



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física.

Interacción entre nanopartículas y material fotosintético. Fotoquímica ambiental y nanobiónica de plantas

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física.

Rocio Torres

Directora de Tesis: Dra. María Gabriela Lagorio

Directora adjunta de Tesis: Dra. Virginia Emilse Diz

Consejera de Estudios: Dra. Sara Aldabe Bilmes

Lugar de Trabajo: Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía
(INQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, Abril de 2022

Resumen

Interacción entre nanopartículas y material fotosintético. Fotoquímica ambiental y nanobiónica de plantas

Las nanopartículas se utilizan actualmente con diversos fines industriales y domésticos, lo que se refleja en su volumen de producción en constante aumento. Este éxito económico viene acompañado de su presencia en el ambiente y el riesgo de efectos potencialmente adversos en los sistemas naturales. Durante la última década, se han logrado avances sustanciales con respecto a la comprensión de las fuentes, el destino y los efectos de las nanopartículas en los sistemas acuáticos y terrestres. El debate sobre su acción a corto y largo plazo está cada vez más presente en la bibliografía actual. Por un lado, múltiples evidencias sugieren que su liberación en el ecosistema ha provocado serios problemas ambientales debido a su posible efecto tóxico en los organismos vivos, particularmente en las plantas. Por otro lado, la nanotecnología ha llamado recientemente la atención en el campo de la agricultura por sus diferentes aplicaciones en la liberación de nutrientes, pesticidas, nanosensores, detección de deficiencias de nutrientes, etc. De esta forma, mediante la nanotecnología es posible alcanzar una agricultura de precisión y así utilizar de manera eficiente el agua, los fertilizantes y otros insumos.

Las plantas constituyen la base tanto del ecosistema como de la cadena alimentaria, y están sometidas continuamente a materiales liberados y acumulados en el medio ambiente por la actividad humana, por lo que es crucial estudiar los efectos de las nanopartículas en ellos. Si bien en los últimos años se han incrementado las publicaciones relacionadas a dicho tema, la mayoría de estos trabajos realizan una evaluación a nivel fisiológico o registran parámetros de estrés celular, pero no evalúan el efecto sobre la actividad fotosintética. En contraste con las técnicas anteriores, el análisis de la fluorescencia de la clorofila es una metodología confiable, no invasiva y no destructiva, conectada íntimamente con el rendimiento fotosintético y que permite la evaluación de la salud vegetal. En esta tesis se estudió el efecto de tres tipos de nanopartículas (metálica, óxido metálico y de carbono) con diferentes propiedades fisicoquímicas, en la actividad fotosintética y propiedades fotofísicas de plantas. Los resultados obtenidos ponen en evidencia la capacidad de las nanopartículas de introducirse en los cloroplastos - debido a su pequeño tamaño - y afectar de manera diferenciada los procesos de captación de luz y/o el transporte electrónico, según sus propiedades fisicoquímicas. Estas investigaciones se encuentran entre los primeros estudios sobre el efecto de nanopartículas en la cadena de transporte electrónico fotosintético desde una perspectiva fotoquímica de los procesos involucrados.

Palabras clave: fotosíntesis, nanopartículas, fluorescencia de clorofila, nanomateriales, impacto ambiental, fotoquímica

Abstract

Interaction between nanoparticles and photosynthetic material. Environmental photochemistry and plant nanobionics

Nanoparticles serve various industrial and domestic purposes evidenced by their constantly increasing production volume. This economic success comes along with their presence in the environment and the risk of potentially adverse effects in natural systems. Over the last decade, substantial progress has been made with respect to understanding the sources, fate and effects of nanoparticles in aquatic and terrestrial systems. The debate on their short- and long-term action is increasingly present in the current literature. There are multiple evidences suggesting their release into the ecosystem has caused serious environmental problems due to their possible toxic effect on living organisms, particularly plants. On the other hand, nanotechnology has recently drawn attention in the field of agriculture for its diverse applications in the release of nutrients, pesticides, nanosensors, detection of nutrient deficiencies, etc. In this way, by means of nanotechnology it is possible to achieve precision agriculture and thus make efficient use of water, fertilizers and other inputs.

Plants are the basis of both the ecosystem and the food chain and are continually subjected to materials released and accumulated in the environment by human activity, so it is crucial to study the effects of nanoparticles on them. Although in recent years there has been an increase in publications related to the study of the effect of nanoparticles in plants, most of these works carry out an evaluation at the physiological level or record cellular stress parameters, but do not evaluate the effect on photosynthetic activity. In contrast to previous techniques, the analysis of chlorophyll fluorescence is a reliable, non-invasive and non-destructive methodology for photosynthesis and plant health evaluation. In this thesis, the effect of three types of nanoparticles (metallic, metallic oxide and carbon), with distinctive physicochemical properties, on the photosynthetic activity and photophysical properties of plants, was evaluated. The obtained results highlight the ability of nanoparticles to enter chloroplasts — due to their small size — and differentially affect the processes of light uptake and/or electronic transport, according to their physicochemical properties. These investigations are among the first studies about the effect of nanoparticles on the photosynthetic electron transport chain from a photochemical perspective of the underlying processes involved.

Keywords: photosynthesis, nanoparticles, chlorophyll fluorescence, nanomaterials, environmental impact, photochemistry

Agradecimientos

Esta es una oportunidad de tratar de devolver, en unas pocas líneas, toda la ayuda que he recibido a lo largo de los años que ha llevado todo el trabajo aquí presentado. Espero estar a la altura de las circunstancias, aunque nunca son suficientes las palabras para las personas que lo merecen.

- A la Universidad de Buenos Aires, por haberme otorgado educación universitaria de calidad, pública, laica y en forma gratuita.
- A las instituciones que financiaron este trabajo de tesis: CONICET, UBA, MinCyT, AUIP
- A mis directoras de tesis, Gabriela Lagorio y Virginia Diz, quienes me acompañaron en todo momento y admiro enormemente. A Virginia la conocí en el laboratorio de FQI y comencé mi recorrido en la investigación en Química con ella. Estoy muy agradecida de haberlas conocido, por ser mis mentoras, por enseñarme, guiarme y apoyarme, ambas estuvieron siempre presentes con el aporte de sus conocimientos y experiencia; poniéndose el guardapolvo y sentándose a mi lado para hacer alguna medida, hasta charlas en el pasillo u oficina, que incluyeron incontables consejos sobre la vida científica.
- A mis compañeros de oficina, a la oficina de los *GORDIS*. Tuve la suerte de caer en la mejor oficina de todas, eramos todos de distintos grupos pero abundaron las risas, los chistes y los chismes, los mates y mucho más. Tuve el honor de ser *la comandanta de todos y todas*, en la oficina de los gordis; la Reina Gordi (Cynthia), la Gordi (Romi), el BolcheGordi (Juan) y el Gordi (Nico).
- Particularmente agradezco a Juan Romero que realizó el doctorado en paralelo conmigo bajo la dirección de Gabriela Lagorio, cuya presencia, aporte, conocimientos y calidad humana fueron muy importantes todos los días durante estos años de doctorado. Gracias al trabajo en equipo con él, logramos mejorar en conjunto y aprender uno del otro, y realizamos aportes y cambios positivos en el grupo de trabajo.
- A las personas que aportaron a esta tesis su conocimiento y experiencia en diversas áreas. Gracias por las discusiones, las medidas y el interés por que aprenda y salgan las cosas adelante: Beatriz Barja, Diego Onna, Fernando Molina, Matías Lanús, Nicolás García Saggión, Florencia Marchini, Leandro Missoni, Lucy Coria, Santiago Herrera, Federico Davia, Daniela Putrino, Ernesto Marceca, Hernán Rodríguez y Leyla Rodríguez
- Al DQIAQF - INQUIMAE por brindarme el lugar de trabajo y a la gente que forma parte de él por darme una mano en el día a día. En especial a:
 - A Claudia Marchi y Natalio De Vincenzo, por su excelente trabajo en las medidas de SEM y TEM, respectivamente; y su carisma y buena onda.

- A las secretarías del primer piso, Alejandra Salas, Natalia Rascón y Claudia González, por su excelencia, ya que el departamento no funcionaría ni un día sin ellas, y por su apoyo y calidez diarios.
 - A Sara Aldabe Bilmes, mi consejera de estudios, por ayudarme a dar los primeros pasos de esta tesis y estar siempre dispuesta a escuchar y aconsejarme.
 - A Andrea Atias, Liliana Bayarres y Graciela Pérez; por su excelente trabajo, apoyo y buena onda.
 - A Leonardo Cantoni e Ignacio Poggi, por su excelente trabajo y su buena onda.
 - Al personal de apoyo; Gabriela Castro, Adriana Martínez, Karina Llano, Maricel Rodríguez, Andres Hunt y Vicente Povse, por su excelente trabajo y por toda su ayuda.
 - A Nancy Witkowski, Waler Rendon, Adriana Carballido, Jorge Artesi, por su excelente trabajo y ayuda.
- A Mauro Bringas y Cecilia Gallego, a los que tuve la suerte de tener como organizadores de la Semana de la Química; por su entusiasmo y calidez.
 - A Jenny y Davide, que hicieron de mi estadía en España uno de mis mejores recuerdos.
 - A mis amigos de toda la vida; a Yamila, Valeria, Lucas, Gonzalo, y también a Caro, Diego y Luis. Ustedes conforman uno de los tres pilares más importantes en mi vida, estoy muy agradecida de tener su amistad, y su compañía y apoyo hicieron y seguirán siendo muy valiosos para mí.
 - A mi tío y mi abuela, por su apoyo y su cariño constante.
 - A mi mamá, papá y hermano; por estar siempre, por apoyarme en todo lo que quise hacer y por todo lo que me quieren y cuidan. Ustedes son mi sostén y un ejemplo de que con esfuerzo y ganas se alcanzan los sueños.
 - A Fede, por escucharme, por su apoyo incondicional, por alegrarse y entristecerse conmigo, por su inmenso amor. En fin, por todo. Gracias a él, el camino para llegar hasta acá se hizo muchísimo más fácil.

Y a todos los que directa e indirectamente me acompañaron en el proceso de construcción de esta tesis.

*Cuanto más claramente podamos enfocar nuestra atención en
las maravillas y realidades del universo que nos rodea,
menos gusto tendremos por la destrucción*

Rachel Carson

Lista de símbolos y abreviaturas

Cars Carotenoides totales

Chl a Clorofila a

Chl b Clorofila b

Chls Clorofilas totales

Cytb₆f Complejo de citocromo *b₆f*

DRX Difracción de rayos X

E_g band gap óptico

ET Transferencia de electrones

ETC Cadena de transporte de electrones fotosintética

Fd Ferredoxina

F(R) Función de remisión

FRET Transferencia de energía de resonancia de Förster

GQD *Quantum dots* de grafeno

LA Luz actínica (intensidad media, permite fotosíntesis)

LHC Complejos pigmento-proteína colectores de luz (*Light Harvesting Complexes*)

LHC-I Complejo antena asociado al PSI

LHC-II Complejo antena asociado al PSII

MAG Nanopartículas de magnetita

mNDVI Índice de vegetación de diferencia normalizada modificado

MWCNT Nanotubos de carbono de paredes múltiples

NDVI Índice de vegetación de diferencia normalizada

NIR Zona del infrarrojo cercano del espectro electromagnético

NP Nanopartículas

NPQ *Quenching* no fotoquímico

OJIP Transiente de fluorescencia de clorofila

OEC Complejo de evolución de oxígeno

PAR Irradiancia fotosintéticamente activa

PC Plastocianina

Pheo Feofitina

PQ Plastoquinona

PRI Índice de reflectancia fotoquímica

PS Pulso saturante

PSI Fotosistema I

PSII Fotosistema II

Q_A Plastoquinona A

Q_B Plastoquinona B

QDC *Quantum dots* de carbono

q_E *Quenching* dependiente de energía

q_T *Quenching* de transición de estado

q_I *Quenching* inhibitorio

RC Centro de reacción

RC-I Centro de reacción del fotosistema I

RC-II Centro de reacción del fotosistema II

ROS Especies reactivas de oxígeno

SEM Microscopía electrónica de barrido

SPION Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético

SWCNT Nanotubos de carbono de pared simple

SWIR Zona del infrarrojo de onda corta del espectro electromagnético

TEM Microscopía electrónica de transmisión

VIS Zona del visible del espectro electromagnético

VSM Magnetómetro de muestra vibrante

UV Zona del ultravioleta del espectro electromagnético

Vx Violaxantina (carotenoide)

Zx Zeaxantina (carotenoide)

Índice general

Resumen	I
Abstract	III
Agradecimientos	V
Abreviaturas	XI
Índice General	XIX
Índice de tablas	XXII
Índice de figuras	XXVII
Publicaciones	XXIX
1. Introducción	1
1.1. Introducción	1
1.2. Nanomateriales en plantas	3
1.2.1. Generalidades	3
1.2.2. Vías de Exposición	3
1.2.3. Fitotoxicidad de nanopartículas en plantas	6
1.2.4. Nanopartículas en la Industria agrícola	8
1.3. Motivación	11
1.4. Objetivos	13
1.5. Descripción del trabajo	13
1.6. Organización de la tesis	14
Referencias	14
2. Fluorescencia de clorofila <i>a</i> y fotosíntesis	23

2.1. Fotosíntesis	24
2.1.1. Estructura de la hoja y el cloroplasto	25
2.1.2. Reacciones dependientes de la luz	26
2.1.3. Esquema Z	29
2.1.4. Ciclo de las xantófilas	29
2.1.5. Fotoquímica primaria de la cadena de transporte electrónico	31
2.2. Medición de la fotosíntesis	33
2.3. Fluorescencia de clorofila <i>a</i>	34
2.4. Cinética de Kautsky	35
2.4.1. Fase oscura	36
2.4.2. Fase actínica	36
2.4.3. Fase de recuperación	37
2.4.4. Parámetros de la fase actínica	39
2.4.5. Parámetros de la fase de recuperación	42
2.5. Transiente OJIP	43
2.5.1. Interpretación de la curva y parámetros derivados	45
2.6. Decaimiento PSMT	50
2.6.1. Fase PS	52
2.6.2. Fase SM	53
2.6.3. Fase MT	54
2.7. Fluorescencia Estacionaria	55
Referencias	60
3. Metodología Experimental	69
3.1. Crecimiento de plantas	69
3.2. Espectros de absorción de pigmentos	70
3.3. Cuantificación de pigmentos	71
3.4. Reflectancia de hojas	73
3.5. Índices espectrales	74
3.6. Fluorescencia estacionaria de hojas intactas	78
3.7. Fluorescencia estacionaria en solución	79
3.8. Cinética de Kautsky y curva PSMT	80

3.9. Transiente OJIP	84
3.10. Caracterización fisicoquímica de los nanomateriales	85
3.10.1. Microscopía Electrónica	85
3.10.2. Difracción de rayos X	88
3.10.3. Dispersión dinámica de luz	91
3.10.4. Potencial Z	94
3.10.5. Espectroscopía infrarroja	96
3.10.6. Magnetometría de muestra vibrante	97
Referencias	100
4. Respuesta fotosintética a baja iluminación	105
4.1. Introducción	105
4.1.1. Hojas de sol y de sombra	107
4.2. Metodología	107
4.2.1. Crecimiento de plantas	107
4.2.2. Extracción de pigmentos	108
4.2.3. Fluorescencia estacionaria	108
4.2.4. Transiente OJIP	109
4.2.5. Cinética de Kautsky y curva PSMT	109
4.3. Resultados	110
4.3.1. Pigmentos	110
4.3.2. Fluorescencia estacionaria	111
4.3.3. Transiente OJIP	113
4.3.4. Curva PSMT	116
4.3.5. Dinámica temporal de los parámetros de la cinética de Kautsky	117
4.3.6. Fase actínica - Partición de energía	118
4.3.7. Fase de recuperación del NPQ	121
4.4. Discusión	124
4.5. Conclusiones	128
Referencias	129
5. Nanopartículas de Oro	133
5.1. Introducción	133

5.1.1. Resonancia de plasmón de superficie	134
5.1.2. Antecedentes	136
5.1.3. Motivación y objetivos	137
5.2. Materiales y Métodos	138
5.2.1. Síntesis de NpAu	138
5.2.2. Caracterización	138
5.2.3. Tratamiento con NpAu	139
5.2.4. Reflectancia y transmitancia de hojas	140
5.2.5. Índices espectrales	140
5.2.6. Fluorescencia estacionaria de hojas	141
5.2.7. Fluorescencia Variable	141
5.2.8. Microscopía Electrónica de Hojas	142
5.2.9. Extracción de cloroplastos y tratamiento con NpAu	143
5.2.10. Absorbancia de cloroplastos	144
5.2.11. Fluorescencia de cloroplastos en ausencia de procesos de reabsorción de luz	145
5.2.12. Fluorescencia de cloroplastos en suspensión	146
5.2.13. Cinética de Reacción de Hill	147
5.2.14. Tasa de evolución máxima de oxígeno	148
5.2.15. Microscopía electrónica de cloroplastos	148
5.2.16. Experimentos resueltos en el tiempos con clorofila extraída	149
5.2.17. Extracción de pigmentos	149
5.2.18. Tiempos de vida de fluorescencia de clorofila	150
5.2.19. Fotólisis de destello láser	150
5.3. Resultados	151
5.3.1. Síntesis y Caracterización de NpAu	151
5.3.2. Sistema en estudio	154
5.3.3. Tratamiento de hojas con NpAu	155
5.3.4. Reflectancia de hojas	156
5.3.5. Fluorescencia estacionaria de clorofila	158
5.3.6. Fluorescencia de clorofila variable	162
5.3.7. Fluorescencia de cloroplastos en ausencia de reabsorción de luz	171

5.3.8. Cinética de la reacción de Hill	172
5.3.9. Tasa de evolución de oxígeno	173
5.3.10. Microscopía de hojas y cloroplastos con NpAu	175
5.3.11. Extracción de clorofila y caracterización espectroscópica	180
5.3.12. Tiempos de vida de fluorescencia de un extracto de clorofila	181
5.3.13. Fluorescencia estacionaria de extractos de clorofila	184
5.3.14. Fotólisis de destello láser de un extracto de clorofila	186
5.4. Conclusiones	191
Referencias	192
6. Nanopartículas de Magnetita	199
6.1. Introducción	199
6.1.1. Antecedentes científicos	199
6.1.2. Hierro, un nutriente esencial en plantas	200
6.1.3. Motivación y objetivos	201
6.2. Metodología	202
6.2.1. Síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4	202
6.2.2. Microscopías electrónicas	203
6.2.3. Difracción de rayos X	203
6.2.4. Ciclos de histéresis magnética	204
6.2.5. Caracterización óptica de semiconductores	204
6.2.6. Crecimiento de plantas	205
6.2.7. Tratamiento con nanopartículas	206
6.2.8. Extracción de pigmentos	206
6.2.9. Fluorescencia estacionaria	206
6.2.10. Transiente OJIP	207
6.2.11. Cinética de Kautsky y curvas PSMT	207
6.3. Resultados	208
6.3.1. Caracterización de nanopartículas	208
6.3.2. Contenido de pigmentos	217
6.3.3. Reflectancia e índices espectrales	219
6.3.4. Fluorescencia estacionaria	222

6.3.5. Transiente OJIP	224
6.3.6. Fase actínica - Partición de energía	232
6.3.7. Fase actínica - Curvas PSMT	236
6.3.8. Fase de recuperación del NPQ	237
6.4. Conclusiones	241
Referencias	242
7. Nanopartículas de carbono	253
7.1. Introducción	253
7.1.1. Antecedentes científicos	253
7.1.2. Clasificación de CD	255
7.1.3. Motivación	256
7.2. Metodología	257
7.2.1. Cultivo y crecimiento de plantas	257
7.2.2. Síntesis de nanopartículas	257
7.2.3. Caracterización de nanopartículas	259
7.2.4. Aplicación de nanopartículas	260
7.2.5. Contenido de pigmentos	260
7.2.6. Índices espectrales	260
7.2.7. Curva de inducción de fluorescencia de clorofila rápida (OJIP)	261
7.2.8. Fluorescencia variable (cinética de Kautsky)	261
7.2.9. Fluorescencia estacionaria de hojas	262
7.2.10. Aislamiento de cloroplastos y estudio de transferencia de energía	263
7.3. Resultados	267
7.3.1. Caracterización de nanopartículas	267
7.3.2. Contenido de pigmentos e índices espectrales	275
7.3.3. Fluorescencia Estacionaria	280
7.3.4. Curvas OJIP y fase I-P	283
7.3.5. Parámetros derivados de la curva OJIP	287
7.3.6. Partición de energía bajo iluminación actínica	294
7.3.7. Estudio de transferencia de energía	300
7.3.8. Transferencia de energía entre cloroplastos y GQD	301

7.3.9. Transferencia de energía entre cloroplastos y nano-CB	307
7.4. Conclusiones	312
Referencias	315
8. Conclusiones y perspectivas	325
8.1. Conclusiones generales	325
8.2. Perspectivas futuras	327
Apéndices	331
A. Parámetros derivados del transiente OJIP	331
B. Parámetros derivados de la cinética de Kautsky	338
Referencias	339

Índice de tablas

1.1. Impacto de las nanopartículas en plantas a nivel morfológico, fisiológico y genético	7
1.2. Diferentes tipos de nanopartículas y su aplicación en agricultura	9
4.1. Contenido y cociente de pigmentos para hojas de <i>L. Sativa</i>	110
4.2. Parámetros derivados de la curva OJIP	115
5.1. Índices espectrales que se corresponden con el contenido de clorofilas (verdor), carotenoides (incluye xantófilas) y agua para las hojas tratadas. ** y * representan diferencias estadísticamente significativas entre las hojas control y con NpAu, al nivel $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente	157
5.2. Cociente de bandas, $F_{red}/F_{far-red}$, corregido por reabsorción.	160
5.3. Parámetros derivados de la cinética de Kautsky en presencia de NpAu.	163
5.4. Cociente de fluorescencia de cloroplastos depositados en portaobjetos.	171
5.5. Tiempos de vida del singlete	183
6.1. Contenido y cociente de pigmentos	218
6.2. Índices espectrales	221
6.3. Índices espectrales	222
6.4. Valores de fluorescencia estacionaria a 680 nm, experimental y corregido . .	223
6.5. Parámetros derivados de la curva OJIP	229
6.6. Parámetros derivados de la cinética de Kautsky	234
7.1. Composición de las mezclas de cloroplastos y nanopartículas para el estudio de transferencia de carga.	264
7.2. Índices espectrales	276
7.3. Contenido de pigmentos	278
7.4. Valores de fluorescencia estacionaria experimental y corregida	281

7.5. Parámetros derivados de la curva OJIP	288
7.6. Parámetros derivados de la cinética de Kautsky	299
A.1. Ecuaciones y definiciones de los parámetros OJIP	331
B.2. Definición de parámetros y cocientes de fluorescencia de la cinética de Kautsky	338

Índice de figuras

1.1. Perspectivas de estudio de NP en plantas	2
1.2. Diagrama esquemático de las vías de absorción y translocación de NP en plantas	4
2.1. Estructuras vegetales que contienen el aparato fotosintético	25
2.2. Representación esquemática del transferencia de electrones de la membrana tilacoide	28
2.3. Esquema de energía potencial simplificado del transporte electrónico fotosintético.	30
2.4. Diagrama de Jablonski idealizado que ilustra la distribución de energía de los fotones absorbidos en una molécula de clorofila <i>a</i>	32
2.5. Partición de energía en el PSII	37
2.6. Protocolo típico de medición de la Cinética de Kautsky y la etapa de recuperación de NPQ subsiguiente.	39
2.7. Curva típica del transiente OJIP	44
2.8. Esquema de las principales vías de energía relacionadas con la fluorescencia de clorofila <i>a</i>	47
2.9. Curva OJIPSMT típica	50
2.10. Espectro de absorción y fluorescencia de una muestra de cloroplastos y hoja típicas	56
2.11. Representación de la capa de material absorbente y dispersante	57
3.1. Bioterio básico diseñado.	70
3.2. Espectros de absorción típicos y absorvidades de clorofilas y carotenoides de un extracto de hoja	71
3.3. Imágenes que muestran un procedimiento típico de extracción de pigmentos	72

3.4. Espectro de reflectancia esquemático de una hoja verde típica (400–2500 nm)	74
3.5. Medición con fluorómetro PAM	81
3.6. Protocolo típico de medición de la Cinética de Kautsky y la etapa de recuperación de NPQ subsiguiente.	82
3.7. Protocolo de medición de la Cinética de Kautsky para una determinada luz actínica	83
3.8. Protocolo de medición de la Cinética de Kautsky para un conjunto de luces actínicas aplicadas en serie	84
3.9. Interacciones de un haz de electrones con la muestra en microscopía electrónica	86
3.10. Representación esquemática de la ecuación de Bragg para un cristal	88
3.11. Esquema básico del sistema de medición y la relación entre la función de correlación y el tamaño de partícula	93
3.12. Esquema de la doble capa superficial y del arreglo experimental para la determinación del potencial Z	96
3.13. Representación esquemática de un sistema ATR-FTIR	97
3.14. Curva de magnetización típica	98
4.1. Espectros de fluorescencia estacionaria	112
4.2. Transiente OJIP experimental y normalizado en O y J	114
4.3. Parámetros derivados de la curva OJIP relativos al control.	115
4.4. Curvas PSMT a diferentes LA	117
4.5. Rendimientos cuánticos del PSII en función del tiempo de iluminación actínica	118
4.6. Rendimientos cuánticos en función de la intensidad de la luz actínica.	120
4.7. PS _{rate} en función de la intensidad de LA.	120
4.8. Decaimiento del k_{NPQ}/k_C en función del tiempo.	122
4.9. Tiempos de desactivación y componentes del NPQ.	123
5.1. Representación esquemática de los electrones de conducción que oscilan a través de la nanopartícula de oro en el campo electromagnético de la luz incidente	135
5.2. Tipos de muestras estudiadas en cloroplastos	146

5.3. Separación de pigmentos por cromatografía	150
5.4. Microscopía electrónica de NpAu	152
5.5. Espectroscopía UV/vis, radios hidrodinámicos y potencial Z de NpAu.	153
5.6. Espectros de absorción y emisión de cloroplastos y NpAu normalizados	155
5.7. Reflectancia difusa VIS-NIR de hojas en presencia y ausencia de NpAu	156
5.8. Fluorescencia de hojas en presencia de NpAu.	159
5.9. Fluorescencia de hojas en presencia de NpAu.	161
5.10. Cinética de Kautsky	162
5.11. Parámetros derivados de la cinética de Kautsky en presencia de NpAu en función del tiempo de exposición.	164
5.12. Tasa máxima de transporte electrónico.	172
5.13. Tasa máxima de evolución de oxígeno de cloroplastos.	174
5.14. Imágenes SEM de hojas tratadas con suspensión de NpAu y solución control	175
5.15. Imagen SEM de NpAu	176
5.16. Imágenes SEM de un corte transversal de hoja tratada con NpAu.	177
5.17. Imágenes TEM de cloroplastos con NpAu.	178
5.18. Imágenes de Cryo-TEM de hojas tratadas con NpAu.	179
5.19. Espectros de absorbancia normalizados de extractos y pigmentos puros.	181
5.20. Decaimiento de fluorescencia de clorofila en atmósfera de nitrógeno	181
5.21. Decaimiento de fluorescencia de clorofila en atmósfera de aire	182
5.22. Espectros de absorbancia y fluorescencia de las muestras estudiadas	185
5.23. Espectros de absorción del transiente	186
5.24. Trazas cinéticas obtenidas tras la excitación (355 nm) por fotólisis de des-tollo láser a distintas longitudes de onda de observación para las muestras en estudio. Las curvas punteadas corresponden a los ajustes monoexponen-ciales correspondientes a cada decaimiento	188
5.25. Tiempos de vida del triplete	189
6.1. Esquema general de la síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4	202
6.2. Fotografía de las partículas	209
6.3. Caracterización morfológica y distribución de tamaño de nanopartículas de magnetita	209

6.4. Espectrograma de difracción de rayos X de nanopartículas de magnetita	211
6.5. Espectroscopia infrarroja de nanopartículas de magnetita.	212
6.6. Curva de histéresis de magnetización	213
6.7. Espectros de absorción y <i>band gap</i>	216
6.8. Espectros de reflectancia	220
6.9. Espectros de fluorescencia estacionaria	223
6.10. Transientes de fluorescencia experimentales y normalizados	226
6.11. Parámetros derivados de la curva OJIP relativos al control	228
6.12. Parámetros derivados de la cinética de Kautsky	233
6.13. Rendimientos cuánticos en función del tiempo de aclimatación para el control y las muestras	235
6.14. Curvas PSMT	236
6.15. Decaimiento del cociente k_{NPQ}/k_C en función del tiempo y componentes del NPQ obtenidos tras el ajuste bi-exponencial	238
7.1. Imágenes de las suspensiones resultantes tras las síntesis de las nanopartículas bajo iluminación de una lámpara negra (luz UV-A)	259
7.2. Microscopía electrónica de nanopartículas de carbono (GQD y nano-CB) sintetizadas	268
7.3. Espectroscopia infrarroja de GQD y nano-CB.	269
7.4. Caracterización espectroscópica de las nanopartículas GQD	271
7.5. Caracterización espectroscópica de las nanopartículas nano-CB	273
7.6. Fluorescencia resuelta en el tiempo	275
7.7. Espectros de fluorescencia experimental, corregidos por reabsorción de luz y normalizados de hojas tratadas con nanopartículas y hojas control	282
7.8. Transientes de fluorescencia experimentales y normalizados	284
7.9. Parámetros derivados de la curva OJIP relativos al control	289
7.10. Partición de energía	295
7.11. Superposiciones espectrales para la emisión y absorción entre cloroplastos y nanopartículas GQD y matrices de emisión de cada sistema	302
7.12. Espectros de fluorescencia de mezclas de cloroplastos y GQD	304

7.13. Espectros de fluorescencia corregidos y absorbancia para el control de cloroplastos	305
7.14. Espectros de fluorescencia corregidos y absorbancia, para las distintas concentraciones de nanopartículas en ausencia de cloroplastos	306
7.15. Gráficos de Stern-Volmer para GQD	307
7.16. Superposiciones espectrales para la emisión y absorción entre cloroplastos y nanopartículas nano-CB y matrices de emisión de cada sistema	308
7.17. Espectros de fluorescencia corregidos por filtro interno y por la dilución para las distintas muestras con excitación a 360 nm	310
7.18. Espectros de fluorescencia corregidos por filtro interno y por dilución para las distintas muestras con excitación a 480 nm	310
7.19. Espectros de absorbancia para las distintas muestras estudiadas	311
7.20. Gráficos de Stern-Volmer para nano-CB	311

Trabajos publicados durante la tesis

Trabajos presentados en congresos

1. **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2021) Nanofertilizantes: Impacto de nanopartículas de magnetita en la actividad fotosintética de plantas. *XXII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (XXII CAFQI)*. Buenos Aires, Argentina.
2. Diz, V. E., **Torres, R.**, Marín, M. L. and Boscá, F. (2021) Asociación inter y transmembrana de 2-(N,N,N-trimetilamonio) etiltio ftalocianinato de zinc vehiculizada en vesículas unilamelares (VUPC) detectada por técnicas de flash fotólisis. *XXII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (XXII CAFQI)*. La Plata, Bs. As.
3. **Torres, R.**, Lagorio, M. G. and Diz, V. E. (2020) Nanoparticles as nanofertilizer. Impact of magnetite nanoparticles on plant photosynthesis. *Nanoandes Perú 2020*. Lima, Perú.
4. **Torres, R.**, Lagorio, M. G., Marchi, M. C. and Diz, V. E. (2020) Functionalized magnetite nanoparticles. Study of its physicochemical properties and biocompatible applications. *7th ISGS Online Summer School on Hybrid Materials: From Basics to Cutting Edge Applications*. España.
5. **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2020) Impact of the foliar application of magnetite nanoparticles on the photosynthetic activity and photophysical properties of leaves. *V Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos (V GRAFOB)*. Rosario, Santa Fe, Argentina.
6. Bardeci González, N., Romero, J. M., **Torres, R.** and Lagorio, M. G. (2020) Design of light filters that improve the contrast between colors perceived by color blind people.

V Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos (V GRAFOB). Rosario, Santa Fe, Argentina.

7. **Torres, R.**, Lagorio, M. G., Marchi, M. C. and Diz, V. E. (2020) Functionalized Fe_3O_4 nanoparticles. Physicochemical properties and biocompatible applications. *30th LNLS Annual Users' Meeting (RAU)*. Campinas, San Pablo, Brasil.
8. **Torres, R.**, Romero, J. M. and Lagorio, M. G. (2019) Chlorophyll fluorescence: a non-destructive plant monitoring technique. *7º Congreso de Ciencias Ambientales*. Buenos Aires, Argentina.
9. Diz, V. E., **Torres, R.**, Marín, M. L. and Bosca, F. (2019) Life-time study for Derivatives of Phthalocyanines vehiculized in Unilamellar Vesicles of Phosphatidylcholine (UVMC) through the Laser Flash Photolysis Technique. *Symposium Exploring the Frontiers of Chemistry: Challenges for the 21st Century*. Buenos Aires, Argentina.
10. **Torres, R.**, Laviani, M., Rovner, F., Marchi, M. C. and Diz, V. E. (2018) Polymeric and magnetic nanoparticulate systems for environmental remediation. *1ras. Jornadas de Ambiente*. Buenos Aires, Argentina.
11. **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2018) Effects of gold nanoparticles on the photophysical and photosynthetic parameters of leaves and chloroplasts. *1ras. Jornadas de Ambiente*. Buenos Aires, Argentina.
12. **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2017) Effects of Gold Nanoparticles on the photophysical parameters and photosynthetic capacity of Leaves and Chloroplasts. *XIII Latin American Meeting of Photochemistry and Photobiology (XIII ELAFOT)*. Córdoba, Argentina.
13. **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2017) Estudio de parámetros fotosintéticos de hojas y cloroplastos. In *III Congreso nacional de ciencia y tecnología ambiental (AA2017)*. Santa Fé, Argentina.
14. **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2017) Effect of Gold Nanoparticles on isolated leaves and chloroplasts. Photochemical study. *6º Congreso de Ciencias Ambientales*.

15. **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2016) Changes in photosynthetic parameters using Nanobionics plants. *III Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos (III GRAFOB)*. Tucuman, Argentina.
16. **Torres, R.**, Bonesi, S. M. and Diz, V. E. (2015) Vehiculization of α -naphthylacetamide in phosphatidylcholine unilamellar vesicles. *XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (XIX CAFQI)*. Buenos Aires, Argentina.

Publicaciones en revistas con referato

1. Abraham Basso, A. L., Rockenbach De Ávila, M., **Torres, R.** and Diz, V. (2021) Magnetite nanoparticles as a promising non contaminant method to control populations of fruit flies (DIPTERA : Tephritidae). *J. Appl. Biotechnol. Bioeng. Res.* 8, 112–117. [DOI:10.15406/jabb.2021.08.00262](https://doi.org/10.15406/jabb.2021.08.00262).
2. **Torres, R.**, Romero, J. M. and Lagorio, M. G. (2021) Effects of sub-optimal illumination in plants. Comprehensive chlorophyll fluorescence analysis. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 218, 112182. [DOI:10.1016/j.jphotobiol.2021.112182](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112182).
3. Cuba, N. I., **Torres, R.**, San Román, E. and Lagorio, M. G. (2020) Influence of Surface Structure, Pigmentation and Particulate Matter on Plant Reflectance and Fluorescence. *Photochem. Photobiol.* [DOI:10.1111/php.13273](https://doi.org/10.1111/php.13273).
4. Romero, J. M., **Torres, R.**, Ospina Calvo, B., Diz, V. E., Iriel, A., Cordon, G. B. and Lagorio, M. G. (2020) Photochemistry and photophysics of biological systems. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 106, [Enlace directo](#).
5. Fleite, S. N., García, A. R., De los Santos, C., Missoni, L. L., **Torres, R.**, Lagorio, M. G. and Cassanello, M. (2020) Simulation and optimization of a lamella settler for cattle feedlot wastewater treatment and nutrients recovery. Experimental validation in the field. *Heliyon* 6. [DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e0584](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e0584).
6. **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2018) Effects of gold nanoparticles on the photophysical and photosynthetic parameters of leaves and chloroplasts. *Photochem. Photobiol. Sci.* 17, 505–516. [DOI:10.1039/c8pp00067k](https://doi.org/10.1039/c8pp00067k).

Publicaciones enviadas a revistas con referato - en revisión -

- **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2022) Nanobiophotonics. Effect of Carbon nanoparticles on the optical and spectroscopic properties of *Cichorium intybus* leaves. *Photochem. Photobiol.* Enviado: Enero 2022
- **Torres, R.**, Diz, V. E. and Lagorio, M. G. (2022) Improved photosynthetic performance induced by Fe_3O_4 . *Photochem. Photobiol. Sci.* Enviado: Febrero 2022 nanoparticles

Introducción

1.1. Introducción

Los nanomateriales han recibido especial atención por su impacto positivo en la mejora de muchos sectores de la economía. Están incluidos en productos de consumo de distintas industrias como la farmacéutica y la cosmética[1]. Poseen numerosas aplicaciones en diversos campos: transporte, energía, agricultura, etc., y cada vez se producen en mayor cantidad y variedad. En el presente existe un amplio debate sobre los riesgos y beneficios de los nanomateriales en el medio ambiente. Hay dos grandes aspectos de interés coexistiendo actualmente para estudiar el efecto de materiales nanoparticulados en el ecosistema. Uno de ellos se refiere al impacto a nivel ecológico que pueden generar las nanopartículas (NP) en sistemas naturales como las plantas; y el otro se focaliza en los beneficios que pueden obtenerse desde una perspectiva agrícola, en el sentido de buscar productos en base a nanomateriales que mejoren la productividad de los cultivos (Fig. 1.1).

Para evaluar sus posibles efectos adversos en los ecosistemas y en la salud humana, la comunidad científica trabaja prestando cada vez más atención a este tema. La literatura sobre la ecotoxicidad de las nanopartículas y los nanomateriales se resume en informes recientes [2-4]. Debido a su uso generalizado en productos de consumo, se espera que las nanopartículas, como cualquier efluente de origen antropogénico, terminen en algún medio: acuático, terrestre y atmosférico, donde su destino y comportamiento son en gran parte desconocidos.

Por otro lado, la nanotecnología ha permitido grandes avances en la investigación agrícola, como la ciencia y tecnología reproductiva, la conversión de desechos agrícolas y alimenta-

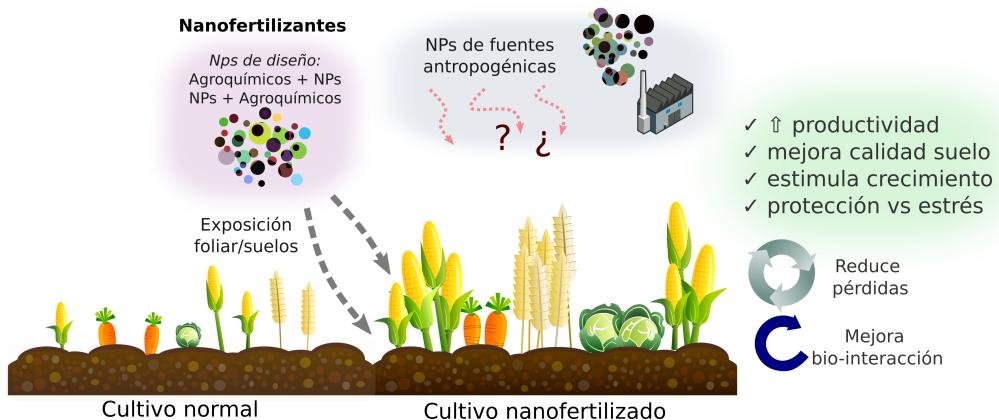


FIGURA 1.1: Esquema general de las distintas perspectivas para estudiar el efecto de nanopartículas en material fotosintético como las plantas. Nanopartículas diseñadas específicamente para una dada función pueden actuar como nanofertilizantes promoviendo el crecimiento de cultivos, mientras que otras nanopartículas provenientes de fuentes antropogénicas pueden resultar contaminantes del ambiente.

rios en energía y otros subproductos útiles a través del nano-bioprocesamiento enzimático, la prevención y tratamiento de enfermedades en plantas usando varios nanocidas [5, 6]. Los dispositivos a nanoescala con propiedades novedosas hacen que los sistemas agrícolas sean inteligentes. Dichos dispositivos son capaces de responder a diferentes situaciones por sí mismos, tomando las medidas correctivas adecuadas. Estos sistemas inteligentes administran productos químicos de una manera controlada y dirigida, similar al uso propuesto de administración de nanofármacos en humanos [7]. Estos *sistemas de entrega inteligentes* en la agricultura deben poseer una combinación de características multifuncionales para una acción exitosa. La seguridad de la agricultura y del sistema alimentario, los nuevos sistemas de administración para el tratamiento de enfermedades, herramientas para la biología molecular y celular, y materiales para la detección de patógenos vegetales son algunos de los vínculos nanotecnológicos con la agricultura y la ciencia de los alimentos [8]. Además de estos, las plantas y/o sus extractos proporcionan una ruta de síntesis biológica de varias nanopartículas metálicas que es más ecológica y permite una síntesis controlada con tamaño y forma bien definidos [9]. En la siguiente sección se presentan algunos de los desarrollos recientes relacionados con la aplicación de nanopartículas para un uso más efectivo y seguro de químicos para plantas así como también se revisa la fitotoxicidad de diferentes tipos de nanopartículas sobre plantas.

1.2. Nanomateriales en plantas

1.2.1. Generalidades

Las plantas superiores interactúan fuertemente con sus ambientes atmosféricos y terrestres y se espera que se vean afectadas como resultado de su exposición a las NP. La nanofitotoxicidad es el aspecto más ampliamente analizado en los estudios relacionados con las interacciones entre plantas y NP (se han publicado más de 1500 artículos en la última década), y se han observado efectos tanto dañinos como beneficiosos en las plantas a nivel fisiológico, bioquímico y genético. [10-12]. La captación, translocación y acumulación de NP en las plantas desempeñan un papel fundamental en la determinación de su fitotoxicidad y también pueden influir aún más en la seguridad alimentaria humana[12-14]. El conocimiento actual sobre los mecanismos de absorción y translocación de las NP en las plantas siguen siendo muy limitado. Schwab y col. han revisado exhaustivamente las diversas barreras fisiológicas para la absorción y el transporte de NP en las plantas [13]. Otro aspecto importante es que las NP suelen ser inestables y pueden ocurrir transformaciones abióticas o bióticas como reacciones redox, agregación y disolución de las NP, alterando en gran medida la biodisponibilidad, toxicidad y destino de las mismas [11, 15, 16]. Por lo tanto, es necesario considerar todos estos factores a la hora de realizar un estudio de los posibles efectos de nanopartículas en plantas. Generalmente, en este tipo de trabajos se suelen considerar estudios sobre germinación de semillas, alargamiento de raíces, a menudo acompañados de otras evaluaciones sobre cambios de biomasa y estudios anatómico-histológicos, útiles para evidenciar *in situ* síntomas de posible toxicidad.

1.2.2. Vías de Exposición

Existen dos modos diferentes de exposición de las plantas a las NP, la exposición foliar y la exposición de las raíces. El conocimiento actual sobre la absorción foliar y las vías de translocación de las NP bajo exposición foliar, se resume en el diagrama esquemático que se muestra en la [Fig. 1.2](#). La cutícula de las hojas es la primera barrera natural contra las NP. Las hojas de las plantas superiores están protegidas por una capa de cera para disminuir la pérdida de agua y el intercambio incontrolado de otros solutos. Hay dos rutas para la absorción de solutos a través de la cutícula, una accesible para solutos no polares a través de difusión y permeación (vía lipofílica) y otra para solutos polares, que ingresan a

través de poros acuosos (vía hidrofílica) con un tamaño efectivo estimado que varía entre 0,6 y 4,8 nm [17]. En consecuencia, las NP de 4,8 nm o menos, pueden penetrar directamente a través de la vía cuticular. Sin embargo, muchos estudios han reportado sobre la captación foliar y la acumulación de NP mayores a 5 nm aunque la vía por la cual estas NP son absorbidas aún no está clara.

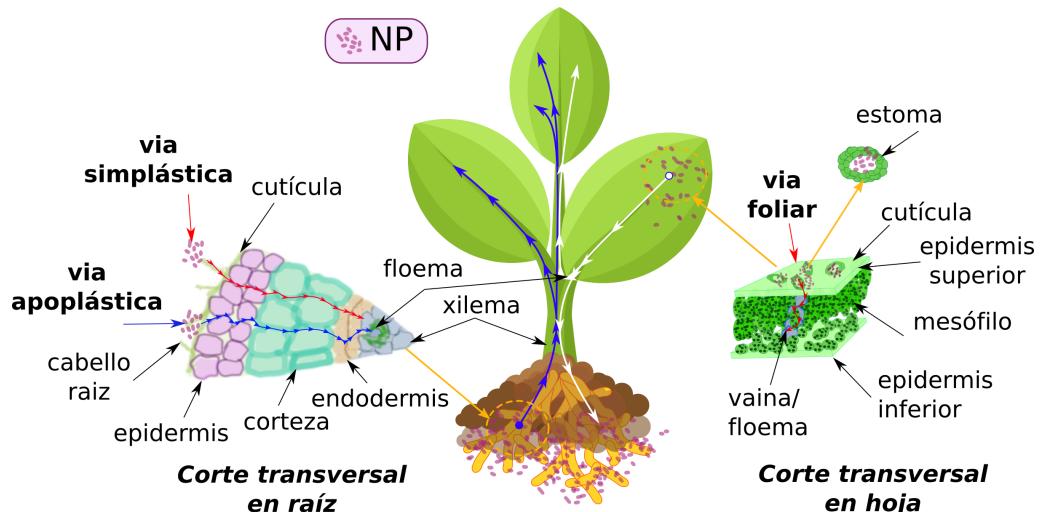


FIGURA 1.2: Diagrama esquemático de las vías de absorción y translocación de NP en plantas.

Además de la vía cuticular, algunos estudios han demostrado la captación de sustancias hidrófilas a través de las aberturas estomáticas (vía foliar, Fig. 1.2). El tamaño morfológico de las aberturas estomáticas es de aproximadamente 25 μm de longitud y de 3 a 10 μm de ancho [17]. Sin embargo, debido a la construcción geométrica única y la función fisiológica de los estomas, el límite de exclusión de tamaño real de la apertura estomática para la penetración de las NP está lejos de ser conocido. Eichert y Goldbach, utilizando un método de cálculo indirecto, estimaron que el radio de poro equivalente de esta vía era mayor de 20 nm [17]. Esta vía estomática es la única vía confirmada de absorción foliar de NP desde la superficie de la hoja hacia los tejidos internos. Numerosos estudios apoyan esta vía de absorción de NP, incluida la observación de varias NP o sus agregados en los estomas de las hojas y los tejidos más profundos de diferentes especies de plantas, utilizando microscopías electrónicas (TEM) o micrografías de rayos X ($\mu\text{-XRF}$), entre otras [11, 18, 19]. Los resultados experimentales indican que el radio de poros de la vía estomática estimado por Eichert y Goldbach fue una subestimación. Además, se espera

que las especies de plantas con diferente morfología de hojas, tamaño y densidad de estomas tengan diferentes capacidades para la absorción foliar de NP [19]. Las NP pueden sufrir un transporte de larga distancia a través del sistema vascular después de entrar en el apoplasto de la hoja a través de la vía estomática (Fig. 1.2). En general, el transporte de líquidos a larga distancia en plantas superiores se produce a través del sistema vascular, que está compuesto por los tejidos conductores del xilema (de raíz a brote) y el floema (de brote a raíz). Los resultados de Wang y cols. [20], Hong y cols. [21], entre otros, apoyan la idea de que las NP pueden transportarse hacia arriba a través del xilema y hacia abajo a través del floema, aunque se desconoce cómo se transportan las NP entre ambos tejidos conductores. Las NP y sus productos transformados en las raíces pueden exudarse posteriormente, pudiendo influir aún más en la comunidad microbiana de las raíces.

En el entorno natural, hay muchos microorganismos capaces de secretar sustancias que pueden inducir la disolución de NP y aumentar su absorción, o bien pueden formar una capa mucosa que protege la superficie de las hojas contra la absorción de NP [11]. Además, algunas enfermedades e infecciones comunes de las hojas pueden destruir los tejidos protectores de las hojas de la cutícula, epidermis e incluso el mesófilo, y reducir la capacidad de las barreras de las hojas contra las NP.

Muchos estudios han informado que las plantas, especialmente árboles y arbustos, juegan un papel importante en la filtración y atrapamiento de partículas en el aire, y por lo tanto mejoran la calidad del aire [22]. Sin embargo, ningún estudio ha informado si las plantas pueden filtrar y capturar NP atmosféricas y en qué medida. Como se mencionó anteriormente, los experimentos a escala de laboratorio indican que las plantas son capaces de capturar NP a través de sus hojas. Dado que el área de la superficie foliar global es enorme, aproximadamente el doble de la superficie terrestre [11], se espera que la captación de partículas (incluyendo NP) por el material vegetal sea muy importante.

Finalmente, el otro método de exposición de las plantas a las NP es la exposición de raíces, el cual es más popular en los trabajos científicos debido a la facilidad de su implementación en un cultivo hidropónico. Sin embargo, se han obtenido algunos resultados contradictorios y el tema de la absorción de NP esta vía sigue siendo controvertido [11, 23, 24]. Este

fue uno de los principales motivos por los cuales en este trabajo de tesis se expusieron las plantas a NP a través de las hojas. Otra cuestión importante es la posibilidad no deseada de transformación química de las NP en su transporte desde las raíces hasta las hojas, lugar donde se realizaron las determinaciones espectroscópicas y fotofísicas.

1.2.3. Fitotoxicidad de nanopartículas en plantas

La mayoría de los estudios centrados en la toxicidad de nanopartículas registran el porcentaje de germinación, elongación de las raíces, la biomasa y el número de hojas [4, 25]. Al interactuar con las plantas, las NP inducen varios cambios morfológicos y fisiológicos, según sus propiedades específicas y su concentración. Hay una gran variedad de informes disponibles que muestran tanto efectos positivos como negativos de las NP en plantas [3, 26]. Las NP pueden tener efectos negativos sustanciales, como la reducción de la germinación de las semillas y la supresión del alargamiento de las plantas, e incluso pueden provocar la muerte de las plantas. Usualmente en estos trabajos se han estudiado un amplio rango de concentraciones de NP con el objetivo de encontrar la concentración tóxica mínima. A continuación se resume brevemente el impacto de las NP a distintos niveles en las plantas.

Un ejemplo de los efectos fitotóxicos de las NP se presenta en el trabajo de Yang y cols., [3] donde se ha estudiado la nanotoxicidad por exposición a nanotubos de carbono de pared simple, NP de ZnO, NP de Ag y NP de Fe, sobre especies de plantas como soja, maíz, trigo, raigrás y cebada. En ellos, varios aspectos del crecimiento de las plantas se vieron negativamente afectados incluida la germinación de semillas, la longitud de los brotes, la biomasa y la expresión genética [4]. Otro ejemplo es el trabajo de Nair y Chung [47] que demostraron el efecto fitotóxico de las NP de plata y concluyeron que con la exposición a una concentración de $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de estas NP, la biomasa de raíces y brotes disminuyó significativamente, y a mayor concentración también afectó el área foliar y el contenido de pigmentos. En otro estudio, se ha demostrado que las NP de ZnO en concentraciones de $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ inhiben el alargamiento de las raíces en maíz y arroz [48]. Del mismo modo, Xiang y colaboradores observaron que las NP de ZnO no afectaron las tasas de germinación a concentraciones menores a $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pero inhibieron significativamente la elongación de raíces y brotes de las plántulas de col China. Tanto la producción de grupos

TABLA 1.1: Impacto de las nanopartículas en plantas a nivel morfológico, fisiológico y genético.

Impacto	Nanopartícula
<i>Morfológico</i>	
Reduce biomasa	Fe ₂ O ₃ [27], ZnO [23], MWCNT [28], Cu[28], Si [29]
Germinación retardada o inhibida	Ag [30], Si [28], Al [31]
Elongación de raíz reducida	CuO [32], SiO ₂ [25], Fe ₃ O ₄ [25], ZnO [33], Cu [34], Al [31], Zn [31]
<i>Fisiológico - Bioquímico</i>	
Generación de ROS y estrés oxidativo	MWCNT [35], CuO [32], Ag [36], ZnO [37], Al ₂ O ₃ [38], TiO ₂ [39], QDots [40]
Daño oxidativo	CuO [32], Au [41], Al ₂ O ₃ [38]
Alteración de regulación génica	SWCNT [42], Ag [36],
Mitosis interrumpida	Ag [43]
<i>Genético</i>	
Daño estructural al ADN	TiO ₂ [44, 45], CeO ₂ [33]
Fragmentación y aberración cromática	Ag [43], TiO ₂ [44, 45]
Alteración expresión génica	MWCNT [46], Ag [36]

hidroxilo libres como la bioacumulación de Zn en raíces o brotes, son los responsables de la toxicidad de las NP de ZnO para las plántulas de col China [49]. Por último, Landa y colaboradores estudiaron el efecto de la exposición a $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de NP de ZnO sobre la expresión génica en *Arabidopsis thaliana*. Observaron inducción de genes asociados a estrés y disminución en la regulación de genes asociados a la organización celular y la biogénesis [50].

Hay una gran variedad de ejemplos como los anteriores en literatura y en resumen, el efecto que puedan tener las NP sobre las plantas es difícil de predecir ya que depende no solo de las propiedades particulares de las nanopartículas en cuestión (tamaño, carga superficial, porosidad, reactividad química, revestimiento superficial, propiedades ópticas, etc.) sino también de las características particulares de la planta (morfológicas y fisiológicas),

el método de exposición, características del entorno y la concentración de NP [4, 51]. Si bien una variedad de nanomateriales provocan efectos tóxicos, muchos otros actúan como reguladores del crecimiento induciendo un aumento significativo de la biomasa e incluso favorecen el desarrollo y el crecimiento, presagiando así sus aplicaciones en la agricultura como nanofertilizantes. Con el reciente énfasis en la nanotoxicología, los investigadores comenzaron a centrarse en cómo estas nanopartículas ingresan a las células vegetales y se distribuyen en diferentes partes, cómo afectan el crecimiento o el rendimiento, pero aún no se conocen los modos de acción asociados en la mayoría de los casos [4]. Asimismo, si bien una gran cantidad de estudios han indicado que las nanopartículas pueden trasladarse a través del xilema (movimiento ascendente) y el floema (movimiento descendente), no se ha dilucidado como atraviesan la gruesa membrana celular vegetal, o si utilizan algunos transportadores o canales. A partir de la lectura de la literatura, parece que la mayor parte de los estudios se llevaron a cabo en instalaciones hidropónicas o involucraron respuestas de germinación de semillas que no reflejan verdaderamente las condiciones ambientales. Dado que las investigaciones apuntan a la movilidad de las nanopartículas a través de la raíz, el tallo, las hojas y los frutos en las especies de cultivos, existe la posibilidad de que los nanomateriales se transfieran a diferentes niveles tróficos [28]. Claramente, es necesario trabajar más para dilucidar los efectos ecotoxicológicos de la exposición a nanopartículas.

1.2.4. Nanopartículas en la Industria agrícola

La nanotecnología ofrece un papel importante en la mejora de las técnicas existentes en la agricultura. Los agroquímicos se aplican convencionalmente a los cultivos mediante pulverización y/o difusión. Por lo general, solo una concentración muy baja de producto químico, muy por debajo de la concentración mínima efectiva requerida, llega al sitio de destino de los cultivos debido a problemas como la lixiviación, degradación por calor, hidrólisis y por degradación microbiana. Por lo tanto, la aplicación reiterada es necesaria para tener un control efectivo sobre los posibles efectos desfavorables como la contaminación del suelo y el agua. Los agroquímicos nanoencapsulados deben diseñarse de tal manera que posean todas las propiedades tales como concentración efectiva (con alta solubilidad, estabilidad y efectividad), liberación controlada en el tiempo en respuesta a ciertos estímulos, actividad dirigida mejorada, baja ecotoxicidad, y un modo de administración sencillo, evitando así la aplicación reiterada [5, 52-54].

Los nanomateriales con un potencial uso en la agricultura se pueden clasificar principalmente en dos grandes grupos: nanopartículas y compuestos activos encapsulados o combinados con un nanomaterial. Dentro del primer grupo se encuentran las nanopartículas que por su composición química y/o funcionalización superficial poseen algún tipo de efecto sobre el cultivo. Estos nanomateriales incluyen fertilizantes o estimulantes del crecimiento de plantas, agentes bactericidas, fungicidas, pesticidas y biosensores de agroquímicos. En la [Tabla 1.2](#) se resumen las aplicaciones principales de las nanopartículas en la industria agrícola y se muestran algunos ejemplos de nanopartículas para cada aplicación.

TABLA 1.2: Diferentes tipos de nanopartículas y su aplicación en agricultura.

Aplicación	Nanopartículas
Protección de cultivos	
Bactericida	Ag [55-57], Mg [58], TiO ₂ [59], ZnO [60]
Fungicida	Ag [61-63], Cu [57, 64], CeO ₂ [65], Si [66], C [67]
Pesticida	Ag [68], CuO [69], Ni [70]
Tratamiento de semillas	
Aumento de germinación	Fe [71], Co [71], Cu [71], Fe ₂ O ₃ [72], SiO ₂ [73]
Protección de semillas	Ag [74]
Biosensores	
Detección de herbicidas	C (MWCNT) [75], Grafeno [76], Au [77], Ag [78]
Detección de organofosfatos	Au [79]
Detección de paratión	Au [79], ZrO ₂ [80], TiO ₂ [81], C (SWCNT)[82]
Detección de clorpirifos	C (SWCNT) [82]
Fertilización	
Crecimiento y biomasa	Ag [83], CeO ₂ [84, 85], C (MWCNT) [86]
Floración y semillas	ZnO [87]

Las aplicaciones potenciales del segundo grupo de nanopartículas, aquellas utilizadas para el transporte de otros agentes químicos, son: suministro de pesticidas encapsulados en nanomateriales para liberación controlada; estabilización de bioplaguicidas con nanomateriales; liberación lenta de fertilizantes, biofertilizantes y micronutrientes asistidos por nanomateriales para un uso eficiente y entrega de material genético para la mejora de cul-

tivos a través de nanopartículas. Si bien las aplicaciones de este segundo grupo son muy interesantes, este trabajo de tesis se centra en la primer categoría: nanopartículas simples con una acción directa en las propiedades fotosintéticas de las plantas.

