

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

ESTUDIO MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE  
LOS PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS DE LA MICRO-ALGA *Chaetoceros sp*



PRESENTA:

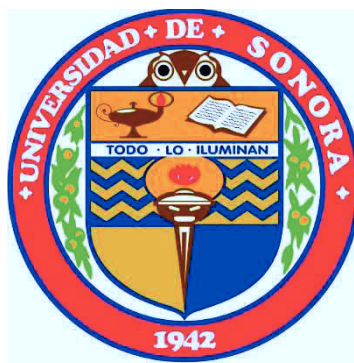
SERGIO GONZÁLEZ CERVANTES

Hermosillo, Sonora

Noviembre 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Sergio González Cervantes la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.

---

Dr. Raúl Pérez Salas

Director de Tesis

---

Dr. Marco Antonio López Torres

Sinodal Secretario

---

Dr. José Antonio López Elías

Sinodal

---

Dra. Clara Tinoco Ojanguren

Suplente

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a toda mi familia, en especial a mis padres, María Magdalena y Sergio, gracias por todo su apoyo, paciencia y todas las oportunidades que me han brindado, nunca podre agradecerles lo suficiente por todo lo que han hecho por mí, a mis hermanos, Juan Antonio y Yara Vanessa, que aunque de vez en cuando un tanto inquietos no me imagino como seria estar sin ellos y a mis abuelos por su cariño y lecciones de vida que me han dado. Gracias a todos y me disculpo por haber tardado tanto.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por ser mi casa de estudio de lo cual me siento orgulloso.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) por la formación profesional recibida, el apoyo y respaldo de profesores y trabajadores excelentes.

Al Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora (DIFUS), Laboratorio de Estado Sólido, por todos los apoyos brindados en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Raúl Pérez Salas, primeramente por aceptarme como tesista, por su apoyo, paciencia y disponibilidad para consultar dudas, por la confianza depositada en mí y por todo lo que he podido aprender de usted.

A mi comité de tesis al Dr. Marco Antonio López Torres, al Dr. José Antonio López Elías, y a la Dra. Clara Tinoco Ojanguren, gracias por aceptar formar parte de mi comité, por su ayuda, sugerencias, observaciones, recomendaciones y el apoyo recibido, esto no solo en la realización del trabajo de tesis este trabajo de tesis sino además durante mi estancia en la licenciatura, se los agradezco mucho.

A mi familia, por su apoyo y paciencia, y a mis amigos que me han seguido acompañado durante todo este tiempo.

## CONTENIDO

<b>FORMATO DE APROBACIÓN</b>	i
<b>DEDICATORIA</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>CONTENIDO</b>	iv
<b>LISTA DE TABLAS</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	xiii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	4
II.1. Interacciones entre la luz y la materia	4
II.1.2. Características de la luz	4
II.1.2.1. Ondas de luz	5
II.1.2.2. La energía de la luz	6
II.2.3 La absorción y emisión de luz	7
II.2. Fotosíntesis	8
II.2.1. Fases	9
II.2.1.1 Absorción de luz y transporte de energía por los sistemas de antenas	10
II.2.1.2 La transferencia de electrones primaria a los centros de reacción	11
II.2.1.3 Estabilización energética mediante procesos secundarios	12
II.2.1.4 Síntesis y transporte de productos estables	12

II.2.3.Organismos fotosintéticos	13
II.2.3.1 Algas	13
II.2.3.1.1 Chromophyta	14
II.2.4. Maquinaria fotosintética	14
II.2.4.1 Plantas terrestres	15
II.2.4.2 Algas	16
II.2.4.2.1 Maquinaria fotosintética en <i>Chaetoceros</i>	17
II.2.4.2.2 Pigmentos fotosintéticos de <i>Chaetoceros</i>	18
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	21
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	22
<b>V. OBJETIVO</b>	23
V.1. General	23
V.2. Específicos	23
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	24
VI.1. Obtención de Micro-algas	24
VI.2 Extracción de pigmentos	24
VI.3 Determinación de Espectros de Absorción y Emisión	24
VI.3.1. Espectro de absorción mediante el uso de un espectrofotómetro	24
VI.3.2. Espectros de Excitación y Emisión mediante el uso de un espectrofluorómetro	25
<b>VII. RESULTADOS</b>	27
VII.1. Espectro de Absorción	27

VII.1.1 Primera medición	27
VII.1.2 Segunda medición	31
VII.1.3 Tercera medición	34
VII.1.4 Cuarta medición	37
VII.1.5 Quinta medición	40
VII.2. Espectros de Excitación y Emisión	43
VII.2.1 Espectros a una longitud de onda de excitación fija y medición de los rangos de emisión	43
VII.2.2 Espectros con rangos de excitación y medición de emisión a una longitud de onda fija	48
VII.2.3 Espectros a una longitud de onda de excitación fija y medición de los rangos de emisión mediante pulsos de luz	51
VII.3 Picos de Absorción, Excitación y Emisión	53
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	56
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	62
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	63
<b>XI. LITERATURA CITADA</b>	64
<b>XII. ANEXOS</b>	68



## LISTA DE TABLAS

Tabla I	Grupos de organismos fotosintéticos	13
Tabla II	Máximos de absorción registrados en el espectrofotómetro.	53
Tabla III	Máximos de emisión registrados en el espectrofluorómetro de acuerdo a la longitud de onda de excitación.	55
Tabla IV	Máximos de emisión registrados en el espectrofluorómetro en un rango de excitación y una emisión a una longitud de onda fija	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	La luz es una onda electromagnética que consiste en campos magnéticos y eléctricos perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación (Taiz y Zeiger, 2002).	5
Figura 2	Espectro electromagnético en escala logarítmica (Nobel 2009)	6
Figura 3	Distribución de los fotones del sol incidentes en la superficie de la tierra con respecto a su longitud de onda en nanómetros (Nobel 2009).	9
Figura 4	Diagrama de las fases 1, que es la absorción de luz y transferencia de energía a los complejos antena, y la fase 2, que comprende la transferencia de electrones a los centros de reacción (Taiz y Zeiger, 2002).	11
Figura 5	Esquema de las fases luminosas y oscuras de la fotosíntesis (Fuente: <a href="http://leavingbio.net/photosynthesis.htm">http://leavingbio.net/photosynthesis.htm</a> ).	12
Figura 6	Representación de una célula madura del mesófilo (Nobel 2009).	15
Figura 7	Cloroplasto de <i>Heterosigma carterae</i> , cuyo plastidio de forma similar al de <i>Chaetoceros</i> se encuentra rodeado por una membrana doble del cloroplasto y dos membranas del retículo endoplasmático de cloroplasto (señalado con las flechas rojas). Los tilacoides se encuentran en grupos de 3, la barra representa una escala de 0.5 $\mu\text{m}$ (Larkum y Vesik 2003)	17
Figura 8	Vemos las características y diferencias estructurales entre distintos tipos de clorofilas (a, b, c <sub>1</sub> , 2, 3 y b) y su posible precursor (Cahoon y Timko 2003)	18
Figura 9	Comparación entre 3 de los principales pigmentos accesorios (Nobel 2009)	19
Figura 10	Absorción de acetona al 90% usada como blanco. No se observan picos de absorción	28

Figura 11	Espectro de absorción de la primera celda en la primera medición. Se observaron 4 picos de absorción: 529, 600, 200 y 659 nm.	28
Figura 12	Absorción en la primera medición de la segunda celda, se detectaron 7 picos de absorción: 366, 408, 433, 485, 527, 624 y 659 nm.	29
Figura 13	Absorción de la tercera celda durante la primera medición donde se detectaron 8 picos de absorción: 368, 406, 435, 486, 257, 602, 625 y 660 nm.	29
Figura 14	Espectro de absorción de la cuarta celda durante la primera serie de mediciones, se observaron 8 picos de absorción: 368, 408, 438, 486, 529, 605, 626 y 658 nm.	30
Figura 15	Espectro de absorción obtenido en la primera serie de mediciones perteneciente a la quinta celda, donde son 7 los picos de absorción que se detectaron y que se localizaban en: 368, 404, 436, 488, 526, 625 y 659 nm.	30
Figura 16	Absorción en la segunda medición de la primera celda, donde se detectaron 7 picos: 368, 406, 434, 487, 531, 599 y 662 nm.	31
Figura 17	Espectro de absorción de la segunda celda durante la segunda medición, donde se observaron 7 picos de absorción: 366, 408, 433, 488, 531, 600 y 659 nm.	32
Figura 18	Espectro de absorción durante la segunda medición de la tercera celda , con 6 picos de absorción detectados en: 365, 409, 487, 529, 599 y 663 nm	32
Figura 19	Absorción de la cuarta celda en la segunda medición, donde se detectaron 6 picos de absorción: 370, 406, 485, 529, 602 y 666 nm.	33
Figura 20	Absorción en la segunda serie de mediciones de la quinta celda donde se detectaron 8 picos de absorción en: 369, 405, 427, 444, 485, 526. 555 y 660 nm.	33
Figura 21	Espectro de absorción de la primera celda durante la tercera serie de mediciones, donde se detectaron 5 picos de absorción: 366,408, 487, 527 y 660 nm.	34

Figura 22	Absorción durante la tercera serie de la segunda celda, donde fueron 5 los picos detectados en: 363, 410, 488, 530 y 662 nm.	35
Figura 23	Absorción de la tercera celda durante la tercera medición donde se detectaron 5 picos de absorción: 369, 410, 488, 599 y 663 nm.	35
Figura 24	Absorción de la cuarta celda duran la tercera serie de mediciones donde fueron 5 los picos de absorción detectados: 369, 408, 487, 597 y 662 nm.	36
Figura 25	Espectro de la quinta celda durante la tercera medición donde fueron 7 los picos detectados y se encuentran en: 366, 407, 433, 491, 526, 599 y 660 nm	36
Figura 26	Absorción durante la cuarta medición de la primera celda, donde fueron 3 los picos detectados y que se encuentran en: 410, 487 y 663 nm.	37
Figura 27	Espectro de la segunda celda durante la cuarta medición donde se observaron tres picos, uno en 411, otro en 486 y el último en 661 nm.	38
Figura 28	Cuarta medición del espectro de absorción de la tercera celda, donde fueron 3 los picos detectados en: 407, 438 y 659 nm.	38
Figura 29	Absorción de la cuarta celda durante la cuarta medición donde se observaron 3 picos de absorción: 408, 434 y 658 nm	39
Figura 30	Absorción durante la cuarta medición de la quinta celda donde se detectaron 4 picos de absorción: 368, 408, 490 y 663 nm.	39
Figura 31	Espectro de absorción de la primera celda durante la quinta serie donde se detectaron 4 picos de absorción: 361, 411, 490 y 662 nm.	40
Figura 32	Espectro de absorción en la quinta medición de la segunda celda, donde fueron 3 los picos detectados: 407, 490 y 662 nm.	41
Figura 33	Absorción en la quinta serie de mediciones de la tercera celda donde se observaron 3 picos de absorción: 408, 439 y 659 nm.	41
Figura 34	Absorción de la cuarta celda durante la quinta medición donde se muestran los 3 picos observados: 409, 486 y 662 nm.	42
Figura 35	Absorción durante la quinta medición de la quinta celda donde fueron 3 los picos de absorción detectado en 407, 492 y 664 nm.	42

Figura 36	Espectro de emisión con una excitación a 370 nm, donde se observaron 3 picos en 432, 524,643 y 677 nm.	43
Figura 37	Espectro de emisión con una excitación a 400 nm donde se observaron 4 picos en: 525, 644,675 y 715 nm.	44
Figura 38	Espectro de emisión con una excitación a 407 nm donde fueron 4 los picos observados: 526, 641, 676 y 716 nm.	44
Figura 39	Espectro de emisión con una excitación a 434 nm con 4 picos de emisión detectados: 524, 639, 677 y 718 nm.	45
Figura 40	Espectro de emisión con una excitación a 468 nm donde fueron 4 los picos de emisión que se observaron en: 527, 641, 679 y 714 nm.	45
Figura 41	Espectro de emisión con una excitación a 491 nm donde se observaron 3 picos de emisión: 532, 676cy 718 nm.	46
Figura 42	Espectro de emisión con una excitación a 609 nm, donde se detectaron dos picos de emisión: 676 y 719 nm.	46
Figura 43	Espectro de emisión con una excitación a 629 nm en el cual fueron 2 los picos de emisión detectados: 676 y 718 nm.	47
Figura 44	Espectro de emisión con una excitación a 660 nm en donde se detectaron dos picos de emisión: 675 y 717 nm.	47
Figura 45	Espectro de excitación con una emisión fija en 432 nm. Donde fueron 4 los picos detectados: 276 307, 364 y 384 nm.	48
Figura 46	Espectro de excitación con una emisión fija en 524 nm. Las irregularidades presentadas por el espectro son debido al empleo de una menor abertura de la rendija de emisión comparada con una rendija de 5 nm, que se utilizó para las otras. Se detectaron 2 picos uno en 371 y 455nm	49
Figura 47	Espectro de excitación con una emisión fija en 643 nm. Con 6 picos detectados: 372, 420, 453, 516, 544 y 585 nm.	49
Figura 48	Espectro de excitación en 677 nanómetros como emisión fija. Donde se detectaron 5 picos: 404, 508, 537, 566 y 613 nm.	50
Figura 49	Espectro compuesto que muestra las partes de alta y baja energía	50

del espectro de excitación con emisión en 735 nm. La discontinuidad muestra la sustracción del reflejo de la luz de excitación cuya intensidad es muy elevada con respecto a la intensidad de emisión de la muestra analizada. Con 9 picos, 4 de ellos en la región de alta energía (246, 286, 310 y 333 nm) en la parte de alta energía y 5 en la región de baja energía (514, 514, 547, 609 y 672 nm)

Figura 50 Espectros de excitación mediante pulsos de luz con excitación a 350 nm y medición de 365-690 nm. Línea verde: tiempo de retraso 0, tiempo por pulso 50, conteo de 25 pulsos y un tiempo de integración de 100 ms. Línea amarilla: tiempo de retraso 0.01, tiempo por pulso 50, conteo de 25 pulsos y un tiempo de integración de 100 ms. Línea naranja: un tiempo de retraso 0.04, tiempo por pulso 50, conteo de 25 pulsos y un tiempo de integración de 100 ms.

## RESUMEN

Uno de los fenómenos más importantes para la vida en la tierra es la fotosíntesis, en el cual la energía luminosa es transformada en energía química, llevada a cabo tanto por plantas terrestres como por distintos grupos de algas. La parte inicial de la fotosíntesis consiste en la absorción de un fotón de luz por parte de los diferentes grupos de pigmentos fotosintéticos, la estructura molecular de los pigmentos es lo que determina la energía que puede ser absorbida en la fotosíntesis, estos pigmentos están presentes en organelos especializados llamados plastidios donde los más conocidos son los cloroplastos. Dadas las diferencias naturales en las que habitan generalmente las micro-algas, como es el caso de *Chaetoceros*., habrá una variación en los espectros de absorción, emisión y fotoluminiscencia respecto a otros grupos de organismos fotosintéticos, así como también respecto al tiempo de respuesta de la unidad absorbente. El principal objetivo es el de caracterizar la respuesta óptica de la absorción y fotoluminiscencia de los pigmentos de la micro-alga *Chaetoceros sp.*, utilizando la metodología desarrollada por Jeffrey y Humphrey (1975), modificada en el laboratorio para la obtención de los pigmentos, y el uso de un espectrofotómetro y un espectrofluorómetro para obtener los espectros de absorción y fotoluminiscencia. Como resultado de esta metodología se obtuvieron espectros de absorción y fotoluminiscencia, los cuales, a pesar de ligeras variaciones en la ubicación de los valores máximos reportados en otros trabajos (Jeffrey y Wright 1987; Schofield *et al.*, 1990; Nobel 2009) se concluye que los picos de absorción máximos muestran a las clorofilas *a* (433-444 nm y 622-626), *c<sub>1</sub>* y *c<sub>2</sub>* (443-444 nm, 597-605 y 622-626 nm) así como también de algunos carotenoides (363-370 y 536-531).

## I. INTRODUCCIÓN

La biología se define como la ciencia que estudia los fenómenos que acaecen a los seres vivos y/o que estuvieron vivos. Sin embargo la cantidad y complejidad de estos fenómenos es tan grande que la biología se ve en la necesidad de tomar prestadas herramientas y métodos de otras ciencias, como lo son las matemáticas, la química, la geología y la física entre otras.

Entre todo ese gran número de fenómenos que pueden ser estudiados hay uno que sobresale, por su complejidad, por la forma en la que ha y sigue influyendo en la historia evolutiva de la vida en la tierra y/o la importancia que tiene para los seres vivos en general; esta es la fotosíntesis (Blankenship 2011).

Todas las formas de vida conocidas en la tierra necesitan una fuente constante de energía para subsistir y multiplicarse (Hohmann-Marriott y Blankenship 2011), los seres vivos pueden obtenerla mediante la degradación de compuestos orgánicos o inorgánicos (como el caso de las bacterias del azufre), energía lumínica o una mezcla de las anteriores.

A pesar de esto, es la energía lumínica la que mantiene y está presente casi en su totalidad en la biósfera (Hohmann-Marriott y Blankenship 2011). La luz emitida por el sol representa una fuente inagotable de energía para aquellos organismos que sean capaces de explotarla. A estos se les conoce como organismos autótrofos y al proceso que utilizan para explotar esta fuente de energía se le llama fotosíntesis. Entre los organismos fotosintéticos se encuentra una gran cantidad de especies de plantas, micro-algas y cianobacterias (Douglas *et al.*, 2003).

Es la fotosíntesis la que permite la subsistencia y proliferación de la vida, ya que los organismos fotosintéticos representan el punto de partida de las redes tróficas y es por esto que la fotosíntesis representa también uno de los fenómenos más importantes en la historia evolutiva de este planeta.

Se calcula que hace 4 Ga (Giga-años, donde Giga =  $1 \cdot 10^9$ ) la cantidad de oxígeno atmosférico era equivalente al 0.1% del actual, y desde la aparición de la fotosíntesis aproximadamente hace 3.7 Ga marco el inicio de cambios en las condiciones atmosféricas y a su vez en las condiciones en la que los seres vivos subsistían.

La evidencia parece indicar que la fotosíntesis dio lugar a lo que se conoce como el gran evento oxidativo hace 2.4 Ga (Holland 2006). En este evento los niveles de oxígeno



atmosférico se elevaron de ese 0.1% inicial hasta un 5-8% de los niveles actuales, este aumento desencadenó básicamente un cambio en el balance de las reacciones oxido-reductoras en el planeta, ocasionando una nueva presión de selección a la cual tuvieron que enfrentarse las especies de organismos (Sessions *et al.*, 2009).

En el caso de los seres vivos el aumento del oxígeno resulto en arma de doble filo, ya que confino a algunos organismo a vivir en condiciones anaeróbicas, mientras que aquellos organismos que pudieron adaptarse y aprovechar nuevas condiciones tuvieron acceso a medios más eficientes de obtener energía (Canfield *et al.*, 2006). Este escenario ha llevado a algunos autores a pensar que la aparición de la multi-celularidad está ligada a este aumento en el oxígeno, y todos estos cambios han sido ocasionados de forma directa o indirecta por la fotosíntesis (Sessions *et al.*, 2009).

La fotosíntesis se divide en 2 fases: La fase luminosa, en esta la energía luminosa es absorbida por distintos pigmentos, los cuales la transfieren a centros de reacción y en estos la energía es utilizada para el transporte de electrones transformándose la energía luminosa a energía química, y la fase oscura, donde la energía química obtenida es utilizada en la formación de azúcares simples como la glucosa, el almidón o la sacarosa.

Aunque se asocia por lo general a la fotosíntesis con las plantas, existen organismos fuera de este reino que son capaces de realizar fotosíntesis, tenemos el caso de algunos protistas como bacterias, micro-algas y otros organismos como las algas que también son capaces de llevar a cabo este proceso (Hohmann-Marriott y Blankenship 2011).

Se puede describir la fotosíntesis de la siguiente manera: Energía Luminosa + Dióxido de Carbono + Agua = Azúcar + Oxígeno. Sin embargo esto no haría justicia a la complejidad bioquímica y biofísica que descansa en el centro de este proceso. Es por eso que para poder estudiar la fotosíntesis, la biología debe conocer las bases químicas y sobre todo las físicas sobre las cuales se da este fenómeno (Nobel 2009).

Dentro de los procesos más importantes en el estudio de la fotosíntesis, están aquellos donde se describen las interacciones entre la luz y la materia. Donde los fotones interactúan con los átomos pudiendo ocasionar distintos fenómenos como la absorción de fotones, el paso de un átomo o molécula de un nivel energético basal a uno excitado y/o el desprendimiento de algún electrón del átomo; entre otros.

Existe una gran cantidad de estudios sobre la estructura y funcionamiento de la maquinaria fotosintética en plantas terrestres principalmente en cambio en el caso de las algas marinas, debido al rol indirecto que han tenido hasta el momento en el interés económico, han recibido poca atención (Douglas *et al.*, 2003). Comparando con sus contrapartes fotosintéticas terrestres los distintos tipos de algas marinas presentan una gran diversidad de mecanismos, ensamblajes y tipos de pigmentos fotosintéticos. Además de esto las algas representan una fuente importante para la obtención de distintos productos naturales (Borowitzka 1999).

En este trabajo se propone el estudio de los pigmentos fotosintéticos en la micro-alga del género *Chaetoceros* perteneciente al grupo de las diatomeas, el cual representa a una gran parte del fitoplancton tanto en agua dulce como marina, mediante técnicas de espectrofotometría que nos den información sobre el comportamiento electrónico de los pigmentos que intervienen en su procesos de fotosíntesis.

## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1. Interacciones entre la Luz y la Materia**

La palabra luz se usa frecuentemente para describir a un amplio rango de radiación electromagnética, que se refiere a ondas que tienen componentes de campo eléctrico y magnético.

La fuente de luz más cercana a la tierra es el sol. Es la energía luminosa del sol la que sostiene la biósfera de la tierra (Jones y Fyfe 2001; Hohmann-Marriott y Blankenship 2011) y actúa como un activador de múltiples actividades de las plantas y los animales, como ejemplos de estos fenómenos tenemos la visión, la foto-taxia, fototropismo, heliotropismo (Nobel 2009).

#### **II.1.2. Características de la luz**

Uno de los triunfos en la física a principios del siglo XX fue el descubrimiento de que la luz presenta propiedades tanto de partícula como de onda. Esto permite que la luz se pueda representar como una onda electromagnética a la que le corresponden oscilaciones locales en campos magnéticos y eléctricos (figura 1) (Taiz y Zeiger 2002), o como una partícula cuando esta es absorbida o emitida por los átomos de un sistema, la cual recibe el nombre de fotón (Bueche y Hecht 2006).

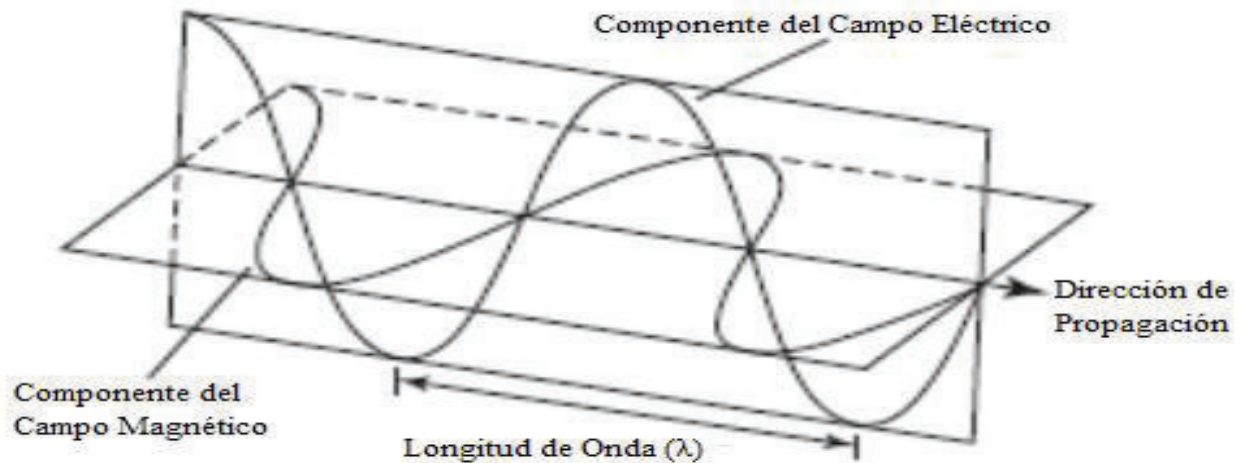


Figura 1. La luz es una onda electromagnética que consiste en campos magnéticos y eléctricos perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación (Taiz y Zeiger, 2002).

### II.1.2.1. Ondas de luz

La luz puede desplazarse en medios sólidos, líquidos, gases e incluso en el vacío. Una de las formas en las que puede ser caracterizada es por su longitud de onda, esto es la distancia entre dos puntos sucesivos de la misma fase, como el espacio entre dos picos de una onda. La unidad preferida para referirse a la longitud de onda en biología son los nanómetros (1 Nanómetro= 1 nm =  $1 \cdot 10^{-9}$  metros) y es representada con la letra griega lambda ( $\lambda$ ) (Nobel 2009).

Para la biología hay regiones electromagnéticas de interés, entre ellas destacan la luz ultravioleta, el espectro visible y el infrarrojo (figura 2). La primera, ultravioleta o simplemente luz UV, es la denominación que recibe la luz cuya longitud de onda es inferior a los 400 nm y puede ser causante de muchos fenómenos biológicos entre estos las mutaciones. Esta radiación no es percibida por el ojo humano pero si es visible por algunos organismos como los insectos. El espectro visible comprende la radiación que va de los 400 a aproximadamente 740 nm. Como lo indica el nombre esta región es la que los seres humanos y otros animales pueden percibir. Esta parte del espectro electromagnético puede ser subdividida en bandas, o colores como el azul, verde y rojo. Sin embargo estas subdivisiones

están basadas en apreciaciones subjetivas realizadas por los humanos. Por último la región del infrarrojo (IR) son radiaciones con longitudes de onda que se extienden más allá de los 740 nm hasta los 300 micrómetros ( $1 \cdot 10^{-6}$ ).

Otra forma de caracterizar la luz es por su frecuencia de oscilación, que se identifica con la letra griega “nu” ( $\nu$ ) y se define como el número de ciclos que se observan en un tiempo dado, y por la magnitud de su velocidad de propagación (como la velocidad de la luz) (Taiz y Zeiger 2002).

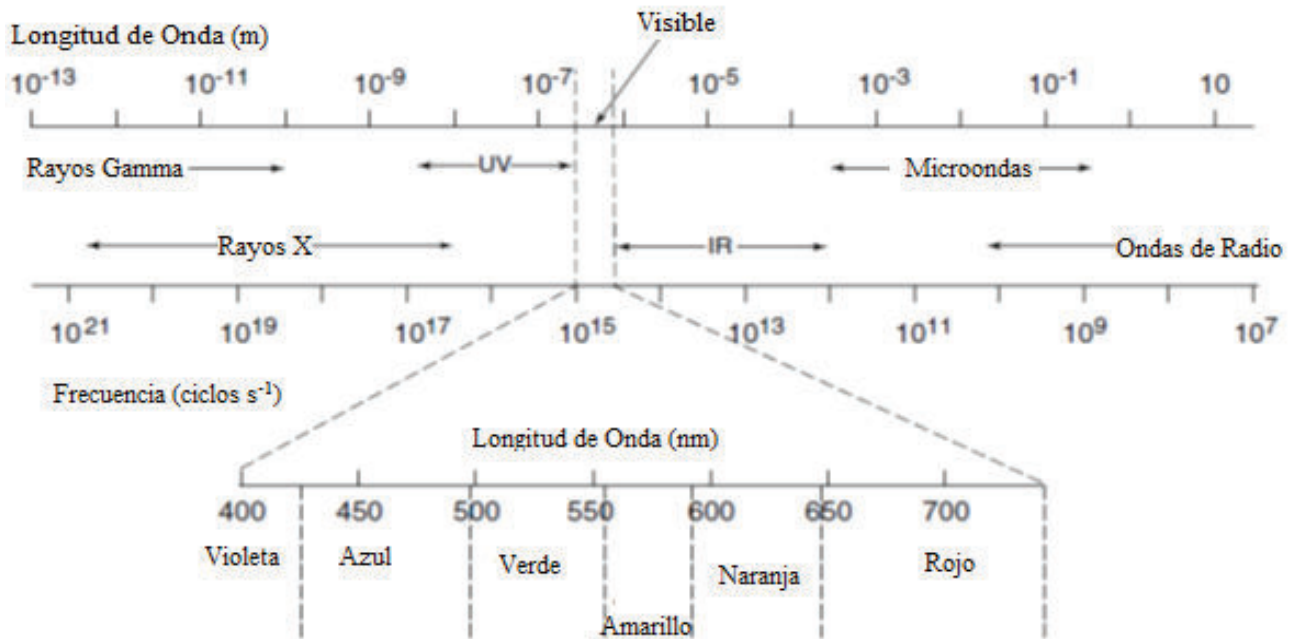


Figura 2. Espectro electromagnético en escala logarítmica (Nobel 2009).

