

24.38

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DEL EFECTO QUE TIENE EL DICROMATO DE POTASIO SOBRE LA PRODUCCION DE PIGMENTOS FOTOSINTETICOS EN PHASEOLUS VULGARIS, MEDIANTE LOS METODOS RADIOMETRICO, ESPECTROFOTOMETRICO Y FLUORESCENCIA DE RAYOS X.



TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN BIOLOGIA PRESENTAN
MARIA YOLANDA COLIN RODEA
BELINDA HERNANDEZ CHAO

MEXICO, D. F.
NOVIEMBRE 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTRODUCCION

Por el hecho de cubrir aproximadamente dos tercios de la superficie terrestre, la vegetación cumple muchas funciones en el equilibrio ecológico. Por una parte es fuente de alimentación y de purificación de la atmósfera y por otra sirve a diversas funciones tanto propias a la actividad humana como naturales, sobresaliendo entre estas últimas la acción de contrarrestar los procesos de erosión del suelo y facilitar la infiltración del agua hacia el subsuelo.

Las plantas al obtener del suelo la mayor parte de sus nutrientes, son susceptibles a los cambios en su composición. Una planta dada que crece en distintos tipos de suelo, frecuentemente muestra variaciones morfológicas y/o fisiológicas. Estas manifestaciones pueden ser de gran utilidad para localizar zonas en las que existan efectos de mineralización o contaminación del suelo. La búsqueda de estas zonas puede ser de interés por la vegetación misma como en el caso de campos agrícolas ubicados en zonas contaminadas o puede serlo porque la mineralización existente sea indicativa de una región con potencial para la exploración y posterior explotación de un yacimiento.

El empleo de la vegetación como herramienta en exploración geofísica ha tenido un auge reciente a partir de la disponibilidad de imágenes de satélite que permiten estudiar grandes extensiones con poco tiempo y esfuerzo.

Diferenciar en las imágenes una misma clase de vegetación, con respecto a si ha sufrido o no un impacto causado por mineralización o contaminación, cae dentro de los campos de Percepción Remota y Geobotánica.

La diferenciación se apoya principalmente en los cambios en la reflectancia de la vegetación causados por la carencia de algún nutriente o el exceso de algún elemento o mineral. Debido a esto es necesario ampliar el conocimiento del comportamiento espectral de la reflectancia de la vegetación cuando esta es sujeta a condiciones anómalas en su adquisición de nutrientes.

Plantas indicadoras de agua, tipo de suelo, salinidad, contaminación y otros factores económicamente importantes como lo son los depósitos minerales, han sido descritos ampliamente por diversos investigadores. En esta aplicación, la vegetación ha llegado a ser de gran utilidad en la clasificación de la tierra, en la predicción del posible uso de la misma, así como de su futura explotación.

El principio de utilizar a las plantas en prospección, está basado en la habilidad que tienen las plantas para absorber los minerales presentes en el suelo ya sea en bajas o altas concentraciones, o bien de responder a la ausencia de estos y a la susceptibilidad que tienen los vegetales de ser afectados por las condiciones de temperatura, humedad y disponibilidad de oxígeno imperantes en el sustrato. Lo anterior se manifiesta en la planta mediante cambios morfológicos y fisiológicos, generalmente observables macroscópicamente.

Las plantas que se desarrollan bajo condiciones naturales sin alteraciones de ningún tipo, presentan patrones de crecimiento, ciclos de vida y morfología característicos de la especie a la que pertenecen. Aquellos vegetales que crecen en suelos que presentan alteraciones físicas o químicas, presentan cambios morfológicos, fisiológicos y en ocasiones genéticos. Si los cambios morfológicos que son más fáciles de estudiar, son caracterizados por alguna técnica como lo es el estudio de las propiedades espectrales de la vegetación, las plantas se convierten en una herramienta importante en la exploración geofísica.

Una gran cantidad de contaminantes, tanto de origen natural como aquellos provenientes de desechos industriales, ponen en peligro la salud humana y ocasionan pérdidas económicas, sobre todo en relación con la agricultura y vegetación natural. El inadecuado procesamiento industrial del cromo y sus desechos esparcidos en diferentes áreas de la zona Metropolitana de la ciudad de México, lo han convertido en un contaminante de alto riesgo para la salud (Mendoza, 1976). Además de la industria productora de cromatos, en la cual los principales compuestos son cromato y dicromato de potasio, cromato y dicromato de so

dio, trióxido de cromo, sulfato básico de cromo y óxido de cromo, usados en la industria química, otras posibles fuentes de contaminación son el cromado de metales, el uso de sustancias de cromo en aditivos de gasolina, en pigmentos, en agentes curtidores (Sullivan, 1969), en inhibidores de la corrosión (Sullivan, 1969; Taylor y Parr, 1978) y en preservativos de la madera (Browning, 1969; Chou et al. 1974; Feist y Ellis, 1978).

En el caso de la vegetación, muchas veces los contaminantes se presentan como un exceso de minerales o elementos que normalmente la planta emplea para su nutrición y desarrollo. Puesto que los nutrientes, en un balance adecuado, son responsables de los procesos que dan su pigmentación a la planta, se sabe que una alteración en dichos nutrientes tiene efectos detectables sobre la pigmentación. En muchas situaciones, estos efectos son detectables por medio de imágenes obtenidas desde aviones o satélites. La detectabilidad se basa en las propiedades de la radiación solar reflejada por las plantas.

Cap I.- COMPORTAMIENTO ESPECTRAL DE LA INTERACCION RADIACION-VEGETACION

Las plantas usan la energía del sol para incorporar los nutrientes inorgánicos a su organismo. Asociado al cambio en los requerimientos de las plantas existen cambios en las propiedades espectrales de la vegetación, ejemplos de esto se observan a simple vista a través del crecimiento de muchas plantas. Es común que una planta cambie su color o tonalidad en función de su etapa de desarrollo. Estos cambios son determinados principalmente por la presencia de pigmentos y la proporción en que estos se encuentren lo cual a su vez depende de la etapa de desarrollo.

La energía del sol recibida cambia en calidad y cantidad con las estaciones del año, por ejemplo, los árboles de coníferas y los deciduales tienen diferentes patrones de crecimiento que dependen de la estación del año, consecuentemente los espectros de reflec-

tancia de estos árboles son muy diferentes en el otoño ya que los árboles deciduales no tienen hojas en esta estación. Las propiedades espectrales de la radiación también cambian con la hora del día debido a la variación del ángulo de incidencia de la radiación solar.

Las propiedades espectrales se pueden dividir en cuatro categorías, con base en la longitud de onda en que se observen y a los diferentes fenómenos físicos que involucra.

- a) Propiedades de reflectancia en la región de 0.4 a 2.5 μm .
- b) Propiedades de luminiscencia en la región de 0.4 a 0.7 μm .
- c) Propiedades térmicas en las regiones de 3 a 5 m y 8 a 14 μm .
- d) Propiedades de reflectancia del radar en la región de 1cm a 3 m.

Las propiedades espectrales no son estáticas ya que están íntimamente relacionadas a los procesos de vida de la planta, siguiendo un ciclo. El ciclo para hojas deciduales consiste de tres fases hasta la madurez. En la fase inicial la reflectancia en el infrarrojo cercano es alta así como significativa en las regiones del azul y del verde. En la segunda fase la clorofila empieza a ser producida y hay fuerte absorción en la banda del azul. Finalmente, con un incremento en la cantidad de clorofila, la absorción en la banda del rojo se va haciendo progresivamente más fuerte ya que en esta banda absorbe la energía que necesita para sus funciones vitales. Simultáneamente hay un incremento de la reflectancia en el infrarrojo cercano. Después del período de madurez y hasta la muerte de la hoja va desapareciendo la absorción en la banda del rojo y disminuye la reflectancia en el verde conforme la clorofila se desintegra pero permanece absorción en la banda del azul por los pigmentos que quedan. Esto produce los colores amarillo y rojo de las hojas en otoño.

Hay un decremento en reflectancia del infrarrojo cercano también por la pérdida de clorofila y simultáneamente las células se contraen y se deshidratan llevando finalmente al color café de las hojas muertas. En contraste con los árboles deciduales, los árboles de co-

níferas siempre tienen grandes cantidades de clorofila, aunque las hojas jóvenes tienden a ser más brillantes. Debido a que no hay época en que todas las hojas mueran no existe cambio drástico en la reflectancia a través del año.

El comportamiento espectral de la interacción radiación-planta que se ha esbozado es general en su descripción. Existen muchos valores que determinan la reflectancia de las hojas. Es a causa de estos diferentes factores que determinan las propiedades espectrales de las hojas tales como, los diferentes arreglos de pigmentos de clorofila, presencia de pigmentos, morfología de las células, componentes internos de la hoja y el contenido de agua, que los diferentes tipos de hojas tienen distintas propiedades de reflectancia espectral.

Aun en una hoja existen diferencias, ya que la superficie superior generalmente tiene reflectancia más baja que la superficie inferior, debido a la asimetría de los arreglos con los que se encuentra la radiación dependiendo de la superficie por la que penetra.

La radiación es reflejada, absorbida, emitida y transmitida por cada una de las hojas, y esta radiación reflejada, emitida y transmitida puede ser retransmitida y vuelta a reflejar numerosas veces antes de dejar la planta, de manera que la reflectancia espectral y las propiedades de emitancia de una planta son mucho más complejas que las de una hoja.

Se han considerado los siguientes parámetros tan importantes como las propiedades de reflectancia cuando se va a medir una cubierta vegetal; a) transmitancia de las hojas; b) número y arreglo de las hojas; c) características espectrales de tallos, troncos, ramas y otros componentes de las plantas; d) propiedades espectrales del suelo, rocas, arbustos etc...; e) ángulo solar (zenit); f) ángulo de visión; y g) ángulo azimutal. Las plantas individuales generalmente no se toman en cuenta en las aplicaciones de Percepción Remota por lo que la cubierta vegetal aparece como una combinación de todas las variables mencionadas, más la variación de cada una a diferentes especies y diferentes mezclas de plantas.

Es claro que para manejar todas estas variables de forma que

se pueda aislar los cambios en reflectancia de un tipo de vegetación que se desee usar como indicadora, es conveniente usar algún modelo.

Los modelos físicos de una cubierta vegetal varían de simples a complejos pero todos requieren del conocimiento de la interacción de la radiación solar con la vegetación. Para esto se debe tomar en cuenta que la hoja es la unidad funcional de esta compleja interacción.

Las propiedades de reflectancia de una hoja son básicas para entender la reflectividad de la planta completa o cubierta vegetal, aunque la reflectancia de una hoja no proporciona de manera directa la reflectancia del conjunto. Existen diferencias cuantitativas y cualitativas en los dos tipos de espectro. El valor de la reflectancia de una cubierta es diferente que el de una hoja debido a la atenuación de radiación por el conjunto, a variaciones en el ángulo de iluminación, orientación de la hoja, sombras y reflectancia del suelo (Knipling, 1970).

Detectar plantas sujetas a un esfuerzo (stress), especialmente esfuerzo debido al exceso de concentración de un metal es de interés general. Los pigmentos de la clorofila generalmente son la parte de la planta más sensible a varios tipos de esfuerzo. En medios adversos donde la clorofila se ve afectada se nota disminución en el crecimiento de la planta, las hojas más pequeñas, menor cantidad de hojas, las hojas podrían estar orientadas de diferente manera o algún otro fenómeno relacionado con el crecimiento sería factible de ocurrir. Todos estos factores afectan el índice de área de la hoja el cual se define como la razón del área total de las hojas de la cubierta vegetal a el área del suelo en el campo de visión. La región de 0.7 a 1.3 μ m es la más sensible a los cambios en el índice de área de la hoja, de manera que cuando las plantas completas y no solo una hoja son afectadas, esta región del espectro es la más adecuada para detectar los efectos del esfuerzo.

La energía que incide sobre una hoja solo puede sufrir tres procesos en el intervalo espectral en el que se observa. La radiación es reflejada, transmitida o absorbida por la hoja. La relación entre la reflectancia, absorbancia y transmitancia espectral

está dada por:

$$\rho(\lambda) + \alpha(\lambda) + \tau(\lambda) = 1$$

donde; $\rho(\lambda)$, $\alpha(\lambda)$ y $\tau(\lambda)$, son la reflectancia, absorbancia y transmitancia espectral hemisférica.

Esto es solo una manifestación del principio de conservación de energía. Estos procesos son determinados por cuatro características de la hoja.

1) La estructura interna de la hoja (i.e. el arreglo histológico de los tejidos y células), es responsable en parte de la difusión o dispersión interna de la radiación solar incidente. La absorbancia, reflectancia y transmitancia espectral, están determinadas en gran parte por la trayectoria óptica media de la energía incidente.

2) La composición de los pigmentos, su concentración y distribución en la hoja controla la absorción de energía en el ultravioleta y visible principalmente.

3) La concentración y distribución de agua en la hoja controla en forma dominante la absorción de energía en la región infrarroja del espectro.

4) Las características de rugosidad en la hoja y el índice de refracción de la cera cuticular de la epidermis controlan la reflectancia espectral de esta superficie.