A continuación se presentan más detalles de algunos ejemplos señalados en la [Tabla 1.2](#). El tratamiento de semillas de *Triticum aestivum L.* (trigo) con nanopartículas de plata (concentraciones entre $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) dio como resultado un incremento en el porcentaje de germinación, un aumento en el peso seco de brotes y raíces, aumento del rendimiento de semillas (menor abscisión), mayor número de hojas, mayor altura de la planta, mayor largo y ancho de la hoja y aumentó el peso seco de la planta [53]. Se observaron resultados similares para semillas de *Borago officinalis* (borraja)[88], *Brassica juncea* (mostaza)[89], *Raphanus sativus* (rábano)[90] y *Arabidopsis* (planta modelo para investigación)[91], donde además se observó promoción del crecimiento de la planta, desarrollo del cloroplaso y el metabolismo de carbohidratos. Un ejemplo de nanopartículas con efecto insecticida se encuentra en las de níquel, que a concentraciones de $\sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ resultaron activas contra las larvas de dos especies de garrapatas del ganado (*Rhipicephalus microplus* y *Hyalomma anatomicum*), así como contra tres especies de mosquitos (*Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* y *Culex gelidus*). La actividad pesticida de las nanopartículas fue aproximadamente 2 veces mayor que la de los complejos de Nihidracina a partir de los cuales se sintetizaron las nanopartículas [70]. Por ultimo, según el estudio realizado por Srivastava y Rao, los nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) funcionalizados pudieron penetrar el recubrimiento de la semilla y mejorar la absorción de agua creando nuevos poros. Los resultados sugirieron que el crecimiento de raíces y brotes se incrementó junto con la biomasa y el número de hojas en comparación con las muestras controladas. El estudio también destacó que una baja dosis de nanotubos promovió el crecimiento del maíz, ajo, maní y trigo [86].

En el escenario agrícola actual, el uso extensivo de agroquímicos para impulsar la producción agrícola ha contaminado tanto la capa superficial del suelo como también las aguas subterráneas. Para aumentar la productividad agrícola teniendo en cuenta el daño al ecosistema es necesario considerar nuevos enfoques. Actualmente se encuentran en desarrollo diversas aplicaciones prometedoras en las áreas de suministro de pesticidas,

bioplaguicidas, fertilizantes y material genético para la transformación de plantas [92]. Se espera que el uso de nanomateriales para el suministro de pesticidas y fertilizantes reduzca la dosis y asegure una entrega lenta controlada [52]. Una de las principales contribuciones previstas es la aplicación de nanopartículas para estabilizar preparaciones de biocontrol que contribuirán en gran medida a reducir el riesgo medioambiental [93]. La nanotecnología, al explotar las propiedades únicas de los nanomateriales, ha desarrollado nanosensores capaces de detectar patógenos en niveles tan bajos como partes por mil millones. Además de la detección, la nanotecnología también tiene soluciones para degradar los productos químicos persistentes en componentes inofensivos y, en ciertos casos, útiles [54]. Las herramientas de la nanotecnología se pueden emplear para abordar los problemas urgentes de la protección ambiental y la contaminación. En síntesis, los nanomateriales tienen un gran potencial para mejorar la productividad agrícola. Sin embargo, el destino, el transporte y el riesgo ambiental de las nanopartículas deben evaluarse críticamente para garantizar su uso seguro en la agricultura [8].

1.3. Motivación

Los avances en la ciencia y la tecnología de los nanomateriales han dado como resultado su presencia ubicua. Utilizamos nanomateriales en nuestros hogares e industrias a diario, y podemos encontrarlos en la naturaleza como contaminantes en el suelo, el agua y las plantas [94, 95]. Los nanomateriales se utilizan actualmente en numerosos productos comerciales y procesos industriales [96]. Las NP pueden afectar la salud de las plantas, provocando efectos agudos y crónicos como se ha comentado en la [Subsección 1.2.3](#). En contraste, los efectos positivos de varias NP sobre diferentes parámetros fotosintéticos, crecimiento y desarrollo se reportaron en varias especies de plantas [83, 84, 86] como se resumió en la [Subsección 1.2.4](#). Sin embargo, la literatura reciente contiene resultados variables y a menudo contradictorios sobre los efectos de un tipo específico de nanopartícula en concentraciones similares en diferentes especies de plantas, y los mecanismos subyacentes siguen siendo desconocidos [95]. Por lo tanto, se necesitan más estudios para esclarecer los efectos de la interacción entre las NP y las plantas, especialmente en lo que respecta al desempeño fotosintético y fisiológico a nivel estructural que sustentan la eficiencia de la transformación energética [4, 5, 8]. Sin embargo, estos estudios adicionales

nales deben basarse en una evaluación crítica de la información disponible para orientar los estudios mecanicistas a comprender los fundamentos fisicoquímicos de las interacciones NP-planta. Paralelamente, estos estudios adicionales deben realizarse bajo condiciones mas realistas de exposición y dosaje de NP.

En particular, el estudio de la acción recíproca de nanopartículas en organismos fotosintéticos es relevante tanto en relación a los posibles efectos nocivos sobre las plantas (fitotoxicidad), como a la posibilidad de diseñar nanomateriales con aplicaciones en la agricultura desde fertilización hasta el desarrollo de biosensores [97]. Las plantas son la base tanto del ecosistema como de la cadena alimentaria, y están sometidas continuamente a materiales liberados y acumulados en el medio ambiente por la actividad antropogénica, por lo que es crucial probar los efectos de las NP en ellos, especialmente en sus pigmentos fotosintéticos [98, 99]. Las nanopartículas metálicas y las nanopartículas fluorescentes son candidatos atractivos para este estudio debido a su riqueza en propiedades ópticas especiales [100].

Otra cuestión importante es la metodología a seguir para dilucidar el efecto de las NP en las plantas. Como se comentó previamente, la mayoría de los trabajos estudian la fitotoxicidad de las NP prestando atención a las características fisiológicas y morfológicas de las plantas. En contraste, un reducido grupo de publicaciones estudian el efecto de las NP en la salud y la fotosíntesis de las plantas desde una perspectiva fisicoquímica. En ese sentido, la medición de la fluorescencia de clorofila *a* es uno de los métodos más utilizados para sondear la fotosíntesis. La fluorescencia de la clorofila *a* es una técnica confiable, no invasiva y no destructiva para la evaluación del transporte de electrones y los procesos fotosintéticos relacionados [101, 102]. El comportamiento espectroscópico y fotofísico (especialmente la fluorescencia) de la clorofila *a* se ha utilizado ampliamente como una herramienta para el monitoreo de la salud de las plantas y para obtener información sobre la fotosíntesis y las condiciones de estrés.[103-105] Diversas técnicas utilizan de base la emisión de la clorofila *a* de las hojas y revisaremos en detalle cada una de ellas en el Capítulo 2.

1.4. Objetivos

Teniendo en cuenta estas vacancias en la literatura, el objetivo general de este trabajo es estudiar la variación en las propiedades ópticas, espectroscópicas y fotoquímicas del material fotosintético cuando este interactúa con nanopartículas. En particular, se planeó llevar a cabo este estudio para tres niveles de interacción entre el vegetal y la nanopartícula: i) nanopartículas inoculadas sobre hojas, ii) nanopartículas combinadas con cloroplastos en suspensión, iii) nanopartículas y pigmentos fotosintéticos en medio homogéneo.

Estos objetivos específicos se encuadran dentro de objetivos más generales como son la evaluación de la toxicidad de nanopartículas en medios acuosos hacia vegetales, el estudio a nivel fisicoquímico de la variación de las propiedades de absorción de luz y transferencia de energía en el sistema nanopartícula- material fotosintético y la potencial aplicación de estos materiales en la agricultura como agentes fertilizantes o promotores del crecimiento, entre otros.

1.5. Descripción del trabajo

Con el objetivo de abarcar un abanico de nanopartículas con propiedades y características distintas, se decidió utilizar nanopartículas metálicas, nanopartículas de óxido metálico y nanopartículas no metálicas. Como representante de las nanopartículas metálicas se utilizaron nanopartículas de oro (NpAu) las cuales poseen una característica absorción plasmónica en la región visible del espectro electromagnético, por lo cual resulta interesante estudiar el efecto de este plasmón en la fotoquímica de hojas y cloroplastos. Luego, las nanopartículas de magnetita ($\text{Np-Fe}_3\text{O}_4$) representan al grupo de nanopartículas de óxidos metálicos y al igual que otros semiconductores no presentan absorción en el visible pero poseen una intensa magnetización. Por último, como nanopartículas no metálicas se utilizaron nanopartículas de carbono sintetizadas a partir de negro de humo microparticulado y nanopartículas de grafeno sintetizadas a partir de sacarosa. La diferencia entre ambas no solo radica en su composición química asociada a los materiales de procedencia, sino también en sus propiedades ópticas, ya que si bien ambas NP son fluorescentes poseen características espectroscópicas distintivas.

1.6. Organización de la tesis

En el [Capítulo 1](#) se presenta una introducción general relacionada con los antecedentes científicos en el tema de las interacciones NP-material vegetal y los intereses de su estudio tanto en el área ambiental como en la de producción agrícola. En el [Capítulo 2](#) se desarrollan los fundamentos teóricos que relacionan la fluorescencia de clorofila *a* con la fotosíntesis. En el [Capítulo 3](#) se muestran los métodos experimentales utilizados a lo largo de todo el trabajo de tesis. El [Capítulo 4](#) contiene el estudio exhaustivo de la respuesta de plantas sometidas a estrés lumínico. En el [Capítulo 5](#) se discuten los efectos de la presencia de nanopartículas de oro en las propiedades fotofísicas y fotosintéticas de hojas y cloroplastos. De forma similar el [Capítulo 6](#) revisa los efectos de aplicar nanopartículas de magnetita en hojas y el [Capítulo 7](#) el efecto comparativo de la presencia de nanopartículas de carbono de dos orígenes y composición diferente en las propiedades fotosintéticas de las plantas. Por ultimo, en el [Capítulo 8](#) se resumen las conclusiones generales de esta tesis.

Referencias

- (1) Navarro, E.; Baun, A.; Behra, R.; Hartmann, N. B.; Filser, J.; Miao, A.-J.; Quigg, A.; Santschi, P. H. y Sigg, L. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 372-386, DOI: [10.1007/s10646-008-0214-0](https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0).
- (2) Handy, R. D.; Owen, R. y Valsami-Jones, E. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 315-325, DOI: [10.1007/s10646-008-0206-0](https://doi.org/10.1007/s10646-008-0206-0).
- (3) Yang, J.; Cao, W. y Rui, Y. *J. Plant Interact.* **2017**, *12*, 158-169, DOI: [10.1080/17429145.2017.1310944](https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1310944).
- (4) Tripathi, D. K.; Singh, S.; Singh, S.; Pandey, R.; Singh, V. P.; Sharma, N. C.; Prasad, S. M.; Dubey, N. K.; Chauhan, D. K. y col. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *110*, 2-12, DOI: [10.1016/j.plaphy.2016.07.030](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030).
- (5) Su, Y.; Ashworth, V.; Kim, C.; Adeleye, A. S.; Rolshausen, P.; Roper, C.; White, J. y Jassby, D. *Environ. Sci.: Nano* **2019**, *6*, 2311-2331, DOI: [10.1039/c9en00461k](https://doi.org/10.1039/c9en00461k).
- (6) Pathakoti, K.; Manubolu, M. y Hwang, H.-M. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 245-253, DOI: [10.1016/j.jfda.2017.02.004](https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.02.004).

- (7) Roco, M. C. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 337-346, DOI: [10.1016/s0958-1669\(03\)00068-5](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(03)00068-5).
- (8) Zhao, L.; Lu, L.; Wang, A.; Zhang, H.; Huang, M.; Wu, H.; Xing, B.; Wang, Z. y Ji, R. *J. Agric. Food. Chem.* **2020**, *68*, 1935-1947, DOI: [10.1021/acs.jafc.9b06615](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06615).
- (9) Gour, A. y Jain, N. K. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 844-851, DOI: [10.1080/21691401.2019.1577878](https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878).
- (10) Ma, X.; Geiser-Lee, J.; Deng, Y. y Kolmakov, A. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 3053-3061, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2010.03.031](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031).
- (11) Lv, J.; Christie, P. y Zhang, S. *Environ. Sci.: Nano* **2019**, *6*, 41-59, DOI: [10.1039/c8en00645h](https://doi.org/10.1039/c8en00645h).
- (12) Dietz, K.-J. y Herth, S. *Trends Plant Sci.* **2011**, *16*, 582-589, DOI: [10.1016/j.tplants.2011.08.003](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.003).
- (13) Schwab, F.; Zhai, G.; Kern, M.; Turner, A.; Schnoor, J. L. y Wiesner, M. R. *Nanotoxicology* **2015**, *10*, 257-278, DOI: [10.3109/17435390.2015.1048326](https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1048326).
- (14) Miralles, P.; Church, T. L. y Harris, A. T. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 9224-9239, DOI: [10.1021/es202995d](https://doi.org/10.1021/es202995d).
- (15) Lowry, G. V.; Gregory, K. B.; Apte, S. C. y Lead, J. R. Transformations of Nanomaterials in the Environment, 2012, DOI: [10.1021/es300839e](https://doi.org/10.1021/es300839e).
- (16) Lin, D.; Tian, X.; Wu, F. y Xing, B. *J. Environ. Qual.* **2010**, *39*, 1896-1908, DOI: [10.2134/jeq2009.0423](https://doi.org/10.2134/jeq2009.0423).
- (17) Eichert, T. y Goldbach, H. E. *Physiol. Plant.* **2008**, *132*, 491-502, DOI: [10.1111/j.1399-3054.2007.01023.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01023.x).
- (18) Eichert, T.; Kurtz, A.; Steiner, U. y Goldbach, H. E. *Physiol. Plant.* **2008**, *134*, 151-160, DOI: [10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x).
- (19) Uzu, G.; Sobanska, S.; Sarret, G.; Muñoz, M. y Dumat, C. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 1036-1042, DOI: [10.1021/es902190u](https://doi.org/10.1021/es902190u).
- (20) Wang, W. N.; Tarafdar, J. C. y Biswas, P. *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15*, 1-13, DOI: [10.1007/s11051-013-1417-8](https://doi.org/10.1007/s11051-013-1417-8).

- (21) Hong, J.; Peralta-Videa, J. R.; Rico, C.; Sahi, S.; Viveros, M. N.; Bartonjo, J.; Zhao, L. y Gardea-Torresdey, J. L. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 4376-4385, DOI: [10.1021/es404931g](https://doi.org/10.1021/es404931g).
- (22) Dzierżanowski, K.; Popek, R.; Gawrońska, H.; Sæbø, A. y Gawroński, S. W. *Int. J. Phytorem.* **2011**, *13*, 1037-1046, DOI: [10.1080/15226514.2011.552929](https://doi.org/10.1080/15226514.2011.552929).
- (23) Lin, D. y Xing, B. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 5580-5585, DOI: [10.1021/es800422x](https://doi.org/10.1021/es800422x).
- (24) Zhou, D.; Jin, S.; Li, L.; Wang, Y. y Weng, N. *Journal of Environmental Sciences* **2011**, *23*, 1852-1857, DOI: [10.1016/s1001-0742\(10\)60646-8](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(10)60646-8).
- (25) Lee, C. W.; Mahendra, S.; Zodrow, K.; Li, D.; Tsai, Y.-C.; Braam, J. y Alvarez, P. J. *Environ. Toxicol. and Chemistry* **2010**, *29*, 669-675, DOI: [10.1002/etc.58](https://doi.org/10.1002/etc.58).
- (26) *Nanotechnology and Plant Sciences*; Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. y Mohammad, F., eds.; Springer International Publishing: 2015, DOI: [10.1007/978-3-319-14502-0](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0).
- (27) Feng, Y.; Cui, X.; He, S.; Dong, G.; Chen, M.; Wang, J. y Lin, X. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 9496-9504, DOI: [10.1021/es402109n](https://doi.org/10.1021/es402109n).
- (28) Stampoulis, D.; Sinha, S. K. y White, J. C. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 9473-9479, DOI: [10.1021/es901695c](https://doi.org/10.1021/es901695c).
- (29) Slomberg, D. L. y Schoenfisch, M. H. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *120827122017009*, DOI: [10.1021/es300949f](https://doi.org/10.1021/es300949f).
- (30) Pokhrel, L. R. y Dubey, B. *Sci. Total Environ.* **2013**, *452-453*, 321-332, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2013.02.059](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.059).
- (31) Lin, D. y Xing, B. *Environ. Pollut.* **2007**, *150*, 243-250, DOI: [10.1016/j.envpol.2007.01.016](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016).
- (32) Atha, D. H.; Wang, H.; Petersen, E. J.; Cleveland, D.; Holbrook, R. D.; Jaruaga, P.; Dizdaroglu, M.; Xing, B. y Nelson, B. C. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 1819-1827, DOI: [10.1021/es202660k](https://doi.org/10.1021/es202660k).
- (33) López-Moreno, M. L.; de la Rosa, G.; Hernández-Viecas, J. A.; Castillo-Michel, H.; Botez, C. E.; Peralta-Videa, J. R. y Gardea-Torresdey, J. L. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 7315-7320, DOI: [10.1021/es903891g](https://doi.org/10.1021/es903891g).

- (34) Lee, W.-M.; An, Y.-J.; Yoon, H. y Kweon, H.-S. *Environ. Toxicol. and Chemistry* **2008**, *27*, 1915, DOI: [10.1897/07-481.1](https://doi.org/10.1897/07-481.1).
- (35) Begum, P. y Fugetsu, B. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *243*, 212-222, DOI: [10.1016/j.jhazmat.2012.10.025](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.025).
- (36) Kaveh, R.; Li, Y.-S.; Ranjbar, S.; Tehrani, R.; Brueck, C. L. y Aken, B. V. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 10637-10644, DOI: [10.1021/es402209w](https://doi.org/10.1021/es402209w).
- (37) Mukherjee, A.; Peralta-Videa, J. R.; Bandyopadhyay, S.; Rico, C. M.; Zhao, L. y Gardea-Torresdey, J. L. *Metallomics* **2014**, *6*, 132-138, DOI: [10.1039/c3mt00064h](https://doi.org/10.1039/c3mt00064h).
- (38) Poborilova, Z.; Opatrilova, R. y Babula, P. *Environ. Exp. Bot.* **2013**, *91*, 1-11, DOI: [10.1016/j.envexpbot.2013.03.002](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.03.002).
- (39) Lei, Z.; Mingyu, S.; Xiao, W.; Chao, L.; Chunxiang, Q.; Liang, C.; Hao, H.; Xiaoqing, L. y Fashui, H. *Biol. Trace Elem. Res.* **2007**, *121*, 69-79, DOI: [10.1007/s12011-007-8028-0](https://doi.org/10.1007/s12011-007-8028-0).
- (40) Navarro, D. A.; Bisson, M. A. y Aga, D. S. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *211-212*, 427-435, DOI: [10.1016/j.jhazmat.2011.12.012](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.12.012).
- (41) Arora, S.; Sharma, P.; Kumar, S.; Nayan, R.; Khanna, P. K. y Zaidi, M. G. H. *Plant Growth Regul.* **2012**, *66*, 303-310, DOI: [10.1007/s10725-011-9649-z](https://doi.org/10.1007/s10725-011-9649-z).
- (42) Shen, C.-X.; Zhang, Q.-F.; Li, J.; Bi, F.-C. y Yao, N. *Am. J. Bot.* **2010**, *97*, 1602-1609, DOI: [10.3732/ajb.1000073](https://doi.org/10.3732/ajb.1000073).
- (43) Kumari, M.; Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 5243-5246, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2009.06.024](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024).
- (44) Castiglione, M. R.; Giorgetti, L.; Geri, C. y Cremonini, R. *J. Nanopart. Res.* **2010**, *13*, 2443-2449, DOI: [10.1007/s11051-010-0135-8](https://doi.org/10.1007/s11051-010-0135-8).
- (45) Ghosh, M.; Bandyopadhyay, M. y Mukherjee, A. *Chemosphere* **2010**, *81*, 1253-1262, DOI: [10.1016/j.chemosphere.2010.09.022](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.022).
- (46) Khodakovskaya, M. V.; de Silva, K.; Nedosekin, D. A.; Dervishi, E.; Biris, A. S.; Shashkov, E. V.; Galanzha, E. I. y Zharov, V. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *108*, 1028-1033, DOI: [10.1073/pnas.1008856108](https://doi.org/10.1073/pnas.1008856108).
- (47) Nair, P. M. G. y Chung, I. M. *Chemosphere* **2014**, *112*, 105-113.

- (48) Yang, Z.; Chen, J.; Dou, R.; Gao, X.; Mao, C. y Wang, L. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, *12*, 15100-15109, DOI: [10.3390/ijerph121214963](https://doi.org/10.3390/ijerph121214963).
- (49) Xiang, L.; Zhao, H.-M.; Li, Y.-W.; Huang, X.-P.; Wu, X.-L.; Zhai, T.; Yuan, Y.; Cai, Q.-Y. y Mo, C.-H. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 10452-10462, DOI: [10.1007/s11356-015-4172-9](https://doi.org/10.1007/s11356-015-4172-9).
- (50) Landa, P.; Vankova, R.; Andrllova, J.; Hodek, J.; Marsik, P.; Storchova, H.; White, J. C. y Vanek, T. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *241-242*, 55-62, DOI: [10.1016/j.jhazmat.2012.08.059](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.059).
- (51) Ruttakay-Nedecky, B.; Krystofova, O.; Nejdl, L. y Adam, V. *J. Nanobiotechnol.* **2017**, *15*, DOI: [10.1186/s12951-017-0268-3](https://doi.org/10.1186/s12951-017-0268-3).
- (52) Nair, R.; Varghese, S. H.; Nair, B. G.; Maekawa, T.; Yoshida, Y. y Kumar, D. S. *Plant Science* **2010**, *179*, 154-163, DOI: [10.1016/j.plantsci.2010.04.012](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012).
- (53) Pestovsky, Y. S. y Martínez-Antonio, A. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2017**, *17*, 8699-8730, DOI: [10.1166/jnn.2017.15041](https://doi.org/10.1166/jnn.2017.15041).
- (54) Baker, S.; Volova, T.; Prudnikova, S. V.; Satish, S. y Prasad, N. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *53*, 10-17, DOI: [10.1016/j.etap.2017.04.012](https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.012).
- (55) El-Rahman, A. y Mohammad, T. *J Appl Sci Res* **2013**, *9*, 6437-6440.
- (56) Ocsoy, I.; Paret, M. L.; Ocsoy, M. A.; Kunwar, S.; Chen, T.; You, M. y Tan, W. *Ac Nano* **2013**, *7*, 8972-8980.
- (57) Yoon, K.-Y.; Byeon, J. H.; Park, J.-H. y Hwang, J. *Sci. Total Environ.* **2007**, *373*, 572-575.
- (58) Imada, K.; Sakai, S.; Kajihara, H.; Tanaka, S. e Ito, S. *Plant Pathol.* **2016**, *65*, 551-560.
- (59) Paret, M. L.; Vallad, G. E.; Averett, D. R.; Jones, J. B. y Olson, S. M. *Phytopathology* **2013**, *103*, 228-236.
- (60) Hafez, E. E.; Hassan, H. S.; Elkady, M. y Salama, E. *Int. J. Sci. Tech. Res. (IJSTR)* **2014**, *3*, 318-324.
- (61) Khadri, H.; Alzohairy, M.; Janardhan, A.; Kumar, A. P.; Narasimha, G. y col. *Adv. Nanopart.* **2013**, *2*, 241-246.

- (62) Mishra, S.; Singh, B. R.; Singh, A.; Keswani, C.; Naqvi, A. H. y Singh, H. *PLoS One* **2014**, *9*, e97881.
- (63) Narayanan, K. B. y Park, H. H. *Eur. J. Plant Pathol.* **2014**, *140*, 185-192.
- (64) Ouda, S. M. *Research Journal of Microbiology* **2014**, *9*, 34.
- (65) Adisa, I. O.; Reddy Pullagurala, V. L.; Rawat, S.; Hernandez-Viecas, J. A.; Dimkpa, C. O.; Elmer, W. H.; White, J. C.; Peralta-Videa, J. R. y Gardea-Torresdey, J. L. *J. Agric. Food. Chem.* **2018**, *66*, 5959-5970.
- (66) Buchman, J. T.; Elmer, W. H.; Ma, C.; Landy, K. M.; White, J. C. y Haynes, C. L. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7*, 19649-19659.
- (67) Wang, X.; Liu, X.; Chen, J.; Han, H. y Yuan, Z. *Carbon* **2014**, *68*, 798-806.
- (68) Ali, S. M.; Yousef, N. M. y Nafady, N. A. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*.
- (69) Ayoub, H. A.; Khairy, M.; Elsaid, S.; Rashwan, F. A. y Abdel-Hafez, H. F. *J. Agric. Food. Chem.* **2018**, *66*, 5491-5498.
- (70) Rajakumar, G. y col. *Veterinary Parasitology* **2013**, *191*, 332-339, DOI: [10.1016/j.vetpar.2012.08.028](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.028).
- (71) Ngo, Q. B.; Dao, T. H.; Nguyen, H. C.; Tran, X. T.; Van Nguyen, T.; Khuu, T. D. y Huynh, T. H. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 015016.
- (72) Rizwan, M.; Ali, S.; Ali, B.; Adrees, M.; Arshad, M.; Hussain, A.; ur Rehman, M. Z. y Waris, A. A. *Chemosphere* **2019**, *214*, 269-277.
- (73) Sun, D.; Hussain, H. I.; Yi, Z.; Rookes, J. E.; Kong, L. y Cahill, D. M. *Chemosphere* **2016**, *152*, 81-91.
- (74) Morsy, M. K.; Khalaf, H. H.; Sharoba, A. M.; El-Tanahi, H. H. y Cutter, C. N. *Journal of food science* **2014**, *79*, M675-M684.
- (75) Luo, M.; Liu, D.; Zhao, L.; Han, J.; Liang, Y.; Wang, P. y Zhou, Z. *Analytica chimica acta* **2014**, *852*, 88-96.
- (76) Zhao, G.; Song, S.; Wang, C.; Wu, Q. y Wang, Z. *Analytica chimica acta* **2011**, *708*, 155-159.
- (77) Boro, R. C.; Kaushal, J.; Nangia, Y.; Wangoo, N.; Bhasin, A. y Suri, C. R. *Analyst* **2011**, *136*, 2125-2130.

- (78) Dubas, S. T. y Pimpan, V. *Mater. Lett.* **2008**, 62, 2661-2663.
- (79) Kang, T.-F.; Wang, F.; Lu, L.-P.; Zhang, Y. y Liu, T.-S. *Sens. Actuators, B* **2010**, 145, 104-109.
- (80) Parham, H. y Rahbar, N. *J. Hazard. Mater.* **2010**, 177, 1077-1084.
- (81) Li, C.; Wang, C.; Wang, C. y Hu, S. *Sens. Actuators, B* **2006**, 117, 166-171.
- (82) Viswanathan, S.; Radecka, H. y Radecki, J. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 24, 2772-2777.
- (83) Syu, Y.-y.; Hung, J.-H.; Chen, J.-C. y Chuang, H.-w. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, 83, 57-64.
- (84) Djanaguiraman, M.; Nair, R.; Giraldo, J. P. y Prasad, P. V. V. *ACS omega* **2018**, 3, 14406-14416.
- (85) Wu, H.; Tito, N. y Giraldo, J. P. *ACS nano* **2017**, 11, 11283-11297.
- (86) Srivastava, A. y Rao, D. P. *Chem. Bull.* **2014**, 3, 502-504.
- (87) Laware, S. y Raskar, S. *International Journal of Current Microbiology Science* **2014**, 3, 874-881.
- (88) Sah, S.; Sorooshzadeh, A.; Rezazadehs, H.; Naghdibadi, H. y col. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, 5, 171-175.
- (89) Sharma, P.; Bhatt, D.; Zaidi, M. G.; Saradhi, P. P.; Khanna, P. K. y Arora, S. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, 167, 2225-2233, DOI: [10.1007/s12010-012-9759-8](https://doi.org/10.1007/s12010-012-9759-8).
- (90) Wang, L.; Zhu, J.; Wu, Q. y Huang, Y. en *Proceedings of the 2nd International Conference on Civil, Materials and Environmental Sciences*, Atlantis Press: 2015, págs. 604-608, DOI: <https://doi.org/10.2991/cmes-15.2015.165>.
- (91) Yu Syu, Y.; Hung, J. H.; Chen, J. C. y wen Chuang, H. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, 83, 57-64, DOI: [10.1016/j.plaphy.2014.07.010](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.010).
- (92) Khot, L. R.; Sankaran, S.; Maja, J. M.; Ehsani, R. y Schuster, E. W. *Crop Prot.* **2012**, 35, 64-70, DOI: [10.1016/j.cropro.2012.01.007](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007).
- (93) Ghormade, V.; Deshpande, M. V. y Paknikar, K. M. *Biotechnol. Adv.* **2011**, 29, 792-803, DOI: [10.1016/j.biotechadv.2011.06.007](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.007).

- (94) Tighe-Neira, R.; Carmora, E.; Recio, G.; Nunes-Nesi, A.; Reyes-Diaz, M.; Alberdi, M.; Rengel, Z. e Inostroza-Blancheteau, C. *Plant Physiol. Biochem.* **2018**, *130*, 408-417, DOI: [10.1016/j.plaphy.2018.07.024](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.024).
- (95) Arruda, S. C. C.; Silva, A. L. D.; Galazzi, R. M.; Azevedo, R. A. y Arruda, M. A. Z. *Talanta* **2015**, *131*, 693-705, DOI: [10.1016/j.talanta.2014.08.050](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050).
- (96) Peters, R. J. y col. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *54*, 155-164, DOI: [10.1016/j.tifs.2016.06.008](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.008).
- (97) Sadik, O.; Zhou, A.; Kikandi, S.; Du, N.; Wang, Q. y Varner, K. *J. Environ. Monit.* **2009**, *11*, 1782-1800.
- (98) Govorov, A. O. y Carmeli, I. *Nano letters* **2007**, *7*, 620-625.
- (99) Falco, W.; Botero, E.; Falcao, E.; Santiago, E.; Bagnato, V. y Caires, A. *Journal of Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2011**, *225*, 65-71.
- (100) Boken, J.; Khurana, P.; Thatai, S.; Kumar, D. y Prasad, S. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2017**, *52*, 774-820.
- (101) Kalaji, H. M. y col. *Photosynth. Res.* **2016**, *132*, 13-66, DOI: [10.1007/s11120-016-0318-y](https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y).
- (102) Kalaji, H. M.; Bąba, W.; Gediga, K.; Goltsev, V.; Samborska, I. A.; Cetner, M. D.; Dimitrova, S.; Piszcz, U.; Bielecki, K.; Karmowska, K.; Dankov, K. y Kompała-Bąba, A. *Photosynth. Res.* **2017**, *136*, 329-343, DOI: [10.1007/s11120-017-0467-7](https://doi.org/10.1007/s11120-017-0467-7).
- (103) Buschmann, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves, 2007, DOI: [10.1007/s11120-007-9187-8](https://doi.org/10.1007/s11120-007-9187-8).
- (104) Moya, I. y Cerovic, Z. G. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer: 2004, págs. 429-445.
- (105) Maxwell, K. y Johnson, G. N. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 659-668, DOI: [10.1093/jexbot/51.345.659](https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659).

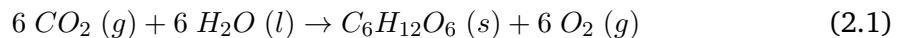
Fluorescencia de clorofila *a* y fotosíntesis

En este capítulo, describiremos los principios y el uso de un método no destructivo importante y ampliamente utilizado para sondear la fotosíntesis, en hojas y tejidos vegetales fotosintéticos similares como las algas: la fluorescencia de clorofila *a*. La medición de la fluorescencia de clorofila *a* proporciona información sobre el funcionamiento y la regulación del fotosistema II (PSII), en particular, sobre la eficiencia del uso de la luz, del transporte de electrones y de los procesos de disipación no fotoquímica, que dan como resultado el *quenching* no fotoquímico (NPQ) de la fluorescencia de la clorofila [1]. Es un método relativamente simple de aplicar, y el equipo requerido es relativamente económico, pero se deben tener ciertos cuidados respecto al desarrollo experimental y la interpretación de los resultados. El registro de la fluorescencia de clorofila *a* se ha vuelto extensamente utilizado no solo en la investigación de la fotosíntesis sino como una herramienta general en el estudio de la fisiología ambiental de las plantas. Se ha empleado en una amplia gama de escalas de medición, que van desde los cloroplastos y hojas hasta nivel de cultivo y doseles arbóreos. Actualmente, existen proyectos para su medición utilizando *drones* y satélites[2].

Para ello primero revisaremos cuestiones generales y relevantes sobre la fotosíntesis, transporte de electrones fotosintéticos, morfología y estructura de la hoja y cloroplastos, entre otros, para un mejor entendimiento de las técnicas de fluorescencia de clorofila *a* y la interpretación de los parámetros derivados de cada una de ellas.

2.1. Fotosíntesis

Los seres vivos acceden a la energía que requieren para subsistir descomponiendo moléculas de carbohidratos durante el proceso de respiración celular. Las plantas producen carbohidratos durante la fotosíntesis. Aunque la energía se puede almacenar en moléculas como el ATP, los carbohidratos (y los lípidos, que también pueden ingresar a la respiración celular como fuente de energía) son depósitos de energía química mucho más estables y eficientes. Los organismos fotosintéticos también llevan a cabo las reacciones de la respiración para recolectar la energía que han almacenado en los carbohidratos durante la fotosíntesis[3]. La reacción general de la fotosíntesis, indicada a continuación, es la inversa de la reacción general para la respiración celular.



La fotosíntesis produce oxígeno como subproducto y la respiración produce dióxido de carbono. En la naturaleza, no existe el desperdicio. El CO₂ no es más que una forma de desecho producido por la respiración así como el oxígeno es un producto de desecho de la fotosíntesis. Ambos son subproductos de reacciones que intervienen en otros procesos. La fotosíntesis absorbe energía de la luz solar para formar carbohidratos en los cloroplastos, y la respiración celular aeróbica libera esa energía almacenada mediante el uso de oxígeno para descomponer los carbohidratos. Ambos compuestos utilizan cadenas de transporte de electrones para generar la energía necesaria para impulsar otras reacciones. La fotosíntesis y la respiración celular funcionan en un ciclo biológico, lo que permite a los organismos acceder a la energía vital que se origina a millones de kilómetros de distancia en una estrella[4].

Hay dos partes básicas de la fotosíntesis: las reacciones dependientes de la luz y las reacciones independientes de la luz (también conocidas como ciclo de Calvin). Durante las primeras, la energía de la luz solar se almacena en moléculas portadoras de energía. Estas moléculas portadoras de energía se utilizan para impulsar las reacciones del ciclo de Calvin, donde las moléculas de CO₂ se unen para producir carbohidratos como la glucosa.

En las plantas, la luz destinada a impulsar el proceso fotosintético es absorbida por dos tipos principales de pigmentos: clorofillas y carotenoides, que son moléculas cromóforas sensibles a la radiación luminosa y genéricamente llamadas pigmentos fotosintéticos. Estos pigmentos no están libres en el aparato fotosintético, sino que se encuentran unidos no covalentemente dentro de las proteínas fotosintéticas formando complejos pigmento-proteína.

2.1.1. Estructura de la hoja y el cloroplasto

En las plantas, la fotosíntesis tiene lugar principalmente en las hojas, que constan de muchas capas de células, en las cuales las caras inferior y superior están bien diferenciadas. La cara superior es la cara adaxial y la inferior abaxial. El proceso de fotosíntesis no ocurre en las capas superficiales de la hoja, sino en una capa intermedia llamada mesófilo (Fig. 2.1). El intercambio de gases de dióxido de carbono y oxígeno se produce a través de pequeñas aberturas reguladas llamadas estomas en la superficie de la hoja.

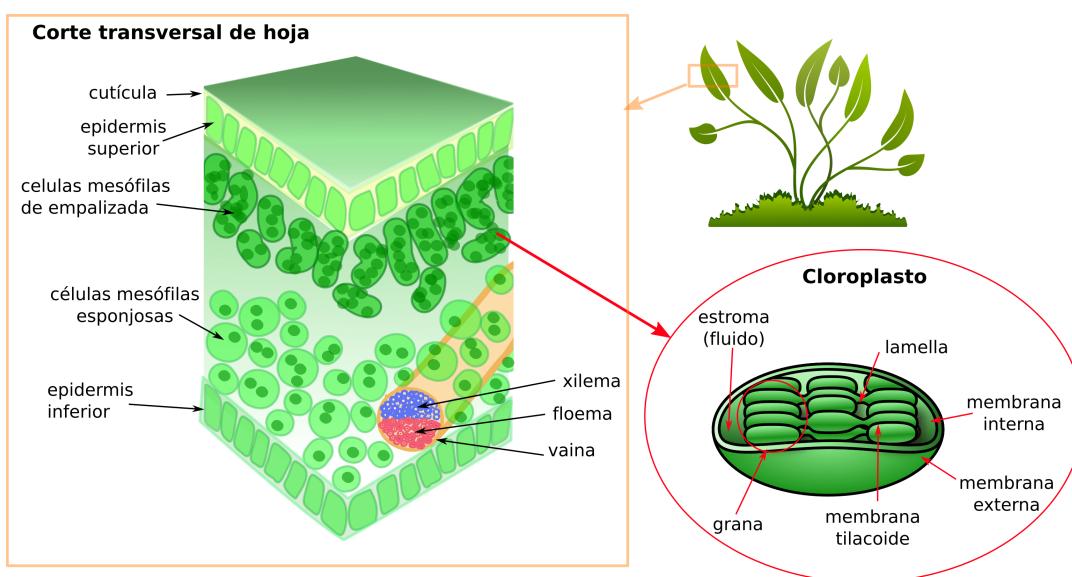


FIGURA 2.1: Estructuras vegetales que contienen el aparato fotosintético: hojas, tejido foliar (corte de hoja), cloroplasto y tilacoides.

En eucariotas, la fotosíntesis tiene lugar dentro de un orgánulo llamado cloroplasto. En las plantas, existen células que contienen cloroplastos en el mesófilo. Los cloroplastos están rodeados por una doble membrana. Dentro del cloroplasto hay una tercera membrana

que forma estructuras apiladas en forma de disco llamadas tilacoides. Incrustados en la membrana tilacoide hay complejos proteína-pigmentos a través de los cuales comienza el proceso fotosintético. La clorofila es responsable del color verde de las plantas. La membrana tilacoide encierra un espacio interno llamado lumen o espacio tilacoide. Otros tipos de pigmentos también participan en la fotosíntesis, pero la clorofila es, por mucho, la más importante. Como se muestra en la [Fig. 2.1](#), una pila de tilacoides se llama grana o lamelas grana, y el espacio que rodea la grana se llama estroma. El estroma es la matriz acuosa principal del cloroplasto, ocupa el mayor volumen y puede ser considerado análogo al citosol de una célula. Esta estructura del cloroplasto permite que tenga lugar el proceso de fotosíntesis[5].

2.1.2. Reacciones dependientes de la luz

Las reacciones dependientes de la luz tienen lugar en la membrana tilacoide, donde la clorofila absorbe energía de la luz solar y luego la convierte en energía química oxidando agua para ello. Las reacciones dependientes de la luz liberan oxígeno como subproducto a medida que el agua se oxida. En el ciclo de Calvin, que tiene lugar en el estroma, la energía química derivada de las reacciones dependientes de la luz impulsa tanto la captura de carbono en las moléculas de dióxido de carbono como el posterior ensamblaje de las moléculas de azúcar.

La primera fase es el proceso de conversión de energía luminosa en energía electroquímica que ocurre en los fotosistemas dentro de las membranas tilacoides. Ambos fotosistemas tienen la misma estructura básica: varias proteínas de antena que rodean el centro de reacción donde tiene lugar la fotoquímica. Los dos centros de reacción parecen haber evolucionado para que puedan generar el potencial de oxidación extremadamente positivo necesario para dividir el agua, sin sacrificar el potencial reductor generado en el otro lado de la membrana. En ambos centros de reacción, una extensa red de moléculas de pigmentos, principalmente clorofila, que se utilizan para capturar la luz, está alojada en el mismo complejo que los cofactores de transferencia de electrones y, por lo tanto, estos complejos se denominan fotosistemas. Los dos fotosistemas se denominan más correctamente oxidoreductoras impulsadas por la luz, y se los conoce usualmente como Fotosistema I ([PSI](#)) y

Fotosistema II (PSII).

Las reacciones dependientes de la luz inician con la absorción de la luz en los complejos pigmento-proteína (LHC, *Light Harvesting Complexes*), y continúa con la canalización de los excitones hacia los centros de reacción de los fotosistemas (RC), donde la energía se transforma en una corriente de electrones y protones entre moléculas oxidorreductoras. Los complejos pigmento-proteína denominados resumidamente como antenas, son las entidades donde ocurre la absorción de la luz. Cada fotosistema contiene múltiples proteínas de antena que incluyen una mezcla de 300 a 400 moléculas de clorofila *a* y *b*, así como otros pigmentos como los carotenoides incluyendo las xantófilas. Los centros de reacción de los fotosistemas contienen un par especial de moléculas de clorofila *a*. El centro de reacción del PSI se llama P₇₀₀ y el del PSII, P₆₈₀, debido a que el PSI posee un máximo de absorción a 700 nm y el PSII a 680 nm.

Además de los fotosistemas, el complejo proteico de membrana citocromo b₆f y las proteínas solubles plastocianina, ferredoxina y ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) participan en la transferencia de electrones en la fotosíntesis oxigénica. El gradiente de protones generado por estas enzimas es utilizado luego por la ATP sintasa para fosforilar el ADP. Las reacciones de oxidorreducción producen entonces, en último término, dos biomoléculas estables (NADPH y ATP) que se van acumulando y proporcionan poder de reducción (el NADPH) y poder de enlace (el ATP), necesarios para la siguiente fase. Estos componentes se muestran en la Fig. 2.2, junto con una representación esquemática de la ruta de transferencia de electrones general.

La vía de transferencia de electrones que se muestra en la Fig. 2.2 es impulsada por la separación de carga inducida por la luz en los dos fotosistemas. El primero de estos sistemas es PSII, que se muestra a la izquierda de la figura. En PSII, el catión radical generado por la separación de carga extrae electrones de un *cluster* de manganeso ubicado en el lado del lumen de la membrana. Después de cuatro ciclos del PSII, el complejo de manganeso puede eliminar cuatro electrones de dos moléculas de agua para producir oxígeno molecular y cuatro protones. En el lado estromal, cada cuatro ciclos del complejo se reducen dos moléculas de plastoquinona a plastoquinol. A continuación, el plastoquinol se reoxida

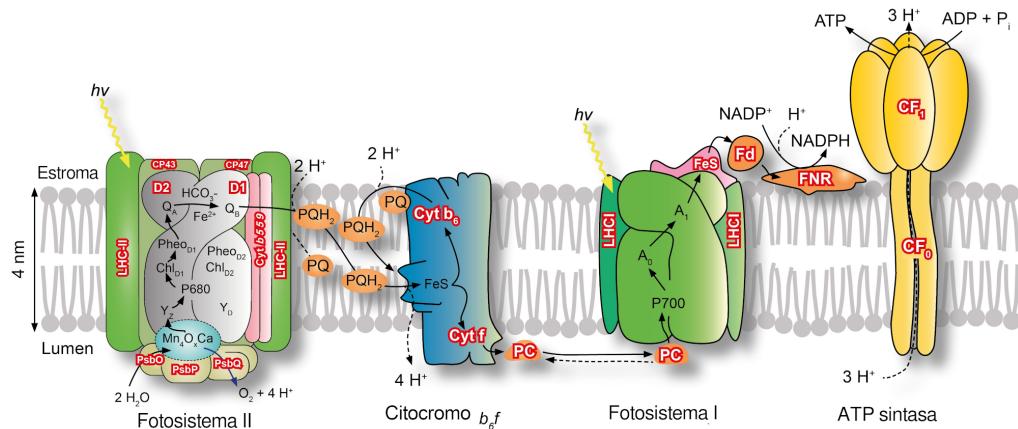


FIGURA 2.2: Representación esquemática y estructura de los componentes de transferencia de electrones de la membrana tilacoide. También se muestra la ruta general del flujo de electrones y protones a través del sistema. Editada y traducida de Govindjee y cols.[6] Copyright (2010), con permiso de Wiley.

a plastoquinona en el complejo citocromo b_6f . Los electrones y protones liberados en este proceso se transfieren al lado estromal de la membrana. Los electrones reducen la proteína plastocianina soluble, mientras que los dos protones se liberan en el estroma. En el segundo fotosistema, PSI, el catión radical generado por la separación de carga inducida por la luz reoxida la plastocianina reducida. Los electrones transferidos a través de PSI reducen la ferredoxina, que es una proteína soluble ubicada en el estroma. Luego, la ferredoxina es reoxidada por ferredoxina- $NADP^+$ reductasa (FNR), que convierte $NADP^+$ en NADPH. La oxidación del agua en PSII y la conversión de plastoquinona en plastoquinol y viceversa conducen a la acumulación de protones en el lumen, lo que crea un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide. El transporte cíclico de electrones, en el que la ferredoxina reducida pasa electrones al citocromo b_6f , también puede contribuir a establecer una diferencia en la concentración de protones a través de la membrana. Este gradiente de protones se utiliza para impulsar la enzima ATP sintasa que se muestra a la derecha, que convierte ADP en ATP en el lado estromal de la membrana.

En la segunda fase de la fotosíntesis se produce toda una serie de reacciones de asimilación de elementos necesarios para la construcción de biomoléculas. El elemento esencial y predominante en la materia orgánica es el carbono. En la primera fase de la fotosíntesis, el carbono se toma del dióxido de carbono (CO_2) del aire. Luego, en la fase independiente de la luz, en el Ciclo de Calvin, se utilizan el ATP y NADPH producidos en la primer etapa

para producir carbohidratos[3].

2.1.3. Esquema Z

La elucidación del mecanismo general de la fotosíntesis descrito anteriormente es el producto de muchos años de intensa investigación. Inicialmente, el enfoque de la mayor parte de este trabajo fue determinar la naturaleza de las reacciones inducidas por la luz y su energía. En 1960, Hill y Bendall[7] presentaron una hipótesis que sugería que estaban involucrados dos pasos inducidos por la luz y mostraron un diagrama en el que la energía se trazaba a lo largo del eje horizontal. Debido a que las dos reacciones en este diagrama se parecían a la letra Z, se conoció como el esquema Z. Ahora se dibuja de acuerdo con la convención más habitual de la energía como eje vertical, y se han agregado muchos detalles de las reacciones de transferencia de electrones[8, 9]. Este esquema se muestra en la Fig. 2.3. El eje vertical en la figura indica el punto medio del potencial de oxidación o reducción para las diversas especies. Los dos pasos verticales indican la absorción de luz por PSI y PSII, y es evidente que los potenciales de punto medio de los dos fotosistemas se desplazan $\sim 0,8$ V entre sí. Debido a este cambio, PSII puede usar fotones de 680 nm para generar un potencial oxidante de $\approx + 1.2$ V (para P_{680}^+ / P_{680}), mientras que PSI usa fotones de energía similar (700 nm) para producir un potencial reductor final de $\approx - 0.7$ V, el cual se utiliza para reducir $NADP^+$ en $NADPH$ [10]. Los diversos pasos posteriores a la absorción de luz por PSI y PSII se refieren a la transferencia de electrones a lo largo de la cadena de aceptores en los dos sistemas. Aquí, nos centraremos en los detalles de estas reacciones de transferencia de electrones. La transferencia de electrones en el complejo citocromo b_6f también es un proceso de varios pasos, pero estos pasos no se muestran en la Fig. 2.3[11].

2.1.4. Ciclo de las xantófilas

El ciclo de las xantófilas es uno de los mecanismos de fotoprotección más importantes en los organismos fotosintéticos [12-14]. El ciclo de las xantófilas protege a los componentes celulares de la sobreexcitación de los pigmentos fotosintéticos y la sobre-reducción de la ETC que puede conducir a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). De es-

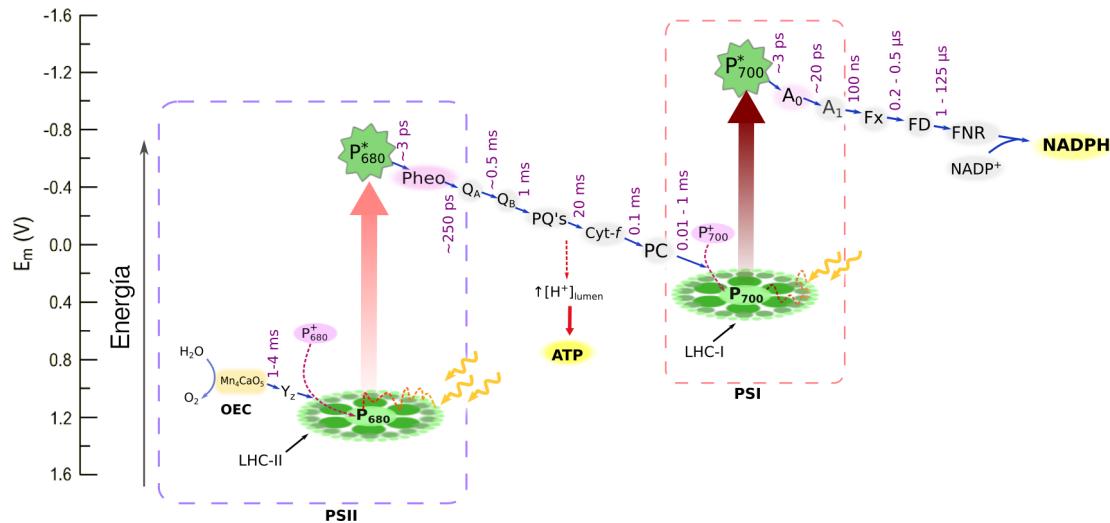


FIGURA 2.3: Esquema Z simplificado para el flujo de electrones fotosintéticos. Se indican los tiempos de vida aproximados y potenciales redox para los cofactores, según fue reportado en bibliografía[8]. En cada antena (LHC) se representa como una línea de puntos una posible ruta para un excitón atrapado que produce P_{680}^* o P_{700}^* , según corresponda.

te modo previene los daños potenciales que resultan principalmente del estrés oxidativo generado por las ROS, siendo el objetivo principal del fotodaño la proteína PsbA(D1) del PSII. El ciclo de las xantófilas permite la disipación segura del exceso de energía de excitación como calor, en los complejos antena de captación de luz (LHC) del PSII. Debido a que este proceso se refleja en los cambios de fluorescencia de la clorofila *a*, comúnmente se evalúa a través del NPQ[15]. El componente principal del NPQ que está relacionado con el ciclo de las xantófilas es q_E , que corresponde al *quenching* dependiente de energía y es el componente principal del NPQ[16, 17].

La fotoinhibición se ha considerado por mucho tiempo como el proceso que provoca daños en el aparato fotosintético, aunque recientemente se cree que es más un proceso de regulación en el que disminuye considerablemente la fotosíntesis sin que realmente llegue a observarse un daño directo en las estructuras fotosintéticas. En el momento en que el aparato fotosintético se encuentra inactivo por alguna causa, la energía que en condiciones normales podría ser utilizada en la fotosíntesis, resulta excesiva y se produce la fotoinhibición.

Existen dos variantes del ciclo, el de la violaxantina (V), que es el más común, y se da en las plantas superiores y, el ciclo de la diadinoxantina en algunos tipos de algas (Adamska,

1997). El ciclo de la violaxantina consta de dos pasos de des-epoxidación en los que V se convierte secuencialmente en anteraxantina (Ax) y zeaxantina (Zx). Los procesos de foto-protectión actúan disipando la energía de excitación que llega al LHC del PSII y de forma que no se puede utilizar en las reacciones fotoquímicas. Mientras la energía absorbida por la antena no es excesiva, es decir, puede ser utilizada en la fotosíntesis, el pigmento predominante en el ciclo es V. Cuando la energía absorbida por la antena resulta excesiva, bien por un aumento de la intensidad de radiación o porque el aparato fotosintético haya sufrido algún cambio y no esté operativo completamente, el pH del lumen disminuye hasta 5 (valor óptimo de la enzima violaxantina desepoxidasa), produciéndose la conversión de V en Ax y posteriormente en Zx. Se ha sugerido que ambos pigmentos, Zx y Ax, actúan como intermediarios en el proceso de fotoprotección del aparato fotosintético[18]. Cuando las condiciones se vuelven favorables y la energía recibida no excede a la que puede ser utilizada en la fotosíntesis, la Zx vuelve a convertirse en Ax y V por la acción de la enzima zeaxantina oxidasa[19].

2.1.5. Fotoquímica primaria de la cadena de transporte electrónico

La cadena de transporte de electrones fotosintética (ETC, por sus siglas en inglés) comienza cuando los fotones se absorben en LHC-II (complejo de recolección de luz LHC del PSII). La absorción de luz azul por parte de la clorofila genera el estado excitado S_2 , que rápidamente decae a S_1 por conversión interna, mientras que la absorción de luz roja genera el estado S_1 (Fig. 2.4). S_1 puede decaer a S_0 por fluorescencia o por conversión interna. En LHC-II, los pigmentos en estado excitado transfieren energía por resonancia de Förster (FRET) de manera eficiente hasta que se alcanza un par especial de moléculas de clorofila *a* en el centro de reacción (P₆₈₀). A diferencia de las moléculas de clorofila en el LHC-II, P₆₈₀^{*} puede transferir energía al reducir un aceptor de electrones cercano, la feofitina (Pheo), y también generar un estado triplete (Fig. 2.4). Posteriormente, los electrones fluyen hacia la plastoquinona A (Q_A) y B (Q_B) y luego por el citocromo b₆f, para finalmente llegar a la plastocianina y al PSI (Fig. 2.3). P₆₈₀⁺ vuelve a su estado neutro tras aceptar electrones provenientes de la oxidación del H₂O, generándose O₂ en el complejo de evolución de oxígeno (OEC, por sus siglas en inglés). El flujo de electrones a través de los portadores genera un bombeo de protones desde el estroma al lumen del tilacoide, que vuelve al estroma a través de la ATP-sintasa. De esta manera, la ETC termina produciendo

ATP y NADPH como productos principales y O_2 como residuo [20].

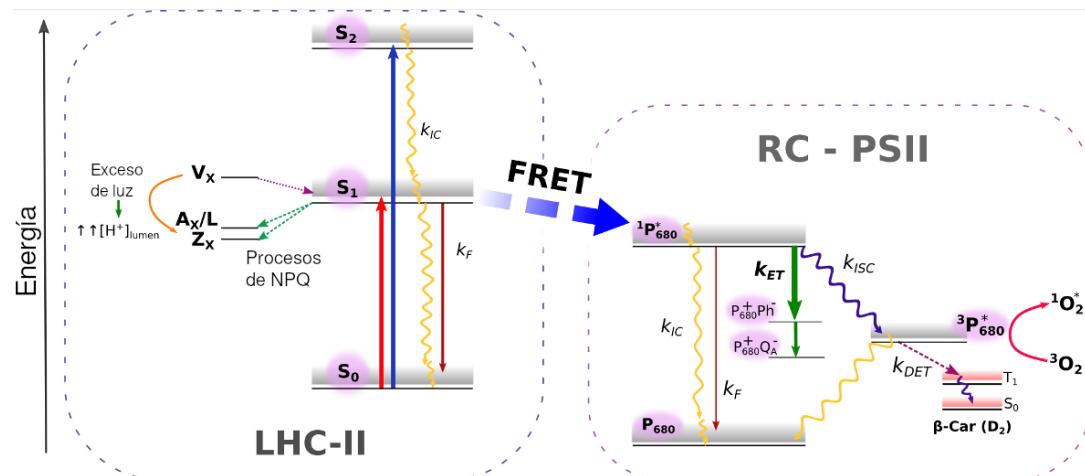


FIGURA 2.4: Diagrama de Jablonski idealizado que ilustra la distribución de energía de los fotones absorbidos en una molécula de clorofila a dentro de LHC y RC del PSII y los procesos de transferencia de energía relacionados directa o indirectamente con la fotosíntesis. S_0 , S_1 y S_2 son los estados electrónicos de los pigmentos del LHC-II (principalmente clorofila). Los niveles vibratorios están esquematizados como un sombreado en gris. Las especies involucradas en el ciclo de las xantofilas se indican como: V_x , violaxantina; A_x/L , anteraxantina/luteína y Z_x , zeaxantina. Respecto al RC del PSII, P_{680} es el par especial de clorofilas en estado fundamental; $^1P_{680}^*$, el singlete excitado; $^3P_{680}^*$, el triplete excitado; $(P_{680} + Pheo^-)$ el complejo de transferencia de carga entre P_{680} y feofitina; y $(P_{680} + Q_A^-)$, a un complejo análogo donde se reduce la plastoquinona A. β -Car (D2) es el β -caroteno cercano a P_{680} , siendo S_0 su estado fundamental y T_1 el primer triplete excitado. k_{IC} , k_F , k_{ISC} , k_{ET} y k_{DET} son las constantes cinéticas asociadas con los procesos de conversión interna, fluorescencia, cruce entre sistemas, transferencia electrónica y transferencia de energía dexter, respectivamente.

Cuando la irradiancia se encuentra entre ciertos límites, el proceso descrito anteriormente funciona en estado estacionario. Sin embargo, cuando la luz incidente se eleva, la cadena de transporte de electrones se satura, P_{680}^* comienza a acumularse y la probabilidad de formación de $^3P_{680}^*$ aumenta. Un carotenoide cercano al RC-PSII, β -Car (D2), tiene la importante función de desactivar este triplete a través de un proceso de transferencia de energía de tipo Dexter (Fig. 2.4) [21, 22]. Sin embargo, la desactivación del carotenoide es más lenta que la nueva formación de $^3P_{680}^*$ en condiciones de alta irradiancia. En tales circunstancias, es factible la formación de oxígeno singlete y otras especies altamente reactivas y dañinas (ROS y otras). El conjunto de mecanismos que actúan regulando la tasa de excitación de la antena con el objetivo de inhibir la acumulación de P_{680}^* se denominan colectivamente *quenching no fotoquímico* (NPQ).

