Sin embargo, con relación al patrón establecido, hubo disminución de los porcentajes de estos tres pigmentos foliares. La violaxantina fue el pigmento con mayor porcentaje, siguiéndole la clorofila "a". En este estado el porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón fue superior al porcentaje de clorofila "b".

En el estado intermedio o sea, en hojas menos verdes, pero aun reticuladas, se notó un descenso del porcentaje de xantofilas, carotinas y clorofilas totales con relación al patrón establecido. El porcentaje de xantofilas fue superior al de carotinas y clorofilas totales. El pigmento con porcentaje más elevado fue la violaxantina, siguiéndole neoxantina (color amarillo), carotinas (color anaranjado) y luteína (color amarillo). El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón fue inferior al de clorofila "b".

En hojas casi blanquecinas (estado avanzado), hubo descenso del porcentaje de xantofilas, clorofilas y carotinas totales con relación

al patrón. El porcentaje de xantofilas fue superior al de clorofilas y carotinas totales. El pigmento con más alto porcentaje fue violaxantina, en tanto que el menor correspondió a clorofila "a" y carotina. Las clorofilas "a" y "b" decrecieron notablemente. El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón fue menor que el porcentaje de clorofila "b".

La disminución de clorofilas con el avance de la severidad de la deficiencia de hierro confirma lo que Jacob y Uexküll (24), como también Robbins (38) y Malavolta (28) indicaron, o sea que el hierro es esencial para la formación de clorofila. Por otra parte, la coloración blanquecina de la hoja en estado avanzado de deficiencia, puede atribuirse al mayor porcentaje de violaxantina en relación al bajo porcentaje de los restantes pigmentos, especialmente clorofilas.

#### 5.10. Contenido de pigmentos en hojas deficientes de manganeso

El estado inicial presentó disminución del porcentaje de clorofilas, carotinas y xantofilas totales con respecto al patrón. El porcentaje de clorofilas fue mayor que el correspondiente a carotinas y xantofilas totales.

El pigmento con mayor porcentaje fue clorofila "a", siguiéndole clorofila "b", neoxantina y luteína. El menor porcentaje correspondió al epóxido de luteína, de color amarillo. En otras palabras, hubo predominio de pigmentos verdes sobre los amarillos. Tal hecho se refleja en la coloración de la hoja en este estado.

En estado intermedio disminuyeron los porcentajes de carotinas,

clorofilas y xantofilas totales con relación al patrón. El porcentaje de carotinas fue mayor que el de clorofilas y xantofilas. Las carotinas presentaron el mayor porcentaje, seguidas por luteína y violaxantina. El menor porcentaje correspondió al epóxido de luteína. Sin embargo, se pudo apreciar el inicio del dominio de pigmentos anaranjados y amarillos sobre los verdes. Las clorofilas "a" y "b" disminuyeron notablemente. El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón fue menor que el de clorofila "b".

En el estado avanzado (hojas totalmente amarillas), el porcentaje de xantofilas, carotinas y clorofilas totales, exhibió una marcada disminución con respecto a hojas normales de autosombra intermedia. El porcentaje de xantofilas fue superior al de carotinas y clorofilas totales (ambas con igual porcentaje). El pigmento que presentó mayor porcentaje fue la clorofila "b" seguida por luteína y epóxido de luteína. El menor porcentaje de pigmentos presentes correspondió a carotinas y clorofila "a" (ambas con igual porcentaje). La violaxantina y la neoxantina no se presentaron en el cromatograma. El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón, fue mucho menor que el porcentaje de clorofila "b". La disminución de clorofilas a medida que avanza la deficiencia de manganeso, corrobora lo indicado por Bonner (4), Hoagland (19) y Jacob y Uexküll (24), en el sentido de que el manganeso es imprescindible en la formación de clorofila. Asimismo, Malavolta (28) señaló que la deficiencia de manganeso incide negativamente en la fotosíntesis. Por aparte, el predominio de pigmentos amarillos (xantofilas totales) sobre

pigmentos verdes (total de clorofilas) puede atribuirse principalmente a la luteína y explicar así el por qué de la tonalidad amarillenta de toda la hoja.

