Red fluorescence of chlorophyll Fluorescencia roja de la clorofila

J.L. Garcia-Pomar^{1*}, R. Gutierrez-Contreras²

1. Instituto de Óptica "Daza de Valdés" IO-CSIC. Serrano 121, 28006 Madrid

2. Instituto de Estructura de la Materia IEM-CSIC. Serrano 121, 28006 Madrid

(*) E-mail: garciapomar@io.cfmac.csic.es

Received / Recibido: 30/05/2015

Accepted / Aceptado: 11/06/2015

DOI: 10.7149/OPA.48.2.93

ABSTRACT:

The red fluorescence of chlorophyll is demonstrated by means of a laboratory photograph. Under ultraviolet light the chlorophyll dissolved in ethanol is fluorescent in the red range.

Key words: Optics education, Optics experiments, Fluorescence, Chlorophyll.

RESUMEN:

Se presenta una fotografía de laboratorio que ilustra la existencia de la fluorescencia en rojo de una muestra de clorofila en etanol. Bajo luz ultravioleta la clorofila diluida en etanol emite fluorescencia en el rojo.

Palabras clave: Educación en Óptica, Prácticas de Óptica, Fluorescencia, Clorofila.

Fig.1. Muestra de clorofila diluida en etanol bajo luz blanca (izquierda) y bajo luz ultravioleta (derecha). Observándose la fluorescencia en rojo bajo luz ultravioleta.

REFERENCES AND LINKS / REFERENCIAS Y ENLACES

- [1] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*. Editorial Oxford University Press (2006).
 - [2] A. Acuña, F. Amat-Guerri. "Early history of solution fluorescence: the Lignum nephriticum of Nicolás Monardes," en: *Fluorescence of supermolecules, polymers, and nanosystems*. Berlin, Springer Ser. Fluoresc. **4**, 3–20 (2008).
 - [3] George C. Papageorgiou and Govindjee (editores) "Advances in Photosynthesis and Respiration," Volume 19, *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers (2005).
 - [4] Brewster D "On the colours of natural bodies," Trans Royal Soc Edinburgh **12**, 538-545 (1834).
<http://dx.doi.org/10.1017/S0080456800031203>
 - [5] J. F. W. Herschel, "On the Epipolic Dispersion of Light, Being a Supplement to a Paper Entitled, 'On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless'," Philosophical Transactions of the Royal Society of London **135**, 147-153, (1845).
<http://dx.doi.org/10.1098/rstl.1845.0005>
 - [6] J. Harbinson, E. Rosenqvist, *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* Springer US (2003).
-

1. Introducción

Los electrones excitados pierden energía al volver al estado fundamental. Este decaimiento es no radiativo, y la energía se transmite a las moléculas de alrededor como energía vibracional, rotacional y traslacional. Es energía térmica. Sin embargo, en algunas moléculas, también se produce un decaimiento radiativo, y la energía se emite en forma de fotones. Este es el caso de las moléculas fluorescentes y fosforescentes. En la fluorescencia, la radiación dura nanosegundos, mientras que la fosforescencia puede llegar a durar varias horas. La diferencia entre ambos procesos radica en que las moléculas fluorescentes emiten la energía absorbida rápidamente, al contrario que las fosforescentes, en las que la emisión se produce más lentamente [1]. Este trabajo se centra en la fluorescencia de las moléculas de clorofila.

1.a. Antecedentes históricos

La fluorescencia, fue por primera vez descrita e informada en 1565 por el médico y botánico español Nicolás Bautista Monardes en su libro *Historia Medicinal*. En él describe el extraño comportamiento de la opalescencia azulada de ciertas infusiones de *Lignum nephriticum* recomendadas para dolencias de riñón [2]. Siendo Althanius Kircher (1646) el primero en discutir, en profundidad, su apariencia bicromática. Era amarillo bajo luz transmitida y azul en la luz reflejada; quizás la luz azul era debida a un proceso de fluorescencia[3].

El escocés Sir David Brewster en 1834 [4] fue el primero en notar la emisión en rojo de la clorofila. Mientras discutía su concepto sobre el color en los cuerpos naturales, señaló casi de pasada que "al pasar un fuerte rayo de luz solar por un fluido verde se sorprendió al observar que su color era un rojo brillante complementario al verde..." El fluido verde del experimento de Brewster era extracto de hojas de laurel en alcohol.

Sin embargo, el descubrimiento más claro de la fluorescencia fue debido a Sir John Herschel (1845)[5] en una solución de sulfato de quinina. Él señaló el color azul "celestial" de la disolución, y la llamó desafortunadamente "*dispersión epipólica*". Fue Sir G.G. Stokes el que bautizó el fenómeno como fluorescencia. Stokes fue el primero en reconocer el fenómeno como una emisión de luz y también vio la fluorescencia de la ficobilina y la clorofila en algas rojas [3].

En este artículo proponemos un experimento educativo para observar la fluorescencia roja de una solución de clorofila bajo radiación ultravioleta (Fig.1), explicando el fenómeno de fluorescencia de esta sustancia y sus aplicaciones.