Altas irradiancias provocan una fuerte acidificación en el lumen del cloroplasto producto del ETC fotosintético, lo que desencadena dos mecanismos diferentes: el ciclo de las xantófilas y la desagregación del LHC. La violaxantina (**Vx**) se convierte en zeaxantina (**Zx**) a pH menor a 5.5. A diferencia de **Vx**, **Zx** puede desactivar el estado excitado de los pigmentos del LHC (Fig. 2.4) [23]. En tales circunstancias, una proteína de membrana PsbS se protona y se une a **Zx**, desencadenando una reordenación física de la membrana tilacoidal. Este cambio estructural provoca una reducción en el tamaño del LHC, disminuyendo así la cantidad de energía que llega al centro de reacción (**RC**) y P_{680}^* se forma en menor cantidad [24]. Además, la unión de plastoquinona (**PQ**) reducida a Cyt b_6f activa las quininas del LHC-II y la LHC-II fosforilada tiende a migrar al PSI. Este mecanismo contribuye a reducir el tamaño de la antena y por tanto la tasa de excitación de P_{680}^* [25].

2.2. Medición de la fotosíntesis

En términos muy generales, la fotosíntesis comienza con la absorción de la luz y termina con la asimilación de CO_2 , un proceso fundamental para las redes tróficas de la biosfera. Es una tarea relativamente sencilla medir la irradiancia fotosintéticamente activa (**PAR**) incidente en una hoja (o cualquier otro sistema fotosintético) e incluso medir la cantidad de esa irradiancia que se absorbe. Asimismo, la medición de la asimilación de CO_2 se realiza fácilmente utilizando sistemas de análisis de gases por espectroscopía infrarroja. Sin embargo, entre la absorción de la luz y la asimilación, se encuentran los procesos intermedios de la fotosíntesis: fotoquímica, transporte de electrones y transducción de energía, metabolismo y procesos de difusión gaseosa. La tasa de asimilación vendrá determinada en última instancia por la actividad limitante de estos procesos. Para racionalizar la relación entre la absorción de luz y la asimilación, es necesario comprender el funcionamiento general de los procesos intermedios que se detallaron anteriormente[3].

Las técnicas actuales para medir directa o indirectamente la fotosíntesis pueden clasificarse en técnicas destructivas *in vitro* del material fotosintético y técnicas no destructivas entre las que se encuentra la fluorescencia de clorofila *a*. Las técnicas destructivas pueden proporcionar instantáneas del proteoma y metaboloma fotosintéticos pero no pueden capturar el estado operativo de la fotosíntesis. Por lo tanto, estas técnicas no logran su-

ministrar la información necesaria del sistema fotosintético con el detalle requerido para permitir que se describan las correlaciones entre el estado o la actividad de los diferentes componentes del sistema fotosintético. Una limitación adicional de los enfoques destructivos es la dificultad de interpretar a partir de ellos, cómo cambia el estado del sistema fotosintético en una hoja específica en respuesta a factores ambientales cambiantes, como la irradiancia, la concentración de CO₂ y la temperatura. Se espera que estos factores afecten el funcionamiento de la fotosíntesis de formas específicas, provocando cambios en el estado regulatorio del sistema. No obstante, las técnicas destructivas han brindado información valiosa sobre la composición, organización y aclimatación del aparato fotosintético en muchos niveles de integración. Sin este conocimiento básico de la organización de la fotosíntesis, las técnicas no destructivas del tipo descrito en este capítulo no podrían existir como las poderosas herramientas que han demostrado ser [1].

El valor de los enfoques no destructivos para medir diferentes aspectos de la fotosíntesis ha llevado a que un gran número de técnicas se utilicen como herramientas en la investigación de este proceso. Estas incluyen análisis de CO₂, vapor de agua[26] y gas O₂[27-29], análisis en paralelo del contenido isotópico de CO₂ y O₂[30], técnicas fotoacústicas[31], radiometría fototérmica [32], fluorescencia de NADP/NADPH[33] y fluorescencia de clorofila a, siendo esta última la más utilizada actualmente[34].

2.3. Fluorescencia de clorofila a

Debido a que la fluorescencia y el transporte electrónico fotosintético son mecanismos competitivos de desactivación de la clorofila a excitada, la fluorescencia es un monitor inmediato y directo de la tasa de transporte de electrones[35]. Cuando el material fotosintético se expone a diferentes flujos de luz, la emisión de fluorescencia cambia según la adaptación de la maquinaria fotosintética al nuevo entorno lumínico. Este fenómeno fue observado por primera vez por Kautsky en 1960 [36] y desde entonces la fluorescencia variable de la clorofila se ha convertido en el indicador más popular de la fotosíntesis y se han desarrollado una amplia variedad de técnicas. A temperatura ambiente, se asume que los cambios registrados en la señal de fluorescencia se deben solo al PSII y se ignoran

los que provienen del PSI. Si bien la contribución de la fluorescencia del PSI a la señal de fluorescencia total es del $\approx 5 - 30\%$ por lo cual no es despreciable, esta fluorescencia del PSI es prácticamente constante. Por ello se considera que la fluorescencia variable observada es debida principalmente al PSII. [2, 37-39] Se han desarrollado una amplia gama de instrumentos enfocados en diferentes aspectos de la fotosíntesis[34]. Los instrumentos que usan destellos de luz muy cortos del orden de microsegundos o menos dan información sobre las primeras reacciones de transferencia de electrones dentro del PSII, mientras que con instrumentos que usan pulsos de saturación es posible obtener información de varias etapas de la ETC. Con instrumentos que miden en estado estable iluminando con una luz fotosintéticamente activa, generalmente fluorómetros de amplitud modulada, es posible determinar los mecanismos reguladores de la ETC inducidos por luz, incluido el NPQ [40]. La fluorescencia resuelta en el tiempo bajo condiciones de iluminación prolongada, ya sea utilizando pulsos de luz saturante o fotosintéticamente activa, se denomina fluorescencia variable. Luego, con fluorómetros estacionarios que utilizan luz fotosintéticamente no activa (irradiancia incidente suficientemente tenue) es posible determinar el espectro de fluorescencia de las hojas y obtener así información de la estequiometría de los fotosistemas y estimar la salud vegetal. A continuación se describe cada una de las técnicas utilizadas en esta tesis, y el marco teórico asociado a las mismas, para luego así comprender el significado y relevancia de los parámetros que se desprenden de cada una de ellas.

2.4. Cinética de Kautsky

La cinética de Kautsky es una de las técnicas basadas en fluorescencia variable de clorofila *a*. Se caracteriza por aplicar una luz fotosintéticamente activa por un período suficientemente prolongado para aclimatar la maquinaria fotosintética a la luz incidente. También puede incluir una etapa oscura posterior a la anteriormente descripta en donde se observa la recuperación de la fluorescencia máxima observada en hojas adaptadas a la oscuridad. En el estudio de la Cinética de Kautsky hay tres fases principales de las que se puede extraer información diferenciada, y se resumen a continuación.

2.4.1. Fase oscura

Los experimentos de fluorescencia variable generalmente comienzan con el material fotosintético previamente adaptado a la oscuridad por al menos 15 min, donde los mecanismos NPQ están ausentes. La fluorescencia inicial (F_0) se mide con baja irradiancia ($\sim 4 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que no produce fotosíntesis y luego se aplica un pulso saturante ($>2000 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El pulso es lo suficientemente intenso y duradero ($\sim 1 \text{ s}$) como para saturar los centro de reacción (RC). Esto ocurre ya que el primer excitón que llega a los RC reduce al primer aceptor (Pheo) de la ETC, pero como en estas condiciones el RC se vuelve a excitar antes que que se produzca la reducción de Pheo por Q_A , el RC no puede donar electrones y se encuentra cerrado. Como la vía fotoquímica está saturada, se produce un pico de fluorescencia máxima (F_M). La diferencia entre la fluorescencia inicial y máxima es la fluorescencia variable (F_V), la cual es proporcional al número de RC disponibles, es decir, reducidos. Por tanto, el parámetro F_V/F_M es ampliamente aceptado como la máxima capacidad fotosintética. Este parámetro se conserva extraordinariamente, siendo ≈ 0.83 en plantas sanas con metabolismo C3 y 0.78 en plantas C4 [34, 41]. Un valor claramente inferior de F_V/F_M es indicativo de algún tipo de estrés o daño.

2.4.2. Fase actínica

Cuando se enciende una luz que permite la fotosíntesis, llamada luz actínica (LA), con una intensidad entre 20 y $1500 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la fluorescencia aumenta debido al fenómeno descrito anteriormente pero alcanza un valor estacionario (F_S) después de algunos minutos (efecto Kautsky). Si luego se aplica un pulso de saturación, la diferencia entre este máximo F_M' y F_S es la fluorescencia variable en la fase actínica (F_V'), que es proporcional al número de RC disponibles para la fotosíntesis bajo esa LA. El rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) en la fase actínica se calcula como F_V'/F_M' y es menor al medido en la fase oscura porque los mecanismos NPQ activados por luz reducen el número de clorofilas excitadas y el tiempo de vida de las mismas como se detalló en la [Subsección 2.1.2](#). A medida que aumenta la intensidad de la luz actínica, disminuye el rendimiento fotosintético del PSII. La [Fig. 2.5](#) es una simulación simple del comportamiento señalado. La cantidad de luz absorbida se correlaciona linealmente con la intensidad de la luz irradia-

da que comúnmente se expresa como radiación fotosintéticamente activa (PAR). Luego, la energía luminosa absorbida en el PSII también guarda una proporcionalidad directa con PAR [42]. Entonces, en condiciones de alta irradiancia, cuando el flujo de energía del transporte de electrones está saturado, el flujo de energía disipada es la ruta principal de desactivación del RC.

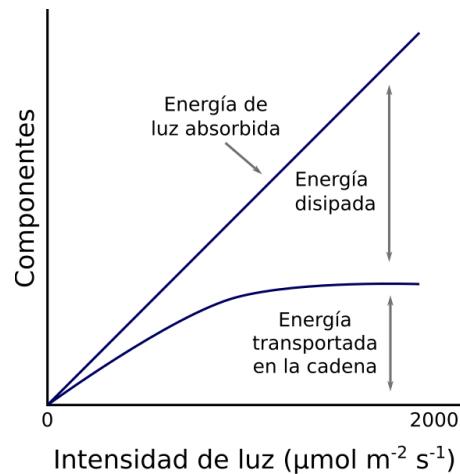


FIGURA 2.5: Partición de energía en el PSII. La energía de la luz absorbida en el PSII se utiliza para el transporte de electrones fotosintéticos o se disipa como calor y fluorescencia de clorofila. La relación entre el uso y la pérdida de energía se muestra sobre la base de los rendimientos cuánticos.

Por otro lado, el producto entre el rendimiento fotosintético de PSII y la intensidad de la luz actínica, es la tasa fotosintética del PSII (PS_{rate}) que, más intuitivamente, aumenta más lentamente a medida que aumenta la luz incidente y alcanza una meseta en algún momento. Esta fuerte dependencia de la eficiencia fotosintética con la intensidad de la luz actínica descripta en Fig. 2.5 pone en evidencia que no alcanza con informar un solo valor de Φ_{PSII} a una LA dada, ya que este no brinda suficiente información para realizar una caracterización apropiada del material fotosintético en cuestión. Por lo tanto, se deben utilizar luces actínicas bajas, medias y altas, de forma de caracterizar la forma de la curva de Φ_{PSII} en función de LA ó PAR.

2.4.3. Fase de recuperación

Esta fase comienza cuando se apaga la luz actínica. En ausencia de luz fotosintéticamente activa, los procesos fotosintéticos no tienen lugar pero los mecanismos NPQ aún permanecen y comienzan a relajarse. Por tanto, si se mide la fluorescencia máxima (F_M) como se

hace en la fase oscura, se registrará un aumento progresivo de la misma con el tiempo. Debido a razones metabólicas y fisiológicas, el tiempo necesario para que cada componente del NPQ se relaje es diferente. El primer componente en desaparecer es el desencadenado por la acidificación del lumen y el potencial transmembrana subsecuente (q_E), con un tiempo de relajación típico (τ_E) de alrededor de 10 - 60 segundos [43]. El estado relacionado con la transición (q_T) toma entre 2 y 5 minutos aproximadamente y la relajación del componente inhibidor (q_I), que está relacionado con el daño inducido por estrés lumínico, puede tardar entre 20 minutos y hasta horas o días en relajarse completamente [44, 45]. Aunque los tiempos de desactivación pueden ser constantes, la cantidad que corresponda a cada componente es proporcional a la intensidad de la luz actínica aplicada en la fase anterior. En consecuencia, es necesario realizar un protocolo utilizando diferentes intensidades de luz actínica para asegurar una caracterización completa de los componentes de NPQ[46].

A continuación se resume un protocolo típico de medición de la Cinética de Kautsky. Como puede observarse en la Fig. 2.6, los parámetros descritos anteriormente prestan atención a los valores máximos (en el pico) y mínimo (basal) de la fluorescencia en cada fase, pero no profundizan en el curso temporal del aumento y la disminución de esa fluorescencia. Sin embargo, si se observa más de cerca las fases de inducción (crecimiento) y decaimiento de la fluorescencia, se observará un patrón característico. Esto generalmente se conoce como curva OJIPsM_T o, alternativamente, curvas OJIP y PSMT, respectivamente. En las secciones siguientes se describen ambas fases y su interpretación teórica.

Algunos enfoques fotoquímicos hacia la fluorescencia de clorofila variable disponibles en la literatura se centran en el par especial de clorofilas y calculan diferentes rendimientos de procesos que desactivan el dicho dímero en estado excitado en el centro de reacción[47, 48]. Aunque esto puede ser útil para caracterizar la fotoquímica del RC, no ofrece una comprensión correcta de los procesos de extinción que, como se discutió anteriormente, desactivan no solo el par especial de clorofilas sino que también juegan papeles importantes en el complejo de antenas (mecanismos del NPQ). El enfoque más completo y mayormente aceptado es el que concibe los centros de reacción y sus complejos de antenas como un todo, lo que permite racionalizar todos los procesos bajo un mismo esquema teórico. A continuación se describirá resumidamente el modelo y los parámetros derivados

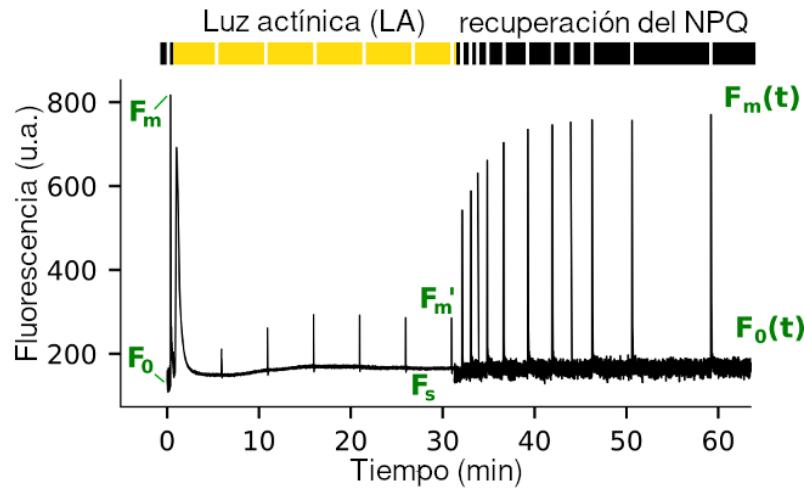


FIGURA 2.6: Protocolo típico de medición de la Cinética de Kautsky y la etapa de recuperación de NPQ subsiguiente. El detalle de los parámetros derivados se discute en las secciones 2.4.4 y 2.4.5.

de la misma. Se describen de forma diferenciada los parámetros derivados de la fase bajo iluminación actínica de los derivados de la fase de recuperación del NPQ.

2.4.4. Parámetros de la fase actínica

La fluorescencia emitida por el PSII, incluyendo el RC y el LHC, en un momento dado se puede expresar como:

$$F(t) = G \cdot \Phi_F(t) = G \cdot \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_P \cdot f_{Q_A}(t) + k_{NPQ}(t)} \quad (2.2)$$

$$f_{Q_A}(t) = \frac{[Q_A](t)}{[Q_A](t) + [Q_A^-](t)} \quad (2.3)$$

Donde G es una constante que depende del dispositivo de medición y está relacionada con la sensibilidad del detector y la luz de excitación, $\Phi_F(t)$ es el rendimiento cuántico de fluorescencia de clorofila y $f_{Q_A}(t)$ es la fracción del primer aceptor de electrones oxidado (disponible). En la Ec. 2.3, $[Q_A^-]$ representa la forma reducida del aceptor de electrones primario. En hojas adaptadas a la oscuridad, se supone que la proporción $f_{Q_A}(t)$ es 1, ya que todos los centros de reacción están abiertos y por ende $[Q_A^-] = 0$.

Continuando con $F(t)$, k_F , k_{ISC} , k_{IC} , k_{NPQ} y k_P corresponden a constantes de velocidad de primer orden para fluorescencia, cruce entre sistemas, conversión interna, extinción no fotoquímica y transferencia de electrones (del par especial clorofila al primer aceptor (Q_A)) [49, 50]. Las tres primeras constantes cinéticas son imposibles de separar con las

técnicas utilizadas en esta tesis, por lo que las agrupamos en k_C .

$$k_C = k_F + k_{ISC} + k_{IC} \quad (2.4)$$

Debido al tipo de procesos que incluye k_C se la denomina constante de desactivación foto-física. Además, se asume que los únicos parámetros en la Ec. 2.2 que cambian en función de la intensidad de la luz actínica son f_{Q_A} y k_{NPQ} .

En la fase oscura inicial (Fig. 2.6 primera sección oscura), las hojas se adaptan a la oscuridad durante un tiempo suficiente (≥ 20 min) de modo que los mecanismos del NPQ no están activos ($k_{NPQ} = 0$) y todos los aceptores primarios de electrones están oxidados ($f_{Q_A}(t) = 1$), por lo que la fluorescencia en ese punto resulta de la siguiente manera:

$$F_0 = G \cdot \frac{k_F}{k_C + k_P} \quad (2.5)$$

Cuando se aplica un pulso corto saturante (PS), los mecanismos del NPQ siguen inactivos pero todos los aceptores primarios se reducen instantáneamente, por lo que $f_{Q_A}(t) = 0$ y:

$$F_M = G \cdot \frac{k_F}{k_C} \quad (2.6)$$

Al combinar estas dos medidas, se cancela la dependencia del dispositivo de medición (G) y se obtiene la tasa de transferencia de electrones del sistema en ausencia de procesos del NPQ que es, de hecho, el rendimiento cuántico máximo de transferencia de electrones del PSII (F_V/F_M):

$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M} = \frac{k_P}{k_C + k_P} \quad (2.7)$$

Luego, cuando se enciende la luz actínica y la señal alcanza un nuevo estado estacionario, los aceptores de electrones primarios se reducen parcialmente (la proporción depende de la intensidad de la LA) y los mecanismos NPQ están activos. Análogamente a las Ec. 2.5 y Ec. 2.6, se pueden establecer dos ecuaciones para el estado estacionario (F_S) y la fluorescencia máxima bajo iluminación actínica (F_M'):

$$F_S(LA) = G \cdot \frac{k_F}{k_C + k_P \cdot f_{Q_A}(LA) + k_{NPQ}(LA)} \quad (2.8)$$

$$F_M'(LA) = G \cdot \frac{k_F}{k_C + k_{NPQ}(LA)} \quad (2.9)$$

Dado que los parámetros F_S y F_M' corresponden a valores a un tiempo de iluminación actínica tal que se alcance un estado estacionario, a partir de ese tiempo dejan de depender del tiempo y por ello en estado estacionario dependen únicamente de la LA aplicada.

Combinando los valores registrados cuando se alcanza dicho estado estacionario, es posible calcular tres rendimientos muy importantes: el rendimiento cuántico máximo de PSII (Φ_{PSII}), el rendimiento cuántico de decaimiento fotofísico (Φ_C) y el rendimiento cuántico de *quenching* no fotoquímico (Φ_{NPQ}) los cuales suman 1 de acuerdo a:

$$\Phi_{PSII}(LA) = \frac{F_M' - F_S}{F_M'} = \frac{k_P \cdot f_{Q_A}(LA)}{k_C + k_P \cdot f_{Q_A}(LA) + k_{NPQ}(LA)} \quad (2.10)$$

$$\Phi_C(LA) = \frac{F_S}{F_M} = \frac{k_C}{k_C + k_P \cdot f_{Q_A}(LA) + k_{NPQ}(LA)} \quad (2.11)$$

$$\Phi_{NPQ}(LA) = \frac{F_S \cdot (F_M - F_M')}{F_M \cdot F_M'} = \frac{k_{NPQ}(LA)}{k_C + k_P \cdot f_{Q_A}(LA) + k_{NPQ}(LA)} \quad (2.12)$$

Como se indicó en la introducción, el PS_{rate} es un indicador intuitivo de la dependencia de la fotosíntesis con la irradiancia actínica y se calcula de la siguiente manera:

$$PS_{rate}(LA) = \Phi_{PSII}(LA) \cdot LA \quad (2.13)$$

Para una determinada fase actínica con una dada intensidad de LA, se obtiene un valor para cada uno de los rendimientos arriba definidos. Para determinarlos es necesario aplicar un pulso saturante durante la iluminación actínica. Se requieren de al menos 15 minutos de iluminación con una cierta LA (depende de la intensidad de esta última) para que la señal se estabilice y obtener los rendimientos cuánticos de manera correcta. Más información sobre los protocolos y tiempos de medición en el [Capítulo 3](#).

Por otro lado, puede ser conveniente cuantificar la proporción de energía que es utilizada para activar la vía fotoquímica (transporte electrónico) o bien, la utilizada en fenómenos asociados al NPQ. Estos parámetros corresponden al *quenching* fotoquímico (q_P) y

quenching no fotoquímico (q_{NP}) el cual es muy similar al NPQ total (no así al Φ_{NPQ}).

$$q_P = \frac{F_M' - F_S}{F_M - F_0} \quad (2.14)$$

$$q_{NP} = \frac{F_M - F_M'}{F_M - F_0} \quad (2.15)$$

$$NPQ_{total} = \frac{F_M - F_M'}{F_M'} \quad (2.16)$$

El q_P indica la proporción de centros de reacción de PSII que están abiertos bajo esa iluminación actínica[51]. Un q_P alto es ventajoso para la separación de carga en el centro de reacción y es beneficioso para el transporte de electrones y el rendimiento de PSII[52].

2.4.5. Parámetros de la fase de recuperación

Los pulsos de saturación durante la fase de recuperación del NPQ permiten estimar la capacidad fotosintética máxima y también, si se cumplen ciertos requisitos experimentales, es posible estimar la contribución de cada componente del NPQ al rendimiento cuántico del NPQ total. Sin embargo, para dilucidar la dependencia temporal característica de cada componente del NPQ, su rendimiento cuántico total no es útil porque depende de k_{NPQ} tanto en el numerador como en el denominador (Ec. 2.12). Debido a que hay más incógnitas que ecuaciones en el sistema, no es posible calcular únicamente k_{NPQ} . Por lo tanto, si se grafica k_{NPQ}/k_C en función del tiempo, donde para cada LA se cumple que k_C permanece constante, el cociente k_{NPQ}/k_C resulta ser directamente proporcional a k_{NPQ} :

$$\frac{k_{NPQ}(LA, t)}{k_C} = \frac{F_M - F_M'(LA, t)}{F_M'(LA, t)} \quad (2.17)$$

Para separar las diferentes contribuciones al NPQ, se asume un comportamiento exponencial para cada paso de su desactivación. Hay varios modelos en la bibliografía para estimar los componentes del NPQ. En el Capítulo 4 se describen algunos resultados de un estudio integral de fluorescencia variable de clorofila en el cual, en conjunto con el Lic. Juan Romero bajo la dirección de M. Gabriela Lagorio, se desarrolló un modelo sencillo para la estimación de los tres componentes del NPQ. A continuación se describe el modelo matemático utilizado, pero el detalle de su elaboración y las ventajas que tiene por sobre los demás modelos presentes en bibliografía se especifica en el siguiente capítulo.

La traza temporal de k_{NPQ}/k_C se ajusta al modelo bi-exponencial siguiente:

$$\frac{k_{NPQ}(LA, t)}{k_C} = q_E(LA) \cdot e^{\frac{t}{\tau_E}} + q_T(LA) \cdot e^{\frac{t}{\tau_T}} + q_I(LA) \quad (2.18)$$

En la Ec. 2.18 los parámetros $q_E(LA)$, $q_T(LA)$ y $q_I(LA)$, representan la amplitud de cada uno de estos componentes. Observar que los componentes de *quenching* dependiente de energía (q_E) y de transición de estado (q_T) tienen asociados un tiempo característico dado por τ_E y τ_T , respectivamente, mientras que el *quenching* inhibitorio (q_I) contribuye al *quenching* total como una constante.

Finalmente, se calcula la fracción del NPQ total correspondiente a cada componente para cada luz actínica. Para ello se multiplica el rendimiento del NPQ total de la Ec. 2.12 por la proporción de ese *quenching* obtenido tras el ajuste del cociente k_{NPQ}/k_C , resultando las siguientes ecuaciones:

$$\Phi_{q_E}(LA) = \Phi_{NPQ}(LA) \cdot \frac{q_E(LA)}{q_E(LA) + q_T(LA) + q_I(LA)} \quad (2.19)$$

$$\Phi_{q_T}(LA) = \Phi_{NPQ}(LA) \cdot \frac{q_T(LA)}{q_E(LA) + q_T(LA) + q_I(LA)} \quad (2.20)$$

$$\Phi_{q_I}(LA) = \Phi_{NPQ}(LA) \cdot \frac{q_I(LA)}{q_E(LA) + q_T(LA) + q_I(LA)} \quad (2.21)$$

2.5. Transiente OJIP

Cuando el material fotosintético previamente adaptado a la oscuridad se ilumina con una luz saturante, la fluorescencia aumenta desde un valor inicial (O) hasta el máximo (P) en medio segundo aproximadamente. Entre O y P, la fluorescencia de clorofila pasa por dos puntos de inflexión: J e I, a ~ 2 y ~ 40 ms, respectivamente (Fig. 2.7), con un patrón característico[53]. La comprensión convencional del transitorio OJIP se basa principalmente en la hipótesis presentada en 1963, por Duysens y Sweers[54]. En su modelo asumieron que el fotosistema II es responsable de la fluorescencia variable de clorofila, y la tasa de conversión fotoquímica de PSII está limitada únicamente por el lado del aceptor de electrones (es decir, el lado que se reduce por el PSII) [37, 38, 55]. Además, se sugirió que el rendimiento de fluorescencia fuera controlado por un *quencher* aceptor del PSII (llamado "Q"), identificado más tarde como plastoquinona Q_A en su estado oxidado. En esta teoría, el rápido aumento de la fluorescencia es un reflejo de la concentración de Q_A reducida,

es decir, Q_A^- , afectado por la cinética de varias reacciones redox asociadas a la cadena de transporte de electrones fotosintéticos. También se ha propuesto la participación de otros procesos que controlan la fluorescencia variable de la clorofila *a* además de la extinción de Q_A . Entre ellos están: la conectividad entre fotosistemas[56]; el centro de reacción de PSII en su estado oxidado[57], la feofitina[58] y el *pool* de plastoquinonas[59]. En esta tesis, la descripción del transiente de fluorescencia se estudiará considerando la hipótesis de Duysens y Sweers, con algunas pequeñas modificaciones para ampliar la validez del modelo.

El transitorio OJIP tiene el potencial de ser utilizado para la caracterización del rendimiento cuántico fotoquímico del PSII y la actividad del transporte de electrones. La curva OJIP es una técnica no destructiva que permite ensayos rápidos de cualquier tipo de muestra fotosintética[55], aunque se ha explotado especialmente en hojas. El transiente se ha utilizado para monitorear efectos específicos de varios inhibidores, factores de estrés y mutaciones, entre ellos: estrés por calor [60, 61], congelamiento [62], sequía [63], altas irradiancias [64], contaminantes [65, 66], salinidad [67], humedad [68], deficiencia de nutrientes [69], entre otros[70].

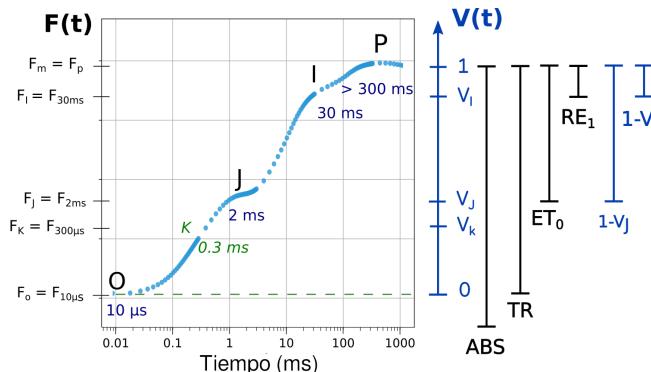


FIGURA 2.7: Curva típica del transiente OJIP.

En muestras fotosintéticas previamente adaptadas a la oscuridad, el lado del aceptor de electrones del PSII se encuentra principalmente en el estado oxidado . Es decir, los centros de reacción del PSII están abiertos y la intensidad de fluorescencia es mínima (F_0), representado en la curva del transitorio de fluorescencia en la Fig. 2.7 como *Origen*. Luego, en menos de 1 s, la fluorescencia de Chl *a* alcanza el pico P (también llamado F_M ,

cuando la intensidad de la luz de excitación es alta y saturante). A nivel de F_M , de acuerdo con la hipótesis introducida por Duysens y Sweers[54], todas las moléculas de Q_A están completamente reducidas (es decir, todos los RC de PSII activos están cerrados), debido a la reducción completa de todos los aceptores de electrones de la ETC como resultado del pulso de luz saturante aplicado. De esta manera, las diferentes fases del transiente de fluorescencia (OJ, JI e IP) se deben a la progresiva saturación de los aceptores de electrones en la ETC: OJ sigue a la reducción del lado aceptor del PSII (Q_A y Q_B); JI representa a la reducción del conjunto de plastoquinonas (PQ) e IP es paralelo a la reducción de los aceptores de transporte de electrones en y alrededor del PSI[37, 40, 71]. Esto significa que los transitorios OJIP brindan información sobre el estado del transporte electrónico de la cadena fotosintética (ETC).

2.5.1. Interpretación de la curva y parámetros derivados

La curva OJIP es visualmente obvia cuando se presenta en una escala de tiempo logarítmica como se muestra en Fig. 2.7, ya que las fases OJ, JI e IP tienen cinéticas diferentes[72]. Las intensidades de fluorescencia en los puntos 0, J, I y P se notan como F_0 , F_J , F_I y F_M , respectivamente. Para comparar curvas de diferentes muestras, es necesario realizar alguna de las siguientes normalizaciones: (A) una normalización simple en F_0 , que generalmente varía entre 1 y 5, ó (B) una doble normalización tanto en F_0 como en F_M , lo que da la fluorescencia variable relativa en el tiempo t , $V(t)$:

$$V(t) = \frac{F(t) - F_0}{F_M - F_0} \quad (2.22)$$

Este parámetro no es más que una doble normalización de la curva que permite comparar los transitorios medidos, convirtiendo las intensidades absolutas de fluorescencia en contribuciones relativas a la fluorescencia variable. La normalización más común es entre F_0 y F_M , pero también puede ser conveniente normalizar en puntos de inflexión intermedios, lo que resulta en $V_J(t)$ y $V_I(t)$, si se normaliza en F_0 y F_J ó F_0 y F_I , respectivamente. Estos últimos no deben confundirse con V_J y V_I los cuales corresponden a valores específicos de $V(t)$ en los puntos J e I, respectivamente. Es decir, a $t = 2$ ms donde $F(t) = F_J$, la fluorescencia variable relativa $V(t = 2ms)$ se suele simplificar como V_J , y análogamente a $t = 40$ ms, V_I . Considerando la teoría de Duysens y Sweers, la fluorescencia relativa

variable $V(t)$ (normalizada en F_0 y F_M) puede interpretarse como la fracción de centros de reacción del PSII cerrados en los puntos J, I y P, según corresponda.

Usualmente con esta técnica, se suele estudiar el efecto en la ETC de un dado agente respecto a un control, por lo que suele ser conveniente cuantificar la diferencia entre los transitorios de muestras y controles para lo cual se utiliza la fluorescencia normalizada $V(t)$ en los puntos de interés. Por ejemplo, para J tenemos ΔV_J :

$$\Delta V_{OJ}(t) = V_{J,muestra}(t) - V_{J,control}(t) \quad (2.23)$$

Strasser y colaboradores desarrollaron un modelo sencillo para analizar el transitorio de fluorescencia OJIP en términos de las diversas reacciones del PSII, basándose en los conceptos generales propuestos por Duysens y Sweers sobre flujos de energía[55]. Por simplicidad, llamaron a este desarrollo el ensayo JIP. De esta forma la curva OJIP (fenómeno de aumento rápido de la fluorescencia) puede ser descripto bajo un modelo de flujos de energía, el ensayo JIP (*JIP test* en inglés).

La Fig. 2.8 es una vista esquemática de los flujos de energía relacionados con los principales fenómenos que ocurren al iluminar la antena del PSII en la muestra fotosintética. El ensayo JIP, en su forma más simple, asume que no hay transferencia de energía entre las unidades PSII, es decir, no hay conectividad entre las unidades del PSII, como si todos los PSII existieran de forma independiente. El flujo total de fotones absorbido por los pigmentos de LHCII en PSII, ABS (en algunos casos los flujos se denotan como J pero aquí se ha simplificado la notación), es capturado parcialmente por los RC de PSII, TR_0 , y parcialmente disipado como calor y fluorescencia, DI_0 . El flujo de excitón atrapado, TR_0 , representa la fracción del flujo de fotón absorbido utilizado para la separación primaria de carga y la estabilización del centro de reacción II oxidado ($P_{680}^+Q_A^-$), es decir, para cerrar los RC de PSII. Por último, el flujo de energía a través de la cadena de transporte de electrones fotosintéticos, desde H_2O a Fd (y eventualmente a $NADP^+$ u otros aceptores de electrones que interactúan con Fd), está representado por el flujo de transporte de electrones ET_0 . Los principales cambios en ET_0 se reflejan en la variación en el tiempo de la reducción de Q_A (de acuerdo con la teoría de Duysens y Sweers).

Todos estos flujos de energía están interrelacionados y dependen de propiedades estructurales y la actividad fotosintética de la muestra biológica. Dado que la energía emitida

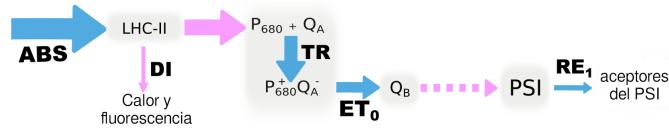


FIGURA 2.8: Esquema de las principales vías de energía relacionadas con la fluorescencia de clorofila *a* de acuerdo al modelo de Duysens y Sweers (1963).

como fluorescencia por las clorofillas de la antena es parte del flujo de energía de disipación, DI_0 , los datos de inducción de fluorescencia pueden relacionarse teóricamente con los flujos de energía anteriores de acuerdo a[37]:

$$ABS = TR_0 + DI_0 \quad (2.24)$$

Como se puede ver en el esquema de la Fig. 2.8 el modelo utilizado para interpretar el transitorio OJIP considera una cascada de flujos de energía fotosintéticos. A partir de estos flujos, es posible calcular varios rendimientos y eficiencias cuánticas de interés como: el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria del PSII (Φ_{P_0}), el rendimiento cuántico del flujo de transporte de electrones de Q_A a Q_B (Φ_{ET_0}), el rendimiento cuántico del flujo de transporte de electrones hasta los aceptores de electrones PSI (Φ_{RE_0}), la eficiencia con la que un electrón atrapado por PSII se transfiere de Q_A a Q_B (Ψ_{ET_0}), la eficiencia con la que un electrón atrapado por PSII se transfiere hasta los aceptores del PSI (Ψ_{RE_0}) y la eficiencia con la que un electrón es transferido desde Q_B hasta los aceptores del PSI (δ_{RE}).

$$\Phi_{P_0} = \frac{TR_0}{ABS} = 1 - \frac{F_0}{F_M} = \frac{F_V}{F_M} \quad (2.25)$$

$$\Phi_{ET_0} = \frac{ET_0}{ABS} = \frac{ET_0}{TR_0} \cdot \frac{TR_0}{ABS} = (1 - V_j) \cdot \Phi_{P_0} = 1 - \frac{F_J}{F_M} \quad (2.26)$$

$$\Phi_{RE_0} = \frac{RE_0}{ABS} = \frac{RE_0}{TR_0} \cdot \frac{TR_0}{ABS} = (1 - V_i) \cdot \Phi_{P_0} = 1 - \frac{F_I}{F_M} \quad (2.27)$$

$$\Psi_{ET_0} = \frac{ET_0}{TR_0} = 1 - V_j \quad (2.28)$$

$$\Psi_{RE_0} = \frac{RE_0}{TR_0} = 1 - V_i \quad (2.29)$$

$$\delta_{RE} = \frac{RE_0}{ET_0} = \frac{1 - V_i}{1 - V_j} \quad (2.30)$$

El subíndice *o* indica que la curva se midió utilizando un pulso saturante por lo que la fluorescencia en P corresponde efectivamente a F_M y por tanto los rendimientos y eficiencias

obtenidas a partir de estos flujos corresponden al valor máximo que pueden tomar. Por ejemplo, si se utiliza un pulso de luz no saturante, el rendimiento Φ_{PO} no sería el rendimiento cuántico fotoquímico máximo del PSII, sino directamente el rendimiento cuántico del PSII bajo esa iluminación. Los parámetros bajo iluminación saturante ya no dependen de la intensidad de luz utilizada debido a que el ETC se bloquea por completo.

Por otro lado, los flujos específicos se pueden calcular por centro de reacción activo (RC) o sección eficaz excitada (CS). En general, se utilizan solo algunos de ellos como ABS/RC que es el flujo de fotones absorbidos promedio por RC del PSII, el cual es una medida del tamaño aparente de la antena[37, 38]. Para calcularlo, es necesario definir otro parámetro, $M_{o,DCMU}$, que es la pendiente inicial del transitorio OJIP en presencia de DCMU. La (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU), es un compuesto que bloquea la transferencia de electrones entre Q_A y Q_B . De esta forma, $M_{o,DCMU}$ se puede aproximar como la velocidad de cierre de los RC. Por lo tanto, bajo los supuestos del modelo, para cada excitón atrapado se cierra un RC, por lo que el flujo de excitones atrapados máximo por RC (TR_0/RC) se puede calcular como $TR_0/RC \approx M_{o,DCMU}$ el cual representa la tasa inicial de cierre de RC activos por el número total de RC activos.

Por razones prácticas, $M_{o,DCMU}$ no se puede medir directamente en experimentos de campo. No obstante, puede aproximarse utilizando datos de fluorescencia obtenidos en muestras no tratadas con DCMU, es decir la muestra en estudio. En este caso, la pendiente inicial de la curva de fluorescencia relativa variable, M_o , es menor que $M_{o,DCMU}$, ya que la fluorescencia relativa a tiempos ≈ 0 se reduce por la reoxidación de Q_A como resultado de la transferencia de electrones a Q_B (que con DCMU está bloqueada, ver la cadena de transferencia de electrones en la [Fig. 2.3](#)). Sin embargo, algunos resultados experimentales sugieren que $M_{o,DCMU}$ se puede aproximar con la relación M_o/V_J [73]. Luego, a partir de un despeje matemático se obtiene el flujo de fotones absorbidos promedio por RC-PSII como:

$$\frac{ABS}{RC} = \frac{TR_0}{RC} \cdot \frac{ABS}{TR_0} = \frac{TR_0}{RC} \cdot \frac{1}{\Phi_{P_0}} \approx \frac{M_o}{V_J} \cdot \frac{1}{\Phi_{P_0}} \quad (2.31)$$

También se puede utilizar RC/ABS que representa la cantidad de RC activos (que pueden

reducir a Q_A) por antena del PSII.

En general, en un gran número de estudios fotosintéticos, la relación F_V/F_M se utiliza como indicador de estrés. Sin embargo, este parámetro empírico no siempre es lo suficientemente sensible como para observar diferencias entre diferentes muestras. Es por ello que en los últimos años se han definido otros parámetros que surgen de la combinación de los parámetros anteriores y que son más sensibles a pequeñas variaciones en el transporte electrónico fotosintético [37, 74]. Uno de ellos es el índice de rendimiento, PI, que se basó en la ecuación de Goldman, en el que se supone que el potencial total de un sistema se puede calcular multiplicando las ecuaciones de Nernst para los componentes individuales [75]. De esta forma PI_{ABS} se calcula a partir de tres componentes: la densidad del centro de reacción, la eficiencia de captura y la eficiencia de transporte de electrones en ETC (Ec. 2.32). Luego, PI_{ABS}^{total} se calcula incluyendo adicionalmente la eficiencia del transporte de electrones hasta los aceptores de PSI (Ec. 2.33). En consecuencia, si un agente afecta a alguno de estos componentes, el efecto se reflejará en el índice de rendimiento, que por tanto tiene una sensibilidad superior a la conseguida por cualquiera de sus componentes aislados. Luego, se puede calcular una fuerza impulsora total de la actividad fotoquímica del sistema, expresada como $DF = \log(PI)$. En muchos casos, las expresiones de PI y DF han demostrado ser muy sensibles a diferentes factores y, por tanto, muy útiles para el seguimiento fisiológico, ambiental y biotecnológico [76-78].

$$PI_{ABS}^{total} = \frac{RC}{J_{ABS}} \cdot \frac{\Phi_{P_0}}{(1 - \Phi_{P_0})} \cdot \frac{\Psi_{ET_0}}{(1 - \Psi_{ET_0})} \quad (2.32)$$

$$PI_{ABS}^{total} = \frac{RC}{J_{ABS}} \cdot \frac{\Phi_{P_0}}{(1 - \Phi_{P_0})} \cdot \frac{\Psi_{ET_0}}{(1 - \Psi_{ET_0})} \cdot \frac{\delta_{RE}}{(1 - \delta_{RE})} \quad (2.33)$$

$$DF_{ABS}^{total} = \log(PI_{ABS}^{total}) \quad (2.34)$$

El subíndice ABS indica que es en base al flujo de fotones absorbidos, ya que se pueden obtener ecuaciones análogas por sección eficaz (CS).

Una descripción detallada de los parámetros derivados del transiente OJIP, las ecuaciones correspondientes y sus definiciones se encuentra en el [Apéndice A](#). La prueba JIP, recién descripta, no es más que un método sistemático para ser utilizado como una herramienta práctica, para obtener información rápida sobre diversas posibilidades de efectos sobre la

fotosíntesis, particularmente en PSII, y en cierta medida en PSI.

2.6. Decaimiento PSMT

El rápido aumento de la fluorescencia característico del transiente OJIP es seguido por un decaimiento mas lento y complejo llamado comúnmente decaimiento PSMT (Fig. 2.9). En esta fase, la fluorescencia tarda varios minutos en alcanzar el nivel estacionario (F_S) pasando por un punto de inflexión S y el pico M hasta alcanzar el punto T en F_S . El pico M a veces no aparece o bien, varios estados denotados como S_1M_1 , S_2M_2 , se presentan. El decaimiento completo está influenciado principalmente por los mecanismos de NPQ y otros fenómenos que desempeñan papeles menores. Por ejemplo, justo después del pico de fluorescencia donde se saturaron los aceptores de electrones, la reserva de PQ comienza a ser reoxidada por el PSI (*quenching* fotoquímico de la fluorescencia) y aparecen mecanismos de NPQ relacionados con el pH que causan el rápido decaimiento de la etapa PS de la curva PSMT [71, 72]. El estudio de este tipo de respuesta dinámica del aparato fotosintético es importante, ya que puede proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de regulación de la fotosíntesis.

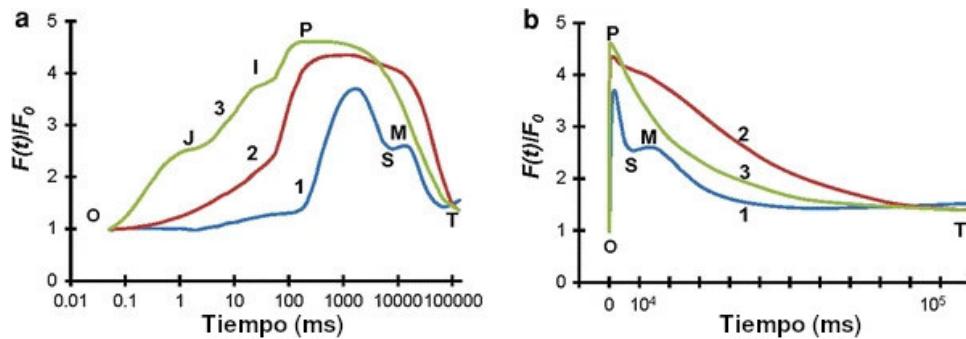


FIGURA 2.9: Curva OJIP-PSMT típica para una muestra de hoja a 32 (1, azul), 320 (2, roja), and 3200 (3, verde) μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Izquierda: a escala de tiempo logarítmica, Derecha: escala lineal. Editada y traducida de Stirbet y cols.[38] Copyright (2011), con permiso de Elsevier.

En comparación con la curva OJIP, que es la respuesta integrada de clorofilas excitadas en señales redox y campos electrostáticos que la ETC genera dentro de la membrana tilacoides, el decaimiento de PS (dentro de PSMT) es manifiestamente mucho más complejo[72, 79]. Por un lado, además de las señales de la cadena de transporte electrónico intramembranosa, ahora se deben tener en cuenta la afluencia de protones asociados a la ETC al

lumen y las señales que esto genera, como acidez del lumen, ΔpH transmembrana y el transporte de contraiones asociado, y la diferencia de potencial eléctrico transmembrana. Esto se pone de manifiesto debido a que en contraste con la curva OJIP que pude observarse en membranas tilacoides aisladas, el decaimiento PS solo se observa si la membrana y la estructura interna del cloroplasto está intacta, ya que depende fuertemente de los niveles necesarios de solutos estromales a diferencia de la fase OJIP[80, 81].

Debido a que la curva PSMT incluye fenómenos relacionados al NPQ más complejos que una simple saturación progresiva de la cadena de transporte electrónico fotosintética (OJIP), es apropiado clasificar los procesos que modulan la fluorescencia de clorofila *a* en la ventana de tiempo de μs a s de acuerdo a los tipos de *quenching* que representan. De esta forma, se obtiene tres tipos de procesos de desactivación que modulan la señal observada:

- (I) Procesos de *quenching* fotoquímico (q_P) asociados con la separación de carga primaria ($P_{680}^* \text{ Pheo } Q_A \rightarrow P_{680}^+ \text{ Pheo}^- Q_A \rightarrow P_{680}^+ \text{ Pheo } Q_A^-$) en el centro de reacción del PSII. Aquí, el RC excitado esta representado como P_{680}^* que dona un electrón a la feofitina a (Pheo) y ésta a su vez a la plastoquinona A (Q_A). Luego, el P_{680}^+ es reducido por un electrón proveniente de la oxidación de H_2O en el OEC[57, 72].
- (II) Procesos de *quenching* no fotoquímico (q_{NP}) que están indirectamente relacionados y regulados por el transporte fotosintético de electrones. El componente principal de q_{NP} es q_E , que está regulado por la acidificación del espacio intratilacoide (lumen) cuando la fotofosforilación no puede mantener la misma velocidad que la tasa de ETC. La acidificación del lumen ejerce efectos complejos sobre las propiedades electrostáticas de la membrana tilacoide y las conformaciones de proteínas asociadas que dan como resultado la formación de dímeros y heterodímeros de clorofilas y xantófilas que funcionan como sumideros de excitación electrónica[82]. Otro proceso q_{NP} regulado por luz, se relaciona con el estado redox del *pool* de plastoquinonas (PQs) [83].
- (III) Disminución de la fluorescencia ($q_{T(1 \rightarrow 2)}$) o aumento de la fluorescencia ($q_{T(2 \rightarrow 1)}$) debido a las transiciones de estado $1 \rightarrow 2$ y estado $2 \rightarrow 1$, respectivamente[84]. Las transiciones de estado son procesos de aclimatación a la luz que aumentan o

disminuyen el tamaño de las antenas captadoras de luz que alimentan la excitación de los complejos centrales de PSII y PSI, por lo tanto modulan la intensidad de la fluorescencia obtenida. En plantas superiores y algas verdes, esto implica el movimiento intramembranoso de los complejos LHC-II de un fotosistema a otro. En un sentido estricto, las transiciones de estado no son procesos de *quenching*, ya que el tiempo de vida de la fluorescencia no se ve afectada, sin embargo, como modulan la fluorescencia observada se suele adherir por simplicidad.

Habiendo revisado el marco teórico que se usará para interpretar la curva PSMT, a continuación resumiremos los procesos involucrados en cada etapa de la curva.

2.6.1. Fase PS

Las principales causas del decaimiento PS se relacionan con una re-oxidación gradual de Q_A por PSI (q_P), la energización de la membrana tilacoide debido a la translocación de protones y a una transición de estado $1 \rightarrow 2$ ($q_{T(1 \rightarrow 2)}$). Sin embargo, la interacción de q_P , y la de q_E (dentro de q_{NP}) asociado a ΔpH son los fenómenos principales que explican el cambio de fluorescencia de OPSMT, a baja iluminación actínica ($\sim 100 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) donde los demás componentes del NPQ poseen poca participación (Fig. 2.9). Esta interpretación ignora, sin embargo, el papel de las transiciones de estado como modificadores de fluorescencia de clorofila a y hay estudios que han propuesto que dichas contribuciones son necesarias para explicar las curvas observadas[72].

Para entender como los protones del lumen acuoso pueden modular la desexcitación de las clorofilas asociadas al LHC hay que revisar los procesos asociados al NPQ dependientes del pH. En plantas superiores y algas, se cree que la mayor parte de q_{NP} dependiente de la acidez del lumen tiene lugar en la periferia de las proteínas LHC que contienen clorofilas a, b y xantófilas en el PSII. Esto involucra la protonación de residuos de aminoácidos ácidos (por ejemplo, Glutamatos) seguida de cambios en las conformaciones proteicas y la formación de dímeros y heterodímeros de Chl a / xantófila que funcionan como sumideros de excitación[82]. El proceso de NPQ ó q_{NP} mejor entendido es el asociado al ciclo de las xantófilas, el cual es activado y regulado por el pH del lumen e involucra proteínas del LHC del PSII[85]. El ciclo de las xantófilas, sin embargo, es demasiado lento

(constantes de tiempo de decenas de segundos[86]) para ser un contribuyente q_{NP} en el rápido decaimiento PS y, por ende es más probable que contribuya en la fase final de la curva PSMT. Por otro lado, el *quenching* intrínseco de Z_x (es decir, independientemente del ciclo de las xantófilas) ha demostrado de manera convincente contribuir a esta etapa[86]. Finalmente, se ha demostrado que la protonación de aminoácidos ácidos genera también centros de *quenching* en las antenas del PSII[87].

2.6.2. Fase SM

Mientras q_P domina el aumento de O a P, y q_E y q_P dominan el decaimiento en PS, junto con una contribución menor de q_{T12} , durante las fases SM y MT de la curva de inducción de fluorescencia, estas últimas transiciones de estado se vuelven cada vez más dominantes. Se ha observado experimentalmente que el pico M se observa principalmente a bajas luces actínicas y tiende a desaparecer o ser menos evidente a mayor intensidad (Fig. 2.9).

Por otro lado, en plantas superiores la reserva de PQ se encuentra oxidada durante la adaptación a la oscuridad por el oxígeno molecular que se encuentra dentro del mismo compartimiento[84]. La transición del estado $1 \leftrightarrow$ estado 2 está regulada por el equilibrio redox del conjunto de PQs[88]. Una planta superior se desplaza hacia el estado fuertemente fluorescente 1 durante la adaptación a la oscuridad en PSMT y al estado 2, débilmente fluorescente, bajo iluminación. De esta forma, a grandes rasgos el extenso decaimiento de $P \rightarrow T$, que a menudo es monótono (S y M pueden ser muy sutiles) refleja la transición de estado $1 \rightarrow 2$. Siendo el transitorio SMT solo un episodio menor en la tendencia general de disminución de la fluorescencia. Los diferentes patrones de PSMT de las hojas superiores de las plantas y las algas pueden reflejar diferencias en la estructura y apilamiento de la membrana tilacoide[72].

Actualmente no hay un consenso general de los fenómenos que conducen a la formación de los puntos S y M. Por un lado, Bradbury y Baker[89, 90] establecieron que el aumento de SM bajo excitación actínica débil, corresponde predominantemente a una disminución en q_P (a medida que Q_A se reduce) y un aumento en q_{NP} (asociado a Δ pH). Por el contrario, Sivak y cols.[91] y Horton [92] observaron una disminución en el Δ pH durante esta misma fase. La discrepancia probablemente se deba a las diferentes intensidades de luz

actínica utilizadas en cada caso. La participación de q_P en el aumento de SM en las hojas está respaldada también por aumentos sincrónicos en las tasas de evolución de O_2 [93] y de la fijación de CO_2 [94].

2.6.3. Fase MT

Como ya se mencionó, en plantas superiores y algas, el transitorio SMT es menos evidente (más bajo) que el transitorio OPS y, a menudo, es solo una inflexión leve durante el decaimiento monótono de $P \rightarrow T$. En plantas superiores y algas, la disminución general de la fluorescencia desde el pico P hasta el estado estacionario terminal T, va acompañada de aumentos algo retardados en la tasa de absorción de CO_2 [95] y la tasa de evolución de O_2 [96]. Sin embargo, dado que el transporte electrónico fotosintético de ambos fotosistemas depende en gran medida de la disponibilidad de sumideros (aceptores) de electrones más allá del PSI (por ejemplo, $NADP^+$, ADP más fosfato, CO_2 y O_2), los patrones cinéticos de fluorescencia de Chl *a*, evolución de O_2 y absorción de CO_2 son sólo cualitativamente similares. Es decir, no se puede utilizar el decaimiento PSMT para predecir la evolución o absorción de gases fotosintéticos o viceversa[72].

La desintegración de MT en hojas de plantas superiores y cloroplastos se ha atribuido a q_P y q_E (q_{NP} asociado a ΔpH), siendo q_E más importante a intensidades actínicas altas[89, 91, 92]. Esta asignación se basa en la desaparición de la fase MT en presencia de inhibidores del ETC como DCMU y el disipador de gradiente de pH, FCCP[93, 96].

En líneas generales, la comparación de los patrones PSMT registrados en distintas plantas superiores permite esbozar algunas generalidades con respecto al origen de estos fenómenos. La adaptación a la oscuridad general que las plantas y las algas pasen al estado 1 de alta fluorescencia. Por lo tanto, desde el inicio de la excitación continua, el patrón de fluorescencia en plantas y algas está dominado por una transición del estado 1 \rightarrow 2 que produce una disminución de la fluorescencia. Esta tendencia general se modula aún más por los procesos q_P y q_{NP} que son causados por la separación de carga primaria en el RC del PSII y el ETC subsiguiente, y la traslocación de protones dependiente de dicho transporte electrónico. Sus contribuciones relativas pueden variar dependiendo de las intensidades de la luz de excitación (que modulan, entre otros, el gradiente de pH generado)

y del tamaño de los sumideros de electrones más allá del PSI. Dado que las transiciones de estado ($1 \rightarrow 2$) son más lentas en relación con la separación de carga primaria y el transporte de electrones en el RC del PSII, los efectos de las transiciones de estado se hacen evidentes solo después de P y a veces incluso después, según la iluminación.

2.7. Fluorescencia Estacionaria

Uno de los métodos más difundidos de la fluorescencia de clorofila *a* constituye el registro del espectro de emisión del material fotosintético que previamente fue adaptado a la oscuridad por al menos 20 minutos. Dicho espectro se obtiene manteniendo la intensidad del haz incidente suficientemente baja de forma tal de evitar la inducción de la fotosíntesis, y con ella la fluorescencia variable. De esta manera se obtiene un espectro de emisión de la hoja invariante en el tiempo. La fluorescencia registrada en estas condiciones es llamada fluorescencia inicial, y se corresponde con la fluorescencia basal, F_0 , registrada también en la curva OJIP y la cinética de Kautsky.

El espectro de fluorescencia medido bajo estas condiciones a nivel del cloroplasto, de la hoja o incluso de una cobertura vegetal, presenta una distribuciónpectral caracterizada por dos bandas. Una banda se ubica en la región del rojo del espectro electromagnético, con un máximo de emisión alrededor de 685 nm y la otra se observa en la región del infrarrojo cercano, con un máximo a 735 nm aproximadamente[39, 97]. El PSI contribuye a la emisión correspondiente a la banda a 735 nm mientras que el PSII contribuye a la emisión de ambas bandas de emisión. La relación de intensidad de estas bandas (F_{685}/F_{735}) proporciona información sobre el estado fisiológico de la planta. Dado que dicho cociente es sensible a la población relativa de fotosistemas I y II presentes en la hoja, ha sido ampliamente correlacionado en la literatura con varios factores de estrés y el contenido de pigmentos[98-103]. Debido a que la banda a 685 nm cae sobre la región del rojo del espectro electromagnético y la banda a 735 nm en la region infrarroja cercana, el cociente de bandas se suele denominar comúnmente como $F_{red}/F_{far-red}$.