### II.1.2.2. La energía de la luz

La energía de un fotón ( $E_\lambda$ ) es:

$$E_\lambda = h\nu = \frac{hc}{\lambda_{vac}}$$

En esta fórmula “ $h$ ” representa la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34}$  J-s) y  $\nu$ , la frecuencia. La ecuación muestra que la energía de un fotón es directamente proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a su longitud de onda en el vacío (Taiz y Zeiger 2002).

### II.2.3 La absorción y emisión de luz

Cuando un átomo o molécula absorbe radiación estas pasan a un estado de mayor energía con respecto a su estado original, sin embargo no cualquier frecuencia de luz es absorbida. Para que la absorción de luz pueda llevarse a cabo es necesario que la energía del fotón deba ser igual a la diferencia de energía entre los niveles de un átomo o molécula y su estados base, que son los de menor energía (Halliday *et al.*, 2005).

Es necesario aclarar que únicamente la luz que haya sido absorbida puede producir cambios químicos, esto se encuentra descrito en la ley de la fotoquímica de Grotthus-Draper, sin importar si esta energía es usada como activador en otras reacciones o convertida en otro tipo de energía. La ley de Stark-Einstein especifica que cada fotón absorbido activa únicamente a una molécula. Posteriormente Einstein postuló que al absorberse un fotón, un solo electrón es el que recibe la energía del fotón, lo que ocasiona el paso de este electrón a un estado de mayor energía (Nobel 2009).

Cuando la luz es absorbida, su campo electromagnético influye sobre el electrón, debido a que estos son partículas cargadas. El campo oscilatorio de la luz representa una fuerza que actúa de forma periódica sobre los electrones, esta fuerza es la que ocasiona o induce a que los electrones se muevan, transfiriendo la energía al átomo o molécula. Cuando esta energía es adquirida del fotón, se dice que el “quantum” de energía ha sido absorbido o capturado. Las características intrínsecas de cada molécula (como son la cantidad de electrones y la composición del núcleo) son las que determinan la magnitud de la energía requerida para la transición electrónica de un nivel a otro, esto permite explicar por qué cada tipo de molécula tiene su propio y único espectro de absorción (Nobel 2009). La posibilidad de que la luz sea absorbida dependerá de dos factores fundamentales, la longitud de onda y la orientación

relativa de su campo electromagnético con respecto a las oscilaciones de los electrones de la molécula.

## II.2. Fotosíntesis

La existencia y la supervivencia de la vida en la tierra dependen de la energía emitida por el sol. La fotosíntesis representa el único proceso biológico capaz de captar esta energía (Liu *et al.*, 2006; Nobel 2009) para transformarla a energía bioquímica (Blankenship 2008).

Es muy probable que la fotosíntesis represente el mejor ejemplo de un campo de estudio científico esencialmente interdisciplinario. Esto debido a que es un proceso tan complejo que es necesario el conocimiento de muchas y diferentes áreas científicas como la termodinámica, cinemática, electroquímica, fotoquímica, espectroscopía, etc., que permita tener una imagen completa de su importancia y alcance.

No solo la importancia sino también la escala en la cual afecta y ha afectado el medio ambiente resultan sorprendentes. Esto se vuelve obvio si se observa el espectro característico de nuestro planeta en el cual se ven representados los pigmentos que se encargan de absorber la luz (Kiang *et al.*, 2007) además aproximadamente  $1.06 \cdot 10^{14}$  kg de carbono son fijados anualmente mediante la fotosíntesis. Algunos autores nombran esto como la productividad primaria neta, pudiendo considerar así a la fotosíntesis como el proceso de síntesis de mayor escala en la tierra (Nobel 2009).

La palabra fotosíntesis en su sentido literal significa: sintetizar usando luz (Taiz y Zeiger 2002). Aunque resulta más detallada la siguiente definición: “la fotosíntesis es el proceso por el cual la energía luminosa es capturada y almacenada por un organismo para después llevar a cabo distintos procesos celulares” (Blankenship 2008). Esta definición es bastante amplia e incluye tanto a la fotosíntesis basada en clorofila como la llevada a cabo por bacterias mediante el uso de cierto tipo de rodopsinas.

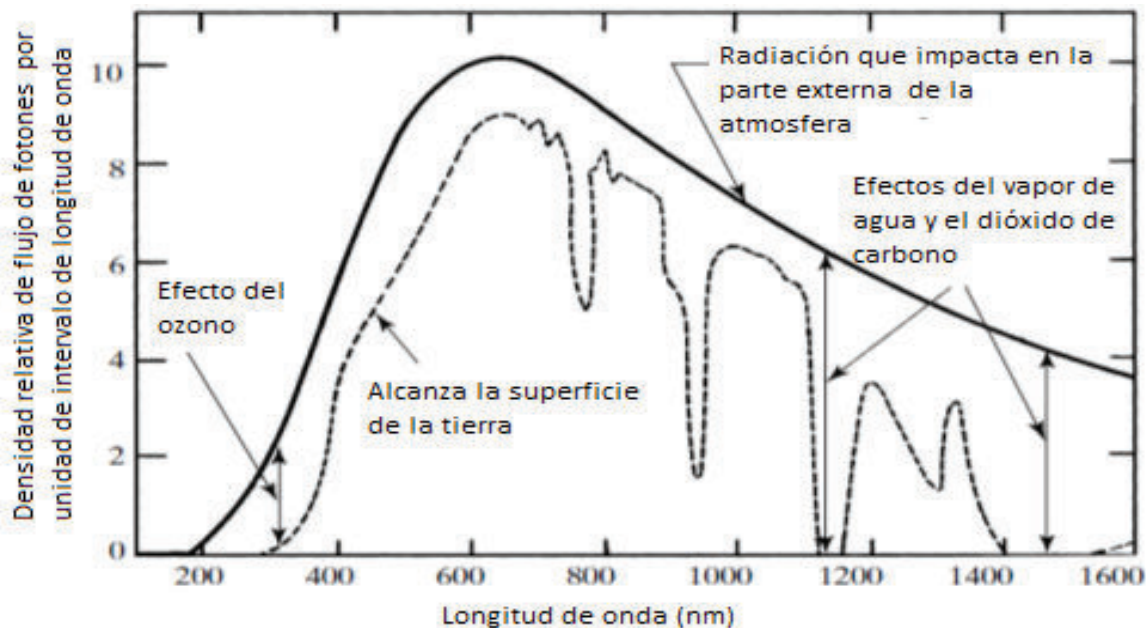


Figura 3. Densidad de flujo de radiación del sol incidentes en la superficie de la tierra con respecto a su longitud de onda (Nobel 2009).

### II.2.1. Fases

A pesar de que la fotosíntesis está compuesta por una gran cantidad de reacciones, cada una de ellas con una alta eficiencia, esta suele dividirse tradicionalmente en dos fases: la luminosa y la oscura. Haciendo con esto una separación entre las reacciones directamente dependientes de la luz y las que son independientes de la luz.

Sin embargo, algunos autores encuentran que esta división no es del todo correcta debido a que en la fase oscura, aunque no hay una dependencia directa de la luz, muchas de las enzimas participantes son reguladas por compuestos producidos durante la fase luminosa (Blankenship 2008). Es por eso que algunos autores suelen dividirla en 3 fases (Nobel 2009) o hasta 4 (Blankenship 2008). Para fines del presente trabajo usaremos esta última. Las fases que se distinguen son las siguientes:

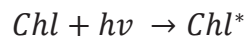
- 1) Absorción de luz y transporte de energía por los sistemas de antenas
- 2) La transferencia de electrones primaria a los centros de reacción



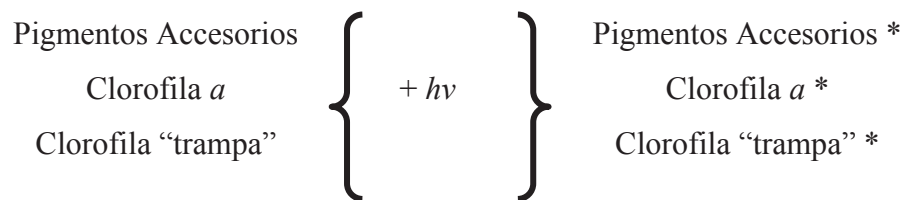
- 3) Estabilización energética mediante procesos secundarios
- 4) Síntesis y transporte de productos estables

### II.2.1.1 Absorción de luz y transporte de energía por los sistemas de antenas

Esta primera fase corresponde al fenómeno de absorción de energía, el cual se da debido a la presencia de distintos grupos de pigmentos, el más conocido de ellos es la clorofila. Estos pigmentos pasan de un estado base a un estado excitado. Para este proceso podemos usar la siguiente ecuación para representar la reacción:



Donde “*Chl*” es la molécula de clorofila en su estado base, “*hv*” representa la energía del fotón y “*Chl\**” representa a la molécula de clorofila en su estado excitado. Es importante aclarar que aunque en este ejemplo se usa la clorofila, el proceso es casi el mismo para los otros pigmentos fotosintéticos, pudiendo resumirlo de la siguiente forma (Nobel 2009):



La clorofila “*a*” posee dos bandas principales en su espectro de absorción una azul, con un pico máximo a 430 nm, y una roja, cuyo pico máximo de absorción esta en los 662 nm para la mayoría de las plantas terrestres. Sin embargo la primera banda, conocida también como la banda de “Soret”, ocasiona que la clorofila se encuentre en un estado muy inestable lo cual hace que libere rápidamente energía en forma de transiciones sin radiación, principalmente calor, y hace que alcance un estado excitado de baja energía. En este último estado la clorofila tiene cuatro diferentes rutas para utilizar la energía disponible que absorbió:

- 1) La clorofila regresa a su estado base, convirtiendo la energía en calor (transiciones sin radiación)

- 2) Puede presentarse el proceso de fluorescencia, en el cual la clorofila excitada libera la energía emitiendo un fotón con una menor longitud de onda que la del fotón que se absorbió.
- 3) La clorofila puede transferir la energía a otra molécula
- 4) La energía puede participar en la fotoquímica

Sin embargo es necesario aclarar que no todos los pigmentos llevan a cabo fotoquímica, la mayoría de ellos se comportan como antenas recolectoras de luz dentro un complejo que es la membrana tilacoidal, posteriormente llevan la energía recolectada a los centros de reacción (3) donde se lleva a cabo la mayoría de la fotoquímica (4) (Taiz y Zeiger, 2002).

### II.2.1.2 La transferencia de electrones primaria a los centros de reacción

Esta fase se lleva a cabo en los centros de reacción y consiste en la transformación de la energía proveniente de los estados excitados a energía química mediante reacciones de óxido-reducción.

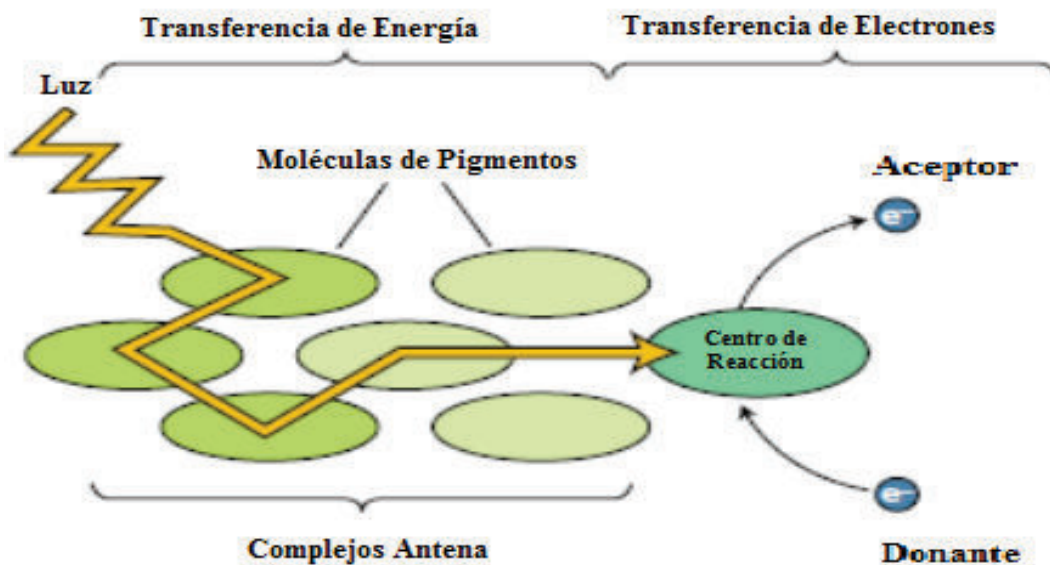


Figura 4. Diagrama que muestra las fases 1 y 2, correspondientes que es la absorción de luz y transferencia de energía a los complejos antena, y la transferencia de electrones a los centros de reacción, respectivamente (Taiz y Zeiger, 2002).

### II.2.1.3 Estabilización energética mediante procesos secundarios

Después de la primera transferencia, hay una separación rápida con respecto a las cargas o especies que participan. En el caso de las plantas fotosintéticas este paso es en el que se llevan a cabo las reacciones de la evolución del oxígeno, mediante los fotosistemas 1 y 2, llegando en última instancia a la formación del compuesto trifosfato de adenosina (también conocido como ATP por sus siglas en inglés).

### II.2.1.4 Síntesis y transporte de productos estables

Mediante el uso de la energía química obtenida en los pasos anteriores se forman azúcares simples mediante la reducción del dióxido de carbono.

En la división tradicional del proceso de fotosíntesis, las primeras 3 fases descritas anteriormente, pertenecerían a las reacciones luminosas y la última que es la síntesis y transporte de productos estables correspondería a la fase oscura, aunque realmente la única estrictamente dependiente de la luz es la primera (Blankenship 2008).

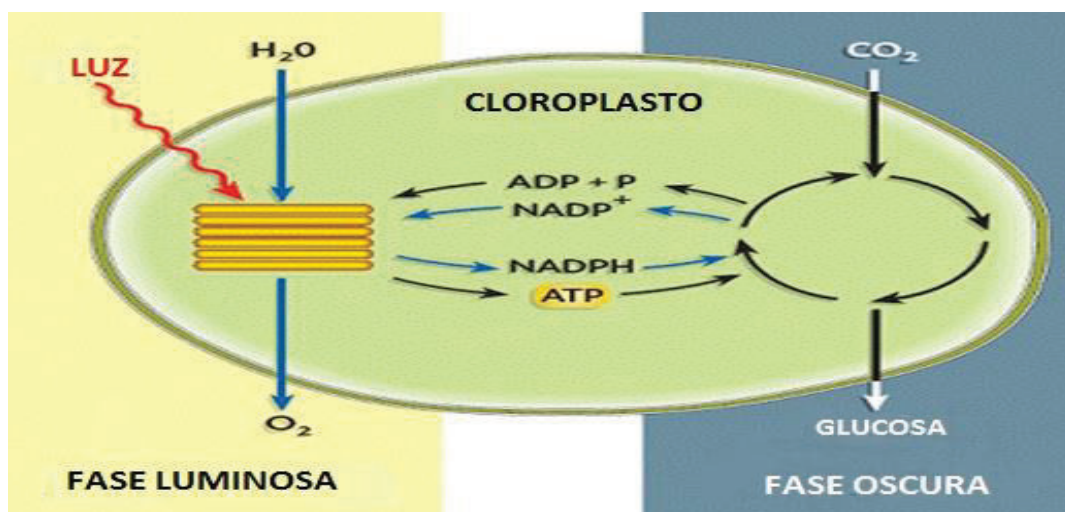


Figura 5. Esquema de las fases luminosas y oscuras de la fotosíntesis (Fuente: <http://leavingbio.net/photosynthesis.htm>).

### II.2.3. Organismos fotosintéticos

Entre los grupos representativos de organismos fotosintéticos (tabla I) tenemos a los miembros del reino Plantae, que incluyen a los grupos de las briofitas (musgos), las plantas vasculares sin semillas (como ejemplo los helechos), las gimnospermas (plantas vasculares con semillas desnudas) y las angiospermas (plantas vasculares con flores y semillas contenidas en frutos), pero es necesario aclarar que no todas las plantas son capaces de realizar la fotosíntesis y existen otros tipos de organismos capaces de realizarla.

Tabla I. Grupos de organismos fotosintéticos

<b>Procariotas</b>	<b>Eucariotas</b>
Bacterias purpuras	Algas
Bacterias verdes del azufre	Plantas
Bacterias verdes (no sulfurosas)	
Helio bacterias	
Cianobacterias	

#### II.2.3.1 Algas

De entre los muchos organismos que existen en la biósfera del planeta, uno de los grupos que se destacan por su importancia en los ecosistemas acuáticos como productores primarios son las algas. Se calcula que cerca del 45% de la fotosíntesis en la tierra se lleva a cabo en ambientes acuáticos (Falkowski 1994).

Este grupo está conformado por una gran cantidad y variedad de organismos eucariotas, pudiendo ser organismos microscópicos unicelulares u organismos macroscópicos

pluricelulares, donde gran parte de ellos cuenta con pigmentos y llevan a cabo algún tipo de fotosíntesis (Blankenship 2008).

Dentro de las múltiples clasificaciones existentes de las algas, la división clásica las separa en tres grupos principales, las algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y algas pardas (Chromophyta)

Donde nos centraremos en este último grupo que incluye una gran variedad de algas.

### **II.2.3.1.1 Chromophyta**

La clasificación y origen del grupo de las Chromophytas es complicada, esto no solo por ser un grupo polifilético sino además por el origen de sus plastidios (Douglas *et al.*, 2003) y variaciones morfológicas entre otros.

El grupo de las Chromophytas se encuentra a su vez compuesto por las divisiones de Heterokontophyta, Haptophyta, Criptomonas y Dinoflagelados

Dentro del grupo de las Heterokontophyta, aunque es muy amplio, cuenta con subgrupos bien definidos entre los que destacan el de las Phaeophytas y el de las Bacillariophytas (Diatomeas)

El grupo de las diatomeas está compuesto generalmente de organismos unicelulares, aunque algunos llegan a presentar agrupaciones coloniales y la mayoría poseen un exoesqueleto a base de sílice (Douglas *et al.*, 2003). Estos organismos representan una gran parte del fitoplancton tanto en ambientes marinos como en agua dulce, y es dentro de esta clase donde se encuentra localizado el género *Chaetoceros*.

### **II.2.4. Maquinaria fotosintética**

A pesar de la gran diversidad de seres vivos fotosintéticos, existe una homogeneidad en la forma y mecanismos de cómo ésta se lleva a cabo. La mayoría poseen una maquinaria celular especializada para llevar a cabo estas reacciones.

Los cloroplastos son los organelos más representativos (Blankenship 2008), sin embargo no son los únicos, también existen complejos en bacterias que se encargan de llevar a cabo la absorción de luz (Liu *et al.*, 2006). Estos pertenecen a una familia de organelos llamados plastidios y es donde se encuentran la mayoría de los pigmentos absorbentes de luz, así como también las enzimas y otras moléculas que participan en la fotosíntesis.

#### II.2.4.1 Plantas terrestres

Es en las hojas, en el caso de la mayoría de las plantas terrestres, donde se lleva a cabo la mayoría de la fotosíntesis, hay aproximadamente medio millón de cloroplastos por milímetro cuadrado en la superficie de una hoja (Campbell *et al.*, 2005). Los cloroplastos suelen encontrarse principalmente en el tejido interno de la hoja conocido como mesófilo, generalmente hay cerca de 30 o 40 cloroplastos en cada célula de mesófilo (Campbell *et al.* 2005). Hay variaciones intra-específicas en el número de cloroplastos, aunque esto no necesariamente afectara la eficiencia general de la fotosíntesis (Li *et al.*, 2013)

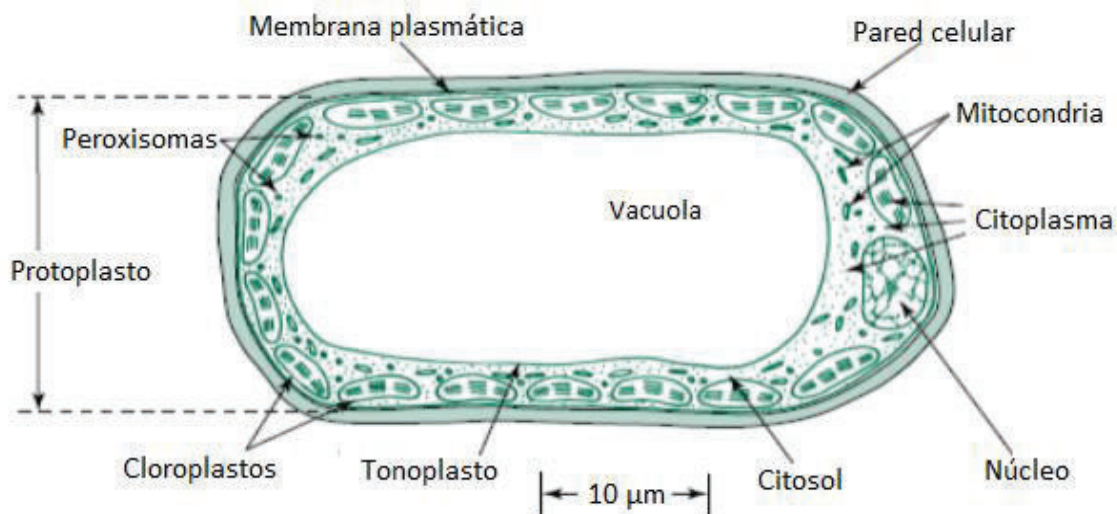


Figura 6. Representación de una célula madura del mesófilo (Nobel 2009).

Los cloroplastos varían en su tamaño de unas 2-4 por 4-7 micrómetros (Campbell *et al.*, 2005). Los cloroplastos poseen un espacio interno acuoso conocido como “estroma”, además de un sistema membranoso interconectado con forma aplanada el cual forma una especie de sacos, a este sistema de “sacos” se les conoce como tilacoides. Los tilacoides a su vez dividen al estroma de otro compartimiento conocido como el espacio tilacoidal (lumen). A los grupos de tilacoides apilados unos sobre otros en columnas, que forman estructuras parecidas a monedas o fichas de póker, se les conoce como granas.

Es en los cloroplastos en donde se lleva a cabo la fotosíntesis, sin embargo no todas las fases se realizan en el mismo lugar. Las primeras 3 fases (o fase luminosa) suceden en la membrana y el espacio interno tilacoidal, en cambio la última fase (la fase oscura) se realiza en el estroma de los cloroplastos.

#### **II.2.4.2 Algas**

En comparación con los organismos terrestres existe un contraste bastante marcado en la variedad de pigmentos y estrategias que han sido elaborados por el grupo de las algas para la absorción de luz y la obtención de energía.

A pesar de las dificultades que plantea el estudio del origen y estructura de los plastidios en los grupos de algas (Larkum y Vesik 2003), podemos hacer reconocer 3 tipos de plastidios diferentes:

1. Con membrana doble:
  - Plastidios de Rhodophytas,
  - Plastidios de Chlorophytas
  - Plastidios o “cianelas” de Glaucocystophytas
2. Tres membranas:
  - Plastidios de Euglenophytas
  - Plastidios de Dinoflagelados
3. Cuatro membranas:
  - Plastidios de Chromophytas (figura 7)

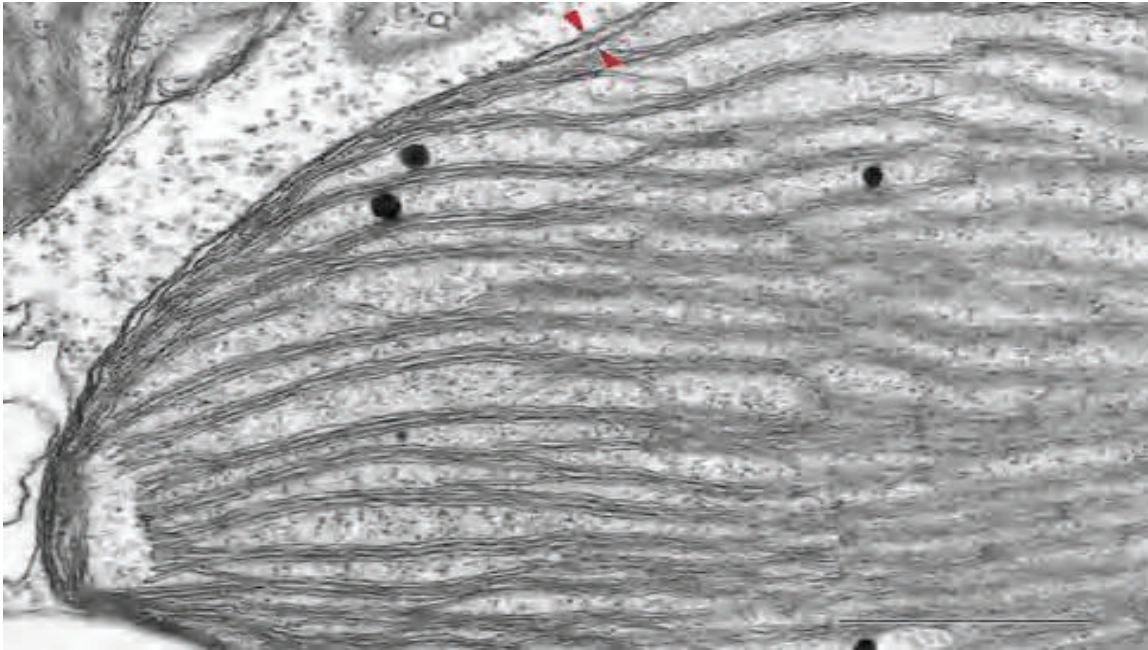


Figura 7. Cloroplasto de *Heterosigma carterae*, cuyo plastidios, de forma similar al de *Chaetoceros*, se encuentra rodeado por una membrana doble del cloroplasto y dos membranas del retículo endoplasmático de cloroplasto (señalado con las flechas rojas). Los tilacoides se encuentran en grupos de 3, la barra representa una escala de 0.5  $\mu\text{m}$  (Larkum y Vesk 2003).

#### II.2.4.1 Maquinaria fotosintética en *Chaetoceros*

Suelen presentar de 1 o más plastidios por célula, poseen un recubrimiento de 4 membranas. Sus tilacoides están agrupados en grupos de 3, sus principales pigmentos fotosintéticos son las clorofilas “a”, “c<sub>1</sub>” y “c<sub>2</sub>” (Jeffrey y Vesk 1997), también poseen fucoxantina como principal carotenoide cosechador de luz.