2. Método experimental

2.a. Así se hizo

Para poder llevar a cabo el experimento, primero hubo que extraer la clorofila. La clorofila es un pigmento de color verde, que absorbe la luz necesaria para llevar a cabo la fotosíntesis. Está presente en los cloroplastos de las hojas de las plantas. Los cloroplastos son unos orgánulos de las células vegetales en los que se produce la fotosíntesis. Para extraer la clorofila se utilizaron hojas de espinaca, ricas en este pigmento. El procedimiento es el siguiente:

Se pesaron 5 gramos de espinacas troceadas y se llevaron a ebullición durante 1 minuto. A continuación, se introdujeron durante 1 minuto en un baño de agua fría a 5°C. Mediante este proceso se consigue romper las células y cloroplastos y así la clorofila queda libre. Para separarla del resto de la hoja, se trituro con 30 mL de etanol. La mezcla resultante se filtró con papel de filtro. La disolución obtenida se fotografió (Canon EOS 600D 18x55mm) con luz blanca y bajo luz ultravioleta, para comprobar la fluorescencia de la clorofila. Para la radiación ultravioleta se utilizó una lámpara ultravioleta *Leuchturm multi-tester* con una longitud de onda de 254 nm.

2.b. Análisis de la fluorescencia de la clorofila

Fig.2. Los diferentes caminos de desexcitación de moléculas de clorofila excitadas en el fotosistema II (FSII).

Analizamos ahora los procesos de fluorescencia y fotoquímica que ocurren en las moléculas de clorofila [6]. Estos fenómenos ocurren en el fotosistema II (FSII), un sistema involucrado en el proceso de fotosíntesis. En el FSII se encuentran las moléculas de clorofila, entre otros compuestos. El centro de reacción de la clorofila, al que llega la energía, se conoce como P₆₈₀. Recibe este nombre porque la clorofila de este fotosistema absorbe la luz con longitud de onda de 680 nm, que se encuentra en la zona roja del espectro.

Cuando el fotón absorbido por la clorofila es azul o ultravioleta (es decir, altamente energético), parte de la energía es disipada inmediatamente como calor del segundo al primer estado excitado (ver Fig.2). Un paquete de energía conocido como excitón que contiene la energía equivalente a un fotón rojo es contenido dentro del pigmento base. La vida media de un excitón dentro de una molécula individual de clorofila está en el rango de los nanosegundos. Algunos excitones se perderán como calor, pero cuando un excitón alcanza el centro de reacción P₆₈₀ del fotosistema II (P₆₈₀ del FSII), el electrón excitado puede quedar atrapado. Se produce un proceso fotoquímico, y este electrón pasa a la cadena de transporte de electrones comenzando así la fotosíntesis. Los excitones no perdidos como calor y que no conllevan el proceso fotoquímico anterior son reemitidos como luz, en un proceso llamado fluorescencia de la clorofila, que produce un pico en el espectro en torno a 690-730nm (zona roja del espectro). La desexcitación a

través del proceso fotoquímico y la disipación térmica en forma de calor compiten con la desexcitación a través de la fluorescencia. Es decir, al volver al estado fundamental, la energía que pierden los electrones puede ser térmica, fotoquímica (empleada en la fotosíntesis), o producir fluorescencia.

Así, el rendimiento de la fluorescencia ϕ_F en el FSII es determinado por las siguientes constantes de velocidad:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_T + k_{fs}} ; \quad (1)$$

donde k_F es la constante de velocidad del proceso de fluorescencia, k_T es la constante de velocidad para la relajación térmica asociada al estrés de la planta, como alta iluminación o alta temperatura, y k_{fs} es la constante de velocidad del proceso fotoquímico.

La intensidad de la fluorescencia I_F viene dada por:

$$I_F = I_{abs} \times \Phi_F ; \quad (2)$$

donde I_{abs} es la intensidad de la luz absorbida.

El cálculo de la intensidad de la fluorescencia de la clorofila se ha tenido en cuenta para hacer diferentes estudios in vivo a diferentes especies vegetales como por ejemplo [6]:

- estudio de la edad de las hojas,
 - efectos de hongos patógenos,
 - tolerancia y daño debido al calor o al frío,
 - daños debido a herbicidas, metales pesados o radiación de microondas,
 - daño físico,
 - estrés por sequía,
- y un largo etcétera.

3. Resultados

Fig.3. Montaje experimental.

En este trabajo, dirigido a colectivos escolares, se quiere comprobar la fluorescencia de la clorofila. Para ello, se extrajo la clorofila de hojas de espinaca mediante una metodología sencilla (ver sección 2.a). A continuación, se tomaron fotografías de la clorofila disuelta en etanol, iluminándola con diferentes fuentes de luz (Fig. 3). Al iluminarla con luz blanca, la clorofila se ve verde, siendo el pigmento que confiere ese color a las hojas. Sin embargo, bajo la luz ultravioleta, la clorofila se torna roja (ver Fig. 1), debido a sus propiedades fluorescentes explicadas en la sección anterior.

4. Conclusiones

La fluorescencia de la clorofila es un proceso que ayuda a determinar in vivo algunos problemas asociados en las plantas. En este artículo se muestra la fluorescencia en el rojo del pigmento de la clorofila de una forma sencilla, introduciendo el concepto de fluorescencia asociado al proceso de fotosíntesis.

Agradecimientos

Los autores agradecen al IOSA Student Chapter la ayuda prestada y a Daniel Cortés el apoyo en la realización de la fotografía. J.L. G-P. agradece al fondo social europeo por financiar parcialmente el programa JAE-Doc y a los proyectos TEC2012-37958-C02-02 del Ministerio de Economía y Competitividad y S2013/MIT-2790 (SINFOTON) de la Comunidad Autónoma de Madrid.