A pesar de proporcionar información interesante, la medición del espectro de fluorescencia de clorofila presenta una fuerte desventaja. Debido al solapamiento de los espectros de

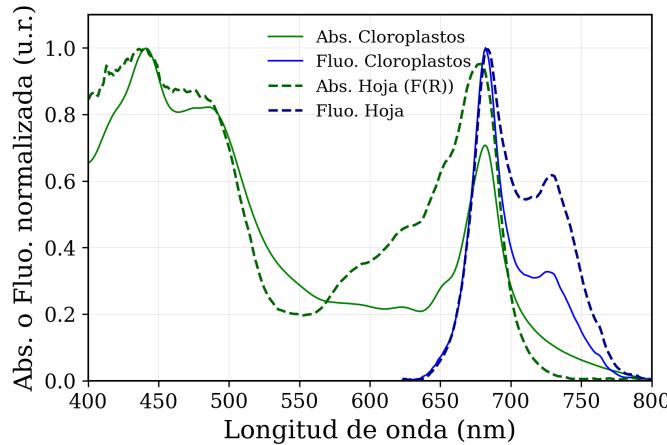


FIGURA 2.10: Espectro de absorción y fluorescencia de una muestra de cloroplastos y hoja típicas.

absorción y emisión en la región del rojo del espectro (Fig. 2.10), la fluorescencia roja es reabsorbida por otras moléculas de clorofila antes de llegar al detector. En consecuencia, la distribuciónpectral registrada está relativamente enriquecida en la región del rojo lejano, lo que conduce a subestimaciones de los cocientes de fluorescencia y todo parámetro dependiente de la intensidad relativa de las bandas. El fenómeno de reabsorción en el interior de la hoja ha sido cuidadosamente abordado por el grupo de investigación de la Dra. M. Gabriela Lagorio, entre otros, y hoy en día se dispone de un modelo y un protocolo estandarizado que permiten estimar con precisión los procesos de reabsorción y corregir dicho espectro de fluorescencia experimental[104-107]. Es importante notar que los procesos de reabsorción tienen que ser tomados en cuenta para sacar conclusiones fisiológicas apropiadas.

Para eliminar este efecto producido por la reabsorción de luz, los espectros de fluorescencia de una capa ópticamente gruesa, con transmitancia cero, se corrigieron según el modelo usado por Ramos y Lagorio [106] que se resume a continuación. Este método se ha aplicado con éxito para corregir los espectros de fluorescencia de las hojas[107, 108]), hojas con morfologías superficiales no tradicionales[109], hojas con heterogeneidad de coloración[50, 109], frutas[110, 111] y flores[112].

Corrección de fluorescencia estacionaria

El procedimiento de corrección utilizado está basado en una descripción física de la interacción de la luz con las hojas. Este modelo contempla la teoría Kubelka-Munk al considerar las hojas como un sistema que además de absorber luz, la dispersan[113]. El modelo de dos flujos tiene en cuenta las siguientes aproximaciones: i) Las hojas se comportan como un dispersor ideal, y (ii) la emisión de fluorescencia es producida en cada elemento de volumen y se descompone en dos flujos de fotones, los cuales tienen la misma magnitud pero direcciones opuestas. Un esquema que describe en líneas generales el modelo se presenta en la [Fig. 2.11](#).

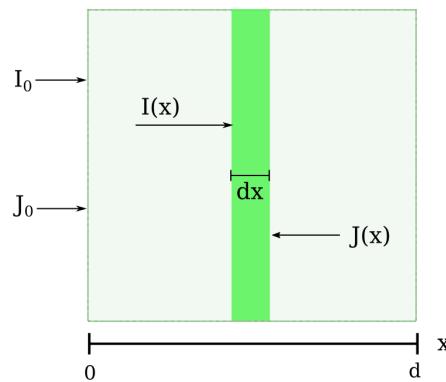


FIGURA 2.11: Representación de la capa de material absorbente y dispersante. La superficie es iluminada en $x = 0$.

El modelo fue validado en hojas comparando espectros de fluorescencia corregidos por los procesos de reabsorción con el espectro de fluorescencia de una capa delgada de cloroplastos donde los procesos de reabsorción se consideran despreciables[106]. De acuerdo con Kubelka-Munk, se consideran dos flujos, el flujo I en la misma dirección que la luz incidente y el flujo J en la dirección de la luz reflejada[113]. Ambos flujos se mueven en direcciones opuestas y perpendiculares a la superficie irradiada. La atenuación de ambos flujos está dada por:

$$dI(x) = -I(x) \cdot (k + s) dx + J(x) \cdot s dx \quad (2.35)$$

$$-J(x) = -J(x) \cdot (k + s) dx + I(x) \cdot s dx \quad (2.36)$$

donde k y s son los coeficientes de absorción y de dispersión de la muestra respectivamente.

Luego el modelo considera el balance de energía sobre la muestra, en este caso, sobre las hojas. Se supone que un haz de luz de intensidad I_0 incide directamente sobre la superficie de las hojas produciendo el siguiente balance: $I_0 = I_R + I_a + I_T$, donde I_R es la intensidad de luz reflejada y dispersada por la hoja, I_a es la intensidad de luz absorbida por las hojas e I_T es la intensidad de luz transmitida por ellas. Es condición necesaria del modelo utilizar un colchón de hojas, que impida la transmisión de luz a través de las hojas. De esta manera, $I_T = 0$ y $I_a = I_0 - I_R$ [114].

Cuando se resuelven las ecuaciones diferenciales (Ec. 2.35 y Ec. 2.36) para una capa de hojas suficientemente gruesa (transmitancia nula) y considerando además irradiación monocromática, se obtiene la siguiente ecuación:

$$F(R) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{R_\infty} = \frac{k}{s} \quad (2.37)$$

Donde, R_∞ es la reflectancia de un colchón de hojas (transmitancia cero) y $F(R)$ es la función de remisión a una dada longitud de onda de emisión y es una cantidad proporcional a la concentración de cromóforo. Esta ecuación vale únicamente si la transmitancia es menor al 1 % en todo el rango del visible, por lo que las medidas de reflectancia difusa deben corresponder a una pila de hojas. R_∞ se puede interpretar como la relación entre el flujo reflejado en la superficie y el flujo de luz incidente. La función de remisión relaciona la reflectancia medida con los coeficientes de absorción, k , y de dispersión, s , de la luz que son parámetros teóricos necesarios para el modelo a continuación[114].

Por otro lado, una muestra fluorescente también puede ser descompuesta en dos flujos de fotones (i y j). Para ello se considera que cuando un fluoróforo se encuentra en un medio dispersivo, en este caso la clorofila a de la hoja, la emisión se produce en cada elemento de volumen[113].

$$\frac{dI(x)}{dx} = -(k + s) \cdot i + s \cdot j + \frac{1}{2} \cdot f(\lambda) \cdot \Phi_f \cdot \frac{dI_a}{dx} \quad (2.38)$$

$$-\frac{dJ(x)}{dx} = -(k + s) \cdot j + s \cdot i + \frac{1}{2} \cdot f(\lambda) \cdot \Phi_f \cdot \frac{dI_a}{dx} \quad (2.39)$$

donde $\frac{dI_a}{dx}$ es el flujo diferencial de fotones absorbidos por la especie emisora, $f(\lambda)$ es la distribución espectral normalizada de la emisión y Φ_f es el rendimiento cuántico de fluorescencia verdadero. Los flujos i y j ahora son flujos de fotones emitidos por lo que (i) no hay emisión incidente a $x = 0$, es decir i es cero a $x = 0$ y (ii) no hay emisión en la última capa porque es suficientemente gruesa, es decir j vale cero al final de la capa a $x = \infty$. Con estas condiciones, e integrando las Ec. 2.38 y Ec. 2.39, se obtiene el siguiente flujo primario reemitido de radiación:

$$j(\lambda, x = 0) = \Phi_f \cdot f(\lambda) \cdot I_0 \cdot (1 - R_{\lambda_0}) \cdot \gamma(\lambda_0, \lambda) \quad (2.40)$$

$$\gamma(\lambda_0, \lambda) = \frac{1}{1 + \sqrt{\frac{F(R_\lambda)}{F(R_\lambda) + 2}}} \cdot \frac{1}{1 + \sqrt{\frac{F(R_\lambda)(F(R_\lambda) + 2)}{F(R_{\lambda_0})(F(R_{\lambda_0}) + 2)}}} \quad (2.41)$$

donde los símbolos λ y λ_0 representan las longitudes de onda de emisión y excitación, respectivamente.

En la parte derecha de la Ec. 2.40 se ve como se relaciona el espectro verdadero de las hojas (a la izquierda) con la distribución espectral normalizada de la emisión ($f(\lambda)$), el rendimiento cuántico de fluorescencia verdadero (Φ_f) y la intensidad de luz absorbida por las hojas expresada como el producto de la intensidad del haz incidente, I_0 , y la fracción de luz reflejada ($1 - R_{\lambda_0}$) [106, 114]. La función gamma es una medida de la densidad de pigmentos y las propiedades de dispersión de las hojas, al considerar tanto el coeficiente de absorción como el de dispersión. El espectro de emisión verdadero de las hojas surge entonces de dividir la fluorescencia experimental por la función $\gamma(\lambda_0, \lambda)$, que a diferencia de los parámetros a la derecha en la Ec. 2.40 es posible determinarla a partir medidas experimentales (reflectancia difusa) [107].

$$F_{\lambda_0, \lambda}^{corr} = \frac{F^{exp}}{\gamma(\lambda_0, \lambda)} \quad (2.42)$$

La condición de transmitancia nula surge de que las ecuaciones diferenciales anteriormente descriptas no tienen una solución única y sencilla a menos que el grosor de la capa dispersante y fluorescente pueda considerarse infinita.

Referencias

- (1) Harbinson, J. en *Light Harvesting in Photosynthesis*, Croce, R., van Grondelle, R., van Amerongen, H. y van Stokkum, I., eds.; CRC Press: 2018, págs. 539-571, DOI: [10.1201/9781351242899-23](https://doi.org/10.1201/9781351242899-23).
- (2) Baker, N. R. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 89-113.
- (3) Azcón-Bieto, J. y col., *Fundamentos de fisiología vegetal*; 581.1 F981f; Madrid, ES: McGraw-Hill Interamericana: 2000.
- (4) Schwartz, R. y Brown, M. H. en *Multiple representations in biological education*; Springer: 2013, págs. 203-223.
- (5) Hoober, J. K., *Chloroplasts*; Springer Science & Business Media: 2012.
- (6) Govindjee; Kern, J. F.; Messinger, J. y Whitmarsh, J. *Photosystem II*, 2010, DOI: [10.1002/9780470015902.a0000669.pub2](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000669.pub2).
- (7) Hill, R. y Bendall, F. *Nature* **1960**, *186*, 136-137.
- (8) Govindjee; Shevela, D. y Björn, L. O. **2017**, *133*, 5-15, DOI: [10.1007/s11120-016-0333-z](https://doi.org/10.1007/s11120-016-0333-z).
- (9) Walker, D. A. **2002**, *7*, 183-185, DOI: [10.1016/s1360-1385\(02\)02242-2](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02242-2).
- (10) Duke, S. y Dayan, F. en *Comprehensive Biotechnology*; Elsevier: 2011, págs. 23-35, DOI: [10.1016/b978-0-08-088504-9.00273-7](https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00273-7).
- (11) Allen, J. F. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 130-137.
- (12) Demmig-Adams, B. en *Current Research in Photosynthesis*; Springer Netherlands: 1990, págs. 1317-1324, DOI: [10.1007/978-94-009-0511-5_305](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0511-5_305).
- (13) Masojídek, J.; Kopecky, J.; Kobliéžek, M. y Torzillo, G. *Plant Biol.* **2004**, *6*, 342-349.

- (14) Brunet, C. y Lavaud, J. *J. Plankton Res.* **2010**, *32*, 1609-1617.
- (15) Demmig-Adams, B.; Koh, S.-C.; Cohu, C. M.; Muller, O.; Stewart, J. J. y Adams, W. W. en; Springer Netherlands: 2014, págs. 531-552, DOI: [10.1007/978-94-017-9032-1_24](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9032-1_24).
- (16) Goss, R. y Lepetit, B. **2015**, *172*, 13-32, DOI: [10.1016/j.jplph.2014.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004).
- (17) Niyogi, K. K. y Truong, T. B. **2013**, *16*, 307-314, DOI: [10.1016/j.pbi.2013.03.011](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.03.011).
- (18) Verhoeven, A. S.; III, W. W. A. y Demmig-Adams, B. **1999**, *118*, 277-287, DOI: [10.1007/s004420050728](https://doi.org/10.1007/s004420050728).
- (19) Adams, W. W. y Demmig-Adams, B. **1994**, *92*, 451-458, DOI: [10.1111/j.1399-3054.1994.tb08835.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb08835.x).
- (20) Shevela, D.; Björn, L. O. y col. *Photosynth. Res.* **2017**, *133*, 5-15.
- (21) Loll, B.; Kern, J.; Saenger, W.; Zouni, A. y Biesiadka, J. *Nature* **2005**, *438*, 1040-1044, DOI: [10.1038/nature04224](https://doi.org/10.1038/nature04224).
- (22) Martínez-Junza, V.; Szczepaniak, M.; Braslavsky, S. E.; Sander, J.; Nowaczyk, M.; Rögner, M. y Holzwarth, A. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1337-1343, DOI: [10.1039/b809884k](https://doi.org/10.1039/b809884k).
- (23) Latowski, D.; Kuczyńska, P. y Strzalka, K. *Redox Rep.* **2011**, *16*, 78-90, DOI: [10.1179/174329211x13020951739938](https://doi.org/10.1179/174329211x13020951739938).
- (24) Khuong, T. T. H.; Christophe, R. y Caffarri, S. *VNU J. Sci. Nat. Sci. Technol.* **2014**, *30*, 6-22.
- (25) Minagawa, J. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2011**, *1807*, 897-905, DOI: [10.1016/j.bbabi.2010.11.005](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.005).
- (26) Ball, J. y col. *Stomatal function* **1987**, 445-476.
- (27) Delieu, T. y Walker, D. *New Phytol.* **1972**, *71*, 201-225.
- (28) Walker, D. A. *Photosynth. Res.* **2002**, *73*, 51-54.
- (29) Laisk, A.; Oja, V. y Eichelmann, H. *Photosynth. Res.* **2012**, *113*, 145-155.
- (30) Driever, S. M. y Baker, N. R. *Plant, Cell & Environment* **2011**, *34*, 837-846.

- (31) Bults, G.; Horwitz, B. A.; Malkin, S. y Cahen, D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1982**, 679, 452-465.
- (32) Malkin, S.; Schreiber, U.; Jansen, M.; Canaani, O.; Shalgi, E. y Cahen, D. *Photosynth. Res.* **1991**, 29, 87-96.
- (33) Cerovic, Z. G.; Bergher, M.; Goulas, Y.; Tosti, S. y Moya, I. *Photosynth. Res.* **1993**, 36, 193-204.
- (34) Kalaji, H. M. y col. *Photosynth. Res.* **2014**, 122, 121-158, DOI: [10.1007/s11120-014-0024-6](https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6).
- (35) Lagorio, M. G. en *Chlorophyll Struct. Prod. Med. Uses*; Nova Science Publishers New York: 2011, págs. 115-150.
- (36) Kautsky, H.; Appel, W. y Amann, H. *Biochemische Zeitschrift* **1960**, 332, 277-292.
- (37) Stirbet, A. y Govindjee *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2011**, 104, 236-257, DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010).
- (38) Stirbet, A. y Govindjee en *Photosynth. Res.* 2012; vol. 113, págs. 15-61, DOI: [10.1007/s11120-012-9754-5](https://doi.org/10.1007/s11120-012-9754-5).
- (39) Pfundel, E. *Photosynth. Res.* **1998**, 56, 185-195.
- (40) Schansker, G.; Tóth, S. Z. y Strasser, R. J. *BBA - Bioenerg.* **2006**, 1757, 787-797, DOI: [10.1016/j.bbabi.2006.04.019](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.019).
- (41) Björkman, O. y Demmig, B. *Planta* **1987**, 170, 489-504.
- (42) Weis, E. y Lechtenberg, D. *Philos. Trans. R. Soc. . B, Biological Sciences* **1989**, 323, 253-268.
- (43) Ptushenko, V. V.; Ptushenko, E. A.; Samoilova, O. P. y Tikhonov, A. N. *Biosystems* **2013**, 114, 85-97.
- (44) Guadagno, C.; Santo, A. V. D. y D'Ambrosio, N. *BBA - Bioenerg.* **2010**, 1797, 525-530, DOI: [10.1016/j.bbabi.2010.01.016](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.016).
- (45) Matuszyńska, A.; Heidari, S.; Jahns, P. y Ebenhöh, O. *BBA - Bioenergetics* **2016**, 1857, 1860-1869.
- (46) Torres, R.; Romero, J. y Lagorio, M. *J. Photochem. Photobiol., B* **2021**, 218, 112182, DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2021.112182](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112182).

- (47) Kramer, D. M.; Johnson, G.; Kuirats, O. y Edwards, G. E. **2004**, *79*, 209-218, DOI: [10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d](https://doi.org/10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d).
- (48) Porcar-Castell, A.; Juurola, E.; Nikinmaa, E.; Berninger, F.; Ensminger, I. y Hari, P. *Tree Physiol.* **2008**, *28*, 1475-1482.
- (49) Baker, N. R. y Oxborough, K. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer Netherlands, págs. 65-82, DOI: [10.1007/978-1-4020-3218-9_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_3).
- (50) Calvo, B. O. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol.* **2019**, *95*, 1360-1368, DOI: [10.1111/php.13149](https://doi.org/10.1111/php.13149).
- (51) Maxwell, K. y Johnson, G. N. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 659-668, DOI: [10.1093/jexbot/51.345.659](https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659).
- (52) Dai, Y.; Shen, Z.; Liu, Y.; Wang, L.; Hannaway, D. y Lu, H. **2009**, *65*, 177-182, DOI: [10.1016/j.envexpbot.2008.12.008](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.008).
- (53) Papageorgiou, G. C. y col. *J. Photochem. Photobiol., B* **2011**, *104*, 258-270.
- (54) Duysens, L. N. M. y Sweers, H. E. Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence, 1963.
- (55) Strasser, R. J.; Srivastava, A. y Tsimilli-Michael, M. *Photosynth. Res.* **2004**, 445-483.
- (56) Joliot, P. y Joliot, A. *Photosynth. Res.* **2003**, *76*, 241-245.
- (57) Butler, W. L. **1972**, *69*, 3420-3422, DOI: [10.1073/pnas.69.11.3420](https://doi.org/10.1073/pnas.69.11.3420).
- (58) Vredenberg, W. J. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer: 2004, págs. 133-172, DOI: [10.1007/978-1-4020-3218-9_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_6).
- (59) Vernotte, C.; Etienne, A. y Briantais, J.-M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1979**, *545*, 519-527.
- (60) Jiang, C.-D.; Jiang, G.-M.; Wang, X.; Li, L.-H.; Biswas, D. y Li, Y.-G. *Environ. Exp. Bot.* **2006**, *58*, 261-268.
- (61) Bednáříková, M.; Folgar-Camean, Y.; Kučerová, Z.; Lazár, D.; Špundová, M.; Hájek, J. y Barták, M. *Photosynthetica* **2020**, *58*, 646-656.
- (62) Zushi, K.; Kajiwara, S. y Matsuzoe, N. *Sci. Hortic.* **2012**, *148*, 39-46.

- (63) Gomes, M. T. G.; da Luz, A. C.; dos Santos, M. R.; do Carmo Pimentel Batitucci, M.; Silva, D. M. y Falqueto, A. R. *Sci. Hortic.* **2012**, *142*, 49-56, DOI: [10.1016/j.scienta.2012.04.026](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.04.026).
- (64) Zivcak, M.; Breštic, M.; Kalaji, H. M. y Govindjee *Photosynth. Res.* **2014**, *119*, 339-354, DOI: [10.1007/s11120-014-9969-8](https://doi.org/10.1007/s11120-014-9969-8).
- (65) Jiang, H.-X.; Chen, L.-S.; Zheng, J.-G.; Han, S.; Tang, N. y Smith, B. R. *Tree Physiol.* **2008**, *28*, 1863-1871.
- (66) Strauss, A.; Krüger, G.; Van Heerden, P.; Pienaar, J.; Weissflog, L. y Musil, C. S. *Afr. J. Bot.* **2004**, *70*, 751-759.
- (67) Kalaji, H. M.; Govindjee; Bosa, K.; Kościelniak, J. y Żuk-Gołaszewska, K. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 64-72, DOI: [10.1007/978-3-642-32034-7_164](https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_164).
- (68) Zivcak, M.; Breštic, M.; Kunderlikova, K.; Olsovská, K. y Allakhverdiev, S. I. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *152*, 318-324, DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2015.08.024](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.024).
- (69) Kalaji, H. M.; Oukarroum, A.; Alexandrov, V.; Kouzmanova, M.; Breštic, M.; Zivcak, M.; Samborska, I. A.; Cetner, M. D.; Allakhverdiev, S. I. y Goltsev, V. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *81*, 16-25.
- (70) Guo, Y. y Tan, J. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 1-14.
- (71) Stirbet, A.; Riznichenko, G. Y.; Rubin, A. y col. *Biochemistry (Moscow)* **2014**, *79*, 291-323.
- (72) Papageorgiou, G. C.; Tsimilli-Michael, M. y Stamatakis, K. *Photosynthesis Research* **2007**, *94*, 275-290, DOI: [10.1007/s11120-007-9193-x](https://doi.org/10.1007/s11120-007-9193-x).
- (73) Demmig-Adams, B.; Adams III, W. W.; Barker, D. H.; Logan, B. A.; Bowling, D. R. y Verhoeven, A. S. *Physiol. Plant.* **1996**, *98*, 253-264.
- (74) Srivastava, A.; Strasser, R. J. y col. *Photosynthetica* **1999**, *37*, 365-392.
- (75) Goldman, D. E. *The Journal of general physiology* **1943**, *27*, 37-60.
- (76) Shapcott, A.; Schmidt, S.; Critchley, C. y col. *Photosynth. Res.* **2007**, *94*, 423-436.
- (77) Christen, D.; Schönmann, S.; Jermini, M.; Strasser, R. J. y Défago, G. *Environ. Exp. Bot.* **2007**, *60*, 504-514, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.02.003>.

- (78) Ceusters, N.; Valcke, R.; Frans, M.; Claes, J. E.; Van den Ende, W. y Ceusters, J. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1-15, DOI: [10.3389/fpls.2019.01012](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01012).
- (79) Barber, J. *Photosynth. Res.* **2004**, *80*, 137-155.
- (80) Barber, J.; Telfer, A. y Nicolson, J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1974**, *357*, 161-165.
- (81) Krause, G. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1974**, *333*, 301-313.
- (82) Gilmore, A. M. *Physiol. Plant.* **1997**, *99*, 197-209, DOI: [10.1111/j.1399-3054.1997.tb03449.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03449.x).
- (83) Haldimann, P. y Tsimilli-Michael, M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2005**, *1706*, 239-249.
- (84) Allen, J. F. y Mullineaux, C. W. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer: 2004, págs. 447-461.
- (85) Golan, T.; Li, X.-P.; Muller-Moule, P. y Niyogi, K. K. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer: 2004, págs. 525-554.
- (86) Niyogi, K. K.; Grossman, A. R. y Björkman, O. *The plant cell* **1998**, *10*, 1121-1134.
- (87) Finazzi, G.; Johnson, G. N.; Dallusto, L.; Joliot, P.; Wollman, F.-A. y Bassi, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 12375-12380.
- (88) Allen, J. F. y Forsberg, J. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 317-326.
- (89) Bradbury, M. y Baker, N. R. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1984**, *765*, 275-281.
- (90) Bradbury, M. y Baker, N. R. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1981**, *635*, 542-551.
- (91) Sivak, M.; Heber, U. y Walker, D. *Planta* **1985**, *163*, 419-423.
- (92) Horton, P. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1983**, *724*, 404-410.
- (93) Bannister, T. y Rice, G. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1968**, *162*, 555-580.
- (94) Walker, D. A.; Sivak, M. N.; Prinsley, R. T. y Cheesbrough, J. K. *Plant Physiol.* **1983**, *73*, 542-549.
- (95) Ireland, C.; Long, S. y Baker, N. *Planta* **1984**, *160*, 550-558.

- (96) Papageorgiou, G. y col. *Biophys. J.* **1968**, *8*, 1316-1328.
- (97) Franck, F.; Juneau, P. y Popovic, R. *BBA - Bioenergetics* **2002**, *1556*, 239-246.
- (98) Lichtenthaler, H. K. y Rinderle, U. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1988**, *19*, S29-S85.
- (99) Lichtenthaler, H. K.; Hak, R. y Rinderle, U. *Photosynth. Res.* **1990**, *25*, 295-298.
- (100) Singh, S.; Dube, A. y Gupta, P. *Pure and Applied Optics: Journal of the European Optical Society Part A* **1998**, *7*, L39.
- (101) Agati, G. *Pure and Applied Optics: Journal of the European Optical Society Part A* **1998**, *7*, 797.
- (102) Agati, G.; Cerovic, Z. G. y Moya, I. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 75-84.
- (103) Peterson, R. B.; Oja, V. y Laisk, A. *Photosynth. Res.* **2001**, *70*, 185-196.
- (104) Agati, G.; Fusi, F.; Mazzinghi, P. y di Paola, M. L. *J. Photochem. Photobiol., B* **1993**, *17*, 163-171.
- (105) Gitelson, A. A.; Buschmann, C. y Lichtenthaler, H. K. *J. Plant Physiol.* **1998**, *152*, 283-296.
- (106) Ramos, M. E. y Lagorio, M. G. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 1063-1066, DOI: [10.1039/b406525e](https://doi.org/10.1039/b406525e).
- (107) Cordón, G. B. y Lagorio, M. G. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2006**, *5*, 735-740.
- (108) Iriel, A.; Dundas, G.; Cirelli, A. F. y Lagorio, M. G. *Chemosphere* **2015**, *119*, 697-703.
- (109) Cuba, N. I.; Torres, R.; San Román, E. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol.* **2020**, DOI: [10.1111/php.13273](https://doi.org/10.1111/php.13273).
- (110) Novo, J. M.; Iriel, A. y Lagorio, M. G. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, *11*, 724-730.
- (111) Ospina Calvo, B.; Parapugna, T. L. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16*, 711-720, DOI: [10.1039/c6pp00475j](https://doi.org/10.1039/c6pp00475j).
- (112) Iriel, A. y Lagorio, M. G. **2009**, *8*, 337, DOI: [10.1039/b814461c](https://doi.org/10.1039/b814461c).
- (113) Lagorio, M. G.; Dicelio, L. E.; Litter, M. I. y San Román, E. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, *94*, 419-425.

- (114) Lagorio, M. G. y Román, E. S. *Journal of Chemical Education* **2002**, *79*, 1362-1367,
DOI: [10.1021/ed079p1362](https://doi.org/10.1021/ed079p1362).

Metodología Experimental

El objetivo de este capítulo es introducir la metodología experimental utilizada en esta tesis para los distintos ensayos llevados a cabo. Se describen en detalle los protocolos de medición tanto para el análisis espectroscópico y fotoquímico del material vegetal y sistemas híbridos, como para la caracterización de las nanopartículas. Por último, se presentan los métodos estadísticos utilizados en esa tesis para evaluar las diferencias entre muestras y controles, según corresponda. Se incluyen también, en algunos casos, marcos teóricos breves, con el objetivo de relacionar la metodología asociada a la técnica con los parámetros que se derivan de ella.

3.1. Crecimiento de plantas

Las plantas utilizadas en esta tesis, se obtuvieron por siembra de semillas en un bioterio sencillo armado en los laboratorios. Se prefirió esta modalidad (frente a la compra directa de plantas en vivero) para conocer con precisión la edad de las plantas. Adicionalmente, se aseguró de este modo, que no hubiesen estado expuestas a pesticidas, herbicidas o diferentes condiciones de crecimiento. Estos aspectos se cuidaron especialmente ya que diferencias mínimas durante el desarrollo de las plantas pueden conducir a diferencias significativas en sus parámetros fotosintéticos. Se eligieron especies de plantas que contaran con hojas de buen tamaño, sin rugosidades o características morfológicas peculiares, de forma tal de facilitar las mediciones espectroscópicas. Las semillas se sembraron en tierra abonada, y luego de varias semanas, una vez alcanzado un tamaño adecuado, se transplantaron los plantines a macetas individuales.

Se construyeron dos cajas de aclimatación utilizando lámparas del mismo tipo y potencia, pero con diferente número de lámparas (Fig. 3.1). Dependiendo del experimento en

cuestión, se utilizaron una o las dos cajas de aclimatación, con una capacidad de 10 plantines cada una. Las irradiancias medias, obtenidas utilizando un medidor de energía, *Field Master, Coherent*, fueron de 25 (baja) y 300 (media) $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ambas cámaras contaron con la misma distribución espectral y un fotoperíodo de 12 a 16 horas, según requerimiento de la especie de trabajo. Se requirieron de dos a tres meses de desarrollo para que las plantas adquiriesen un tamaño y un número de hojas adecuado para el inicio de los experimentos. Previamente se registraron algunos parámetros fotosintéticos generales de modo de asegurar que la capacidad fotosintética de las plantas fuera máxima, lo cual es indicio de una buena salud general como punto de partida.

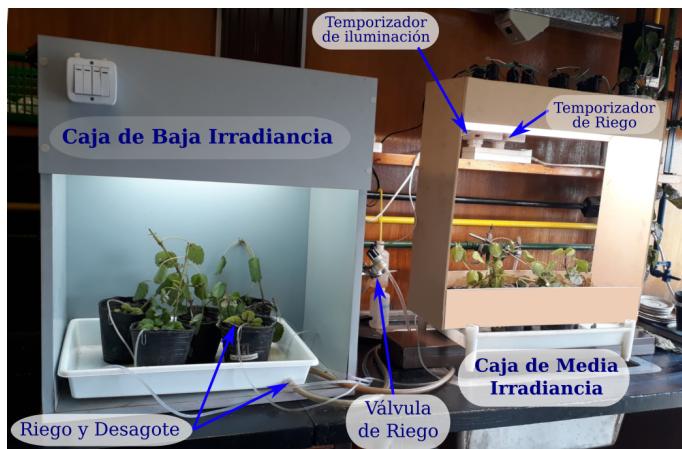
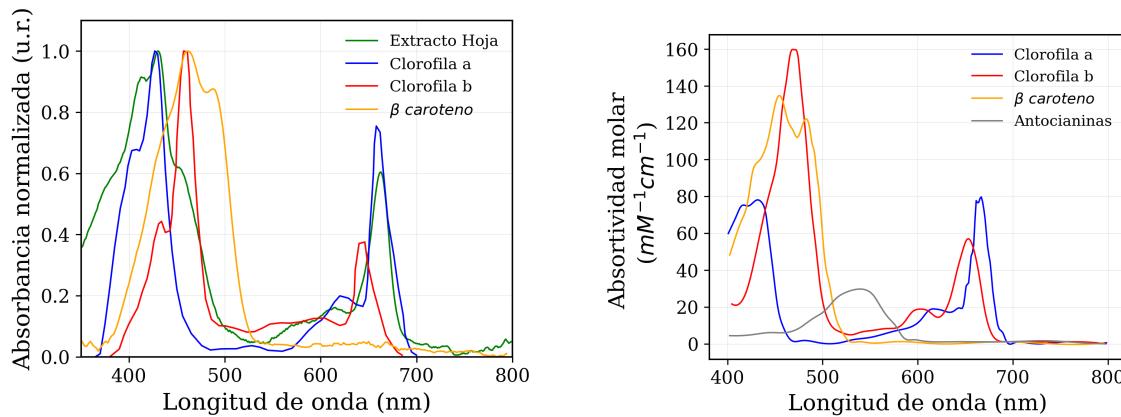


FIGURA 3.1: Bioterio básico diseñado. La iluminación de ambas cajas poseen la misma distribución espectral pero se diferencian en la intensidad.

3.2. Espectros de absorción de pigmentos

Los extractos de hojas verdes contienen una mezcla de pigmentos entre los que se destacan, **Chl a**, **Chl b**, y carotenoides (**Cars**). Los espectros de absorción de estos extractos se caracterizan por la absorción de Chl *a* y Chl *b* en la zonas azul y roja del espectro electromagnético (Fig. 3.2A), mientras que los carotenoides absorben ampliamente en la región de azul (400 a 500 nm). La determinación del contenido de pigmentos se realiza habitualmente por espectrofotometría, sobre extractos del material vegetal en acetona 80 % en volumen. Una muestra de planta homogeneizada con un solvente orgánico suele ser turbia y debe filtrarse o centrifugarse para obtener una solución completamente transparente (ver Sección 3.3). La turbidez y la dispersión de la luz conducen a una mayor

absorción entre 400 y 800 nm, con un aumento leve pero continuo hacia longitudes de onda más corta. Esta es una condición necesaria para evitar sobreestimación en la cuantificación de pigmentos, especialmente para Chl *b* y Cars. La ausencia de turbidez se puede comprobar midiendo la absorbancia a 750 nm y 520 nm. Para un extracto de pigmento de hoja completamente transparente, la absorbancia a 750 nm debe ser igual a cero, ya que las clorofillas y los carotenoides no absorben en esta región. Las lecturas de absorbancia a 520 nm para extractos de tejido vegetal verde deben ser menores al 10 % de la máxima absorbancia asociada a las clorofillas en el rojo cerca de 670 nm (en acetona 80 %), como se muestra en Fig. 3.2A.



A Espectros de absorción de un extracto de hoja en acetona 80 % y espectros de clorofillas y carotenoides totales puros.

B Espectros de absorción de los principales pigmentos de las hojas. Los espectros se trazaron en términos de coeficiente de extinción molar. Los máximos se ajustaron a los valores reportados por Lichtenhaller (1987)[1].

FIGURA 3.2: Espectros de absorción típicos y absorbividades de clorofilas y carotenoides de un extracto de hoja.

Las absorbividades molares de los principales pigmentos fotosintéticos que se presentan en la Fig. 3.2 B, han sido primeramente determinados por Lichtenhaller y cols.[1]. A partir de ellos y de los valores de absorbancia a distintas longitudes de onda, es posible obtener las ecuaciones que permiten la determinación de la concentración de carotenoides totales, Chl *a* y Chl *b* en la solución del extracto de tejido verde.

3.3. Cuantificación de pigmentos

La cuantificación espectroscópica de pigmentos, utilizada en la tesis, se basó en la ley de Lambert-Beer, que relaciona la absorbancia de una solución con la concentración de

cromóforos.

La determinación del contenido de pigmentos de una muestra de hojas se realizó de la siguiente manera. Las muestras de hojas se lavaron con agua destilada y se eliminaron los nervios y pecíolos. Los pigmentos vegetales fotosintéticos, clorofillas y carotenos, se extrajeron con acetona al 80 % v/v en agua, utilizando un mortero. Los extractos se filtraron utilizando un embudo y papel de filtro, y se centrifugaron durante 3 a 5 minutos a 3000 RPM hasta que el sobrenadante fue completamente transparente. Una extracción exitosa se identifica claramente por el color marrón (no verdoso) de los restos vegetales en el papel de filtro (Fig. 3.3 B). El sobrenadante, se trasvasó cuantitativamente a un matraz apropiado, el cual se enrasó con acetona al 80 % (Fig. 3.3 C). Luego, se tomó una alícuota de esa solución y se registró el espectro de absorbancia en el momento para evitar degradación de los pigmentos por luz ambiental. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz (UV-3600 Plus, Shimadzu, Tokio, Japón) con cubetas de cuarzo, de 1 cm de paso óptico, y se registró la absorbancia entre 200 y 800 nm. Se obtuvieron las concentraciones de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*) y carotenoides totales (Cars), de acuerdo a Lichtenthaler y Buschmann[2], utilizando las siguientes ecuaciones, donde A_i refiere a la absorbancia registrada a la longitud de onda *i*.

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 12,25 \cdot A_{663 \text{ nm}} - 2,79 \cdot A_{647 \text{ nm}} \quad (3.1)$$

$$\text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 21,50 \cdot A_{647 \text{ nm}} - 5,10 \cdot A_{663 \text{ nm}} \quad (3.2)$$

$$\text{Car. totales } (\mu\text{g mL}) = \frac{1000 \cdot A_{470 \text{ nm}} - 1,82 \cdot \text{Chl } a - 85,02 \cdot \text{Chl } b}{198} \quad (3.3)$$



A Recortes de hojas previo extracción de pigmentos y cálculo de área foliar.



B Residuos vegetales luego de la extracción de pigmentos.



C Soluciones finales de los extractos vegetales.

FIGURA 3.3: Imágenes que muestran un procedimiento típico de extracción de pigmentos.

La concentración de clorofillas se puede cuantificar con diferentes sistemas de unidades.

Usualmente, se expresan en: $mg \text{ Chl} \cdot m^{-2}$ de área foliar (ó $\mu g \text{ Chl} \cdot cm^{-2}$ de área foliar), $\mu g \text{ Chl} \cdot g^{-1}$ de peso seco y $mg \text{ Chl} \cdot g^{-1}$ de peso fresco (menos adecuado que el peso seco). En bibliografía se reportan estos valores mayoritariamente por área foliar, y no por peso seco o fresco. Si los grupos estudiados no difieren visiblemente en el tamaño de las hojas, la referencia más apropiada es por área foliar.

El área foliar de las hojas que posteriormente se utilizó para extraer los pigmentos, se determinó adquiriendo imágenes con un celular personal con cámara, junto a una referencia como podría ser una regla o algún objeto de longitud conocida (Fig. 3.3 A). A continuación, se procesaron estas imágenes con el programa *Image J*. Para ello, se ajustó la escala utilizando la referencia, se aplicó un *threshold* apropiado y se calculó el área total de las hojas. Por último, se determinaron los cocientes en peso de los pigmentos, Chl *a/b* y Chls/Cars.

3.4. Reflectancia de hojas

La reflectancia de las hojas medida a longitudes de onda desde el visible al infrarrojo (400 - 2500 nm) está controlada por diversas variables bioquímicas y físicas, que incluyen clorofila y otros pigmentos de las hojas, nitrógeno total, agua y la estructura interna y superficial de las hojas[3]. Las características de absorción específicas para los pigmentos y otros compuestos en plantas individuales dominan en el visible (400-700 nm) mientras que a longitudes de onda larga (SWIR, 1500-2500 nm) se presentan bandas características de absorción determinadas por las propiedades vibratorias y rotacionales de las moléculas presentes, fundamentalmente agua (Fig. 3.4).

Como la absorbancia de los pigmentos en el infrarrojo cercano (NIR, 750–1300 nm) es baja, la reflectancia en esa zona está controlada por la estructura interna de la hoja[4]. La reflectancia NIR está controlada por la relación entre la superficie celular del mesófilo y los espacios de aire intercelulares, debido a las discontinuidades refractivas entre estos espacios de aire y las paredes celulares[5, 6]. Esta dependencia de la estructura conduce a diferencias en la reflectancia NIR entre diferentes especies vegetales, según su tipo de hoja tanto por su grosor como por su composición[3, 7, 8]. Los efectos del contenido de cloro-

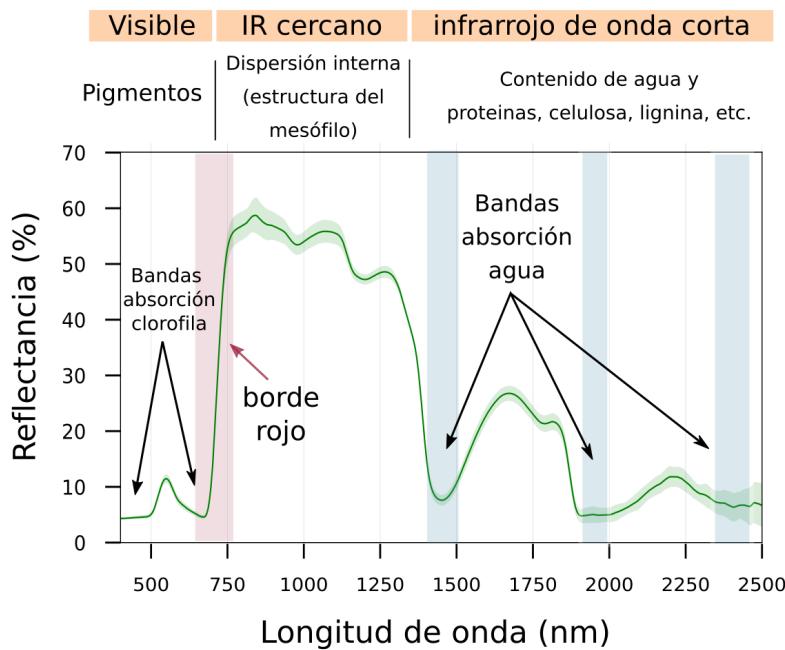


FIGURA 3.4: Espectro de reflectancia esquemático de una hoja verde típica (400–2500 nm).

fila sobre las propiedades ópticas de las hojas son los más investigados, debido a su papel fundamental en las reacciones de captación de luz de la fotosíntesis y su importancia fisiológica general. En la mayoría de las especies de plantas, los pigmentos de clorofila tienen el efecto más fuerte sobre la reflectancia visible de las hojas. Los espectros de absorción de la clorofila *a* y *b* se muestran en la Fig. 3.2B junto con los espectros de carotenoides (β -caroteno) y antocianinas. La clorofila absorbe fuertemente en las regiones espectrales del rojo (650-700 nm) y azul (400-500 nm), con absorbancia máxima entre 660 y 680 nm y reflectancia máxima en longitudes de onda del verde (560 nm), lo que explica el color verde de la vegetación. Sin embargo, la absorción superpuesta de la presencia de carotenoides en longitudes de onda azules a menudo impide que esta región sea útil en la estimación del contenido de clorofila[9]. Las antocianinas tienen un máximo de absorción en aproximadamente 530 nm, reflejando fuertemente luz de longitudes de onda largas (rojo).

3.5. Índices espectrales

Los índices espectrales de vegetación son parámetros ampliamente utilizados para recuperar el contenido de pigmentos a partir de datos de reflectancia. Resultan muy útiles en

la industria agrícola en la cual se utilizan imágenes satelitales para estimar el contenido de clorofila de distintos cultivos[10].

El índice **NDVI** (índice de vegetación de diferencia normalizada) presentado en la [Ec. 3.4](#), es uno de los índices más utilizados para monitorear el porcentaje de cobertura verde en un área, aunque esta relación es en gran parte empírica[11]. En algunos casos, se ha demostrado que el NDVI se correlaciona bien con la producción primaria neta[12] y las tasas fotosintéticas[13]. Sin embargo, el NDVI logra detectar cambios a largo plazo en la fotosíntesis. Aunque también se han detectado cambios menores en el NDVI debido a variaciones en el tamaño de la reserva de pigmentos[14, 15], este índice se muestra relativamente insensible a cambios sutiles o tempranos en la fotosíntesis[16].

$$NDVI = \frac{R_{800 \text{ nm}} - R_{680 \text{ nm}}}{R_{800 \text{ nm}} + R_{680 \text{ nm}}} \quad (3.4)$$

Se han propuesto también correcciones para este índice de modo de mejorar su correlación con el contenido de clorofilas, al reducir su dependencia con la estructura de la hoja. Sims y Gamon[9] propusieron un índice NDVI corregido en el rojo lejano, al cual llamaron *mND₇₀₅* pero que actualmente es más conocido como **mNDVI** (NDVI modificado).

$$mNDVI = \frac{R_{750 \text{ nm}} - R_{705 \text{ nm}}}{R_{750 \text{ nm}} + R_{705 \text{ nm}} - 2 \cdot R_{445 \text{ nm}}} \quad (3.5)$$

Si bien la mayoría de las investigaciones se han concentrado en la aplicación de índices de vegetación o métodos estadísticos para determinar el contenido de clorofila, algunos estudios también han investigado el modelado de carotenoides foliares de esta manera[17, 18]. Los principales desafíos para modelar el contenido de carotenoides a partir de índices espectrales, es la gran superposición en los espectros de absorción de clorofila y carotenoides ([Fig. 3.2 B](#)), junto con la concentración relativamente baja de carotenoides en las hojas, a excepción de situaciones particulares de estrés ó senescencia de las mismas. Gil-telson y cols.[18] encontraron que la sensibilidad de la reflectancia recíproca al contenido de carotenoides alcanza su punto máximo a 510 nm. En consecuencia, los autores formularon el índice de reflectancia de carotenoides, donde se utilizaron bandas a 550 nm y 700

nm para minimizar la influencia del contenido de clorofila. Años más tarde, Hernández-Clemente y cols.[19], corrigieron dichas bandas por otras cercanas con mayor sensibilidad

$$PRI = \frac{R_{531 \text{ nm}} - R_{570 \text{ nm}}}{R_{531 \text{ nm}} + R_{570 \text{ nm}}} \quad (3.6)$$

El índice **PRI** estima el contenido de carotenoides foliares, por ende también detecta las fluctuaciones a corto plazo en el ciclo de la xantófilas. De esta forma, mediante el registro del índice **PRI** se pueden observar respuestas fotoprotectoras asociadas al ciclo de xantófilas, ya que la función principal de los carotenoides es la fotoprotección. Como se comentó en el [Capítulo 2](#), altas irradiancias provocan una fuerte acidificación en el lumen del cloroplasto, lo que desencadena la conversión de violaxantina (Vx) en zeaxantina (Zx) (más detalles en [Subsección 2.1.4](#)). Estos cambios en la composición de los carotenoides se traduce en cambios en la reflectancia a 531 nm y por ende en variaciones del **PRI**[20]. Se ha demostrado que este índice está estrechamente relacionado con las proporciones estacionales entre carotenoides y clorofila, y con la fotosíntesis de las plantas[21, 22]. Sin embargo, también se encontró que el **PRI** se ve muy afectado por variaciones estructurales[23, 24] por lo que tampoco es recomendable utilizarlo para comparar diferentes especies o bien, regiones con muy diferente espesor de cobertura vegetal.

Por último, es posible calcular índices específicos para clorofila a ($PSND_a$, en la [Ec. 3.7](#)) y clorofila b ($PSND_b$ en la [Ec. 3.8](#)). Cada índice utiliza en su cálculo, una banda de infrarrojo cercano (800 nm) que minimiza los efectos de las interacciones de la radiación en la superficie de la hoja y las estructuras internas del mesófilo, como sugirieron Peñuelas y cols.[25]. Las longitudes de onda de 675 y de 650 nm corresponden a los máximos de absorción de Chl *a* y Chl *b* respectivamente, y se emplean en el cálculo siguiendo la sugerencia de Chapelle[26]. De esta manera, los índices proporcionan una medida de la intensidad de absorción del pigmento en las hojas relativa a la meseta del infrarrojo cercano altamente reflectante. Blackburn[27] ha encontrado que existen relaciones fuertes y exponenciales entre $PSND_a$ y Chl *a* ($R^2 = 0,90$) y $PSND_b$ y Chl *b* ($R^2 = 0,91$).

$$PSND_a = \frac{R_{800 \text{ nm}} - R_{675 \text{ nm}}}{R_{800 \text{ nm}} + R_{675 \text{ nm}}} \quad (3.7)$$

$$PSND_b = \frac{R_{800 \text{ nm}} - R_{650 \text{ nm}}}{R_{800 \text{ nm}} + R_{650 \text{ nm}}} \quad (3.8)$$

Luego, en la región del infrarrojo de onda corta, SWIR, las bandas de absorción de agua están ubicadas en 1450 y 1950 nm, con características más débiles presentes en 980 y 1150 nm, tal como se indica en la [Fig. 3.4](#). Sin embargo, variaciones asociadas al contenido de agua también pueden manifestarse en el visible y en el NIR [7]. Esto probablemente se deba a la descomposición de los pigmentos inducida por el estrés, por ejemplo, en el espectro visible, y los cambios en las propiedades refractivas de las células en el mesófilo que afectan la dispersión interna en el NIR.

Se utilizaron tres índices de relación simple asociados con el contenido de agua, el índice de agua (WI, en la [Ec. 3.9](#))[28], el índice de agua de la hoja (LWI, en la [Ec. 3.10](#))[29] y el índice de estrés por humedad (MSI, en la [Ec. 3.11](#))[30]. Todos ellos utilizan las bandas principales de absorción del agua a 970, 1200, 1450 y 1950 nm[31]. En líneas generales, estos índices de agua se basan en una relación entre la reflectancia a una longitud de onda de referencia donde el agua no absorbe y una longitud de onda donde el agua absorbe. Por último, un índice análogo al NDVI para clorofilas, es el índice de diferencia normalizada de agua (NDWI, en la [Ec. 3.12](#))[32]. A diferencia de los demás índices de agua simples, en el NDWI se normaliza la diferencia de las reflectancias a una longitud de onda donde el agua absorbe y otra en donde no.

$$WI = \frac{R_{900 \text{ nm}}}{R_{970 \text{ nm}}} \quad (3.9)$$

$$LWI = \frac{R_{1300 \text{ nm}}}{R_{1450 \text{ nm}}} \quad (3.10)$$

$$MSI = \frac{R_{1600 \text{ nm}}}{R_{820 \text{ nm}}} \quad (3.11)$$

$$NDWI = \frac{R_{857 \text{ nm}} - R_{1241 \text{ nm}}}{R_{857 \text{ nm}} + R_{1241 \text{ nm}}} \quad (3.12)$$

Los espectros de reflectancia difusa se registraron para una capa ópticamente gruesa compuesta por varias hojas (4 - 5 hojas) de modo que la transmitancia fue ≈ 0 en toda la

región del visible. Para ello se usó un espectrofotómetro (3101PC, Shimadzu, Tokio, Japón) equipado con una esfera integradora (Shimadzu ISR-3100), para lo cual se utilizó sulfato de bario para ajustar el 100 % de reflectancia. La corrección por línea de base se realizó colocando el sulfato de bario en la posición de muestra y en la posición de referencia. Luego, se retiró el sulfato de bario de la posición de muestra y en su lugar se colocaron las hojas o colchones de hojas para determinar los espectros de reflectancia difusa. Los espectros de transmitancia se realizaron manteniendo los portamuestras con sulfato de bario tanto en la posición de muestra como en la posición de referencia y colocando las hojas en la ventana de entrada de la esfera.

3.6. Fluorescencia estacionaria de hojas intactas

El registro de la distribución espectral de la fluorescencia inicial, se llevó a cabo en forma estacionaria sobre la cara adaxial de las hojas usando un espectrofluorómetro *QuantaMaster 400, PTI-Photon Technology International-Brunswick, EE. UU.*, en geometría de *front face* con un ángulo de 60 °. Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente sobre hojas recién cortadas y adaptadas 20 minutos a la oscuridad. Las hojas fueron previamente cortadas y lavadas, y luego dispuestas en un recipiente con un pequeño trozo de algodón humedecido con agua Milli-Q para evitar que se secan durante el tiempo de la medición. De forma de obtener una capa suficientemente gruesa con transmitancia nula, se registraron los espectros de fluorescencia de una pila de dos o tres hojas. La longitud de onda de excitación se estableció en 460 nm (máximo en los espectros de excitación). Los espectros de emisión se registraron entre 600 y 800 nm y se corrigieron mediante la respuesta del detector a cada longitud de onda. El flujo de fotones utilizado fue inferior a $20 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en todos los casos, evitando la inducción de la fluorescencia variable. De esta forma, todos los aceptores de electrones pueden considerarse abiertos y la fluorescencia medida corresponde a la fluorescencia inicial (F_0). Para lograr estas condiciones, se utilizó una apertura del monocromador de excitación de 0,25 - 0,50 mm que corresponde a 1 - 2 nm, de modo que la distribución espectral de las hojas fuera invariable después de repetidos registros de los espectros de fluorescencia. Este procedimiento se realizó para 5 ó 6 hojas por planta y muestra.

Para corregir los espectros por procesos de reabsorción de luz, se registraron los espectros de reflectancia y transmitancia, utilizando un espectrofotómetro (3101PC, Shimadzu, Tokio, Japón) equipado con una esfera integradora (Shimadzu ISR-3100). Se utilizó sulfato de bario para el ajuste del 100 % de reflectancia. Los espectros de reflectancia y transmitancia se obtuvieron en el intervalo de 400 a 800 nm. El registro de la transmitancia se realizó para corroborar muestra a muestra, que la misma estuviese por debajo del 1 % lo cual es requisito para la validez del modelo de corrección por reabsorción de luz.

3.7. Fluorescencia estacionaria en solución

El registro de la emisión fluorescente de soluciones o suspensiones se llevó a cabo en una cubeta de 1 cm de paso óptico en geometría de 90 grados utilizando un espectrofluorómetro *QuantaMaster 400, PTI, (EE.UU.)*. Cuando la concentración de los cromóforos en solución es demasiado alta, no es posible asumir una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de cromóforo, y es necesario corregir los espectros de fluorescencia obtenidos. La intensidad de fluorescencia medida es proporcional a la absorbancia del cromóforo y por ende a su concentración, solo hasta una absorbancia de 0,05. Estas intensidades distorsionadas pueden corregirse aproximadamente por los efectos del filtro interno de la siguiente manera. Dada una muestra que posee una absorbancia significativa en las longitudes de onda de excitación y emisión, A_{ex} y A_{em} , respectivamente, se produce una atenuación de la excitación y la emisión en $10^{-0,50A_{ex}}$ y $10^{-0,50A_{em}}$, respectivamente[33]. La atenuación debida a la absorción de la luz incidente se suele denominar efecto de filtro interno primario, y la absorción de la luz emitida se denomina efecto de filtro interno secundario. Finalmente, la intensidad de fluorescencia corregida viene dada aproximadamente por:

$$F_{corr} = F_{exp} \cdot 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \quad (3.13)$$

Por lo tanto, los espectros de fluorescencia experimentales de cloroplastos y/o nanopartículas con absorbancia $> 0,05$; se corrigieron por efectos de filtro interno utilizando la Ec. 3.13.

3.8. Cinética de Kautsky y curva PSMT

La fluorescencia variable se investigó utilizando un fluorómetro de pulso modulado (*Hansatech Instruments*, FMS1). Dicho fluorómetro posee dos fuentes de luz diferentes, un haz de luz de iluminación de la muestra que puede ser saturante o actínica, y el haz de medición modulado que es de baja intensidad (no induce fotosíntesis). El haz de excitación modulado (594 nm) induce una señal de fluorescencia modulada. El haz de modulación utiliza pulsos de muy corta duración (1,8 μ s) con largos períodos de inactividad entre pulsos. De esta manera, la cantidad integrada de radiación incidente sobre la muestra es menor que 0,05 μ mol de fotones \cdot m $^{-2}$ s $^{-1}$, evitando cambios fisiológicos significativos en la muestra durante las mediciones. Adicionalmente, el equipo posee un dispositivo suplementario con un sensor de radiación fotosintéticamente activa incidente (PAR) y de temperatura. Se utilizó este dispositivo para conocer la intensidad de la luz incidente sobre la hoja en unidades de μ mol de fotones \cdot m $^{-2}$ s $^{-1}$ y así calibrar el equipo. El pulso de saturación (luz halógena) utilizado, tuvo una duración de 0,5 s con una intensidad de 2700 μ mol de fotones \cdot m $^{-2}$ s $^{-1}$. La luz actínica fue proporcionada por la misma fuente de luz halógena, con una intensidad variable entre 0 y 1039 μ mol de fotones \cdot m $^{-2}$ s $^{-1}$, según el protocolo específico utilizado.

Cabe señalar que los equipos para el registro de la cinética de Kautsky y la curva OJIP, cuentan con clips de medición específicos muy similares entre sí. Este clip de hojas se utiliza no solo para la medición sino para la adaptación a la oscuridad. Los clips de hojas son pequeños y ligeros, y se conectan directamente a la punta de la fibra óptica conectada al equipo. El clip de hoja en sí tiene una pequeña placa de obturación que debe cerrarse sobre la hoja cuando se coloca el clip de modo que se excluya la luz ambiental y se produzca la adaptación a la oscuridad. El cuerpo de los clips está fabricado con plástico blanco para minimizar los efectos de la acumulación de calor en la hoja durante el tiempo en que el clip está en su lugar. La sección del anillo de ubicación del clip que interactúa con el adaptador de fibra óptica también está construida de plástico blanco. La muestra descansa sobre una almohadilla de espuma mientras está en el clip para minimizar el daño a la estructura de la muestra, muy importante en hojas con alto contenido de agua (p. Ej. en plantas suculentas). La placa del obturador debe cerrarse para excluir la luz de la

muestra durante la adaptación a la oscuridad. Durante dicha adaptación, todos los centros de reacción se oxidan completamente y permanecen abiertos (ver Subsección 2.4.4 para más detalle). A continuación, en la Fig. 3.5, se muestra una imagen donde se observa el clip, el obturador, la fibra óptica y la planta cuya cinética de Kautsky se registrará.



FIGURA 3.5: Adaptación a la oscuridad y medición de la cinética de Kautsky utilizando el clip provisto por el fluorómetro de pulso modulado (*Hansatech Instruments*, FMS1).

Tres protocolos de medición diferentes se utilizaron durante esta tesis, según las necesidades específicas en cada sistema de trabajo. El primer protocolo consistió en aplicar una sola luz actínica por un período largo de 30 minutos y luego de apagarse se registró la recuperación del NPQ. El segundo protocolo, consistió en aplicar una sola luz actínica hasta alcanzar estabilización de la fluorescencia, usualmente unos 10 a 20 minutos según la intensidad de la luz actínica aplicada. En el tercer protocolo se aplicó, en cambio, una serie de tres luces actínicas de creciente intensidad (baja, media y alta). Cada luz actínica se mantuvo encendida el tiempo necesario para la estabilización de la fluorescencia, lo cual fue previamente estandarizado para automatizar su registro.

El primer protocolo experimental utilizado se detalla en la Fig. 3.6. Previamente se adaptaron las hojas a la oscuridad por al menos 20 minutos utilizando el clip del equipo. Luego, se comenzó el registro de la señal de fluorescencia mínima de las muestras adaptadas a la oscuridad (F_0) con el haz de modulación durante 20 segundos. A continuación, se aplicó el pulso de saturación (PS), registrando la fluorescencia máxima (F_M). Después de per-

mitir que la fluorescencia se estabilizara durante 30 segundos, se encendió la luz actínica (LA) durante un total de 30 minutos. Las intensidades de LA utilizadas fueron: 0, 41, 93, 175, 287, 429, 602 y 1038 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Durante la iluminación actínica y cada 5 minutos, se aplicó un PS, registrando así la máxima fluorescencia en el estado adaptado a la luz (F_M').

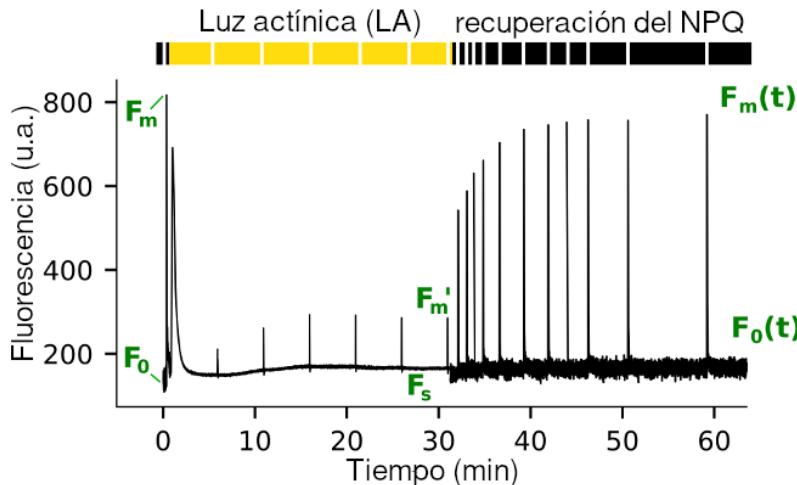


FIGURA 3.6: Protocolo típico de medición de la Cinética de Kautsky y la etapa de recuperación de NPQ subsiguiente.