#### 5.11. Contenido de pigmentos en hojas deficientes en boro

En el estado inicial se notó aumento en el porcentaje de carotinas, clorofilas y xantofilas totales con respecto al patrón. El mayor porcentaje correspondió a carotinas seguido por el de clorofilas y xantofilas totales. El pigmento con mayor porcentaje fue la clorofila "b", seguido por carotinas y clorofila "a". De los pigmentos amarillos (xantofilas) la violaxantina tuvo el porcentaje más elevado, en tanto que el menor correspondió al epóxido de luteína. Este pigmento fue el único que decreció con respecto al patrón. El porcentaje de clorofila "a" en relación al patrón establecido fue menor que el porcentaje de clorofila "b".

El estado intermedio exhibió aumento de carotinas, clorofilas y xantofilas totales con respecto al patrón. El porcentaje mayor correspondió a carotinas, seguido por el porcentaje de clorofilas y xantofilas totales respectivamente. El mayor porcentaje perteneció a pigmentos anaranjados (carotinas) siguiéndole clorofila "b" (verde) y neoxantina (amarillo). El menor porcentaje correspondió a epóxido de luteína, que mantuvo porcentaje igual al mostrado en el estado inicial. El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón fue menor que el porcentaje de clorofila "b".

El estado avanzado exhibió aumento de carotinas, clorofilas y

xantofilas totales con respecto al patrón. El porcentaje de carotinas fue mayor que el de clorofilas y xantofilas totales. A los pigmentos anaranjados (carotinas) correspondió el mayor porcentaje. Los menores porcentajes (más bajos, incluso, que el porcentaje normal) fueron los de luteína y epóxido de luteína. El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón, fue menor que el porcentaje de clorofila "b".

Las hojas deficientes en boro no presentaron clorosis, pero si disminución de tamaño. Aun en estado avanzado de deficiencia hubo aumento de clorofilas con respecto al patrón. Sin embargo la deficiencia de boro en café es responsable de la poca formación de frutos (32). Por los citados detalles podemos suponer que la mayor concentración de clorofila en hojas de menor tamaño que las normales, produce una gran acumulación de estos pigmentos en el parénquima clorofílico. Tal acumulación, de alguna manera, sería la responsable de que no todas las moléculas de clorofila "a" pudiesen transformar la energía de la luz en energía química. Consecuencia de lo anterior sería la poca síntesis de carbohidratos y por ende una baja producción. En tal sentido Malavolta (28) indicó que la deficiencia de boro afecta el traslado de carbohidratos.

#### 5.12. Contenido de pigmentos en hojas deficientes de zinc

En el estado inicial el porcentaje de carotinas totales aumentó con respecto al patrón, en tanto que el porcentaje de xantofilas decreció ligeramente y un tanto mayor fue el descenso de clorofilas

totales. Los pigmentos anaranjados (carotinas) exhibieron el más alto porcentaje de aumento, seguidos por luteína (color amarillo), clorofila "b" (verde) y violaxantina (color amarillo); estos 2 últimos con igual porcentaje. El menor porcentaje correspondió a epóxido de luteína. El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón fue menor que el porcentaje de clorofila "b".

El estado intermedio exhibió aumento del porcentaje total de carotinas sobre el patrón, en tanto que las clorofilas y xantofilas totales (con igual porcentaje) presentaron disminución. El pigmento que ofreció el mayor porcentaje de aumento fue la luteína (amarilla), seguida por carotinas (anaranjadas) y clorofila "b" (verde). El menor porcentaje correspondió a epóxido de luteína. El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón fue menor que el porcentaje respectivo de clorofila "b".

El estado avanzado denota en orden decreciente, disminución del porcentaje de clorofilas, xantofilas y carotinas totales con respecto al patrón. Los pigmentos anaranjados (carotinas) exhibieron el mayor porcentaje seguidos por la luteína (de color amarillo). El menor porcentaje correspondió a epóxido de luteína. La disminución de clorofilas "a" y "b" es muy notoria. El porcentaje de clorofila "a" con respecto al patrón fue inferior al porcentaje respectivo de clorofila "b". En este estado, al ostensible predominio de carotinas y luteína sobre los pigmentos verdes, puede atribuirse la intensificación de la clorosis y también la reducción del tamaño de la hoja.

La reducción de tamaño en la hoja, bajo condiciones deficientes de zinc, es imputada a la relación que este micronutriente guarda con la producción de auxinas, inhibiendo por tanto el crecimiento (28). El descenso observado en el contenido de clorofila coincide con la atrofia que según Jacob y Uexküll (24) sufren los cloroplastos cuando ocurre deficiencia de zinc.