Aparte de ser los responsables de las reacciones fotosintéticas, los derivados y las distintas variedades de clorofilas juegan un papel muy importante en reacciones metabólicas y catabólicas



### II.2.4.1.1 Pigmentos fotosintéticos de *Chaetoceros*

Como se mencionó anteriormente este género de micro-algas posee 3 tipos diferentes de clorofilas “a”, “c<sub>1</sub>” y “c<sub>2</sub>” (figura 8).

Para el caso de la clorofila *a* algunos autores (Kiang *et al.*, 2007; Nobel 2009) reportan que actúa en las longitudes de onda de 700 nm y 680 nm, sin embargo también hay registros en 435 y 676 nm. En cambio las clorofilas *c<sub>1</sub>* y *c<sub>2</sub>* registran actividad en 444, 578 y 628 nm para la primera y 448, 582 y 629 nm para la segunda.

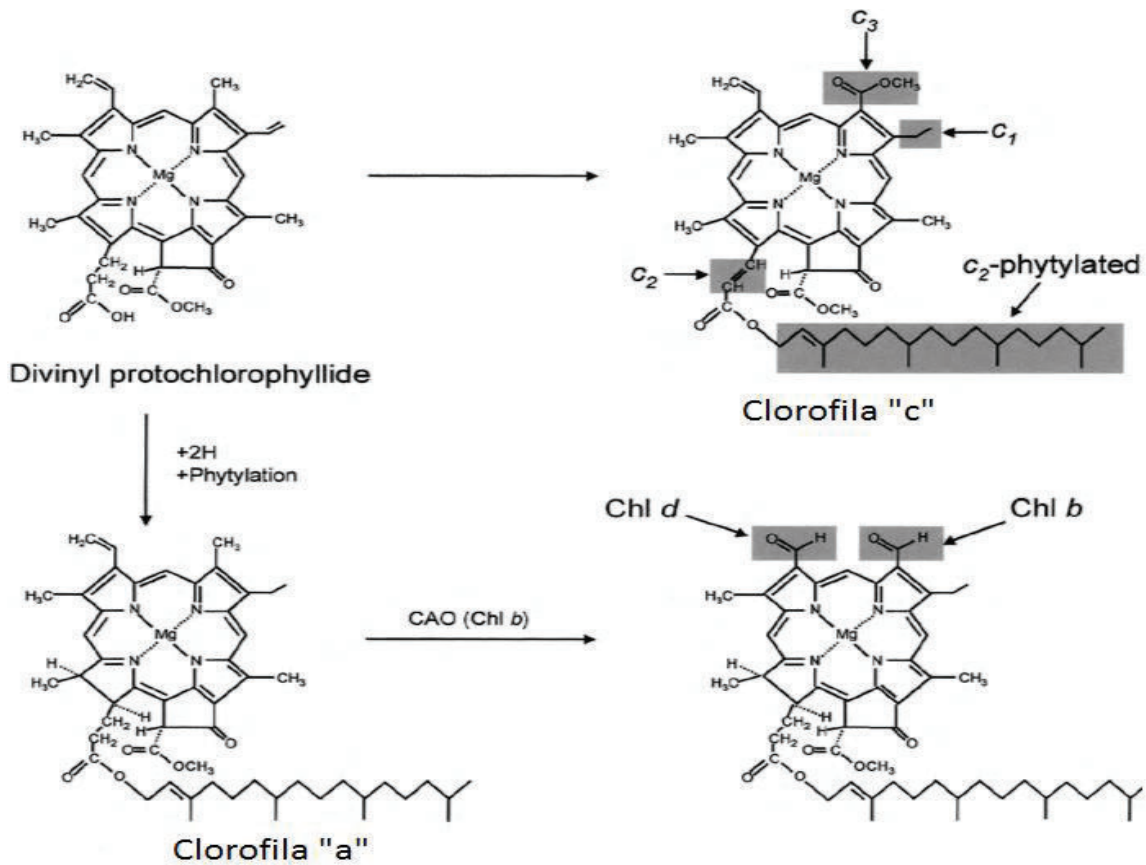


Figura 8. Características y diferencias estructurales entre distintos tipos de clorofilas (*a*, *b*, *c<sub>1</sub>*, *c<sub>2</sub>*, *c<sub>3</sub>* y *d*) y su posible precursor (Cahoon y Timko 2003)

Las clorofilas se pueden diferenciar en dos tipos de pigmentos básicos, uno con un anillo magnésico de protoporfirina y el otro con un anillo magnésico de clorina. Además poseen fucoxantina (figura 9) como pigmento accesorio.

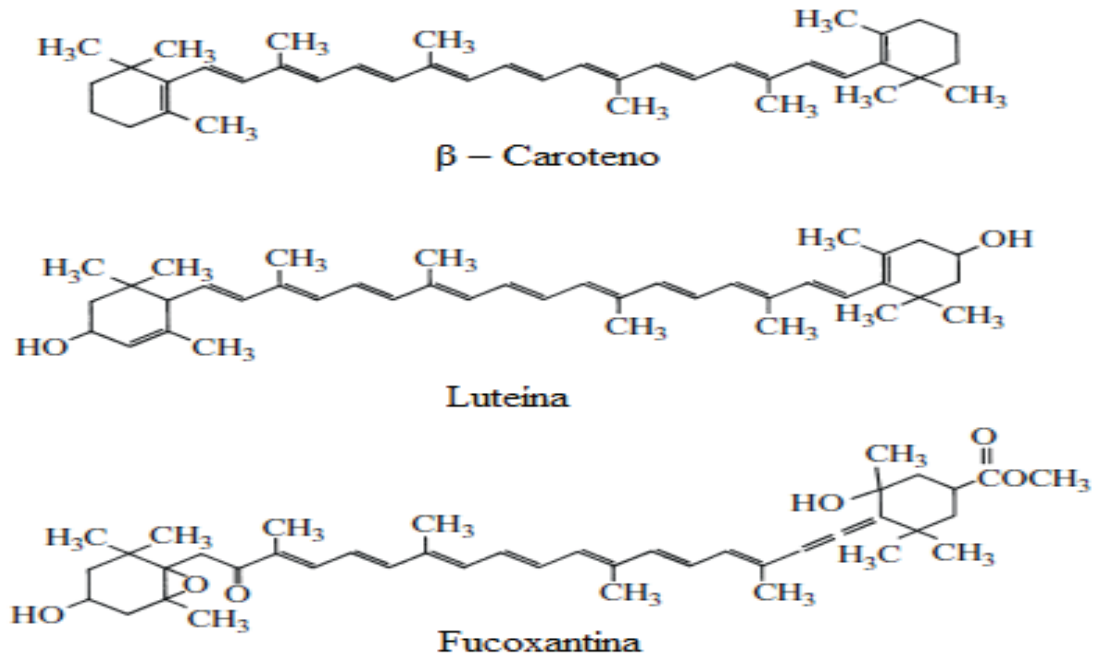


Figura 9. Comparación entre 3 de los principales pigmentos accesorios (Nobel 2009). Donde la longitud de onda donde actúan los pigmentos es en 425, 448 y 475 nm para  $\beta$ -caroteno; para la luteína en 421, 445 y 474; y para la fucoxantina en 448 y 472 nm.

Además de los picos de absorción mencionados anteriormente, tanto las clorofilas como los pigmentos accesorios presentan otro tipo de interacciones con la luz como lo es la emisión de fluorescencia. Esta fluorescencia también se da en ciertas longitudes de onda donde se presentan picos de emisión, siendo la región de 400-500 nm la reportada para los carotenoides (Mimuro y Akimoto 2003) y la de 600-700 la reportada para las clorofilas *a*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub> (Jeffrey y Wright 1987; Nobel 2009).

A pesar de los múltiples registros para los picos de fluorescencia, es importante considerar los efectos que pueden afectar su aparición como es el caso del efecto retardado observado por Ho *et al.*, (2000) y Scordino *et al.*, (2008) al estudiar algas contaminadas con algunos metales, donde reportan que el retraso puede ser hasta de segundos dependiendo el metal involucrado.

Para el estudio de la absorción de luz de los pigmentos y de la fotosíntesis en general se deben considerar dos aspectos importantes:

- i. El acomodo de los fotosistemas en la membrana tilacoidal
- ii. La distribución de la excitación entre los dos fotosistemas

En base a lo anterior es necesario concentrarnos en la membrana tilacoidal y en su comportamiento, el cual algunos autores describen es el mismo que el de un cuerpo en estado sólido (Blankenship 2008); siendo la física del estado sólido un área de estudio con una gran cantidad de aplicaciones.

### III. JUSTIFICACIÓN

La fotosíntesis es uno de los procesos biológicos más importantes dentro de la biología, el cual presenta un rango muy amplio de ligeras variaciones en el funcionamiento y presencia de distintos grupos de pigmentos fotosintéticos, siendo las más marcadas aquellas entre los organismos terrestres y los acuáticos. El género de micro-algas *Chaetoceros* representa un caso viable para estudiar dichas variaciones mediante técnicas de espectrofotometría (medición de espectros de absorción y fotoluminiscencia) las cuales nos pueden proveer de información acerca de las transiciones electrónicas y el efecto de la luz sobre los pigmentos fotosintéticos.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Dadas las diferencias naturales entre los lugares en que habita la micro-alga *Chaetoceros*, habrá una variación en los espectros de absorción y fotoluminiscencia (incluyendo el tiempo de respuesta) respecto a otros grupos de organismos fotosintéticos.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1 Objetivo General**

Caracterizar la respuesta óptica de la absorción y fotoluminiscencia de los pigmentos extraídos de la micro-alga *Chaetoceros sp.*

### **V.2 Objetivos Específicos**

Obtener los espectros de absorción y de fotoluminiscencia de los pigmentos mediante el uso de una fuente de luz continua

Obtener el espectro de fotoluminiscencia mediante el uso de pulsos de luz.

Determinar los picos de máxima absorción y emisión

Identificar las componentes de los pigmentos mediante la comparación entre los espectros obtenidos y los reportados en la literatura.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **VI.1 Obtención de la micro-alga**

La micro-alga perteneciente al género *Chaetoceros*, fue suministrada por el laboratorio de nutrición acuícola y análisis químicos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

### **VI.2 Extracción de Pigmentos**

Para la extracción de pigmentos se utilizó el método descrito por de Jeffrey y Humphrey (1975) (descrito en el ANEXO I) con las modificaciones descritas a continuación: Las muestras de micro-algas fueron re-suspendidas en un tubo contenedor usando 15mL de agua destilada. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min, descartando después el sobrenadante. La pastilla celular resultante de la centrifugación se re-suspendió en una solución de acetona al 90%, y se dejó reposar durante aproximadamente 16 horas en un congelador, procediendo después de esto a realizar la primera de 5 series de medidas de absorción que se realizaron en un lapso de 7 días

### **VI.3 Determinación de Espectros de Absorción y Emisión**

#### **VI.3.1. Espectro de absorción mediante el uso de un espectrofotómetro**

De los pigmentos extraídos se colocó 1mL de muestra en cada una de 5 celdas para espectrofotómetro, las celdas son de plástico transparente al ultravioleta con dimensiones de 12.5x12.5x45 mm<sup>3</sup> con capacidad e 1.5 mL.

Posteriormente se procedió a medir la absorción de cada celda por separado, en un rango de las mediciones iba de los 350 a 800 nm y cada medición fue repetida 3 veces. Para estas mediciones se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo Lambda 19 (ANEXO 2). Este modelo es de doble haz, donde uno cruza por la muestra de referencia (blanco) y el otro por la muestra “problema”. Esto hace que resulte más práctico con respecto a los equipos de un solo haz. Es a partir de la comparación entre los dos haces transmitidos que se obtiene la “Densidad óptica” (sin unidades), la cual representa el logaritmo en base 10 de la intensidad relativa de luz transmitida. Se hicieron 5 series de mediciones distribuidas en un lapso de 7 días. Entre cada serie de mediciones las muestras eran tapadas y almacenadas en un congelador.

Antes de volver a realizar las mediciones, las muestras eran retiradas del congelador, se destapaban y se dejaban reposar a temperatura ambiente durante un lapso de 20 minutos. Esto permitía elevar la temperatura de las muestras hasta temperatura ambiente (26-28 °C), que fue la temperatura a la que se realizaron las mediciones.

### **VI.3.2. Espectros de excitación y emisión mediante el uso de un espectrofluorómetro**

Cuando ciertas sustancias absorben energía de radiación electromagnética y esta energía es liberada a su vez mediante la emisión de radiación después de un periodo de alrededor de milisegundos se le conoce como fluorescencia. Este fenómeno es usado en una multitud de estudios distintos, desde análisis estructurales, el marcaje y/o interacción de macromoléculas entre otros. Para las medidas de fotoluminiscencia se usó un espectrofluorómetro Fluorolog-3 Jobin Yvon (ANEXO 3) registrando datos de 3 pruebas diferentes:

- 1) Obtención de espectros de emisión con excitación a longitud de onda fija,
- 2) Obtención de emisión en una longitud de onda fija variando la longitud de onda de excitación en un rango determinado y



3) Obtención de espectros de emisión en un rango de longitudes de onda con una longitud de onda de excitación pulsada. Para el caso de esta prueba el procedimiento consiste en la excitación de muestra mediante una serie de pulsos de luz que se emiten en un periodo de tiempo muy corto (del orden de milisegundos) y medir a continuación la intensidad de la fotoluminiscencia a una longitud de onda fija. El uso de pulsos de luz permite determinar la rapidez de las emisiones de los diferentes pigmentos a una determinada longitud de onda, además de que nos ofrece información sobre el desarrollo temporal del fenómeno de fotoluminiscencia de los pigmentos.

Las medidas fueron digitalizadas y almacenadas utilizando el software OringLab del espectrofluorómetro, el cual es una aplicación de software usado para el análisis de datos y manejo de gráficos, mediante el uso de este software fue posible la determinación de los picos.

Estas pruebas fueron realizadas después de la segunda serie de mediciones de absorción y usando los picos detectados en esas pruebas

## **VII. RESULTADOS**

### **VII.1 Espectros de Absorción**

En la absorción óptica los resultados son presentados en base al orden de las mediciones hechas. La figura 10 representa el blanco usado durante las mediciones, las figuras de la 11 a la 15 representan la primera serie de mediciones, de 16 a 20 de la segunda serie, las figuras de la 21 a 25 presentan los resultados de la tercera serie, de 26 a 30 la cuarta serie y de 31 a 35 la quinta serie.

Los picos de mayor absorción se encuentran marcados y la longitud de onda en la que aparecen se encuentra entre paréntesis. Para el caso del blanco se observó que no apareció ningún pico de absorción (figura 10); sin embargo, existe una diferencia entre las primeras mediciones (figuras 11 a la 15) y las últimas (figuras 31 a la 35), estas diferencias van tanto en la localización de los picos, como su nivel de absorción y el número de picos detectados. Para la primera medición los picos que aparecen son 366-368, 404-408, 433-438, 485-488, 526-529, 600-605, 622-626 y 658-660 nm y para la última aparecen en 368, 407-411, 439, 486-492 y 659-664 nm

#### **VII.1.1 Primera medición**

En la primera medición se detectaron en total de 8 picos en las siguientes longitudes de onda 366-368, 406-411, 433-438, 485-488, 526-529, 600-605, 622-626 y 658-660 nm. Donde los picos con mayor absorción se encontraron en el rango de 406-411, 433-438 y 658-660 nm

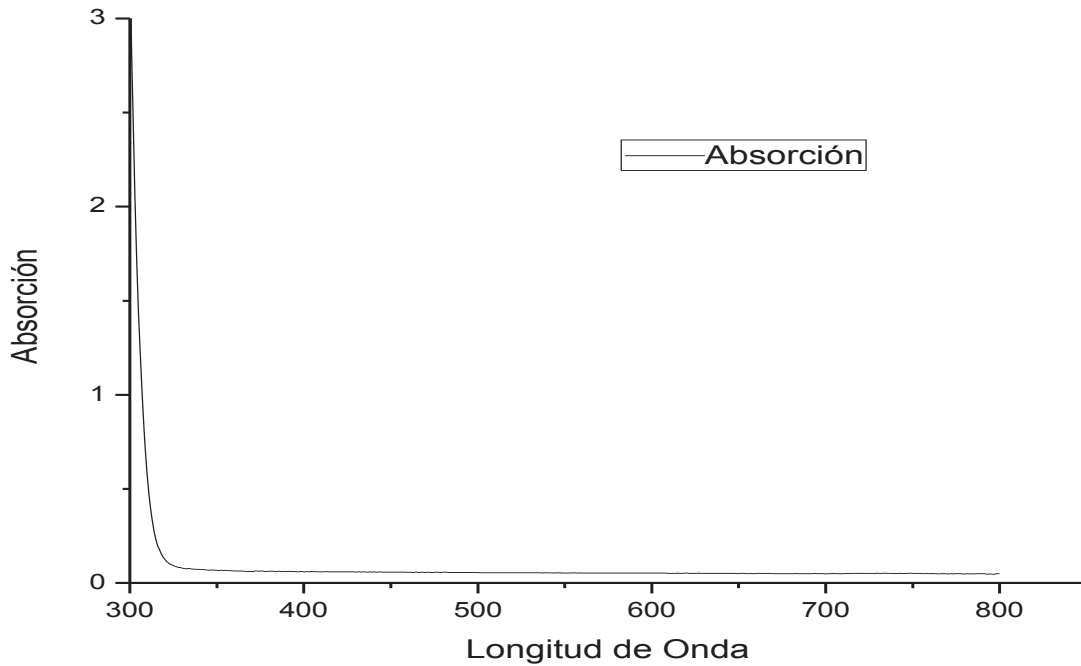


Figura 10. Absorción de acetona al 90% usada como blanco. No se observan picos de absorción.

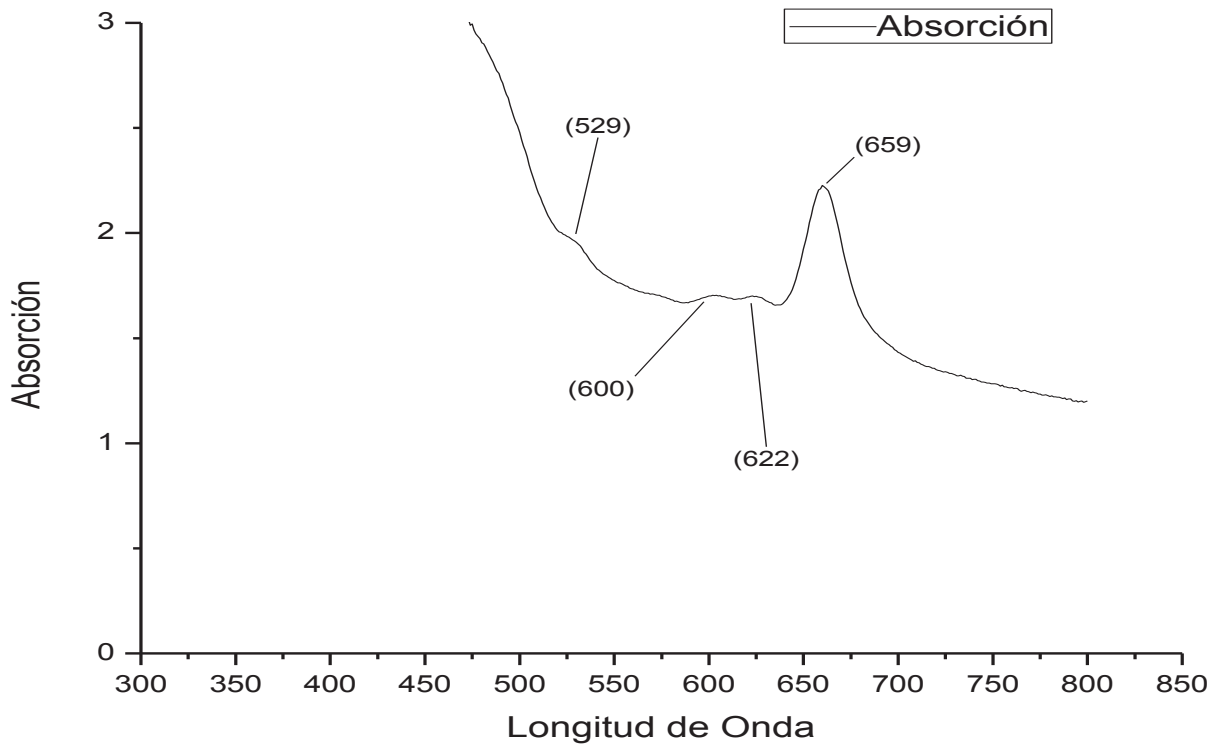


Figura 11. Espectro de absorción de la primera celda en la primera medición. Se observaron 4 picos de absorción: 529, 600, 200 y 659 nm.

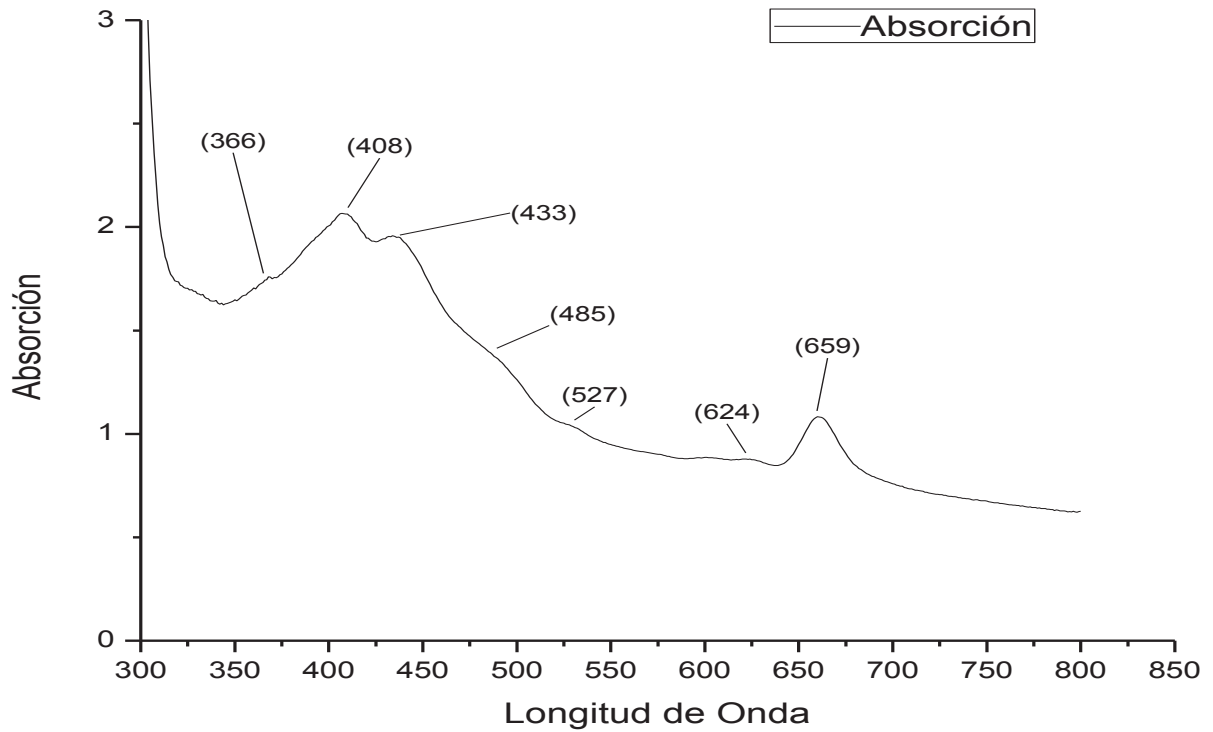


Figura 12. Absorción en la primera medición de la segunda celda, se detectaron 7 picos de absorción: 366, 408, 433, 485, 527, 624 y 659 nm.

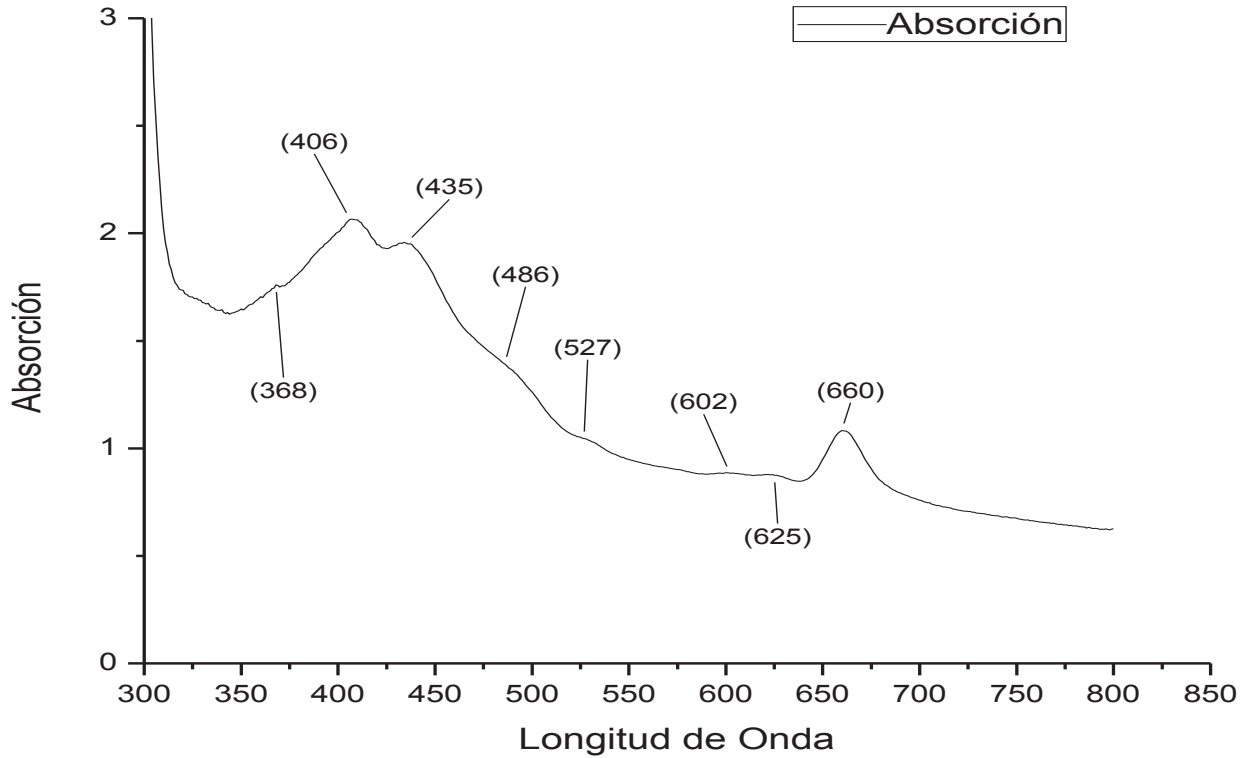


Figura 13. Absorción de la tercera celda durante la primera medición donde se detectaron 8 picos de absorción: 368, 406, 435, 486, 257, 602, 625 y 660 nm

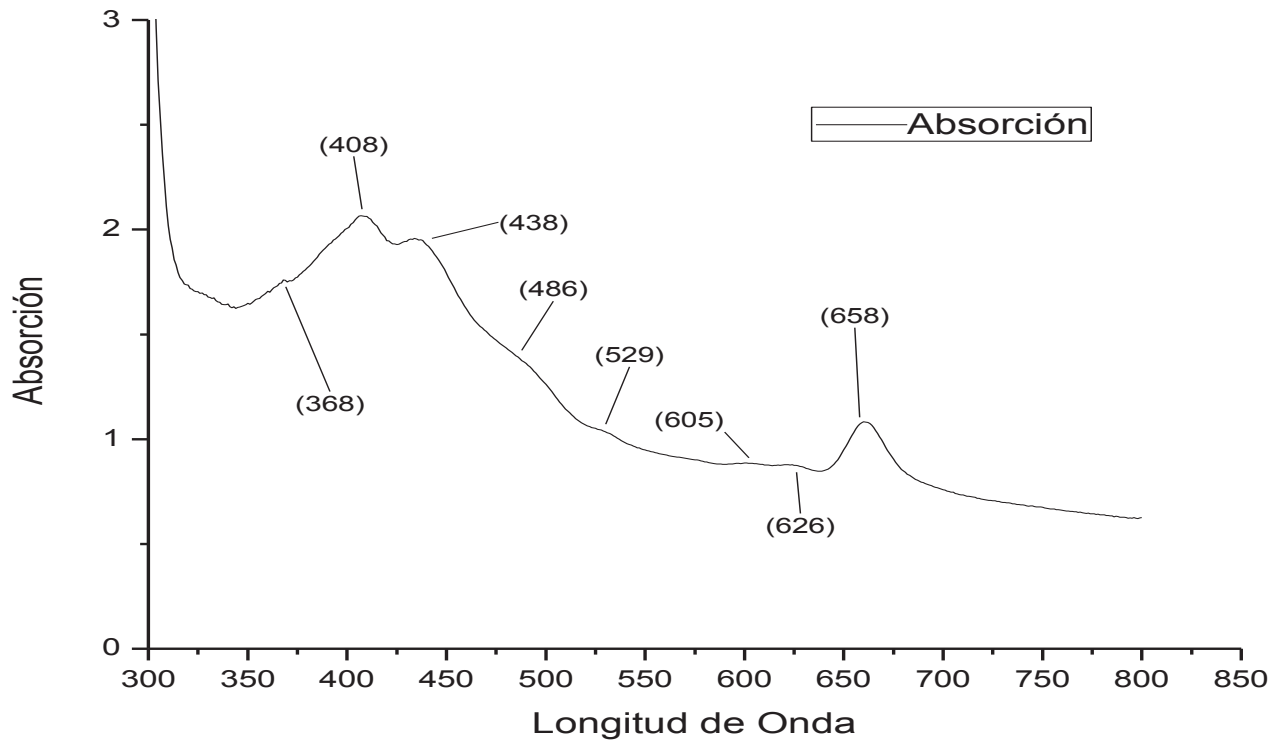


Figura 14. Espectro de absorción de la cuarta celda durante la primera serie de mediciones, se observaron 8 picos de absorción: 368, 408, 438, 486, 529, 605, 626 y 658 nm.