Después de 30 minutos, se apagó la LA y se registró la etapa de recuperación del NPQ durante casi 50 minutos, en los que se aplicaron 11 pulsos de saturación a intervalos de tiempo no regulares. De esta forma, fue posible estimar los diferentes componentes del NPQ. Para ello se requiere aplicar pulsos de saturación, pero como en esencia es una etapa oscura se deben aplicar la menor cantidad de pulsos necesarios para estimar correctamente los parámetros. Previo a realizar cualquier estudio de la cinética de Kautsky y la recuperación del NPQ de un material fotosintético, se deben encontrar las condiciones óptimas de medición. En este caso, el protocolo óptimo, y general para una variedad de especies de hojas, es el detallado aquí con una duración total de 70 minutos, representado en la Fig. 3.6.

El segundo protocolo se representa esquemáticamente en la Fig. 3.7 y consistió simplemente en adaptar la hoja a la oscuridad, luego aplicar un pulso saturante el cual produce un pico de fluorescencia máxima (F_M), posteriormente se aplica una luz actínica media y se deja estabilizar la fluorescencia hasta un valor estacionario (F_S). Una vez alcanzado

ese punto, se aplica un pulso de luz saturante que produce un pico de fluorescencia, F_M' . Adicionalmente se aplica un pulso de luz infrarroja que permite excitar diferencialmente el PSI por lo que permite oxidar los transportadores medios de electrones y alcanzar un estado similar al adaptado a la oscuridad, cuya fluorescencia se denomina F'_0 .

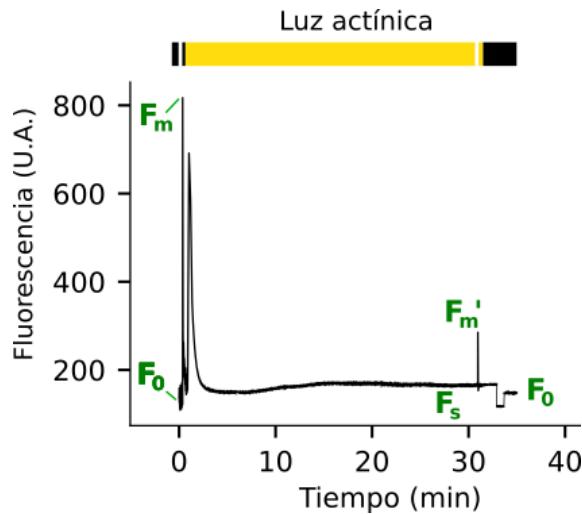


FIGURA 3.7: Protocolo de medición de la Cinética de Kautsky para una determinada luz actínica.

Un último protocolo se representa en Fig. 3.8. En dicho protocolo se aplicó una serie de tres luces actínicas de creciente intensidad. Cada LA se aplica durante el tiempo necesario para su estabilización, previamente estandarizado para la muestra de hoja en cuestión. A mayor LA, mayor es el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario en general. Al final de cada etapa de iluminación actínica se aplicó un pulso de saturación y luego se incrementó la luz actínica. Con este protocolo fue posible determinar múltiples parámetros de aclimatación actínica (rendimientos cuánticos y *quenching* fotoquímico y no fotoquímico) a diferentes LA, de manera rápida. En los últimos dos protocolos no es posible determinar individualmente los componentes del NPQ, y solo es posible determinar el NPQ total para cada LA.

Cabe destacar una limitación de adquisición de datos del FMS1 (fluorómetro de pulso modulado). Este equipo puede adquirir datos de fluorescencia por un máximo de 50 minutos aproximadamente. Como el protocolo de la Fig. 3.6 tenía una duración mayor a 60 minutos, se optó por utilizar una opción del *software* donde no se adquieren datos por un dado período según lo programado. De esta manera, el registro de la fluorescencia solo se adquirió inmediatamente antes y después de los pulsos de saturación, durante los cuales

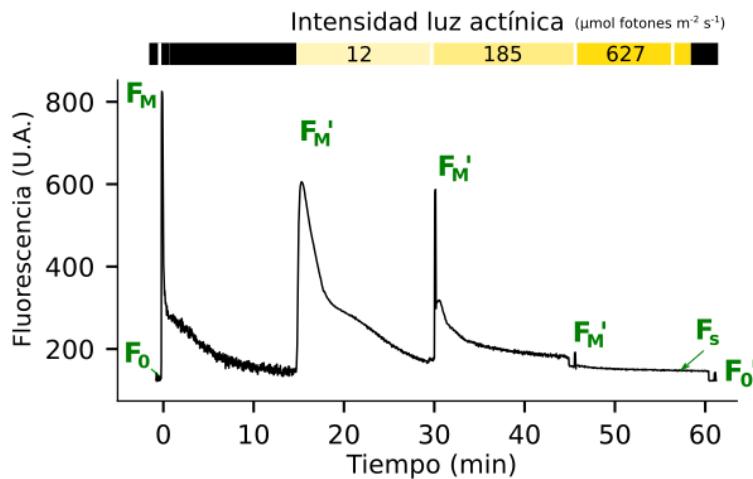


FIGURA 3.8: Protocolo de medición de la Cinética de Kautsky para un conjunto de luces actínicas aplicadas en serie.

se obtiene la información necesaria para calcular los parámetros derivados de dicha curva (detalles en [Subsección 2.4.2](#)). De esta forma se redujo considerablemente la cantidad de datos que adquiere el equipo, y fue posible entonces registrar la intensidad de fluorescencia durante el decaimiento PSMT. La curva PSMT se registró durante los primeros 5 a 10 minutos de iluminación actínica, sin saturar la memoria del FMS1. Finalmente, los decaimientos se promediaron entre las réplicas para un mismo tratamiento lumínico. Tanto para la cinética de Kautsky como para la curva PSMT se utilizaron las mismas curvas empleando los protocolos descriptos anteriormente.

3.9. Transiente OJIP

Las curvas de inducción rápida de fluorescencia de clorofila (OJIP) se registraron con un *Plant Efficiency Analyser* (Handy-PEA, Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido). La curva OJIP se indujo sobre una hoja adaptada a la oscuridad por 20 minutos utilizando el clip provisto por el equipo (similar al clip en la [Fig. 3.5](#)).

Cada transitorio de fluorescencia fue inducido por un led rojo (máximo a 650 nm) a 3000 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ cuya intensidad es suficiente para asegurar el cierre completo de los centros de reacción del PSII y así obtener la verdadera intensidad de fluorescencia máxima en F_M *in vivo*). La determinación se realizó sobre una hoja intacta previamente adaptada a la oscuridad. Las señales de fluorescencia se registraron en una exploración

de tiempo de $50 \mu s$ a 1 s para caracterizar completamente el transiente. La cuantificación de los transitorios de fluorescencia se realizó de acuerdo con los parámetros y modelos descriptos en el capítulo anterior en la [Sección 2.5](#). Un resumen detallado de los parámetros derivados del transiente OJIP, las ecuaciones correspondientes y sus definiciones se encuentran en el [Apéndice A](#).

3.10. Caracterización fisicoquímica de los nanomateriales

3.10.1. Microscopía Electrónica

La microscopía electrónica es ampliamente utilizada para la caracterización de sólidos. A partir de la termoionización de un filamento metálico, generalmente de tungsteno, se genera un haz de electrones que mediante lentes magnéticas se enfoca sobre la muestra. Esta disposición se utiliza tanto en microscopía electrónica de barrido ([SEM](#)) como en microscopía electrónica de transmisión ([TEM](#)). La diferencia entre estas técnicas reside en la energía del haz, el método de detección y la procedencia de los electrones que se detectan, por lo que la información que puede extraerse de las micrografías obtenidas es diferente.

Cuando los electrones inciden sobre una muestra se producen distintos tipos de interacciones, resumidos en la [Fig. 3.9](#). Los electrones retrodifundidos se generan por choques elásticos entre los electrones del haz y la superficie. Por choques inelásticos pueden emitirse electrones de las capas externas de los átomos de la muestra, llamados secundarios, o electrones de capas más internas que generan emisión de rayos X o de electrones Auger. El haz de electrones también puede atravesar la muestra (haz transmitido). Si la muestra es cristalina pueden observarse fenómenos de difracción de electrones.

Microscopía electrónica de barrido

En la microscopía electrónica de barrido, más conocida por sus siglas en inglés, SEM, se enfoca un haz de electrones con energía de 1 a 50 keV sobre la muestra y se examina un área determinada. En esta técnica se detectan los electrones retrodifundidos o electrones secundarios, y a partir de ellos se genera una imagen de la topología de la superficie. Algunos microscopios SEM presentan la posibilidad de realizar espectroscopía de rayos X (EDS). Esta técnica requiere de energías de haz mayores a 10 keV, y se detecta la emisión

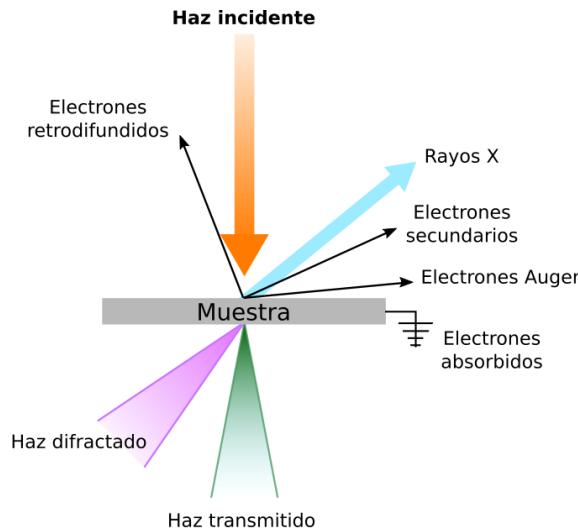


FIGURA 3.9: Interacciones de un haz de electrones con la muestra en microscopía electrónica.

de rayos X de los componentes de la muestra, cuya energía depende de la especie atómica. Por lo tanto, puede analizarse cualitativamente la composición de la muestra y la distribución de distintos elementos en una zona determinada.

Las imágenes SEM fueron adquiridas con un microscopio Zeiss DSM 982 GEMINI (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) perteneciente al Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la FCEN-UBA, operado por la técnica a cargo del mismo, la Dra. Claudia Marchi. Este microscopio emplea un cañón de emisión de campo y un detector de electrones secundarios. Se empleó un voltaje de aceleración entre 5 y 20 kV dependiendo de la muestra a estudiar.

En este microscopio se realizaron observaciones de las características superficiales de las nanopartículas. Las muestras se prepararon depositando gotas de una suspensión relativamente diluida del material, sobre una oblea de silicio apoyada en un taco de aluminio. Las micrografías obtenidas fueron analizadas mediante el programa Image J, para determinar así la distribución de tamaño de partícula y el tamaño promedio.

Microscopía electrónica de transmisión

En la microscopía electrónica de transmisión (TEM), se detectan los electrones transmitidos, que pasan a través de una muestra muy delgada. Dado que la imagen se genera

por contraste, las zonas donde el haz de electrones interactúa con la muestra se ven más oscuras. Si la muestra es cristalina, puede observarse también un efecto de difracción de los electrones en la imagen, siendo posible el registro de las distancias interplanares de la estructura. Los electrones se aceleran por un potencial característico del equipo, viajan a través de una cámara de vacío e inciden sobre la muestra, que debe ser delgada (espesor menor a 200 nm).

Las muestras que pueden observarse directamente en un TEM son muestras de cortes ultrafinos de tejidos o materiales, o bien, suspensiones de nanomateriales. Cuando la muestra posee suficiente contraste dado por su composición, no es necesario teñir la muestra con acetato de uranilo. Este es el caso en muestras compuestas por átomos o iones de alto peso atómico, como por ejemplo Au ó Ag. Si la muestra está compuesta principalmente por átomos del segundo o tercer período, el contraste de la muestra es muy pequeño con respecto a la grilla que la sostiene, y se utiliza acetato de uranilo para aumentar el contraste de la imagen. Como este compuesto difunde por toda la muestra pero no ingresa dentro de la nanopartícula, el contraste se invierte. De esta forma, la imagen característica de una microscopía TEM con tinción negativa como es este caso, posee un fondo oscuro y la muestra se observa con claridad.

Las muestras con buen contraste se depositan directamente sobre una grilla de cobre recubierto con Forward Carbon de 300 mesh. La muestra se deja unos pocos minutos y luego se seca cuidadosamente el exceso de solución con un papel. Para muestras de bajo contraste se agrega una gota de acetato de uranilo y se deja 1 minuto para que se lleve a cabo la tinción. Las imágenes finales se analizaron posteriormente utilizando el programa Image J. Utilizando este programa se ajustó la escala, se aplicó un *thereshold* adecuado y se calculó el área de todas las partículas. Luego, se estimó el diámetro considerando las partículas como esféricas.

Se han obtenido micrografías TEM utilizando dos equipos distintos:

- Microscopio de Transmisión EM301 operado a 60kV, con una resolución del orden de 5 nm, perteneciente al Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la FCEN.
- Microscopio de Transmisión Philips CM 200 Super Twin operado a 200kV, pertene-

ciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Materiales de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) de Constituyentes.

- Microscopio de Transmisión JEOL, modelo JEM-1010, operado a 100 kV, perteneciente a la *Universitat Politècnica de València*.

3.10.2. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (DRX), es una técnica analítica que proporciona información acerca de la identificación de la estructura y fase de materiales cristalinos. La tecnología DRX puede ser usada para identificar cristales de forma unitaria y revelar su estructura. Es posible entonces identificar los cristales presentes en una mezcla, por ejemplo la composición de magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma - Fe_2O_3$) en una muestra de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. La difracción de rayos X es una de las técnicas más utilizadas dentro de la caracterización de materiales. Esta técnica está basada en la interacción entre una onda electromagnética del rango de los rayos X y la muestra a estudiar. Los rayos X son producidos mediante la aceleración de electrones desde un cátodo hacia un blanco metálico (ánodo), por medio de alto voltaje. Los electrones acelerados chocan con los átomos del metal utilizado como blanco, removiendo electrones de niveles internos y occasionando que electrones de niveles superiores cubran los lugares vacantes, emitiendo así, fotones de rayos X. Los rayos X que se generan de esta forma, se utilizan para bombardear muestras cristalinas y así obtener su patrón de difracción de rayos X.

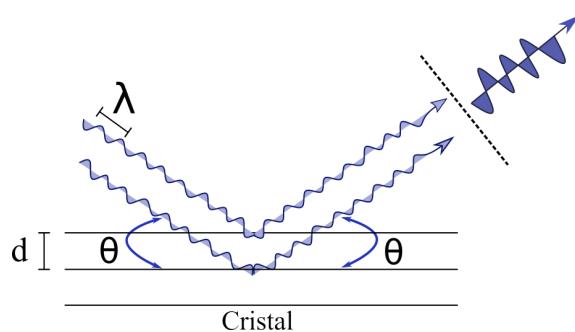


FIGURA 3.10: Representación esquemática de la ecuación de Bragg para un cristal.

En una muestra completamente cristalina, los átomos se encuentran agrupados de forma periódica y ordenada, por lo que al recibir esta radiación, son dispersados en todas direcciones, produciendo fenómenos de interferencia, tanto constructiva como destructiva. La mayor parte de las dispersiones son del tipo destructivo, cancelándose entre sí, pero

en determinadas ocasiones, debido a la periodicidad de los átomos, puede ocurrir que las ondas dispersadas se encuentren en fase y se refuercen, dando origen al fenómeno de difracción. Esto se cumple cuando los rayos X difractados por planos paralelos separados por una distancia d , presentan una diferencia de camino recorrido igual a un número entero de la longitud de onda del haz incidente. Esto se traduce matemáticamente como la ley de Bragg (Ec. 3.14).

$$n\lambda = 2 \cdot d_{h,k,l} \cdot \operatorname{sen}(\theta) \quad (3.14)$$

donde $d_{h,k,l}$ son las distancias entre planos del cristal, que están matemáticamente relacionadas con la celda unitaria del cristal mediante fórmulas simples para cada estructura cristalina (por ejemplo, en el caso de un sistema cúbico $d_{h,k,l} = a/\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$, siendo a el tamaño de la celda unitaria). El sufijo (h,k,l) corresponde a los índices de Miller, que identifican cada reflexión en los planos y a continuación, se nota $d_{h,k,l}$ como d para simplificar la notación.

Para monocrstales, la difracción es un evento organizado en el que el cristal y el haz de rayos X incidente deben configurarse de modo que se cumpla la ley de Bragg y se produzca la difracción. Si no se cumple la condición, el cristal debe rotarse, de modo que el ángulo θ sea igual al dado por la ley de Bragg. Con las muestras de polvo, dicha rotación no es esencial para la difracción, debido a que una muestra de polvo de un solo material consiste en muchos pequeños cristalitos (típicamente de 1 a 10 μm idealmente imperfectos) compactados en un polvo en el que todas las orientaciones de los cristalitos son igualmente probables. Una muestra con estas características donde los cristalitos están orientados aleatoriamente entre sí, se denomina policristalina. Por ende, si hay muchos cristalitos en orientaciones aleatorias, para cualquier espaciamiento d dado del cristal, digamos d_1 , habrá una cantidad de cristalitos a una dada orientación con ángulo θ_1 respecto al haz incidente, que satisface la ley de Bragg para planos separados d_1 (Ec. 3.14). En total, un cono de rayos difractados, con un ángulo de semivértice de $2 \cdot \theta_1$, (siendo θ el ángulo entre el haz incidente y los planos d , mientras que 2θ es el ángulo entre los haces incidente y difractado) se produce y puede ser finalmente detectado.

Simultáneamente, también habrá por casualidad una serie de cristalitos en una orientación con un ángulo θ_2 con respecto al haz incidente, que también satisface la ley de Bragg para planos espaciados d_2 . Esto producirá otro cono de rayos difractados con un ángulo de semi-vértice $2 \cdot \theta_2$ y así sucesivamente para d_3, d_4 , etc. Estos conos cruzaran posteriormente una placa fotográfica plana formando círculos, conocidos como anillos de Debye-Scherrer. Siendo la muestra policristalina, se forman sucesivos anillos correspondientes a una orientación dada de los cristalitos[34]. A diferencia de un monocrystal en donde se observarían puntos según su estructura cristalina y no anillos. En síntesis, para cada cristalito es posible aplicar la ley de Bragg y la señal resultante posee información respecto a la estructura de los cristales que componen dicho polvo, así como sucede en monocróstales.

Luego, las señales que se generan debido a la distribución de la densidad electrónica de los cristalitos se observan en la escala de 20° y 90° generalmente, ya que las distancias sobre las cuales se produce la difracción son escalas atómicas del orden de los Å. Estos difractogramas se suelen denominar a ángulos altos. Luego, a bajos angulos (0.2° y 5°) es posible obtener información de la superficie de las nanopartículas, la estructura del polvo, o bien de los poros nanométricos de un material mesoporoso, entre otros.

En esta tesis se han realizado determinaciones para altos ángulos, por lo que los DRX obtenidos dependerán de la composición del material, la fase cristalina presente y el tamaño de los cristales. Luego, para muestras con patrones DRX con bandas suficientemente estrechas, es decir, con alta cristalinidad, se utilizó la ecuación de Scherrer (Ec. 3.15) para aproximar el tamaño de cristalita (L)[35]:

$$L = \frac{0,9 \cdot \lambda}{B \cdot \cos\theta} \quad (3.15)$$

donde λ es la longitud de onda de los rayos X incidentes, en este caso corresponde a radiación $K - \alpha$ de cobre con una energía de 8.04 eV, la cual corresponde a una longitud de onda de rayos X de 1.5418 Å. Luego, B es el ancho a media altura del pico de difracción correspondiente al ángulo θ corregido por el ancho instrumental. Es importante recalcar que los valores hallados a través de esta ecuación constituyen una estimación debido a la configuración empleada para la medida, y sirven para marcar tendencias pero no para

obtener valores absolutos de tamaño de partícula[36].

Respecto a la configuración instrumental y el equipo utilizado, se registró DRX en modo de incidencia rasante, donde el sustrato se encuentra fijo a un dado ángulo y únicamente rota el detector. Esto hace que el haz irradie una zona más amplia de la muestra y penetre en ella sin impactar sobre el sustrato, permitiendo maximizar la señal. Las medidas se realizaron en intervalos acordes a las fases cristalinas posibles para cada material en general entre 20° y 70°, en un equipo Siemens D5000 perteneciente al INQUIMAE, FCEyN, UBA; utilizado por la técnica a cargo del mismo, la Lic. Gabriela Castro.

3.10.3. Dispersión dinámica de luz

La dispersión de luz dinámica (DLS, también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz quasi elástica) es una de las técnicas de dispersión de luz más populares porque permite determinar tamaños de partículas no fluorescentes en suspensión. Las aplicaciones típicas son emulsiones, micelas, polímeros, proteínas, nanopartículas o coloides. El principio básico es simple: la muestra se ilumina con un haz proveniente de un láser y las fluctuaciones de la luz dispersa se detectan en un ángulo de dispersión conocido θ mediante un detector de fotones rápido.

La DLS se basa en el movimiento browniano de partículas dispersas. El principio del movimiento browniano es que las partículas chocan constantemente con las moléculas de solvente. Estas colisiones hacen que se transfiera una cierta cantidad de energía, lo que induce el movimiento de partículas. La transferencia de energía es más o menos constante y, por tanto, tiene un mayor efecto sobre las partículas más pequeñas. Como resultado, las partículas más pequeñas se mueven a velocidades más altas que las partículas más grandes. Si se conocen o estiman todos los demás parámetros que influyen en el movimiento de las partículas, es posible determinar el diámetro hidrodinámico midiendo la velocidad de las partículas.

La relación entre la velocidad de las partículas y el tamaño de las mismas viene dada por

la ecuación de Stokes-Einstein (Ec. 3.16).

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \nu \cdot R_H} \quad (3.16)$$

donde D es el coeficiente de difusión de traslación, k_B la constante de Boltzmann, ν la viscosidad y R_H el radio hidrodinámico. Además, la ecuación incluye la viscosidad del dispersante y la temperatura porque ambos parámetros influyen directamente en el movimiento de las partículas. Un requisito básico para la ecuación de Stokes-Einstein es que el movimiento de las partículas debe basarse únicamente en el movimiento browniano. Si hay sedimentación, no hay movimiento aleatorio, lo que daría lugar a resultados inexactos. Por lo tanto, el inicio de la sedimentación indica el límite de tamaño superior para las mediciones de DLS. Por el contrario, el límite de tamaño inferior está definido por la relación señal/ruido. Las partículas pequeñas no dispersan mucha luz, lo que conduce a una señal débil.

La luz dispersa se detecta durante un cierto período de tiempo para monitorear el movimiento de las partículas. La intensidad de la luz dispersa no es constante, pero fluctuará con el tiempo. Las partículas más pequeñas, que se mueven a velocidades más altas, muestran fluctuaciones más rápidas que las partículas más grandes. Por otro lado, las partículas más grandes dan como resultado amplitudes más altas entre las intensidades de dispersión, como se muestra en la Fig. 3.11 B. Esta traza de intensidad inicial se usa además para generar una función de correlación, g_2 . En general, la función de correlación describe cuánto tiempo está ubicada una partícula en el mismo lugar dentro de la muestra. Al principio, la función de correlación es lineal y casi constante, lo que indica que la partícula todavía está en la misma posición que el momento anterior. Más tarde, puede verse una disminución exponencial de la función de correlación, lo que significa que la partícula se está moviendo. Si no hay similitud con la posición inicial, la función de correlación muestra nuevamente un comportamiento lineal. Esta parte de la función de correlación se conoce como línea de base. La información del movimiento dependiente del tamaño se incluye en el decaimiento de la función de correlación. El decaimiento representa una medida indirecta del tiempo que las partículas necesitan para cambiar sus posiciones relativas. Las partículas pequeñas se mueven rápidamente por lo que el decaimiento es rápido.

Las partículas más grandes se mueven más lentamente y, por lo tanto, se retrasa el decaimiento de la función de correlación (Fig. 3.11 B). De hecho, la función de correlación es una descripción matemática de las fluctuaciones de la luz dispersa y se utiliza para determinar el coeficiente de difusión translacional (D). El coeficiente de difusión se determina a partir de la función de correlación g_2 y el diámetro hidrodinámico (similar el tamaño de partícula) se obtiene luego mediante la ecuación de Stokes-Einstein ya discutida.

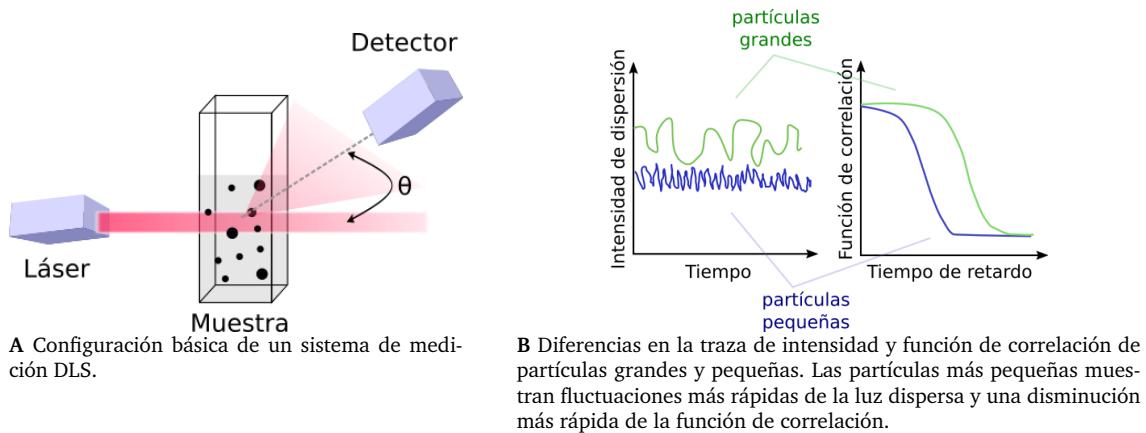


FIGURA 3.11: Esquema básico del sistema de medición y la relación entre la función de correlación y el tamaño de partícula.

La configuración básica de un instrumento DLS se muestra en la Fig. 3.11 A. Se dirige un láser de frecuencia única a la muestra contenida en una cubeta. Si hay partículas en la muestra, la luz láser incidente se dispersa en todas direcciones. La luz dispersa se detecta en un cierto ángulo a lo largo del tiempo y esta señal se utiliza para determinar el coeficiente de difusión y el tamaño de partícula mediante la ecuación de Stokes-Einstein. La luz del láser incidente suele ser atenuada por un filtro gris que se coloca entre el láser y la cubeta. Cuando se miden muestras turbias, el detector no podría procesar la gran cantidad de fotones. Por lo tanto, la luz láser se atenúa para recibir una señal suficiente pero procesable en el detector. Los instrumentos DLS modernos incluyen dos o tres ángulos de detección para mediciones de tamaño de partículas. Dependiendo de la turbidez de la muestra, la dispersión lateral (90°) o la retrodispersión (175°) es más adecuada. Se puede usar un ángulo hacia adelante (15°) para monitorear la agregación.

El diámetro hidrodinámico obtenido representa un promedio del tamaño de las partículas. Para que una medida de DLS pueda considerarse confiable debe considerarse la polidispersividad de la muestra, la tasa de recuento promedio y la calidad de la muestra. La

polidispersividad es una medida de la uniformidad de distribución de tamaño de partícula, para la cual es deseable tener valores bajos. La tasa de recuento promedio, que es una medida de la intensidad de la señal, es deseable se encuentre en el orden de 500 kilocuentas por segundo (el valor lo indica el programa del equipo en el momento). La calidad de la muestra, es un indicador de la relación señal/ruido calculada a partir de la función de correlación. La calidad máxima es 10.

Las medidas se realizaron a temperatura ambiente (25°C) en muestras dispersas en agua usualmente, en una cubeta común de 1 cm de paso óptico. Hay un rango de concentraciones de partícula en el cual las medidas son confiables y esto se identifica graficando el diámetro hidrodinámico en función de la concentración de partícula. La zona de concentración donde el radio es constante, es el rango de diluciones a trabajar. Esa parte de la curva que es constante se suele llamar *plateau*. Para cada suspensión de nanopartículas se deben preparar varias diluciones en un amplio rango de forma de identificar la zona del *plateau* y de allí, el diámetro hidrodinámico correcto para esa muestra de nanopartículas en particular. Las mediciones fueron registradas en 5 o 10 ciclos de 50 segundos cada uno, según el caso y fijando el valor del índice de refracción en 1.55, valor previamente establecido por el fabricante para partículas opacas en el rango del visible. El equipo está provisto de un láser de He-Ne de 632 nm con una potencia de 15 mW enfocado sobre un portacelada que contiene la muestra. Los experimentos se realizaron en el equipo 90Plus/BI-MAS perteneciente al INQUIMAE, FCEN, UBA.

3.10.4. Potencial Z

Potencial zeta es una técnica que se aplica para la determinación de la carga superficial de partículas dispersas, particularmente en suspensiones de nanopartículas[37]. La superficie de una partícula cargada atrae una capa delgada de carga opuesta que se une firmemente a ella, formando una capa líquida delgada llamada capa Stern. Más lejos de la superficie hay una capa adicional de iones más débilmente asociados a la superficie, de carga opuesta, que se mueven con la partícula a medida que viaja a través de un medio debido al movimiento browniano o al de sedimentación. Como resultado de este fenómeno se crea una doble capa eléctrica[38], tal como se esquematiza en Fig. 3.12 A. El potencial zeta recibe su nombre del potencial eléctrico de la doble capa y se determina mediante

la medición de la velocidad de las partículas cargadas que se mueven hacia el electrodo de carga opuesta a través de la dispersión en presencia de un campo eléctrico externo[39, 40]. Los valores de potencial zeta se encuentran típicamente en el rango de -100 a +100 mV. La magnitud del potencial zeta da una predicción de la estabilidad coloidal. Las nanopartículas con valores de potencial Z mayores de 25 mV y menores de -25mV , presentan un alto grado de estabilidad. Valores menores de potencial Z representan suspensiones inestables, que dan lugar a procesos de agregación, coagulación o floculación. Estos procesos se generan debido a la atracción de tipo Van der Waals entre las partículas[40, 41].

En resumen, potenciales zeta positivos o negativos altos, superiores a 30 mV (en módulo), conducen a una dispersión estable. Por otro lado, valores bajos, inferiores a 5 mV, representan suspensiones que dan lugar a procesos de aglomeración. El potencial zeta se ve afectado no solo por las propiedades de las nanopartículas, sino también por la naturaleza de la solución, el pH y la fuerza iónica.

Las mediciones de potencial zeta se realizaron utilizando un *Zeta-Potential Analyzer (Brookhaven Instrument Corp.)* equipado con un láser He-Ne de 632 nm que opera en un ángulo de detección de 173 grados. En una medición de potencial zeta, se carga una muestra en una celda capilar que contiene dos electrodos conductores, los cuales hacen contacto con el voltaje aplicado al instrumento en el exterior. Las partículas cargadas dentro de la celda se moverán a través del medio a una velocidad proporcional a su potencial zeta. Las partículas con un potencial zeta de mayor magnitud se moverán a un ritmo rápido, mientras que las partículas con un potencial zeta bajo se moverán más lentamente. El movimiento de las partículas debido al campo eléctrico aplicado se mide mediante la dispersión de la luz generada por un haz de luz aplicado. La frecuencia de la luz dispersa es función de la velocidad de las partículas debido al desplazamiento Doppler. Un segundo haz de luz (el haz de referencia) se mezcla con el haz disperso para extraer sensiblemente el cambio de frecuencia en la luz dispersa. Este cambio de frecuencia se puede convertir en un valor de movilidad electroforética (U_E). El potencial zeta, ζ , se calcula a partir de la movilidad electroforética con la constante dieléctrica del disolvente ϵ , la viscosidad ν y otras constantes mediante la ecuación de Henry.

$$U_E = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot \zeta}{3 \cdot \nu} \cdot f(Ka) \quad (3.17)$$

En la figura a continuación se muestra la mezcla del haz disperso con el haz de referencia en el detector de potencial zeta en la parte inferior derecha. La magnitud medida del cambio de frecuencia se usa luego para determinar la velocidad de la partícula y con esta el potencial zeta.

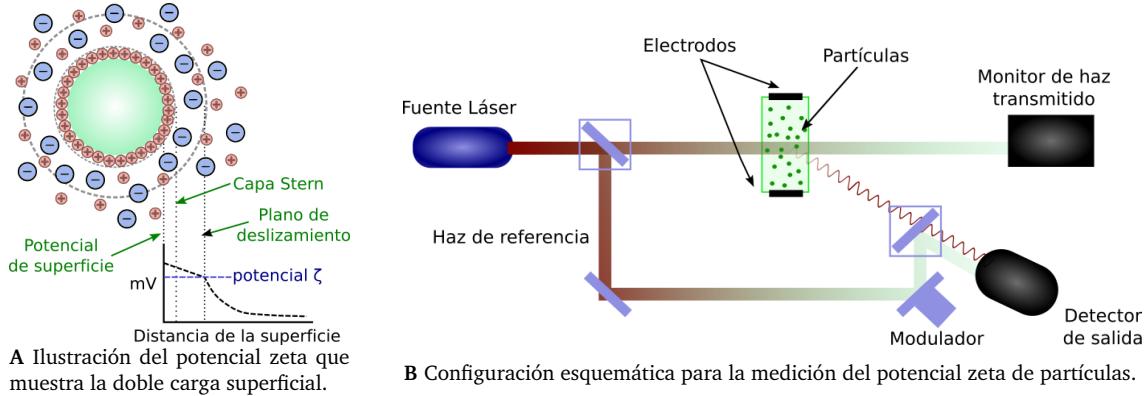


FIGURA 3.12: Esquema de la doble capa superficial y del arreglo experimental para la determinación del potencial Z.

3.10.5. Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se utiliza para detectar transiciones de vibración de una molécula. La ventaja de FTIR en comparación con la espectroscopía infrarroja convencional es que todos los números de onda se miden al mismo tiempo con la ayuda de un interferómetro de Michelson. Entonces, dado que todas las frecuencias de radiación llegan al detector al mismo tiempo, existe una gran relación señal/ruido. Otra ventaja es que el espectro se puede registrar en menos tiempo[42].

Un espectrómetro FTIR común consta de una fuente, interferómetro, compartimento de muestra, detector, amplificador, convertidor A/D y una computadora. La fuente genera radiación que atraviesa la muestra a través del interferómetro y llega al detector. Luego, la señal es amplificada y convertida en señal digital por el amplificador y el convertidor de analógico a digital, respectivamente. Finalmente, la señal se transfiere a una computadora en la que se realiza la transformada de Fourier. El interferómetro de Michelson, que es el núcleo de los espectrómetros FTIR, se utiliza para dividir un haz de luz en dos de modo

que las trayectorias de los dos haces sean diferentes. Luego, se recombinan los dos haces y alcanzan al detector donde se mide la diferencia de intensidad de estos dos haces en función de la diferencia de caminos. El interferograma obtenido es una función del tiempo, al cual que posteriormente se le aplica una transformada de Fourier para obtener una función de frecuencias, que se utiliza posteriormente para producir un espectro[43].

Se registraron los espectros FTIR en modalidad ATR (reflectancia total atenuada) que es una versión de espectroscopía infrarroja caracterizada por la reflexión interna total por un cristal trapezoidal de alto índice de refracción que cuando lo atraviesa un haz infrarrojo da como resultado una onda evanescente. La reflexión total del haz infrarrojo en el elemento de reflexión interna se debe a la pendiente de la luz incidente que está por encima del ángulo crítico y depende del índice de refracción del material. La muestra se coloca directamente sobre la superficie del cristal para que pueda absorber la onda evanescente que penetra en ella entre 0,5 y 2 μm , tal como se representa en la Fig. 3.13.

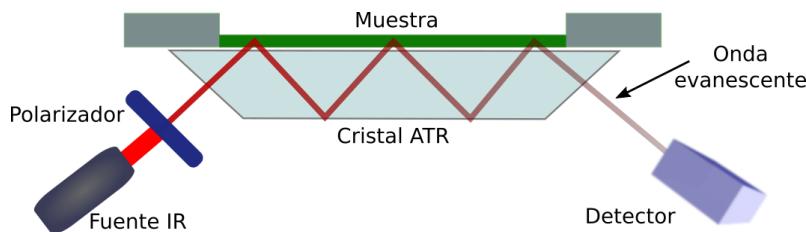


FIGURA 3.13: Representación esquemática de un sistema ATR-FTIR. El haz infrarrojo atraviesa el cristal ATR cubierto en la parte superior por la muestra. La onda evanescente penetra en la muestra y es absorbida por la misma.

Los espectros de infrarrojo en modalidad ATR-FTIR fueron obtenidos usando un espectrofotómetro FTIR Nicolet 8700, con resolución de 4 cm^{-1} de 64 barridos, utilizando un accesorio de ATR, con cristal de diamante. Las mediciones fueron realizadas en colaboración con la Lic. Adriana Martínez del INQUIMAE (UBA-CONICET).

3.10.6. Magnetometría de muestra vibrante

La magnetometría de muestra vibrante (VSM) es una técnica versátil para medir el momento magnético de una muestra cuando se la hace vibrar perpendicularmente a un campo magnético uniforme. Con este método se pueden detectar cambios tan pequeños como 10^{-5} a 10^{-6} emu. La técnica VSM se puede utilizar para obtener información sobre el

momento magnético de las muestras basándose en la ley de inducción magnética de Faraday[44]. A diferencia de otras técnicas, VSM mide el momento magnético de una muestra completa. En esta técnica, se monta una muestra magnética en el portamuestras y se coloca entre los polos del electroimán, generalmente orientados horizontalmente. La vibración de la muestra ocurre en un plano perpendicular a la línea que une los polos de los electroimanes.

La posición óptima de la muestra se denomina *punto de silla*, la cual se determina mediante una calibración de posicionamiento previa a las mediciones. Durante la medición, la muestra se somete a una vibración constante verticalmente. El flujo magnético cambiante, que es proporcional al momento magnético en la muestra, induce un voltaje de corriente alterna que es detectado por un conjunto de bobinas captadoras colocadas cerca de los polos electromagnéticos. Se detectan así cambios de flujo cuando se cambia el campo magnético aplicado, o frente a cambios en la posición de la bobina o de la muestra. Luego, el voltaje inducido se amplifica para obtener la información del momento magnético de la muestra.

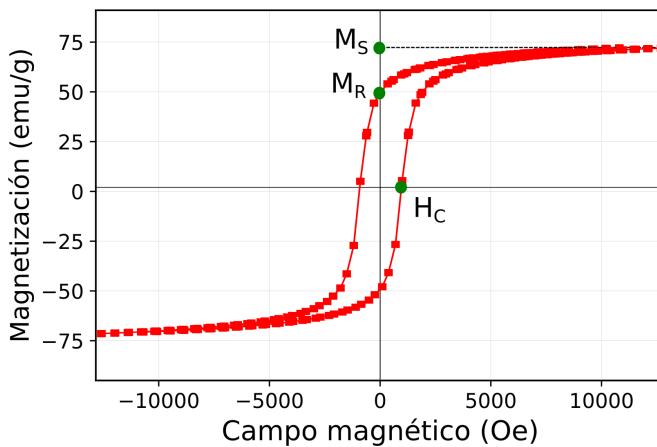


FIGURA 3.14: Curva de magnetización típica de partículas ferromagnéticas que se puede obtener utilizando VSM. Se marcan sobre la curva los tres puntos principales de la misma, la magnetización de saturación (M_S), la magnetización remanente (M_R) y el campo cohercitivo (H_C).

La Fig. 3.14 muestra una curva de magnetización típica (curva M-H) medida con VSM, que proporciona el momento magnético de la muestra en función del campo magnético aplicado, así como la coercitividad, la magnetización residual y de saturación[44].

En general, el comportamiento magnético de las nanopartículas puede clasificarse en dos tipos: superparamagnético (SP) o ferro(ferri)magnético (FM)[45, 46]. Un sistema de partículas se encuentra en un estado SP cuando en ausencia de un campo magnético aplicado tiene momento magnético nulo. Luego, al interactuar con un campo magnético, los espines electrónicos de las partículas tienden a alinearse en sentido del campo aplicado, aumentando la magnetización hasta llegar a la magnetización de saturación (M_S). A medida que se retira el campo magnético, la magnetización disminuye y cuando el campo aplicado vuelve a ser cero, la magnetización de las partículas es nula. Es decir, se alcanza saturación sin presentar histéresis magnética en un ciclo de magnetización-desmagnetización de una muestra que presenta comportamiento superparamagnético. La curva que describe este comportamiento de la magnetización, M , en función del campo aplicado, H , es la función de Langevin y está dada por [45, 46]:

$$M(H) = M_S \cdot \left[\coth \left(\frac{\mu \cdot H}{k_B \cdot T} \right) - \frac{k_B \cdot T}{\mu \cdot H} \right] \quad (3.18)$$

donde M es la magnetización de la partícula, M_S la magnetización de saturación, μ es el momento magnético de cada partícula en J/T , k_B es la constante de Boltzman ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$) y T es la temperatura absoluta. El estado SP se observa cuando las partículas son lo suficientemente pequeñas y forman monodomínios magnéticos, de modo que los espines electrónicos en ausencia de campo magnético se promedian a cero por la agitación térmica.

En determinados sistemas magnéticos, es posible que la función de Langevin no se ajuste completamente a la curva M-H. Esto usualmente sucede cuando la curva M-H no pasa por el punto (0,0) por una mala calibración, o bien debido a que las partículas en cuestión poseen comportamiento SP y FM al mismo tiempo, el cual está asociado a una estructura de espín multifásico. En estos casos la muestra está compuesta por distintas fases que pueden ser SP, FM, o incluso, paramagnéticas (PM). El componente PM existe debido a espines superficiales o espines no compensados[47]. Es posible modificar la ecuación de Langevin y así contemplar estos detalles más finos, e identificar los componentes FM, SP y PM [48]. Las diferencias fundamentales entre las curvas M-H entre partículas SP y

FM, es que las partículas con comportamiento FM presentan histéresis magnética como la representada en la [Fig. 3.14](#), mientras que las SP no presentan histéresis. Por lo tanto, suele ser de interés ajustar la gráfica M-H a temperatura ambiente con la ayuda de la función de Langevin modificada la cual considera tanto los componentes SP, FM, como PM[48]:

$$M(H) = \frac{2M_S^{FM}}{\pi} \cdot \tan^{-1} \left[\frac{H \pm H_c}{H_c} \tan \left(\frac{\pi S}{2} \right) \right] + M_S^{SP} \cdot \left[\coth \left(\frac{\mu \cdot H}{k_B \cdot T} \right) - \frac{k_B \cdot T}{\mu \cdot H} \right] + \chi^{PM} \cdot H \quad (3.19)$$

donde el primer término representa el componente FM, el segundo término representa el componente SP (función de Langevin de la [Ec. 3.18](#)) y el tercer término representa el componente PM. Donde M_S^{FM} , M_S^{SP} , S y χ^{PM} son la magnetización de saturación del componente FM, la magnetización de saturación del componente SP, la relación M_r^{FM}/M_S^{FM} y el componente PM, respectivamente.

Si no se observa histéresis en las curvas M-H experimentales, se puede simplificar la ecuación anterior al descartar el término FM, quedando simplemente el componente SP y PM[49]:

$$M(H) = M_S^{SP} \cdot \left[\coth \left(\frac{\mu \cdot H}{k_B \cdot T} \right) - \frac{k_B \cdot T}{\mu \cdot H} \right] + \chi^{PM} \cdot H \quad (3.20)$$

Referencias

- (1) Lichtenthaler, H. K. en *Plant Cell Membranes; Methods in Enzymology*, vol. 148; Academic Press: 1987, págs. 350-382, DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
- (2) Lichtenthaler, H. K. y Buschmann, C. *Handbook of Food Analytical Chemistry 2005*, 2-2, 171-178, DOI: [10.1002/0471709085.ch21](https://doi.org/10.1002/0471709085.ch21).
- (3) Cuba, N. I.; Torres, R.; San Román, E. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol.* **2020**, DOI: [10.1111/php.13273](https://doi.org/10.1111/php.13273).
- (4) Slaton, M. R.; Hunt, E. R. y Smith, W. K. *Am. J. Bot.* **2001**, 88, 278-284, DOI: [10.2307/2657019](https://doi.org/10.2307/2657019).

- (5) Blackburn, G. A. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 855-867.
- (6) Serrano, L. *Int. J. Remote Sens.* **2008**, *29*, 5265-5274.
- (7) Ollinger, S. V. *New Phytol.* **2010**, *189*, 375-394, DOI: [10.1111/j.1469-8137.2010.03536.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03536.x).
- (8) Vogelmann, T. C. y Martin, G. *Plant Cell Environ.* **1993**, *16*, 65-72.
- (9) Sims, D. A. y Gamon, J. A. *Remote Sens. Environ.* **2002**, *81*, 337-354.
- (10) Croft, H. y Chen, J. en *Comprehensive Remote Sensing*; Elsevier: 2018, págs. 117-142, DOI: [10.1016/b978-0-12-409548-9.10547-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.10547-0).
- (11) Chen, J. M. y Cihlar, J. *Remote Sens. Environ.* **1996**, *55*, 153-162.
- (12) Prince, S. *Int. J. Remote Sens.* **1991**, *12*, 1313-1330.
- (13) Gamon, J. A.; Field, C. B.; Goulden, M. L.; Griffin, K. L.; Hartley, A. E.; Joel, G.; Peñuelas, J. y Valentini, R. *Ecol. Appl.* **1995**, *5*, 28-41.
- (14) Gamon, J. y Surfus, J. *The New Phytol.* **1999**, *143*, 105-117.
- (15) Gitelson, A. A. y Merzlyak, M. N. *Int. J. Remote Sens.* **1997**, *18*, 2691-2697.
- (16) Grace, J.; Nichol, C.; Disney, M.; Lewis, P.; Quaife, T. y Bowyer, P. *Global Change Biol.* **2007**, *13*, 1484-1497.
- (17) Blackburn, G. A. *Remote Sens. Environ.* **1998**, *66*, 273-285.
- (18) Gitelson, A. A.; Zur, Y.; Chivkunova, O. B. y Merzlyak, M. N. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 272-281.
- (19) Hernández-Clemente, R.; Navarro-Cerrillo, R. M. y Zarco-Tejada, P. J. *Remote Sens. Environ.* **2012**, *127*, 298-315.
- (20) Gamon, J.; Peñuelas, J. y Field, C. *Remote Sens. Environ.* **1992**, *41*, 35-44.
- (21) Filella, I.; Porcar-Castell, A.; Munné-Bosch, S.; Bäck, J.; Garbulsky, M. y Peñuelas, J. *Int. J. Remote Sens.* **2009**, *30*, 4443-4455.
- (22) Peñuelas, J.; Garbulsky, M. F. y Filella, I. *New Phytol.* **2011**, *191*, 596-599.
- (23) Suárez, L.; Zarco-Tejada, P. J.; Sepulcre-Cantó, G.; Pérez-Priego, O.; Miller, J.; Jiménez-Muñoz, J. y Sobrino, J. *Remote Sens. Environ.* **2008**, *112*, 560-575.
- (24) Hernández-Clemente, R.; Navarro-Cerrillo, R. M.; Suárez, L.; Morales, F. y Zarco-Tejada, P. J. *Remote Sens. Environ.* **2011**, *115*, 2360-2375.

- (25) Peñuelas, J.; Baret, F. y Filella, I. *Photosynthetica* **1995**, *31*, 221-230.
- (26) Chappelle, E. W.; Kim, M. S. y McMurtrey III, J. E. *Remote Sens. Environ.* **1992**, *39*, 239-247.
- (27) Blackburn, G. A. *Int. J. Remote Sens.* **1998**, *19*, 657-675, DOI: [10.1080/014311698215919](https://doi.org/10.1080/014311698215919).
- (28) Peñuelas, J.; Llusia, J.; Pinol, J. y Filella, I. *Int. J. Remote Sens.* **1997**, *18*, 2863-2868, DOI: [10.1080/014311697217387](https://doi.org/10.1080/014311697217387).
- (29) Seelig, H.-D.; Hoehn, A.; Stodieck, L.; Klaus, D.; Adams Iii, W. y Emery, W. *Remote Sens. Environ.* **2008**, *112*, 445-455, DOI: [10.1016/j.rse.2007.05.002](https://doi.org/10.1016/j.rse.2007.05.002).
- (30) Hunt Jr, E. R. y Rock, B. N. *Remote Sens. Environ.* **1989**, *30*, 43-54, DOI: [10.1016/0034-4257\(89\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0034-4257(89)90046-1).
- (31) Sims, D. A. y Gamon, J. A. *Remote Sens. Environ.* **2003**, *84*, 526-537, DOI: [10.1016/S0034-4257\(02\)00151-7](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00151-7).
- (32) Gao, B.-c. *Remote Sens. Environ.* **1996**, *58*, 257-266, DOI: [10.1016/s0034-4257\(96\)00067-3](https://doi.org/10.1016/s0034-4257(96)00067-3).
- (33) Lakowicz, J. R. en *Principles of fluorescence spectroscopy*; Springer: 1999, págs. 25-61.
- (34) Widjonarko, N. E. *Coatings* **2016**, *6*, 54.
- (35) Langford, J. I. y Wilson, A. J. C. **1978**, *11*, 102-113, DOI: [10.1107/s0021889878012844](https://doi.org/10.1107/s0021889878012844).
- (36) Giannini, C.; Ladisa, M.; Altamura, D.; Siliqi, D.; Sibillano, T. y De Caro, L. *Crystals* **2016**, *6*, 87.
- (37) Shnoudeh, A. J.; Hamad, I.; Abdo, R. W.; Qadumii, L.; Jaber, A. Y.; Surchi, H. S. y Alkelany, S. Z. en; Elsevier: 2019, págs. 527-612, DOI: [10.1016/b978-0-12-814427-5.00015-9](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814427-5.00015-9).
- (38) Clogston, J. D. y Patri, A. K. en *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*; Springer: 2011, págs. 63-70.
- (39) Pons, T.; Uyeda, H. T.; Medintz, I. L. y Mattossi, H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20308-20316.
- (40) Sapsford, K. E.; Tyner, K. M.; Dair, B. J.; Deschamps, J. R. y Medintz, I. L. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4453-4488.

- (41) Horie, M. y Fujita, K. en *Advances in molecular toxicology*; Elsevier: 2011; vol. 5, págs. 145-178.
- (42) Stuart, B. H., *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*; John Wiley & Sons: 2004.
- (43) Griffiths, P. R. *Science* **1983**, *222*, 297-302.
- (44) Foner, S. *Review of Scientific Instruments* **1959**, *30*, 548-557, DOI: [10.1063/1.1716679](https://doi.org/10.1063/1.1716679).
- (45) Chantrell, R.; Popplewell, J. y Charles, S. *IEEE Trans. Magn.* **1978**, *14*, 975-977, DOI: [10.1109/tmag.1978.1059918](https://doi.org/10.1109/tmag.1978.1059918).
- (46) Knobel, M.; Nunes, W. C.; Socolovsky, L. M.; Biasi, E. D.; Vargas, J. M. y Denardin, J. C. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 2836-2857, DOI: [10.1166/jnn.2008.15348](https://doi.org/10.1166/jnn.2008.15348).
- (47) Cabot, A.; Alivisatos, A. P.; Puntes, V. F.; Balcells, L.; Iglesias, Ò. y Labarta, A. *Physical Review B* **2009**, *79*, DOI: [10.1103/physrevb.79.094419](https://doi.org/10.1103/physrevb.79.094419).
- (48) Jaffari, G. H.; Ceylan, A.; Bui, H. P.; Jr, T. P. B.; Ozcan, S. y Shah, S. I. *J. Phys.: Condens. Matter* **2012**, *24*, 336004, DOI: [10.1088/0953-8984/24/33/336004](https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/33/336004).
- (49) Rani, S. y Varma, G. *Physica B: Condensed Matter* **2015**, *472*, 66-77, DOI: [10.1016/j.physb.2015.05.016](https://doi.org/10.1016/j.physb.2015.05.016).

Respuesta fotosintética a baja iluminación

4.1. Introducción

Con el objetivo de introducir un análisis integral de las técnicas de fluorescencia de clorofila utilizadas en esta tesis, se resumen los resultados de un trabajo publicado en 2021[1]. En dicho trabajo se estudió el efecto en la actividad fotosintética por aclimatación a baja irradiancia. La motivación de este trabajo fue variada.

La elección de la aclimatación a una irradiancia baja se debió a falencias en la bibliografía al respecto. En ella, se estudiaron intensamente los efectos en el contenido de pigmentos y actividad fotosintética en plantas aclimatadas a luz sombreada, o bien en plantas aclimatadas a altas irradiancia donde se presenta el fenómeno de fotoinhibición. Por otro lado, las condiciones experimentales referidas como baja, media o alta iluminación se diferencian únicamente respecto a la intensidad total de la luz y no a su distribución espectral. Debido al fenómeno de reabsorción de luz por parte de las hojas, la luz de sombra se encuentra enriquecida espectralmente en el rojo lejano. Por ende, la luz de sombra no solo posee una intensidad menor respecto a la luz directa, sino también posee una distribución espectral diferente. Estas diferencias producen cambios en la composición de pigmentos y estructura de los cloroplastos, y por ende se observan diferencias en la actividad fotosintética en hojas de sol (iluminación directa de la fuente de luz) y hojas de sombra (iluminación indirecta, principalmente dada por reflexión de otras hojas). En la siguiente sección se describen brevemente estas diferencias entre hojas de sol y sombra.

Otras de las motivaciones del trabajo fue la integración de todas las técnicas de fluorescencia de clorofila *a*, la adquisición de la etapa de recuperación del NPQ a partir de la cinética de Kautksy y el desarrollo de un modelo simple para la estimación de los componentes del NPQ.

En la mayoría de los trabajos de fluorescencia de clorofila los autores utilizan solo una de las técnicas o bien se concentran en un fenómeno, por ejemplo solo registran la curva OJIP o estudian el NPQ. Por lo que no existen muchos trabajos donde se integren los resultados de diversas técnicas de fluorescencia de clorofila que puedan así indagar sobre el efecto de un dado factor en las distintas etapas de la cadena de transporte electrónico fotosintético y la regulación de su actividad por fenómenos como el NPQ.

Asimismo, si bien los parámetros fotosintéticos de la fluorescencia variable se han calculado en muchos trabajos previos, no es así para la fase de recuperación del NPQ. En esta fase, la capacidad fotosintética se recupera gradualmente a medida que se desactivan los mecanismos del NPQ activados en la etapa previa de iluminación actínica. Los pulsos de saturación aplicados durante esta fase permiten calcular diferentes parámetros en función del tiempo y estimar la amplitud y los tiempos de desactivación característicos de cada componente del NPQ. Sin embargo, ajustar la desactivación de NPQ con un modelo apropiado no es una tarea trivial y los resultados dependen en gran medida de esto.

Es por ello que en el trabajo aquí referido se incluyó un enfoque alternativo y simple para la estimación de los componentes del NPQ evitando limitar o sobreestimar los componentes o sus tiempos característicos[1]. Superando así a otros modelos y enfoques actualmente presentes en la bibliografía, como el de Ahn y col.[2] que requiere asumir las constantes previo a su cálculo, Ptushenko y col.[3] que asume un comportamiento triexponencial que parece ser más complejo que la señal de origen, y Guadagno y col.[4] que requiere que los componentes tengan tiempos de desactivación muy diferentes.

En síntesis, en este capítulo se resumen los resultados un estudio exhaustivo de la fluorescencia de la clorofila con el objetivo de proporcionar un enfoque unificado de estas técnicas. Además, el capítulo y el trabajo aquí resumido, pretendió ser una guía para to-

dos los interesados en el estudio integral de la fluorescencia de la clorofila. Lo anterior se llevó a cabo analizando un caso general, como es la aclimatación a diferentes ambientes de luz con la misma distribución espectral en plantas. Si bien en el trabajo referido en este capítulo se estudiaron tres especies vegetales con diferentes mecanismos de asimilación de carbono, se presentan aquí únicamente los resultados a la especie vegetal más conocida, *Lactuca Sativa* (lechuga común). Los resultados indicaron que el enfoque utilizado es capaz de caracterizar los diferentes tratamientos y detectar sutiles diferencias entre las especies.

4.1.1. Hojas de sol y de sombra

Las hojas de sol y de sombra pueden diferir considerablemente en su composición relativa de pigmentos fotosintéticos, portadores de electrones, su ultraestructura de cloroplasto y sus tasas de fotosíntesis[5-8]. La adaptación de las hojas y del cloroplasto a luz solar directa o a la sombra se produce durante el desarrollo de la hoja y comprende adaptaciones morfológicas y bioquímicas especiales. Las hojas de sol poseen cloroplastos de tipo sol que están adaptados para funcionar a altas tasas de conversión cuántica fotosintética y por ende poseen una mayor capacidad fotosintética y contenido de clorofila (Chl *a* + *b*) por área foliar. A su vez, exhiben valores más altos del cociente Chl *a/b*, niveles más bajos de proteínas captadoras de luz (LHC-II), y un menor grado de apilamiento de tilacoides que las hojas de sombra con sus cloroplastos de tipo sombra[9, 10]. En síntesis, cada tipo de hoja contiene cloroplastos que maximizan la capacidad fotosintética para la intensidad de luz presente durante su desarrollo.

4.2. Metodología

4.2.1. Crecimiento de plantas

Se sembraron semillas de lechuga (*Lactuca Sativa*), y luego los brotes de un tamaño adecuado se transplantaron individualmente en macetas. Se dispusieron 10 plantas en dos bioterios con iluminación controlada con un fotoperíodo de 12 hs, de $25 \mu\text{mol}$ de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (baja irradiancia) y $300 \mu\text{mol}$ de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (irradiación media) cada una, hasta alcanzar un tamaño y parámetros fotosintéticos óptimos.