## 6. CONCLUSIONES

1. En hojas normales a pleno sol se encontró el menor contenido de pigmentos. En tanto que la mayor concentración correspondió a hojas normales de autosombra intermedia.
2. En hojas normales de café se encontraron 2 tipos de carotinas:  $\beta$ -carotina y  $\gamma$ -carotina, con mayor porcentaje el primero que el segundo.
3. La deficiencia de nitrógeno en sus 3 estados produjo disminución de clorofila "a", clorofila "b" y aumentos relativos de xantofilas, especialmente luteína.
4. La deficiencia de fósforo en sus 3 estados exhibió dominancia de xantofilas, principalmente epóxido de luteína, luteína y violaxantina, sobre los otros pigmentos. Fue el elemento cuya deficiencia avanzada provocó total ausencia de clorofila "a".
5. La deficiencia de potasio mostró aumento de xantofilas y clorofilas sobre el porcentaje establecido como patrón. Las xantofilas con mayor porcentaje fueron violaxantina y luteína.
6. La deficiencia de calcio en sus 3 estados indujo disminución porcentual de clorofilas (especialmente clorofila "a") contra un mayor por ciento de carotinas y xantofilas (principalmente luteína).
7. La deficiencia de magnesio en sus 3 estados, denotó disminución de clorofilas, xantofilas y carotinas totales. En el estado

avanzado los pigmentos con mayor porcentaje fueron carotinas y luteína.

8. La deficiencia de azufre en general causó disminución de carotinas. A partir del estado intermedio se redujeron también las clorofilas continuando así hasta el estado avanzado. Las xantofilas se incrementaron en los estados inicial y avanzado, ofreciendo siempre mayor porcentaje de luteína y el epóxido de luteína.
9. La deficiencia de hierro en los 3 estados analizados, causó descenso porcentual de clorofilas, carotinas y xantofilas totales. Sin embargo, el pigmento que mantuvo el mayor porcentaje sobre los demás (especialmente sobre clorofila "a") fue la violaxantina.
10. La deficiencia de manganeso en sus 3 estados produjo disminución de xantofilas, carotinas y clorofilas. Los pigmentos con mayor porcentaje fueron clorofila "b", luteína y epóxido de luteína. El menor porcentaje correspondió a clorofila "a" y carotinas. La violaxantina y la neoxantina estuvieron ausentes en estado avanzado.
11. La deficiencia de boro en los 3 estados respectivos, exhibió aumento de carotinas, clorofilas y xantofilas totales. El mayor aumento correspondió siempre a la carotina, en tanto que epóxido de luteína mostró el menor.

12. La deficiencia de zinc en sus 3 estados reveló que el mayor porcentaje correspondió a carotinas y el menor a epóxido de luteína. Causó además un notorio dominio de pigmentos no solo anaranjados sino también amarillos (principalmente luteína) sobre las clorofilas.
13. En todas las deficiencias de fósforo, potasio, calcio, azufre, boro y zinc el porcentaje de clorofila "a" fue siempre menor que el de clorofila "b". Este hecho sugiere que porcentualmente la clorofila "a" es más afectada por tales deficiencias.
14. El aumento de pigmentos amarillos y anaranjados en presencia de menor porcentaje de clorofila "a" que de clorofila "b" indica que el enmascaramiento experimentado por los pigmentos accesorios se debe principalmente a la clorofila "a".

## 7. RESUMEN

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal y plantaciones de café (Coffea arabica L.) del Centro Tropical de Enseñanza e Investigación del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA (IICA-CTEI) y en otras áreas cafetaleras ubicadas en el cantón de Turrialba, Costa Rica.

El objetivo general de esta investigación fue el de establecer qué influencia ejercen las deficiencias minerales sobre la composición de los pigmentos de los plastidios en café. Los objetivos específicos fueron determinar si las deficiencias de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, boro, manganeso y zinc, observables individualmente en las hojas de café, incidían en la presencia o ausencia, aumento o disminución de carotinas, clorofila "a", clorofila "b", luteína, epóxido de luteína, violaxantina y neoxantina.

Se estableció un patrón para hojas normales a pleno sol, autosombra intermedia y plena autosombra, con el que se comparó, cada una de las deficiencias clasificadas en 3 estados: inicial, intermedio y avanzado. Para la separación de los pigmentos se utilizó el método de cromatografía en capa fina, según Hager y Bertenrath (16, 17). El análisis cuantitativo se efectuó por espectrofotometría.

