

Práctica 2:

Espectro de absorción de la clorofila

Orozco González Luis René

correo: reneg@ciencias.unam.mx

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Fecha de entrega:

5 de junio de 2020

Resumen

En el presente trabajo, se realiza una comparación entre dos artículos que tienen como objetivo el estudio del espectro de absorbancia de la clorofila. Estos artículos siguen diferentes metodologías para la extracción de la clorofila de las diferentes especies utilizadas en este trabajo. Las muestras de clorofila extraídas se analizan mediante el método de espectrofotometría UV-Visible (UV-Vis) para ver el cambio de la absorbancia de los pigmentos orgánicos con respecto a la longitud de onda de la luz.

1. DESARROLLO DE LA TEORÍA Y FUNDAMENTOS FÍSICOS

Las plantas son organismos más impresionantes en cuanto a captar luz solar se refiere, pues el espectro de luz que absorben es usado para crear azúcares mediante la fotosíntesis. Los responsables de realizar la fotosíntesis (*absorción de la luz*) son los cloroplastos, los cuales contienen pigmentos llamados clorofilas, clasificadas en dos tipos: *clorofila tipo a* y *clorofila tipo b*. La estructura de la clorofila está dada por el tetrapirrol, en cuyo centro hay un ión de Mg^{+2} , con 4 nitrógenos a su alrededor. Por cada N se tiene un anillo con sistemas de dobles enlaces, siendo este último los responsables de la absorción del espectro visible. La clorofila tipo *a* es la responsable directa de las reacciones causadas por la absorción de la luz.

A la clorofila tipo *b* se le conoce como “pigmento accesorio”, pues no interviene directamente con la reacción después de la absorción de la luz, sino que funciona como una antena, la cual transfiere electrones tipo *a* gracias a la energía de la luz que es absorbida. Otros pigmentos accesorios son los carotenos que funcionan de la misma manera que la clorofila tipo *b*. Las clorofilas absorben luz violeta-azul y rojo, reflejando la luz verde como es el caso de la espinaca, mientras que los carotenoides absorben luz verde-azul reflejando la luz amarilla-naranja. Esto suele no notarse hasta que se rompe la clorofila, que es cuando la luz incide.

1.1. Orbitales moleculares

El carbono es uno de los elementos con mayor presencia en las estructuras orgánicas y es debido a los distintos tipos de hibridación, que es básicamente una reorganización de los electrones en los orbitales. El átomo puede tomar distintas formas para formar enlaces con otros átomos de

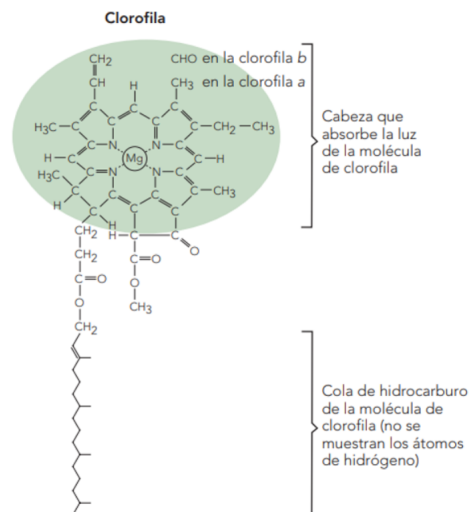


Figura 1: Esquema de la estructura del tetrapirrol, formado por cuatro anillos, uno por cada nitrógeno conectado al Magnesio. La clorofila *a* y *b* se diferencian por el sustituyente en uno de sus anillos. Imagen tomada de la página web: http://almez.pntic.mec.es/~jrem0000/dpbg/Fotosintesis/clorofila_y_pigmentos_accesorios.html

elementos distintos, como el tetrapirrol. En la Figura 1 se puede observar que en la mayoría de los carbonos se tiene doble enlace más dos simples, esto es porque se tiene una hibridación sp^2 como se muestra en la figura 2.

Para entender cómo está formado el tetrapirrol, primero observemos la molécula de etileno en la figura 3. Este es un compuesto aromático y su estructura es bastante similar a los enlaces que forman en la figura 1. Notemos que una vez estando la hibridación sp^2 en el carbono se forma

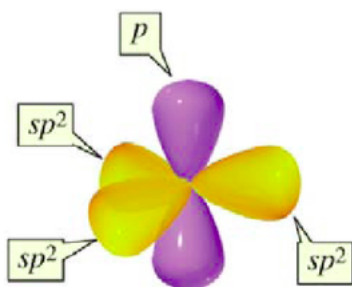


Figura 2: Representación del átomo de Carbono con hibridación sp^2 . Imagen tomada de:[1]

un doble enlace con una extensión sp^2 por cada carbono (enlace σ) y p para cada carbono que forman el enlace π , después de cada sp^2 sobrante se forma un enlace con hidrógeno, como es para ambos carbonos entonces se tienen cuatro hidrógenos por molécula, la relevancia de esto es que debido a los enlaces π y σ se tiene la fluorescencia en el tetrapirrol.