4.2.2. Extracción de pigmentos

Las muestras de hojas se lavaron con agua destilada y se eliminaron los nervios y pecíolos. Los pigmentos vegetales fotosintéticos se extrajeron con acetona al 80 % utilizando un mortero. Los extractos se centrifugaron y posteriormente se registró el espectro de absorbanzia en el rango del visible utilizando un espectrofotómetro de doble haz con cubetas de cuarzo (UV-3600 Plus, Shimadzu, Tokio, Japón). Se calcularon las concentraciones de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*) y carotenoides totales (*Cars*) utilizando las ecuaciones presentadas en la [Sección 3.3](#). Se determinaron luego los cocientes en peso de los pigmentos, Chl *a/b* y Chls/*Cars*.

4.2.3. Fluorescencia estacionaria

Las mediciones de fluorescencia estacionaria se realizaron en la cara superior de las hojas usando un espectrofluorómetro de estado estacionario en geometría frontal con un ángulo de 60° (*QuantaMaster*; PTI-Photon Technology International-Brunswick, EE. UU.). Los espectros se registraron a temperatura ambiente sobre hojas recién cortadas y adaptadas 20 minutos a la oscuridad. La longitud de onda de excitación se estableció en 460 nm (máximo en los espectros de excitación). Los espectros de emisión se registraron entre 600 y 800 nm y se corrigieron mediante la respuesta del detector a cada longitud de onda. El flujo de fotones utilizado fue inferior a 20 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en todos los casos, evitando la inducción de la fluorescencia variable. Para lograr estas condiciones, se utilizó una apertura del monocromador de excitación de 0,50 mm que corresponde a 2 nm.

Luego, los espectros de fluorescencia estacionaria se corrigieron según el modelo utilizado previamente por Ramos y Lagorio [11] para eliminar la distorsión producida por la reabsorción de luz. Para ello, se registraron los espectros de reflectancia de las hojas a transmitancia nula. Los espectros de reflectancia difusa de una capa ópticamente gruesa de hojas se registraron usando un espectrofotómetro (3101PC, Shimadzu, Tokio, Japn) equipado con una esfera integradora. Se utilizó sulfato de bario para el ajuste del 100 % de reflectancia.

4.2.4. Transiente OJIP

Los transientes de fluorescencia de clorofila (OJIP) se registraron con un *Plant Efficiency Analyser* (Handy-PEA, Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido). La curva OJIP se indujo utilizando un pulso saturante de $3000 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La determinación se realizó sobre hojas intactas previamente adaptadas a la oscuridad. El registro de la fluorescencia cubre el intervalo de tiempo entre $50 \mu\text{s}$ y 1 s, de forma de caracterizar completamente el transiente. La interpretación de los transitorios rápidos de fluorescencia se realizó de acuerdo con los supuestos y el modelo de flujos descriptos previamente en la [Sección 2.5](#). Una descripción detallada de los parámetros derivados del transiente OJIP, las ecuaciones correspondientes y sus definiciones se encuentran en el [Apéndice A](#).

4.2.5. Cinética de Kautsky y curva PSMT

La fluorescencia variable se investigó utilizando un fluorómetro de pulso modulado (*Hansatech Instruments*, FMS1). Dicho fluorómetro posee dos fuentes de luz diferentes, un haz de iluminación de la muestra que puede ser saturante o actínica, y el haz de medición modulado, que es de baja intensidad. El pulso de saturación utilizado tuvo una duración de 0,5 s con una intensidad de $2700 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que la intensidad de la luz actínica (LA) varió entre 0 y $1039 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con una duración de 30 minutos.

El protocolo experimental utilizado fue presentado previamente en la [Sección 3.8](#) del capítulo anterior. Las intensidades de LA utilizadas fueron: 0, 41, 93, 175, 287, 429, 602 y $1038 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Después de 30 minutos, se apagó la LA y se registró la etapa de recuperación del NPQ durante casi 50 minutos, en los que se aplicaron 11 pulsos de saturación a intervalos de tiempo no regulares.

La curva PSMT se registró junto con la cinética de Kautsky, ya que consiste básicamente en el decaimiento de la fluorescencia dentro de los primeros minutos tras encender una luz fotosintéticamente activa o saturante. La curva PSMT se registró durante los primeros 5 a 10 minutos de iluminación actínica. Los decaimientos se promediaron entre las réplicas para un mismo tratamiento lumínico. Tanto para la cinética de Kautsky como para la

curva PSMT se utilizaron las mismas curvas empleando el protocolo descripto más arriba. Se registraron dichas curvas para un total de 4 a 5 hojas por cada planta, para los dos tratamientos lumínicos estudiados.

4.3. Resultados

A partir del análisis individual y conjunto de las técnicas de fluorescencia de clorofila y la extracción de pigmentos, es posible realizar un análisis integral de la actividad y rendimiento de la cadena de transporte electrónico en su conjunto y de las distintas etapas que la conforman, así como una descripción global del estado de salud de la planta (o material fotosintético en cuestión). Análisis similares se realizaron para estudiar el efecto de distintas nanopartículas en las plantas.

4.3.1. Pigmentos

TABLA 4.1: Contenido y cociente de pigmentos para hojas de *L. Sativa* luego de una aclimatación a muy baja (muestra) y media (control) irradiancia. El contenido de pigmento se expresó en miligramos por gramo de materia foliar fresca (mg/g f.w.). ** y * representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente.

Pigmento (mg/g f.w.)	Iluminación	
	Muy baja (LL)	Media (Control)
Chl <i>a</i>	$0.612 \pm 0.247^*$	$0.163 \pm 0.040^*$
Chl <i>b</i>	$0.237 \pm 0.099^*$	$0.049 \pm 0.006^*$
Chl <i>a + b</i>	$0.848 \pm 0.347^*$	$0.212 \pm 0.046^*$
Cars	$0.158 \pm 0.067^*$	$0.054 \pm 0.017^*$
Cocientes		
Chl <i>a/b</i>	$2.6 \pm 0.1^{**}$	$3.3 \pm 0.3^{**}$
Chls/Cars	$5.4 \pm 0.1^{**}$	$4.0 \pm 0.9^{**}$

Los resultados obtenidos para el contenido de pigmento se muestran en la [Tabla 4.1](#) y fueron los esperados para esta especie según se ha informado en literatura[12-14]. Se observó que el contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides fue significativamente mayor en las plantas aclimatadas a baja iluminación (LL) con respecto al control (iluminación media). De manera similar, el cociente Chl *a/b* disminuyó significativamente en las

plantas LL respecto al control, tal como se esperaba para este tipo de tratamiento[15]. La adaptación del aparato fotosintético a baja iluminación implicó no solo un aumento en el tamaño de las antenas (para aumentar la captación de luz) y, por tanto, un aumento en la cantidad de pigmentos totales, sino también una disminución en la relación Chl *a/b*. Esto se debe a que Chl *b* se encuentra exclusivamente en el complejo antena (LHC), mientras que Chl *a* está presente tanto en las antenas como en los centros de reacción. Además, dado que la relación Chl *a/b* de la antena del fotosistema I (LHC-I) es mayor que la del fotosistema II (LHC-II), una disminución en el cociente Chl *a/b* es un indicador de un mayor aumento en la antena del PSII en comparación con la del PSI. De esta manera, la reducción observada en la proporción de Chl *a/b* en las plantas aclimatadas a baja irradiancia se debe principalmente a aumentos significativos en el contenido de Chl *b* y probablemente se deban a cambios en la organización de los componentes de captación de luz y transporte de electrones[16]. El marcado aumento en el contenido de clorofilas en las hojas LL demostró la capacidad de la planta para maximizar su capacidad de recolección de luz en condiciones de crecimiento de baja iluminación[17].

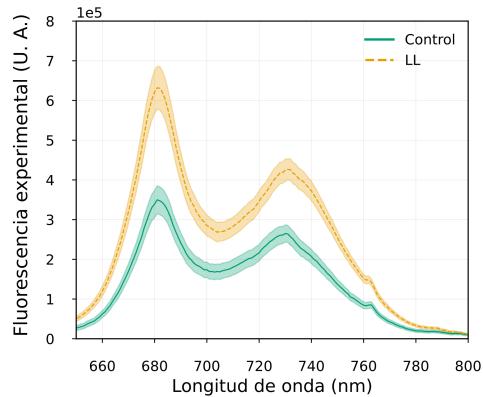
Los cocientes Chl *a/b* y Chls/Cars son parámetros conocidos que reflejan la aclimatación del aparato fotosintético a la luz[15, 16, 18-21]. Particularmente, la relación Chls/Cars es un indicador de verdor de las hojas. El aumento observado en este cociente en las hojas de LL, está fuertemente asociado con un nivel más bajo de carotenoides del ciclo de las xantófilas en comparación con las plantas control.

Estos resultados muestran que las diferencias en la intensidad lumínica en la aclimatación fueron suficientes para inducir cambios significativos en la composición y el contenido de pigmentos.

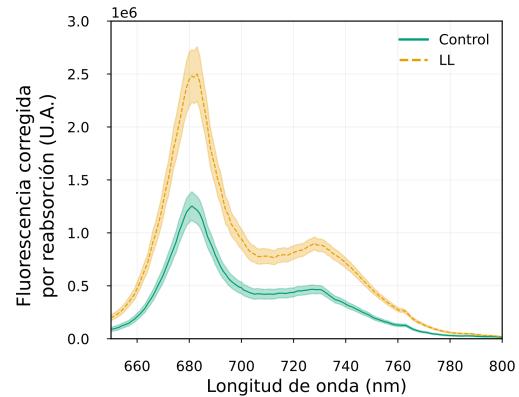
4.3.2. Fluorescencia estacionaria

El espectro de fluorescencia de las hojas se caracteriza por tener dos bandas, una a 680 nm (comúnmente llamada F_{red}) y otra a 730 nm ($F_{far-red}$), aproximadamente. La banda a 680 nm se debe a la emisión del PSII únicamente, mientras que ambos fotosistemas contribuyen a la banda de fluorescencia observada a 730 nm. Dado que el cociente $F_{red}/F_{far-red}$ es sensible a la población relativa de PSI y PSII presente en la hoja, se lo ha correlacionado

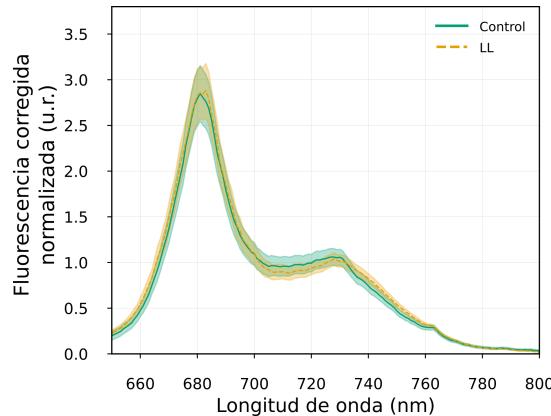
ampliamente en la literatura con varios factores de estrés[22-26]. La Fig. 4.1 presenta los espectros de fluorescencia experimentales, los espectros corregidos por reabsorción de luz y los espectros corregidos normalizados a 730 nm. Se observó una mayor intensidad de fluorescencia experimental y corregida para las hojas de *L. Sativa* aclimatadas a baja iluminación (LL) respecto al control. Dado que están presentes mecanismos de reabsorción de luz, no existe una correlación directa entre el contenido de clorofillas y la intensidad de fluorescencia[1, 23, 27].



A Espectro de fluorescencia estacionaria experimental.



B Espectro de fluorescencia estacionaria corregido por reabsorción de luz.



C Espectro de fluorescencia estacionaria corregido normalizado a 730 nm.

FIGURA 4.1: Espectros de fluorescencia estacionaria de hojas de *L. Sativa* bajo aclimatación a baja (naranja punteado) y media (verde) irradiancia. Las curvas representan el valor medio y la zona sombreada el error estándar.

Como se comentó anteriormente, el cociente $F_{red}/F_{far-red}$ para los espectros corregidos por reabsorción de luz es una herramienta ampliamente utilizada en el monitoreo de la salud vegetal y en particular se ha observado que dicho cociente de fluorescencia es mayor para hojas de sombra que para hojas de sol ya que las hojas de sombra desarrollan

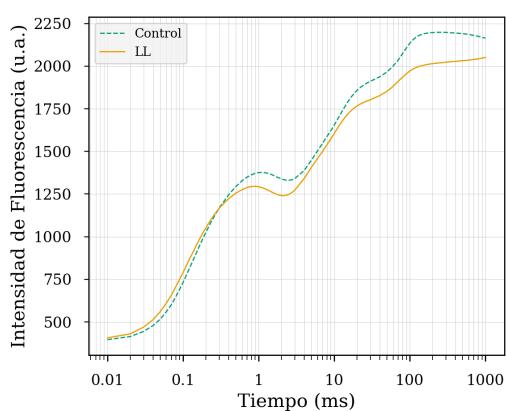
una mayor proporción de PSII para compensar la deficiencia de luz de longitud de onda corta[1, 28-30]. Como la distribución espectral de ambos entornos de aclimatación fue la misma, no se esperaban cambios en la relación $F_{red}/F_{far-red}$ para las hojas aclimatadas a iluminación media y baja. Efectivamente, no se observaron cambios en los cocientes $F_{red}/F_{far-red}$ para ninguna de las especies estudiadas incluyendo *L. Sativa* como se muestra en la Fig. 4.1 C. Por lo tanto, el tratamiento de baja iluminación no produjo cambios significativos en la población relativa de PSI y PSII con respecto al control. Este resultado es una primera diferenciación de los efectos diversos que producen la intensidad de luz de aclimatación y el sombreado.

4.3.3. Transiente OJIP

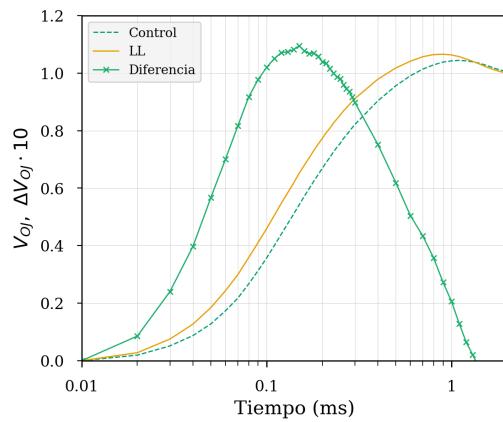
El efecto del tratamiento de baja irradiancia sobre los fotosistemas y la cadena de transporte electrónico durante la aclimatación se caracterizó en función de los cambios observados en los parámetros de la curva OJIP. La curva o transiente de fluorescencia OJIP proporciona información sobre la estructura y función del PSII e indirectamente del PSI[31]. En líneas generales, para *L. Sativa* se observó una disminución en la fluorescencia a lo largo de casi toda la curva, manteniendo constante el valor en el máximo (F_M) para las muestras aclimatadas a baja irradiancia respecto al control (Fig. 4.2 A). A partir de los valores de fluorescencia variable doblemente normalizados en el inicio (O) y otro punto de la curva (J, I ó P), es posible obtener un gran número de parámetros que brindan información específica de distintas etapas de la cadena de transporte de electrones fotosintético (ETC).

Usualmente el análisis de la curva OJIP comienza representando la fluorescencia variable normalizada en distintos puntos de la curva (V_{OP} , V_{OJ} y V_{OI}) de forma de identificar visualmente qué etapas de la ETC son las que sufrieron cambios. En ese sentido, bajo ciertas condiciones de estrés, es posible observar la aparición de un pico K en las curvas OJIP a aproximadamente $300 \mu s$ [32, 33]. Este pico se hace evidente cuando la curva OJIP se presenta como una fluorescencia variable relativa entre F_0 y F_J (V_{OJ}), o como la diferencia (ΔV_{OJ}) entre el tratamiento y el control, como se muestra en la Fig. 4.2 B.

El transitorio OJIP es una señal rica y compleja a partir de la cual se pueden obtener múltiples parámetros que se refieren a diferentes etapas de la cadena de transporte electrónico



A Transiente de fluorescencia de clorofila a , en escala de tiempo logarítmica, de hojas aclimatadas a intensidad lumínica media (control) y muy baja (LL).



B Fluorescencia variable relativa ($V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$) y diferencia cinética de V_{OP} ($\Delta V_{OP} = V_{OP,LL} - V_{OP,control}$) en hojas que fueron aclimatadas a intensidad lumínica media (control) y muy baja (LL).

FIGURA 4.2: Transiente OJIP experimental y normalizado en O y J. La escala de tiempo es logarítmica. Las curvas corresponden a un promedio de 8-10 hojas.

(detalles de cada uno en el [Apéndice A](#)). Como la cantidad de parámetros derivados de la curva OJIP es abundante, suelen utilizarse figuras como la [Fig. 4.3](#) donde se representan algunos de los parámetros en un gráfico de araña o con distribución radial, donde los parámetros se muestran relativos al control. Esto se debe a que dichos parámetros suelen tener valores absolutos muy diferentes entre sí. Este tipo de figuras suele ser útil para diferenciar visualmente la tendencia de los cambios observados, mientras que la [Tabla 4.2](#) describe los valores y la significancia estadística de esos cambios.

Entre los parámetros fundamentales y más estudiados, se destaca el rendimiento cuántico fotoquímico máximo ($F_V/F_M = \Phi_{P_0}$) el cual es un indicador de estrés ambiental[34]. En conjunto con otros parámetros mencionados en la [Sección 2.5](#), como el rendimiento cuántico del transporte de electrones desde Q_A a Q_B (Φ_{ET_0}), el rendimiento cuántico del transporte de electrones hasta los aceptores de electrones del PSI (Φ_{RE_0}) y la energía absorbida por RC activos (ABS/RC), es posible realizar una descripción simple del efecto global de la actividad de la ETC, en base a estos cuatro parámetros fundamentales. Estos parámetros fueron sensibles al tratamiento y se resumen, entre otros, en la [Tabla 4.2](#). Por otro lado, todos los rendimientos y eficiencias cuánticas disminuyeron debido al tratamiento de baja irradiancia, mientras que los flujos de energía por RC activo (absorción ABS/RC , disipación DI/RC , transferencia de energía TR/RC , transporte electrónico ET/RC y reducción de aceptores del PSI RE/RC), aumentaron luego del tratamiento.

TABLA 4.2: Efectos de la aclimatación en los parámetros derivados de la curva OJIP para *L. Sativa*.** y * representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente, con $n = 12$.

Parámetro	Control	LL	Parámetro	Control	LL
F_0	$323 \pm 41^{**}$	$422 \pm 70^{**}$	ABS/RC	$3.2 \pm 0.3^*$	$3.8 \pm 0.7^*$
F_M	2219 ± 184	2205 ± 247	DI_o/RC	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.4
F_V	1895 ± 203	1783 ± 303	TR_o/RC	$2.7 \pm 0.2^*$	$3.0 \pm 0.2^*$
F_K	$1159 \pm 133^*$	$1290 \pm 74^*$	ET_o/RC	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1
F_J	1340 ± 130	1382 ± 110	RE_o/RC	0.42 ± 0.03	0.37 ± 0.07
F_I	1927 ± 158	1981 ± 198	RC/ABS	$0.31 \pm 0.03^{**}$	$0.26 \pm 0.03^{**}$
F_V/F_M	$0.85 \pm 0.02^*$	$0.80 \pm 0.06^*$	RC/CS	$100 \pm 7^{**}$	$110 \pm 6^{**}$
F_V/F_0	$6.0 \pm 1.1^{**}$	$4.4 \pm 1.2^{**}$	Φ_{P_0}	$0.85 \pm 0.02^*$	$0.80 \pm 0.06^*$
V_{OK}	$0.44 \pm 0.05^*$	$0.49 \pm 0.03^*$	Ψ_{ET_0}	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.02
V_{OJ}	0.53 ± 0.03	0.54 ± 0.02	Φ_{ET_0}	0.40 ± 0.02	0.37 ± 0.03
V_{OI}	$0.84 \pm 0.01^{**}$	$0.88 \pm 0.03^{**}$	δ_{RE}	$0.33 \pm 0.04^*$	$0.27 \pm 0.07^*$
M_0	$1.5 \pm 0.1^*$	$1.6 \pm 0.1^*$	Φ_{RE_0}	$0.13 \pm 0.01^{**}$	$0.10 \pm 0.03^{**}$
N	$42 \pm 3^{**}$	$37 \pm 3^{**}$	PI_{ABS}	$1.6 \pm 0.4^{**}$	$1.0 \pm 0.3^{**}$
S_M	$15 \pm 1^{**}$	$12 \pm 2^{**}$	PI_{ABS}^{total}	$0.8 \pm 0.2^{**}$	$0.4 \pm 0.2^{**}$

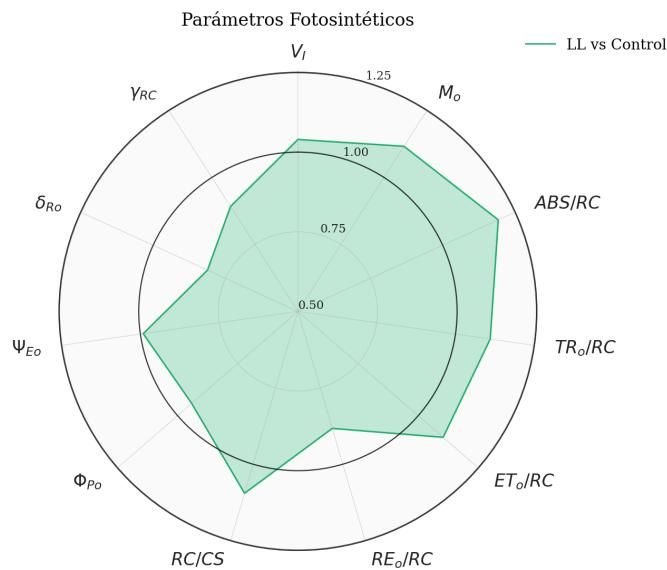


FIGURA 4.3: Gráfico de distribución radial de parámetros OJIP seleccionados para hojas de *L. Sativa* aclimatadas a diferente intensidad de luz. Para cada parámetro, el valor del control se estableció como 1.

Los cambios observados en las hojas tratadas con baja irradiancia fueron los esperados ya que los parámetros relacionados con la captación de luz (como ABS/RC) fueron ma-

yores en LL, lo cual es consistente con la mayor concentración de pigmentos. Esta bien reportado, para plantas de sombra o aclimatadas a luz de sombra (enriquecida en longitudes de onda del rojo lejano) que la respuesta fisiológica del aparato fotosintético a estos ambientes involucra la síntesis de pigmentos. Esta ampliación del tamaño de las antenas captadoras de luz (LHC) de ambos fotosistemas, conduce a una disminución del cociente Chl *a/b*[15, 16, 18-21]. Por otro lado, los rendimientos cuánticos disminuyeron producto del estrés lumínico aplicado (Fig. 4.3). Por ello, que los flujos aumenten por RC activo a pesar de que las eficiencias y rendimientos cuánticos disminuyen, podría deberse a una disminución de los RC activos (denominador de esos parámetros) y no a un aumento real en los flujos de energía (numerador). A continuación, en la Sección 4.4, se combinan los resultados de esta técnica, la extracción de pigmentos y fluorescencia estacionaria, para identificar qué etapa de la ETC fue la más afectada por el tratamiento.

4.3.4. Curva PSMT

Cuando se enciende la luz actínica en el fluorómetro de pulso modulado (PAM), se puede observar la disminución de la fluorescencia desde el punto P (máximo) hasta un mínimo en estado estacionario (T) cuya traza temporal se denomina curva PSMT. La Fig. 4.4 muestra los gráficos semilogarítmicos de fluorescencia normalizada en función del tiempo para intensidades de luz actínica baja, media y alta. En primer lugar, se observó que los trazos de fluorescencia muestran decaimientos monótonos en la segunda parte de la curva (después de 10 segundos), lo que está de acuerdo con la idea de que la curva de PSMT está dominada por el *quenching* de transición de estado (q_E)[35, 36]. El rápido decaimiento en PS es una consecuencia del *quenching* fotoquímico (q_P). Cuando la luz actínica es baja, la saturación de la reserva de PQ ocurre antes de que q_E sea significativo, un hecho que conduce a una meseta o pico M alrededor de los 10 segundos. Con el aumento de la LA, la saturación del conjunto de PQ se desplaza a tiempos menores, q_E se acelera y, por lo tanto, el pico M desaparece. Este comportamiento se observó para las plantas de *L. sativa*, tanto para las plantas control como para las tratadas con LL. Sin embargo, a LA media, el pico M está ausente en las plantas control pero se observa nítidamente en las plantas aclimatadas a baja irradiancia.

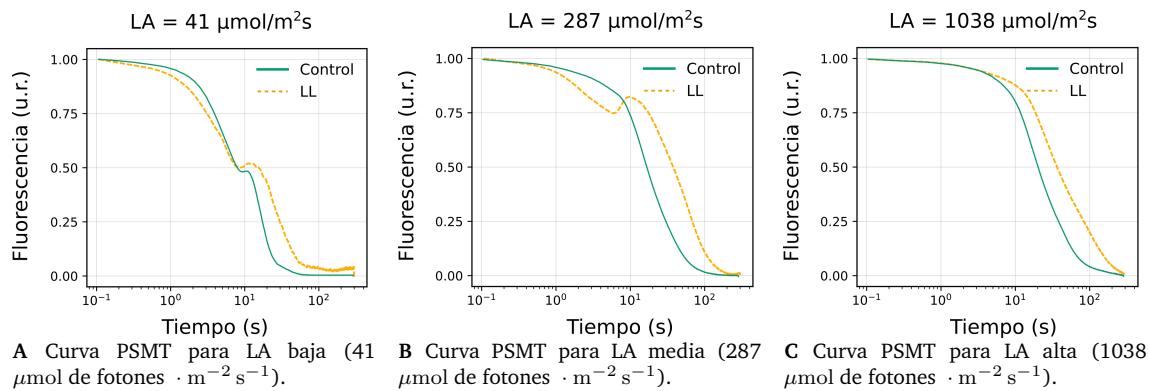


FIGURA 4.4: Curvas PSMT de plantas control y LL, bajo diferentes LA en función del tiempo. La fluorescencia está normalizada a nivel del pico (P) y en el estado estacionario (T). Las intensidades de luz actínica baja, media y alta utilizadas, fueron 41, 287 y 1038 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

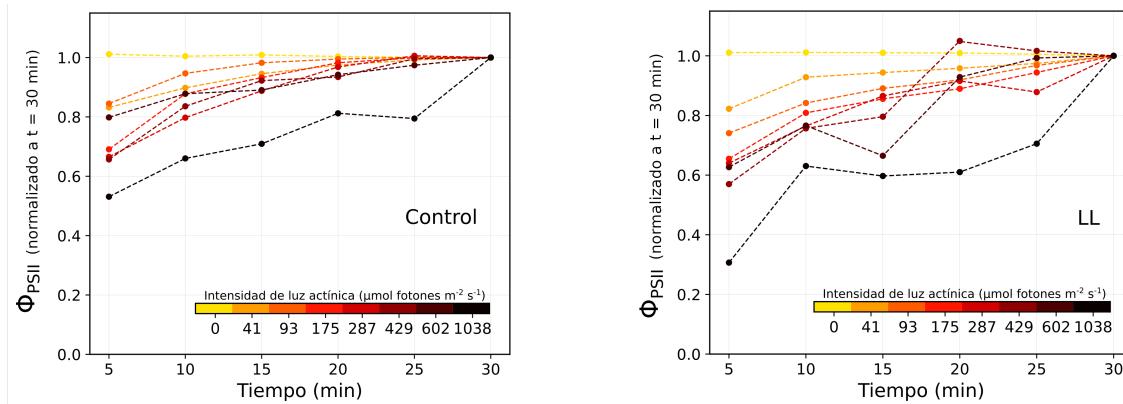
4.3.5. Dinámica temporal de los parámetros de la cinética de Kautsky

Uno de los objetivos del trabajo aquí citado, fue encontrar y presentar las condiciones óptimas de medición para el análisis de la cinética de Kautsky. Además, se elaboraron pautas generales de medición para la correcta determinación de los parámetros derivados de la misma.

Si bien en la mayoría de los trabajos en donde se registra la cinética de Kautsky o fluorescencia variable en el tiempo bajo iluminación actínica, se deja stabilizar la fluorescencia hasta un estado estacionario, no hay un consenso general sobre cuánto es el tiempo mínimo necesario para ello. Para determinarlo, en el protocolo presentado en la Fig. 3.6 se aplicaron cinco pulsos de saturación durante 30 minutos de aclimatación actínica, de forma de identificar el tiempo mínimo necesario para dicha estabilización de la fluorescencia. A partir de los pulsos de saturación y los correspondientes máximos de fluorescencia (F_M') fue posible determinar distintos rendimientos cuánticos.

A continuación, se presenta en la Fig. 4.5 la evolución temporal relativa al valor obtenido a los 30 minutos, del rendimiento cuántico del PSII, Φ_{PSII} , bajo diferentes intensidades de iluminación actínica. En líneas generales, se requieren de 20 minutos de iluminación para una completa aclimatación y por ende, estabilización de la fluorescencia variable. Por otro lado, a mayor LA, mayor fue la variación de estos parámetros con el tiempo. De esta forma, a bajas LA, unos 10 a 15 minutos de iluminación fueron suficientes para alcanzar

una estabilización, pero a altas LA se necesitaron entre 20 a 25 minutos de iluminación para que la fluorescencia alcance un estado estacionario.



A Rendimiento cuántico del PSII de hojas control relativo al valor obtenido a los 30 minutos de aclimatación actínica, en función del tiempo de iluminación, para distintas LA aplicadas.

B Rendimiento cuántico del PSII de hojas LL relativo al valor obtenido a los 30 minutos de aclimatación actínica, en función del tiempo de iluminación, para distintas LA aplicadas.

FIGURA 4.5: Rendimientos cuánticos del PSII en función del tiempo de iluminación actínica.

Por ultimo, la variación de los parámetros de las hojas LL en función del tiempo, fue mayor que la variación temporal observada en las hojas control. Esta diferencia aumentó conforme aumentaba la intensidad de LA aplicada.

4.3.6. Fase actínica - Partición de energía

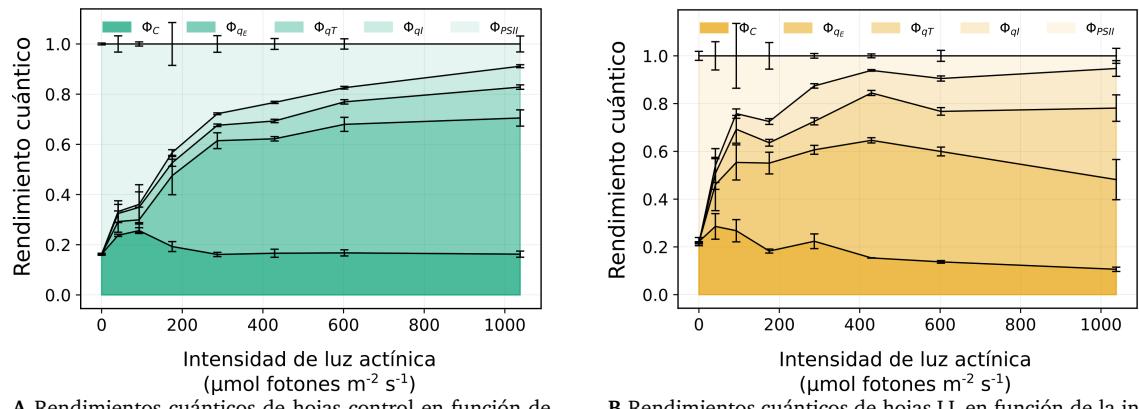
Los resultados de la partición de energía entre la fotosíntesis (Φ_{PSII}), la disipación de calor por NPQ (Φ_{NPQ}) y el decaimiento fotofísico (Φ_C), a diferentes intensidades de LA, se resumen en la Fig. 4.6. Esta figura ilustra por separado los rendimientos cuánticos de los componentes del NPQ que se obtuvieron del modelo biexponencial propuesto en este trabajo, cuyos parámetros se discuten por separado en la Subsección 4.3.7. Para ambos tratamientos, el rendimiento cuántico fotofísico (Φ_C) fue prácticamente constante. A pesar de un ligero aumento a bajas LA, se mantuvo alrededor de 0.2 para todo el rango de LA estudiadas. Se publicaron resultados similares en la literatura[4, 37, 38] pero no se discutió una causa posible para este resultado. Un valor de Φ_C constante de ~ 0.2 significa que, a cualquier iluminación actínica, la máxima eficiencia posible de la primera etapa de la fotosíntesis es de alrededor del 80 %. En otras palabras, la fracción de energía disipada por

decaimiento no radiativo o fluorescencia siempre es del $\sim 20\%$ para cualquier intensidad de LA aplicada. Esto se debe a que dicha eficiencia máxima fotoquímica es una propiedad intrínseca del sistema y de la transferencia de energía propia dentro de las antenas y el centro de reacción del PSII, y no es un punto de adaptación o aclimatación a la intensidad de la luz actínica.

A diferencia de Φ_C , el rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) y el rendimiento cuántico del NPQ (Φ_{NPQ}) mostraron una dependencia fuerte y opuesta con la intensidad de LA. Para las plantas control a intensidades de irradiancia muy bajas (LA $< 50 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), menos del 10 % de la energía absorbida se disipó a través de mecanismos NPQ y más del 70 % se utilizó en la cadena de transporte de electrones (Fig. 4.6 A). Sin embargo, el Φ_{PSII} se redujo al $\sim 40\%$ (aproximadamente la mitad de la eficiencia máxima) a $200 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para el control de *L. sativa*. A intensidades de luz actínicas altas esta relación se invirtió y el Φ_{NPQ} fue el mecanismo de desactivación dominante, alcanzando un $\sim 70\%$, donde solo uno de cada diez fotones absorbidos se utilizó en la cadena de transporte de electrones.

Para el tratamiento con LL, las plantas de *L. sativa* fueron las más afectadas de las especies estudiadas en el trabajo que aquí se resume. De hecho, a $100 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, las plantas de control mostraron $\Phi_{PSII} \sim 0,6$ y las plantas aclimatadas a baja iluminación, presentaron un $\Phi_{PSII} \sim 0,2$. En general, los valores de Φ_{PSII} disminuyeron más abruptamente para las plantas aclimatadas a baja irradiancia (LL) que para las plantas de control, con el aumento de la LA (Fig. 4.6).

Por otro lado, el análisis de las tasas fotosintéticas máximas del PSII (PS_{rate}) permite algunas comparaciones interesantes entre tratamientos. Como se muestra en la Fig. 4.7, en líneas generales la curva correspondiente a las tasas fotosintéticas de las plantas LL se encuentra por debajo de la curva correspondiente a las plantas control. Si bien el rendimiento cuántico Φ_{PSII} da una idea de la proporción de energía absorbida que se utiliza en la fotosíntesis, el PS_{rate} se correlaciona directamente con la tasa fotosintética total. Cabe señalar entonces, que a pesar de que las plantas LL poseen mayor contenido de pigmentos por área foliar, la tasa fotosintética y el rendimiento cuántico de la misma, fueron menores



A Rendimientos cuánticos de hojas control en función de la intensidad de la luz actínica.

B Rendimientos cuánticos de hojas LL en función de la intensidad de la luz actínica.

FIGURA 4.6: Rendimientos cuánticos en función de la intensidad de la luz actínica. Los rendimientos cuánticos de los componentes del NPQ se presentan por separado, por lo tanto, el rendimiento cuántico del NPQ total se puede obtener sumando los rendimientos de los componentes individuales.

que para las plantas control.

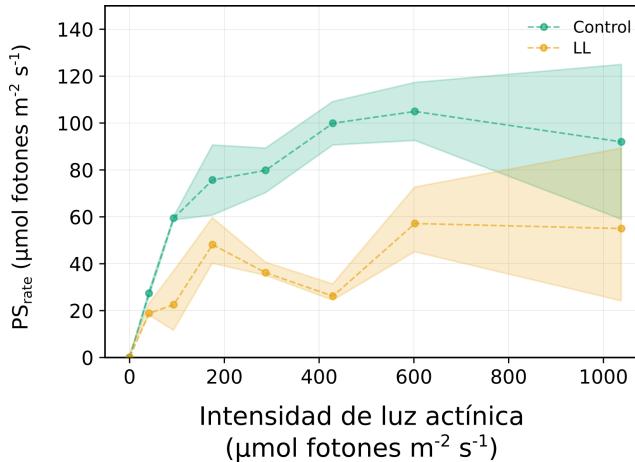


FIGURA 4.7: PS_{rate} en función de la intensidad de luz actínica. Las áreas sombreadas representan el desvío estándar asociado.

La tasa fotosintética alcanza un valor de saturación, determinado por la capacidad máxima de los transportadores de electrones de dicha cadena de transporte electrónico, que en este caso se observa para ambos tratamientos a alrededor de $600 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Luces actínicas por encima de dicho valor, no producen un aumento en la tasa fotosintética ya que se encuentra saturada. Sin embargo, en este intervalo sí hay un disminución del Φ_{PSII} dado que la proporción de energía usada para la fotosíntesis es menor debido a que se absorbe una mayor cantidad de fotones.

Por último, se pone en evidencia tanto en la Fig. 4.6 como en la Fig. 4.7, la dependencia de los parámetros con la intensidad de la luz actínica. Si bien la distribución de energía analizada en esta sección es muy importante y aporta al entendimiento de la partición de energía en las hojas, esta distribución depende fuertemente del tiempo durante el cual estuvo encendida la luz actínica. Es por ello necesario, para describir correcta y completamente dicha distribución de energía, realizar un estudio de la cinética de Kautsky a diferentes luces actínicas. Estas intensidades dependerán de la muestra fotosintética, pero como mínimo se necesitan tres luces actínicas diferentes (baja, media y alta) para describir completamente los rendimientos cuánticos fotosintéticos, entre otros parámetros relevantes.

4.3.7. Fase de recuperación del NPQ

Los pulsos de saturación durante la fase de recuperación del NPQ permiten estimar la capacidad fotosintética máxima y también, si se cumplen ciertos requisitos experimentales, es posible estimar la contribución de cada componente del NPQ al rendimiento cuántico del NPQ total. El rendimiento cuántico del NPQ total (Φ_{NPQ}) no es útil para calcular k_{NPQ} porque este parámetro aparece tanto en el numerador como en el denominador (Ec. 2.12). Por lo tanto, si se grafica k_{NPQ}/k_C en función del tiempo, donde para cada LA se cumple que k_C permanece constante, el cociente k_{NPQ}/k_C resulta ser directamente proporcional a k_{NPQ} . El cociente k_{NPQ}/k_C se obtiene dividiendo los rendimientos cuánticos Φ_{NPQ} y Φ_C entre sí.

$$\frac{k_{NPQ}(LA, t)}{k_C} = \frac{\Phi_{NPQ}(LA, t)}{\Phi_C(LA, t)} \quad (4.1)$$

En la Fig. 4.8 se comparan las curvas de k_{NPQ}/k_C a distintas luces actínicas para cada tratamiento. La figura se muestra en escala semi-logarítmica no solo para facilitar la comparación de los decaimientos entre las muestras, sino para evidenciar que el comportamiento no es mono-exponencial. Como puede observarse, a cada LA, las curvas de las plantas LL mostraron valores de k_{NPQ}/k_C mayores que las curvas de las plantas control. Se observó la misma tendencia al comparar la traza a un dado tiempo de recuperación. Esto se visualiza mejor en la curva que corresponde a la mayor intensidad de LA. Por lo tanto, dado que k_C permaneció prácticamente constante para todas las LA y no difirió

significativamente entre el control y LL, la variación en las curvas k_{NPQ}/k_C en función del tiempo sigue la misma tendencia que k_{NPQ} .

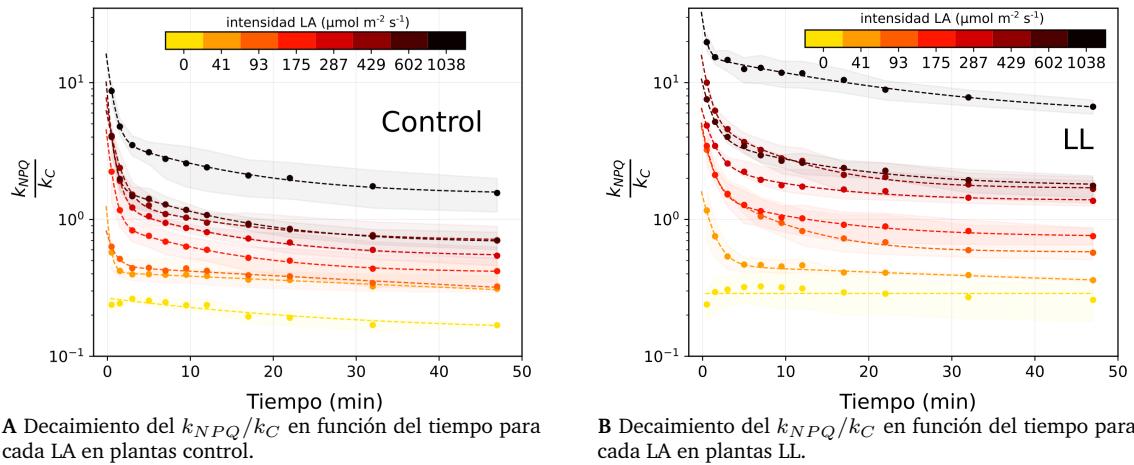


FIGURA 4.8: Decaimiento del k_{NPQ}/k_C en función del tiempo en escala semi-logarítmica (eje Y). Las líneas punteadas representan las curvas ajustadas utilizando el modelo biexponencial propuesto y las zonas sombreadas representan el error estándar experimental asociado al decaimiento de k_{NPQ}/k_C (no al ajuste).

Luego, para separar las diferentes contribuciones al NPQ, se ajustó la traza temporal de k_{NPQ}/k_C con un modelo bi-exponencial presentado en la [Ec. 2.18 del Capítulo 2](#). A partir de este ajuste, se obtuvieron los parámetros $q_E(LA)$, $q_T(LA)$ y $q_I(LA)$, que representan la amplitud del *quenching* dependiente de energía (q_E), de transición de estado (q_T) y *quenching* inhibitorio (q_I), los cuales son a su vez, funciones de la luz actínica. Los primeros dos, tienen asociados un tiempo característico dado por τ_E y τ_T , respectivamente, mientras que q_I contribuye al *quenching* total como una constante. Finalmente, se calculó la fracción del NPQ total correspondiente a cada componente para cada luz actínica. Para ello se multiplicó el NPQ total por la proporción de cada *quenching*, obtenido tras el ajuste de $k_{NPQ}/k_C(t)$.

La [Fig. 4.9](#) muestra los tiempos de desactivación característicos individuales de cada componente a las diferentes LA estudiadas. Los valores correspondientes al *quenching* dependiente de energía (τ_E) se encuentran en el rango de valores esperado según los cálculos de Ptushenko y cols.[\[3\]](#), de alrededor de $\sim 30 - 60$ s, y también de acuerdo con los descritos previamente en la literatura para la desactivación del NPQ asociado al ΔpH . Con respecto al tiempo característico asociado al *quenching* del estado de transición (q_T), es

difícil encontrar estimaciones confiables en la literatura, por lo que las comparaciones son escasas. Sin embargo, el rango alrededor de ~ 20 min obtenido para el τ_T de *L. sativa* es compatible con los valores obtenidos por Ptushenko y cols.[3] para el *quenching* asociado con el ciclo de las xantófilas en hojas de *Tradescantia sp*. Finalmente, el tiempo de desactivación del *quenching* inhibitorio, q_I , fue mayor que el lapso de tiempo aquí estudiado, es decir mayor de 50 minutos.

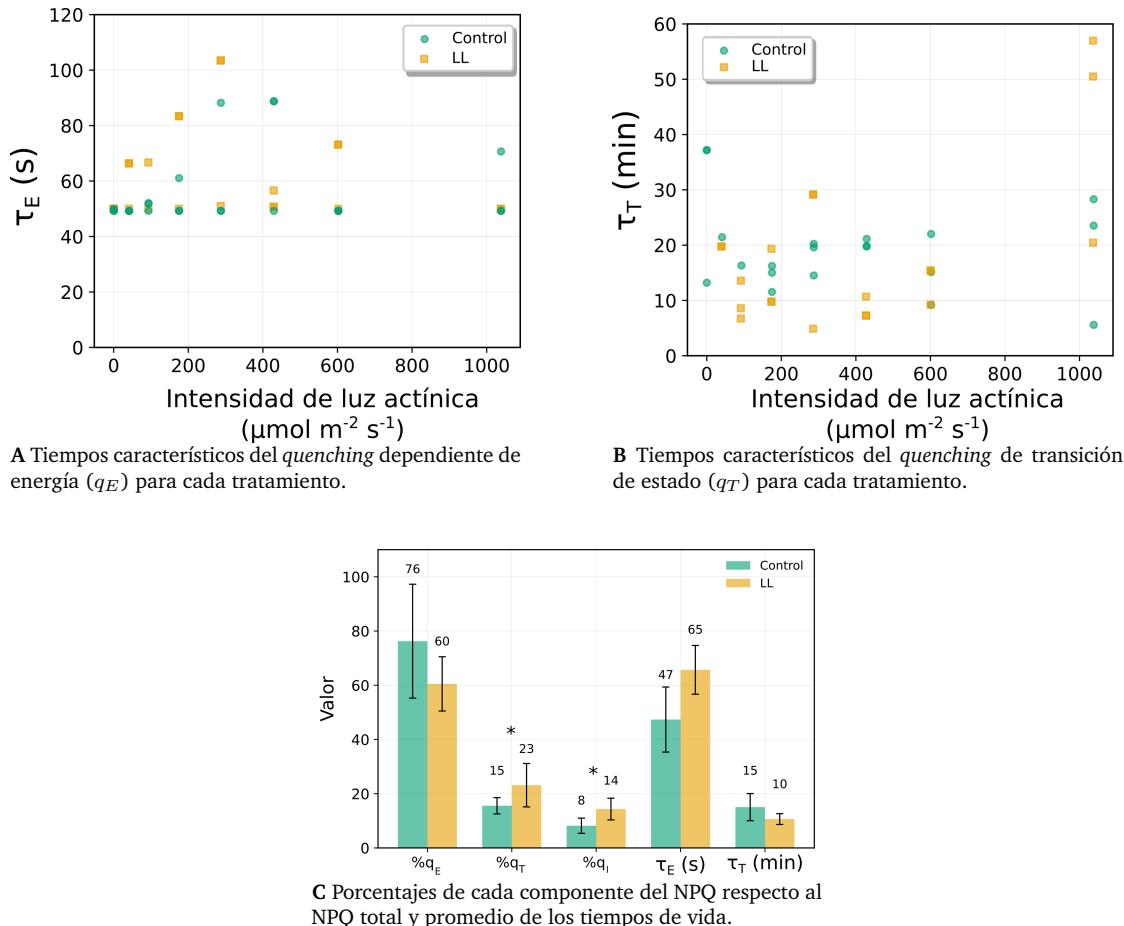


FIGURA 4.9: Tiempos de desactivación característicos para los componentes del NPQ y la proporción relativa de cada componente.

Curiosamente, los tiempos de desactivación característicos no han mostrado, en líneas generales, una dependencia significativa con la LA. La única diferencia relevante se encontró para la máxima LA estudiada, $1038 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde τ_T de plantas LL presentaron valores más altos que el control y, particularmente en comparación con el resto de los valores a intensidades actínicas menores. Más allá de esa diferencia, el tratamiento de aclimatación a poca luz no ha producido cambios en los tiempos de desactivación.

Asimismo, todos los valores de τ_E para el control y LL fueron similares entre sí, a cada LA estudiada.

4.4. Discusión

Después del tratamiento con baja iluminación, el contenido total de clorofilas y carotenoides aumentó. Este resultado refleja una estrategia general para aumentar la captura de energía en condiciones de iluminación deficiente. *L. sativa*, con metabolismo de carbono tipo C3, respondió con una disminución en el cociente Chl *a/b*. Este es un comportamiento típico que se observa cuando aumenta el tamaño de la antena captadora de luz. Tanto Chl *a* como Chl *b* se encuentran en las antenas, LHC-I y LHC-II, pero solo Chl *a* está presente en los RC de los fotosistemas. Por ende, un aumento en el tamaño de la antena, conduce a niveles más altos en las concentraciones de Chl *a + b*. Sin embargo, dado que el número de Chl *a* en los centros de reacción no aumenta, la relación de Chl *a/b* disminuye.

En cuanto a los carotenoides, se registró un aumento en su concentración en plantas tratadas con baja irradiancia respecto a los controles. Esta disminución que puede atribuirse también a un aumento en el tamaño de las antenas en condiciones LL. Es bien sabido que el número de *Cars* por clorofila generalmente aumenta bajo una iluminación intensa para proteger los centros de reacción a través de mecanismos del NPQ, particularmente mediante el ciclo de las xantófilas [19, 21]. En un entorno de baja irradiancia, esta fotoprotección es menos necesaria y entonces sería razonable que se redujera el número de carotenoides por clorofila. Este hecho fue evidenciado por el aumento en el cociente Chls/Cars tras el tratamiento de baja iluminación.

El análisis de los espectros de fluorescencia corregidos por reabsorción de luz proporciona información importante sobre la relación entre los fotosistemas. Se ha propuesto en la literatura que la relación de fluorescencia corregida está relacionada con la estequiometría de los fotosistemas, que a su vez depende de la calidad espectral de la fuente de luz utilizada durante el desarrollo de las hojas [28, 30, 39]. En este trabajo, dado que la intensidad de la luz de aclimatación disminuyó sin alterar su distribución espectral, el cociente de fluorescencia corregido por reabsorción de luz ($F_{red}/F_{far-red}$) no se vio afectado por el

tratamiento y, por lo tanto, no se observó variación en la estequiometría de los fotosistemas.

La aclimatación y el efecto en las distintas etapas de la cadena de transporte electrónico (ETC) se visualizó perfectamente en los parámetros obtenidos a partir de los transitorios de fluorescencia de clorofila. Después del tratamiento con baja irradiancia, la absorción de luz por centro de reacción (ABS/RC), que representa el tamaño aparente de la antena, aumentó. Este resultado está de acuerdo con la disminución observada para la relación Chl *a/b* a partir de la determinación del contenido de pigmentos, que sugiere también un aumento en el tamaño de la antena.

El pico K observado en la curva OJIP se ha asociado generalmente con estrés por calor[40], pero también se ha informado bajo estrés debido a deficiencia de nutrientes[41] y sequía[42], e incluso en plantas en ambientes naturales no estresadas[43]. La aparición de un pico K es un fenómeno que se puede observar tanto cuando hay una inactivación del complejo que desarrolla oxígeno (OEC), un aumento del tamaño de la antena funcional PSII o un cambio en el estado redox del *pool* de plastoquinonas (PQ)[44, 45]. Sin embargo, el daño de OEC también se puede diagnosticar a partir de la relación F_K/F_J , que indica el grado de inactivación del lado donante del PSII[43]. Como la relación F_K/F_J obtenida para *L. sativa* es ligeramente superior en las hojas aclimatadas a LL que en los controles (Tabla 4.2), no se descartan daños en el OEC. Por ende, tanto el aumento de la antena funcional como la inactivación parcial del OEC contribuyen a la formación del pico K observado para *L. sativa* aclimatadas a LL respecto al control.

En la Fig. 4.6, los valores a intensidad LA cero, en ausencia de mecanismos NPQ, son equivalentes a F_V/F_M (y también a los Φ_{P_0} obtenidos del transiente OJIP). Ambos valores, que representan el rendimiento cuántico fotoquímico máximo del PSII, están en concordancia con los reportados en bibliografía para una planta C3 saludable como *L. Sativa* en las condiciones de iluminación del control. Dicho valor máximo está establecido en ~ 0.83 para plantas con metabolismo C3[41, 46-48]. La aclimatación LL afectó fuertemente el rendimiento fotoquímico máximo del PSII para *L. sativa* de acuerdo a las variaciones observadas en Φ_{PSII} presentados en la Fig. 4.6.

Aunque se han calculado parámetros fotosintéticos para hojas adaptadas a la oscuridad y para hojas adaptadas a una determinada luz actínica en muchos trabajos, este no es el caso de la fase de recuperación del NPQ. Tras el ajuste biexponencial de cada traza temporal de k_{NPQ}/k_C , se obtuvieron los componentes del NPQ y el *quenching* dependiente de energía (q_E) resultó ser el componente más significativo en todos los casos, aún en el amplio rango de LA estudiadas. Su contribución osciló entre el 50 % y el 85 % del NPQ total (Fig. 4.6). Además, el componente inhibidor (q_I) si bien aumentó lentamente con el incremento de la intensidad de LA, siempre se mantuvo alrededor de 0.1, es decir cerca del 10 % de los fotosistemas sufrieron daños permanentes o cambios irreversibles bajo la aclimatación para las intensidades actínicas estudiadas. Es razonable y esperado que dicho componente aumente conforme aumenta la LA debido a que altas irradiancias aumentan el tiempo de vida del estado excitado del RC del PSII, y con esto la probabilidad de formación del triplete. Este último a su vez, puede producir especies reactivas de oxígeno que en última instancia, producen daños en las membranas y en la actividad de enzimas y proteínas en los cloroplastos. El *quenching* del estado de transición (q_T) fue el componente más variable. En la Fig. 4.9C se representa un promedio general de la proporción de cada componente de *quenching* al NPQ total. En líneas generales se observó una disminución no significativa de q_E y un incremento significativo ($p < 0.01$) en q_T y q_I bajo el tratamiento de baja iluminación respecto al control. Por otro lado, a altas LA como se observa en Fig. 4.6, la proporción de *quenching* asociado al estado de transición aumenta abruptamente. Esto tiene sentido ya que a altas irradiancias, el lumen se acidifica fuertemente e induce la transición de estado en las antenas lo que implica un aumento en q_T . Cabe destacar que lo presentado en la Fig. 4.9C corresponde a proporciones relativas del *quenching* respecto al NPQ total y no a valores absolutos de *quenching* los cuales están presentados en la Fig. 4.6.

A pesar de que la contribución de cada componente del NPQ fue sensible al tratamiento LL, este no fue el caso para sus respectivos tiempos característicos. Estos permanecieron constantes respecto tanto del tratamiento como de la intensidad de la luz actínica aplicada. Esto es razonable debido a que los tiempos de vida son característicos del tipo de proceso en cuestión, más específicamente de la cinética de su decaimiento. Dado que los

fenómenos son los mismos y lo único que varía es la proporción relativa de cada uno de ellos a distintas LA o tratamientos, es esperable que los tiempos de vida no cambien a menos que haya algún tipo de bloqueo en los mecanismos involucrados. Esta observación es novedosa e interesante, porque evidencia que la respuesta de la planta al aumento de la irradiancia no implica un *quenching* más duradero o bien, de forma más general, un cambio en la cinética de los procesos de NPQ involucrados.

También es interesante analizar comparativamente las curvas PSMT y los resultados de las otras dos técnicas de fluorescencia variable. En las hojas aclimatadas a baja irradiancia, la meseta M fue fácilmente observable bajo luz actínica baja y media, mientras que para los controles solo se observó a LA baja como se muestra en Fig. 4.4. La meseta M en plantas superiores se evidencia cuando la saturación del *pool* de PQ ocurre antes de que q_E se vuelva significativa[36]. En consecuencia, para las plantas LL, Φ_{q_E} fue mayor en LL que para los controles, para cada LA. A partir de los pulsos de saturación durante la fase actínica de la cinética de Kautsky, se pudo estimar un *quenching* fotoquímico, q_P , que resultó ser menor para las plantas LL que para los controles. Además, los valores de fluorescencia relativa variable obtenidos de los transitorios OJIP, como V_K , V_J , V_I , fueron más altos para las plantas LL que para los controles. Estos parámetros representan la fracción de RC cerrados y, de acuerdo con la teoría de Duysens y Sweers, también indican la proporción de Q_A reducido en cada punto, K, J e I, respectivamente. En conjunto, estas observaciones sugieren un grupo más pequeño de aceptores de electrones, ya que la saturación se logra más rápido, para las plantas LL en comparación con el control. Este hecho también es consistente con los rendimientos cuánticos más bajos, un Φ_{q_E} más alto y la observación de la meseta M aún a LA medias, en comparación con los controles. Por último, dos parámetros de la curva OJIP específicos que refieren directamente al número total de aceptores de electrones son N (número total de electrones transferidos) y S_M (número de portadores de electrones). Ambos parámetros disminuyen significativamente en las hojas aclimatadas a baja iluminación, indicando un menor número de aceptores totales de electrones en las plantas LL respecto al control.

4.5. Conclusiones

En el trabajo aquí resumido se presentó una visión profunda de la fluorescencia de la clorofila como indicador del estado fisiológico de las plantas. Se incluyó una imagen comparativa completa de las metodologías de análisis disponibles y se proporcionó un nuevo modelo para obtener los componentes del NPQ. Toda la metodología se utilizó para analizar los cambios a nivel fotosintético por aclimatación a luz sub-óptima.

El análisis del contenido de pigmento sugiere que *L. sativa* mostró el comportamiento tradicional de aclimatación a baja iluminación. El análisis de fluorescencia de clorofila permitió una comprensión y una caracterización más profundas de los cambios fisiológicos en el tratamiento con poca luz. La aclimatación de *L. sativa* implicó un aumento en el tamaño de la antena, lo que fue sugerido por el análisis de pigmentos y confirmado por la prueba OJIP. Este incremento en la antena condujo a un aumento del flujo de fotones absorbidos, el cual no fue acompañado por un aumento en el flujo de electrones transportados a través de la cadena, reflejándose en una reducción en la eficiencia fotosintética a diferentes intensidades de LA. El análisis de fluorescencia variable también reveló una menor tasa fotosintética (PS_{rate}) para las hojas LL respecto al control, el cual fue el primer indicio de un menor contenido de aceptores de electrones, ya que se observó que las plantas LL alcanzaron la saturación a intensidades de luz menores y con un rendimiento menor que las plantas control. Luego, el menor contenido de aceptores de electrones de la ETC se confirmó a partir de los cambios observados en los parámetros N , S_M , V_K , V_J y V_I de la curva OJIP. La disminución en cada uno de ellos en las hojas LL reflejan que es necesaria una menor cantidad de fotones para saturar las distintas etapas de la ETC (dado que la saturación ocurre más rápido), y esto se deduce en una menor cantidad de transportadores de electrones.

