

Propiedades ópticas de la clorofila

Propuesta de extensión de la práctica de espectroscopía difractiva

La espectroscopía es una técnica con aplicaciones variadas, desde la detección de exoplanetas hasta la industria (como la agrónoma) o la biología (como en la detección de diferentes estados de compuestos basados en un cambio en la emisión de fluorescencia); actualmente, es una de las técnicas más extendidas para el estudio del estado de salud de cultivos a gran escala. En esta práctica se propone que evalúen si pueden establecer parámetros de salud vegetal en función del espectro de emisión de la clorofila.

La clorofila es un componente indispensable de la fotosíntesis. Cuando las plantas comienzan a morir, o se encuentran en situaciones estresantes (falta de agua o nutrientes), se produce la degradación de este componente, lo que en consecuencia produce una variación en su espectro de fluorescencia (principalmente en la intensidad, pero también en el corrimiento de los picos del espectro) [1,2]. Es por esto que la espectroscopía se utiliza como una técnica no invasiva para evaluar el estado de los cultivos.

Para estudiar el espectro de la clorofila deben elegir una planta de hoja, por ejemplo, la espinaca. En primera instancia, deben preparar las muestras de clorofila; para ello, deben triturar las hojas, mezclarlas con alcohol etílico y, luego, filtrar la mezcla. El precipitado de alcohol será de una tonalidad verde y contendrá la clorofila de la planta; será preciso desarrollar un protocolo de preparación de muestras para controlar la proporción de hojas trituradas y alcohol (¿por qué?).

Para observar la emisión de fluorescencia de la clorofila deberán utilizar un láser verde. El montaje experimental se muestra en la Fig. 1, donde el láser se coloca a 90° de la fibra del espectrómetro para su protección y para disminuir su contribución al espectro medido [3]. Para evaluar el efecto del estrés hídrico sobre el espectro de fluorescencia de la clorofila deben realizar diversas muestras: el control con la hoja fresca y otras a las que sometieron a distintos grados de estrés. Piensen cómo pueden provocar estrés a la planta.

Una vez obtenidos los espectros bajo diferentes condiciones podrán compararlos entre sí y con el espectro de fluorescencia esperado para la clorofila, el cual pueden consultar en la bibliografía; deben establecer si encuentran los picos de absorción esperados y evaluar si su sistema de medición permite detectar cambios en la salud de la planta mediante los

espectros obtenidos.

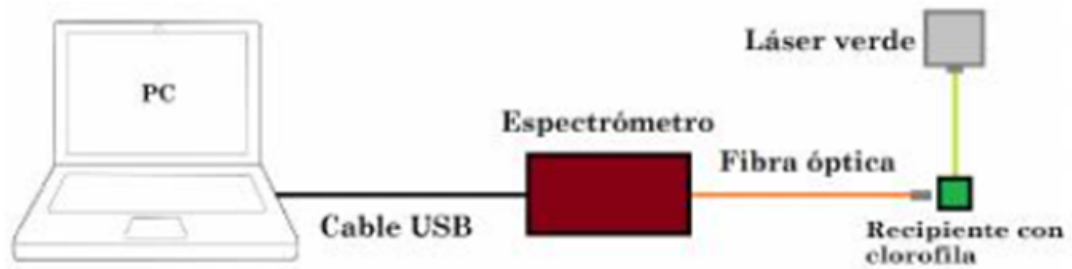


Figura 1: dispositivo experimental para el estudio del espectro de emisión de la clorofila.

Extra: un acercamiento a las imágenes hiperespectrales

Dentro del campo de la espectroscopía, un método muy usado es el de las “imágenes hiperespectrales” (*hyperspectral imaging*), por tratarse de una técnica no invasiva y de aplicación en diversas áreas. Éste consiste, básicamente, en la recolección de imágenes en simultáneo en distintos “canales”, cada uno asociado a un rango acotado del espectro electromagnético (ver Fig. 2). Esto permite obtener una huella espectral para cada píxel de la imagen obtenida. Además de utilizarse un dispositivo más sofisticado, esta técnica requiere de un procesamiento más complejo que en el caso del experimento anterior. Si bien en Laboratorio 5 no contamos con una cámara hiperespectral, se puede realizar una experiencia para aproximarnos al funcionamiento de la técnica y del procesamiento de los datos.

División espectral

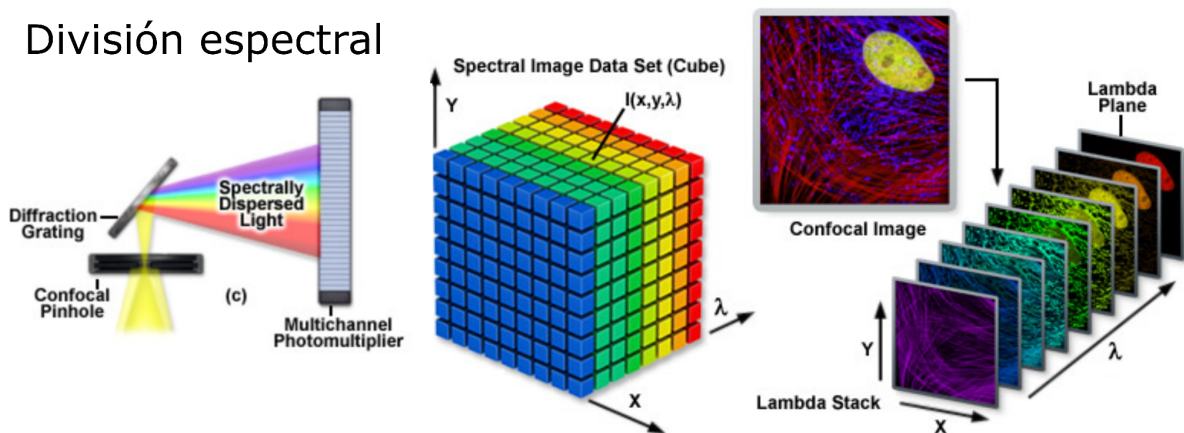


Figura 2: ejemplo de descomposición hiperespectral en un cultivo celular utilizando el módulo lambda de un microscopio Zeiss.