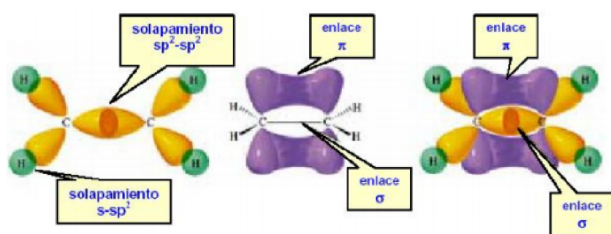


Figura 3: Molécula de etanol formada de un enlace doble (σ y π) de carbono y cuatro enlaces simples con cuatro hidrogenos. Imagen tomada de:[1]

La excitación de electrones en una molécula es similar a la de un átomo, con la diferencia de que en la molécula, cada estado basal o excitado tendrá estados vibracionales debido a que la molécula puede absorber pequeñas cantidades de energía para mantenerse en el mismo estado electrónico, entonces cuando se absorbe la energía necesaria para cambiar el estado (de S_0 a S_1) suben los electrones y estos quedan apareados con los que se encuentran en el estado basal. Más tarde bajan hasta el menor estado vibracional de S_1 (relajación interna no radiante) para después cambiar al estado basal emitiendo radiación en una longitud de onda distinta a la recibida.

1.2. Fluorescencia

La luminiscencia se define como la radiación emitida por un átomo o molécula después de haberla adquirido por excitación de electrones. Hay dos tipos de luminiscencia de acuerdo al tiempo de des-excitación de electrones: la fluorescencia con un tiempo de emisión de 3 a 10 segundos, y la fosforescencia con tiempos de emisión de segundos a horas. Una molécula puede excitarse de dos maneras distintas, la

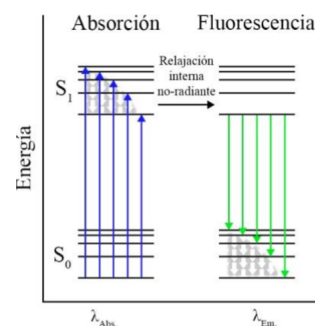


Figura 4: Diagrama de Jablonski, donde se pueden observar los modos vibracionales, los estados basal S_0 y el estado excitado S_1 . Imagen tomada de: <https://www.pngocean.com/gratis-png-clipart-hpirm>

causante de la fluorescencia es cuando los electrones que suben de nivel energético tienen espín contrario a los que no suben de nivel, a esto se le conoce como singulete. Por otro lado, cuando el espín de los electrones excitados no están apareados con los del estado base, se le conoce como triplete y causa la fosforescencia.

Una de las principales características de todos los objetos en la vida cotidiana es su color. El fenómeno físico detrás de los colores se debe a la absorción de luz. La absorción de la energía de la luz ocurre cuando un fotón promueve la transición de un electrón de un estado de menor energía a uno de mayor energía. Los electrones que son excitados posteriormente decaen a su estado base y el decaimiento de los electrones a su vez produce fotones que son emitidos con una particular frecuencia (véase figura:5)

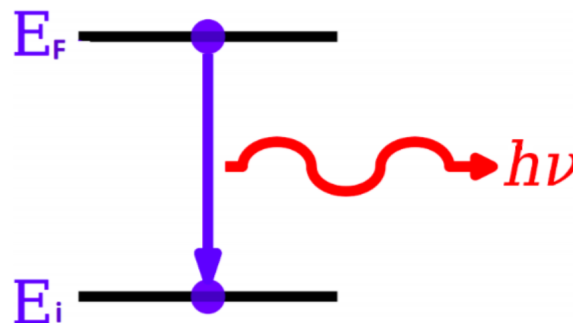


Figura 5: Esquema del decaimiento de un electrón y emisión de un fotón. Imagen tomada de: <http://www.calderglen.s-lanark.sch.uk/wpChemistry/wp-content/uploads/2017/05/Electronic-configuration.pdf>

Los niveles de energía permitidos dependen de la estructura atómica del material. Entonces cada objeto tiene su color característico que depende de la estructura atómica del mismo. La relación entre los niveles permitidos y la frecuencia del fotón emitido están dados por la ecuación

1.

$$\Delta E = E_f - E_i = h\nu \quad (1)$$

Las plantas tienen la propiedad de absorber la energía de la luz solar y convertirla en energía útil para el funcionamiento de su sistema. Dicha propiedad se debe a los pigmentos fotosintéticos que son compuestos orgánicos encargados del proceso de transformación de la energía. La estructura molecular de la clorofila es un anillo tetrapirrólico que contiene un ion de Mg^{+2} en el centro con cuatro nitrógenos (véase figura 6).