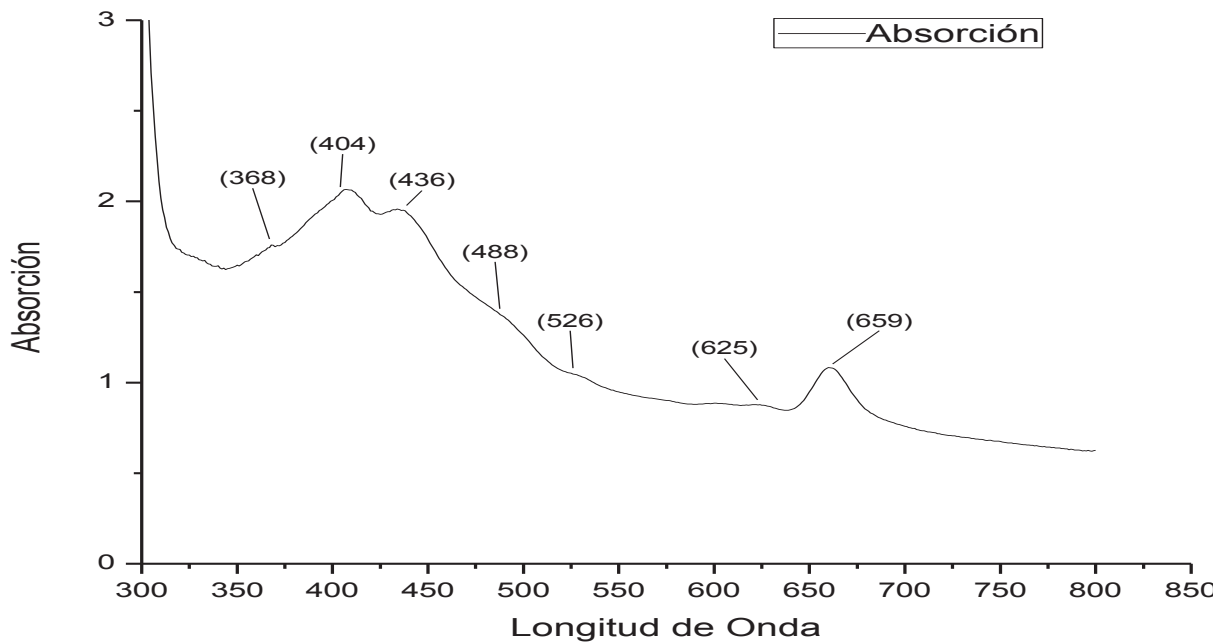


Figura 15. Espectro de absorción obtenido en la primera serie de mediciones perteneciente a la quinta celda, donde son 7 los picos de absorción que se detectaron y que se localizaban en: 368, 404, 436, 488, 526, 625 y 659 nm.

## VII.1.2 Segunda medición

En esta medición fueron un total de 8 picos de absorción detectados, que se localizaron en las longitudes de onda: 365-370, 405-409, 427-444, 485-492, 526-531, 599-602 y 659-666 nm. Los picos más marcados se registraron en las longitudes de onda 405-409, 485-492 y 659-666 nm.

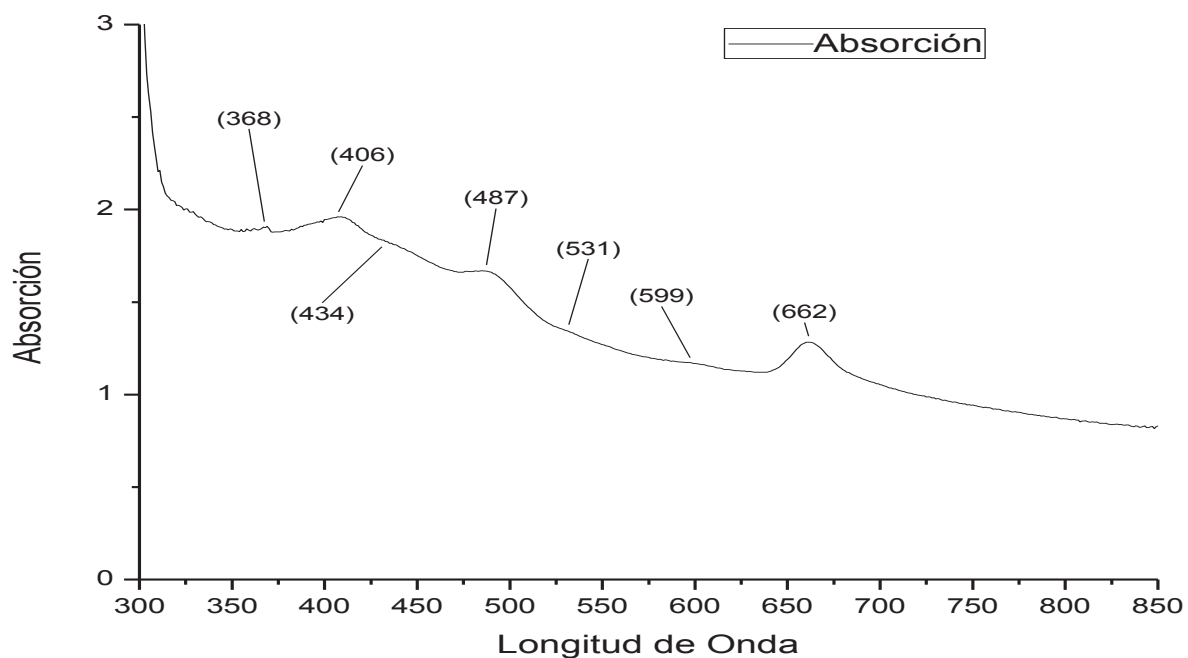


Figura 16. Absorción en la segunda medición de la primera celda, donde se detectaron 7 picos: 368, 406, 434, 487, 531, 599 y 662 nm.

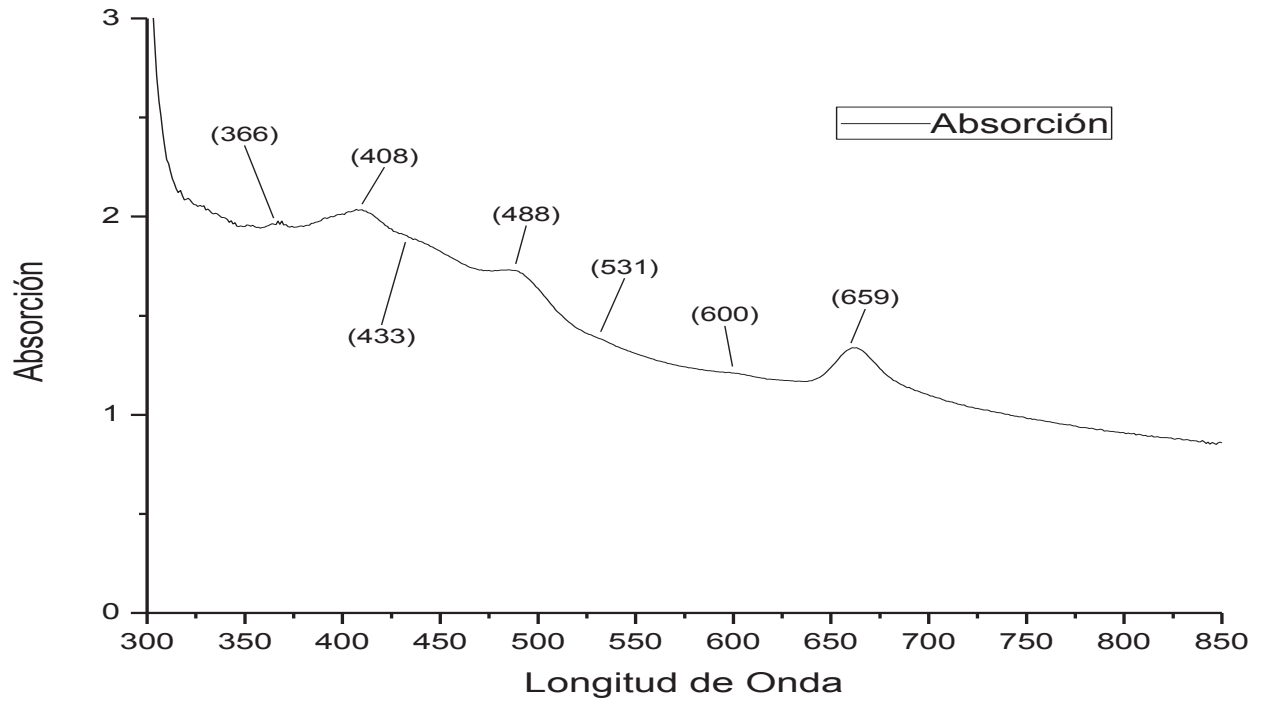


Figura 17. Espectro de absorción de la segunda celda durante la segunda medición, donde se observaron 7 picos de absorción: 366, 408, 433, 488, 531, 600 y 659 nm.

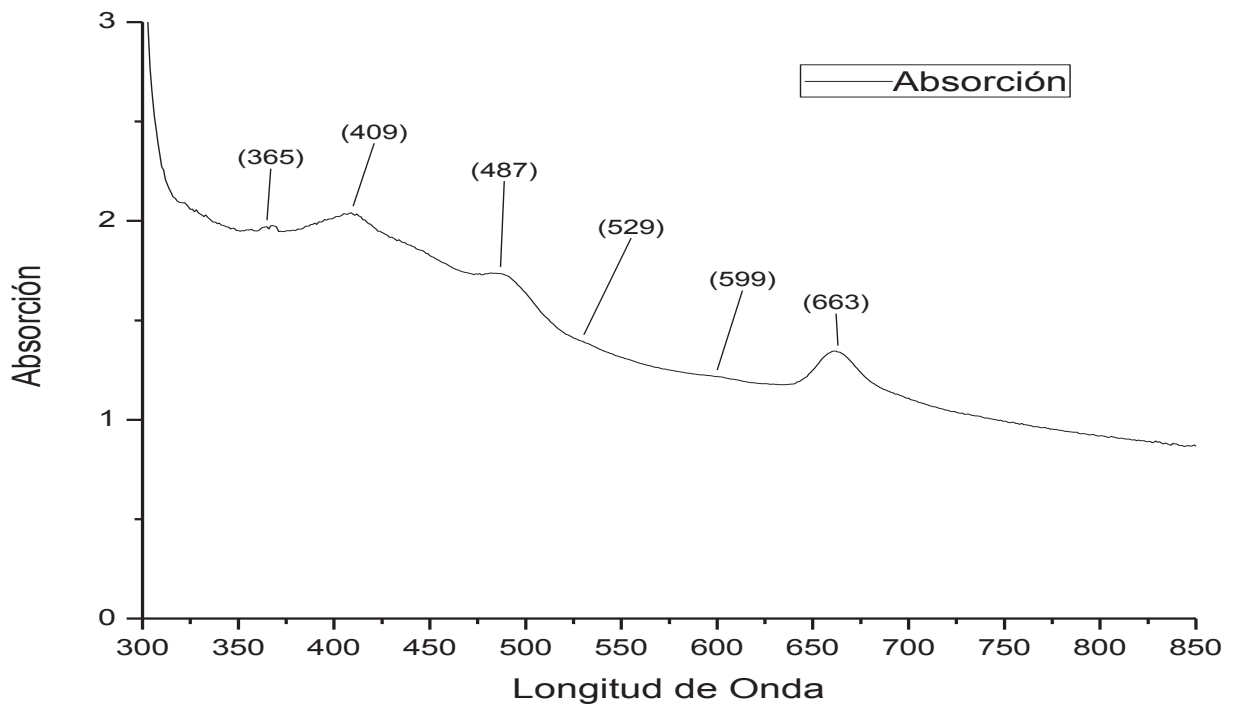


Figura 18. Espectro de absorción durante la segunda medición de la tercera celda, con 6 picos de absorción detectados en: 365, 409, 487, 529, 599 y 663 nm.

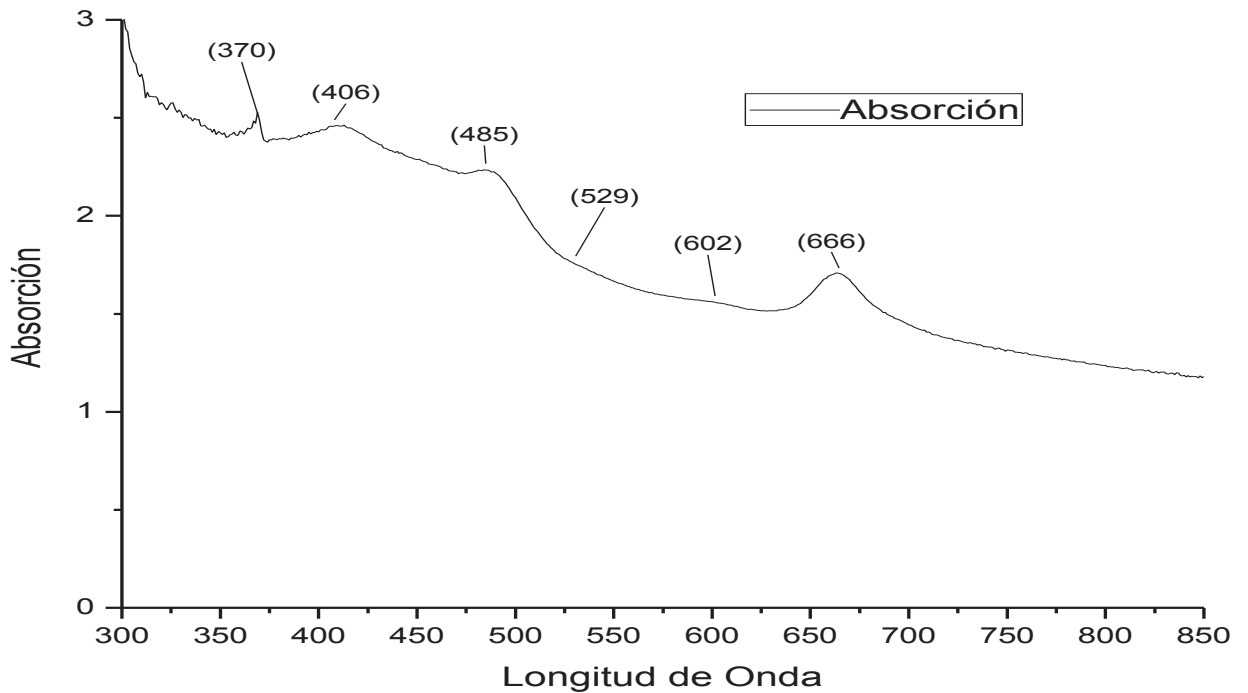


Figura 19. Absorción de la cuarta celda en la segunda medición, donde se detectaron 6 picos de absorción: 370, 406, 485, 529, 602 y 666 nm.

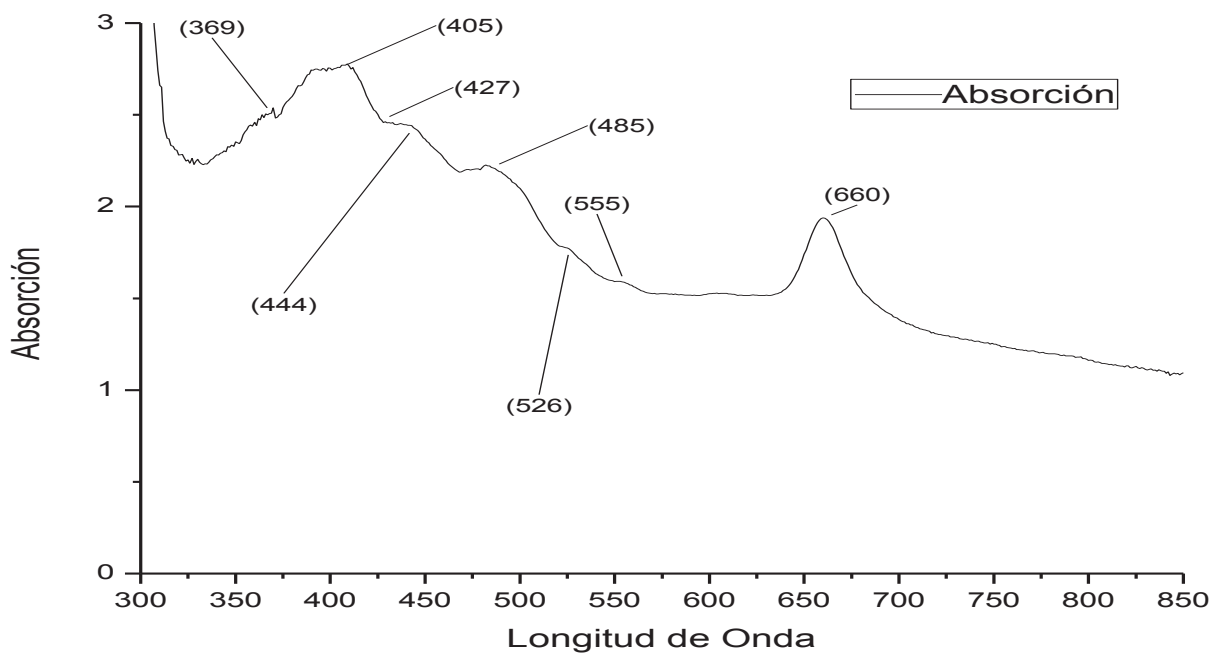


Figura 20. Absorción en la segunda serie de mediciones de la quinta celda donde se detectaron 8 picos de absorción en: 369, 405, 427, 444, 485, 526, 555 y 660 nm.



### VII.1.3 Tercera medición

En esta tercera medición se detectaron un total de 7 picos de absorción, en las siguientes longitudes de onda: 363-369, 407-410, 433, 487-491, 526-530, 597-599 y 660-663 nm. Siendo los picos con mayor absorción los detectado en 407-408, 487-491 y 660-663 nm.

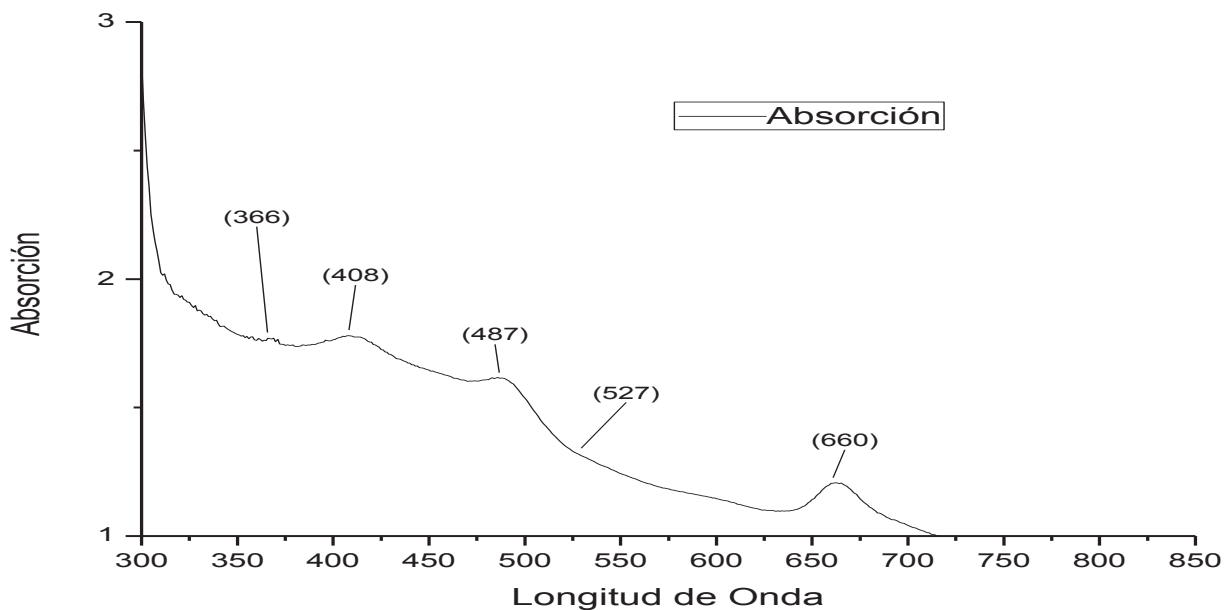


Figura 21. Espectro de absorción de la primera celda durante la tercera serie de mediciones, donde se detectaron 5 picos de absorción: 366,408, 487, 527 y 660 nm.

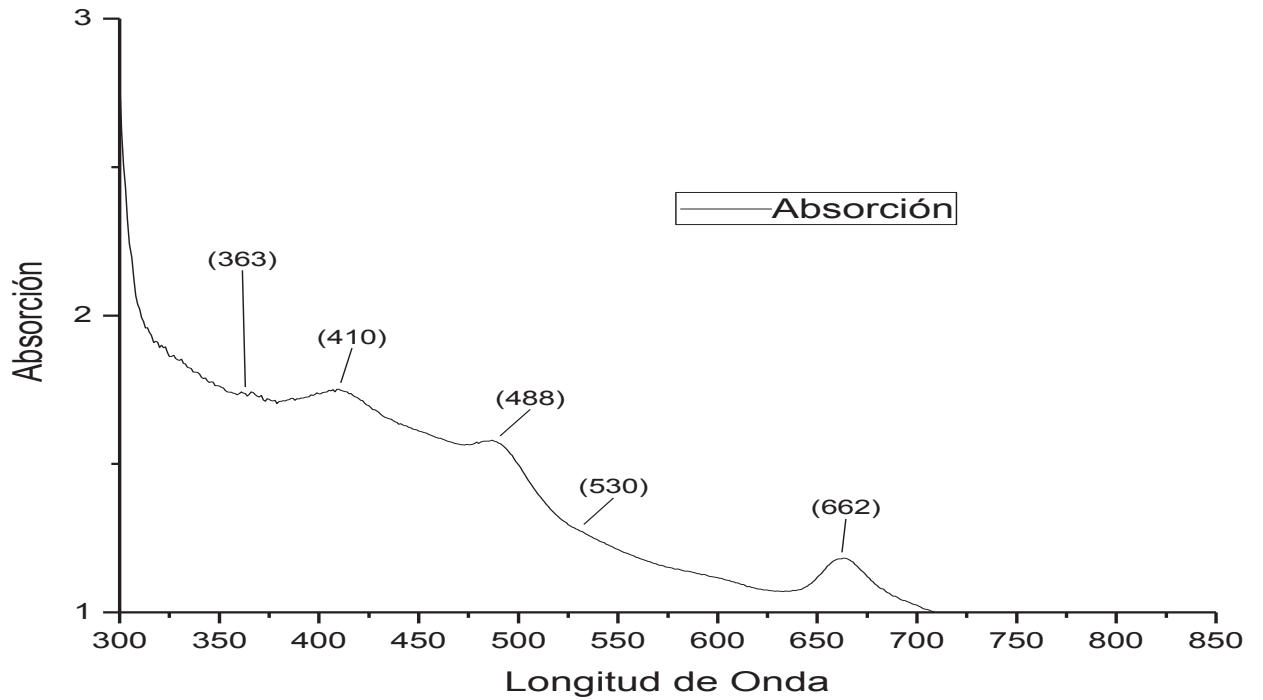


Figura 22. Absorción durante la tercera serie de la segunda celda, donde fueron 5 los picos detectados en: 363, 410, 488, 530 y 662 nm.

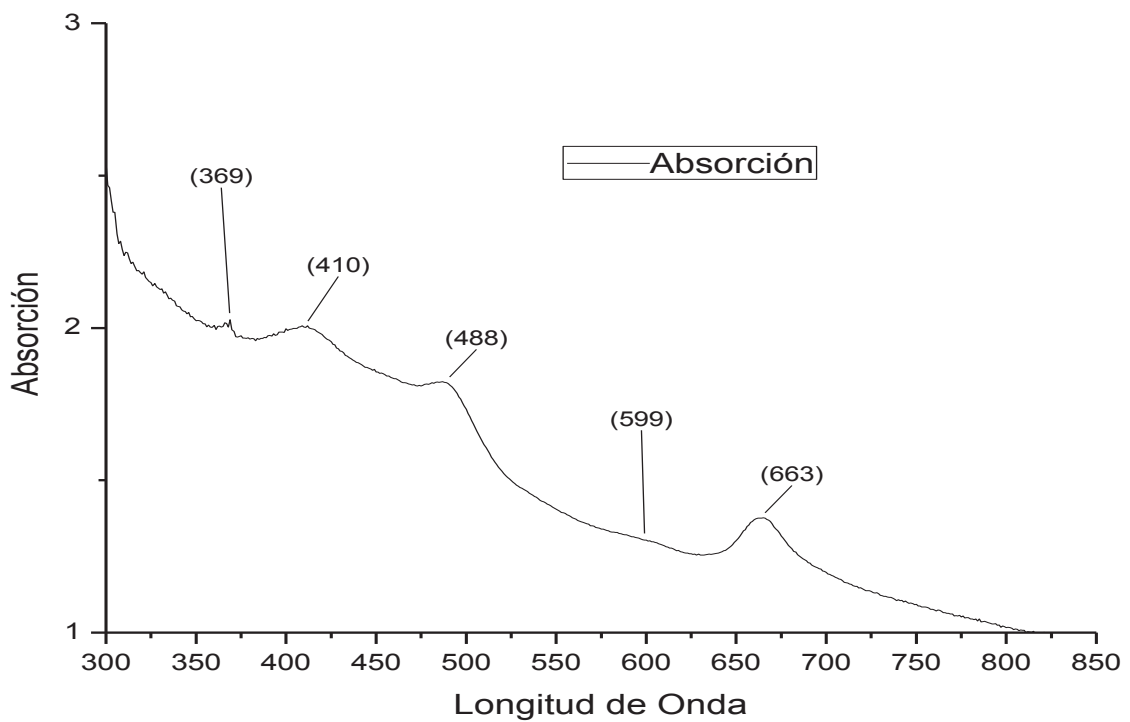


Figura 23. Absorción de la tercera celda durante la tercera medición donde se detectaron 5 picos de absorción: 369, 410, 488, 599 y 663 nm.