Los espectros típicos de reflectancia y transmitancia de la hoja de una planta sana se pueden apreciar en la figura 1. La curva muestra el porcentaje de la energía incidente, reflejada o transmita por la hoja en función de la longitud de onda de la energía en el intervalo espectral de 0.4 a 2.7 μm (Knipling, 1970; Murtha, 1978).

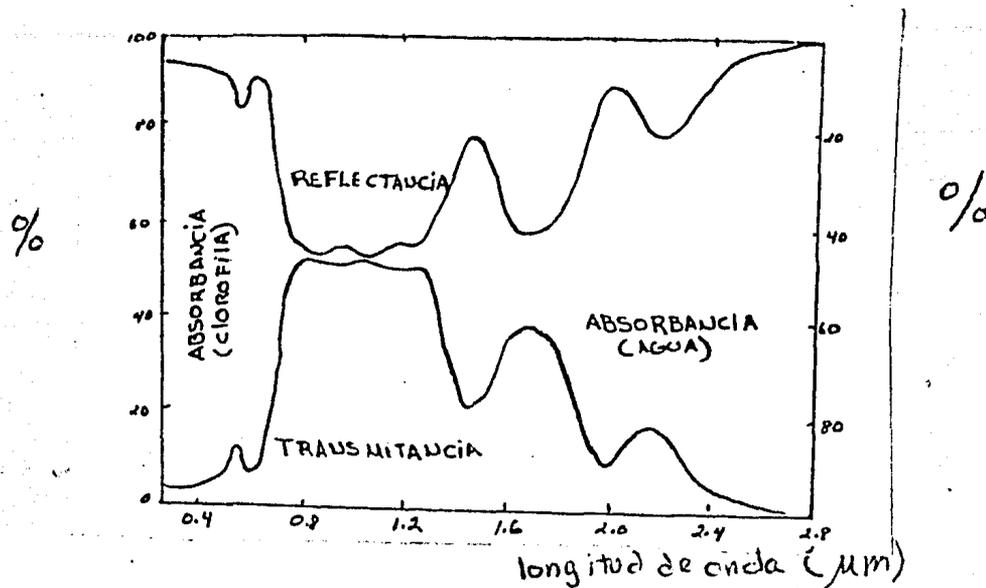


Figura 1. Espectro típico de reflectancia y transmitancia de una hoja de una planta sana.

Se observa que el espectro de transmitancia tiene la misma forma que el espectro de reflectancia. En cambio el espectro de absorbancia sigue un comportamiento contrario al de los otros dos. La absorbancia es alta en el visible y en el infrarrojo más allá de $1.3\mu\text{m}$, pero es casi cero en el infrarrojo de 0.7 a $1.3\mu\text{m}$.

La hoja de una planta típica sana tiene una reflectancia baja en la región del visible, una reflectancia relativamente alta en el infrarrojo cercano y un poco más baja en el infrarrojo más allá de $1.3\mu\text{m}$.

Esto último se debe a la fuerte absorción por agua (Gausman et al., 1977; Knipling, 1970).

En la región visible del espectro, la gran absorción de energía radiante es debida a los pigmentos de las hojas, principalmente las clorofilas, aunque los carotenoides, xantofilas y antocianinas modulan ligeramente los espectros (Murtha, 1978).

La alta reflectancia de las hojas en el infrarrojo de 0.7 a $1.3\mu\text{m}$ se debe a las discontinuidades entre los índices de refracción de la hoja. La principal discontinuidad es la interfase aire célula dentro de la hoja. Los componentes de la hoja tales como poros estomáticos, núcleo, paredes celulares, cristales y citoplasma, también producen discontinuidades significativas en los índices de refracción que contribuyen a la reflectancia de la hoja. La alta reflectancia en este

intervalo es un requerimiento funcional de la hoja para mantener un balance de energía, evitando sobrecalentarse y con ello la destrucción de las clorofilas

La cera cuticular de una hoja es casi transparente a la radiación visible e infrarroja por lo que muy poca de la energía solar incidente sobre la hoja es reflejada directamente de la superficie. La radiación es dispersada hacia la cutícula y epidermis y de ahí a las células del mesófilo y cavidades de aire del interior de la hoja. Aquí la radiación sufre múltiples reflexiones y difracciones por las diferencias en los índices de refracción entre el aire (1.0) y las paredes de celulosa hidratada (1.4).

Numerosos artículos se han publicado acerca de la absorción espectral de pigmentos aislados de hojas, pero quizá la evidencia más fuerte esté dada por el espectro de reflectancia de la porción blanca de una hoja variegada de geranio, la cual carece de clorofila (Fig. 2). En este caso el nivel de reflectancia en el visible es casi el mismo que en el infrarrojo cercano. Por lo que se puede concluir que la presencia o ausencia de clorofila no influyen de manera significativa en la porción infrarroja del espectro, y que en ausencia de absorción debida a los pigmentos, los procesos de dispersión dentro de la hoja son casi igual de eficientes para longitudes de onda en el visible. Otros estudios del espectro de absorción de clorofila aislada indican también que estos pigmentos son casi transparentes a la radiación infrarroja (Knipling, 1970).

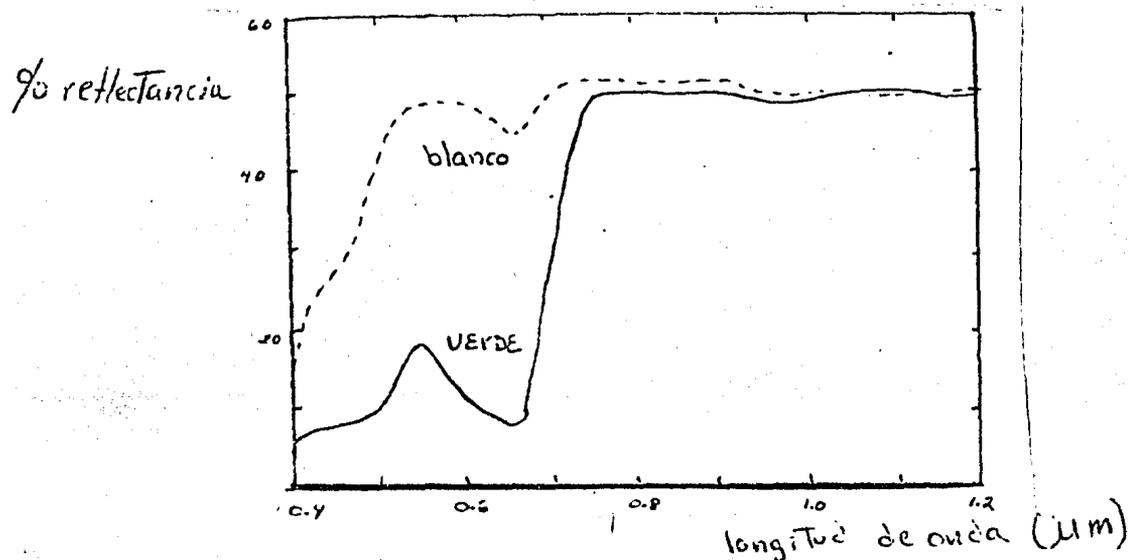


Figura 2. Espectro de reflectancia de las porciones verde y blanca de una hoja variegada de geranio

La fuerte absorción por la hoja en la en la región infrarroja más allá de $1.3\mu\text{m}$, como ya se había indicado anteriormente, se debe al agua .

El efecto de deshidratación en la hoja de frijol, se muestra en el espectro de reflectancia en la figura 3 . Los números 10% y 100%, se refieren a la fracción de agua en las hojas al muestrear. El nivel de referencia (100%) representa la cantidad de agua presente en la hoja de una planta típica.

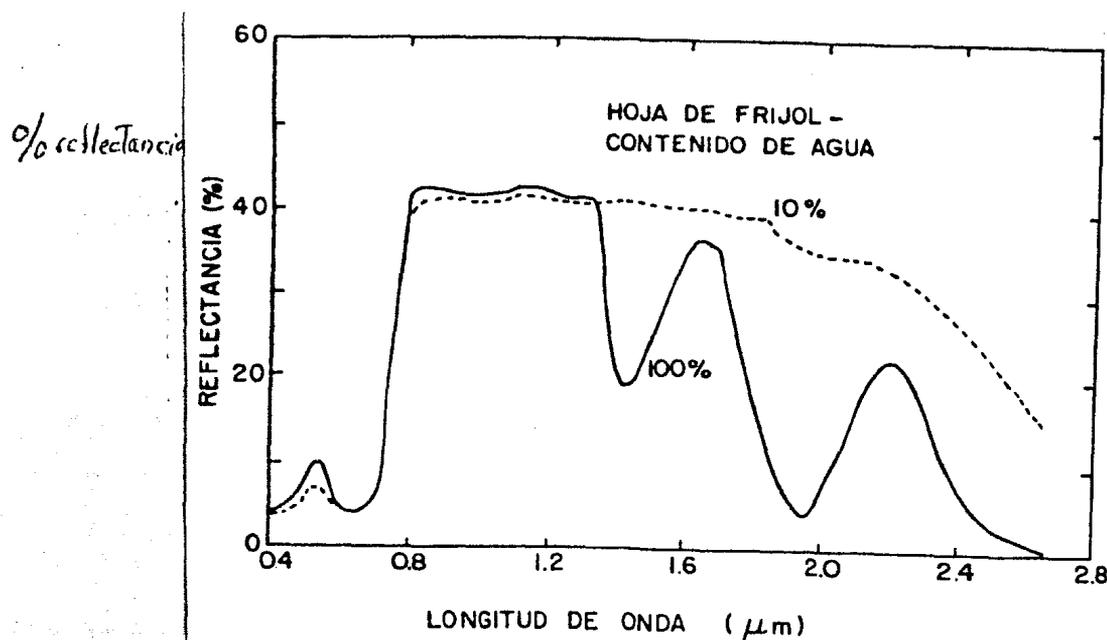


fig. 3 Efecto de deshidratación en la hoja de frijol.

Las evidencias del mecanismo interno de reflexión son bastante fuertes. Cuando se infiltra una hoja con agua se observa una drástica reducción en reflectancia en el infrarrojo cercano (fig. 4). El agua llena las cavidades de aire, reduciendo las diferencias de los índices de refracción en la hoja e incrementando la transmitancia a expensas de la reflectancia.

En el presente trabajo el objetivo principal consistió en tratar de encontrar algún tipo de correlación entre los valores de reflectancia que tiene una hoja de frijol , después de haber sometido a la planta a diferentes concentraciones de dicromato de potasio, con aquellos valores obtenidos de la concentración de clorofila total en la hoja, así como con los valores de cromo presentes en la misma .

La planta de frijol fué seleccionada después de una serie de pruebas de laboratorio con esta y con otras plantas. Esta planta presenta características que la hacen idónea para este tipo de investigación, dichas características son mencionadas más adelante.

Phaseolus vulgaris es una dicotiledonea que pertenece a la familia Leguminosae. Es una planta herbácea, de tallo delgado, de hojas compuestas, flores más o menos perigíneas, con cinco pétalos separados y un carpelo solitario, dehiscente a lo largo de sus suturas. Por otro lado la planta de frijol es sensible al cromo, lo cual la hace ser un sujeto de experimentación importante , en la investigación de los efectos metabólicos que pueda tener el cromo en los vegetales.