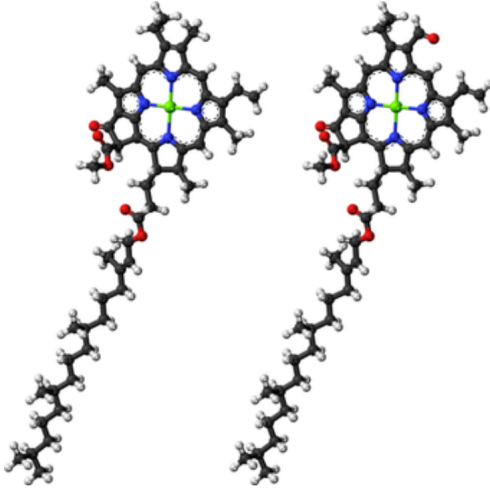


Figura 6: Estructura molecular de la clorofila A (izquierda) y B (derecha). Solamente difieren en un sustituyente del anillo de Porfirina. El elemento verde representa al magnesio; los elementos blancos hidrogenos; los elementos negros carbono, salvo los cuatro elementos de nitrógenos adyacentes al magnesio. Imagen tomada de: https://www.wikiwand.com/en/Chlorophyll_a

El color verde de la mayoría de las plantas es debido a su estructura particular de la clorofila, lo que hace que el espectro de absorción sea menor en el rango $[500nm, 600nm]$. A pesar que siempre se refiera a la clorofila como única, existen dos tipos de clorofila, la A y B, que tienen un espectro de absorción diferente (véase figura 7), pero ambos tipos de se encuentran dentro de cada planta y ambos tienen baja absorvancia en el rango “verde”. Debido a su configuración molecular, la clorofila es una molécula fluorescente que tiene un espectro de absorción y emisión bien definidos, a este tipo de moléculas se le conoce como fluoróforo.[2][1]

1.3. Espectrofotometría y la ley de Lambert y Beer

La espectrofotometría es un método científico utilizado para medir cuanta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución de muestra. Todos los métodos espectrofotométricos se basan en dos leyes que combinadas

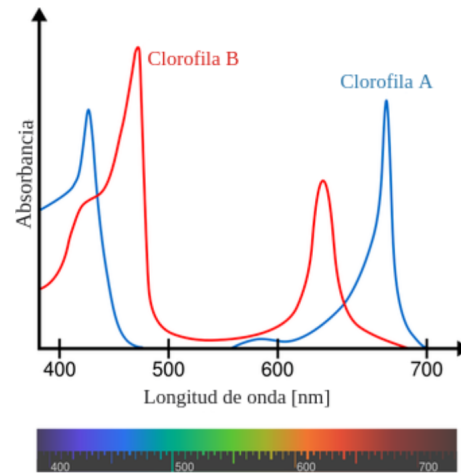


Figura 7: Espectro de emisión de la clorofila tipo A y tipo B. Imagen tomada de: https://cdn-0.enacademic.com/pictures/enwiki/50/220px-Chlorophyll_ab_spectra2.PNG

se conocen como la *Ley de Lambert y Beer*. La ley de Lambert establece que la fracción de la luz absorbida por un medio transparente es independiente de la intensidad de la luz incidente, y cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual a la luz pasando a través de este, lo cual puede ser expresado como en la ecuación 2.

$$\log \frac{I_0}{I} = kl \quad (2)$$

donde I_0 es la intensidad de luz incidente, I es la intensidad de luz transmitida, l es la longitud por donde pasa luz en cada celda del espectrofotómetro y k es la constante del medio.

La ley de Beer nos dice que la cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas del cromóforo a través de la cual pasa la luz lo cual indica que:

$$k = \epsilon c \quad (3)$$

donde c es la constante del cromóforo (*parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color*) y ϵ es el coeficiente molar de absorción, una característica propia del cromóforo. ϵ es igual absorción de una solución molar en una celda de 1 cm. Retomando la ecuación de Lambert (ecuación 2), obtenemos que:

$$\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon cl \quad (4)$$

Si consideramos que el término $\log \left(\frac{I_0}{I} \right)$ es conocido como *absorbancia*, y el inverso del cociente entre la luz incidente y la transmitida se le llama *transmitancia* $\left(T = \frac{I}{I_0} \right)$, tenemos que:

$$A = \log \left(\frac{1}{T} \right) = \epsilon cl \quad (5)$$

De acuerdo a la ley de Lambert y Beer, la absorbancia debe de ser linealmente proporcional a la concentración del cromóforo[3].

Un espectrofotómetro en general, consta de dos dispositivos: un espectrómetro y un fotómetro. Un espectrómetro es un dispositivo que produce, típicamente dispersa y mide la luz. El fotómetro mide la intensidad de la luz. A continuación se da una descripción más detallada.