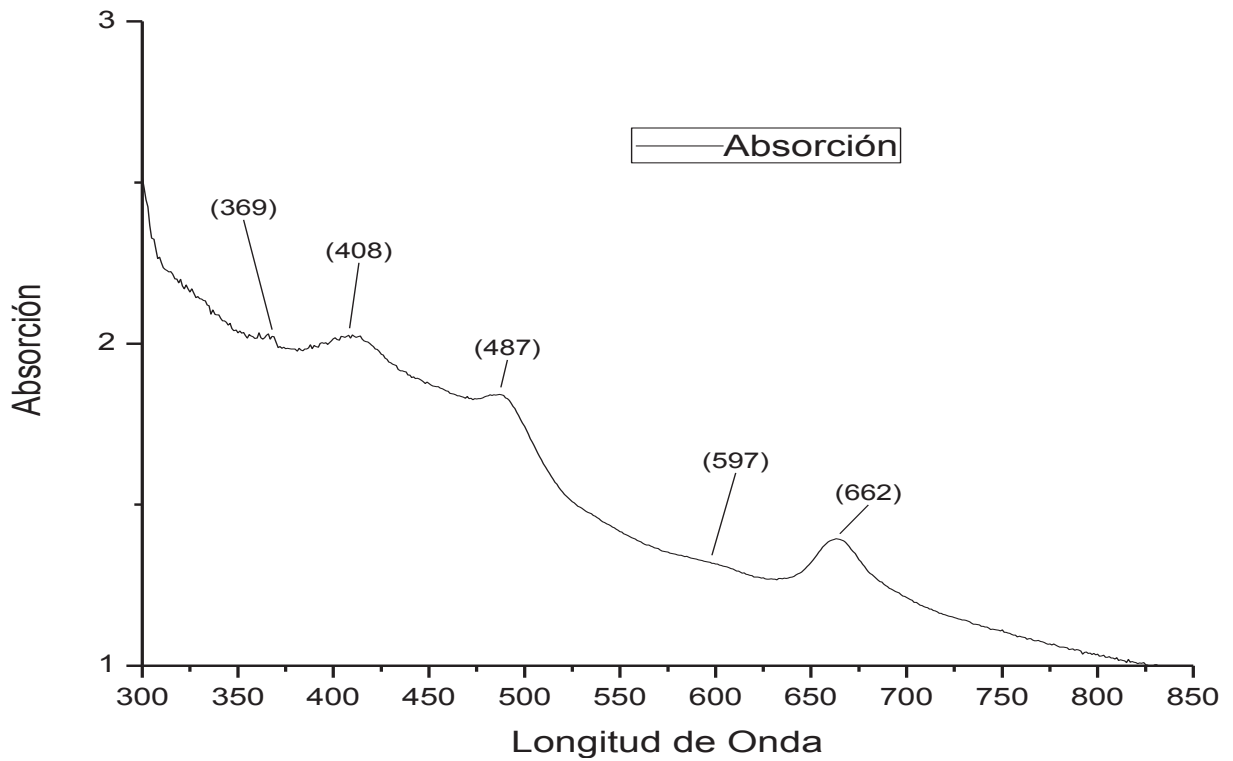


Figura 24. Absorción de la cuarta celda durante la tercera serie de mediciones donde fueron 5 los picos de absorción detectados: 369, 408, 487, 597 y 662 nm.

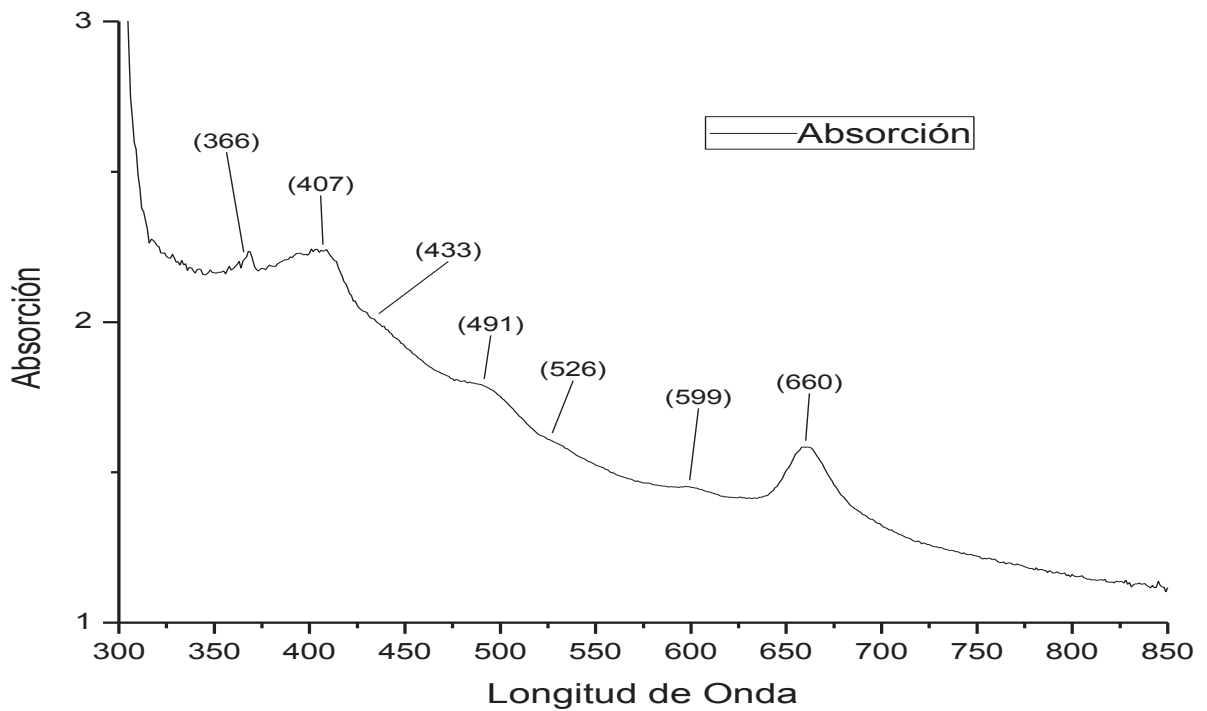


Figura 25. Espectro de la quinta celda durante la tercera medición donde fueron 7 los picos detectados y se encuentran en: 366, 407, 433, 491, 526, 599 y 660 nm

#### VII.1.4 Cuarta medición

Los picos detectados en la cuarta medición fueron cinco; estos fueron encontrados a las longitudes de onda: 368, 407-411, 434-438, 486-490 y 658-663 nm. Los picos más marcados fueron a las longitudes de onda de 407-411, 486-49 y 658-663 nm.

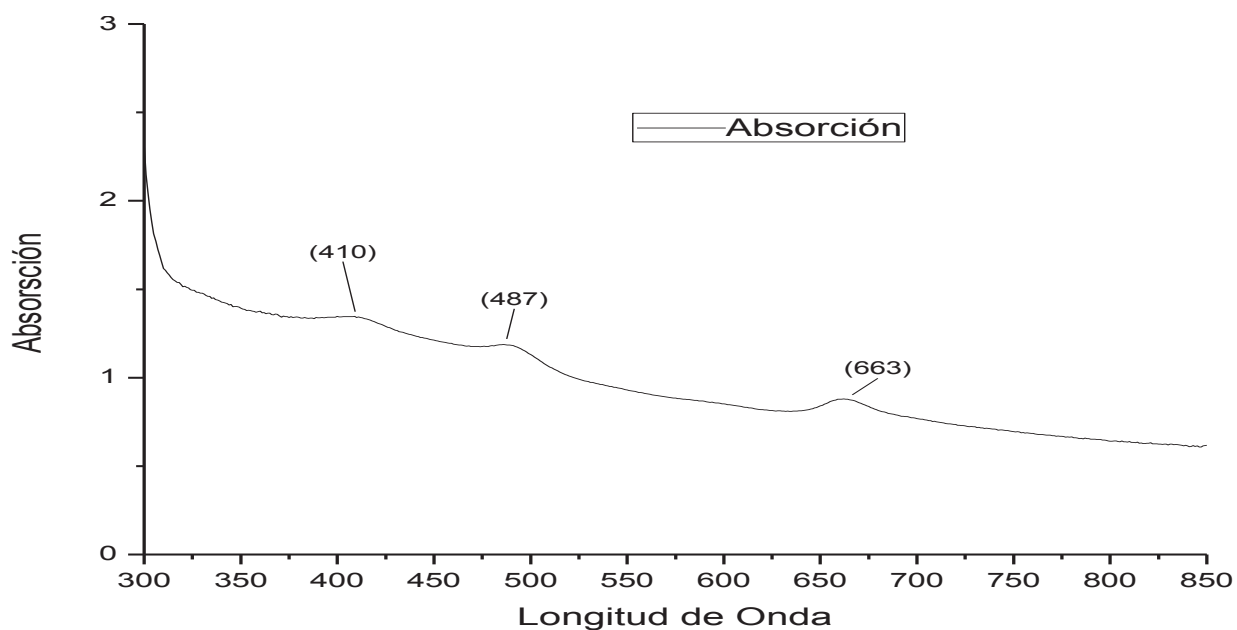


Figura 26. Absorción durante la cuarta medición de la primera celda, donde fueron 3 los picos detectados y que se encuentran en: 410, 487 y 663 nm.

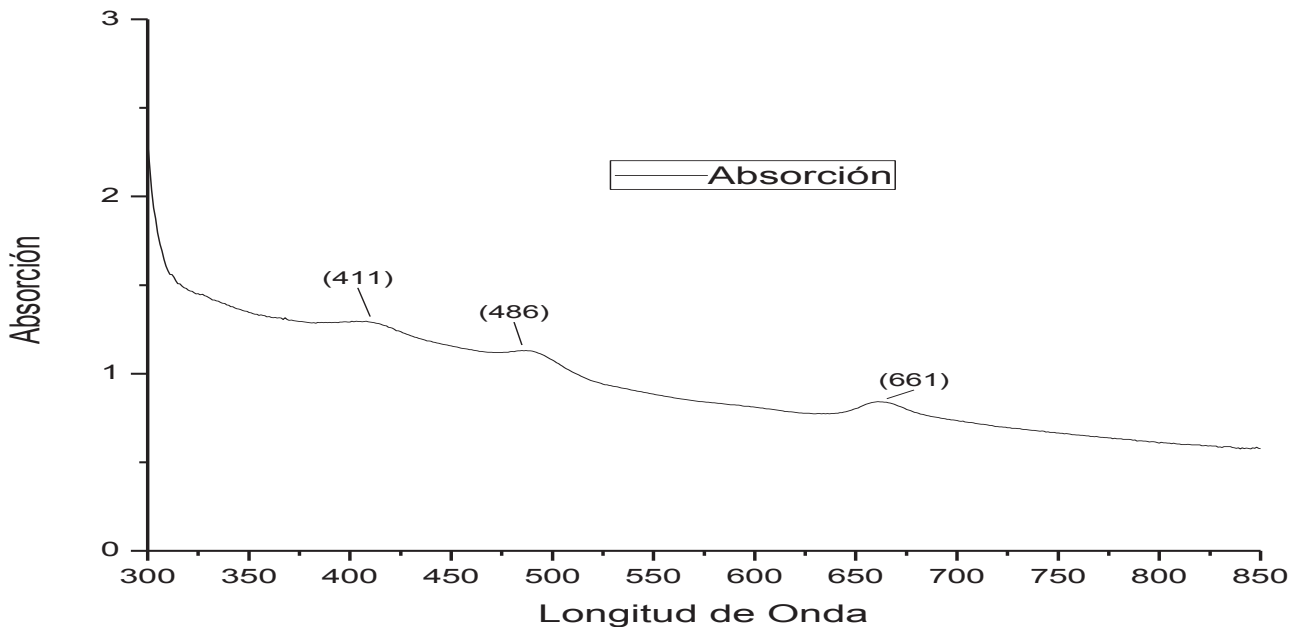


Figura 27. Espectro de la segunda celda durante la cuarta medición donde se observaron tres picos, uno en 411, otro en 486 y el último en 661 nm.

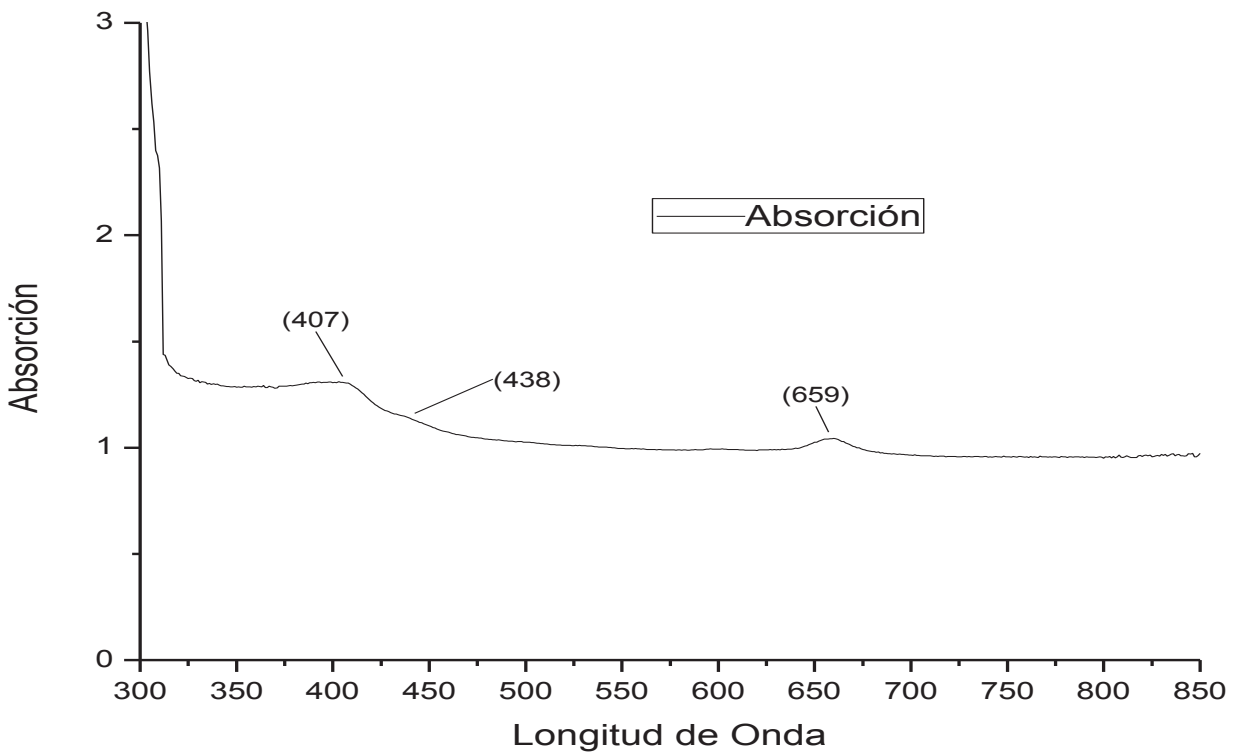


Figura 28. Cuarta medición del espectro de absorción de la tercera celda, donde fueron 3 los picos detectados en: 407, 438 y 659 nm.

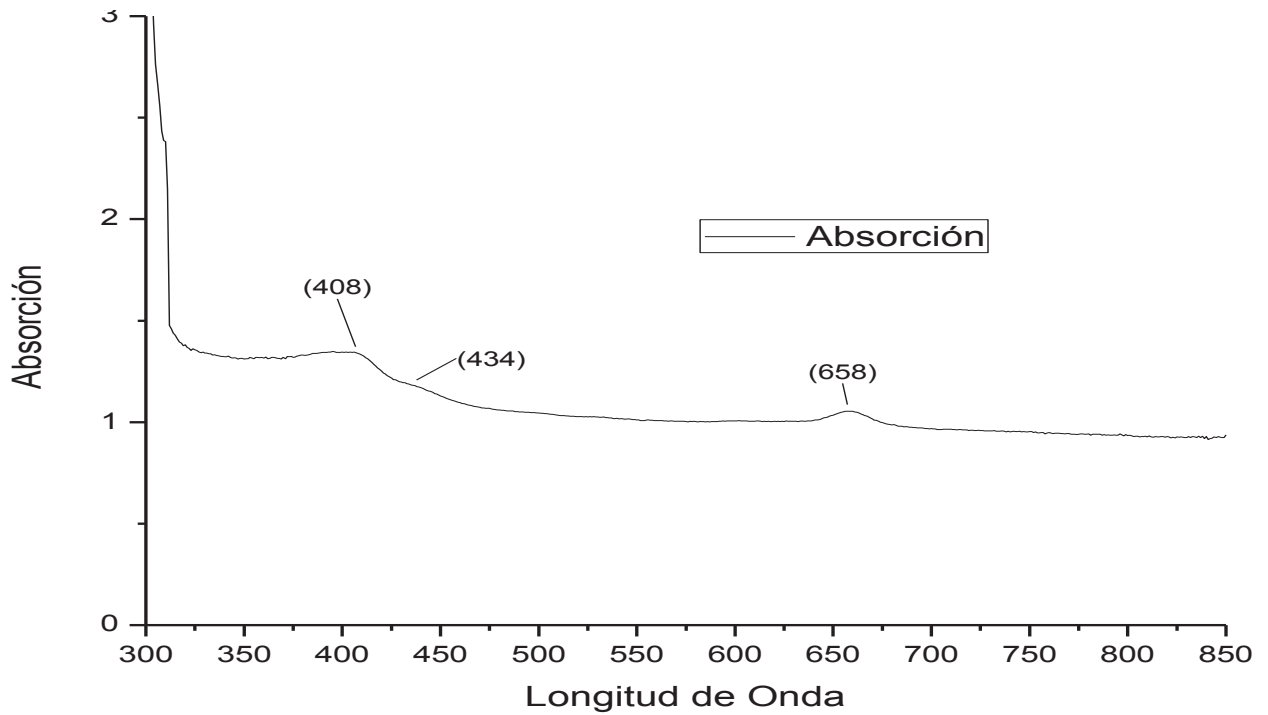


Figura 29. Absorción de la cuarta celda durante la cuarta medición donde se observaron 3 picos de absorción: 408, 434 y 658 nm.

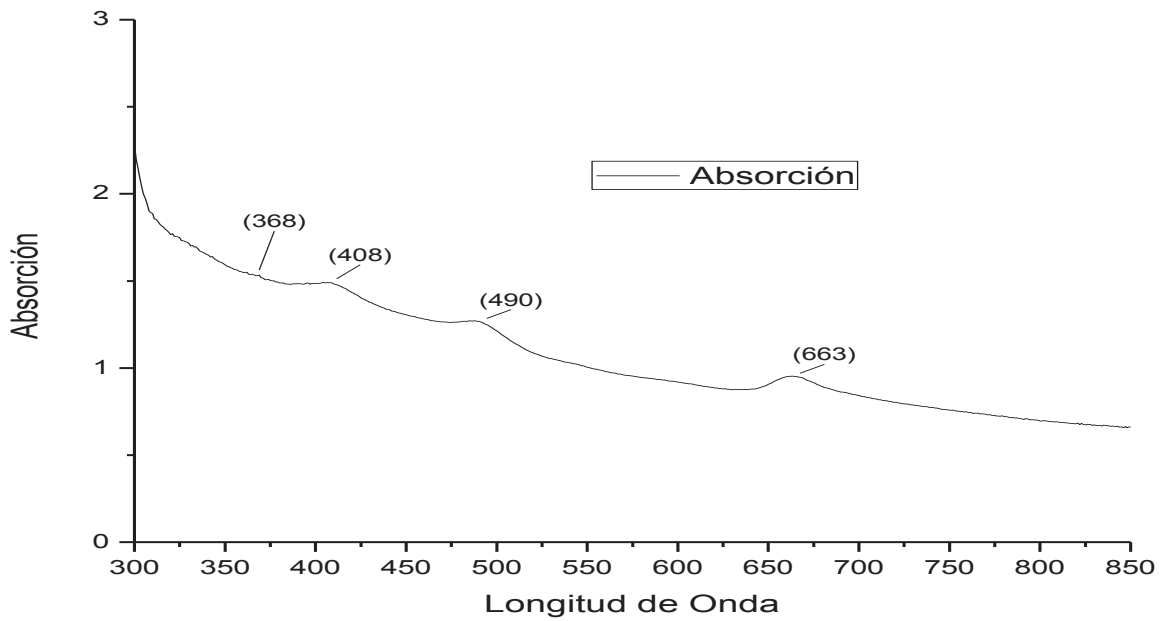


Figura 30. Absorción durante la cuarta medición de la quinta celda donde se detectaron 4 picos de absorción: 368, 408, 490 y 663 nm.

### VII.1.5 Quinta medición

En esta medición se detectaron un total de 5 picos 361, 407-411, 439, 486-492 y 659-664 nm. Donde aquellos con mayor absorción se encontraban 407-411, 486-492 y 659-662 nm.

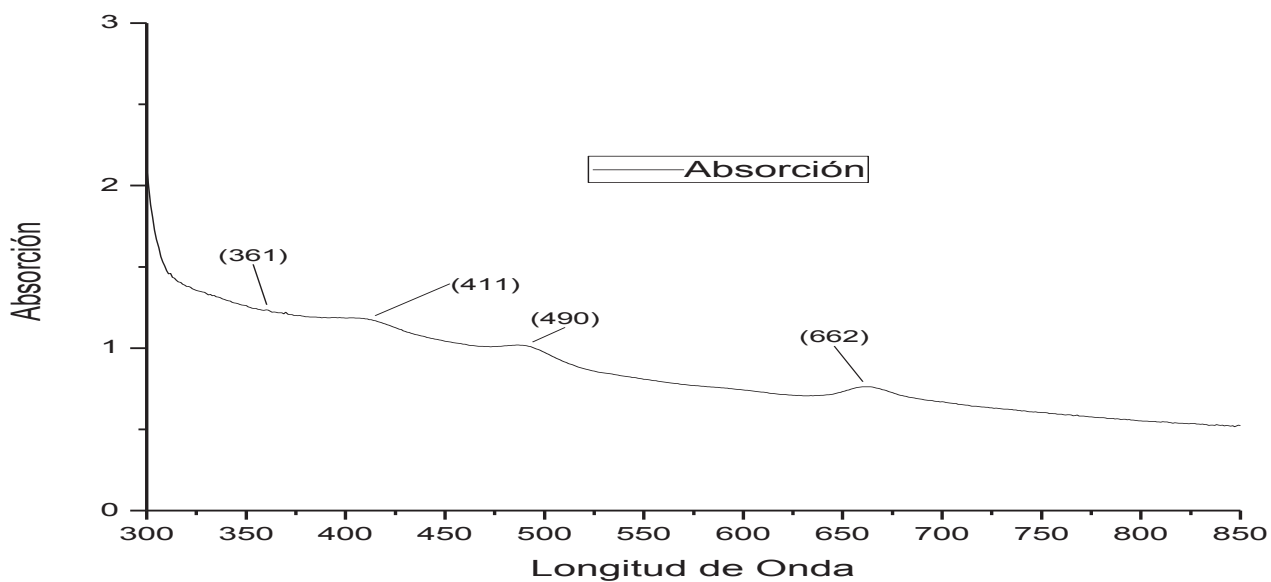


Figura 31. Espectro de absorción de la primera celda durante la quinta serie donde se detectaron 4 picos de absorción: 361, 411, 490 y 662 nm.

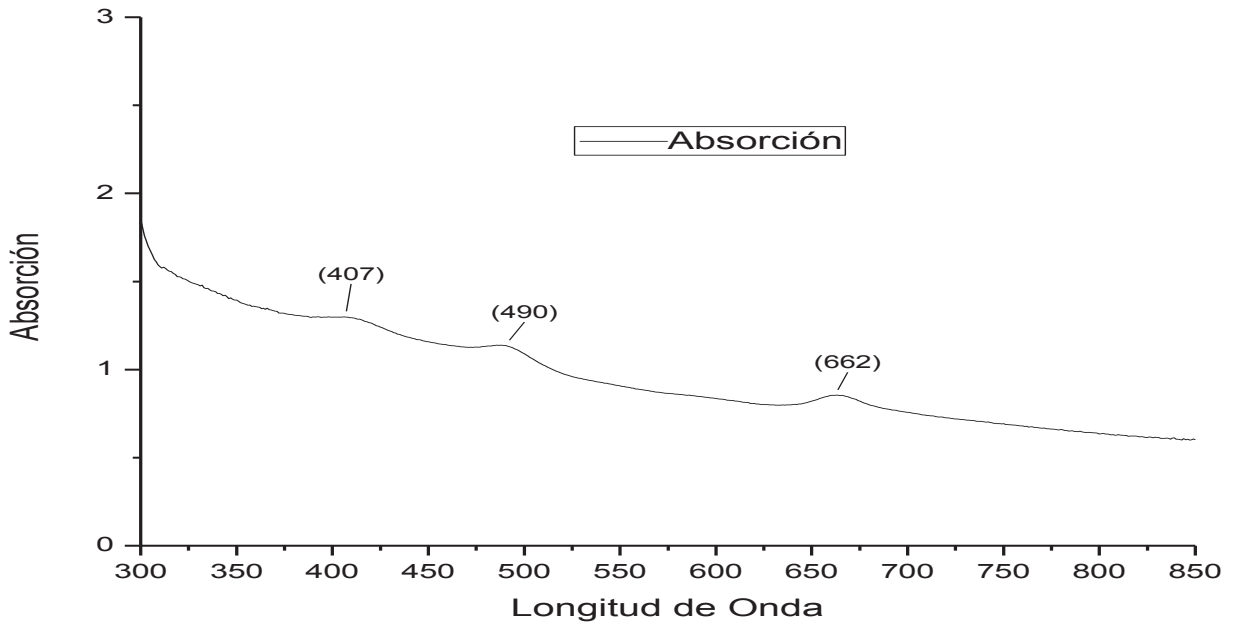


Figura 32. Espectro de absorción en la quinta medición de la segunda celda, donde fueron 3 los picos detectados: 407, 490 y 662 nm.

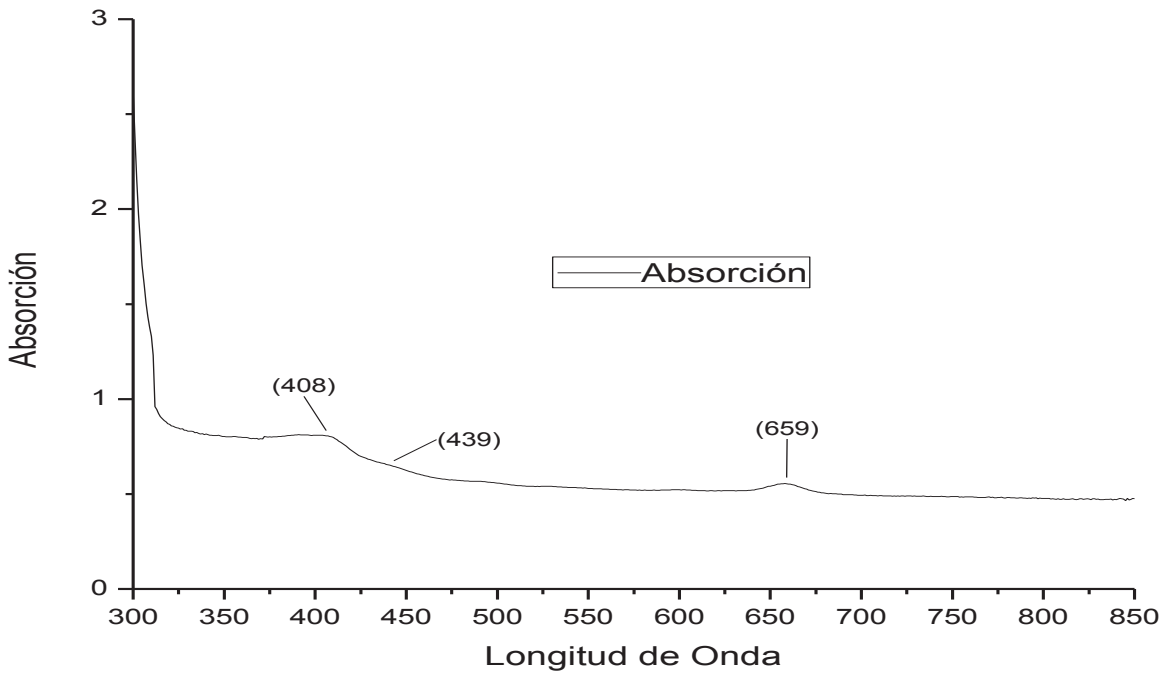


Figura 33. Absorción en la quinta serie de mediciones de la tercera celda donde se observaron 3 picos de absorción: 408, 439 y 659 nm.