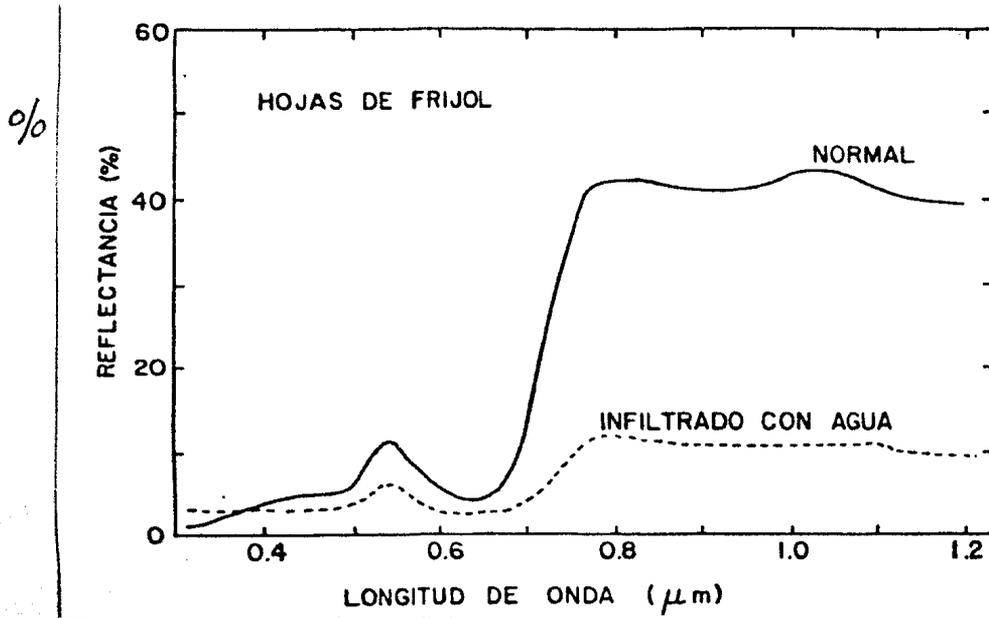


Figura 4. Efecto de la infiltración de agua en los espacios intercelulares

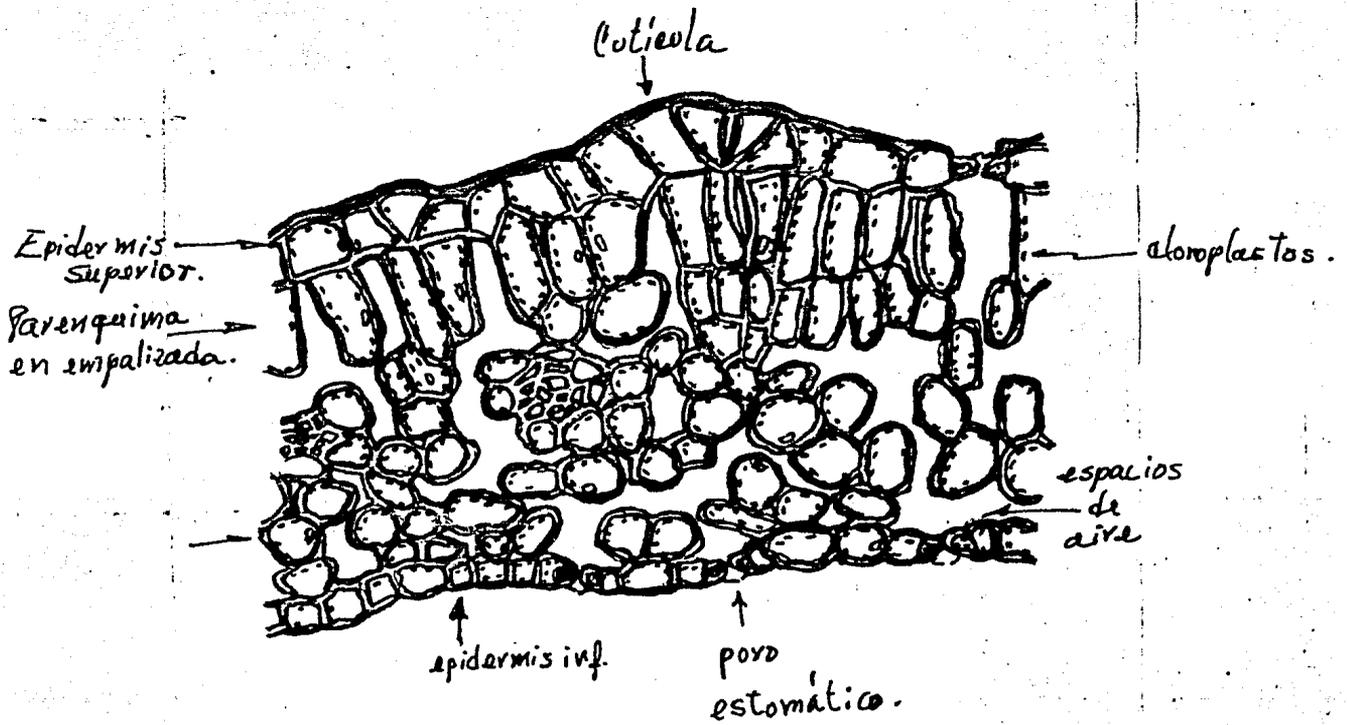


Fig. 5 Representación esquemática de la sección transversa de una hoja .

recta. Si además el radiómetro es de banda angosta y puede recorrer algún intervalo espectral, es posible obtener un espectro de la radiación reflejada por el objeto. Este espectro da la información necesaria para reconocer la presencia del objeto en una imagen cuando el comportamiento espectral se usa en el contexto de una clasificación de imágenes.

La respuesta espectral de un radiómetro es determinada por la respuesta de la combinación elemento dispersor-detector, y depende del intervalo de longitud de onda en que esté observando el detector.

Existen varios tipos de detectores entre los que se puede escoger dependiendo del intervalo espectral deseado. Entre ellos están los fotovoltaicos, fotoconductivos y los fotoemisivos.

Los fotovoltaicos al recibir radiación producen su propio voltaje, su tiempo de respuesta es del orden de $1 \mu s$.

En los fotoconductivos al incidir la radiación se produce una alteración electrónica que da lugar a un cambio en la resistencia del detector, o sea que a mayor flujo recibido, mayor conductancia. También tienen un tiempo de respuesta del orden de $1 \mu s$.

Cuando la señal recibida es baja se usan los fotomultiplicadores, que son usados en la porción visible-IR cercano del espectro (Davis et al. 1978). En un fotomultiplicador, los fotoelectrones emitidos por el fotocátodo son dirigidos electrostáticamente a una superficie emisiva secundaria, llamada dínodo. Por el primer electrón se emiten de tres a seis electrones secundarios, estos últimos se enfocan a un segundo dínodo donde se repite el proceso y así sucesivamente. El último dínodo está seguido por un ánodo que colecta los electrones dando lugar a la señal de salida del fotomultiplicador (Phototubes and Photocells, 1963).

Los componentes básicos de cualquier radiómetro son:

- a) Óptica: proporciona la radiación monocromática y la colima.
- b) Detector: transforma la radiación que viene de la muestra a una señal, generalmente eléctrica.
- c) Registrador electrónico: amplifica la señal, y la registra. (Handbook of Military Infrared Technology, 1965). (Figs. y)

Las principales características de funcionalidad de un radiómetro están determinadas por:

- a) R, la responsividad: la salida por unidad de radiación incidente.
- b) D, la detectividad: el recíproco de la potencia equivalente al ruido (NEP). $D = \frac{1}{\text{NEP}}$.

La respuesta de un detector se define como el cambio en la señal de salida (ΔS) dividida entre el cambio en el flujo incidente ($\Delta \Phi$)

$$R = \frac{\Delta S(\text{salida})}{\Delta \Phi(\text{entrada})}$$

si la respuesta del detector es lineal entonces:

$$S_\lambda = R_\lambda \Phi_\lambda \quad (Z)$$

una suposición importante es que un detector tenga respuesta lineal y que es válido el principio de superposición para señales compuestas por longitudes de onda distintas. En general: para los detectores comerciales se cumplen ambas condiciones y en particular para el fotomultiplicador que se usó esto es cierto.

Existen varias definiciones de reflectancia, dos de ellas se dan a continuación :

$$R = \frac{\Phi_r}{\Phi_i} \quad (A)$$

donde: Φ_r = flujo reflejado (watts)
 Φ_i = flujo incidente (watts)

$$R = \frac{\overline{\Omega} L}{E_0} \quad (B)$$

donde: $\overline{\Omega}$ = ángulo sólido
 L = radiancia $w/m^2 \cdot sr$
 E_0 = irradiancia w/m^2

Físicamente, la ecuación (A) implica que de alguna forma, usando el mismo detector, se puede medir la radiación incidente así como la reflejada. El mayor problema radica en medir la reflejada ya que hay que detectar la radiación reflejada en todas direcciones. La expresión (B) contiene implícita una suposición importante que simplifica el método de medición.

Esta última es válida para un panel lambertiano o reflector difuso perfecto. Una superficie lambertiana tiene por definición una radiancia constante para cualquier ángulo de reflectancia. De esta forma, se puede hacer una medición para algún ángulo de observación con la suposición de que la radiancia es constante para todo el hemisferio.

Si no se hiciera esta consideración tendríamos que, para un ángulo de observación fijo habría que rotar el detector de forma que se obtuvieran mediciones para una variación del ángulo azimutal de 180° . Esto habría que hacerlo para varios ángulos de observación, para después sumar las contribuciones de cada medición. Incluso, siguiendo este proceso habría que suponer que la señal obtenida es la misma en regiones en las que no se midió.

Con las suposiciones anteriores, hay varias formas de medir la reflectancia de una muestra. Una manera muy conveniente es hacerlo con respecto a un patrón o panel de referencia. Al hacer esto se obtiene una reflectancia relativa de la muestra con respecto al panel y si además se conoce la reflectancia absoluta del panel, se obtiene la reflectancia absoluta de la muestra.

Al barrer el radiómetro el intervalo espectral de operación, se obtiene un registro de la variación de la señal como función de la longitud de onda. Si esto se hace para muestra y para panel de referencia se obtienen $S_m(\lambda)$ y $S_p(\lambda)$ que de acuerdo con (Z) se pueden expresar como

$$S_m(\lambda) = R(\lambda) \bar{\Phi}_m(\lambda) \quad (Y)$$

$$S_p(\lambda) = R(\lambda) \bar{\Phi}_p(\lambda) \quad (X)$$

donde $R(\lambda)$ es la respuesta del fotomultiplicador y $\bar{\Phi}_m(\lambda)$, $\bar{\Phi}_p(\lambda)$ son los flujos que dan lugar a las señales correspondientes.

Tomando el cociente de (Y) entre (X),

$$\frac{S_m}{S_p} = \frac{\bar{\Phi}_m}{\bar{\Phi}_p} \quad (W)$$

pero el flujo recibido por el detector se puede expresar como

$$\bar{\Phi}(\text{recibido}) = I \frac{A_o}{r^2} \quad (U)$$

$$= L A_1 \cos \Theta \frac{A_o}{r^2} \quad (V)$$

donde

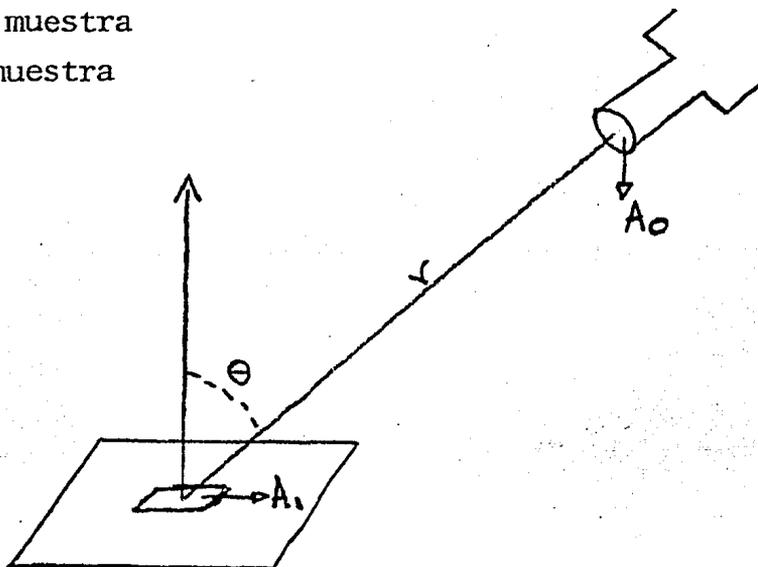
Θ = ángulo de observación

A_o/r^2 = ángulo sólido que subtende el elemento sensible del fotomultiplicador

$A_1 \cos \Theta$ = área de la muestra proyectada en la dirección del fotomultiplicador

I = intensidad de la muestra

L = radiancia de la muestra



Utilizando (V) en la relación (W), se tiene que para condiciones idénticas de medición para muestra y panel,

$$\frac{\Phi_m(\lambda)}{\Phi_p(\lambda)} = \frac{L_m(\lambda) A_1 \cos \theta \frac{A_0}{r^2}}{L_p(\lambda) A_1 \cos \theta \frac{A_0}{r^2}}$$

$$\frac{\Phi_m(\lambda)}{\Phi_p(\lambda)} = \frac{L_m}{L_p} = \frac{S_m(\lambda)}{S_p(\lambda)} \quad (T)$$

notese que el factor que se eliminó contiene la geometría de la configuración experimental.

Se tiene entonces que la razón de señales es igual a la razón de radiancias. Entonces multiplicando por la reflectancia absoluta del panel se encuentra

$$\frac{S_m(\lambda)}{S_p(\lambda)} R_p(\lambda) = \frac{L_m(\lambda)}{L_p(\lambda)} R_p \quad (S)$$

y usando la definición (B)

$$\frac{L_m(\lambda)}{L_p(\lambda)} \frac{\prod L_p}{E_0} = \frac{\prod L_m(\lambda)}{E_0} = R_m(\lambda) \quad (R)$$

donde $R_m(\lambda)$ es el espectro de reflectancia absoluta de la muestra.

De lo anterior se establece que

$$R_m(\lambda) = \frac{S_m(\lambda)}{S_p(\lambda)} R_p(\lambda) \quad (Q)$$

$S_m(\lambda)$ y $S_p(\lambda)$ pueden tener unidades arbitrarias, (volts, amperes, etc), y además la ecuación (Q) es válida también para la representación gráfica de las señales. Ya que los factores geométricos se cancelan, es posible obtener la reflectancia de cualquier muestra directamente del cociente del valor gráfico de las señales multiplicado por la reflectancia absoluta del panel de referencia. En la sección de metodología se describe el procedimiento para que sea válida la relación (Q).