Los resultados indicaron que las deficiencias de nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio, hierro, manganeso y zinc, disminuyeron gradualmente, según su intensidad, el contenido de clorofilas, en

tanto que aumentó relativamente el porcentaje de pigmentos amarillos y anaranjados (especialmente luteína y carotinas). La deficiencia de azufre produjo inicialmente disminución de carotinas, para luego causar la de clorofilas. La deficiencia de potasio exhibió aumento de clorofilas y xantofilas. La deficiencia de boro denotó asimismo aumento de xantofilas, clorofilas y carotinas. Por otro lado, se es tableció que los tipos de carotina presentes en hojas de café, son R y  $\gamma$ -carotina.

## 8. SUMMARY

The present research was carried out at the plant Physiology laboratory and coffee plantations (Coffea arabica L.) of the Inter-American Institute of Agricultural Sciences of the OAS (IICA-CTEI), including other coffee growing areas nearby, located in the Turrialba district, Costa Rica.

The general objective of this work was to establish which influence mineral deficiencies exist on the composition of the plastid pigments in coffee. The specific objectives consisted in establishing how deficiencies of the following elements: nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, sulfur, iron, boron, manganese and zinc, observed in coffee leaves, affected the following plastid pigments: carotenes, chlorophylls a and b, lutein, lutein epoxide violaxanthin and neoxanthin.

For comparison leaves grown under three light intensities full sun, half shade, full shade were analyzed as checks, to be compared with the results of leaves showing three levels of deficiency: slight, intermediate, severe. For the separation of the pigments thin layer chromatography was employed according to Hager and Bertenrath (16, 17). The quantitative determination was carried out spectrophotometrically.

The results indicated that in the case of nitrogen, phosphorus, calcium, magnesium, iron, manganese and zinc deficiency the chlorophyll content gradually decreased visible intensification of

the deficiency, while blue relative percentage of the yellow and orange pigments (specially luttein and carotenes). Sulfur deficiency caused initially a reduction of carotenes, later on of chlorophylls. Potassium deficiency caused an increase in chlorophylls and xanthophylls. In case of boron deficiency xanthophyll as well as chlorophylls and carotenes increased. On the other hand, it was found that the carotenes present in coffee leaves were  $\beta$  y  $\gamma$ -carotene.

9. LITERATURA CITADA

1. ARONOFF, S. An introduction survey. In Vernon, L. P. y Seely, G. R. The chlorophylls. New York, Academic Press, 1966. pp. 3-20.
2. BENDIX, A. A. Importancia del elemento magnesio para las plantas. *Café de El Salvador* 27(306-307):259-260. 1957.
3. BOGORAD, L. Chlorophyll biosynthesis. In Goodwin, T. V. Chemistry and biochemistry of plant pigments. New York, Academic Press, 1965. pp. 29-70.
4. BONNER, J. y GALSTON, A. W. Principios de fisiología vegetal, Versión española de Federico Portillo. 4a. ed. Madrid, Aguilar, 1965. 463 p.
5. BUDOWSKI, G. y SCHREUDER, G. F. The climate at Turrialba. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Comunicaciones de Turrialba nº 68. 1962. 36 p.
6. DAVIES, B. H. Analysis of carotenoids pigments. In Goodwin, T. V. Chemistry and biochemistry of plant pigments. New York, Academic Press, 1965. pp. 489-531.
7. FIESTER, D. R. The study of a leaf chlorosis of coffeea resembling the magnesium deficiency symptom in some other fruit crops. Unpublished thesis. Ithaca, New York, Cornell University, 1955. 79 p. (typewritten).
8. FRANCO, C. M. Teor em clorofila das folhas de cafeeiros diversamente sombreados o a pleno sol. *Revista do Instituto de Café (Brasil)* 28(169):296-299. 1941.
9. \_\_\_\_\_ y MENDES, H. C. Deficiencie de zinco em cafeeiro. *Boletim do Superintendencia dos Serviços do Café (Brasil)* 29(334):34-39. 1954.
10. \_\_\_\_\_. Descoloração em folhas de cafeeiro, causa da pelo frio. *Bragantia* 15(13):131-135. 1956.
11. GLOVER, J. Colorimetric, absorpimetric and fluorimetric methods. In Paech, K. y Tracey, M. V. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Berlin, Springer, 1956. v. 1, pp. 149-244.
12. GOODALL, D. W. y GREGORY, F. G. Chemical composition of plants as an index of their nutritional status. Imperial Bureau of Horticulture and Plantation Crops, Wales. Technical Communication nº 17. 1947. 117 p.