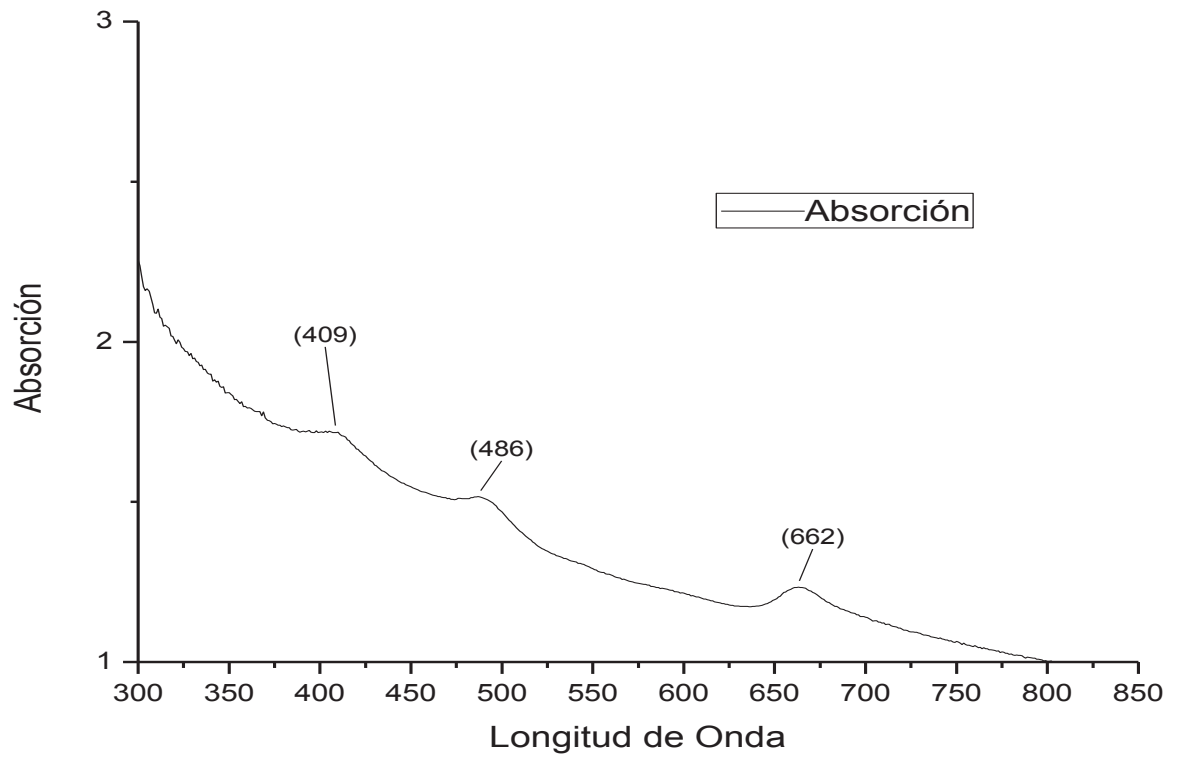


Figura 34. Absorción de la cuarta celda durante la quinta medición donde se muestran los 3 picos observados: 409, 486 y 662 nm.

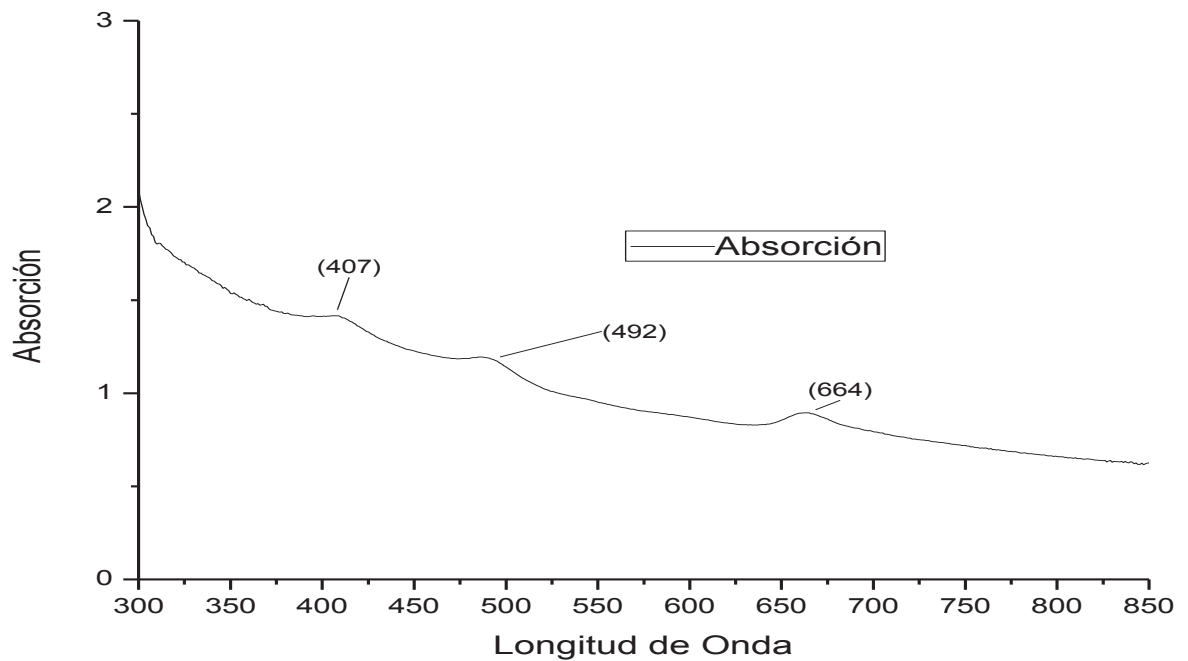


Figura 35. Absorción durante la quinta medición de la quinta celda donde fueron 3 los picos de absorción detectado en 407, 492 y 664 nm.

## VII.2. Espectros de Excitación y Emisión

### VII.2.1 Espectros a una longitud de onda de excitación fija y medición de los rangos de emisión.

A continuación tenemos los espectros de emisión que se obtuvieron al excitar las muestras a una longitud de onda fija, donde se encuentran señalados los picos más importantes y entre paréntesis la longitud de onda correspondiente. Las longitudes de onda utilizadas para la excitación de la muestra corresponden a los picos que se obtuvieron en la medición de la absorción. De la figura 36 a la 44 podemos ver la aparición de picos de emisión en 432, 524-532, 639-644, 675-679 y 714-719 nm; donde la mayor emisión se dan en el pico ubicado en 675-679.

Se observó que el pico en el rango 439-644, deja de ser detectado a partir de la figura 41 hasta la 44. En cambio el pico de 714-719 no alcanza a ser detectado en la figura 36, que corresponde a una excitación a 370 nm, pero si en el resto de las longitudes de onda.

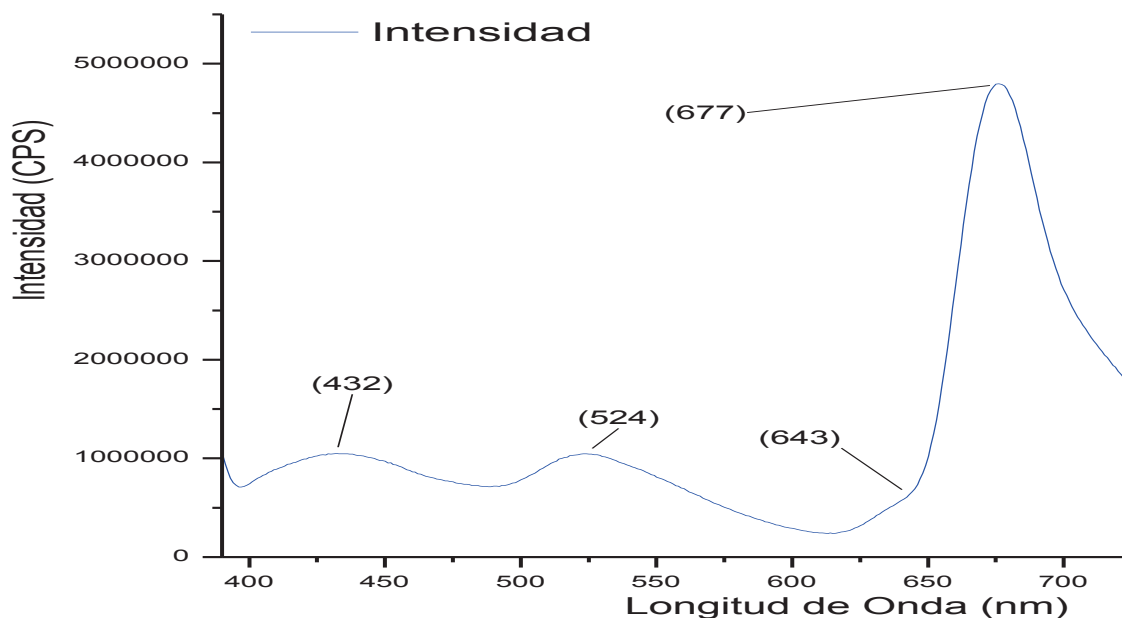


Figura 36. Espectro de emisión con una excitación a 370 nm, donde se observaron 4 picos en 432, 524, 643 y 677 nm.

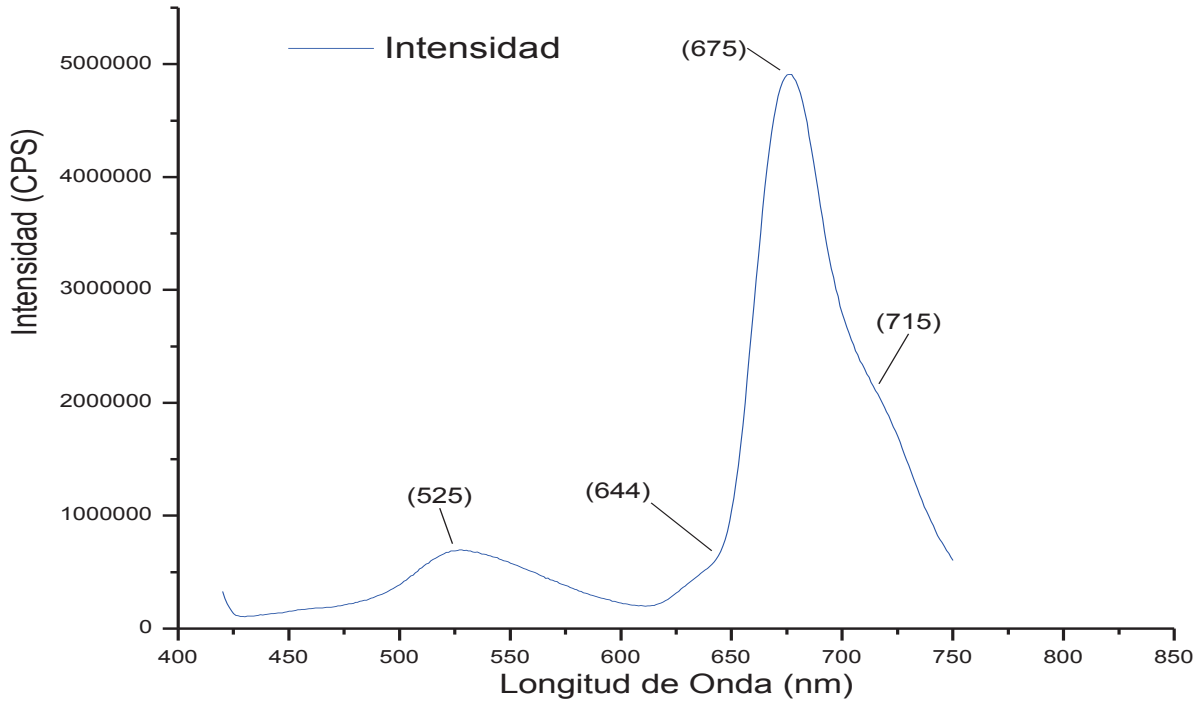


Figura 37. Espectro de emisión con una excitación a 400 nm donde se observaron 4 picos en: 525, 644, 675 y 715 nm.

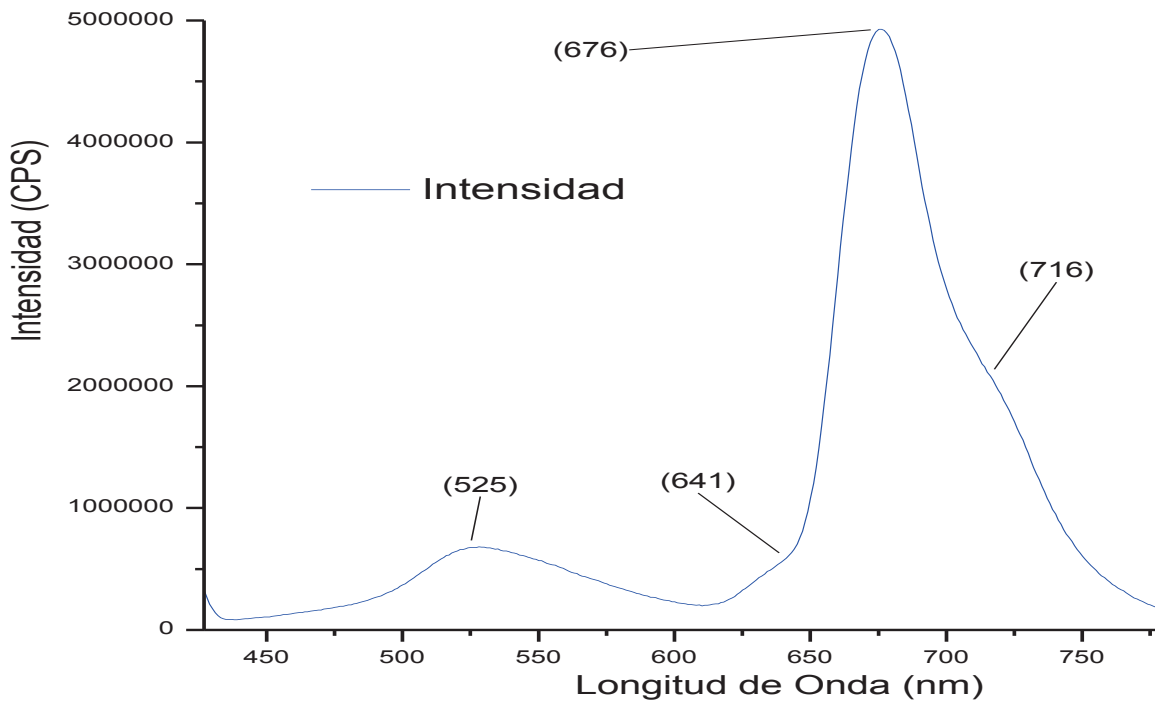


Figura 38. Espectro de emisión con una excitación a 407 nm donde fueron 4 los picos observados: 525, 641, 676 y 716 nm.

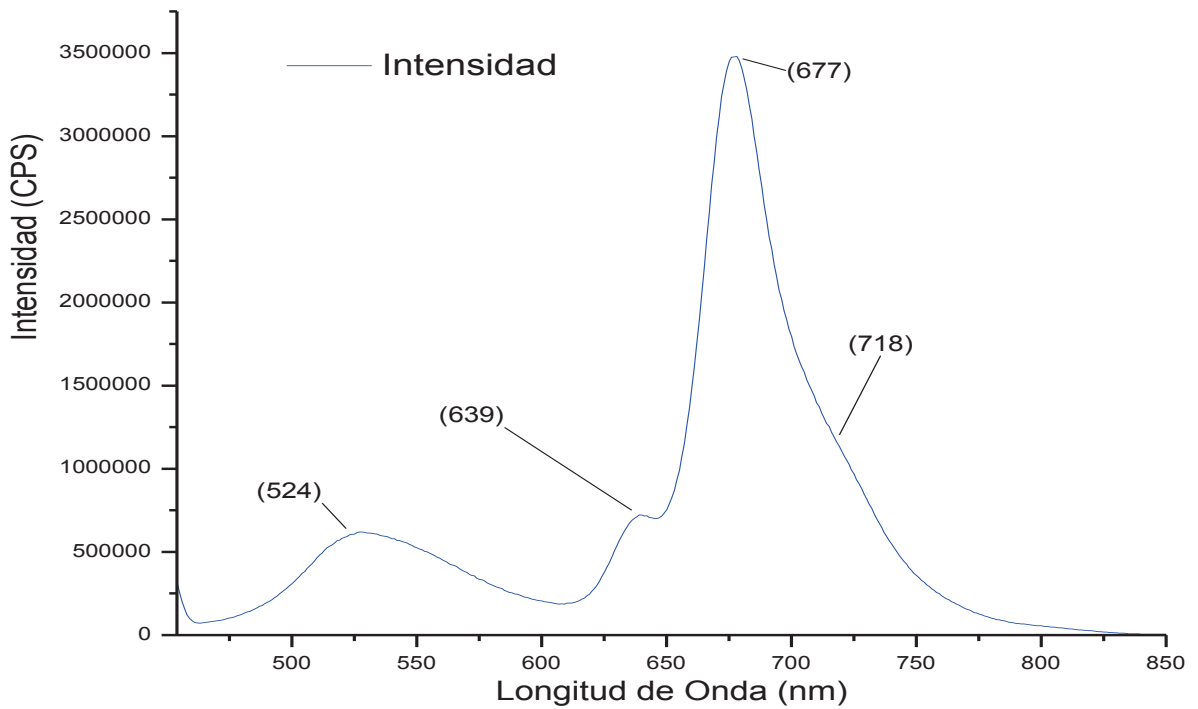


Figura 39. Espectro de emisión con una excitación a 434 nm con 4 picos de emisión detectados: 524, 639, 677 y 718 nm.

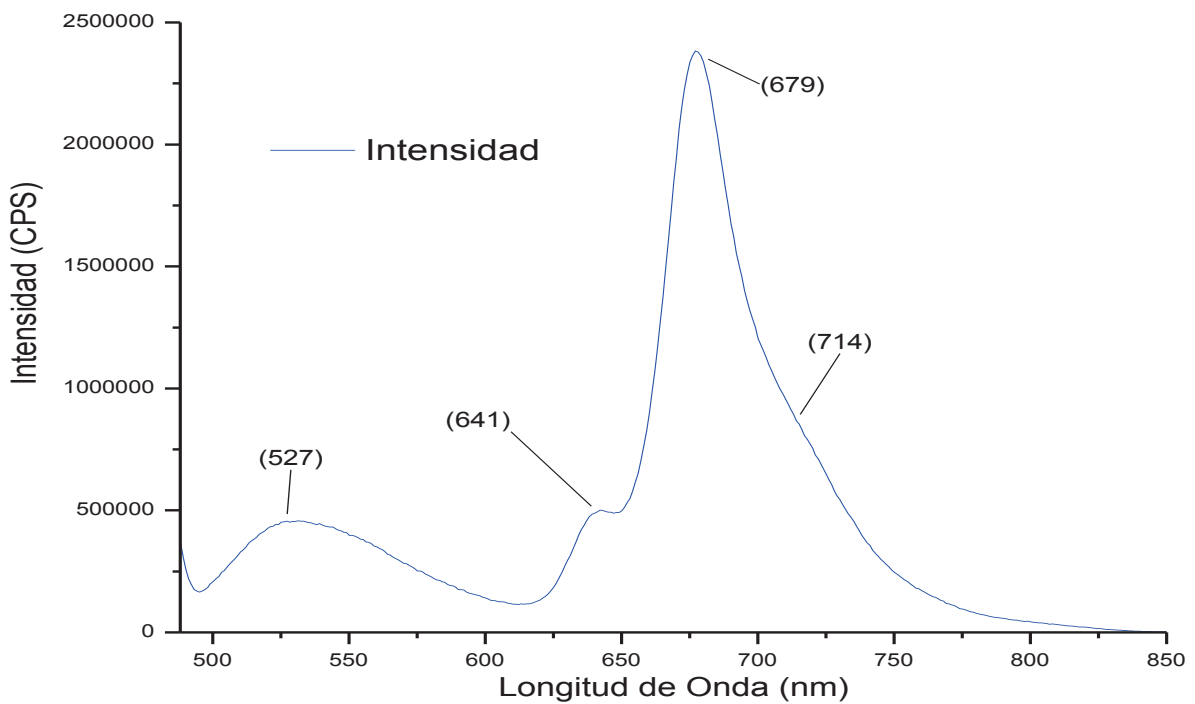


Figura 40. Espectro de emisión con una excitación a 468 nm donde fueron 4 los picos de emisión que se observaron en: 527, 641, 679 y 714 nm.

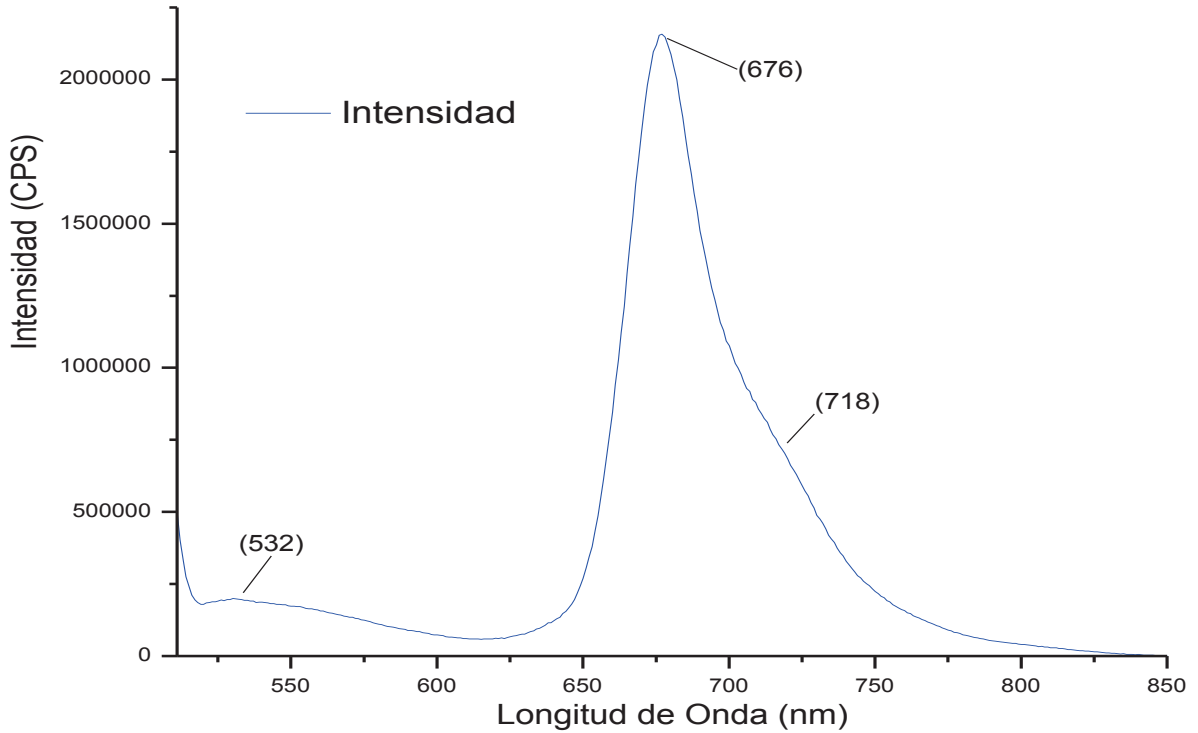


Figura 41. Espectro de emisión con una excitación a 491 nm donde se observaron 3 picos de emisión: 532, 676cy 718 nm.

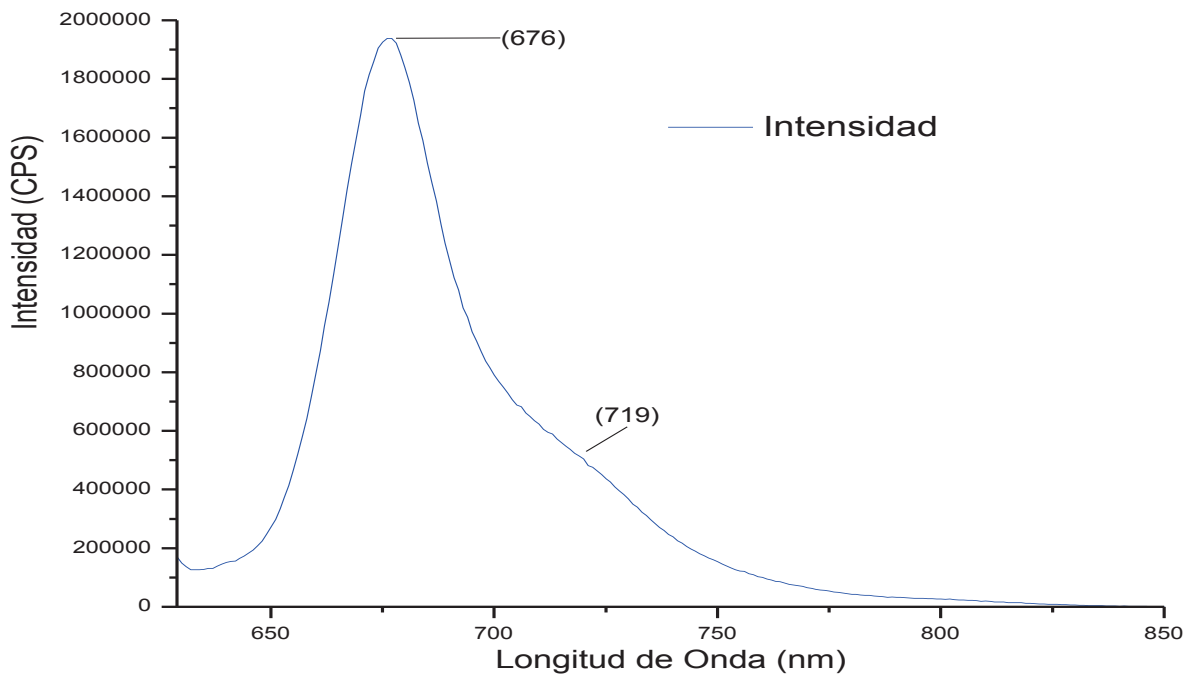


Figura 42. Espectro de emisión con una excitación a 609 nm, donde se detectaron dos picos de emisión: 676 y 719 nm.