Descripción del Radiómetro y Sistema de Medición

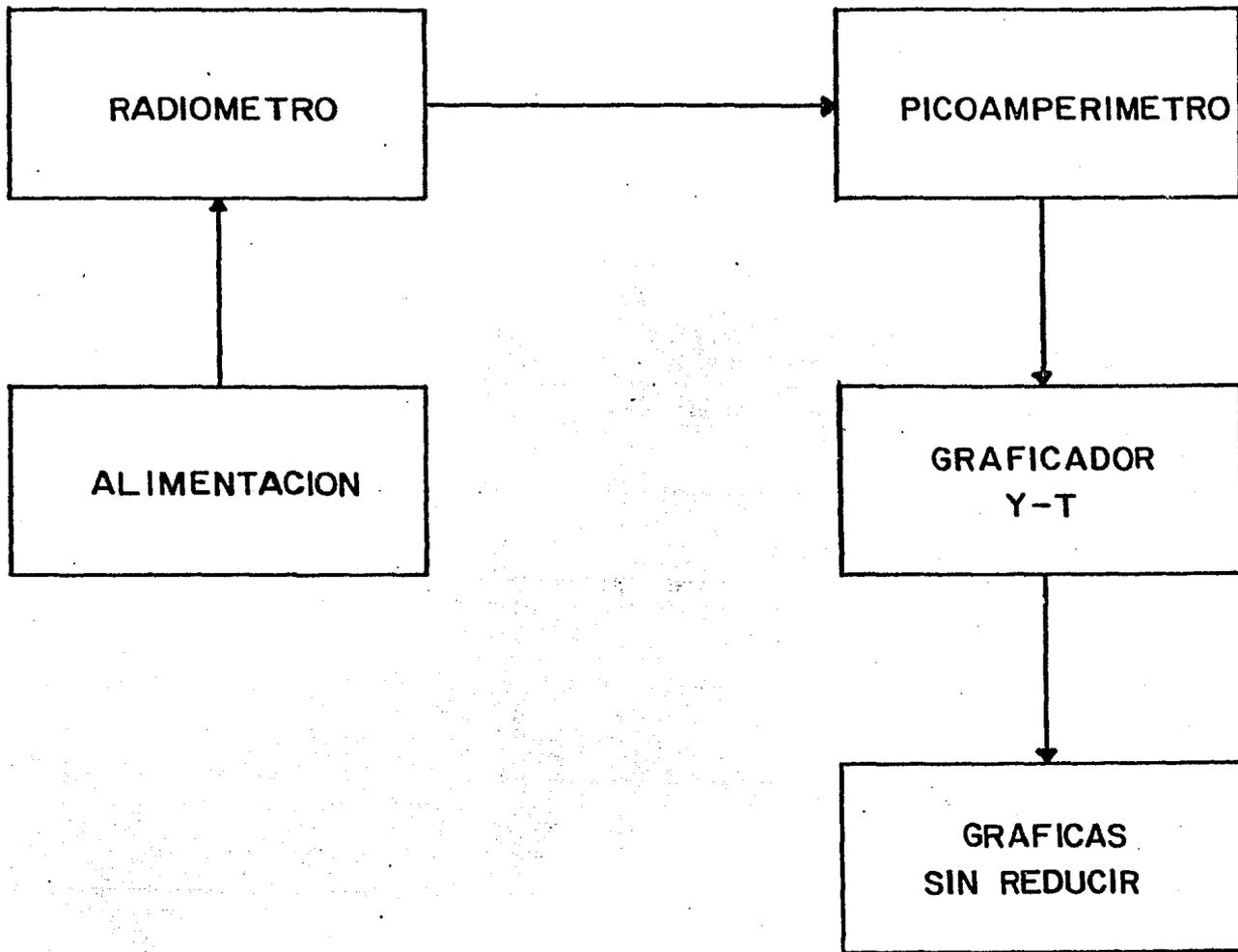
El radiómetro que se empleó fue diseñado y construido por el Instituto de Geofísica y el Centro de Instrumentos de la UNAM. El radiómetro se puede esquematizar por medio de tres bloques según la función que desempeñan (ver figura). El monocromador es del tipo Czerny-Turner, con una rejilla de difracción de 13,000 líneas por pulgada. Esta última, en combinación con la rendija de salida del monocromador proporciona una resolución espectral de 1.9 nm. La fuente de luz blanca es una lámpara de Tungsteno-Cuarzo operada a una temperatura de 2850°K. La calibración espectral se hizo con las líneas del mercurio de una lámpara de baja presión. La Colimación de la radiación monocromática se hace con un diafragma en la rendija de salida, para simular una fuente puntual, seguida por una lente convergente colocada a la distancia focal de ésta.

El barrido del monocromador es controlable por un servo-controlador de posición. El codificador de posición permite fijar un origen en longitud de onda que es almacenado en memoria. Con respecto a este origen, el usuario puede programar un barrido a través de un intervalo de longitud de onda a velocidad angular constante (i.e. cambio en longitud de onda continuo y uniforme). Alternativamente, el barrido puede ser controlado externamente por un generador de señales. El servo-controlador avanza un angstrom por cada pulso (nivel TTL) que le llega). En este modo de operación se puede controlar el barrido para que el tiempo que tarda sea igual al tiempo que el papel de un graficador y-t tarda en recorrer una distancia selec-

cionada. De esta forma se establece la correspondencia entre tiempo y longitud de onda para el registro gráfico de la señal proveniente del del radiómetro.

El tercer bloque esquematiza la geometría de detección. La radiación monocromática colimada es reflejada hacia el objeto bajo análisis, por un espejo de primera superficie colocado a 45° con respecto a la dirección de la radiación. Esto hace que la radiación incida perpendicular a la muestra. Para este trabajo se diseñó un porta muestras que permite colocar la muestra siempre en la misma posición. Esto es indispensable para realizar mediciones de reflectancia relativas a un panel de referencia. La radiación reflejada es detectada por un fotomultiplicador (RCA 4830) cuyo ángulo de visión es determinado por la posición que guarda a lo largo de un arco de círculo con centro en la muestra. El fotomultiplicador es alimentado por una fuente de alto voltaje operada a 1000 v. Un divisor de voltaje proporciona 100 V entre cada etapa del fotomultiplicador (i.e., entre dinodos vecinos).

La señal se sacó del radiómetro por medio de un cable blindado (ver figura AB) y se llevó a un pico amperímetro (Keithley 402A) donde la señal fue medida, amplificada y convertida a una señal entre 0-1 volt, para deflexión total de la escala del amperímetro. Esta señal se mandó a un graficador y-t (Hewlett-Packard) de forma que según se explicó, cada división de un centímetro sobre el papel correspondió a 10 nm de barrido.



SISTEMA DE MEDICION DE LA RADIACION ESPECTRAL REFLEJADA.

Reducción de Los Datos Experimentales

De acuerdo con el planteamiento teórico establecido en la sección de fundamentos de radiometría, la reflectancia de las muestras (hojas) se calculó con respecto a un panel de referencia. De este panel de referencia se conocía su reflectancia absoluta mediante mediciones de calibración realizadas en Environmental Research Institute of Michigan (ERIM). En el intervalo de operación (400-800 nm) la reflectancia absoluta del panel se tuvo para los valores de 400 nm más múltiplos de 50 nm. Se hizo una interpolación lineal para puntos intermedios ya que la metodología requería dividir, punto a punto, los valores de la muestra entre los correspondientes del panel, se decidió digitizar las curvas experimentales, discretizándolas en 41 puntos. Esto corresponde a incrementos de 10 nm.

Se desarrollaron programas (ver apéndice) para:

1. Digitizar las curvas experimentales almacenando los datos en archivos en la B7800 de la UNAM.
2. Restar corriente oscura, convertir escala de los datos, realizar la división y multiplicar por la reflectancia espectral absoluta del panel. Esto da la reflectancia absoluta de cada muestra.
3. Promediar la reflectancia de los grupos de 6 hojas para cada concentración de contaminante para cada tiempo de muestreo.
4. Calcular la media y desviación estandar para cada grupo de 6 hojas del inciso anterior.

Los programas se hicieron de forma que cada uno generará los archivos que el siguiente usaría. Esto limitó los errores a tan sólo los errores en la digitización debidos a mala transmisión de los datos; estos fueron mínimos y fácilmente detectables.

La graficación de los resultados se llevó a cabo con un paquete de graficación del Instituto de Ingeniería, de acceso público.

Espectrofotometría.

Cuando la luz, y otra radiación electromagnética fuera del espectro visible, pasa a través de cualquier medio transparente homogéneo ésta sale disminuida en energía. Parte de la luz puede ser disipada en la superficie, parte en el interior y parte reflejada regularmente en la superficie. El resto de la luz que es perdida se dice que es absorbida. Esta puede ser transformada en calor o en luz fluorescente o fosforescente de longitudes de onda que difieren de la original.

El conocimiento de esta radiación absorbida ha sido empleada durante largo tiempo, siempre que un químico observaba un color, y para hacer una deducción de esta observación, él utilizaba una forma de espectroscopía de absorción. Pruebas colorimétricas sistemáticas pueden ser aplicadas cualitativa y cuantitativamente en el análisis, y brinda un medio para seguir el curso de una reacción química.

Cuando reemplazamos el ojo por instrumentos que aumentan el rango espectral observable, más allá de los límites para los cuales el ojo humano es sensible, incluyendo (o por inclusión) de las regiones ultravioleta e infrarrojo, y podemos medir la proporción de radiación cada longitud de onda que es absorbida, llegamos a un método muy poderoso y preciso para discriminar entre diferentes sustancias, para estimar la fuerza de las soluciones y su pureza, y para observar las tasas de cambios químicos. Algunas observaciones pueden ayudar grandemente en la elucidación de la estructura de las moléculas.

Primeros trabajos

Las primeras observaciones de espectros de observación fueron hechos por Brewster en 1833, pero los primeros trabajos serios en el ultravioleta fueron hechos por Miller y Stokes. En 1862 comunicaron independientemente a la Real Sociedad los resultados de experimentar sobre la transparencia de varias sustancias en el ultravioleta.

La Naturaleza de la absorción

Es usual distinguir entre dos clases de absorción general y selectiva. Cuando la intensidad de absorción se incrementa continuamente hacia el final del espectro, la absorción se dice que es general; cuando la absorción varía de tal forma que en una gráfica el % de luz absorbida graficada contra la longitud de onda, muestra máximos y mínimos se dice que es selectiva. La distribución de estos dos términos indican que la absorción selectiva está condicionada por la presencia de bandas de absorción.

Explicación Cuántica.

La absorción de luz se ha considerado como un fenómeno de resonancia. Posiblemente fue Angstrom quien tuvo la primera idea de que la luz es absorbida por una sustancia, ya que los períodos de vibración particular en las moléculas corresponden con aquéllos de la luz absorbida. Sobre esta hipótesis estuvo basado su reconocimiento de la correspondencia entre emisión y absorción. La ley de Kirchhoff sugirió que las líneas oscuras en el espectro solar eran líneas de absorción debidas a tapones de sustancias que en fuentes terrestres producen líneas de emisión de la misma longitud.

El espectro de absorción de moléculas es mucho más complicado y consiste no de líneas como los átomos sino de grupos de bandas (regiones espectrales sobre las cuales un rango completo de longitudes de onda es aparentemente absorbido). La energía de una molécula es hecha de tres partes, sus electrones, están asociados con vibraciones en la molécula, y la energía de rotación. Cada una de estas energías es cuantizada justo como la energía electrónica de un átomo individual es cuantizado. La molécula puede así existir únicamente en un número limitado de estados eléctricos vibracionales y rotacionales. Las bandas de absorción en el infrarrojo lejano corresponden a transiciones de un estado rotacional a otro, y sus grandes longitudes de onda indican que los cambios de energía involucrados son muy pocos, alrededor de una centésima de electrón-volt. o menos. Una

transición de la molécula de un estado vibracional a otro puede estar acompañado por una transición rotacional simultánea, la cual puede diferir de molécula a molécula, si se piensa que todas están bajo el mismo cambio vibracional. El espectro de absorción que resulta, no consiste en una sola línea sino en un número de líneas estrechamente espaciadas, separadas por cantidades que corresponden a las pequeñas diferencias en las energías de los estados rotacionales.

Leyes de Absorción

Las mediciones cuantitativas de absorción están basadas en dos leyes fundamentales: concernientes a la relación que existe entre las intensidades de la radiación incidente y sobre la transmitida por una capa de sustancia absorbente.

Ley de Lambert

Ley de Beer

Fundamentos de la Espectrofotometría

Clases de Mediciones espectrofotométricas pueden ser clasificadas de acuerdo a la naturaleza del problema al cual se está aplicando. Posibles aplicaciones atienden a establecer dos categorías, aquéllas en las cuales vemos la información sobre la naturaleza y el estado del medio absorbente y aquélla en la cual estamos interesados en conocer el efecto producido por el medio sobre la radiación transmitida o reflejada por esta. Así podemos medir la absorción para identificar y estimar las sustancias que absorben, para resolver algún problema de constitución molecular, o para averiguar que está teniendo lugar entre átomos o moléculas - en cada instancia ésta es la

proporción a la concentración al material absorbente. (Ley de Beer). Así la exactitud proporcional con la cual una concentración puede ser determinada es $\Delta c/c$ y por diferenciación de la ecuación

$$d = \log_{10} I_0/I = ecl.$$

$$\Delta c/c = \Delta d/d$$

Asumiendo que la longitud de la celda y el coeficiente de extensión específicos son exactamente conocidos o que los valores absolutos de estos no están involucrados, como en la comparación de dos soluciones de la misma sustancia en la misma celda.

Mediciones de Absorción

Las diferentes características de construcción y las condiciones de operación afectan el uso de un espectrofotómetro para mediciones de absorción pueden ser discutidas bajo los cuatro siguientes encabezamientos principales.