- **Espectrómetro:** produce un rango deseado de longitud de onda de luz. Primero un colimador (*lente*) transmite un haz de luz (*fotones*) que pasa a través de un monocromador (*prisma*) para dividirlo en varias longitudes de onda (*las que componen el haz*)(espectro). Luego, un selector o lector de longitud de onda (*rendija*) transmite solo las longitudes de onda deseadas, como se muestra en la figura 8.
- **Fotómetro:** después de que el rango deseado de longitud de onda de luz pasa a través de la solución de una muestra en una cubeta, el fotómetro detecta la cantidad de fotones que se absorbe y luego envía una señal a un galvanómetro o una pantalla digital como se muestra en la figura 8.

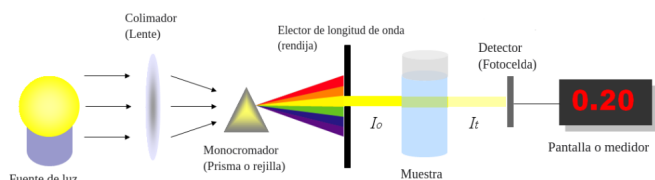


Figura 8: Estructura básica de los espectrofotómetros. Imagen tomada de: <https://www.vedantu.com/chemistry/spectrophotometer-principle>

2. BÚSQUEDA DE 2 ARTÍCULOS

Artículo: Análisis de clorofila de *spinacia oleracea* y cuantificación de albumina de espagueti utilizando espectrofotometría.

Autores: Jeisson Fabian Martin Calvo y Julián Castañeda Gómez

Sitio de descarga: <http://contexto.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/view/597>

En este trabajo Jeisson Martin y Julián Castañeda llevaron a cabo una interpretación de los conceptos de espectro de luz, absorbancia y pigmentos a partir de curvas de absorbancia obtenidas mediante un proceso de espectrofotometría de la clorofila de la *Spinacia oleracea* (espinaca). Además de cuantificar las proteínas presentes en tres tipos de pasta comestible (*esto último no será de interés para la práctica por lo que lo omitiremos, ya que queda fuera de los objetivos de la práctica de este trabajo, pero aun así se debe de mencionar ya que es parte del artículo original*).

Para el estudio del espectro de la clorofila en el artículo se divide en dos etapas, la primera es la extracción de la clorofila la cual tiene que ser una cantidad significativa, los autores trabajaron 500 ml de clorofila. La segunda fase fue las pruebas con el espectrofotómetro con distintas soluciones con la finalidad de obtener las respectivas absorbancias. Para su posterior análisis.

Artículo: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA EN HOJAS Y SU ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LUZ EN FUNCIÓN DE SOMBREAR EN PLANTAS DE CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS.

Autores: VERA LEX ENGEL y FÁBIO POGGIANI

Sitio de descarga:

https://www.researchgate.net/publication/277249118_Study_of_foliar_chlorophyll_concentration_and_its_light_absorption_spectrum_as_related_to_shading_at_the_juvenile_phase_of_four_native_forest_tree_species

En este trabajo Engel y Poggiani estudiaron la respuesta al sombreado de cuatro especies forestales nativas (*Brasil*) en términos de los cambios cuantitativos y cualitativos en la clorofila de las hojas en función de la intensidad de luz relativa, como una forma de evaluar la adaptabilidad a la sombra de estas especies, probando la hipótesis de que las especies con una mayor tolerancia a la sombra tendrían una mayor capacidad para alterar la clorofila de la hoja (*principalmente en relación con la proporción relativa de clorofila b*).

Se eligieron las siguientes especies: (1) *Amburana cearensis* (P. All.) A.C.Sm., “cerezo” o “amburana”, familia Fabaceae; (2) *Zeyhera tuberculosa* (Vell) Bur., “Ipê-felpudo”, familia Bignoniaceae; (3) *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Grisebach, “ipe-purple”, familia Bignoniaceae, e. (4) *Erythrina speciosa* Andr., “Porcina”, familia Fabaceae. La elección de especies se basó en la importancia ecológico-silvícola. Se les aplicó diferentes tipos de sombreado para después extraerles la clorofila para su posterior análisis mediante un análisis espectrofotométrico.

3. DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

Para el artículo: Análisis de clorofila de *spinacia oleracea* y cuantificación de albumina de espagueti utilizando espectrofotometría.

Como se mencionó en la sección anterior el experimento empieza por la extracción de la clorofila (500 ml) de 140 gr de *Spinacia oleracea* (espinaca) con la utilización de alcohol etílico y agua. Luego para cada caso, se realizaron las pruebas pertinentes con el espectrofotómetro mediante diferentes disoluciones de clorofila: 1, 2 y 3 ml, con la finalidad de obtener las respectivas absorbancias; como muestra patrón, para las espectrofotometrías se consideraron las muestras puras extraídas. Se realizaron 5 mediciones por espectrofotometría para cada concentración con el fin de

establecer análisis pertinentes respecto al valor promedio en cada caso.