13. GOODWIN, T. V. Carotenoids. In Paech, K. y Tracey, M. V. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin, Springer, 1955. v. 3, pp. 272-311.
14. \_\_\_\_\_. Distribution of carotenoids. In \_\_\_\_\_. Chemistry and biochemistry of plant pigments. New York, Academic Press, 1965. pp. 127-142.
15. \_\_\_\_\_. The biosynthesis of carotenoids. In \_\_\_\_\_. Chemistry and biochemistry of plant pigments. New York, Academic Press, 1965. pp. 143-173.
16. HAGER, A. y MEYER-BERTENRATH, T. Verteilungschromatographische Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden grüner Pflanzen und Dünnschichten. Planta 58(5):564-568. 1962.
17. \_\_\_\_\_ y MEYER-BERTENRATH, T. Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden. Planta 69(3):1-98, 217. 1966.
18. HILL, R. y WITTINGHAM, C. P. Photosynthesis. London, Methuen, 1955. 152 p.
19. HOAGLAND, D. R. Inorganic plant nutrition. Massachusetts, Chronica, 1944. 176 p.
20. HOLDEN, M. Chlorophylls. In Goodwin, T. V. Chemistry and biochemistry of plant pigments. New York, Academic Press, 1965. pp. 461-485.
21. HOLDRIDGE, L. R. Life zone ecology. San José, Costa Rica. Tropical Science Center, 1967. 206 p.
22. HOLT, A. S. Nature, properties and distribution of chlorophylls. In Goodwin, T. V. Chemistry and biochemistry of plant pigments. New York, Academic Press, 1965. pp. 3-28.
23. HOPP, H. Report on variability in chemical analysis of coffee leaves at Finca Chocóla, Guatemala. Guatemala, s. e., 1952. 10 p.
24. JACOB, A. y UEXKÜLL, H. V. Fertilización. Traducido por L. López Martínez de Alva. 2a ed. Wageningen, Holanda, Veenman, 1964. 589 p.
25. JENSEN, W. A. y KAVAJIAN, L. G. La biología vegetal en nuestros días. Traducción de la 2a. ed. en inglés de Ana María Palazón Mayoral. México, D. F., Herrero, 1968. 249 p.

26. KAMEN, M. D. Primary processes in photosynthesis. New York, Academic Press, 1953. 177 p.
27. MALAVOLTA, E. y PIMENTEL-GOMES, F. Foliar diagnosis in Brazil. In Reuther, W. Plant analysis and fertilizer problems. Washington, American Institute of Biological Sciences, 1961. pp. 180-189.
28. \_\_\_\_\_ et al. La nutrición mineral de algunas cosechas tropicales. Berna, Instituto Internacional de la Potasa, 1964. 154 p.
29. MILLER, E. V. Fisiología vegetal. Traducción al español por Francisco Latorre. México, D. F., UTEHA, 1967. 323 p.
30. MOLISCH, H. Fisiología vegetal. Traducida del alemán por Emilio Guinea. 6a. ed. Madrid, Labor, 1945. 390 p.
31. MOSS, R. A. y LOOMIS, W. E. Absorption spectra of leaves. I. The visible spectrum. Plant Physiology 27:370-391. 1952.
32. MÜLLER, L. E. Algunas deficiencias minerales comunes en el caféto (Coffea arabica L.). Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Boletín Técnico nº 4. 1959. 40 p.
33. NAMKEN, L. N. y LEMON, E. R. Field studies in internal moisture relations of the corn plant. Agronomy Journal 52(11):643-646. 1960.
34. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Photosynthetic mechanism of green plants. Washington, D. C., 1963. 758 p.
35. NUTMAN, F. J. Studies of the physiology of Coffea arabica L. Photosynthesis of coffee leaves under natural conditions. Annals of Botany (n.s.) 1(3):353-368. 1937.
36. RABINOWITCH, E. I. Photosynthesis. New York, Interscience, 1945. v. 1, 569 p.
37. RAY, P. M. La planta viviente. Traducido por Raúl J. Blaisten. México, D. F., Continental, 1964. 165 p.
38. ROBBINS, W. W., WEIR, T. E. y STOCKING, C. R. Botánica. Versión española de Alonso Blackaller, Valdés. México, D. F., Limusa. 1966. 608 p.
39. SESTAK, Z. y CATSKY, J. Intensity of photosynthesis and chlorophyll content as related to leaf age in Nicotiana glauca hort. Biología Plantarum 4(2):131-140. 1962.