- 1) El sistema dispersante
- 2) Alineación del monocromador y fotómetro.
- 3) Celdas para líquidos y gases.

Brescia F. et al. (1977) Química. Ed. Interamericano. México
p. 610-614 p.

La experiencia nos enseña que es más práctico diseñar fuentes

luminosas y detectores de luz para ciertos límites de frecuencia. Por ejemplo, para los límites de la luz visible, de la ultravioleta y del infrarrojo. Tales instrumentos reciben por lo general el nombre de espectrofotómetros, y consisten en un medidor de luz (fotones) que opera dentro de límites específicos de frecuencia. El espectrofotómetro contiene una fuente luminosa que produce un número preciso de fotones de frecuencias conocidas. Los fotones son dirigidos hacia una muestra y entonces el instrumento detecta si pasan o no esos fotones a través de la muestra (si son transmitidos) o si son absorbidos por ella. Por lo general, en esta forma se obtiene automáticamente un gráfico que muestra la absorción o la transmisión en relación con la longitud de onda. El gráfico es el espectro de absorción de la muestra.

Las consideraciones importantes que gobiernan la designación del sistema dispersante son:

- 1.- La intensidad de la radiación monocromática requerida.
- 2.- El rango de longitud de banda o de onda incluido en el rayo monocromático.
- 3.- La cantidad de stray radiación de otras longitudes de onda.

La intensidad de una longitud de banda de un rayo que pasa un microcromador depende:

- a) La brillantez intrínseca de la fuente luminosa.
- b) Los tamaños del slit.
- c) La longitud focal del sistema.
- d) El tamaño y dispersión del prisma.

Aislamiento y Propiedades físicas de pigmentos fotosintéticos.

Las clorofilas son extraídas generalmente del material vegetal mediante el uso de mezclas de metanol y eter de petróleo. Las clorofilas son transferidas finalmente a la solución de eter de petróleo y después son purificadas de otros pigmentos por cromatografía.

Entre los problemas que surgen durante la utilización de procedimientos cromatográficos, es la relativa inestabilidad de las clorofilas y sus derivados, por ejemplo una descomposición lenta puede ocurrir sobre absorbentes. Esto se debe a la facilidad con la que el magnesio es perdido en trazas de ácidos, la posibilidad de una oxidación aérea especialmente en presencia de trazas de bases y la sensibilidad de las clorofilas a la luz.

Un buen procedimiento de extracción de todos los pigmentos en la solución ocasionan poco o ningún cambio en ellos.

La acetona y el metanol, son los solventes utilizados más comúnmente para romper los enlaces de unión entre pigmentos y proteínas. La acetona ha sido preferida por muchos investigadores debido a su propiedad de alomeriza- en metanol; pero tales solven-
ción
tes orgánicos, pero como los solventes acuosos, casi siempre son utilizados y ésto no parecería ocurrir en extractos almacenados por cortos períodos.

Sustancias tales como CaCO_3 , MgCO_3 , NaHCO_3 y fimetolanilina son añadidos generalmente para prevenir la formación de feofitina, esto es conocido particularmente para hojas que se sabe son ácidas.

Los extractos deben ser analizados tan rápido como sea posible,

pero si han deben guardarse del frío y de la obscuridad. Después de que las clorofilas han sido extraídas pueden ser determinadas por varios métodos basados en espectrofotometría y fluorometría, ambos con y sin separación de los pigmentos individuales.

Métodos espectrofotométricos (de determinación).

La absorbancia puede ser medida en el solvente, en el cual los pigmentos han sido extraídos o después. La determinación espectrofotométrica de clorofilas es dependiente de la Ley de Law-Beer y diferentes ecuaciones han sido dadas para determinar la ^{concentración} total de la clorofila y de clorofila a. en clorofila b en una mezcla.

Arnon (1949) da las siguientes ecuaciones para extractos de acetona 80% con medidas de absorción en 663 nm y 645 nm en 1cm de la celda, utilizando la absorción específica de coeficientes

$$\text{mg/l Clorofila total} = 10.2 D_{545} + 8.02 D_{663}$$

$$\text{mg/l Clorofila a} = 12.70 D_{663} - 2.69 D_{645}$$

$$\text{Clorodila 60Mg /l } = 22.9 D_{44} - 4.68 D_{663}.$$

Los valores han sido modificados por varios investigadores, pero la ecuación de Arnon continúa siendo la más utilizada (Goodwin, 1976).

Este método fue el que se emplea en la cuantificación de clorofila.

Funcionamiento del Sistema Fotosintético.

Para conocer de que manera los organismos fotosintéticos captan la energía solar y la forma en que la utilizan en la fotosíntesis, es conveniente recordar algunos aspectos fisicoquímicos relevantes de la luz y de la absorción de la misma.

La luz es una de las formas más importantes de energía radiante para los seres vivos. Todos los procesos vitales finalmente dependen de la habilidad que tienen las plantas para capturar la energía luminica y utilizarla en la síntesis de sustancias orgánicas.

La teoría ondulatoria de la luz, considera que ésta viaja a través del espacio en forma de onda. La teoría cuántica, sostiene que la luz se compone de pequeñas partículas denominadas cuantos o fotones. Estas partículas que no poseen masa, se desprenden de cualquier objeto que emita luz y viajan a través del espacio hasta que interactúan con un objeto material.

La teoría ondulatoria explica ciertas características de la luz que no son explicadas por la teoría cuántica y viceversa.

La energía transportada por un haz de luz, está directamente relacionada tanto con la longitud de onda como con la frecuencia. La cantidad de energía radiante transportada por un haz luminoso varía directamente con la frecuencia; es decir, mayor sea ésta, mayor será la energía. Es decir a medida que la longitud de onda aumenta, disminuye la cantidad de energía que lleva.

En el espectro de la luz visible al rojo corresponde la longitud de onda más larga y la menor energía, mientras que a la luz azul con la longitud de onda más corta, le corresponde la mayor cantidad de energía (Baker y Allen, 1977).

La habilidad de un compuesto para absorber fotones depende de su estructura atómica, particularmente del arreglo de los electrones que rodean su núcleo atómico. El espectro de absorción de un compuesto es indicativo de su capacidad para absorber luz como una función de la longitud de onda. Únicamente fotones con cierta longitud de onda pueden excitar a un átomo o molécula dada, ya que la excitación de moléculas no es continua, sino cuantizada. Esto es, la energía luminosa es absorbida en valores discretos.

Cuando un fotón interacciona con un átomo o molécula capaz de absorber luz a una longitud de onda dada, la energía es absorbida por algunos de los electrones, los cuales son elevados a niveles de energía superiores. El átomo o molécula se encuentra en un estado de alta energía. Una molécula excitada tiene posibilidades gracias a esta condición de reaccionar con alguna otra molécula. En tal reacción fotoquímica la molécula excitada puede perder un electrón cediéndolo a la molécula con la que reacciona (Lehninger, 1977).

La energía que es capturada por algunas moléculas puede ser transformada a otras formas de energía.

La captura de un fotón y la conversión de su energía lumínica, en energía química es una propiedad privada de las plantas y este proceso es llamado "fotosíntesis".

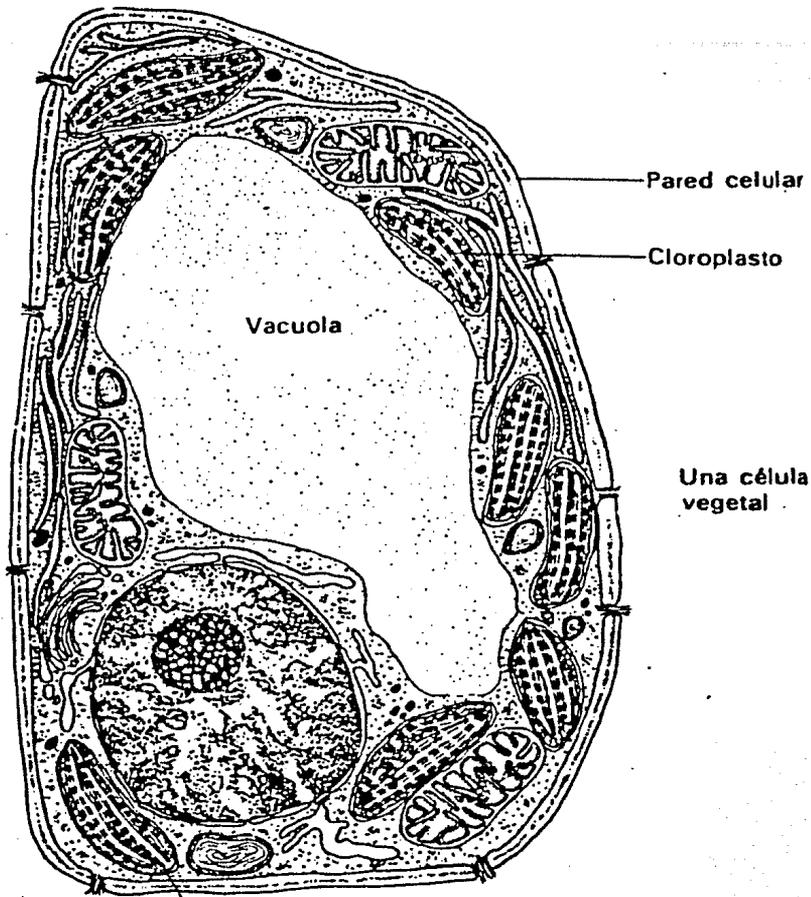
La cantidad total de energía solar que llega a la superficie de la tierra en forma de fotones, es inmensa, se estima que excede 2×10^{26} cal/año. Únicamente el 12% de esta energía está disponible actualmente para la vida vegetal; del resto que se encuentra fuera del visible parte es absorbida por la atmósfera, parte por la porción no viva de la superficie terrestre (Devlin, 1972) y parte es reflejada al espacio exterior.

La energía solar capturada en el proceso de la fotosíntesis es la fuente de la cual proviene aproximadamente el 90% de toda la energía utilizada por el hombre para la obtención de calor, luz y energía, ya que el carbón, petróleo y gas natural, los combustibles para la mayoría de las máquinas hechas por el hombre, son producto de la descomposición de material biológico generado hace millones de años por organismos fotosintéticos.

Cloroplastos y Pigmentos Fotosintéticos.

En algas verdes y plantas superiores, los pigmentos fotosintéticos están contenidos en un organelo celular llamado cloroplasto. Los cloroplastos de plantas superiores son marcadamente uniformes en tamaño y forma, tienen forma de disco o saco elipsoidal de aproximadamente 3-10 μm de largo y alrededor de 1 y medio μm de grosor.

La fig. 2. es una representación esquemática de una célula vegetal y particularidades de un cloroplasto.



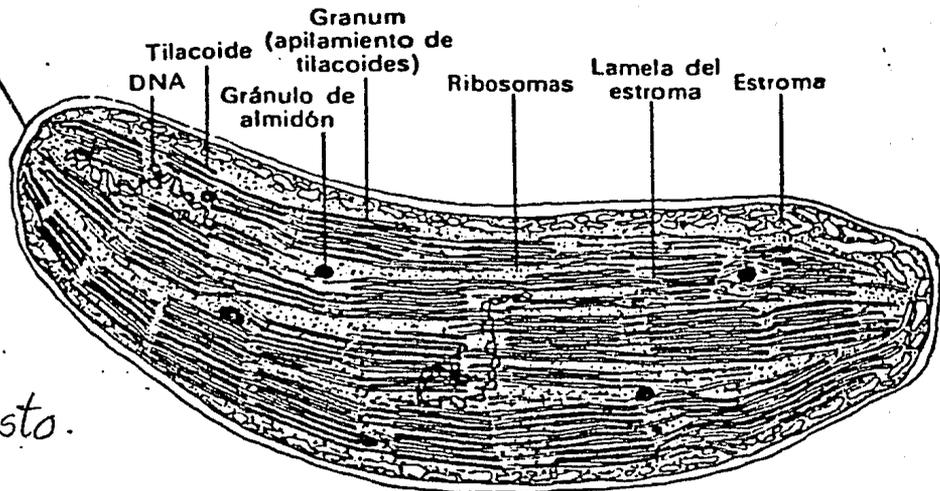
Pared celular

Cloroplasto

Vacuola

Una célula vegetal

Fig. 2
Célula vegetal



Granum
(apilamiento de
tilacoides)

DNA

Gránulo de
almidón

Ribosomas

Lamela del
estroma

Estroma

Cloroplasto.

Los cloroplastos de las plantas superiores están formados por cilindros densos, llamados grana, incluidos en un material más claro el estroma. Estudios recientes con el microscopio electrónico, han revelado que existen de 40 a 80 grana en un cloroplasto típico, cada uno compuesto por capas de membranas apareadas formando sacos o discos denominados tilacoides.

Las membranas o lamelas de los discos parecen estar interconectadas, extendiéndose a través del estroma a los grana adyacentes.

Las membranas del tilacoide tienen encajado un conjunto paracrystalino de pequeñas partículas llamados cuantosomas. La clorofila corresponde a una parte importante de los lípidos. Una fracción de la clorofila está unida a proteínas, aunque la fracción proteica incluye también varios citocromos, plastocianina y ferredoxina.