Con el fin de cuantificar y verificar gráficamente los datos de absorbancias se obtiene la curva de calibrado midiendo la absorbancia de una serie de soluciones de concentraciones conocidas de una misma sustancia, tratadas con un mismo método y medidas a igual longitud de onda en el mismo instrumento. Para medir la concentración de una sustancia se eligió la región de máxima absorción del espectro con base a la muestra patrón, denominada longitud de onda analítica: En el caso de la clorofila se optó por el intervalo de 500 nm a 600 nm, realizando mediciones de espectrofotometría de la muestra patrón ascendentes de 10 en 10 y de 5 en 5, con el fin de obtener graficas bidimensionales (Absorbancia vs Concentración) para evidenciar las máximas de absorbancia en las espectrofotometrías correspondientes, así mismo se realizó el cálculo de las concentraciones mediante la constante de la concentración por el volumen.

Para el artículo: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA EN HOJAS Y SU ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LUZ EN FUNCIÓN DE SOMBRERÍA EN PLANTAS DE CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS.

El experimento empezó plantando las diferentes especies en macetas de manera individual, para exponerlas a cuatro diferentes niveles de sombra. Los autores utilizaron marcos de madera de 12.25 m² de área y 1.60 m de altura en su parte central, cubiertos con pantallas de nylon negro, respectivamente. con 30, 60 y 80 % de sombreado, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y de un nivel a pleno sol (0 % de sombreado). Las mediciones realizadas con un luxímetro indicaron posteriormente un tono promedio de 41, 68 y 82 %.

Los autores tuvieron que esperar 304, 352, 368 y 421 días después de la siembra, para recoger las muestras, respectivamente, para *E. speciosa*, *T. avellanae*, *Z. tuberculosis* y *A. cearensis*. Se tuvo cuidado de llevar a cabo el muestreo en diferentes momentos dependiendo de las tasas de crecimiento de cada especie para que en estos momentos las plantas tuvieran aproximadamente el mismo tamaño relativo. Se eliminaron de 4 a 5 hojas maduras de la parte media del dosel de 3 plantas por parcela y en cada nivel de sombra, para el análisis de clorofila de acuerdo con la metodología descrita por Linder (1974)[4] y Whitham (1971)[5]. La extracción de clorofila se realizó en acetona al 80 % y la cuantificación por espectrofotometría. Los cálculos de mg de clorofila por gramo de peso fresco de tejido foliar se basaron en las siguientes ecuaciones (6), (7) y (8) (Whitham et al., 1971)[5]

$$Clorofila_{(a)} = \frac{(12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) V}{1000W} \quad (6)$$

$$Clorofila_{(b)} = \frac{(22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}) V}{1000W} \quad (7)$$

$$Clorofila_{(total)} = \frac{A_{652} \times 1000 \times V / 1000W}{34.5} \quad (8)$$

Donde:

- A = Absorbancia a la longitud de onda indicada.
- V = Volumen final de clorofila - extracto de acetona.
- W = Materia fresca en gramos del material vegetal utilizado.

El espectro de absorción se determinó en una muestra compuesta, que consiste en una alícuota (*una parte que se toma de un volumen o de una masa iniciales*), de 5 ml del extracto de cada planta utilizada. De la solución así obtenida, la absorbancia se leyó entre 370 y 700 nm. En el caso de *T. avellanae*, las soluciones obtenidas después de la extracción de clorofila se diluyeron a la mitad de la concentración original.

4. RESULTADOS OBTENIDOS EN CADA ARTÍCULO Y SU ANÁLISIS

Para el artículo: Análisis de clorofila de *spinacia oleracea* y cuantificación de albumina de espagueti utilizando espectrofotometría.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las cinco mediciones de absorbancia de clorofila extraída con alcohol etílico y agua.

Concentración (ppm)	Mediciones (absorbancias)					Promedio
	1	2	3	4	5	
56000	0,073	0,075	0,076	0,074	0,076	0,075
112000	0,194	0,174	0,204	0,230	0,218	0,204
168000	0,255	0,245	0,234	0,268	0,274	0,255

Figura 9: Resultados de las absorbancias registradas por el espectrofotómetro y el valor promedio de los datos, teniendo en cuenta el registro de la muestra patrón de por el espectrofotómetro en el caso de Clorofila extraída con alcohol etílico. *Imagen tomada de:* [6]

Resultados de la espectrofotometría de clorofila extraída con agua.

Teniendo en cuenta los valores promedios para cada caso (*Extracción por alcohol y por agua*), se obtuvo la correlación lineal para el modelo que mejor se ajuste entre el lineal, logarítmico o exponenciales, la Raíz del Error Medio Cuadrático (REMC) y el porcentaje de confianza.