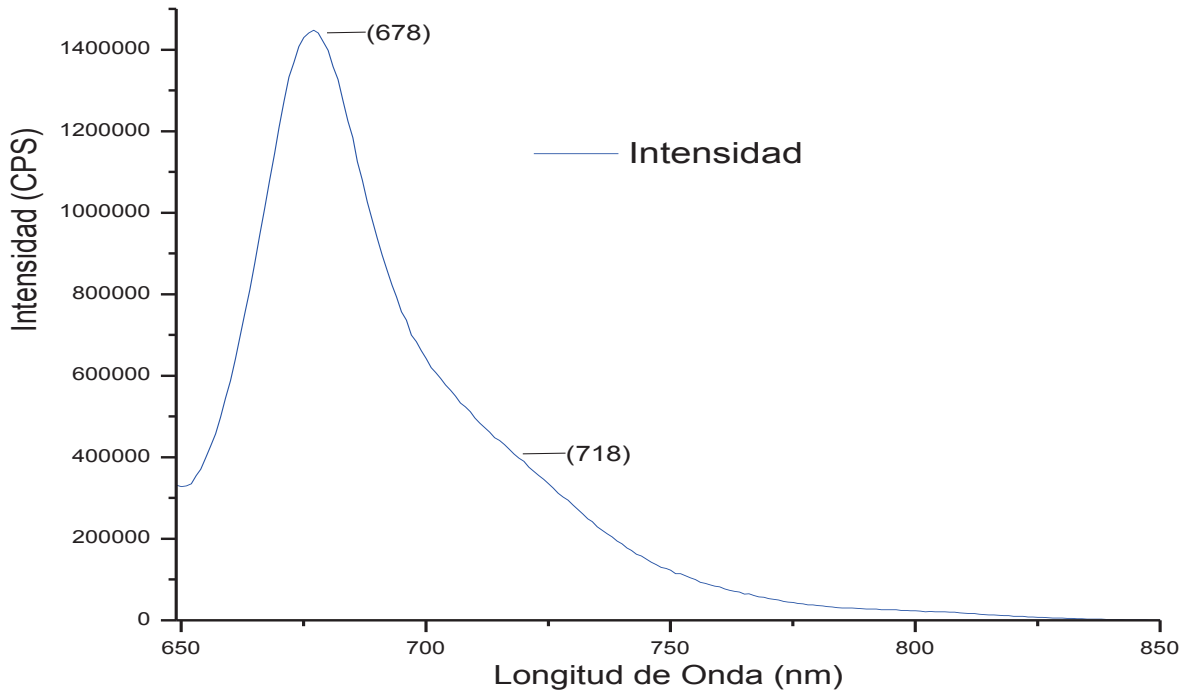


Figura 43. Espectro de emisión con una excitación a 629 nm en el cual fueron 2 los picos de emisión detectados: 676 y 718 nm.

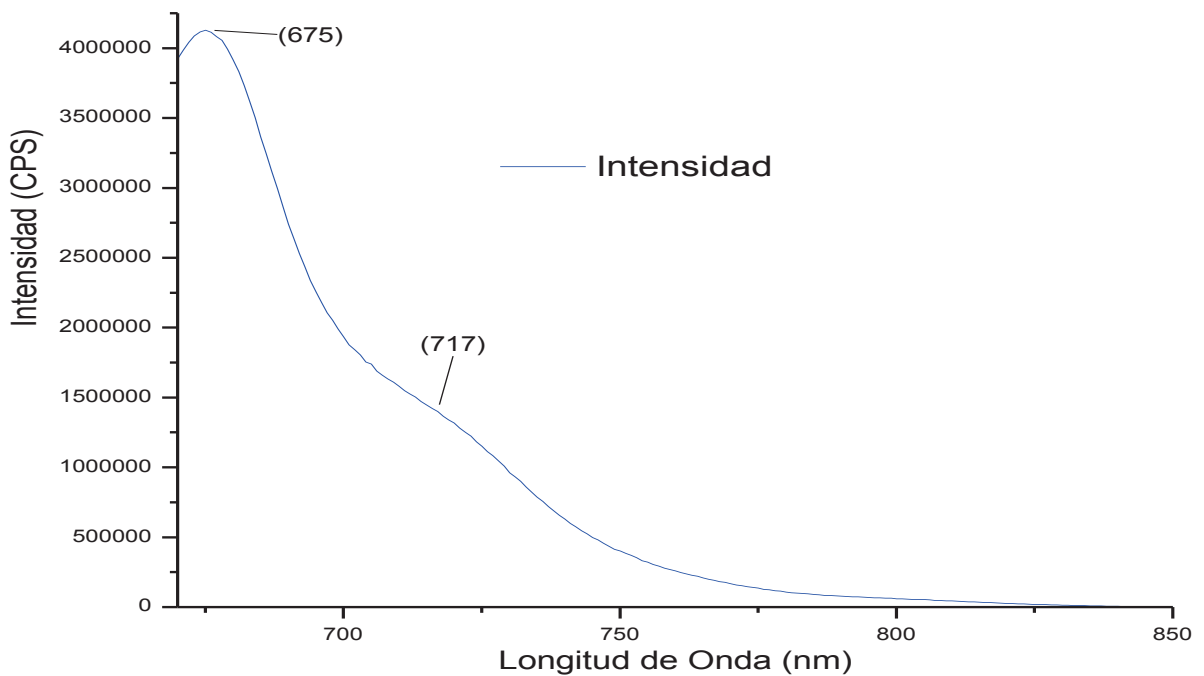


Figura 44. Espectro de emisión con una excitación a 660 nm en donde se detectaron dos picos de emisión: 675 y 717 nm

## VII.2.2 Espectros con rangos de excitación y medición de emisión a una longitud de onda fija

Las siguientes graficas presentan los espectros excitación de la muestra en un rango determinado de longitud de onda, midiendo la intensidad de la respuesta de fotoluminiscencia en una longitud de onda fija. Los picos con mayor intensidad se encuentran marcados y las longitudes de onda entre paréntesis. Para la figura 45 tenemos que se presentan 4 picos (276,307, 364 y 384 nm), los picos de mayor intensidad están en 276 y 307. En la figura 46 son dos los picos de absorción (371 y 455 nm). En el caso de la figura 47 con una emisión a 643nm se detectaron 6 picos de emisión (372, 420, 453, 516, 544 y 585 nm), siendo los más detallados los encontrados en 420, 544 y 585 nm. Para la emisión fija en 677 nm fueron 5 picos de emisión (404, 508, 537, 566 y 613 nm) donde los de mayor intensidad se encontraban en 404 y 613 nm. El ultimo espectro con emisión en 735 nm presento un total de 9 picos, siendo los más marcados aquellos en 246, 286, 310, 333, 414 y 672 nm

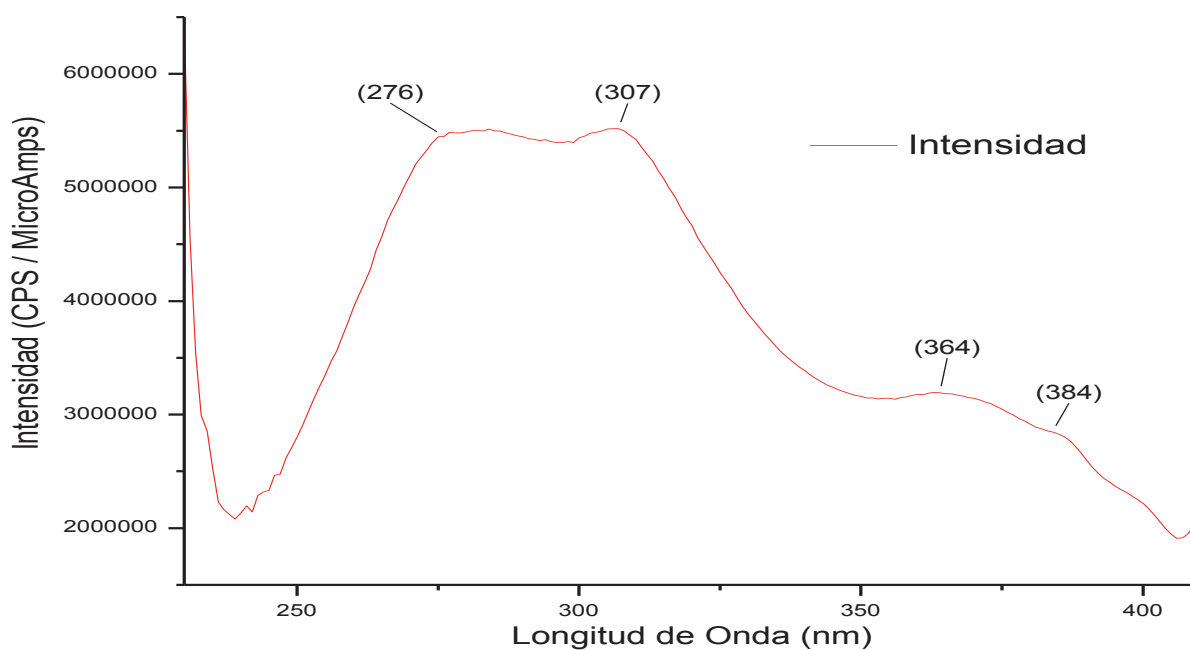


Figura 45. Espectro de excitación con una emisión fija en 432 nm. Donde fueron 4 los picos detectados: 276 307, 364 y 384 nm.

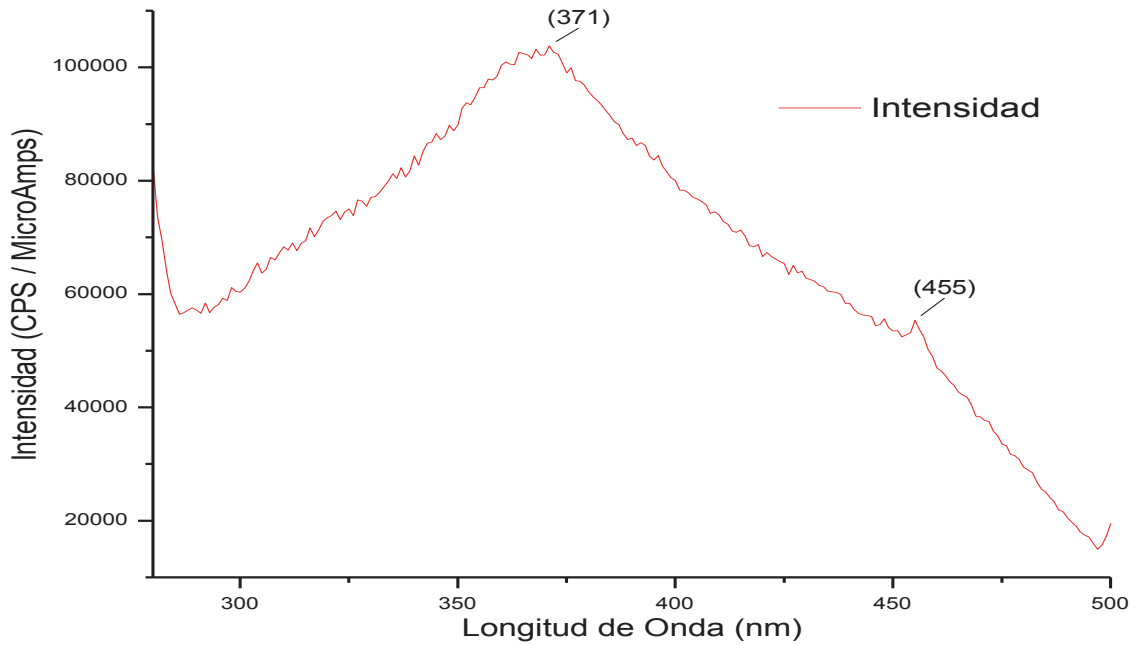


Figura 46. Espectro de excitación con una emisión fija en 524 nm. Las irregularidades presentadas por el espectro son debido al empleo de una menor abertura de la rendija de emisión comparada con una rendija de 5 nm, que se utilizó para las otras. Se detectaron 2 picos uno en 371 y 455nm

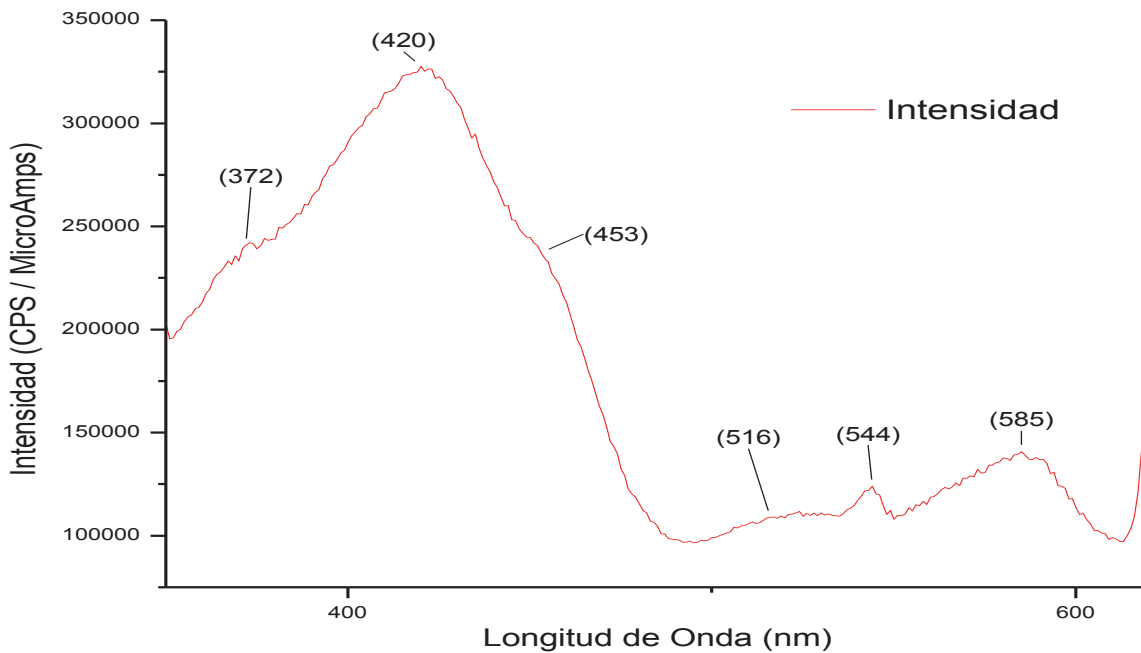


Figura 47. Espectro de excitación con una emisión fija en 643 nm. Con 6 picos detectados: 372, 420, 453, 516, 544 y 585 nm.



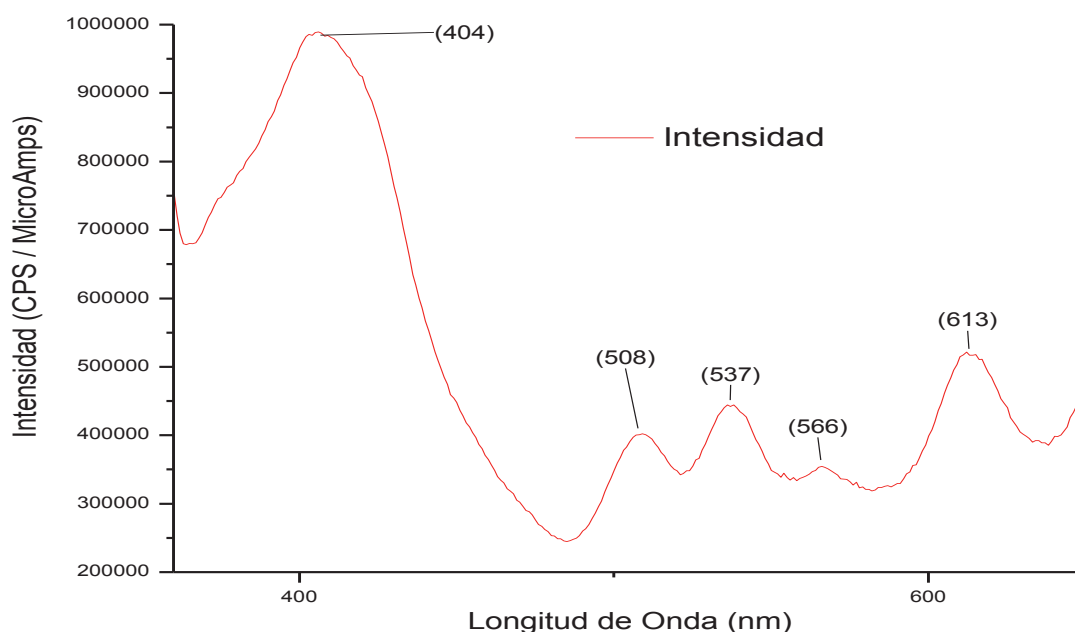


Figura 48. Espectro de excitación en 677 nanómetros como emisión fija. Donde se detectaron 5 picos: 404, 508, 537, 566 y 613 nm.

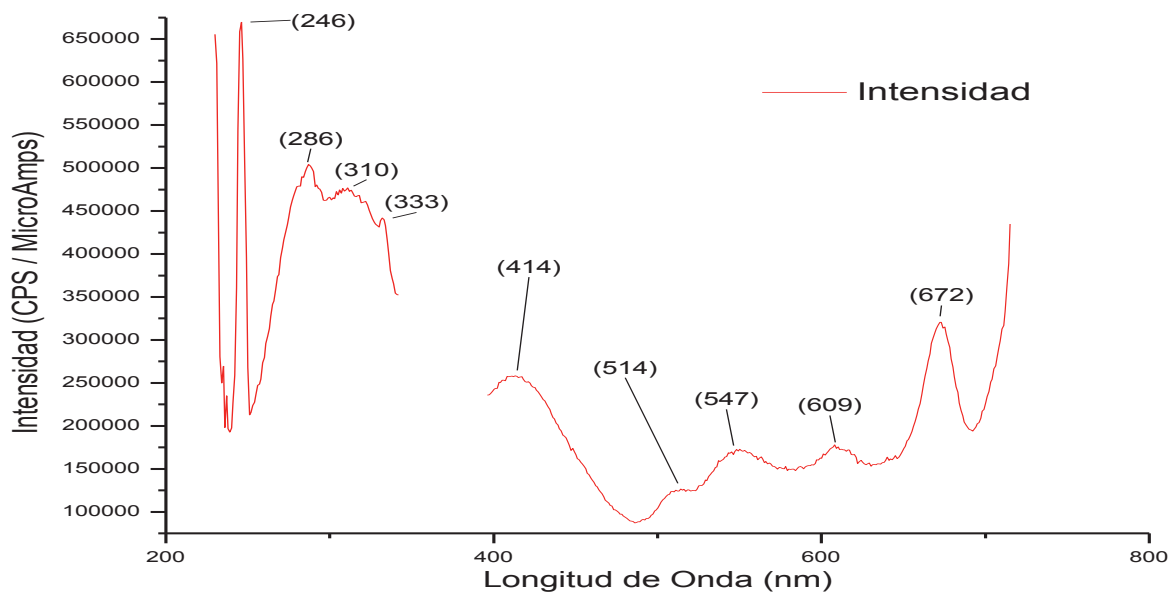


Figura 49. Espectro compuesto que muestra las partes de alta y baja energía del espectro de excitación con emisión en 735 nm. La discontinuidad muestra la sustracción del reflejo de la luz de excitación cuya intensidad es muy elevada con respecto a la intensidad de emisión de la muestra analizada. Con 9 picos, 4 de ellos en la región de alta energía (246, 286, 310 y 333 nm) en la parte de alta energía y 5 en la región de baja energía (514, 514, 547, 609 y 672 nm)

### **VII.2.3 Espectros a una longitud de onda de excitación fija y medición de los rangos de emisión mediante pulsos de luz**

Los siguientes espectros muestran la intensidad de la luminiscencia de la muestra al ser excitada usando una serie de pulsos de luz en un tiempo de milisegundos a una longitud de onda determinada. No se pudieron detectar picos bien definidos como en el caso del espectro anterior, sin embargo se puede apreciar el aumento en la intensidad de la fotoluminiscencia en las regiones de alta energía (350-450 nm) esto para las mediciones con un tiempo de retraso de 0 y 0.01 ms. En el caso de la medición con un tiempo de retraso de 0.04ms (línea de color naranja), el tiempo de detección es demasiado lento como para poder armar un espectro, sin embargo se detectan rastros de luminiscencia. También se detectó una disminución en la intensidad de los espectros conforme aumentaba el tiempo de retraso.

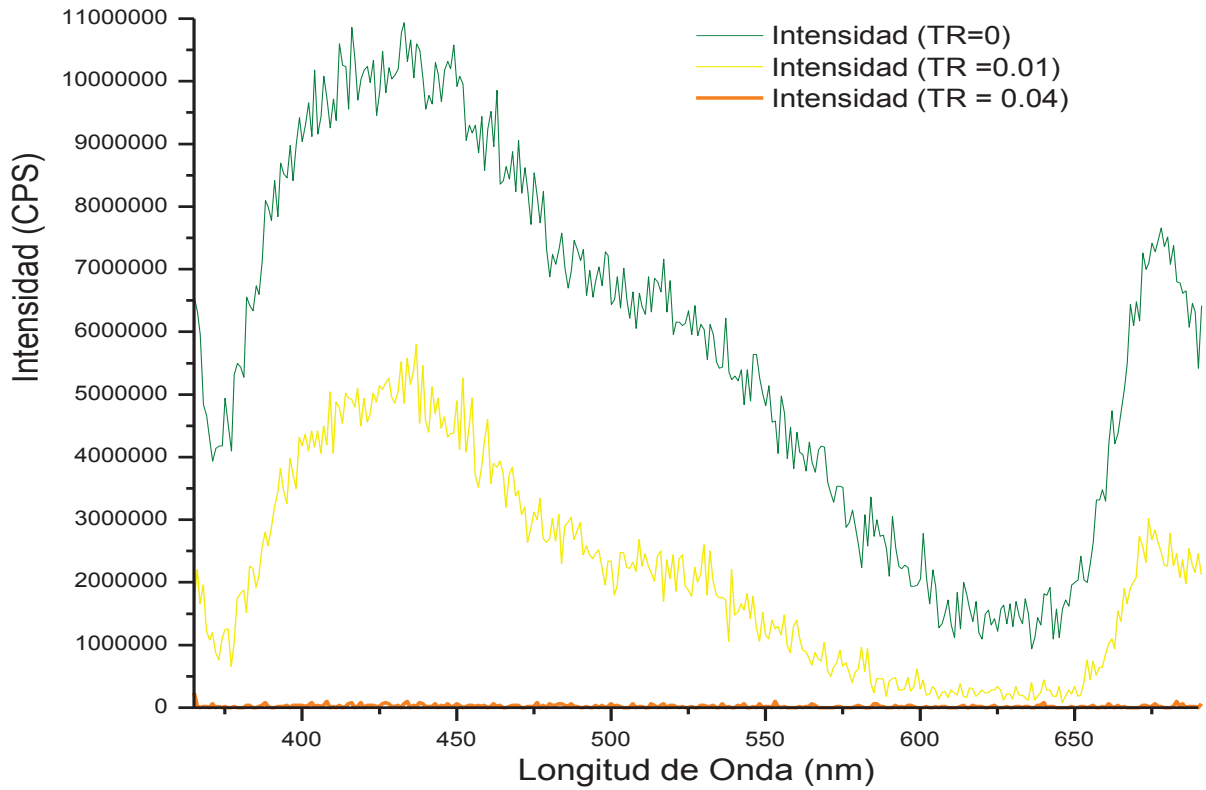


Figura 50. Espectros de excitación mediante pulsos de luz con excitación a 350 nm y medición de 365-690 nm. Línea verde: tiempo de retraso 0, tiempo por pulso 50, conteo de 25 pulsos y un tiempo de integración de 100 ms. Línea amarilla: tiempo de retraso 0.01, tiempo por pulso 50, conteo de 25 pulsos y un tiempo de integración de 100 ms. Línea naranja: un tiempo de retraso 0.04, tiempo por pulso 50, conteo de 25 pulsos y un tiempo de integración de 100 ms.

### VII.3 Picos de Absorción, Excitación y Emisión

A continuación presentamos una tabla en la cual se enlistan las mediciones de los picos de absorción, excitación y emisión.

Tabla II. Máximos de absorción registrados en el espectrofotómetro.

Número de veces detectado	Numero de Medición	Longitud de Onda de los Picos de Absorción	Rango de Variación
15	1	366 – 368– 368– 368	361-370
	2	368 – 366– 365- 370 –369	
	3	366 – 363 – 369 –366	
	4	368	
	5	361	
24	1	408 – 406– 408– 404	406 - 411
	2	406 – 408 – 409 – 406 – 405	
	3	408 – 410 – 410 – 408 – 407	
	4	410 – 411 – 407 – 408 – 408	
	5	411 – 407 – 408 – 409 – 407	
11 <sup>a,c</sup>	1	433 – 435 – 438 – 436	433-444
	2	434 – 433 – 427 – 444 <sup>c</sup>	
	3	433	
	4	438 – 434	
	5	439	
21	1	485 – 486 – 486 –488	485-492
	2	487 – 488 – 487 – 485 – 485	
	3	487 – 488 – 488 – 487– 491	

	4	487 – 486 – 490	
	5	490– 490 – 486 – 492	
	1	529 – 527 – 527 – 529 – 526	
13	2	531 – 531 – 529 - 529 – 526	526-531
	3	527 – 530 – 526	
1	2	555	555
	1	600 – 602 –605	
10	2	599 – 600 –599 – 602	597-605
	3	599 – 597 – 599	
5	1	622 – 624 – 625 –626 –625	622-626
	1	659 – 659 –660 – 658– 659	
	2	662 –659 – 663 – 666– 660	
25 <sup>a</sup>	3	660 – 662– 663– 662– 660	658-666
	4	663 – 661 – 659– 658 – 663	
	5	662 – 662 – 659 – 662 – 664	

Tabla III. Máximos de emisión registrados en el espectrofluorómetro de acuerdo a la longitud de onda de excitación.

<b>Longitud de Onda de Excitación (nm)</b>	<b>Picos de Emisión</b>
370	432 – 524 – 643 – 677
400	525 – 644 – 675 – 715
407	525 – 641 – 676 – 716
434	524 – 639 – 677 – 718
468	527 – 641 – 679 – 714
491	532 – 676 – 718
609	676 – 719
629	678 – 718
660	675 – 717

Tabla IV. Máximos de emisión registrados en el espectrofluorómetro en un rango de excitación y una emisión a una longitud de onda fija

<b>Longitud de Onda de Emisión</b>	<b>Rango de Excitación</b>	<b>Picos de Longitud de Onda de Excitación</b>
432	230 - 410	276 – 307 – 364 – 384
524	280 - 500	371 – 455
643	350 - 620	372 – 420 – 453 – 516 – 544 – 585
677	360 - 650	404 – 508 – 537 – 566 – 613
735	230 - 342	246 – 286 – 310 – 333
	396 - 715	414 – 514 – 547 – 609 – 672

## VIII. DISCUSIÓN

Se pueden observar diferencias en las lecturas de la medición de los picos de absorción, siendo esta no mayor a 8 nm (Tabla II). Dentro de las posibles explicaciones para esta variación, así como para la aparición y desaparición de algunos picos se encuentra la posibilidad de una degradación en los pigmentos que diera lugar al desvanecimiento de los picos y con esto a la pérdida de precisión en la medición, ya que podemos ver que con el paso del tiempo entre medición y medición parece existir una variación mayor entre las primeras mediciones hechas y las últimas, otra posible explicación es que en las últimas mediciones el material de las muestras se depositó en su mayoría en el fondo de las celdas haciendo con esto que la muestra quedara dividida en dos partes claramente diferenciables por su densidad, sin embargo esta separación tan marcada fue observada claramente solo a partir de la tercera serie de mediciones.

Es importante notar que en la primera medición (figura 11) los valores menores de 529 nm para la primera serie se omitieron porque presentaban un efecto de saturación, lo cual fue generado por una alta densidad de pigmentos en la solución. Por esta razón para las siguientes medidas las soluciones se diluyeron usando mitad de muestra y mitad solvente. En las siguientes medidas se ve claramente la formación de picos en la región de 300 a 450 nm.

Los picos que aparecieron en la mayoría de las mediciones son 3, el primero en un rango de 406-411 nm, el segundo de 485-494 nm y el último de 658-666 nm (resaltados en gris en la tabla II). Los dos primeros casos parecieran deberse a carotenoides, esto si comparamos con los valores reportados por Bacon (2001) para el caso del  $\beta$ -caroteno (425, 448 y 475 nm) luteína (421, 445 y 474 nm), violaxantina (418, 442 y 466 nm), neoxantina (418, 442 y 467), sin embargo el pico de 406 a 411 es posible que se deba a las clorofilas *a* y *c*, en cambio el tercer pico con más detecciones pertenece a la segunda región de absorción de las clorofilas (Sakshaug *et al.*, 1991). Hay casos especiales en los cuales ciertos picos solo se detectaron una sola vez (555 nm) o solo durante las primeras mediciones (583-605 nm). Basándonos en el fenómeno de la separación de las muestras en dos fases suponemos que para el caso de los 3 picos más representativos se deben a una alta concentración de pigmentos absorbentes en dicha zona del espectro.