El problema es cómo se organizan ésta y otras sustancias para realizar la fotosíntesis.

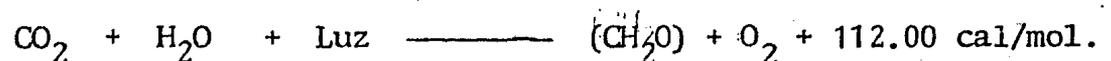
FOTOSÍNTESIS.

La fotosíntesis es el proceso de gran escala que convierte compuestos orgánicos simples y estables en la combinación rica en energía de materia orgánica y oxígeno, haciendo posible de este modo una vida abundante sobre la tierra. La fotosíntesis es la fuente de toda la materia viva y toda la energía biológica de la tierra.

El proceso fotosintético consta aparentemente de tres fases principales: 1) Separación de los átomos de hidrógeno de la molécula de agua con producción de moléculas de oxígeno; 2) La transferencia de los átomos de hidrógeno desde un compuesto intermedio de la primera fase a otro de la tercera; 3) La utilización de los átomos de hidrógeno para convertir en CO_2 el carbohidrato.

La primera y la segunda fase constituyen lo que conocemos con el nombre de fase luminosa y la tercera lo que se denomina fase oscura de la fotosíntesis.

La reacción total de la fotosíntesis puede resumirse en la ecuación siguiente:



donde CH_2O representa un carbohidrato, mol es la abreviatura de 'molécula gramo', es decir, el peso molecular en gramos de las subtancias en cuestión (carbohidratos y O_2).

Pigmentos Fotosintéticos.

La capacidad que tienen las plantas de capturar energía luminosa ha sido asociado con las partes verdes de las mismas por científicos desde el siglo XVIII. El color verde proviene de la clorofila, la cual se encuentra dentro de los cloroplastos y es la clave de la fotosíntesis. No obstante, no todos los cloroplastos son verdes (Dyson, 1977) dado que también contienen pigmentos accesorios, los cuales incluyen el amarillo rojo o carotenoide púrpura, y el azul o rojo de las ficobilinas (Lehninger, 1977). Estos pigmentos en algunas ocasiones se encuentran en cantidad suficiente como para enmascarar el verde de la clorofila.

Los pigmentos son sustancias que absorben fuertemente la luz visible. La mayoría absorbe únicamente en algunas regiones del espectro y transmite o refleja la luz de todas las otras longitudes de onda; como consecuencia, ellos presentan color. La clorofila por ejemplo, absorbe longitudes de onda cortas y largas en el espectro visible: azul y rojo. Las longitudes de onda reflejadas son las que se encuentran en el verde a la mitad del espectro visible, estas propiedades se combinan para producir el verde característico de los vegetales (Govindjee and Govindjee, 1974). Los carotenoides encontrados en algas y bacterias al igual que en plantas superiores, absorben principalmente en el azul y son amarillos, naranja o de color rojo.

La clorofila y demás pigmentos se forman en los cloroplastos de las células generalmente por el influjo de la luz solar.

Se conocen varios pigmentos con el nombre de clorofila, las más importantes son la clorofila a y b.

Las células fotosintéticas productoras de O_2 contienen dos clases de clorofila, de las cuales una siempre es la a. Mientras que en las plantas verdes la segunda clorofila es la b, en algas pardas, diatomeas y dinoflagelados es la clorofila c.

Los principales pigmentos vegetales verdes, clorofilas a y b se hallan en las plantas superiores comúnmente en razón a:b de 2.5 ± 0.5 a 1. Aunque esta razón es muy variable y en muchas especies vegetales la clorofila b no se encuentra (Othmer, 197).

Químicamente, la clorofila es un compuesto porfirinico magnésico y contiene un anillo ciclopentano fusionado. Los cuatro átomos de nitrógeno del centro están coordinados con un ion magnesio Mg^{2++} y forman un complejo extremadamente estable planar esencialmente. La clorofila

La razón por la que las clorofilas absorben la luz visible eficientemente es debido a sus múltiples dobles enlaces conjugados (Lehninger, 1977).

Las diferencias en la estructura química de las clorofilas producen espectros que pueden ser tratados sistemáticamente. Los espectros de absorción de estas moléculas difieren apreciablemente en las diferentes longitudes de onda en las que se encuentran las intensidades de las bandas. Las variaciones espectrales para un mismo tipo de clorofila pueden ser debidas a que las moléculas se encuentran en diferentes microambientes celulares o a que pueden estar agregadas de manera diferente con otras moléculas de clorofila, además que generalmente se encuentran asociadas a proteínas. Las pequeñas diferencias de estructura entre las clorofilas a y b, se traducen en una diferencia considerable en su espectro de absorción.

Al igual que la clorofila los pigmentos accesorios pueden servir como receptores de energía luminosa. Ellos incluyen a los carotenoides y a las ficobilinas. Estos pigmentos tienen sus máximos de absorción a longitudes de onda diferentes a las de la clorofila y sirven como receptores de luz complementarios, de porciones del espectro visible no cubiertos totalmente por la clorofila.

Cuando la energía luminosa es absorbida por estos pigmentos, ésta es transferida a la molécula de clorofila para ser utilizada en la fotosíntesis.

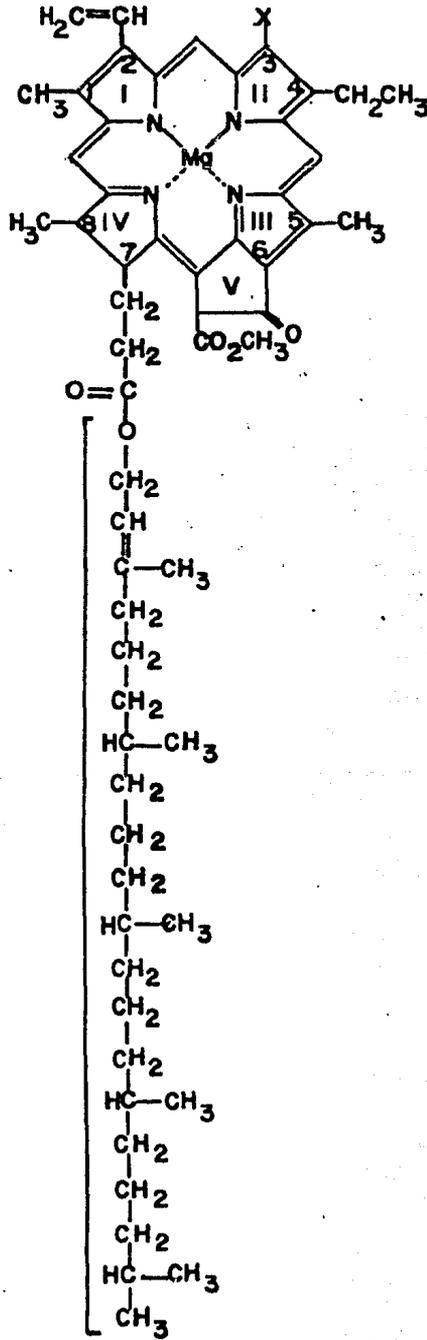
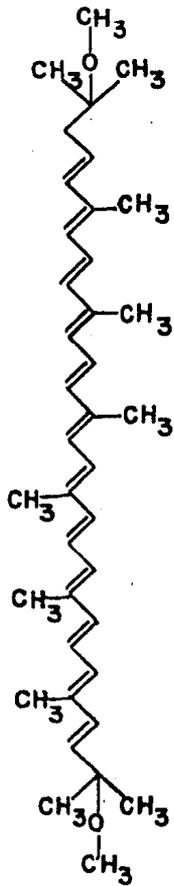
Los carotenoides son grandes moléculas poliisoprenoidales que tienen dobles enlaces conjugados, al final de cada molécula se encuentra un anillo ciclohexano sustituido insaturado. Existen dos clases principales de carotenoides en los cloroplastos: los carotenos que son hidrocarburos isoprenoidales y no contienen oxígeno en su molécula, y las xantófilas que son similares en estructura pero que contienen átomos de oxígeno en sus anillos terminales. La siguiente figura muestra la estructura química del B-caroteno, el caroteno más abundante y la espiriloxantófila.

Las ficobilinas no se encuentran en plantas superiores, se presentan en algas rojas y azul verdes (Hall, 1977; Goodwin, 1976; Heath, 1970).

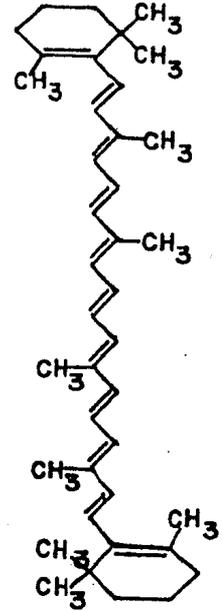
también tiene una larga cadena hidrofóbica , que consiste en un alcohol fitol esterificado a un sustituyente de ácido propiónico en el anillo IV.

La siguiente figura muestra la estructura química de la clorofila .

Espiriloxantina



Clorofila



β-caroteno

Los carotenoides absorben luz principalmente en el azul-violeta, el cual contribuye a su color amarillo rojizo. De sus espectros de absorción en solventes orgánicos, se observa un desplazamiento considerable con respecto a las bandas de absorción en el azul de las clorofila.

Al igual que en el caso de la clorofila, también existe evidencia de que los carotenoides están asociados con proteínas de una manera no covalente en la unidad fotosintética (Heath, 1969).

Es importante recordar que la forma fotosintéticamente significativa de cada pigmento vegetal, es la forma bajo la cual existe en el tejido vivo y no la forma en la cual es extraído generalmente.

Los pigmentos se encuentran organizados en sistemas funcionales y es de esta forma como ellos intervienen en la fotosíntesis.

Aún falta mucho por conocer sobre estos sistemas de pigmentos en cuanto a su modo preciso de acción y a su composición.

Respecto a la composición, parece que todos los organismos fotosintéticos tienen dos sistemas funcionales de pigmentos, los cuales son llamados generalmente fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII).

El PSI está formado en su mayor parte por pigmentos que tienen su máxima absorción de luz en las longitudes de onda mayores de 680 nm, mientras que el PSII está formado por pigmentos que absorben eficientemente por debajo de los 680 nm.

El PSI está localizado en una fracción particular del cloroplasto, la cual contiene clorofila a_{683} y clorofila a_{700} , citocromo f en una cantidad igual a la de a_{700} y poco o nada de clorofila b.

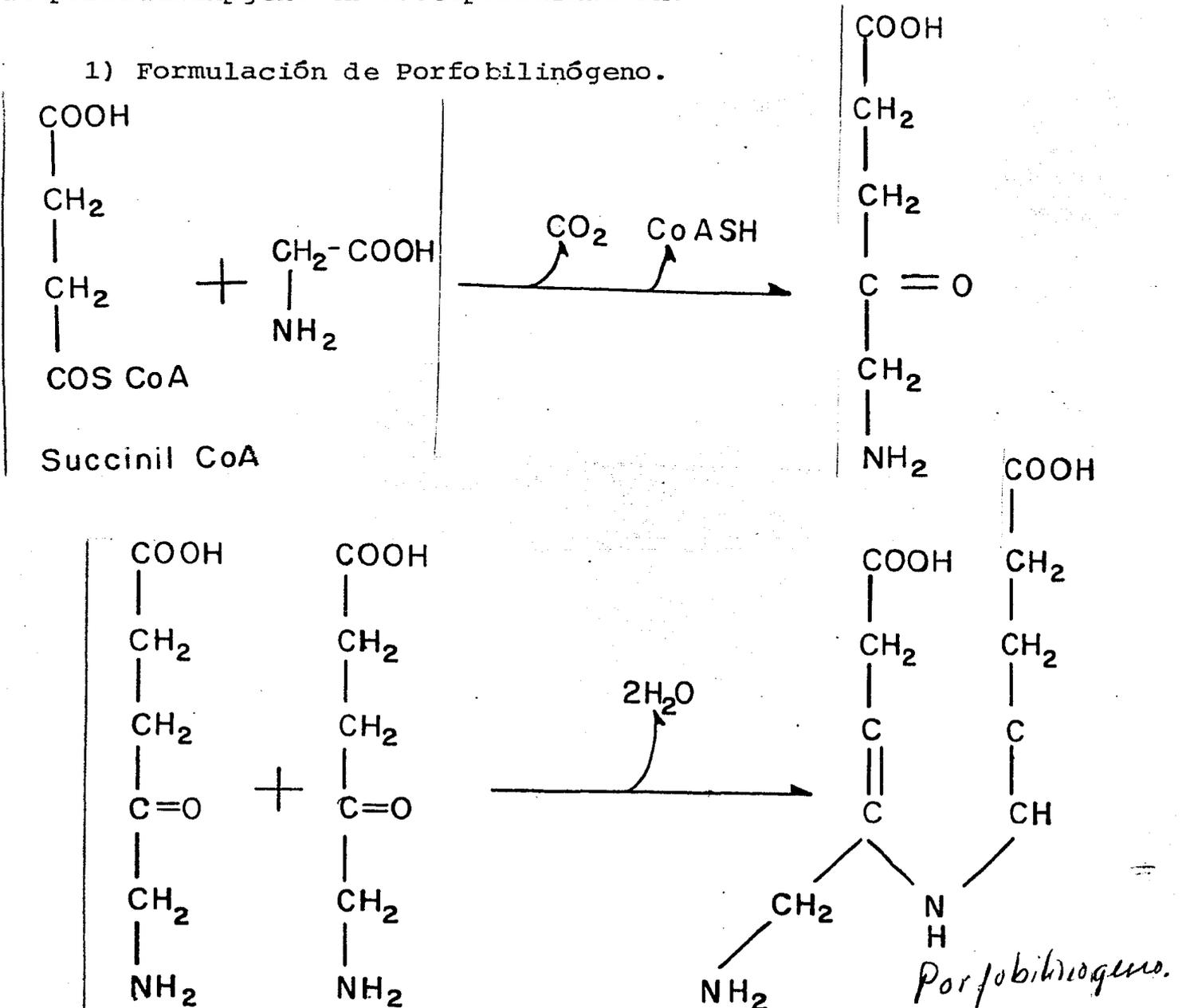
El PSII, se piensa que está localizado en o a través de la lamela de los grana, el cual no puede ser separado sin alterar su actividad fotoquímica. Las preparaciones más puras del PSII contienen una proporción de componentes del PSI.