De esta manera se obtuvieron las siguientes dos gráficas:

Curva de calibrado obtenida en el caso de la clorofila extraída con alcohol etílico (Figura 9):

La figura 11 representa los valores promedio de las absorbancias obtenidas por espectrofotometría UV y presenta un de 0.9955 para un modelo logarítmico, un REMC de

Concentración (ppm)	Mediciones (absorbancias)					Promedio
	1	2	3	4	5	
56000	0,088	0,107	0,098	0,115	0,126	0,107
112000	0,153	0,146	0,238		0,266	0,201
168000	0,238	0,294	0,279		0,313	0,279

Figura 10: Resultados de las absorbancias registradas por el espectrofotómetro y el valor promedio de los datos. Teniendo en cuenta el registro de la muestra patrón de por el espectrofotómetro en el caso de Clorofila extraída con agua. *Imagen tomada de:* [6]



Figura 11: Curva de calibrado teniendo en cuenta que la abscisa comprende la concentración de clorofila extraída con alcohol etílico y el eje de ordenadas se refiere a la absorbancia obtenida por la espectrofotometría. *Imagen tomada de:* [6]

0.0071 y una confianza promedio de 93.6 % con lo cual se comprende una obtención de datos óptima y una elaboración de curva de calibrado pertinente para establecer concentraciones desconocidas, en este caso, de clorofila extraída con alcohol etílico.

Curva de calibrado obtenida en el caso de la clorofila extraída con agua, (figura 10):

La figura 12 representa los valores promedio de las absorbancias obtenidas por espectrofotometría UV y presenta un $r = 0.9986$ para un modelo lineal, un REMC de 0.0202 y una confianza promedio de 83.4 % con lo cual se comprende una obtención de datos óptima y una elaboración de curva de calibrado pertinente para establecer concentraciones, en este caso, de clorofila extraída con agua.

Se evidencia que las estadísticas obtenidas en gráfica 1 ofrecieron mejores resultados respecto a la gráfica 2, lo anterior es debido al método de extracción porque el primer caso (extracción con alcohol etílico) presenta una afinidad química con la molécula de clorofila ya que se trata de un solvente apolar[6].

Para el artículo: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA EN HOJAS Y SU ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LUZ EN FUNCIÓN DE SOMBRERÍA EN PLANTAS DE

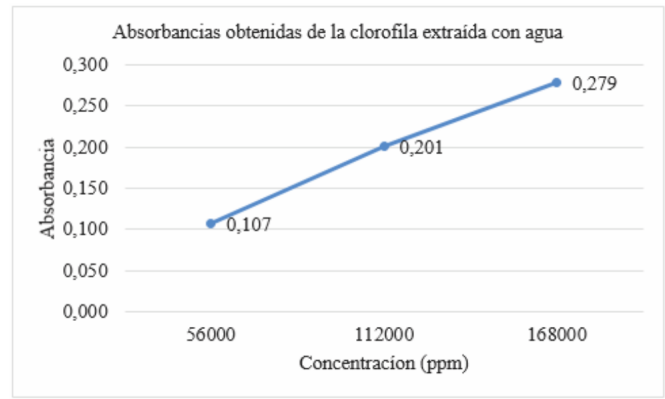


Figura 12: Curva de calibrado teniendo en cuenta que la abscisa comprende la concentración de clorofila extraída con agua y el eje de ordenadas se refiere a la absorbancia obtenida por la espectrofotometría. *Imagen tomada de:* [6]

CUATRO ESPECIES FORESTALES NATIVAS.

En la figura 13 se presentan los resultados obtenidos de las respuestas al sombreado de las diferentes especies. Los autores afirman de que existe un patrón similar al observado en otros estudios. (Shirley, 1929; Bjorkman y Holmgren, 1963; Inoue, 1978; Abrams, 1987; Lee, 1988).

		%Sombreado	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total
L. diversus	clorofila a	r = 0,84678 P-F = 0,0001** N = 36	—	—	—
	clorofila b	r = 0,85816 P-F = 0,0001** N = 36	0,92091	—	—
	clorofila total	r = 0,62502 P-F = 0,0001** N = 36	0,78395	0,76412	—
	Raíz a:b	r = -0,72588 P-F = 0,0001** N = 36	-0,65644	0,84285	-0,84285
			0,0001**	0,0001**	0,0001**
			36	36	36
T. avellanedae	clorofila a	r = 0,78022 P-F = 0,001** N = 36	—	—	—
	clorofila b	r = 0,78124 P-F = 0,0001** N = 36	0,97419	—	—
	clorofila total	r = 0,75425 P-F = 0,0001** N = 36	0,98955	0,88604	—
	Raíz a:b	r = 0,28767 P-F = 0,09466 N = 36	-0,41332	-0,56965	-0,53229
			0,01226	0,0001**	0,0001**
			36	36	36
N. glaberrima	clorofila a	r = 0,85384 P-F = 0,0001** N = 35	—	—	—
	clorofila b	r = 0,65208 P-F = 0,001** N = 35	0,77735	—	—
	clorofila total	r = 0,81559 P-F = 0,0001** N = 35	0,97192	-0,87514	—
	Raíz a:b	r = 0,16804 P-F = 0,35584 N = 35	0,14845	-0,47786	-0,01978
			0,39476	0,07768	0,93026
			35	35	35
A. curatella	clorofila a	r = 0,69020 P-F = 0,0001** N = 36	—	—	—
	clorofila b	r = 0,77255 P-F = 0,0001** N = 36	0,93110	—	—
	clorofila total	r = 0,74054 P-F = 0,0001** N = 36	0,96363	0,97558	—
	Raíz a:b	r = -0,79790 P-F = 0,0001** N = 36	-0,79617	-0,92320	-0,85702
			0,0001**	0,0001**	0,0001**
			36	36	36