El modelo bi-exponencial aquí presentado para la evaluación de los componentes del NPQ, describió con precisión la recuperación del rendimiento del PSII en la fase oscura y permitió el análisis de los tiempos de desactivación característicos de los componentes de *quenching*. Curiosamente, ni τ_T o τ_E variaron significativamente entre tratamientos, a excepción de un aumento τ_T observado en hojas LL a la máxima LA estudiada.

En resumen, se ha demostrado cómo un análisis completo de fluorescencia de clorofila permite no solo la detección, sino también la caracterización detallada de la respuesta de la cadena de transporte electrónico y la actividad de cada etapa. También reveló algunas diferencias novedosas e interesantes entre los parámetros. Si bien los valores absolutos y cambios relativos de los parámetros fotosintéticos aquí obtenidos, no se pueden extrapolar directamente a otras plantas otras especies o metabolismo de carbono, los resultados son consistentes con la aclimatación aquí inducida. La investigación adicional que extienda este estudio de fluorescencia integral a un gran número de plantas con diferentes mecanismos de fijación de carbono debería ser interesante para el trabajo futuro.

Referencias

- (1) Torres, R.; Romero, J. y Lagorio, M. *J. Photochem. Photobiol., B* **2021**, *218*, 112182, DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2021.112182](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112182).
- (2) Ahn, T. K.; Avenson, T. J.; Peers, G.; Li, Z.; Dall’Osto, L.; Bassi, R.; Niyogi, K. K. y Fleming, G. R. **2009**, *357*, 151-158, DOI: [10.1016/j.chemphys.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2008.12.003).
- (3) Ptushenko, V. V.; Ptushenko, E. A.; Samoilova, O. P. y Tikhonov, A. N. *Biosystems* **2013**, *114*, 85-97.
- (4) Guadagno, C.; Santo, A. V. D. y D’Ambrosio, N. *BBA - Bioenerg.* **2010**, *1797*, 525-530, DOI: [10.1016/j.bbabiobio.2010.01.016](https://doi.org/10.1016/j.bbabiobio.2010.01.016).
- (5) Anderson, J. M.; Chow, W. S. y Park, Y.-I. *Photosynth. Res.* **1995**, *46*, 129-139.
- (6) Boardman, N. t. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1977**, *28*, 355-377.
- (7) Lichtenthaler, H. K.; Ač, A.; Marek, M. V.; Kalina, J. y Urban, O. *Plant Physiol. Biochem.* **2007**, *45*, 577-588, DOI: [10.1016/j.plaphy.2007.04.006](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.006).
- (8) Meier, D. y Lichtenthaler, H. *Protoplasma* **1981**, *107*, 195-207.
- (9) Lichtenthaler, H. K.; Kuhn, G.; Prenzel, U. y Meier, D. *Physiol. Plant.* **1982**, *56*, 183-188.
- (10) Zivcak, M.; Brestic, M.; Kalaji, H. M. y Govindjee *Photosynth. Res.* **2014**, *119*, 339-354, DOI: [10.1007/s11120-014-9969-8](https://doi.org/10.1007/s11120-014-9969-8).

- (11) Ramos, M. E. y Lagorio, M. G. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 1063-1066, DOI: [10.1039/b406525e](https://doi.org/10.1039/b406525e).
- (12) Baslam, M.; Morales, F.; Garmendia, I. y Goicoechea, N. *Sci. Hortic.* **2013**, *151*, 103-111, DOI: [10.1016/j.scienta.2012.12.023](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.023).
- (13) Pinto, E.; Almeida, A. A.; Aguiar, A. A. y Ferreira, I. M. *Food Chem.* **2014**, *152*, 603-611, DOI: [10.1016/j.foodchem.2013.12.023](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.023).
- (14) Kohatsu, M. Y.; Lange, C. N.; Pelegrino, M. T.; Pieretti, J. C.; Tortella, G.; Rubilar, O.; Batista, B. L.; Seabra, A. B. y de Jesus, T. A. *J. Cleaner Prod.* **2021**, *324*, 129264, DOI: [10.1016/j.jclepro.2021.129264](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129264).
- (15) Lichtenthaler, H. K. y Babani, F. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer: 2004, págs. 713-736, DOI: [10.1007/978-1-4020-3218-9_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_28).
- (16) Schieffthaler, U.; Russell, A. W.; Bolhàr-Nordenkampf, H. R. y Critchley, C. **1999**, *26*, 485, DOI: [10.1071/pp98102](https://doi.org/10.1071/pp98102).
- (17) Lei, T. T.; Tabuchi, R.; Kitao, M. y Koike, T. **1996**, *96*, 411-418, DOI: [10.1111/j.1399-3054.1996.tb00452.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00452.x).
- (18) Bailey, S.; Walters, R. G.; Jansson, S. y Horton, P. *Planta* **2001**, *213*, 794-801, DOI: [10.1007/s004250100556](https://doi.org/10.1007/s004250100556).
- (19) Lichtenthaler, H. K.; Babani, F.; Navrátil, M. y Buschmann, C. *Photosynth. Res.* **2013**, *117*, 355-366, DOI: [10.1007/s11120-013-9834-1](https://doi.org/10.1007/s11120-013-9834-1).
- (20) Dai, Y.; Shen, Z.; Liu, Y.; Wang, L.; Hannaway, D. y Lu, H. **2009**, *65*, 177-182, DOI: [10.1016/j.envexpbot.2008.12.008](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.008).
- (21) Sarijeva, G.; Knapp, M. y Lichtenthaler, H. K. *J. Plant Physiol.* **2007**, *164*, 950-955, DOI: [10.1016/j.jplph.2006.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.09.002).
- (22) Yaryura, P.; Cordon, G.; Leon, M.; Kerber, N.; Pucheu, N.; Rubio, G.; Garcíá, A. y Lagorio, M. G. **2009**, *195*, 186-196, DOI: [10.1111/j.1439-037x.2008.00359.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-037x.2008.00359.x).
- (23) Lichtenthaler, H. K. y Rinderle, U. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1988**, *19*, S29-S85.
- (24) Singh, S.; Dube, A. y Gupta, P. *Pure and Applied Optics: Journal of the European Optical Society Part A* **1998**, *7*, L39.

- (25) Peterson, R. B.; Oja, V. y Laisk, A. *Photosynth. Res.* **2001**, *70*, 185-196.
- (26) Agati, G.; Cerovic, Z. G. y Moya, I. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 75-84.
- (27) Lichtenthaler, H. K.; Buschmann, C.; Döll, M.; Fietz, H.-J.; Bach, T.; Kozel, U.; Meier, D. y Rahmsdorf, U. *Photosynth. Res.* **1981**, *2*, 115-141, DOI: [10.1007/bf00028752](https://doi.org/10.1007/bf00028752).
- (28) Cordón, G. B. y Lagorio, M. G. **2007**, *6*, 873, DOI: [10.1039/b617685b](https://doi.org/10.1039/b617685b).
- (29) Terashima, I.; Sakaguchi, S. y Hara, N. *Plant Cell Physiol.* **1986**, *27*, 1023-1031.
- (30) Calvo, B. O. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol.* **2019**, *95*, 1360-1368, DOI: [10.1111/php.13149](https://doi.org/10.1111/php.13149).
- (31) Stirbet, A. y Govindjee *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2011**, *104*, 236-257, DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010).
- (32) Chen, L.-S.; Li, P. y Cheng, L. **2009**, *66*, 110-116, DOI: [10.1016/j.envexpbot.2008.12.017](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.017).
- (33) Strasser, R. J.; Srivastava, A. y Govindjee, **1995**, *61*, 32-42, DOI: [10.1111/j.1751-1097.1995.tb09240.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb09240.x).
- (34) Adams, W. W. y Demmig-Adams, B. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer Netherlands: 2004, págs. 583-604, DOI: [10.1007/978-1-4020-3218-9_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_22).
- (35) Stirbet, A.; Riznichenko, G. Y.; Rubin, A. y col. *Biochemistry (Moscow)* **2014**, *79*, 291-323.
- (36) Papageorgiou, G. C.; Tsimilli-Michael, M. y Stamatakis, K. *Photosynthesis Research* **2007**, *94*, 275-290, DOI: [10.1007/s11120-007-9193-x](https://doi.org/10.1007/s11120-007-9193-x).
- (37) Kramer, D. M.; Johnson, G.; Kiirats, O. y Edwards, G. E. **2004**, *79*, 209-218, DOI: [10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d](https://doi.org/10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d).
- (38) Hendrickson, L.; Förster, B.; Pogson, B. J. y Chow, W. S. **2005**, *84*, 43-49, DOI: [10.1007/s11120-004-6430-4](https://doi.org/10.1007/s11120-004-6430-4).
- (39) Torres, R.; Diz, V. E. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17*, 505-516, DOI: [10.1039/c8pp00067k](https://doi.org/10.1039/c8pp00067k).
- (40) Kalaji, H. M.; Jajoo, A.; Oukarroum, A.; Brestic, M.; Zivcak, M.; Samborska, I. A.; Cetner, M. D.; Łukasik, I.; Goltsev, V. y Ladle, R. J. *Acta Physiol. Plant.* **2016**, *38*, DOI: [10.1007/s11738-016-2113-y](https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y).

- (41) Kalaji, H. M.; Oukarroum, A.; Alexandrov, V.; Kouzmanova, M.; Brestic, M.; Zivcak, M.; Samborska, I. A.; Cetner, M. D.; Allakhverdiev, S. I. y Goltsev, V. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *81*, 16-25.
- (42) Gomes, M. T. G.; da Luz, A. C.; dos Santos, M. R.; do Carmo Pimentel Batitucci, M.; Silva, D. M. y Falqueto, A. R. *Sci. Hortic.* **2012**, *142*, 49-56, DOI: [10.1016/j.scienta.2012.04.026](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.04.026).
- (43) Srivastava, A.; Guissé, B.; Greppin, H. y Strasser, R. J. **1997**, *1320*, 95-106, DOI: [10.1016/s0005-2728\(97\)00017-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00017-0).
- (44) Kalaji, H. M. y col. *Photosynth. Res.* **2016**, *132*, 13-66, DOI: [10.1007/s11120-016-0318-y](https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y).
- (45) Schansker, G.; Srivastava, A.; Govindjee y Strasser, R. J. *Funct. Plant Biol.* **2003**, *30*, 785, DOI: [10.1071/fp03032](https://doi.org/10.1071/fp03032).
- (46) Björkman, O. y Demmig, B. *Planta* **1987**, *170*, 489-504.
- (47) Li, Y.-G.; Li, L.-H.; Jiang, G.-M.; Niu, S.-L.; Liu, M.-Z.; Gao, L.-M.; Peng, Y. y Jiang, C.-D. **2004**, *42*, 243-249, DOI: [10.1023/b:phot.0000040596.39460.6f](https://doi.org/10.1023/b:phot.0000040596.39460.6f).
- (48) Durhman, A. K.; Rowe, D. B. y Rugh, C. L. **2006**, *41*, 1623-1628, DOI: [10.21273/hortsci.41.7.1623](https://doi.org/10.21273/hortsci.41.7.1623).

Nanopartículas de Oro

5.1. Introducción

El característico color rojo brillante de las suspensiones de nanopartículas de oro (NpAu) ha atraído el interés de los artesanos desde la antigüedad[1], y las NpAu o sus nanoaleaciones se pueden encontrar en copas ornamentales como la copa *Licurgo* (siglo IV d.C.)[2], vidrios de rubí rojo coloreados con el púrpura de *Cassius* (Edad Media)[3] y láminas de brillo (siglos XV-XVI)[1]. Una de las muestras más antiguas está formada por un marfil egipcio bañado en oro que data del siglo VIII a.C., donde las NpAu formaron accidentalmente una mancha púrpura por la difusión de una fina lámina de Au en el sustrato de marfil poroso[4]. De hecho, este tipo de aplicación se ha mantenido hasta la actualidad.

El primer científico que relacionó las propiedades ópticas de la suspensión del oro coloidal (hoy conocidas como NpAu) con su pequeño tamaño fue Michael Faraday, quien en 1852 dio una conferencia en Londres titulada *Relaciones experimentales del oro (y otros metales) con la luz*[5]. En sus informes, Faraday describió las soluciones coloidales de Au como *un hermoso fluido rubí* y atribuyó el efecto a una mera variación en el tamaño de las partículas. Posteriormente, el estudio de Faraday inspiró el trabajo teórico de Gustav Mie a principios del siglo XX, que todavía es válido hoy en día, sobre la dispersión y absorción de partículas esféricas[6].

Las nanopartículas de oro se encuentran entre los nanomateriales más utilizados con múltiples y muy diversos usos en diferentes campos, desde el electrónico hasta el medicinal. Se utilizan NpAu para producir recubrimientos eléctricos, mejorar la actividad redox en aplicaciones fotoquímicas y electroquímicas al interactuar con moléculas orgánicas[7, 8],

hasta en sistemas de administración de fármacos[9, 10] y en métodos de detección e imágenes ultrasensibles[11, 12]. El uso exitoso de las NpAu puede ser fácilmente entendido por el hecho de que tienen características ópticas y electrónicas únicas basadas en la existencia de la resonancia de plasmón de superficie (RPS), que permiten visualizar fácilmente las nanopartículas ya que la luz que dispersan se encuentra en el rango visible del espectro electromagnético[13, 14]. Además, las NpAu son fáciles de sintetizar, estables en suspensión acuosa y otros solventes[15-17], soportan una variedad de revestimientos de superficie[10] y poseen gran biocompatibilidad [18-20].

Estas propiedades y características de las NpAu motivaron el interés del presente trabajo; en observar el efecto que las mismas pudieran tener sobre las propiedades ópticas, espectroscópicas y fotoquímicas de materiales fotosintéticos como hojas y cloroplastos. Las nanopartículas plasmónicas como las nanopartículas de oro o plata son candidatos atractivos para este estudio debido a su riqueza en propiedades ópticas especiales[21]. Además, debido a la posibilidad de sintetizarlas con un pequeño diámetro, pueden penetrar fácilmente las hojas a través de sus estomas (poros donde se produce el intercambio gaseoso y transpiración)[22, 23]. Debido a las variadas e interesantes propiedades fotofísicas y fotoquímicas de ambos sistemas (nanopartículas plasmónicas y materiales fotosintéticos), se espera algún tipo de interacción importante que incluya procesos de transferencia de energía o carga entre nanopartículas y pigmentos fotosintéticos cuando ambos están presentes.

A continuación, se repasan brevemente las características principales del plasmón superficial, el cual está presente en las nanopartículas metálicas y algunos antecedentes relevantes sobre la interacción entre nanopartículas de oro y material fotosintético, que han servido de soporte bibliográfico para este capítulo de tesis.

5.1.1. Resonancia de plasmón de superficie

Los plasmones son oscilaciones colectivas de electrones libres en metales. Según el modelo líquido de Fermi, los plasmones pueden describirse como una nube de electrones cargados negativamente desplazados coherentemente de su posición de equilibrio alrededor de una red formada por iones cargados positivamente, en analogía con un plasma real [24, 25]. En el caso de las nanopartículas (NP) metálicas con un tamaño comparable a la profun-

didad de la superficie del metal, el campo eléctrico de la luz incidente puede penetrar el metal y polarizar los electrones de conducción. Los plasmones en NP con un tamaño mucho menor que la longitud de onda del fotón son llamados plasmones de superficie localizada, porque la oscilación resultante del plasmón se distribuye por todo el volumen de partícula[24, 25]. Un desplazamiento tan coherente de electrones de la red cargada positivamente genera una fuerza de restauración que tira de los electrones polarizados de vuelta a la red, es decir, las NP actúan de forma muy similar a una nanoantena (Fig. 5.1). Por lo tanto, el plasmón en una nanopartícula puede considerarse como un oscilador armónico de masa-resorte impulsado por la onda de luz resonante de energía. En ella, la nube de electrones oscila como un simple dipolo en dirección paralela al campo eléctrico de la radiación electromagnética. Sólo la luz con frecuencia en resonancia con la oscilación puede excitar el plasmón de superficie[24]. Para dicha frecuencia de resonancia se observa un máximo de absorción y dispersión (extinción) en el espectro óptico. Esta frecuencia depende de la oscilación del conjunto de los electrones en la superficie del material y, por ende, de la composición, forma y tamaño de la nanopartícula, de las moléculas adsorvidas sobre su superficie y del medio circundante. Si bien el color de las suspensiones de nanopartículas metálicas es la base de muchas de sus aplicaciones, la característica más importante de estos sistemas es la intensificación del campo electromagnético local cerca de la superficie.

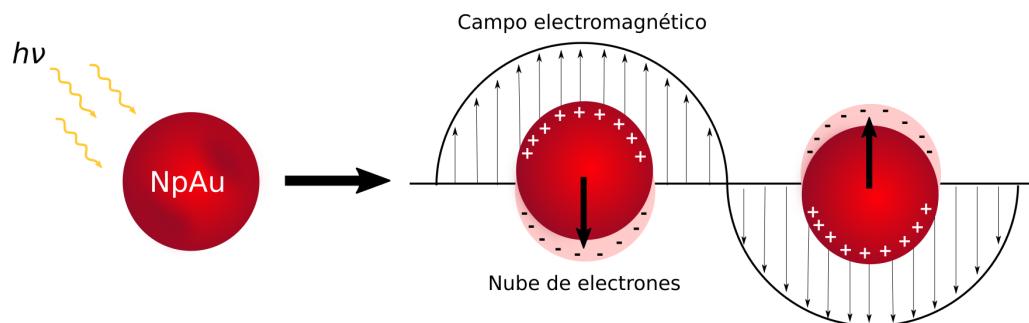


FIGURA 5.1: Representación esquemática de los electrones de conducción que oscilan a través de la nanopartícula de oro en el campo electromagnético de la luz incidente.

La teoría de Mie postulada por Gustav Mie en 1908[6] se ha utilizado para explicar la variación de color de las NpAu con su tamaño. Mie calculó la resonancia del plasmón de la superficie resolviendo la ecuación de Maxwell con las condiciones de contorno adecuadas para una pequeña esfera que interactúa con un campo electromagnético[26], para la situación en la que el tamaño de la partícula es mucho menor que la longitud de onda

de la luz. Generalmente, el tamaño de la nanopartícula afecta la distribución espacial de las cargas de polarización sobre la superficie, así como la separación de cargas positivas y negativas. Por lo tanto, este efecto influye en los picos máximos, la longitud de onda de resonancia del plasmón y el ancho de banda del plasmón, como muestran muchas investigaciones, tanto teórica como experimentalmente[27-29]. De esta forma, es posible estimar el tamaño de la partícula a partir de la posición del máximo de absorción para nanopartículas metálicas esféricas, y la distribución de tamaño de partícula mediante el ancho de banda del plasmón.

5.1.2. Antecedentes

La interacción de las nanopartículas de oro con la molécula de clorofila ya ha sido estudiada por varios autores. Barazzouk y col. demostraron que las NpAu disminuían la fluorescencia de la clorofila *a*, en solución, debido a una transferencia de electrones fotoinducida desde el pigmento fotosintético excitado a las nanopartículas[7]. Más tarde, este grupo de investigación utilizó NpAu, en concentración micromolar, para fotoproteger la clorofila *a* en solución[30]. Los autores reportaron que las NpAu eran más protectoras que los fotoprotectores de plantas naturales como los β -carotenos o las quinonas. En ese trabajo, propusieron una unión entre la nanopartícula y los átomos de N de la clorofila *a*, la cual evitaba su degradación por especies reactivas de oxígeno.

La observación *in vivo* del *quenching* de la fluorescencia de la clorofila, inducida por NpAu, también fue informada por Falco y colaboradores que trataron semillas y hojas de soja a nivel de superficie con NpAu[31].

Por otro lado, como se mencionó en el Capítulo 1, la mayoría de las publicaciones donde se investigó el efecto de nanopartículas en plantas, se llevaron a cabo caracterizaciones fisiológicas o morfológicas de las plantas tratadas con nanopartículas respecto a las plantas control. Por ende, son minoritarios los estudios donde dicho efecto se investiga o racionaliza desde el punto de vista bioquímico, como podría ser el seguimiento de la actividad fotosintética, entre otros.

Feichtmeier y cols.[32] expusieron semillas de cebada a NpAu por dos semanas, y observaron que las nanopartículas se acumulan en la raíz. Aunque la germinación no fue afectada, el crecimiento y por ende la biomasa disminuyó drásticamente. Los resultados del trabajo de Sabo-Attwood y cols.[33], mostraron el potencial de las NpAu para ingresar a las plantas a través de mecanismos dependientes del tamaño, así como también la capacidad para trasladarse a las células y tejidos, causando biotoxicidad. En ese sentido, Zhu y cols.[34], investigaron la capacidad de penetración de las NpAu según la carga superficial dada por diversos estabilizantes. Los resultados de este estudio indicaron que la absorción y distribución de NpAu depende tanto de la carga superficial de las mismas como de las especies de plantas. Los resultados mostraron que las NpAu cargadas positivamente fueron absorbidas más fácilmente por las raíces de las plantas, mientras que las NpAu cargadas negativamente se trasladaron de manera más eficiente a los brotes de las plantas (incluidos los tallos y las hojas) desde las raíces. Por otro lado, Arora y cols.[35] rociaron NpAu sobre hojas y observaron cambios positivos en su crecimiento y rendimiento. Se observó así que la altura de la planta, el diámetro del tallo, el número de ramas, vainas y hojas, el rendimiento de producción de semillas, entre otras, se vieron afectados positivamente por el tratamiento con nanopartículas.

5.1.3. Motivación y objetivos

Si bien se ha reportado previamente el *quenching* de la fluorescencia de la clorofila producido por las NpAu, faltaba un estudio espectroscópico completo tanto a nivel de hoja como de cloroplasto y una revisión de si dicho *quenching* de la fluorescencia estacionaria produce cambios en la actividad fotosintética de hojas y cloroplastos. Además, se buscó desarrollar un mecanismo detallado de los procesos fotofísicos que tienen lugar en el sistema NpAu-hoja, el cual es relevante para la correcta interpretación de los parámetros fotosintéticos, como el rendimiento cuántico de los fotosistemas II y el NPQ, entre otros, generalmente obtenidos a partir de la fluorescencia variable de clorofila.

Teniendo en cuenta estas vacantes en la literatura, el objetivo de este trabajo fue estudiar comparativamente el efecto de las NpAu en hojas y cloroplastos sobre la absorción de luz, la fluorescencia variable y no variable de la clorofila, y sobre la fotosíntesis, racionalizando los resultados mediante un detallado mecanismo cinético y sus respectivas ecuaciones

algebraicas. Por último, para evidenciar posibles fenómenos de transferencia de carga o energía entre las NpAu y los pigmentos fotosintéticos en las hojas, se registraron los decaimientos de fluorescencia resuelta en el tiempo y los transientes de absorción, y obtener así los tiempos de vida del estado excitado singlete y triplete de la clorofila en solución en presencia de NpAu.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Síntesis de NpAu

Se sintetizaron nanopartículas de oro (NpAu) con algunas modificaciones de acuerdo con el método presentado por Diz y cols.[36]. Primeramente, se preparó una solución acuosa (20 ml) de citrato de sodio al 1% (4 ml) y ácido tánico al 1% (0,05 ml) la cual se llevó a una temperatura de 60°C. Aparte en un erlenmeyer, se agitó una solución de ácido tetracloroaúrico 0,25 mM (1 ml) en agua Milli-Q (80 ml) a 60°C. Una vez que la temperatura se mantuvo constante, se trasvasó el contenido de la primer solución al erlenmeyer conteniendo la solución ácido tetracloroaúrico. Al cabo de unos pocos minutos se observó que la solución se tornó color rojo rubí. Luego, la mezcla se calentó otros 10 minutos bajo la misma agitación. Finalizada la síntesis, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se trasvasó a un matraz de 100 mL, el cual se enrasó con agua Milli-Q. Todos los materiales de vidrio utilizados durante la síntesis, fueron previamente lavados con agua regia ($HCl : HNO_3$ 3:1) de forma de eliminar residuos orgánicos e inorgánicos de las paredes del recipiente, especialmente del erlenmeyer donde se llevó a cabo la síntesis. La presencia de pequeñas partículas de polvo o incluso detergente u otros compuestos orgánicos en las paredes del mismo, pueden conducir a la nucleación temprana y la posterior formación de partículas de gran tamaño, produciendo la floculación de la suspensión coloidal. Por último, se enjuagó el material de vidrio lavado con agua regia, con agua destilada (sin uso de detergente).

5.2.2. Caracterización

Las partículas obtenidas se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM), espectroscopía UV/vis, dispersión dinámica de luz (DLS) y po-

tencial Zeta, cuya metodología general se describió previamente en la Sección 3.10. Para la microscopía electrónica de barrido se depositaron gotas de la suspensión de nanopartículas sobre un taco con una pequeña pieza de sílice. Para la microscopía electrónica de transmisión, se depositaron gotas de la suspensión de nanopartículas en una grilla para TEM recubierta con carbono. El microscopio electrónico de transmisión utilizado fue un JEM 1200EX II y el microscopio electrónico de barrido fue un Zeiss SUPRA 40, ambos ubicados en el Centro de Microscopias Avanzadas (CMA, FCEyN, Pabellón 1). Para las medidas de diámetro hidrodinámico y potencial Z, se realizaron distintas diluciones de modo de encontrar el intervalo óptimo de medición. Esto se llevó a cabo mediante la confección de una curva de calibración de tamaño en función de la dilución de las nanopartículas. Se utilizó un DLS 90 Plus/BI-MAS (*Brookhaven Instrument Co, EE.UU.*), equipado con un láser He-Ne láser que funciona a 632.8 nm y un analizador de potencial Zeta (*Brookhaven Instrument Corp, EE.UU.*). Los espectros de absorción de las dispersiones de NpAu se registraron utilizando un espectrofotómetro UV/vis de doble haz con cubetas de cuarzo.

5.2.3. Tratamiento con NpAu

La especie utilizada en este estudio fue *Robinia pseudoacacia L.*. Las hojas de tamaño y estructura similares se obtuvieron de un árbol ubicado en las cercanías del pabellón 2 de la FCEyN y se lavaron para su uso inmediato con agua Milli-Q. Las hojas se colocaron individualmente en un recipiente de plástico con seis divisiones individuales de unos 3 cm de lado, con una capacidad de 10 mL por división. A la mitad se le añadió solución control y a la otra un mismo volumen de suspensión de nanopartículas, hasta cubrir completamente las hojas. Se iluminó con luz blanca de $800 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante dos horas cada día de medición con el objetivo de inducir la apertura de estomas y facilitar la entrada de las nanopartículas. Los estomas son poros de la hoja mediante los cuales se realiza el intercambio gaseoso, y además son sensibles a la luz. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Cada lote de hojas estuvo constituido por seis hojas control y seis hojas de muestra. La solución utilizada como control fue una solución de citrato de sodio (1 mM) y ácido tánico (3 mM) de pH 5, el cual es un medio análogo en el que están dispersas las NpAu. La concentración de nanopartículas en el medio de síntesis fue de $8.34 \times 10^{11} \text{ NP/ml}$, y fue obtenida a través de un cálculo estimado considerando el diámetro obtenido por microscopía electrónica, geometría esférica y una densidad similar

al de Au° a granel.

Sobre cada hoja se realizaron mediciones de transmitancia, reflectancia, fluorescencia estacionaria y fluorescencia variable (cinética de Kautsky) el mismo día. Cada medición se realizó después de 5, 24, 48, 72 y 86 horas después de la primera exposición de las hojas a la dispersión de nanopartículas o la solución control. Previo a las mediciones se lavaron las hojas con agua destilada para retirar el remanente de las soluciones y dispersiones de su superficie.

5.2.4. Reflectancia y transmitancia de hojas

Los espectros de reflectancia y transmitancia difusa de la hojas se registraron tanto para hojas individuales como para pilas de 3 a 4 hojas, de modo que la transmitancia en el visible sea inferior al 1 %. Ambos espectros se realizaron entre 300 y 2500 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV3101PC equipado con una esfera integradora, utilizando sulfato de bario como estándar de referencia.

5.2.5. Índices espectrales

Dado que las hojas fueron tratadas con NpAu y solución control a partir de la inmersión de las mismas en las dispersiones o soluciones, es razonable que el contenido de agua en las hojas incremente. Para examinar dicho estrés hídrico de las hojas, se registraron los espectros de reflectancia hasta la zona del infrarrojo cercano a partir de la cual es posible determinar índices de vegetación relacionados con la fisiología, la estructura y el contenido de agua de las hojas. Las medidas de reflectancia se utilizaron tanto para corregir los espectros de fluorescencia estacionaria como para determinar índices espectrales. Para ello se registraron los espectros hasta 2500 nm. Las bandas espectrales centradas en 531 nm y 570 nm se utilizaron para calcular el índice de reflectancia fotoquímica (PRI) que es sensible al contenido de carotenoides[37]. Se calcularon tres índices de relación simple asociados con el contenido de agua, el índice de agua (WI)[38], el índice de agua de la hoja (LWI)[39] y el índice de estrés por humedad (MSI) [40]. Todos ellos utilizan las bandas principales de absorción del agua a 970, 1200, 1450 y 1950 nm[41]. Además, se calcularon los índices de diferencia normalizada de agua (NDWI)[42], y los índices de diferencia normalizada de vegetación (NDVI)[41], y los índices específicos $PSND_a$ y

$PSND_b$, los cuales son sensibles al contenido de clorofilas.

Debido a la baja relación señal-ruido de la reflectancia difusa que se mide en la zona del infrarrojo cercano, la señal registrada en esta región no es tan confiable como la señal en el rango del visible. Por ello, se optó por el cálculo de varios índices relativos al contenido de agua, y de esta forma reforzar la capacidad individual que tiene cada uno para su determinación.

5.2.6. Fluorescencia estacionaria de hojas

Se obtuvieron los espectros de emisión o fluorescencia inicial (F_0) de hojas adaptadas previamente a la oscuridad por 20 minutos, utilizando una apertura de ranura de excitación inferior a 0,5 mm (2 nm) de modo de mantener el flujo fotónico suficientemente bajo, evitando así la inducción de la fluorescencia variable. En estas condiciones, la fluorescencia inicial se registró en función de la longitud de onda entre 600 y 800 nm. Los espectros se registraron excitando a la longitud de onda donde se observó máxima emisión de la hoja, estandarizada en 460 nm, y en el máximo de absorción de las NpAu a 520 nm. Las mediciones se realizaron en un espectrofluorómetro de estado estacionario QuantaMaster 400 (*Photon Technology Inc., Canadá*) utilizando una geometría frontal con un ángulo de 60°.

Debido a la superposición de los espectros de absorción y emisión de hojas, los espectros de emisión experimentales están distorsionados y se subestima la relación entre las bandas de emisión. Para eliminar este efecto producido, los espectros de fluorescencia de una capa ópticamente gruesa de hojas, se corrigieron según el modelo utilizado por Ramos y Lagorio[43] introducido anteriormente en la [Subsubsección 2.7](#).

5.2.7. Fluorescencia Variable

La fluorescencia variable se registró utilizando un fluorómetro de pulso modulado (*Hansatech FMS1*). El haz de excitación modulado (594 nm) induce una señal de fluorescencia también modulada, en condiciones donde se excluye la luz ambiental. El pulso de excitación es de corta duración ($1.8 \mu s$) pero con largos períodos entre pulsos. La cantidad integrada de radiación incidente sobre la muestra fue menor a $0.05 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

evitando cambios fisiológicos significativos en las hojas durante las mediciones. El pulso de saturación (luz halógena) tuvo una duración de 0.5 s con una intensidad de 2700 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La luz actínica fue proporcionada por una fuente de luz halógena cuya intensidad fue de 175 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la cual corresponde a una intensidad de luz actínica media.

El protocolo experimental utilizado corresponde al protocolo de la [Fig. 3.7](#) presentado en [Sección 3.8](#). En síntesis, se comenzó registrando la señal de fluorescencia mínima, F_0 , de hojas adaptadas al menos 20 minutos a la oscuridad. Luego se aplicó un pulso de saturación y se registró la fluorescencia máxima, F_M . A continuación, las muestras fueron expuestas a una única luz actínica durante varios minutos hasta alcanzar un estado estacionario (F_S). Luego se aplicó un nuevo pulso de saturación para registrar la fluorescencia máxima para hojas adaptadas a la luz (F'_M). Por último, la luz actínica se apagó y se aplicó un pulso con luz de 750 nm para la determinación de F'_0 . A partir de estas mediciones, se calculó la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_V/F_M) y el rendimiento cuántico fotoquímico del PSII (Φ_{PSII}), entre otros parámetros que fueron descriptos en la [Sección 2.4](#) del [Capítulo 2](#).

5.2.8. Microscopía Electrónica de Hojas

La visualización del material biológico en microscopios electrónicos requiere de una preparación especial de las muestras debido a que la potencia de 20 kV normalmente utilizada en SEM y la de 100 a 300 kV en TEM, daña irreversiblemente la muestra. Primeramente se realizaron imágenes SEM con el microscopio Zeiss SUPRA 40 (CMA, FCEyN) de trozos medianos de hoja depositados con la cara superior (adaxial) hacia arriba. Este tipo de materiales no es conductor y por ende requiere de la deposición de algún metal como oro sobre la superficie. Siendo que la deposición del mismo afectaría la correcta visualización de las nanopartículas de oro sobre la superficie de la hoja, no se realizó y solo se tomaron imágenes rápidamente evitando la degradación o deformación de la muestra. Dadas estas circunstancias, las imágenes poseen interferencias debido a la baja conductividad de la muestra. Se tomaron imágenes de hojas tratadas con solución control y muestra. Luego, con el objetivo de visualizar nanopartículas en el interior de la hoja, se adquirieron imágenes de trozos muy pequeños de hoja, triturados con mortero usando nitrógeno líquido,

pero no se obtuvieron resultados satisfactorios.

Posteriormente, se adquirieron imágenes de *Cryo-TEM* de hojas de espinaca tratadas con NpAu, utilizando el mismo procedimiento descripto en la [Subsección 5.2.3](#). Como la imagen que se forma en el TEM depende de que los electrones puedan atravesar la muestra, esta ha de ser suficientemente delgada para permitirlo por lo que fue necesario realizar cortes muy finos del espécimen de un grosor menor a 100 nm, afectando mínimamente la estructura original. Para ello, se utilizó un Crio-Ultramicrotomo (*Leica EM UC7*) de forma de obtener un corte adecuado de la muestra de hoja. De manera similar a las técnicas convencionales de preparación de muestras biológicas para TEM, el material biológico se fijó primero químicamente con aldehídos a baja concentración. Luego, en lugar de la deshidratación con disolvente orgánico e incrustación de resina, el material fijado se infiltró con sacarosa. Posteriormente se congeló en nitrógeno líquido y se seccionó con un cuchillo seco a baja temperatura. Las crio-secciones obtenidas se recuperaron de la superficie del cuchillo, se descongelaron y colocaron en grillas convencionales de TEM recubiertas con carbono. Para este último paso, las crio-secciones se tiñeron con acetato de uranilo, se incrustaron en metilcelulosa para evitar el secado y los artefactos de contracción irregular del orgánulo celular (los cuales producen arrugas en la crio-sección deformando la imagen y la estructura) y se examinaron por TEM[44, 45]. Las imágenes de dichos cortes finos de hoja se registraron utilizando un microscopio electrónico de transmisión de 100kV modelo JEM-1010 JEOL (*SCSIE en Burjassot-Paterna, Universitat de Valencia, España*).

5.2.9. Extracción de cloroplastos y tratamiento con NpAu

Los cloroplastos se obtuvieron de las hojas de *Robinia pseudoacacia L.* mediante centrifugación diferencial, utilizando de base procedimientos de referencia que fueron ligeramente modificados[46, 47]. Resumidamente, a unos 5 g de hoja cortadas y lavadas con agua Milli-Q, dispuestas en un mortero, se le añaden 5 ml de medio de suspensión (B10) y se trituró suavemente la muestra de modo de no romper la membrana de los cloroplastos sino únicamente la membrana vegetal y las fibras de la hoja. Debido a que la ruptura de la membrana se reduce a bajas temperaturas, todos los materiales se enfriaron previamente en el congelador de una heladera disponible en el laboratorio, y el procedimiento en general se realizó en baño de hielo. El homogéneo resultante se filtró usando un embudo

común cubierto con gaza o algodón. Se centrifugó a baja temperatura a 3000 RPM por 10 min y se descartó el pellet, ya que este contiene remanentes de hoja de gran tamaño. Se agregaron 2 ml más de B10 al sobrenadante, y se centrifugó a 5000 RPM por 15 min, descartándose el sobrenadante en este caso, ya que contiene proteínas, compuestos en solución y trozos de cloroplastos de bajo tamaño. El extracto de cloroplastos así obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de B10. El medio B10 estuvo compuesto de sacarosa 0,5 M, TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 1 mM y EDTA 2 mM). Los extractos de cloroplastos se almacenaron a -10°C durante no más de 48 horas.

Como los cloroplastos requieren de un medio con las características de B10 para mantenerse fotosintéticamente activos, fue necesario preparar una muestra de NpAu en el mismo medio de suspensión en el que se encontraban suspendidos los cloroplastos. Para ello, se preparó una suspensión concentrada de B10 y luego se llevó al volumen correspondiente con la suspensión de NpAu sintetizada como se describió en la [Subsección 5.2.1](#). El control, en este caso, fue preparado análogamente, reemplazando la suspensión nanoparticulada por la solución control de citrato de sodio y ácido tánico. De esta manera, las muestras y los controles de cloroplastos para este estudio, estuvieron contenidas en un medio regulado común (B10). Se prepararon luego distintas combinaciones de cloroplastos y nanopartículas, y se estudiaron sus propiedades fotofísicas, la cinética de reacción de Hill, la tasa máxima de evolución de oxígeno y se realizaron microscopias electrónicas de cloroplastos con NpAu.

5.2.10. Absorbancia de cloroplastos

La cuantificación de cloroplastos se infiere a partir de la concentración de clorofila. Para determinaciones de fluorescencia, en general, se utilizan dispersiones de cloroplastos de concentración menor a 7 μ M de clorofila, reduciendo distorsiones del espectro por efecto de filtro interno [48, 49]. Para determinar la concentración de clorofila del extracto de cloroplastos, se tomó un volumen adecuado (usualmente de 10-50 μ L) y se diluyó en 5 ml de acetona 80 %. En síntesis, el procedimiento es análogo a la determinación de pigmentos a partir de hoja, exceptuando el paso de extracción con mortero. En este caso, como los cloroplastos son pequeños y sensibles al cambio en el medio, la dispersión de un pequeño volumen de los mismos en acetona 80 % conduce a la ruptura de la membrana

y la posterior liberación de los pigmentos al medio. Luego, se centrifugó a 5000 RPM por 5 a 10 min, de modo de precipitar los elementos insolubles, como membranas y proteínas de los cloroplastos. Se registraron los espectros de absorbancia de la solución limpida resultante, utilizando un espectrómetro Shimadzu UV-3600 de doble haz con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La cuantificación de la clorofila se llevó a cabo a partir de los coeficientes de absorbividad molar presentados en la [Sección 3.3](#) de acuerdo al trabajo de Lichtenthaler y Buschmann[50].

5.2.11. Fluorescencia de cloroplastos en ausencia de procesos de reabsorción de luz

El modelo de corrección de fluorescencia de hojas ([Subsección 5.2.6](#)) fue validado utilizando el espectro de fluorescencia de un capa de cloroplastos en ausencia de procesos de reabsorción de luz[43]. Con el objetivo de confirmar que los cambios observados sobre los espectros de emisión de hojas eran debidos realmente a cambios de los espectros de los cloroplastos, se registraron los espectros para una capa de cloroplastos en ausencia de reabsorción. Para ello, se extrajeron cloroplastos de acuerdo al protocolo citado anteriormente. Del mismo modo que fue descripto en Ramos y Lagorio[43], se depositó una fina capa de cloroplastos sobre un portaobjetos, como se muestra en la [Fig. 5.2A](#) y se registró el espectro de fluorescencia. Dentro de un rango de espesor de capa de cloroplastos, la relación $F_{red}/F_{far-red}$ se mantuvo constante y resultó idéntica al valor obtenido en hojas tras corregir los espectros por reabsorción.

De este modo, se midieron los espectros de cloroplastos depositados sobre un portaobjetos. La muestra con nanopartículas y el control se prepararon análogamente a lo mencionado en [Subsección 5.2.9](#). Resumidamente, se prepararon medios de suspensión de cloroplastos que contenían NpAu (8.34×10^{11} NP/ml) o solución control (15.5 μ M de citrato). Se prepararon dispersiones con concentración constante de cloroplastos y distintas concentraciones de NpAu. Para ello, se agregaron 200 μ L de suspensión concentrada de cloroplastos a volúmenes diferentes de la suspensión de NpAu (0.2, 0.5, 0.7 y 1.0 mL). En paralelo, se prepararon los controles, reemplazando la suspensión de NpAu por el mismo volumen de la solución blanco. Todas las soluciones se llevaron al mismo volumen final con el *buffer* de suspensión de cloroplastos. Las muestras y controles se realizaron por

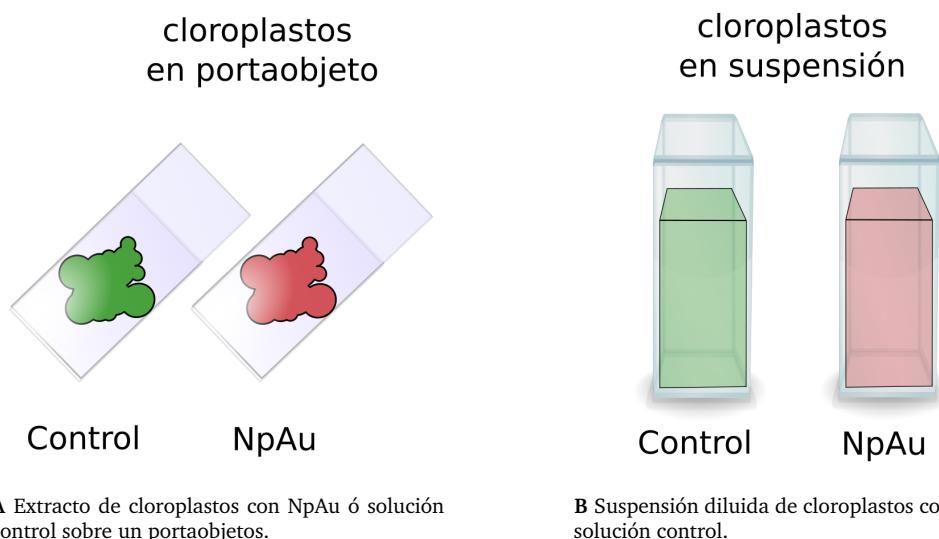


FIGURA 5.2: Tipos de muestras estudiadas en cloroplastos. Se registraron tanto los espectros de fluorescencia de cloroplastos en ausencia de procesos de reabsorción de luz depositados sobre un portaobjetos y en suspensión.

cuadruplicado.

Los espectros de capas finas de cloroplastos depositados en portaobjetos, se registraron utilizando un espectrofluorómetro de estado estacionario PTI (*Photon Technology International*) en geometría *front face* de 60°. Las condiciones de medición son análogas a la sección [Subsección 5.2.6](#), por lo que aquí también los cloroplastos depositados se adaptaron a la oscuridad por 20 minutos. Las longitudes de onda de excitación fueron 460, 500 y 520 nm. Para evitar la inducción de la fluorescencia de clorofila variable en los cloroplastos durante la medición, el monocromador de excitación se ajustó con un ancho de rendija de 1 nm mientras que el ancho de rendija del monocromador de emisión se mantuvo suficientemente abierto para obtener una señal apreciable (4 nm).

5.2.12. Fluorescencia de cloroplastos en suspensión

Se registraron los espectros de fluorescencia de suspensiones de cloroplastos con concentración menor a 7 μM de clorofila, en presencia de NpAu. Para ello se prepararon suspensiones con la misma concentración de cloroplastos con diferentes volúmenes de *buffer* BH10 control y muestra. Al igual que en la [Subsección 5.2.3](#), se prepararon soluciones reguladoras BH10 de cloroplastos con solución control y dispersión de nanopartículas. De esta forma, el medio de dispersión de los cloroplastos mantuvo el pH, la fuerza iónica y la

densidad adecuadas para su estudio fotofísico. La preparación de las muestra y controles, así como la extracción de cloroplastos y su medición se realizaron en el mismo día.

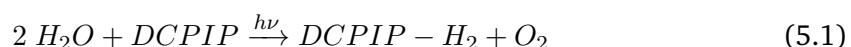
Se observó que las suspensiones de cloroplastos, a pesar de contener una baja concentración de clorofila, registraban absorbancias mayores a 0,5 y por ende los espectros de fluorescencia debieron corregirse por efectos de filtro interno[51], utilizando la Ec. 3.13 presentada anteriormente.

Los espectros se registraron utilizando un espectrofluorómetro de estado estacionario PTI (*Photon Technology International*) en geometría *front face* de 90°. Previamente, las suspensiones de cloroplastos se adaptaron a la oscuridad por 20 minutos. Se excitaron las dispersiones a 460, 500 y 520 nm. El monocromador de excitación se ajustó con un ancho de rendija de 1 nm y el de emisión a 4 nm. Se utilizaron cubetas de plástico y los espectros se registraron bajo agitación constante a temperatura ambiente para evitar decantación de los cloroplastos durante la medición.

5.2.13. Cinética de Reacción de Hill

La reacción de óxido-reducción conocida como reacción de Hill se utiliza para evaluar la tasa del transporte de electrones en la cadena fotosintética de cloroplastos [52, 53]. Como aceptores artificiales de electrones se pueden usar varios compuestos que son capaces de capturar los electrones que fluyen desde el PSII al PSI. Uno de los más utilizados es el DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) que posee una coloración azul en estado oxidado ($\lambda_{max} = 607\text{nm}$) y es incoloro en su estado reducido.

La reacción de Hill se estudió para observar la actividad fotosintética de los cloroplastos bajo la influencia de nanopartículas. La tasa de transferencia de electrones está correlacionada con la tasa de fotorreducción de DCPIP. Siendo el agua el donante de electrones primario en la fotosíntesis, la reacción se suele representar como:



La tasa de foto-reducción de DCPIP se obtuvo tras registrar la absorbancia del DPCIP oxi-

dado a 607 nm para distintas suspensiones de cloroplastos con nanopartículas y soluciones controles, en medio BH10. La absorbividad molar obtenida, tras un calibración previa, fue de $20.000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para DCPIP, muy similar al esperado[53]. La iluminación se llevó a cabo con una lámpara halógena de 75 W (Osram). Debido a que la actividad de los cloroplastos es muy sensible a cambios de temperatura, se colocó un filtro de luz de agua con el objetivo de absorber luz en la región del IR del espectro de la lámpara utilizada. La densidad del flujo de fotones fue de $250 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el tiempo de iluminación total se optimizó en 5 minutos, registrando mediciones de absorbancia cada 15 segundos durante los primeros 1,5 minutos, y luego cada 30 segundos. La concentración de clorofila fue de $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ y 1 mM de DCPIP. Los espectros de absorción visibles se registraron usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-3600, usando cubetas de plástico de 1 cm de paso óptico.

5.2.14. Tasa de evolución máxima de oxígeno

La tasa de evolución de oxígeno en condiciones de saturación se midió polarográficamente usando un electrodo de oxígeno tipo Clark de fase acuosa (*Hanna Instruments HI 9146*) [54-56]. Las mediciones se realizaron sobre un total de 18 ml de dispersión de cloroplastos conteniendo $80\text{-}100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de clorofila. El medio de suspensión estaba constituido por Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), sacarosa 0,5 M, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, MnCl₂ 1 mM, EDTA 2 mM y como aceptor de electrones artificial DCPIP 30 μM . Las dispersiones de cloroplastos se adaptaron previamente en la oscuridad, y se comenzó a registrar el contenido de oxígeno en la suspensión tras encender la lámpara. La medición se llevó a cabo a 20°C con un flujo de fotones de $680 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La luz actínica fue suministrada por una lámpara halógena de 75 W acoplada con un filtro de agua. El flujo de fotones se midió usando un fotodiodo (*COHERENT, FieldMaster*).

5.2.15. Microscopía electrónica de cloroplastos

Se adquirieron imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de suspensiones de cloroplastos con nanopartículas para las cuales se utilizó acetato de uranilo como agente de contraste negativo. En este caso, el equipo utilizado fue un microscopio electrónico de transmisión Philips EM300 (*CNEA Constituyentes*).

5.2.16. Experimentos resueltos en el tiempo con clorofila extraída

En virtud de haber sido beneficiada por una beca del programa de movilidad académica internacional entre todas las instituciones asociadas a la AUIP entre 2018-2019, se realizaron algunos experimentos resueltos en el tiempo con el objetivo primario de identificar procesos de transferencia de carga entre los cloroplastos y las NpAu. La movilidad se realizó a España, particularmente al grupo dirigido por la Dra. María Luisa Marín y el Dr. Francisco Boscá Mayans, en el Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la *Universitat Politécnica de Valéncia*. Debido a que el equipo de flash-fotólisis resuelto en el femtosegundo no se encontraba aún en funcionamiento al momento del viaje, se realizaron experimentos en el nano y microsegundo con clorofila extraída de espinaca y NpAu. Si bien Barazzouk y cols. [7] concluyeron previamente la existencia de una transferencia de carga entre el triplete de la clorofila *a* pura y NpAu, este experimento fue realizado en medio orgánico. En los experimentos llevados a cabo en España se realizaron en un medio con mayor similitud a la situación real en los cloroplastos, ya que se utilizó una mezcla de acetonitrilo y agua, así como un extracto real de clorofilas naturales y otros pigmentos que están presentes en las hojas.

5.2.17. Extracción de pigmentos

Las muestras de hojas se lavaron con agua destilada y se eliminaron los nervios y pecíolos. Los pigmentos vegetales fotosintéticos se extrajeron con acetona al 80 % utilizando un mortero. Los extractos se centrifugaron y posteriormente se registró el espectro de absorbancia en el rango del visible utilizando un espectrofotómetro de doble haz con cubetas de cuarzo (UV-3600 Plus, Shimadzu, Tokio, Japón). Se calcularon las concentraciones de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) y carotenoides totales (*Cars*) utilizando las ecuaciones presentadas en la [Sección 3.3](#).

Luego, dada la bien conocida interferencia por transferencia de energía que producen los carotenoides en la fluorescencia de la clorofila, los extractos de pigmentos se sometieron a cromatografía sólido-líquido de forma de separar principalmente los carotenoides de las clorofilas. En la [Fig. 5.3](#) se presenta la columna utilizada donde se pueden visualizar a simple vista los diferentes pigmentos presentes en el extracto.

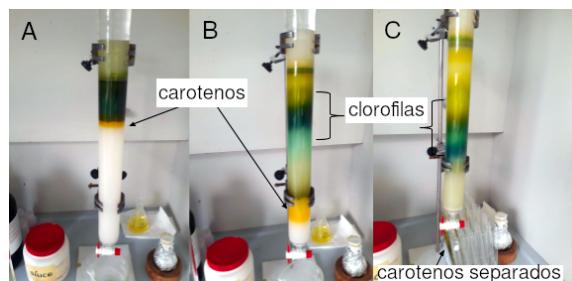


FIGURA 5.3: Separación de pigmentos por cromatografía. Los paneles A, B y C representan distintos tiempos de avance del frente de elución.

5.2.18. Tiempos de vida de fluorescencia de clorofila

Los experimentos de fluorescencia en estado estacionario y de fluorescencia resuelta en el tiempo de extractos de clorofila se realizaron en un fluorómetro FS900 (Edinburgh Instruments) perteneciente al Instituto de Tecnología Química, UPV-CSIC, España. Las mediciones de tiempo de vida se basaron en el recuento de fotones individuales utilizando una lámpara de destello de hidrógeno con un ancho de pulso de 1,5 ns como fuente de excitación. Las trazas cinéticas se ajustaron mediante funciones de decaimiento mono y bi-exponencial, posterior a un procedimiento de deconvolución para separarlas del perfil de pulso de la lámpara.

Las medidas se realizaron sobre mezclas de extractos de clorofillas a una concentración constante de $10 \mu\text{M}$ y una concentración variable de 0, 25 y $50 \mu\text{M}$ de NpAu en una mezcla de solvente de acetonitrilo y agua. A modo de control interno se realizaron las medidas por duplicado en ambiente de nitrógeno y aire.

5.2.19. Fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser (ó *laser flash photolysis* en inglés, LFP) se llevaron a cabo con un láser pulsado *Spectron Laser Systems* de Nd:YAG SL404G-10 usando una longitud de onda de excitación de 355 nm, perteneciente al Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química, UPV-CSIC, España. La energía de los pulsos individuales (~ 10 ns de duración) fue menor que 15 mJ por pulso. El sistema de fotólisis de destello láser consistió en un láser pulsado, una lámpara de xenón pulsada (Oriel Xenon Lo255),

un monocromador Oriel 77200, una tubo fotomultiplicador Oriel (PMT), una fuente de alimentación PMT 70705 y un osciloscopio Tektronix TDS-640A.

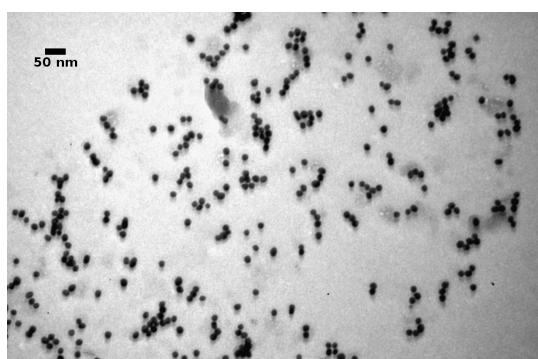
Las medidas se realizaron sobre mezclas de extractos de clorofilas a una concentración constante de $10 \mu\text{M}$ y una concentración variable de 0, 25 y $50 \mu\text{M}$ de NpAu en una mezcla de solvente de acetonitrilo y agua. Los transientes de absorción se registraron entre 400 y 800 nm sobre muestras previamente desaireadas con nitrógeno. Antes y después de cada determinación, se registraron los espectros de absorbancia y fluorescencia estacionaria a modo de verificar la degradación de la muestra debido al láser.

5.3. Resultados

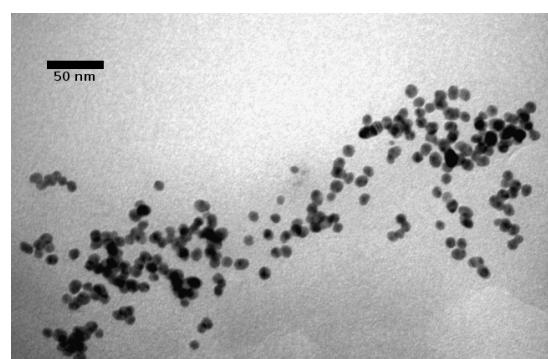
5.3.1. Síntesis y Caracterización de NpAu

Se lograron sintetizar nanopartículas de oro (NpAu) a partir de la reducción de HAuCl_4 en presencia de un exceso de citrato de sodio, utilizando ácido tánico como estabilizante y regulador de tamaño de partícula. El medio de síntesis de las partículas contiene el exceso de citrato remanente tras la reacción y posee un $\text{pH} = 5$. Debido a que en los experimentos con cloroplastos, el medio utilizado contenía elevada fuerza iónica, se realizó la caracterización de las NpAu tanto en el medio de reacción como en el medio de suspensión de cloroplastos con el objetivo de determinar la posible floculación de las partículas en este último. La caracterización incluyó espectroscopia UV/vis, determinación de radios hidrodinámicos, potencial Z y se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido y transmisión. A continuación, en la [Fig. 5.4](#) se muestran las imágenes de TEM y los respectivos histogramas de los diámetros de partículas obtenidos a partir de las mismas. El diámetro de las partículas se obtuvo tras la determinación del área de las mismas a partir del tratamiento de imágenes correspondiente con el *software* ImageJ.

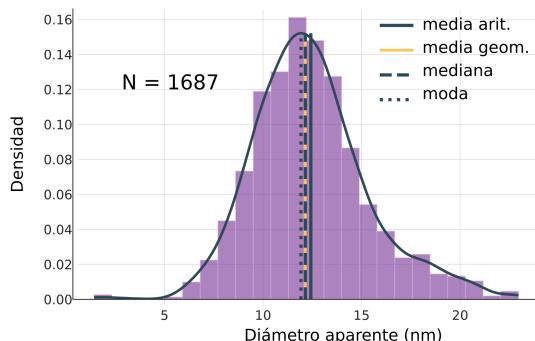
El tamaño de las partículas en el medio de síntesis fue de $14 \pm 3 \text{ nm}$ ([Fig. 5.4 A](#)). La distribución de tamaños fue unimodal y simétrica, estando los valores medios, moda y mediana muy próximos entre sí. El diámetro obtenido para las mismas partículas en el *buffer* de suspensión de cloroplastos fue de $12 \pm 3 \text{ nm}$ ([Fig. 5.4 B](#)). No se observaron diferencias significativas entre los diámetros de las nanopartículas en ambos medios. Sin embargo,



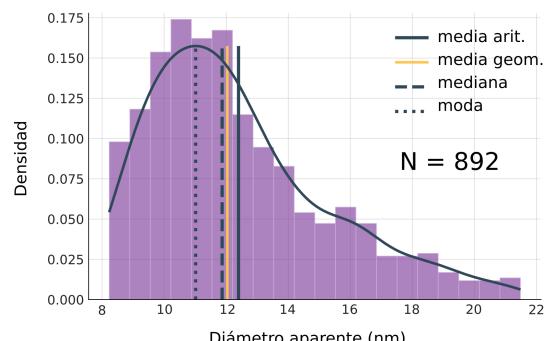
A Imagen TEM de NpAu en el medio de síntesis.



B Imagen TEM de NpAu en el buffer de suspensión de cloroplastos.



C Histograma de la distribución de tamaños obtenidos para NpAu en el medio de síntesis.

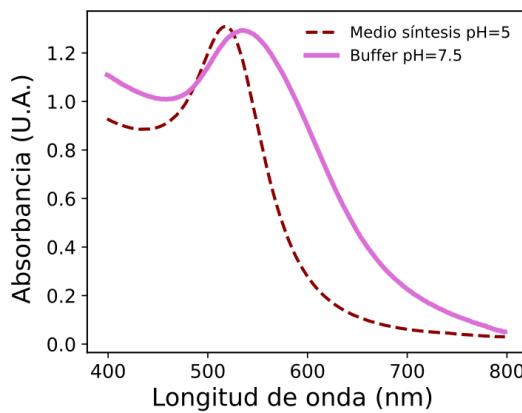


D Histograma de la distribución de tamaños obtenidos para NpAu en el buffer de suspensión de cloroplastos.