Parece ser que este contiene citocromo b_{559} , plastoquinona y la mayor parte del manganeso del cloroplasto. La composición de pigmentos del fotosistema II varía de acuerdo con el organismo; el PSII de las plantas superiores y de algas tienen clorofila a_{682} , clorofila b y carotenoides.

Biosíntesis de Clorofilas.

Las vías de biosíntesis de hemo y clorofila son las mismas, tanto como la Protoporfirina IX. La vía común ha sido trabajada en animales pero la mayor parte de los pasos se ha demostrado en plantas. La vía para la protoporfirina IX puede ser dividida en dos estadios principales: a) La biosíntesis de porfobilinógeno, el precursor pirrólico y b) la conversión de porfobilinógeno en Protoporfirina IX.

1) Formulación de Porfobilinógeno.



En la reacción dado se forma porfobilinógeno precursor inmediato de porfirinas.

Esta reacción ha sido demostrada en espinaca, cebada etíola y frijol; este es activado in vitro por grupos SH (Sulf

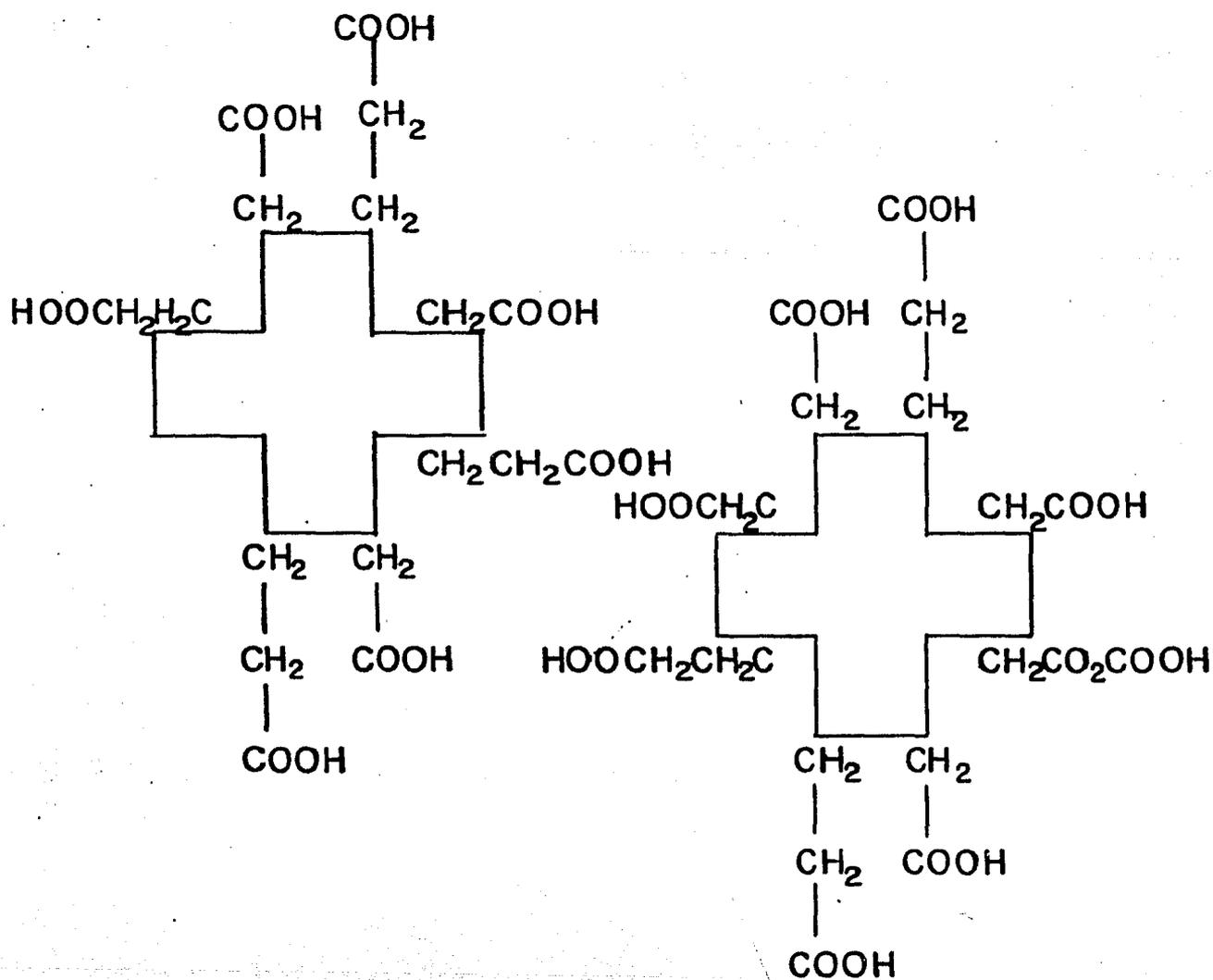
y este paso es inhibido por metales pesados.

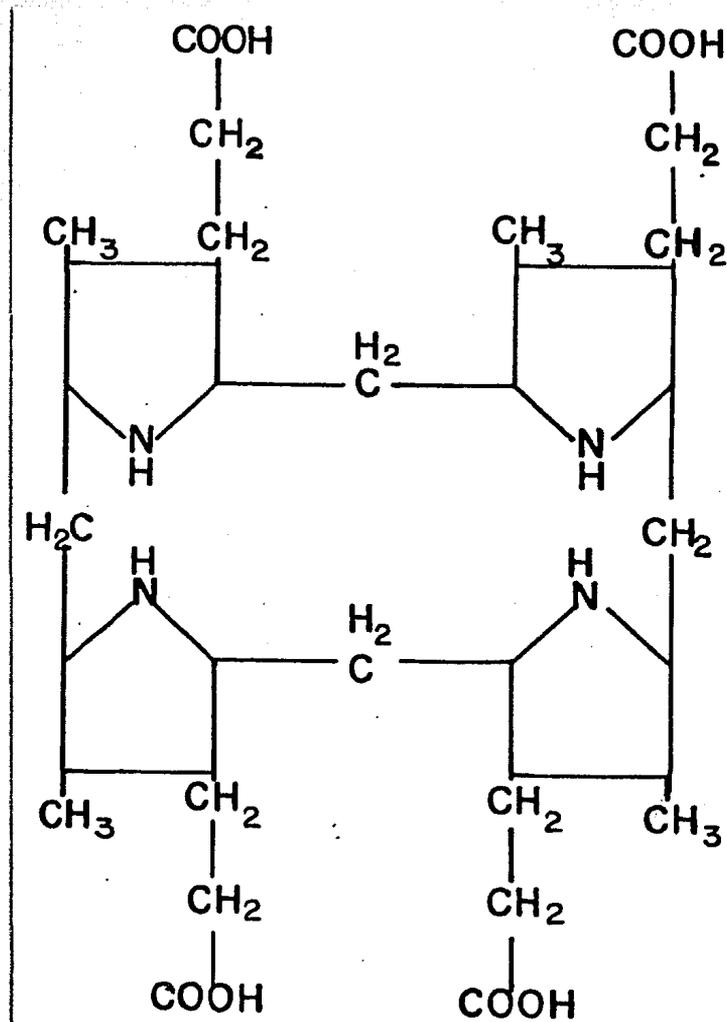
Formación de Protoporfirina IX.

La condensación lineal de cuatro moléculas de porfobilinógeno (PBG) seguido de una ciclación producirá un porfirinógeno con ocho grupos carboxilo (COOH), el cual con una oxidación de los enlaces $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=-$ se obtendrá uroporfirina VIII. Mientras que el isomero relacionado protoporfirina IX es uroporfirina III (IX).

Esto significa que en la formación de uroporfirina III la molécula de porfobilinógeno la cual se convierte en el anillo D durante la ciclación.

El mecanismo de formación del anillo porfirínico, no es completamente claro, pero es sabido que la ciclación existe a un nivel porfirinoico, y que dos enzimas están relacionadas, estas enzimas han sido aisladas en hoja de espinaca y de Chlorella.



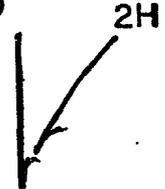
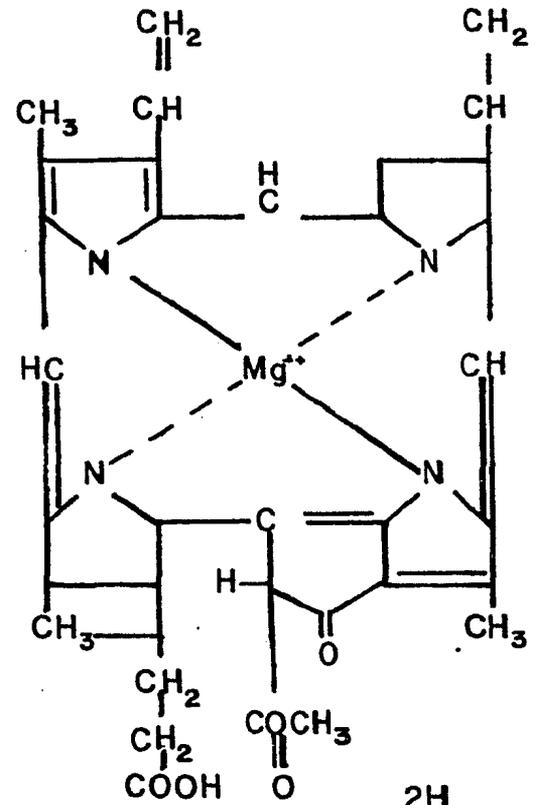
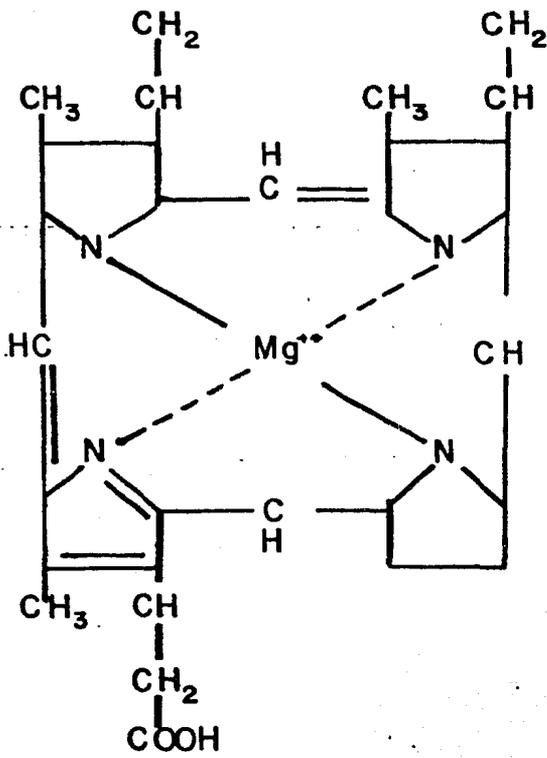