40. SESTAK, Z. y VACLAVIC, J. Relationship between chlorophyll content and photosynthetic rate during the vegetation season in maize grown at different constant soil water levels. In Bohdan, S., ed. Water stresses in plants. Proceedings of a Symposium, Prague, Sept. 30-Oct. 4, 1963. The Hague, Junk, 1965. pp. 210-215.
41. SMITH, H. C. J. y BENITEZ, A. Chlorophylls: analysis in plant materials. In Paech, K. y Tracey, M. V. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin, Springer, 1955. v. 4, pp. 142-196.
42. STRAIN, H. H. y SVEC, W. A. Extraction, separation and isolation, Vernon, L. P. y Seely, G. R. The chlorophylls. New York, Academic Press, 1966. pp. 21-66.
43. TERRIEN, J., TRUFFAUT, G. y CARLES, J. Light, vegetation and chlorophyll. London, Hutchinson, 1957. 224 p.
44. WALLACE, T. The diagnosis of mineral deficiencies, in plants, by visual symptoms. 2nd. ed. New York, Chemical, 1961. 125 p.
45. WEAVER, J. E. y CLEMENTS, F. E. Ecología vegetal. Traducción de la 2a. ed. inglesa por Angel L. Cabrera. Buenos Aires, Acme, 1914. 667 p.
46. WEEDON, B. C. L. Chemistry of the carotenoids. In Goodwin, T. V. Chemistry and biochemistry of plant pigments. New York, Academic Press, 1965. pp. 75-125.
47. WHITTINGHAM, C. P. Function in photosynthesis. In Goodwin, T. V. Chemistry and biochemistry of plant pigments. New York, Academic Press, 1965. pp. 357-380.
48. WILSON, C. L. y LOOMIS, W. E. Botánica. Traducción de la 4a. ed. inglesa por Irina L. de Coll. México, D. F., UTEHA, 1968. 646 p.

A P E N D I C E

ANALISIS FOLIAR DE HOJAS CON SINTOMAS VISIBLES DE  
DEFICIENCIAS MINERALES

<u>ELEMENTO</u>	<u>CONTENIDO</u>
Nitrógeno	< 1,8 %
Fósforo	< 0,2 %
Potasio	< 0,75 %
Calcio	< 0,89 %
Magnesio	< 0,094 %
Azufre	< 0,14 %
Hierro	< 1,1 ppm.
Boro	< 15,0 ppm.
Manganeso	< 0,02 ppm.
Zinc	< 0,46 ppm.

Datos tomados en la Estación Meteorológica, situada a pocos metros al norte de la laguna del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Turrialba, Costa Rica. Elevación 602 m (1962 pies), aatitud 9°53' N, longitud 83° 38' W.

	<u>Enero 1971</u>	<u>Febrero 1971</u>	<u>Marzo 1971</u>
<u>Temperatura</u>			
Media	20,1 °C	20,0 °C	20,2 °C
Promedio de las máximas	25,2 °C	25,9 °C	25,2 °C
Promedio de las mínimas	16,7 °C	15,7 °C	16,8 °C
Máxima absoluta	27,0 °C	27,9 °C	27,5 °C
Mínima absoluta	12,0 °C	12,6 °C	13,0 °C
<u>Precipitación</u>			
Total mensual	168,3 mm	46,8 mm	117,9 mm
Días con 0,1 o más	24	18	19
Máximo por día	62,1 mm	11,9 mm	22,9 mm
<u>Brillo solar</u>			
Duración de la iluminación:			
Total mensual	147,6 horas	160,8 horas	99,1 horas
Promedio diario	4,76 horas	5,74 horas	3,20 horas
<u>Radiación</u>			
Total mensual	12.780 cal/cm <sup>2</sup>	13.806 cal/cm <sup>2</sup>	13.122 cal/cm <sup>2</sup>
Promedio diario	412,25 cal/cm <sup>2</sup>	493,07 cal/cm <sup>2</sup>	423,29 cal/cm <sup>2</sup>
Máxima diaria	624 cal/cm	705 cal/cm	759 cal/cm
<u>Humedad relativa</u>			
Promedio diario	87,4 %	84,7 %	86,4 %
Promedio de las mínimas	58,5 %	52,1 %	56,3 %
Mínima absoluta	41 %	41 %	27 %