Onde:
r = Coeficiente de correlación lineal de Pearson
P-F = Probabilidad de que F calculado sea menor que F tabulado (análisis de variancia de correlación)
N = Número de observaciones

Figura 13: Análisis de correlación lineal simple (Pearson) entre la clorofila de la hoja y el porcentaje de sombreado. *Tabla tomada de:* [7]

Además se hace mención que para todas las especies, hubo una alta correlación positiva entre las concentraciones de clorofila (mg / g) y los niveles de sombreado. En todas las especies, la clorofila b se correlacionó mejor con el nivel de sombreado que la clorofila a (a excepción de T. avellanedae, probablemente porque la clorofila a está presente en los dos tipos de complejo clorofila-proteína, que varían Según Thornber (1975), bajo la acción de la luz, mientras que la clorofila b tiene una respuesta mejor

definida, en *T. avellanadae* la correlación entre la clorofila *a* y *b* fue más débil y la contribución relativa de la clorofila *b* a la clorofila total fue menor.

La relación entre clorofila *a* / *b* se correlacionó con el nivel de sombra de una manera estadísticamente significativa solo para las especies *A. ceaensis* y *E. speciosa*, en ambas presentando una correlación negativa. En estas dos especies, hubo una correlación más alta de la relación *a* / *b* con clorofila *b* que con *a*. Como la degradación de la clorofila *b* es más difícil, hay un aumento relativo de la clorofila *a*. Para estas especies, una proporción relativa más alta de clorofila *b* puede ser ventajosa bajo sombra, ya que la clorofila *b* permite una mayor eficiencia de absorción de luz menos intensa (Whatley y Whatley, 1982), y una ampliación del espectro de luz. acción de la fotosíntesis (Mitchell, 1979).

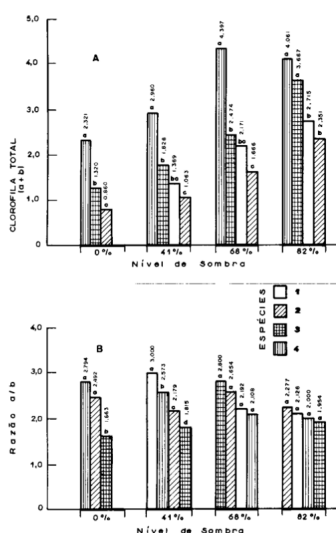


Figura 14: Concentración media total de clorofila en mg / g de materia seca. (A) y la relación clorofila *a* / *b*. (B) en las hojas de (1) *Burbanana cearensis*; (2) *Zeyhera tuberculosa*; (3) *Tabebuia avellanadae* y (4) *Erythrina speciosa* a diferentes niveles de sombreado (%). Dentro de cada nivel de sombra, los promedios de especies indicados por la misma letra no difieren en el nivel de probabilidad del 5 %. La media de *A. cearensis* por debajo del 0 % de sombra no se consideró debido a valores faltantes. *Tabla tomada de:* [7]

La figura 14 muestra las medias de la concentración total de clorofila y la relación *a* / *b* de clorofila por especie en cada nivel de sombra, así como la comparación de las medias entre especies, obtenidas del desarrollo del análisis conjunto. de varianza por nivel de sombra. Parece que *E. speciosa* mostró valores de clorofila más altos que las otras especies, siendo solo igualada por *T. avellanadae* con un 82 % de sombra. Tuberculous *Z*, por otro lado, fue la especie con la concentración de clorofila total más baja en todos los niveles. Estas diferencias pueden ser importantes con un sombreado superior al 41 %, porque en estas condiciones la tasa de fotosíntesis debe ser proporcional a la concentración de clorofila, según Gabrielsen, 1948)[8].

Según esta hipótesis, *E. speciosa* y *T. avellanadae* podrían mostrar altas tasas de crecimiento, más altas que las de otras especies incluso en la sombra (Engel, 1989). La alta concentración de clorofila en las hojas de *E. speciosa* puede estar relacionada con un mayor contenido de nitrógeno en las hojas, de aproximadamente el 4 % de la materia seca (Engel y Poggiani, 1990) debido a la capacidad de fijación simbiótica de este elemento que la especie presenta.