Mg-Protoporfirina-metilester

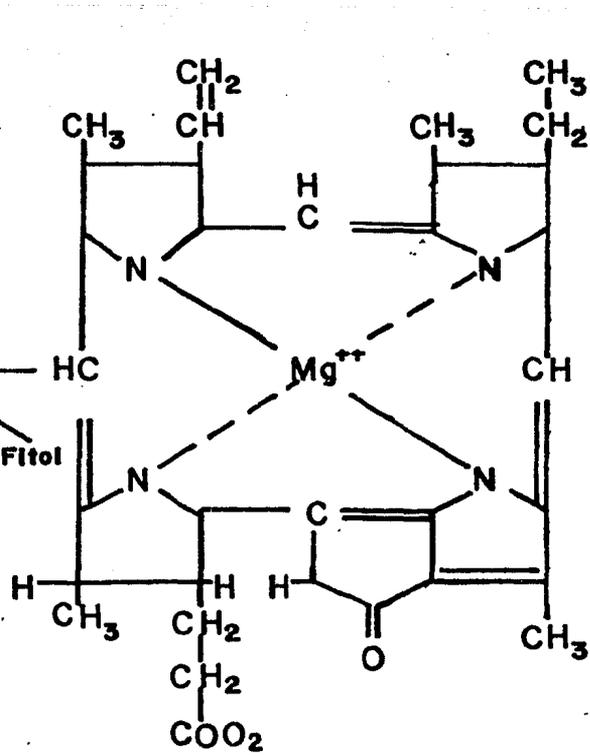
Mg 2,4-divinil-feoporfirina a₅

Mg-Protoporfirina IX

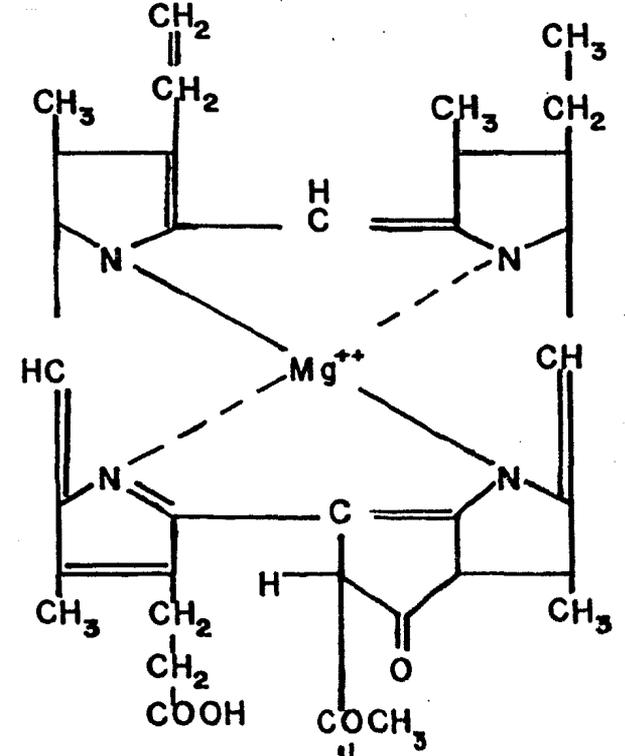
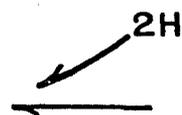
Sadenosil metionina



Clorofila a



Clorofilida a



Mg2-vinil-ficoporfirina (Protochlorofilida a)

Preparaciones en crudo de estas fuentes, convierten el p porfobilinógeno en uroporfirinógeno III (urógeno III).

La conversión de urógeno tres a coprógeno iii en el cual los residuos del ácido acético en c-1, 3, 5, y 8 son convertidos en residuos metálicos por la enzima urógeno descarboxilasa.

El coprógeno III es convertido en protógeno IX por la descarboxilación de los residuos de ácido propiónico sobre los anillos A y B en residuos vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}_2$). Este es el fin de la línea para porfirinógenos, ellos no pueden quitar iones metálicos, tal que el siguiente paso es la conversión del protógeno IX sin color en la protoporfirina IX (IV) color rosa; esto ocurre espontánea y fácilmente pero existe la evidencia de una conversión enzimática en las plantas.

La fig. . . . esquematiza los diferentes pasos que intervienen en la síntesis de la clorofila.

Cuando semillas etioladas son expuestas a la luz continuamente, la conversión de plástidos en cloroplastos es acompañada por la síntesis de enzimas relacionadas con labiosíntesis de clorofilas; la manera en la cual esto es regulado, es desconocido pero los compuestos o ambientes que inhiben la formación de cloroplastos, una regulación general de la formación de cloroplastos debe regular también la producción de clorofila.

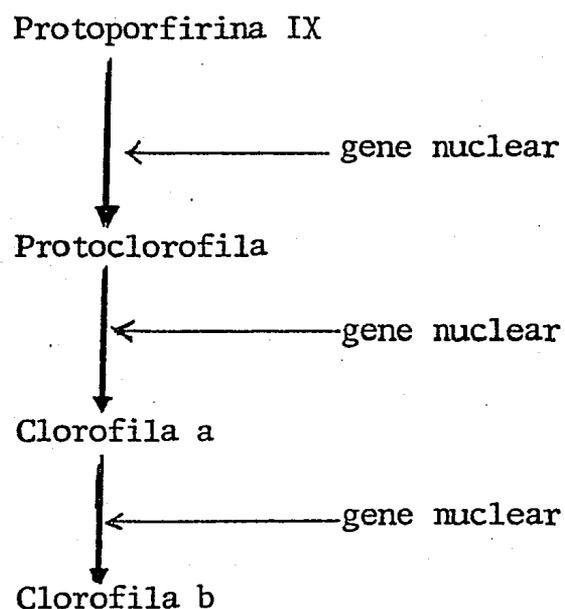
Se han realizado algunos trabajos (Goodwin, 1966) con el fin de dilucidar el papel que juega el cloroplasto, pero los conocimientos aún no son suficientes para establecer su intervención en la síntesis de la clorofila.

Se han realizado algunos trabajos (Goodwin, 1966) con el fin de dilucidar el papel que juega el DNA del cloroplasto, pero los conocimientos aún no son suficientes para establecer su intervención en la síntesis de la clorofila.

Mediante una serie de investigaciones con plantas mutantes (Soger, 1955), (Von Wetlstem, 1959), (Robbele, 1956) (Highkin, 1950) se llegó a la conclusión de que al menos tres de las reacciones de

la síntesis de clorofila son afectados por mutaciones en genes nucleares: un paso entre la conversión de proloporfirina y protoclorofila, en la conversión de protoclorofila a clorofila y algún paso involucrado en la síntesis de clorofila b pero no en la clorofila a (Kirk en Goodwin).

La figura siguiente esquematiza el control nuclear de la síntesis de clorofila.



Material y Método

La planta de frijol fue seleccionada debido a que reúne características que resultan ventajosas para estos estudios. Entre éstas se encuentran: tamaño de la hoja, ausencia de rugosidad excesiva, corto tiempo de germinación, rápido crecimiento y alta sensibilidad a la acción de metales pesados.

Las semillas de Phaseolus vulgaris se pusieron a germinar en cajas de Petri, teniendo como sustrato papel filtro, la humedad se les proporcionó con la solución nutritiva Hoagland (Canger, 1964). Para evitar el desarrollo de hongos, se pusieron en la obscuridad y se lavaron las semillas cada tercer día con agua corriente. Esto se realizó en uno de los laboratorios del Departamento de Percepción Remota, del Instituto de Geofísica.

Las plantas se mantuvieron en vasos de vidrio forrados con papel aluminio para evitar el desarrollo de algas, para evitar que la luz penetrara por la parte superior del vaso, se les acondicionó una tapa de unicel.

La capacidad de cada vaso fue de 300 ml. y en cada vaso se pusieron dos plantas.

Las plantas se mantuvieron en condiciones de luz, temperatura y humedad relativa del invernadero de la Facultad de Ciencias, de la UNAM.

Con el objeto de seleccionar concentraciones de dicromato de potasio capaces de inducir alteración en la planta, pero no clorosis evidente a muerte de la planta se probaron concentraciones de 1500 ppm, 500 ppm, 50 ppm y 25 ppm contaminando desde la etapa de germinación pero el resultado general fue la inhibición y muerte de la semilla.

Posteriormente se hicieron otras pruebas contaminando cuando la planta tenía un tamaño aproximado de 22 cm de altura con las concentraciones de 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 65 ppm, 80 ppm y 100 ppm.

Con base en esta última prueba, se decidió trabajar concentraciones de dicromato de potasio de 25 ppm, 20 ppm, 15 ppm, 10 ppm, 5 ppm, y 0 ppm (testigo).

2

La contaminación se llevó a cabo vía raíz a través de la solución nutritiva.

El tamaño de la muestra fue estimado con base estadística, siendo éste de 48 individuos. Conformándose con ellos 6 lotes, 5 experimentales y uno testigo o control. De las 48 plantas, 36 fueron muestreadas en cada una de cuatro fechas. Se decidió limitar el estudio a cuatro fechas y 6 concentraciones con base en el tiempo requerido para llevar a cabo una serie completa de mediciones. Puesto que las hojas son organismos vivos y empiezan a cambiar sus propiedades a partir del momento en que se cortan, es necesario realizar todas las mediciones pertinentes en un lapso no mayor de 5 hrs.

Las actividades realizadas en cada una de estas fechas fueron las siguientes:

Se cortaron 36 hojas (6 por cada lote) e inmediatamente fueron pesados en una balanza analítica, para una posterior cuantificación de pigmentos clorofílicos por extracción.

Antes de realizar esta extracción, se obtuvieron los espectros de reflectancia de cada una de las 36 hojas, en el intervalo de 400-800 nm., en un espectroradiómetro diseñado en el I.G.F. El procedimiento de medición se detalla más adelante.

Como esta actividad requería cierto tiempo, las hojas cortadas se mantuvieron sobre un algodón empapado (caja húmeda) en un buffer para cultivo de tejidos vegetales (). De esta manera se evitó la pérdida de turgencia de las hojas y sus espectros de reflectancia fueron obtenidos sin mayores problemas.

El espectro radiómetro, cuenta con una graficadora conectada a la salida, lo que permitió obtener gráficas de la señal del panel y de la muestra. De aquí se puede calcular la reflectancia de la muestra.

El resultado para cada fecha fue 36 curvas correspondientes a las hojas de frijol, más una curva del panel de referencia por cada cuatro curvas de muestras. La figura muestra los registros de la señal obtenida por un panel de referencia y una hoja del lote de ppm de contaminante en la fecha 3.

Medición de Espectros de Extractos.

Como el método anterior nos es destructivo, las mismas hojas se utilizaron para la extracción de pigmentos, cada hoja fue cortada en pequeñas porciones inmediatamente después de obtener su espectro de reflectancia e introducida en un frasco color ámbar con un volumen conocido de la mezcla acetona—agua al 80%. A esta suspensión se le agregó un poco de carbonato de magnesio para evitar la formación de feofitina, la cual enmascarará en la cuantificación a las clorofilas. La hoja fue macerada con una varilla de vidrio para llevar la extracción a cabo adecuadamente.

Una vez realizada la extracción se filtró cada uno de los extractos para eliminar las partículas en suspensión que aumentan la dispersión de la luz al obtener el espectro de absorción. Una vez que se obtuvieron las muestras filtradas, se hicieron diluciones debido a lo concentrado del extracto. Esto se hizo tomando en cuenta que la máxima concentración que podía medir el espectrofotómetro U.V.- visible (Perkin-Elmer, modelo 252). Se hizo de forma que las variaciones en absorción estuviesen comprendidas en el intervalo dinámico de la escala de sensibilidad seleccionada en el espectrofotómetro.

Ya que se obtuvo el extracto filtrado, y diluido se pusieron 2.5 ml. en una celda del espectrofotómetro, la otra celda correspondía al blanco de referencia (acetona-agua 80%). De esta manera se obtuvieron los espectros de absorbancia de 400-800 nm.

Medición de Espectros de las hojas

Para obtener los espectros de reflectancia de las hojas, la metodología que se siguió fue tal que se cumplieron las condiciones presentadas en la sección de radiometría.

La radiación monocromática y colimada se hizo incidir normal a la superficie del panel o de la hoja según la que se estuviera analizando. Con el fin de que los factores geométricos (ec. T) se eliminen es indispensable que el haz incidente esté totalmente contenido en el plano bajo análisis. Esto se observó para todas las mediciones.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- 1). Estabilización de la corriente oscura del fotomultiplicador.
El alto voltaje de alimentación al mismo se encendió entre 2 y 3 horas antes de empezar cada serie de mediciones.
- 2). Estabilización de la lámpara de tungsteno. Esta se encendió 15 minutos previo a las mediciones.
- 3). Colocar panel de referencia en el radiómetro.
- 4). Posicionar el radiómetro en $\lambda_{Max} = 540$ nm tomar lectura, apuntar escalas y graficar la señal.
- 5). Tomar lectura y graficar corriente oscura.
- 6). Regresar radiómetro a 400 nm.
- 7). Empezar barrido y graficación de la señal del fotomultiplicador.
- 8). Al llegar a 800 nm, regresar radiómetro a λ_{max} , tomar lectura y graficar.
- 9). Cambiar panel por muestra.
- 10). Repetir el proceso del paso 4) al 9).

El espectrofotómetro al igual que el espectroradiómetro tenía conectada a él una graficadora, de manera que también los espectros de absorbancia se pudieron obtener gráficamente.

Para la obtención de los espectros se hizo lo siguiente:

- a) Encendido del aparato (estabilización de las lámparas \approx 25 min).
- b) Realización de una corrección de fondo que era almacenada en la memoria de la microcomputadora (corrida de blanco-contra blanco).
- c) Establecimiento de la λ max 800 nm.
- d) Establecimiento o fijación de λ min. 400 nm.
- e) Establecimiento de la ordenada máxima (0-3).
- f) Inicio de barrido (de 800 a 400 nm) y graficación simultánea del espectro.

El último inciso fue el que se repitió con cada una de las muestras, los otros se realizaban cada vez que el aparato era encendido. La figura muestra un espectro de absorción para el extracto de 25 p.p.m. de la fecha T₁.

El análisis de cromo por fluorescencia de rayos x se llevó a cabo en la última fecha. Las muestras se secaron y pulverizaron para que pudieran ser irradiadas más eficientemente. Los espectros que se obtuvieron fueron cualitativos, y el tiempo de irradiación fue de 2000 segundos.

La siguiente figura muestra el espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos.