Schofield *et al.*, (1990) reportan para el caso particular de la diatomea *Chaetoceros gracile*, picos de máxima absorción dentro del rango de 370-400 nm cercanos a la luz UV así como también un pico de absorción cercano a los 675 nm, los cuales difieren con el total de picos que fueron detectados en nuestro experimento. Otra de las diferencias con respecto a Schofield *et al.*, fue la posición relativa de los picos de absorción en el extremo cercanos al rojo, que en base a su diseño experimental parece atribuirse a las condiciones de cultivo. Al comparar con estos resultados encontramos algo parecido como los principales picos de absorción que se encuentran en la región UV en el rango de 363-411 y también en el extremo del rojo en un intervalo de 658-666, dentro de las posibles explicaciones para estas diferencias tenemos que la medición de los espectros de absorción se llevó a cabo usando suspensiones diluidas de los cultivos de micro-algas en cambio nuestros estudios fueron realizados usando los pigmentos extraídos, además de que el solvente usado en nuestras mediciones era acetona en lugar de una suspensión diluida del medio de cultivo, por ultimo las diferencias en las condiciones de cultivo pudieron haber influido en la abundancia relativa de los pigmentos.

Por otra parte, comparando con los datos presentados por Kiang *et al.*, (2007), tenemos que presentan picos de absorción, para la clorofila *a*, en 700 nm y 680 nm en la mayoría de las plantas superiores y algas verdes donde estas medidas corresponden a los fotosistemas que conforman parte del aparato fotosintético, sin embargo en nuestras mediciones no hay un pico que corresponda exactamente con estas longitudes de onda siendo el más cercano el que se encuentra en el rango de 658-666 nm. En cambio Lee *et al.*, (2013) reportan picos cercanos a los 435 y 676 nm también para la clorofila *a*, en este caso para el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. En otro trabajo Bacon (2001) reporta dos casos particulares, uno para dinoflagelados donde el pico de 435 nm se asocia a los carotenoides, mientras que un pico en los 669 nm representa exclusivamente a la clorofila *a*, y el segundo caso reportado por Bacon (2011) para el alga parda del grupo de las Phaeophyta (*Acrocarpia paniculata*) donde marca picos de absorción de 424, 444 y 470 nm para la fucoxantina, otros picos de absorción a los 436 y 465 nm, el primero perteneciente a la clorofila *a* y el segundo a la clorofila *c*<sub>2</sub>. Sin embargo tanto las mediciones presentadas por Lee *et al.*, (2013) y Bacon (2001) están hechas *in vivo*, lo cual ocasiona que los picos de absorción se corran hacia la región del rojo (Kato *et al.* 1989 y Bacon 2001) esto debido a los enlaces a distintos complejos proteicos, esto podría explicar las diferencias con respecto a nuestras mediciones.



En base a lo reportado por Nobel (2009) la clorofila *a* tiene dos bandas de absorción una en el extremo del azul a 430 nm (conocida también como banda de Soret) y otra en el rojo a 662 nm, en nuestro caso encontramos la primera banda en el rango de 433-444 nm y la segunda en 658-666 nm (marcados en la tabla II con el superíndice “a”). En cambio distintos autores como Jeffrey y Wright (1987), y Fawley (1989) reportan que los puntos de máxima absorción para los distintos tipos de clorofila *c* en dietil-éter son 628, 578 y 444nm para  $c_1$ , para  $c_2$  629, 582 y 448 nm, comparando con nuestros resultados tenemos picos que cercanos a esas lecturas ya que detectamos picos en 622-626, 605-597 y 433-444 nm (resaltado en verde en la tabla II). Por último (resaltado en azul claro) se encuentra el caso donde si bien se ve una variación en los picos de absorción no resulta posible distinguir si la contribución es de la clorofila *a* o de alguna de las variedades de clorofila *c*.

Posterior a la quinta serie de mediciones, una de las muestras fue agitada hasta que la muestra se homogenizo y se midió su absorción, esto para ver si la desaparición de los picos era por una degradación completa de los pigmentos o se debía a la separación de fases que se había observado. El espectro que aparece (ANEXO 4) guarda cierta similitud al obtenido con las primeras mediciones, sin embargo presenta algunas irregularidades sobre todo en la región de los 350 a 400 nm.

De acuerdo a los datos de la tabla III podemos ver que para casi todas las absorciones indicadas como “longitud de onda de excitación”, las emisiones son casi las mismas. Como sabemos que cada longitud de onda está asociada a una energía fotónica y cada energía absorbida es la diferencia entre dos niveles de energía de los pigmentos fotosintéticos. Así que se presentan 5 transiciones desde el estado base a 5 estados excitados (entre 370 y 491 nm) que decaen desde 4 estados comunes generando 4 emisiones (432, 524, 643 y 677nm). Esto son estados comunes donde se da el decaimiento de los elementos fotosintéticos, sin importar de qué elemento se trata. Para la absorción de 491nm no se alcanza a distinguir la emisión de 641 nm, seguramente porque su intensidad es muy pequeña. Las absorciones de 609, 629 y 660 nm también se asocian a 3 niveles de menor energía que decaen a 2 niveles desde los cuales se presentan las emisiones de 677 y 718 nm. Estos 3 niveles son usados como medios de decaimiento de los 5 niveles de mayor energía. Por esto resulta difícil identificar cada uno de estos pigmentos utilizando los resultados de emisión.

Debido a las diferencias en el comportamiento de los carotenoides en un complejo de pigmentos y solventes orgánicos (Katoh *et al.* 1989 y Bacon 2001) tenemos que la mayoría de los picos de emisión en el rango de 400-500 nm pertenecen al grupo de los carotenoides entre ellos la fucoxantina (Mimuro y Akimoto 2003), , en cambio aquellos cercanos al rango de 600-700 nm se deben a la emisión procedente de absorción de la banda de Soret para distintos tipos de clorofila *a*, *c*<sub>1</sub> y *c*<sub>2</sub> (Jeffrey y Wright 1987; Nobel 2009).

Observando las figuras correspondientes a esta prueba y a los valores de los picos podemos ver claramente que el pico con mayor intensidad es el que se registra en la longitud de 675-678 nm donde este corresponde a la primera emisión de fluorescencia de la clorofila *a* y se debe a la excitación de la clorofila en su región de más alta energía (la región cercana a los 400 nm) lo cual se puede apreciar en la disminución de la intensidad del pico en 675-678 conforme la longitud de onda va haciéndose más grande (Papageorgiou 2004; Nobel 2009).

En principio, los espectros de excitación nos deberían revelar el tipo de centro emisor. Sin embargo a pesar de las claras diferencias entre los espectros, su análisis resulta complejo debido a que algunos centros emisores parecen sobreponerse y no poseemos cada pigmento por separado para poder comparar con el espectro completo. Para la emisión de 432 nm, es de esperarse que esta provenga de un nivel de mayor energía, por lo que deberíamos observar los picos de absorción a longitudes menores a 432 nm. Según el espectro de excitación observado, las energías con mayor intensidad se presentan alrededor de 300 nm que correspondería a un carotenoide según Schofield *et al.*, (1990) y Hiller (1999), tentativamente estas mediciones indicarían la acción de protección de los carotenoides. Para la emisión de 524 nm, la absorción es mas intensa alrededor de 371 nm, lo cual pudiera deberse a la absorción de la fucoxantina. En cambio las absorciones que dan lugar a las emisiones de 643, 677 y 715 nm tienen una fuerte componente alrededor de 420 nm donde algunos autores consideran que es una de las longitudes de onda de absorción de los carotenoides la cual se asocia a las reacciones fotosintéticas (Hiller 1999; Mimuro y Akimoto 2003), mientras que otros autores la atribuyen principalmente a la clorofila *a* (Bacon 2001; Nobel 2009). Para las emisiones de 643, 677 y 715 nm podemos notar algunas diferencias en la region de mayor longitud de onda de los espectros de las figuras 47-49.

Además, la tabla IV nos muestra los picos donde se presenta una mayor intensidad al momento de evaluar la emisión a una determinada longitud de onda, esto mientras la muestra

es excitada dentro de cierto rango. Se puede observar que las figuras correspondientes a la emisión de 432 y 677 presentan la mayor intensidad (que se muestra en el eje vertical de las figuras 45 y 48, respectivamente), lo cual concuerda con los resultados de los espectros de absorción esto debido a que las absorciones más altas se dan algunos nanómetros antes si se comparan con las emisiones.

Como caso particular, la figura 49 nos muestra un espectro compuesto, este espectro se formó con ambos extremos del espectro (de alta y baja energía) al cortar la zona comprendida de los 350-380 nm, este corte en las mediciones es necesario debido a que en esa zona dada la naturaleza de la prueba ocurre una anomalía ocasionada por la superposición de las ondas de luz generadas en el espectrofluorómetro y provoca la aparición de picos de emisión que no tienen nada que ver con la respuesta óptica de la muestra (la figura de la medición con la anomalía se muestra en el ANEXO 5). También resulta de gran interés que los picos marcados, si bien son de una menor intensidad comparados con las figuras 45 y 48, representan longitudes de onda que contribuyen a la fotoluminiscencia en la longitud de onda de 735 nm que es la parte lateral de la segunda banda de fluorescencia reportada por algunos autores (Nobel 2009; Bacon 2001) en 728 nm, y que se atribuye al paso de la clorofila *a* de su estado excitado más bajo a su estado base, sin embargo los picos presentes en el espectro de excitación parecen indicar la aportación de otros pigmentos a la emisión de esta longitud de onda.

Estas dos pruebas son complementarias y permiten obtener información detallada de los procesos de fotoluminiscencia de los pigmentos, sin embargo la falta de un método de separación de pigmentos más adecuado resultó una limitante.

No se pudo realizar una tabla para la medición en base a pulsos de luz, esto debido a la naturaleza irregular de las gráficas obtenidas, sin embargo si puede observar parte del comportamiento de la muestra (figuras 50 y 51), incluso a pesar de los tiempos de medición resultarían demasiado altos. En el caso de la figura 52 el tiempo de retraso resulta demasiado alto pero a pesar de que no se puede observar el comportamiento de la muestra nos resultó posible detectar rastros de fotoluminiscencia. Al comparar los resultados obtenidos por Ho *et al.*, (2000) para *Acetabularia acetabulum* y por Scordino *et al.*, (2008) para diferentes algas verdes indican que las concentraciones de distintos metales (cadmio, cromo, cobre y/o plomo) en las condiciones donde habitan las micro-algas ocasionan un fenómeno de luminiscencia

retardada, alterando el tiempo de respuesta normal de luminiscencia haciendo que pase de nano-microsegundos a milisegundos o segundos. En nuestras pruebas usamos mediciones de 100 milisegundos y logramos detectar rastros de luminiscencia, lo que parece indicar la presencia de metales pero no con la suficiente concentración como para ver los efectos de una luminiscencia retrasada hasta segundos completos como la reportada por Scordino *et al.*, (2008).

## IX. CONCLUSIONES

Hemos visto que la forma de preparación de las muestras permitió obtener espectros de absorción claros y con efectos diferenciados por la evolución de los pigmentos. Los espectros de emisión muestran el efecto de absorción de cada uno de los pigmentos. De los resultados de las mediciones y las comparaciones hechas con resultados publicados podemos concluir que las técnicas de absorción óptica y fotoluminiscencia son sensibles a los cambios electrónicos de los átomos que componen los pigmentos de las microalgas y han revelado la presencia de diferentes tipos de pigmentos presentes en la micro-alga *Chaetoceros sp.*. Los picos de absorción máximos mostraron la acción de las clorofilas *a*, *c*<sub>1</sub> y *c*<sub>2</sub> (433-444, 567-605 y 622-626 nm; y un último pico perteneciente exclusivamente a la clorofila *a* en 658-666 nm) y algunos grupos de carotenoides (363-370, 526-531 nm).

Se notó la existencia de la banda de Soret en la región de 400 a 434nm que da lugar a la emisión en 676-678 nm, presente en todos los espectros de emisión. La emisión de 735nm resultó ser una contribución de múltiples pigmentos más allá de solo la clorofila *a*, también variedades de clorofila *c* (región de 420-430) y carotenoides (región de alta energía de 250-350).

Si bien hubo una variación en la localización de los picos de absorción y emisión en el transcurso de los días, fué posible señalar los principales pigmentos pero no con el suficiente detalle como para identificar la contribución exacta de cada uno.

## X. RECOMENDACIONES

Las siguientes sugerencias deberían tenerse en cuenta para continuar y profundizar con este estudio, primero determinar las energías absorbidas y emitidas en diferentes condiciones de cultivo de las micro-algas. También sería recomendable refinar el método de extracción de pigmentos para poder tener los pigmentos por separado y hacer pruebas con ellos, esto se pudiera lograr añadiendo métodos de separación e identificación como por ejemplo técnicas de cromatografía HPLC. Además de probar otros métodos y/o solventes para la extracción de los pigmentos y comparar el efecto sobre los espectros.

De igual forma se recomienda obtener los espectros *in vivo* y compararlos con los obtenidos mediante técnicas de extracción. Y también de realizar pruebas de pulsos de luz con un detector que permitan mediciones de tiempo más cortas, o cambiar de la lámpara de luz pulsada a un láser pulsado que permite reducir el tiempo de adquisición de datos de decaimiento fluorescente y poder ver lo que ocurre a tiempos más corto con las emisiones. Eso permitiría detallar más los procesos activos de los diferentes tipos de pigmentos.

## XI. LITERATURA CITADA

Bacon K. 2001. Role of Carotenoids in Photosynthesis. 229-250 p. En Bacon K. (Eds) Photosynthesis, Springer Netherlands.

Bacon K. 2001. Photosynthesis: An Overview. 1-46 p. En Bacon K. (Eds) Photosynthesis, Springer Netherlands.

Blankenship, R. E. 2008. Appendix: Light, Energy and Kinetics. 258-305 p. En Blankenship, R. E. (Eds) Molecular Mechanisms of Photosynthesis, Blackwell Science Ltd.

Blankenship, R. E. 2008. The Basic Principles of Photosynthetic Energy Storage. 1-10 p. En Blankenship, R. E. (Eds) Molecular Mechanisms of Photosynthesis, Blackwell Science Ltd.

Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70(1-3): 313-321.

Bueche, F. y E. Hecht 2006. Chapter 36 - Reflection of Light. 302-308. En Bueche, F. y E. Hecht (Eds) *Schaum's outline of theory and problems of college physics*. McGraw-Hill. New York

Cahoon, A. B. y M. Timko 2003. Biochemistry and Regulation of Chlorophyll Biosynthesis. 95-131 p. En A. D. Larkum, S. Douglas y J. Raven (Eds) *Photosynthesis in Algae*. Springer Netherlands.

Campbell, N. A., J. B. Reece y L. Urry 2005. Chapter 10 - Photosynthesis. 181-198 p. En Campbell, N. A., J. B. Reece y L. Urry (Eds) *Biology*. London, Pearson Benjamin Cummings. San Francisco, Calif.

Canfield, D. E., M. T. Rosing y C. Bjerrum 2006. Early anaerobic metabolisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361(1474): 1819-1836.

Douglas, S., J. Raven y A. D. Larkum 2003. The Algae and their General Characteristics. 1-10 p. En A. D. Larkum, S. Douglas y J. Raven (Eds) *Photosynthesis in Algae*. Springer Netherlands.

Falkowski, P. 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research* 39(3): 235-258.

Fawley, M. W. 1989. A new form of chlorophyll C involved in light-harvesting. *Plant Physiology* 91(2): 727-732.

Halliday, D., R. Resnick y J. Walker 2005. Chapter 34 – Electromagnetic Waves. 1075 – 1103 p. En Halliday, D., R. Resnick y J. Walker (Eds) *Fundamentals of physics*. New York; Chichester, Wiley.

Hiller, R. 1999. Carotenoids as Components of the Light-harvesting Proteins of Eukaryotic Algae. 81-98 p. En H. Frank, A. Young, G. Britton y R. Cogdell (Eds). *The Photochemistry of Carotenoids*. Springer Netherlands.

Ho, M. W., A. Triglia, F. Musumeci y A. Scordino. 2000. Changes in membrane potential and delayed luminescence of *Acetabularia acetabulum*. *J Photochem Photobiol B* 55(1): 70-73

Hohmann-Marriott, M. F. y R. E. Blankenship 2011. "Evolution of Photosynthesis." *Annual Review of Plant Biology* 62(1): 515-548.

Holland, H. D. 2006. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1470): 903-915.

Jeffrey, S. W. y G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochemical Physiology Pflanzen* 167: 191-194.

Jeffrey, S. W. y M. Veski. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura y S. W. Wright. Paris, UNESCO Publishing: 37-84.

Jeffrey, S. W. y S. W. Wright. 1987. A new spectrally distinct component in preparations of chlorophyll c from the micro-alga *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 894(2): 180-188.

Jones, M. R. y P. K. Fyfe. 2001. Photosynthesis: New light on biological oxygen production. *Current Biology* 11(8): R318-R321.

Kato, T., M. Mimuro y S. Takachi. 1989. Light harvesting particles isolated from a brown alga *Dictyota dichotoma*: A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 976: 233-240.

Kiang, N. Y., J. Siefert, Govindjee y R. E. Blankenship. 2007. Spectral signatures of photosynthesis. I. Review of Earth organisms. *Astrobiology* 7(1): 222-251.



Larkum, A. D. y M. Vesk. 2003. Algal Plastids: Their Fine Structure and Properties. 11-28 p. En A. D. Larkum, S. Douglas y J. Raven (Eds) Photosynthesis in Algae. Springer Netherlands.

Lee, E., R.-L. Heng y L. Pilon 2013. Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer 114(0): 122-135

Li, Y., B. Ren, L. Gao, L. Ding, D. Jiang, X. Xu, Q. Shen y S. Guo. 2013. Less Chlorophyll does not Necessarily Restrain Light Capture Ability and Photosynthesis in a Chlorophyll-Deficient Rice Mutant. Journal of Agronomy and Crop Science 199(1): 49-56.

Liu, W.-m., Y.-l. Yan, K.-j. Liu, C.-h. Xu y S.-x. Qian. 2006. The study of photo-induced ultrafast dynamics in light-harvesting complex LH2 of purple bacteria. Frontiers of Physics in China 1(3): 283-294.

Mimuro, M. y S. Akimoto. 2003. Carotenoids of Light Harvesting Systems: Energy Transfer Processes from Fucoxanthin and Peridinin to Chlorophyll. 335-349 p. En A. D. Larkum, S. Douglas y J. Raven (Eds) Photosynthesis in Algae. Springer Netherlands.

Nobel, P. S. 2009. Chapter 4 - Light. 176-226 p. En Nobel, P. S (Eds) Physicochemical and Environmental Plant Physiology. Academic Press. San Diego,

Nobel, P. S. 2009. Chapter 5 - Photochemistry of Photosynthesis. 228-275 p. En Nobel, P. S. (Eds) Physicochemical and Environmental Plant Physiology. Academic Press. San Diego.

Papageorgiou, G. 2004. Fluorescence of Photosynthetic Pigments in Vitro and in Vivo. 43-63 p. En George C. Papageorgiou y Govindjee (Eds) Chlorophyll a Fluorescence. Springer Netherlands.

Sakshaug, E., G. Johnsen, K. Andresen y M. Vernet. 1991. Modeling of light-dependent algal photosynthesis and growth: experiments with the Barents Sea diatoms *Thalassiosira nordenskioldii* and *Chaetoceros furcellatus*. Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers 38(4): 415-430.

Schofield, O., R. R. Bidigare y B. B. Prézelin. 1990. Spectral photosynthesis, quantum yield and blue-green light enhancement of productivity rates in the diatom *Chaetoceros gracile* and the prymnesiophyte *Emiliana huxleyi*. Marine Ecology Progress Series 64: 11.

Scordino, A., F. Musumeci, M. Gulino, L. Lanzaò, S. Tudisco, L. Sui, R. Grasso y A. Triglia. 2008. Delayed luminescence of microalgae as an indicator of metal toxicity. *Journal of Physics D: Applied Physics* 41(15): 155507

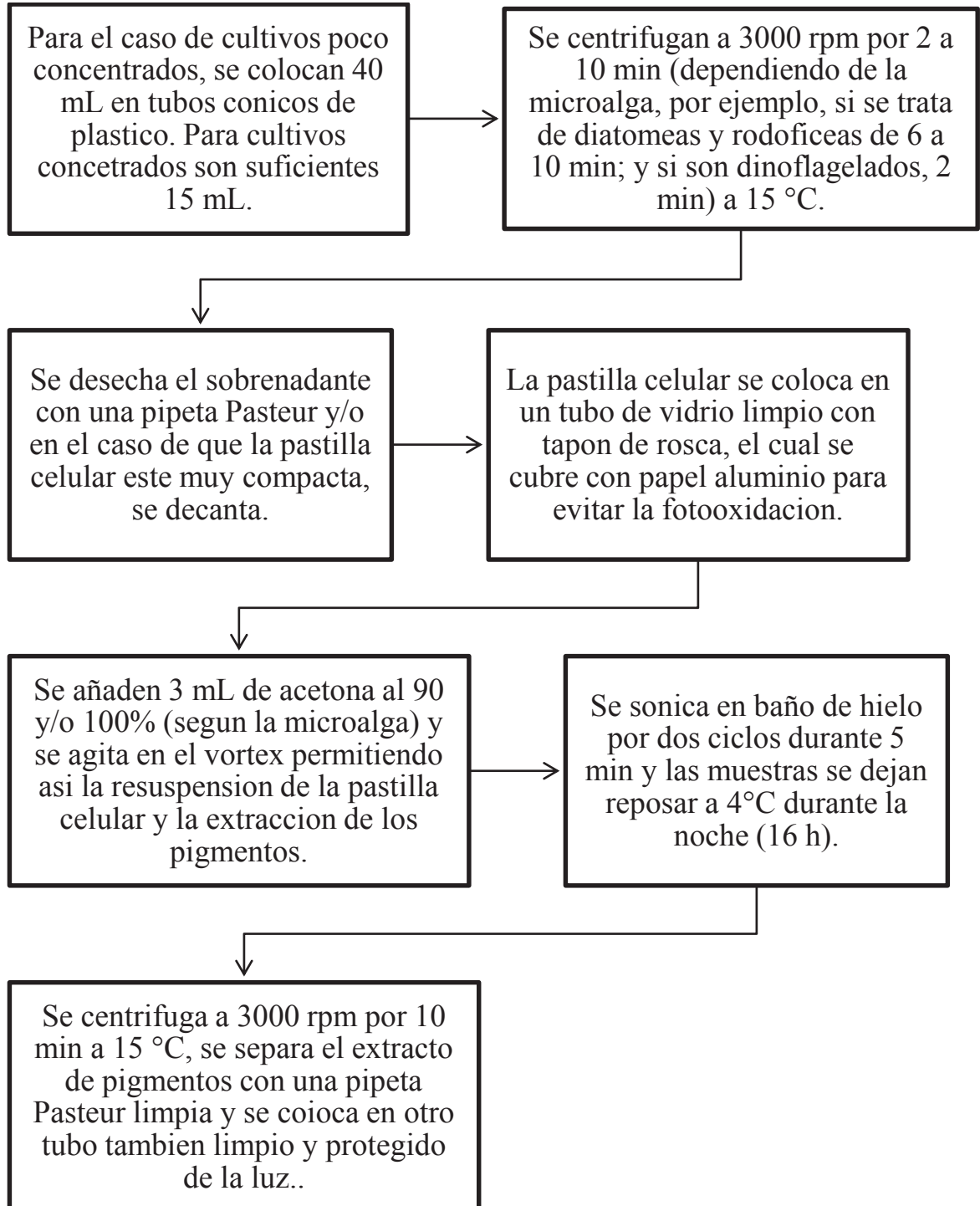
Scordino, A., F. Musumeci, M. Gulino, L. Lanzaò, S. Tudisco, L. Sui, R. Grasso y A. Triglia. 2008. Delayed luminescence of microalgae as an indicator of metal toxicity. *Journal of Physics D: Applied Physics* 41(15): 155507

Sessions, A. L., D. M. Doughty, P. V. Welander, R. E. Summons y D. K. Newman. 2009. The continuing puzzle of the great oxidation event. *Current Biology* 19: R567-574.

Taiz, L. y E. Zeiger. 2002. Chapter 7 - Photosynthesis: The Light Reactions. 111-143 p. En Taiz, L. y E. Zeiger (Eds) *Plant physiology*. Sinauer Associates. Sunderland, Mass. Great Britain.

## XII. ANEXOS

Anexo1. Protocolo para la extracción de pigmentos liposolubles de Jeffrey y Humphrey (1975).



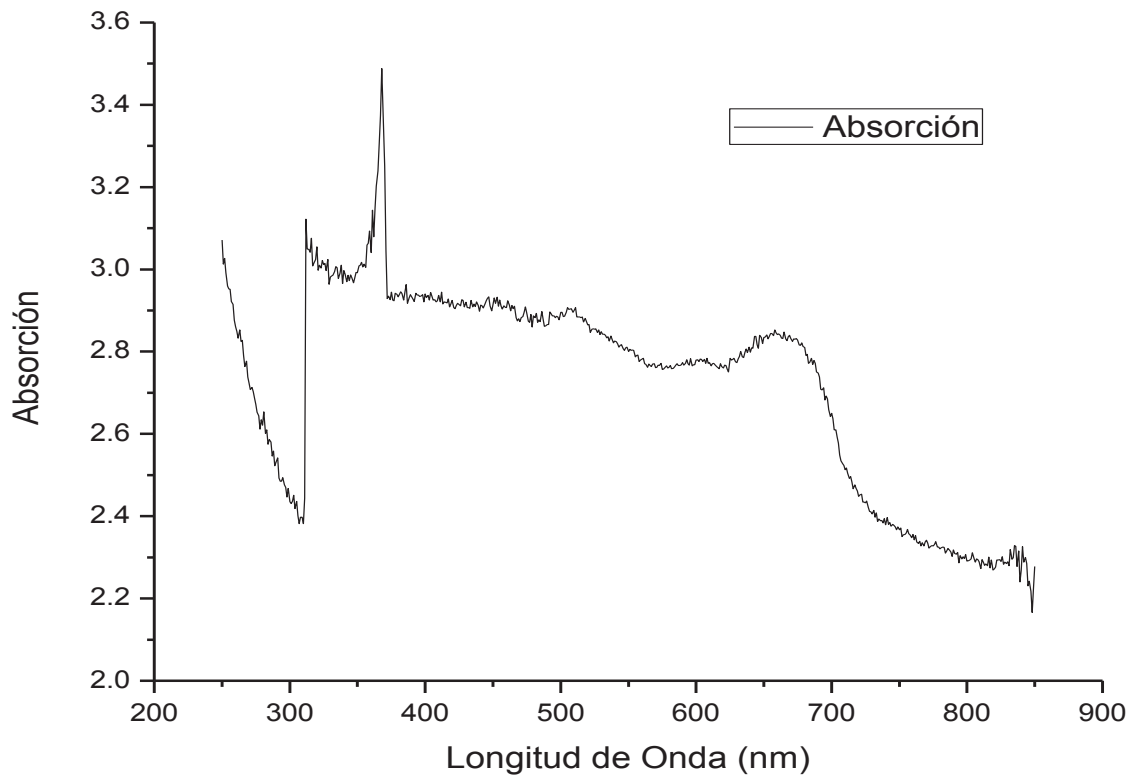
Anexo 2. Espectrofotómetro “Perkin Elmer” modelo Lambda 19



Anexo 3. Espectrofluorómetro “Fluorolog -3 Jobin Yvon”



Anexo 4. Espectro de absorción de la muestra una vez que se volvió a agitar



Anexo 5. Grafica del espectro de emisión con la anomalía