Las especies estudiadas mostraron que la capacidad de absorción de luz en las diferentes longitudes de onda aumentó con el sombreado (Figura 15). El mayor aumento se produjo en las regiones de los picos de absorción, pero en general las longitudes de onda correspondientes a los picos no cambiaron entre los niveles de sombra en la misma especie, aunque la absorbancia en estos puntos se ha alterado. El cambio en las absorbancias en cada longitud de onda es un reflejo de la concentración de pigmentos en las hojas. La proporción relativa entre estos también influye en la determinación del espectro, ya que cada tipo de clorofila tiene un pico de absorción en diferentes longitudes de onda.

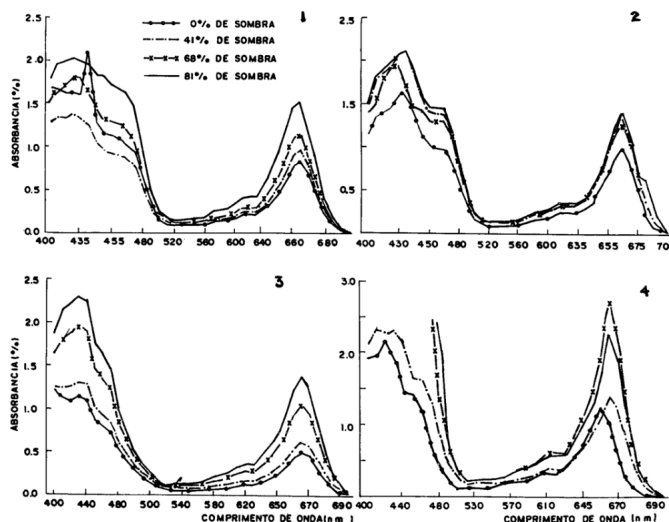


Figura 15: Espectros de absorción de luz de clorofila extraída en acetona 80 % de las hojas de (1) *Amburanacearensis*; (2) *Zeyhera tuberculosa*; (3) *Tabebuia avellanadae* y (4) *Erythrina speciosa* dependiendo del nivel de sombreado (%). *Tabla tomada de:* [7]

5. COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Los artículos que se estudian en este trabajo siguen dos metodologías diferentes aunque ambos artículos llegan a conclusiones similares, por ejemplo ambos estudios afirman que la absorbancia tiene una magnitud mayor en cuanto a la concentración aumenta es decir, es directamente proporcional a la concentración que se posee en una muestra.

Para el caso del segundo artículo se llega a que se en-

contró que las cuatro especies estudiadas tienen la capacidad de alterar sus fotosistemas en términos de la cantidad de pigmentos y la composición relativa de clorofila a y b. Además de que los cambios sufridos en las hojas proporcionan una mayor eficiencia de absorción de luz no solo en el rango rojo, sino también en otras regiones del espectro.

Para el primer artículo se demostró cuantitativamente que la energía absorbida corresponde a la cantidad necesaria para promover un electrón de un orbital a otro en una molécula conjugada, esto tiene lugar ya que la espectrofotometría fue realizada con radiación UV y la región máxima de absorbancia registrada por el fotómetro para el caso de la muestra patrón. Esto tiene lugar por la ley de Beer lo cual indica que a mayor concentración las ondas electromagnéticas chocan contra un mayor número de átomos o moléculas y son absorbidos.

REFERENCIAS

- [1] Adrian P Sutton. *Electronic structure of materials*. Clarendon Press, 1993.
- [2] Arthur Beiser. *Concepts of modern physics*. Tata McGraw-Hill Education, 2003.
- [3] Adrian C Melissinos and Jim Napolitano. *Experiments in modern physics*. Gulf Professional Publishing, 2003.
- [4] SUNE LINDER. A proposal for the use of standardized methods for chlorophyll determinations in ecological and eco-physiological investigations. *Physiologia Plantarum*, 32(2):154–156, 1974.
- [5] FH Witham, DF Blaydes, and RM Devlin. Experiments in plant physiology new york. *Von Nonstrand Reinhold Company*, pages 55–56, 1971.
- [6] Jeisson Fabian Martin Calvo and Julian Alfonso Castañeda Gómez. Análisis de la clorofila de spinacia oleacea y cuantificación de albumina de espagueti utilizando espectrofotometría. *UGCiencia*, 22(1):99–109, 2016.
- [7] VL Engel and FÁBIO POGGIANI. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 3(1):39–45, 1991.
- [8] EK Gabrielsen. Effects of different chlorophyll concentrations on photosynthesis in foliage leaves. *Physiologia Plantarum*, 1(1):5–37, 1948.