Pueden utilizar la cámara de sus celulares, en lo posible comparando siempre imágenes tomadas con el mismo teléfono. Estas imágenes estarán formadas, en realidad, por tres canales RGB (red, green y blue). Esta separación espectral representa una versión acotada de la técnica de la que estamos hablando y puede resultarles ya conocida.

En primer lugar, deberán separar una imagen en estos tres canales usando Python o cualquier otro lenguaje con el que estén familiarizados. Pueden escribir un código propio o utilizar el disponible en este [link](#). Si bien no hay una conversión directa de RGB a longitud de onda, una aproximación consiste en convertirlo a HSV (hue, saturation, value) y, luego, asociar el H a la longitud de onda (la relación es lineal). Discutan bajo qué condiciones esta aproximación es buena y cómo evaluarlo. Nuevamente, esto pueden hacerlo con un código en Python, obteniendo un resultado similar al mostrado en la Fig. 3. La propuesta es que tomen fotos de plantas en los alrededores del edificio donde vean que hay hojas secas o marchitándose. De vuelta en el laboratorio, deberán procesar las imágenes con su código y evaluar si son capaces de distinguir las hojas en mal estado a partir de su longitud de onda y, en función de esto, establecer un criterio para evaluar la salud de las plantas.

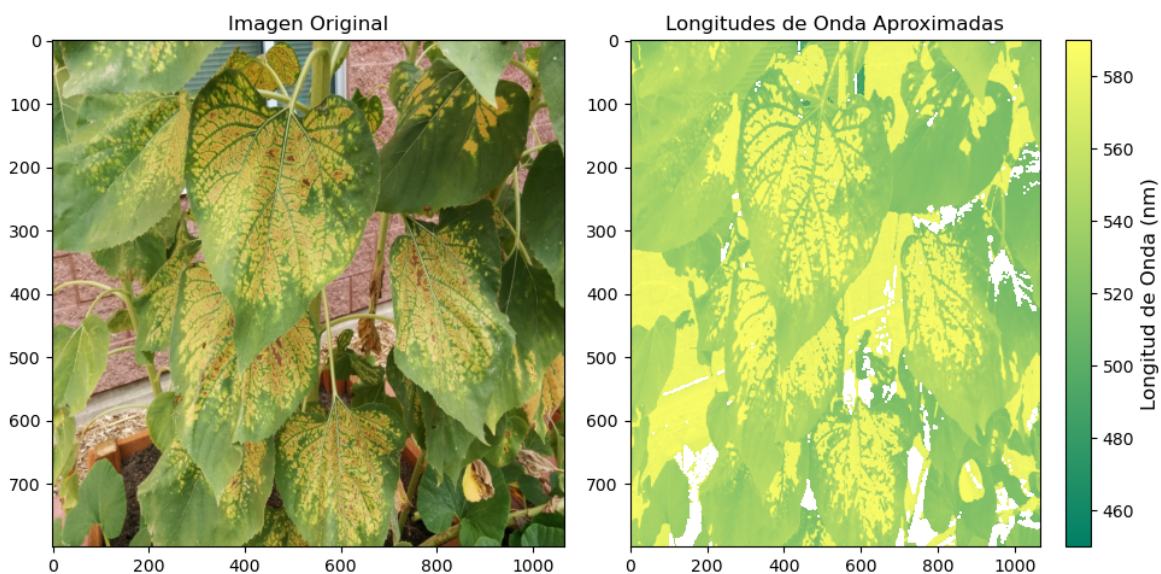


Figura 3: filtrado de la fotografía de una planta para asociar al color de cada píxel una longitud de onda predominante (entre 400 - 600 nm).

En caso de que sobre tiempo: pueden medir el espectro de otros componentes que les resulten interesantes. Una opción es medir la cantidad de Allura E129 (el colorante rojo más utilizado en la industria alimenticia) en diversos alimentos. En años recientes se ha cuestionado el uso de éste por existir evidencias de que en altas concentraciones es dañino. Pueden estudiar a qué concentración corresponde el colorante presente en los

alimentos en base a su espectro, y compararlo con las recomendaciones límites de organismos de salud [4].

Bibliografía sugerida:

[1] K. Maxwell and G. N. Johnson, "Chlorophyll fluorescence - a practical guide", Journal of Experimental Botany, 51, 345 (2000)

[2] G. A. Carter and A. K. Knapp, "Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration", Am J Bot. 88, 4 (2001)

[3] Manual del [espectrómetro](#) disponible en el laboratorio.

[4] K. Rovina, S. Siddiquee, and S. M. Shaarani, "Extraction, Analytical and Advanced Methods for Detection of Allura Red AC (E129) in Food and Beverages Products", Front Microbiol., 27, 7 (2016)