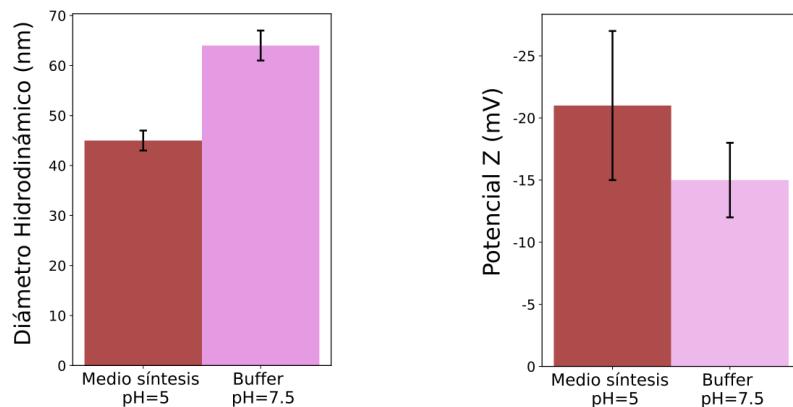
FIGURA 5.4: Imágenes TEM de NpAu en el medio de síntesis y en el medio de suspensión de cloroplastos, y sus respectivos histogramas de diámetros de partícula.

la distribución de tamaños de las NpAu en el medio regulador con alta fuerza iónica posee una distribución asimétrica, con una mayor proporción de partículas de gran tamaño (Fig. 5.4D). Si bien las partículas en ninguno de los dos medios floculó, es muy probable que una proporción mayor de NpAu se hayan aglomerado en el medio de suspensión de cloroplastos respecto al medio de síntesis, formando agregados de mayor tamaño. Esta aglomeración debió ser lo suficientemente leve como para no inducir precipitación de los agregados durante los meses de experimentación posteriores.

Los espectros UV/vis de las nanopartículas exhibieron el típico plasmón con un máximo a 520 ± 3 nm (Fig. 5.5 A). Se calculó el tamaño de partícula considerando la posición y altura del máximo de absorción de acuerdo al trabajo de Haiss[57] y se obtuvo un valor medio de 13 nm, el cual se corresponde bien con el diámetro obtenido por microscopía electrónica. Se observó un leve corrimiento del plasmón a longitudes de onda mayores en las partículas dispersas en buffer, lo cual es coherente con una leve aglomeración de



A Espectros de absorbancia de NpAu en el medio de síntesis y en el *buffer* de suspensión de cloroplastos.



B Diámetros hidrodinámicos de NpAu en el medio de síntesis y en el *buffer* de suspensión de cloroplastos.

C Potencial Z de NpAu en el medio de síntesis y en el *buffer* de suspensión de cloroplastos.

FIGURA 5.5: Espectros de absorbancia, radios hidrodinámicos y potencial Z de las NpAu en ambos medios estudiados.

partículas[58].

Los diámetros hidrodinámicos de las partículas obtenidos por DLS fueron 45 ± 2 nm en el medio de síntesis y 64 ± 3 nm en el medio de suspensión de cloroplastos (Fig. 5.5 B). La variación en el diámetro hidrodinámico está asociada al cambio en el medio de dispersión de las nanopartículas. El potencial Z fue $-(21 \pm 6)$ mV para las partículas en el medio de síntesis y $-(15 \pm 3)$ mV en el *buffer*. Esta bien reportado en bibliografía que los electrolitos y el pH afectan no solo la estabilidad de las nanopartículas de oro formadas, sino también el tamaño de las mismas en la suspensión[59]. Asimismo, la estabilidad de las nanopartículas depende de la fuerza iónica de la solución. Cuanto mayor es la fuerza iónica, mayor es la agregación de nanopartículas de oro producto de una disminución (en módulo) de

su carga superficial. Bajo una fuerza iónica alta, se presume que se suprime la doble capa de las NpAu, lo que resulta en un potencial Z más pequeño[60] tal como se observa en la Fig. 5.5 C. La carga superficial de las NpAu es negativa, no solo por su carácter metálico sino por los aniones citrato adsorbidos en la superficie.

Los resultados indicaron que la mayor proporción de las NpAu permanecieron como partículas únicas o aglomerados pequeños al transferirse del medio de síntesis a la solución reguladora. Sin embargo, la presencia de una mayor cantidad de iones en la solución regulada con respecto al medio de síntesis causó una disminución en la carga superficial absoluta del coloide (menos negativo), y por ende una mayor aglomeración de las mismas[58]. Esto también se evidenció en la espectroscopía UV/vis ya que el máximo y todo el espectro se corrió a longitudes de onda mayores, indicando un aumento en la proporción de partículas de mayor tamaño. Afortunadamente, las dispersiones de NpAu en el *buffer*, si se preparaban cuidadosamente utilizando materiales debidamente lavados con agua regia, mantenían las propiedades ópticas aquí informadas para las NpAu por varias semanas.

Una alternativa era sintetizar NpAu directamente en el buffer de suspensión de cloroplastos, pero se descartó por dos grandes motivos. El primero, es que la síntesis en un medio de pH y fuerza iónica diferente cambiaría el tamaño de partícula obtenido, y con ella las propiedades ópticas de las mismas. Otro motivo, es la presencia de gran cantidad de iones metálicos y posibles interferencias durante la síntesis que están presentes en el *buffer* de suspensión de cloroplastos. Para mantener entonces las mismas propiedades ópticas entre las NpAu que se aplicarían sobre hojas y cloroplastos, se decidió realizar una única estrategia de síntesis y así mantener un único tamaño de partícula. Luego, cuidadosamente, se cambió el medio de dispersión de las mismas por el *buffer* requerido para la suspensión de cloroplastos.

5.3.2. Sistema en estudio

Habiendo caracterizado las nanopartículas a utilizar en ambos medios de trabajo, se revisan a continuación las características espectroscópicas del sistema en estudio. En la Fig. 5.6 se muestran los espectros de absorción y emisión normalizados de los cloroplastos y nanopartículas. La absorción de las nanopartículas se presenta en una zona intermedia entre

la absorción y emisión de los cloroplastos (también de la clorofila y las hojas). Esta es una característica interesante, porque permite a la nanopartícula absorber luz en una zona donde la absorción en los cloroplastos está disminuida. Estas propiedades del sistema brindan la posibilidad de una transferencia de energía entre las NpAu y los cloroplastos u hojas, y hacen viable un posible incremento de la antena aparente de los cloroplastos u hojas, dada por la absorción de las NpAu en el verde, donde las hojas absorben poca luz. Se evaluó la validez de esta hipótesis con experimentos tanto en hoja, como en cloroplastos y clorofila.

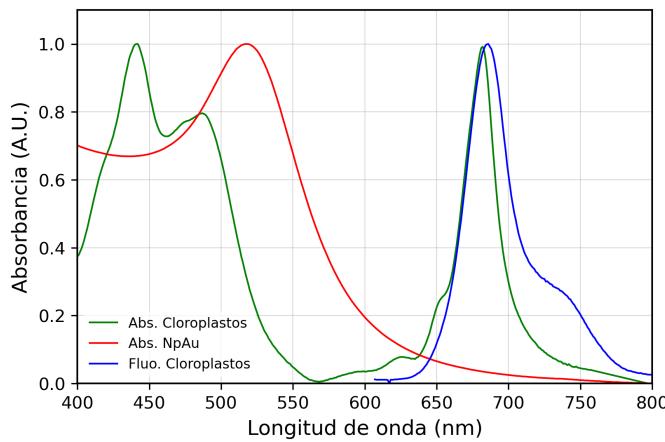


FIGURA 5.6: Espectros de absorción y emisión de cloroplastos y NpAu normalizados.

5.3.3. Tratamiento de hojas con NpAu

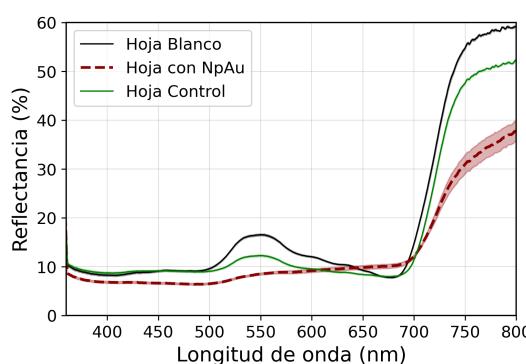
Para el tratamiento con nanopartículas se buscó una planta con hojas que permitieran la inoculación o infiltración de las mismas y además mantuvieran sus propiedades durante los días de experimentación. Primeramente, se probaron plantas *succulentas* para las cuales la infiltración con jeringa resultaba muy sencilla debido al grosor de las hojas, sin embargo, usualmente se rompían durante el procedimiento. Por el mismo motivo, no permitían mediciones consecutivas de fluorescencia estacionaria y reflectancia cuyas mediciones implican el uso clips o sujetadores para sostener las hojas durante el registro de los espectros. Se utilizaron finalmente hojas de un árbol (*Robinia pseudoacacia*) cercano dentro de Ciudad Universitaria y se optó por un método de inoculación de las nanopartículas mediante inmersión. Este procedimiento se utiliza en general para infiltrar compuestos fluorescentes dentro de las hojas, para luego ser observados bajo un microscopio confocal de fluores-

cencia. En dicho procedimiento se utiliza luz blanca o azul para inducir la apertura de los estomas y favorecer la entrada de los compuestos o partículas de la solución a la hoja. Los estomas son poros o canales presentes en la superficie de las hojas sobre el cual se produce el intercambio gaseoso y transpiración.

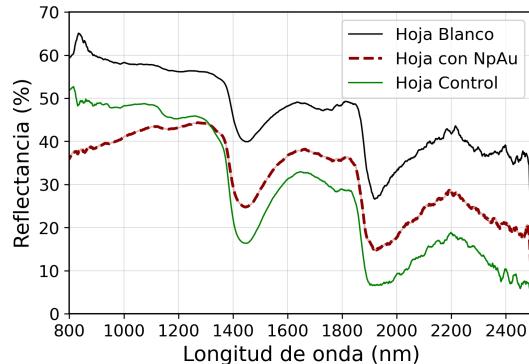
De esta forma se inocularon hojas con NpAu y solución control, y luego se estudió la espectroscopia registrando primeramente los espectros de reflectancia de las mismas.

5.3.4. Reflectancia de hojas

En la Fig. 5.7 se presentan los espectros de reflectancia de hojas sin inocular (hojas blanco) y de hojas inoculadas con nanopartículas y solución control. Se observó en la zona de 550 nm un máximo local de reflectancia que se corresponde con el color verde bien conocido de las hojas. Tras el tratamiento se produjeron cambios en todo el espectro estudiado. La variación más evidente en la región del visible fue una disminución en la banda observada entre 500-600 nm. Este cambio es consistente con la absorción característica de las NpAu en esa zona (Fig. 5.6).



A Reflectancia de hojas en el VIS.



B Reflectancia de hojas en el NIR.

FIGURA 5.7: Reflectancia difusa VIS-NIR de hojas en presencia y ausencia de NpAu. Las hojas blanco corresponden a hojas sin inocular, las hojas control fueron tratadas con solución control y las hojas con NpAu son hojas tratadas con NpAu. La zona sombreada en cada espectro representa el error estándar asociado a cada longitud de onda.

Para detectar el posible estrés de las hojas tratadas se calcularon varios índices espectrales o índices de vegetación de banda estrecha relacionados con la fisiología de la hoja, la estructura y el contenido de agua a partir de los espectros de reflectancia de la hoja[61].

Debido a la alta absorbtividad del agua en la región del infrarrojo cercano (NIR), se pueden

obtener índices de humedad a partir de la reflectancia en esta zona. Particularmente, las bandas de absorción del agua se encuentran en 970, 1200, 1450 y 1950 nm, en orden creciente de intensidad[41]. Los índices de agua o estrés hídrico calculados fueron: el índice de agua (WI), el índice de agua normalizado (NDWI), el índice de agua vegetal (LWI) y el índice de estrés por humedad (MSI). Por otro lado, se calcularon el índice de reflectancia fotoquímica (PRI), el índice de vegetación normalizado (NDVI), el índice NDVI modificado (mNDVI), y los índices específicos para clorofila *a* ($PSND_a$) y clorofila *b* ($PSND_b$), los cuales guardan una proporcionalidad con el contenido de carotenoides y clorofilas, según el caso. Los resultados se presentan en la [Tabla 5.1](#).

TABLA 5.1: Índices espectrales que se corresponden con el contenido de clorofilas (verdor), carotenoides (incluye xantófilas) y agua para las hojas tratadas. ** y * representan diferencias estadísticamente significativas entre las hojas control y con NpAu, al nivel $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente.

Categoría	Índice	Hoja Blanco	Hoja Control	Hoja con NpAu
Verdor	NDVI	0.75	$0.75 \pm 0.03^{**}$	$0.57 \pm 0.09^{**}$
	mNDVI	0.65 ± 0.02	$0.74 \pm 0.06^{**}$	$0.548 \pm 0.09^{**}$
	$PSND_a$	0.75 ± 0.03	$0.75 \pm 0.03^{**}$	$0.57 \pm 0.08^{**}$
	$PSND_b$	0.72 ± 0.02	$0.74 \pm 0.03^{**}$	$0.58 \pm 0.08^{**}$
Carotenoides	PRI	-0.027 ± 0.002	$-0.025 \pm 0.005^{**}$	$0.058 \pm 0.0028^{**}$
Agua	WI	1.033 ± 0.007	$1.00 \pm 0.01^*$	$0.94 \pm 0.01^*$
	LWI	1.40 ± 0.01	$2.73 \pm 0.03^{**}$	$1.77 \pm 0.02^{**}$
	NDWI	0.059 ± 0.001	$0.0084 \pm 0.0003^{**}$	$-0.086 \pm 0.003^{**}$
	MSI	0.791 ± 0.004	$0.581 \pm 0.004^{**}$	$0.96 \pm 0.01^{**}$

La mayoría de los índices de contenido de agua disminuyen para la hoja tratada con nanopartículas respecto a la hoja control. En líneas generales se observó un aumento en los índices de agua de las hojas control respecto a las hojas sin tratar (hojas blanco). Esto sugiere que el tratamiento en sí mismo incrementa levemente el contenido de agua en las hojas, lo cual es consistente con la metodología de inoculación utilizada. Por otro lado, los valores menores para los índices correspondientes a muestras con nanopartículas respecto del control, pueden deberse a una limitación en la entrada de agua a las hojas por la presencia de nanopartículas en sus estomas y espacios intracelulares. El índice MSI mostró

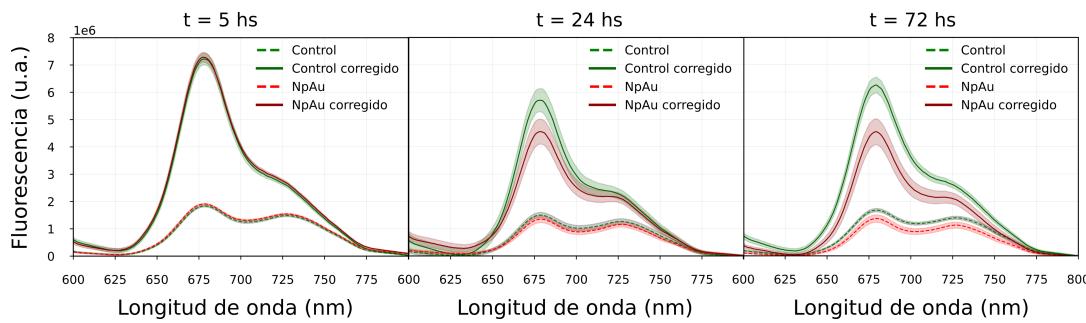
una tendencia inversa ya que refiere a estrés por humedad, y no contenido de agua como los anteriores. La tendencia en el índice refleja un mayor estrés en las hojas tratadas con nanopartícula que en las hojas control.

Los índices que se obtienen con valores de reflectancia en la región del visible, los cuales reflejan el contenido de pigmentos, son *a priori* engañosos. Esto se debe a que la reflectancia en la zona de 500-600 nm está comprometida por la absorción de luz producto de las NpAu presentes. Es decir, una disminución en la reflectancia en esta zona es un claro indicio de estrés por pérdida de pigmentos en las hojas sin tratar, pero en este caso la presencia del plasmón de las nanopartículas metálicas interfiere en la señal. Por ende, dado que la reflectancia en la región entre 500 y 600 nm está disminuida en las muestras tratadas con nanopartículas, y es una zona donde también absorben los pigmentos fotosintéticos, los índices ya no reflejan el contenido de pigmentos esperado. La disminución de todos los índices en la zona del VIS podría deberse a una disminución real del contenido de pigmentos, producto de su degradación o descomposición, o bien, a un aumento en la absorción en la zona dada por la presencia de las partículas. De hecho, el índice más afectado debería ser el PRI que cuantifica carotenoides, el cual usa la reflectancia a 531 nm, un punto fuertemente afectado por la absorción del plasmón de las NpAu ([Fig. 5.6](#) y [Fig. 5.7A](#)). Este no sería el caso, en cambio, para los índices de agua que se obtienen con valores de reflectancia a longitudes de onda mayores de 850 nm. En resumen, el registro de los espectros de reflectancia y el posterior cálculo de índices no es suficiente para inferir el estado fisiológico de las hojas inoculadas.

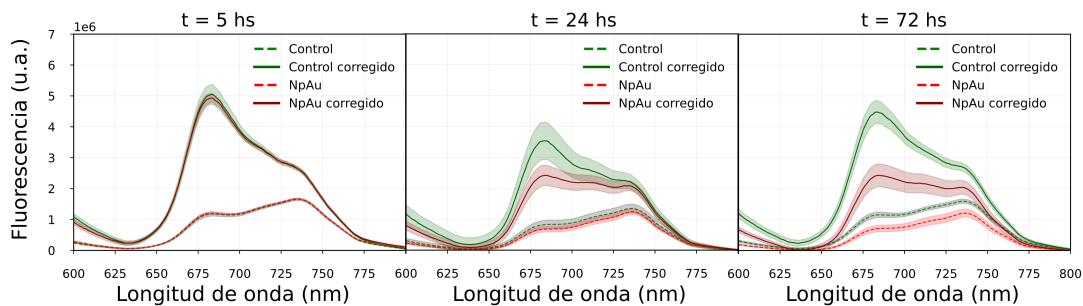
5.3.5. Fluorescencia estacionaria de clorofila

Los espectros de fluorescencia estacionaria de hojas se presentan en la [Fig. 5.8](#). Dichos espectros se obtuvieron bajo una iluminación leve que no induce la cinética de Kautsky, y por ende los espectros de fluorescencia corresponden al estado F_0 [43]. La banda con máximo en el rojo (680 nm) corresponde únicamente a emisión del fotosistema II (PSII), mientras que tanto el PSII como el PSI contribuyen a la banda ubicada en el rojo lejano a temperatura ambiente[62]. Se observó una disminución de la fluorescencia experimental y corregida tras el tratamiento con las NpAu. Esto ocurrió para ambas longitudes de onda de excitación, siendo más evidente a 460 nm ([Fig. 5.8A](#)) y se acentuó con el tiempo de

exposición.



A Fluorescencia estacionaria experimental y corregida por reabsorción, de hojas tratadas con excitación a 460 nm.



B Fluorescencia estacionaria experimental y corregida por reabsorción, de hojas tratadas con excitación a 520 nm.

FIGURA 5.8: Fluorescencia de hojas control y tratadas con NpAu. Se muestran los espectros experimentales y corregidos por reabsorción de luz, obtenidos bajo excitación a 460 nm y 520 nm. Los distintos tiempos, 5, 24 y 72 hs corresponden al tiempo tras el primer tratamiento de las hojas. La zona sombreada representa el error estándar.

Como la absorción de la nanopartícula a las longitudes de onda de excitación es significativa, es probable que el *quenching* de fluorescencia experimental observado se deba a un efecto de filtro interno. Como la absorción de las NpAu es mayor a 520 nm que a 460 nm, es razonable que el *quenching* observado fuera de $\sim 40\%$ a 520 nm, mientras que a 460 nm fue de $\sim 18\%$.

Dado que la corrección por reabsorción corrige utilizando la reflectancia a las longitudes de onda tanto de excitación como de emisión, la absorción del plasmón de las NpAu está considerada, y por lo tanto el *quenching* observado en los espectros de fluorescencia corregidos no es producto del efecto de filtro interno. Dicho *quenching* sobre la fluorescencia corregida, el cual corresponde a la fluorescencia del cloroplastos, fue de $\sim 47\%$ a 520 nm y de $\sim 27\%$ a 460 nm, tras 72 hs de exposición con las NpAu. Es decir, las diferencias son aún mayores que las observadas en la fluorescencia de las hojas afectadas por la reabsorción.

ción de luz.

El cociente de fluorescencia entre las bandas en el rojo y rojo lejano, $F_{red}/F_{far-red}$, se ha estudiado ampliamente en función del estrés en las plantas[63]. Una hoja saludable suele tener un cociente de fluorescencia corregido por reabsorción entre 2.5 y 2.9 y aumenta frente diferentes factores de estrés[64-66]. Los cocientes obtenidos se muestran en la Tabla 5.2, y se encuentran dentro de un rango saludable. Sin embargo, los cocientes de hojas tratadas con NpAu fueron siempre menores a los obtenidos para las hojas control, y luego de 72 hs el cociente alcanzó su mínimo valor de 2.3. El cociente $F_{red}/F_{far-red}$ tiene significado fisiológico solo a excitación de 460 nm, donde se conoce la composición de la emisión correspondiente al PSI y PSII de las bandas observadas a temperatura ambiente. Es por ello que el análisis y la interpretación de los cocientes $F_{red}/F_{far-red}$ bajo excitación de 520 nm es aproximada, ya que se supone un comportamiento similar al observado bajo excitación de 460 nm.

TABLA 5.2: Cociente de bandas, $F_{red}/F_{far-red}$, corregido por reabsorción. * representa diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.05$.

Tiempo	$\lambda_{exc} = 460$ nm		$\lambda_{exc} = 520$ nm	
	Control	NpAu	Control	NpAu
5 hs	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.1
24 hs	$2.7 \pm 0.4^*$	$2.3 \pm 0.4^*$	$1.5 \pm 0.2^*$	$1.2 \pm 0.1^*$
72 hs	$2.6 \pm 0.2^*$	$2.3 \pm 0.5^*$	$1.6 \pm 0.2^*$	$1.1 \pm 0.3^*$

La absorción de las NpAu en dispersión acuosa a longitudes de onda mayores de 650 nm es reducida y puede considerarse despreciable (Fig. 5.5 A). Sin embargo, la posición del plasmón se corre hacia el rojo cuando las nanopartículas se aglomeran entre sí y se desconoce el espectro de las mismas dentro de la hoja. Además, la corrección por reabsorción de luz considera el espectro de reflectancia de la hoja inoculada con NpAu a pesar de que el espectro real de las partículas en la hoja es desconocido. Por ende, la disminución en el cociente $F_{red}/F_{far-red}$ no está asociado a un efecto de filtro interno por la presencia del plasmón de las nanopartículas. Para corroborar que el *quenching* de fluorescencia corregida y la disminución del cociente de fluorescencia obtenidos son efectos reales de las

NpAu sobre los cloroplastos, se registraron los espectros de fluorescencia de cloroplastos en presencia de NpAu cuyos resultados se muestran en la [Subsección 5.3.7](#) a continuación.

Por otro lado, durante las repetidas mediciones de las mismas hojas, se observó el deterioro de las mismas tras la constante manipulación. Esto condujo tanto a un aumento en la variabilidad de los resultados, impactando directamente en los desvíos estándar obtenidos, como a una disminución de la fluorescencia de las hojas control. Se optó entonces por repetir el experimento, pero realizando las mediciones solo a las 24 y 96 hs de exposición.

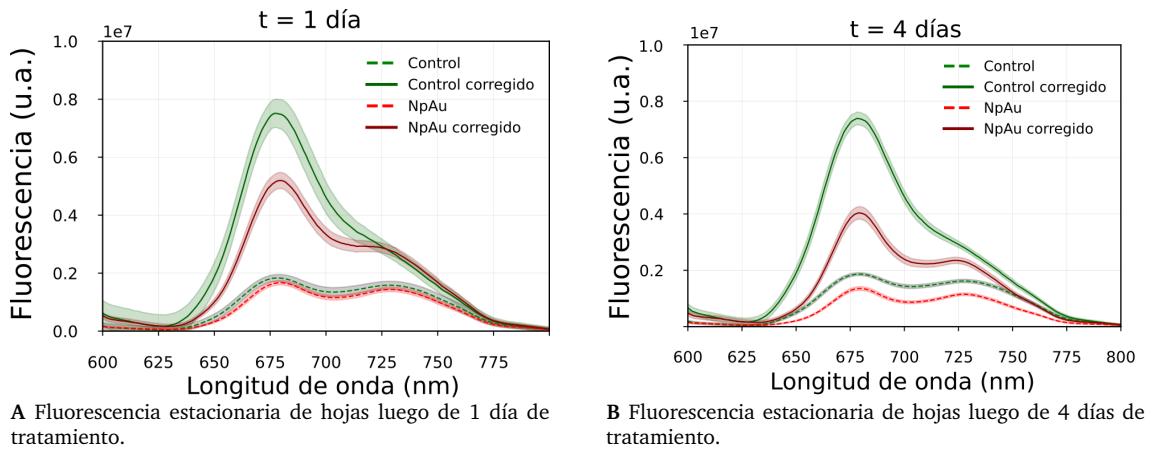


FIGURA 5.9: Espectros de fluorescencia experimentales y corregidos por reabsorción de luz, luego de 1 y 4 días de tratamiento de las hojas, bajo excitación de 460 nm. La zona sombreada representa el error estándar.

Como se puede observar en la [Fig. 5.9](#) el efecto neto es análogo al observado en la [Fig. 5.8](#), pero los cambios son más intensos y los desvíos estándar menores. El *quenching* observado en la intensidad de la fluorescencia corregida es de $\sim 45\%$ con excitación a 460 nm y $\sim 65\%$ a 520 nm. Asimismo el cociente $F_{red}/F_{far-red}$ disminuye significativamente de 2.8 ± 0.4 para el control a 1.9 ± 0.2 para las hojas tratadas con NpAu, bajo excitación de 460 nm. Además la intensidad y la distribución espectral de la fluorescencia del control se conservó entre los días de medición, en comparación con los resultados de la [Fig. 5.8](#). Esto refleja el menor deterioro de las hojas producto de una menor manipulación de las hojas tratadas.

5.3.6. Fluorescencia de clorofila variable

Los curvas típicas de las cinéticas de Kautsky obtenidas para las hojas control y las hojas tratadas con NpAu se muestran en la Fig. 5.10. Los parámetros fotosintéticos resultantes se muestran en la Tabla 5.3 y Fig. 5.11. Todos los valores absolutos de fluorescencia, como la fluorescencia inicial (F_0) y fluorescencia máxima (F_M) disminuyeron en presencia de las nanopartículas respecto al control y esta disminución se hizo más evidente con el transcurrir de los días. La disminución de F_0 se corresponde con lo observado en los espectros de fluorescencia de las hojas con NpAu discutidos en la sección anterior. En consecuencia, debido a que las intensidades de fluorescencia fueron menores, el tiempo transcurrido hasta alcanzar el estado estacionario también fue menor. Por ejemplo, observando la Fig. 5.10, tras encender la luz actínica, el tiempo que empleó la hoja control en alcanzar un valor estacionario fue mayor al que empleó la hoja tratada con NpAu. Lo mismo ocurrió con el tiempo de estabilización tras los pulsos de luz saturante, pero en la escala de tiempo de la Fig. 5.10 no se logra apreciar correctamente.

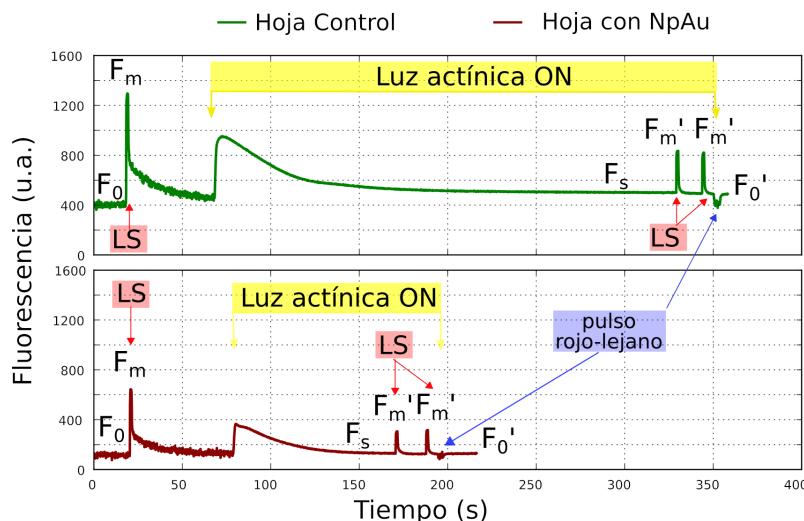


FIGURA 5.10: Curva típica de la cinética de Kautsky de hojas control (arriba) y hojas tratadas con NpAu. LS representa un pulso de luz saturante.

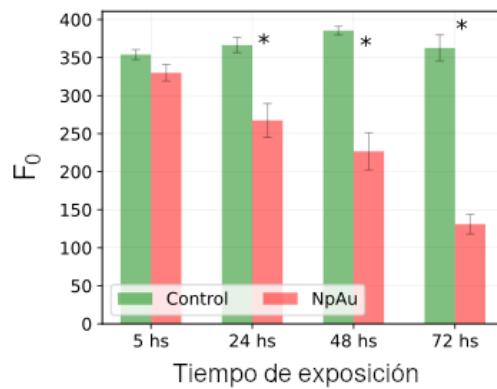
De acuerdo con la Tabla 5.3 y la Fig. 5.11, los cambios observados en los parámetros derivados de la cinética de Kautsky para hojas en presencia de NpAu respecto a los controles fueron: disminución de la fluorescencia en cada punto de la curva, particularmente en F_0 , F_s y F_M), aumento de los cocientes de fluorescencia como F_V / F_M y F_V / F_0 , aumento del rendimiento cuántico de PSII (Φ_{PSII}) y el *quenching* fotoquímico (q_P) y por último, dis-

minución del rendimiento cuántico del NPQ (Φ_{NPQ}), del rendimiento cuántico fotofísico (Φ_C) y del *quenching* no fotoquímico (q_{NP}).

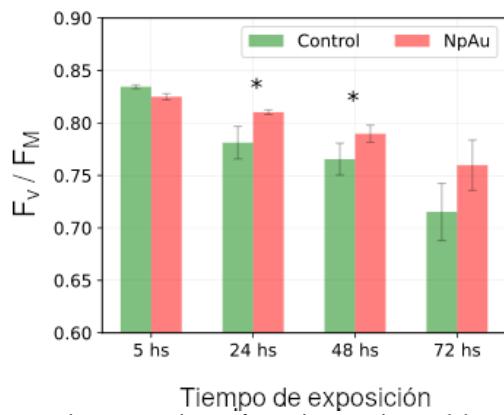
Recordemos que la fluorescencia registrada por el fluorómetro de pulso modulado PAM utilizado para registrar la cinética de Kautsky se debe principalmente a la emisión del PSII y suele despreciarse la contribución del PSI. A la longitud de onda de excitación del fluorómetro PAM (594 nm), tanto las NpAu como el centro de reacción del PSII (P_{680}) pueden excitarse (ver Fig. 5.6 para comparar los espectros de absorción). La absorción de luz por las NpAu podría conducir a una transferencia de energía al P_{680} del PSII, específicamente a la banda de absorción alrededor de 680 nm. Sin embargo, si este proceso ocurre, debería observarse un aumento de la fluorescencia el cual no se observó. Por lo tanto, dicho proceso no ocurre o bien la constante cinética asociada al mismo es despreciable frente a las demás constantes cinéticas asociadas a la desactivación de P_{680}^* . Por otro lado, si las NpAu absorbieran luz y no transfirieran energía, actuarían generando un efecto de filtro interno que se traduce en una disminución en la fluorescencia tal como se observó para F_0 y F_M . Pero esto no es suficiente para explicar la variación en los cocientes de fluorescencia (Tabla 5.2 y Tabla 5.3) y en los parámetros de la cinética de Kautsky como el Φ_{PSII} .

TABLA 5.3: Parámetros derivados de la cinética de Kautsky en presencia de NpAu. * representa diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.05$.

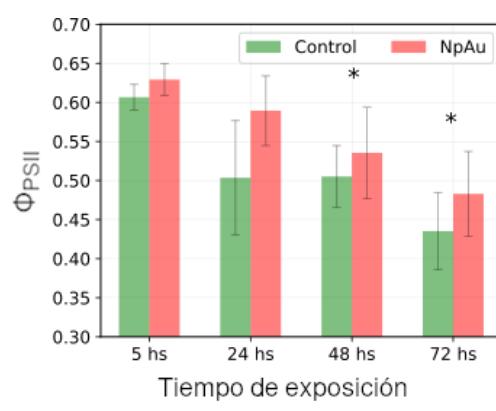
Par.	24 hs		96 hs	
	Control	NpAu	Control	NpAu
F_0	$189 \pm 11^{**}$	$91 \pm 6^{**}$	$235 \pm 18^{**}$	$70 \pm 8^{**}$
F_M	$1143 \pm 50^{**}$	$579 \pm 33^{**}$	$996 \pm 22^{**}$	$380 \pm 40^{**}$
F_V/F_M	0.836 ± 0.005	0.844 ± 0.003	$0.76 \pm 0.01^*$	$0.816 \pm 0.003^*$
F_V/F_0	5.1 ± 0.4	5.4 ± 0.5	$3.2 \pm 0.3^{**}$	$4.4 \pm 0.6^{**}$
Φ_{PSII}	$0.66 \pm 0.03^{**}$	$0.74 \pm 0.02^{**}$	$0.45 \pm 0.03^{**}$	$0.59 \pm 0.06^{**}$
Φ_{NPQ}	$0.12 \pm 0.02^{**}$	$0.06 \pm 0.02^{**}$	$0.24 \pm 0.02^{**}$	$0.16 \pm 0.05^{**}$
Φ_C	$0.21 \pm 0.02^*$	$0.20 \pm 0.02^*$	$0.31 \pm 0.02^*$	$0.25 \pm 0.04^*$
PS_{rate}	$124 \pm 5^{**}$	$140 \pm 4^{**}$	$84 \pm 6^{**}$	$111 \pm 11^{**}$
q_P	$0.89 \pm 0.03^*$	$0.93 \pm 0.03^*$	$0.77 \pm 0.07^*$	$0.84 \pm 0.08^*$
q_{NP}	$0.43 \pm 0.07^*$	$0.27 \pm 0.09^*$	$0.56 \pm 0.03^{**}$	$0.47 \pm 0.14^{**}$



A Fluorescencia inicial (F_0) en función del tiempo de exposición de las NpAu a las hojas.



B Rendimiento cuántico fotoquímico máximo del PSII (F_v/F_M) en función del tiempo de exposición de las NpAu a las hojas.



C Rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) en función del tiempo de exposición de las NpAu a las hojas.

FIGURA 5.11: Parámetros derivados de la cinética de Kautsky en presencia de NpAu en función del tiempo de exposición. Significancia estadística con $\alpha < 0.05$ (*).

En literatura hay varios trabajos en los que se ha informado *quenching* de la fluorescencia de clorofila en solución. Este *quenching* se atribuyó generalmente a transferencia de electrones del singlete excitado de clorofila *a* a diferentes aceptores [67-69]. En particular, Barazzouk y cols.[7] observaron una transferencia de electrones fotoinducida entre clorofila *a* y nanopartículas de oro. De hecho, los autores demostraron que la clorofila *a* excitada puede donar un electrón a NpAu, un proceso termodinámicamente factible ya que el potencial de reducción para la clorofila excitada es -1.1 V vs NHE y el nivel de Fermi de Au es +0.5 V vs NHE[7].

En el presente trabajo también se detectó un *quenching* de la fluorescencia de clorofila estacionaria y variable (Fig. 5.8, Fig. 5.10 y Fig. 5.11). Teniendo en cuenta los valores de - 0.62 V a - 0.70 V para el potencial de reducción del estado excitado del RC del PSII

$(E_{P_{680+}/P_{680^*}}^o)$ vs NHE [70, 71] y el nivel de Fermi de 0.5 V a 0.7 V para NpAu de tamaño similar[7, 72], la transferencia de carga desde el P_{680}^* hacia las NpAu es termodinámicamente favorable. Por lo tanto, para interpretar debidamente los resultados observados se deben considerar simultáneamente la absorción de luz tanto de la clorofila como de las NpAu, el proceso de transferencia de carga entre ambas y el efecto de filtro interno de las NpAu sobre la emisión de clorofila.

Para racionalizar el significado de los cambios observados en los parámetros fotofísicos cuando las NpAu están presentes, es conveniente resolver un esquema cinético general donde el proceso de transferencia de carga se introduce en paralelo con los procesos fotosintéticos y otros decaimientos fotofísicos conocidas a partir del RC del PSII (P_{680}):

1. $P_{680} \xrightarrow{h\nu} P_{680}^*$
2. $NpAu \xrightarrow{h\nu} NpAu^*$
3. $P_{680}^* \xrightarrow{k_d} P_{680}$
4. $P_{680}^* \xrightarrow{k_f} P_{680} + h\nu_f$
5. $P_{680}^* + Q_A \xrightarrow{k_p} P_{680}^+ + Q_A^-$
6. $P_{680}^* + NpAu \xrightarrow{k_{ct}} P_{680}^+ + NpAu^-$

con $k_d + k_f = k_c$

En el esquema cinético presentado, k_c , representa la constante de velocidad para el decaimiento fotofísico, k_p la constante de velocidad para el primer paso de transferencia de electrones de la fotosíntesis y k'_{ct} , análogamente, la constante de velocidad para la transferencia de electrones de P_{680}^* a la nanopartícula de oro que tiene incorporada la concentración de NpAu dentro ($k'_{ct} = k_{ct} \cdot [NpAu]$).

A partir de este mecanismo general, los diferentes parámetros fotosintéticos pueden expresarse en términos de las constantes de velocidad[73]. La mayoría de los parámetros dependen de la luz actínica y del tiempo de iluminación pero, en lo que sigue a continuación, se obviarán estas dependencias a modo de simplificar la notación. F_0 puede

entonces escribirse mediante las [Ec. 5.2](#) y [Ec. 5.3](#), en ausencia o presencia de las NpAu respectivamente.

$$F_0 = G \cdot \frac{k_f}{(k_c + k_p)} \quad (5.2)$$

$$F_0^{NpAu} = G' \cdot \frac{k_f}{(k_c + k'_{ct} + k_p)} \quad (5.3)$$

con $G' < G$. donde G es un factor instrumental asociado a la ganancia. El efecto de filtro interno de las NpAu se ha incluido cualitativamente en G' al indicar que G' es menor que G. Suponiendo los mismos valores para k_f , k_c y k_p para ambas situaciones, se puede ver que se predice un valor menor para F_0 en presencia de NpAu debido al proceso de transferencia de carga y al filtro interno. En este caso, como las hojas fueron adaptadas a la oscuridad, los mecanismos del NPQ no están activos ($k_{NPQ} = 0$) y todos los aceptores primarios de electrones están oxidados ($f_{QA}(t) = 1$). Más detalles de las ecuaciones se presentaron en la [Subsección 2.4.4](#).

Cuando se aplica un pulso de saturación, no es posible la transferencia de carga (ya sea para el proceso fotosintético o la transferencia de carga a NpAu) debido al hecho de que todos los aceptores de electrones se reducen y se obtiene un valor máximo F_M . En este punto, las ecuaciones son:

$$F_M = G \frac{k_f}{k_c} \quad (5.4)$$

$$F_M^{NpAu} = G' \frac{k_f}{k_c} \quad (5.5)$$

Donde el valor más bajo para G' comparado con G explica el resultado experimental de que $F_M^{NpAu} < F_M$. Notar que bajo la suposición de que k_f y k_c permanecen constantes, la transferencia de carga hacia la nanopartícula no influye en la disminución de F_M . Este sería debido únicamente al efecto de filtro asociado al plasmón de las NpAu.

Hasta aquí, F_0 y F_M son parámetros obtenidos para una hoja previamente adaptada a la oscuridad. Luego del pulso de saturación que induce el máximo valor de fluorescencia F_M se enciende una luz actínica bajo la cual la hoja realiza fotosíntesis, produciendo una señal de fluorescencia dependiente del tiempo en función de la proporción de aceptores

reducidos, entre otros procesos que se activan y regulan bajo iluminación no saturante (revisión en [Subsección 2.1.2](#)). Luego de un tiempo mínimo necesario para la estabilización de dicha señal, cuyo valor se representa como F_S ([Fig. 5.10](#)), se aplica un nuevo pulso saturante y se obtiene un valor de fluorescencia máxima que en esas condiciones se denota F_M' . Análogamente a F_0 y F_M , se predice una disminución para ambos parámetros en presencia de NpAu:

$$F_S = G \cdot \frac{k_f}{(k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A})} \quad (5.6)$$

$$F_S^{NpAu} = G' \cdot \frac{k_f}{(k_c + k_{NPQ} + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A})} \quad (5.7)$$

$$F_M' = G \cdot \frac{k_f}{k_c + k_{NPQ}} \quad (5.8)$$

$$F_M'^{NpAu} = G' \cdot \frac{k_f}{k_c + k_{NPQ}} \quad (5.9)$$

Nuevamente, la disminución de F_S y F_M' se debe a que $G' < G$ y en el caso de F_S además, a la presencia de k_{ct} .

El rendimiento cuántico máximo (F_V / F_M), se describe mediante las [Ec. 5.10](#) y [Ec. 5.11](#) en ausencia o presencia de NpAu, respectivamente:

$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M} = \left(\frac{k_f}{k_c} - \frac{k_f}{k_c + k_p} \right) \frac{k_c}{k_f} = \frac{k_p}{k_c + k_p} \quad (5.10)$$

$$\left(\frac{F_V}{F_M} \right)^{NpAu} = \frac{F_M - F_0}{F_M} = \left(\frac{k_f}{k_c} - \frac{k_f}{k_c + k_{ct} + k_p} \right) \frac{k_c}{k_f} = \frac{k_{ct} + k_p}{k_c + k_{ct} + k_p} \quad (5.11)$$

Experimentalmente se encontró que:

$$\frac{F_V}{F_M} < \left(\frac{F_V}{F_M} \right)^{NpAu} \quad (5.12)$$

Esta inecuación puede ser escrita en términos de las constantes cinéticas como:

$$\frac{k_p}{k_c + k_p} < \frac{k_{ct} + k_p}{k_c + k_{ct} + k_p} \frac{k_c + k_{ct} + k_p}{k_c + k_p} < \frac{k_c + k_p}{k_p} \frac{k_{ct}}{k_c + k_p} < \frac{k_{ct}}{k_p} \quad (5.13)$$

$$\Rightarrow k_c + k_p > k_p \Rightarrow k_c > 0 \quad (5.14)$$

que, debido a los valores positivos para todas las constantes de velocidad, siempre se

cumple. Esto muestra que incluso cuando no hay un incremento real en la fotosíntesis (asociado a un aumento en $k_p \cdot f_{Q_A}$), la presencia del proceso de transferencia de carga hacia las nanopartículas causa un aparente aumento en el rendimiento cuántico máximo de la fotosíntesis. En otras palabras, en presencia de NpAu si se considera la transferencia de carga planteada, F_V / F_M ya no representa el rendimiento fotoquímico máximo de la fotosíntesis, sino al rendimiento de la suma de los dos procesos de transferencia de electrones: la fotosíntesis y la transferencia de carga a las nanopartículas.

Análogamente para F_V / F_0 tenemos:

$$\frac{F_V}{F_0} = \frac{F_M - F_0}{F_0} = \left(\frac{k_f}{k_c} - \frac{k_f}{k_c + k_p} \right) \frac{k_c + k_p}{k_f} = \frac{k_p}{k_c} \quad (5.15)$$

$$\left(\frac{F_V}{F_0} \right)^{NpAu} = \frac{F_M - F_0}{F_0} = \left(\frac{k_f}{k_c} - \frac{k_f}{k_c + k_{ct} + k_p} \right) \frac{k_c + k_{ct} + k_p}{k_f} = \frac{k_{ct} + k_p}{k_c} \quad (5.16)$$

Experimentalmente se observó que $F_V / F_0 < F_V / F_0^{NpAu}$, lo cual se cumple si $k_{ct} > 0$, algo que es lógico debido a que es una constante cinética, particularmente de la transferencia de carga hacia la NpAu. Es importante notar que el cambio de este parámetro se explica únicamente considerando una transferencia de carga entre el P_{680}^* y las NpAu.

Se encontró un escenario similar para el rendimiento cuántico del PSII dada por las Ec. 5.17 y Ec. 5.18.

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_M' - F_S}{F_M'} = \frac{k_p \cdot f_{Q_A}}{k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A}} \quad (5.17)$$

$$\Phi_{PSII}^{NpAu} = \frac{F_M' - F_S}{F_M'} = \frac{k_p \cdot f_{Q_A} + k_{ct}}{k_c + k_{NPQ} + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}} \quad (5.18)$$

Experimentalmente se observó que $\Phi_{PSII} < \Phi_{PSII}^{NpAu}$ (ver Fig. 5.11), inecuación que en términos de las constantes cinéticas, está dada por la Ec. 5.19.

$$\begin{aligned} \frac{k_p \cdot f_{Q_A}}{k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A}} &< \frac{k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}}{k_c + k_{NPQ} + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}} \\ \Rightarrow \frac{k_c + k_{NPQ} + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}}{k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A}} &< \frac{k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}}{k_p \cdot f_{Q_A}} \\ \Rightarrow \frac{k_{ct}}{k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A}} &< \frac{k_{ct}}{k_p \cdot f_{Q_A}} \Rightarrow k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A} > k_p \cdot f_{Q_A} \\ &\implies k_c + k_{NPQ} > 0 \end{aligned} \quad (5.19)$$

que siempre es válida debido a los valores positivos para las constantes de velocidad. Tal como en el caso de F_V/F_M , el aumento en la eficiencia de PSII observado en hojas con NpAu es aparente, ya que si se considera la transferencia de carga, estos parámetros pierden su correspondencia con la tasa fotosintética. Es decir, lo que se calcula en estas condiciones no es Φ_{PSII} sino la eficiencia cuántica para los dos procesos en conjunto, que implica tanto la transferencia de electrones desde P_{680}^* hacia los aceptores de electrones tradicionales como a la NpAu. Luego, los rendimientos cuánticos asociados, que son el rendimiento cuántico fotofísico, Φ_C y el rendimiento cuántico del *quenching* no fotoquímico, Φ_{NPQ} disminuyen a expensas del aumento de Φ_{PSII} ya que todos ellos deben sumar uno. De la misma forma, se puede predecir el cambio en estos parámetros en base al planteo de los mismos en función de las constantes cinéticas correspondientes. Para Φ_{NPQ} se tiene:

$$\Phi_{NPQ} = \frac{(F_M - F_M')F_S}{F_M'F_M} = \frac{k_{NPQ}}{k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A}} \quad (5.20)$$

$$\Phi_{NPQ}^{NpAu} = \frac{(F_M - F_M')F_S}{F_M'F_M} = \frac{k_{NPQ}}{k_c + k_{NPQ} + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}} \quad (5.21)$$

El Φ_{NPQ} disminuyó en presencia de NpAu siempre y cuando $k_{ct} > 0$, lo cual es completamente lógico debido a que es una constante cinética. Se observó, que al igual que para F_V/F_0 (Ec. 5.16) la disminución del Φ_{NPQ} solo se explica si se considera una etapa adicional de transferencia de carga hacia la NpAu. Lo mismo ocurre para Φ_C según las Ec. 5.22 y Ec. 5.23:

$$\Phi_C = \frac{F_S}{F_M} = \frac{k_c}{k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A}} \quad (5.22)$$

$$\Phi_C^{NpAu} = \frac{F_S}{F_M} = \frac{k_c}{k_c + k_{NPQ} + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}} \quad (5.23)$$

Donde nuevamente es válido que Φ_C disminuya en presencia de NpAu si $k_{ct} > 0$.

Para el *quenching* no fotoquímico, el resultado experimental fue que $q_{NP} > q_{NP}^{NpAu}$. Aquí nuevamente, la ocurrencia del proceso de transferencia de carga a NpAu distorsiona el significado de este parámetro. De hecho, considerando las Ec. 5.24 y Ec. 5.25 que se

obtuvieron para q_{NP} :

$$q_{NP} = \frac{F_M - F_M'}{F_M - F_0} = \frac{k_{NPQ}(k_c + k_p \cdot f_{Q_A})}{(k_p \cdot f_{Q_A} + k_{NPQ})k_p \cdot f_{Q_A}} \quad (5.24)$$

$$q_{NP}^{NpAu} = \frac{F_M - F_M'}{F_M - F_0} = \frac{k_{NPQ}(k_c + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A})}{(k_p \cdot f_{Q_A} + k_{NPQ})(k_c + k_p \cdot f_{Q_A})} \quad (5.25)$$

Luego, para que se cumpla el resultado experimental:

$$\begin{aligned} q_{NP} > q_{NP}^{NpAu} &\implies \frac{k_{NPQ}(k_c + k_p \cdot f_{Q_A})}{(k_p \cdot f_{Q_A} + k_{NPQ})k_p \cdot f_{Q_A}} > \frac{k_{NPQ} \cdot (k_c + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A})}{(k_p \cdot f_{Q_A} + k_{NPQ})(k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A})} \\ &\implies \frac{k_c + k_p \cdot f_{Q_A}}{k_p \cdot f_{Q_A}} > \frac{k_c + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}}{k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}} \Rightarrow k_p \cdot f_{Q_A} < k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A} \Rightarrow k_{ct} > 0 \end{aligned} \quad (5.26)$$

Así, un valor menor de q_{NP}^{NpAu} es el resultado de una transferencia de carga a NpAu y no necesariamente a un *quenching* no fotoquímico menor dado por un cambio en k_{NPQ} .

Finalmente, el *quenching* fotoquímico aumenta en presencia de NpAu y las expresiones correspondientes se muestran en las [Ec. 5.27](#) y [Ec. 5.28](#). Sin embargo, debido a la complejidad matemática de la ecuación, la solución no es tan simple como en los casos anteriores.

$$q_P = \frac{F_M' - F_S}{F_M' - F_0} = \frac{\left(\frac{k_f}{k_c + k_{NPQ}} - \frac{k_f}{k_c + k_{NPQ} + k_p \cdot f_{Q_A}} \right)}{\left(\frac{k_f}{k_c + k_{NPQ}} - \frac{k_f}{k_c + k_p \cdot f_{Q_A}} \right)} \quad (5.27)$$

$$q_P^{NpAu} = \frac{\left(\frac{k_f}{k_c + k_{NPQ}} - \frac{k_f}{k_c + k_{NPQ} + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}} \right)}{\left(\frac{k_f}{k_c + k_{NPQ}} - \frac{k_f}{k_c + k_{ct} + k_p \cdot f_{Q_A}} \right)} \quad (5.28)$$

Para cada una de las múltiples soluciones para la inecuación donde $q_{NP}^{NpAu} > q_{NP}$, hay alguna relación posible entre las constantes cinéticas que cumple con el resultado experimental de que q_P de las hojas tratadas con NpAu sea mayor que el obtenido para el control.

En las ecuaciones presentadas en esta última sección se supuso que todas las constantes cinéticas permanecen constantes a pesar de la incorporación de un proceso adicional de transferencia de carga. Algo que en la práctica no necesariamente debe ocurrir, ya que la fotosíntesis y la transferencia de carga hacia la nanopartícula no solo son procesos competitivos, sino que ambos forman la especie P_{680}^+ cuya desactivación es la determinante de la velocidad. Por ende, la existencia de un proceso adicional que aumente la frecuencia de formación de P_{680}^+ impactará en la velocidad de ambos procesos de transferencia de carga

y posiblemente en las constantes de velocidad asociadas.

En conclusión, luego de confirmar que muchos de los parámetros obtenidos a partir de la cinética de Kautsky pierden su correspondencia con los procesos fisiológicos asociados a la fotosíntesis, se vuelve imperante medir algún parámetro que resulte independiente tanto del filtro óptico de la señal de fluorescencia como de la transferencia de carga hacia la NpAu. Con ese objetivo realizamos posteriormente mediciones en cloroplastos.

5.3.7. Fluorescencia de cloroplastos en ausencia de reabsorción de luz

Se registraron los espectros de fluorescencia de cloroplastos depositados sobre una placa de vidrio, a distintas concentraciones de NpAu. En estas circunstancias, como la capa es suficientemente fina no hay procesos de reabsorción, el espectro de fluorescencia se corresponde con el espectro de las hojas luego de corregir por reabsorción. Es decir, no hay procesos que distorsionen la distribuciónpectral del espectro obtenido respecto al espectro de emisión de los cloroplastos en la hoja. Esta metodología no es más que una validación de la corrección por reabsorción (Subsección 5.2.9) y los cambios observados en presencia y ausencia de NpAu en la fluorescencia estacionaria de hoja presentada en la Subsección 5.2.6.

TABLA 5.4: Cociente de fluorescencia de cloroplastos depositados en portaobjetos. Los símbolos * y ** representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**), respectivamente.

Vol (ml)	NpAu ($10^{11} \cdot ml^{-1}$)	$F_{red}/F_{far-red}$	Control (μM)	$F_{red}/F_{far-red}$
0.2	1.4	$1.58 \pm 0.08^{**}$	2.6	$3.3 \pm 0.3^{**}$
0.5	3.5	$2.1 \pm 0.1^*$	6.5	$3.1 \pm 0.3^*$
0.7	4.9	$2.35 \pm 0.08^*$	9.0	$3.1 \pm 0.2^*$
1.0	7.0	$2.09 \pm 0.05^{**}$	12.3	$2.6 \pm 0.2^{**}$

En la Tabla 5.4 se indican las concentraciones de NpAu (cantidad de $NP \cdot ml^{-1}$) y la concentración de citrato del control en las suspensiones utilizadas. La solución de citrato al 0,02 % se utilizó como control debido a que en la síntesis de NpAu se usa citrato en exceso. Tanto el cociente de fluorescencia como la fluorescencia disminuyen en presencia de NpAu, y esta disminución depende de la concentración de nanopartículas presentes en

la muestra. Ambas tendencias se corresponden con lo observado anteriormente para la fluorescencia estacionaria de hojas (Subsección 5.2.6).

5.3.8. Cinética de la reacción de Hill

Se registró la cinética de reacción de Hill a partir del decaimiento de la absorbancia del DCPIP, el cual es un aceptor de electrones artificial de la cadena fotosintética, en función del tiempo. Dicha tasa es proporcional a la tasa fotosintética máxima de los cloroplastos. El DCPIP, de color azul, al reducirse en presencia de cloroplastos y luz forma un compuesto que no absorbe en la región del visible. Por lo que la tasa de fotoreducción de DCPIP se puede obtener a partir del registro de la absorbancia en el máximo de absorción de este compuesto (608 nm) en función del tiempo. Dicha determinación se realizó con una concentración constante de cloroplastos, a la que se le añadieron volúmenes adecuados de solución control o NpAu. Los resultados se presentan en la Fig. 5.12.

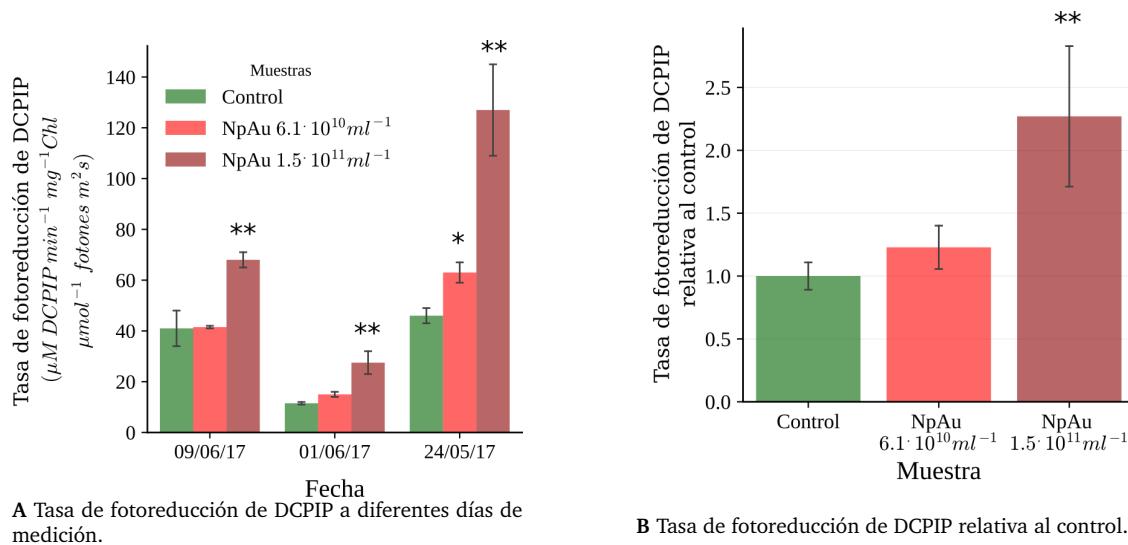


FIGURA 5.12: Tasa de fotoreducción de DCPIP a diferentes días de medición y relativa al control a las dos concentraciones de nanopartículas estudiadas. Los símbolos * y ** representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**), respectivamente.

En la Fig. 5.12A se muestran las tasas obtenidas en los distintos días de medición. Si bien los valores entre controles y muestras no son lo suficientemente similares como para promediarlos directamente, se observa una clara tendencia. Las diferencias entre los valores correspondientes a diferentes días de medición se deben a pequeñas diferencias en la actividad de cloroplastos. Dicha actividad es muy sensible a múltiples factores, co-

mo por ejemplo la temperatura, la cual debe mantenerse rigurosamente a $\approx -3^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de utilizar los cloroplastos para este ensayo. También pueden deberse a sutiles variaciones en la composición o la idoneidad de la membrana de los cloroplastos obtenidos. Debido a esta variabilidad adicional de los datos se optó por calcular una tasa de fotoreducción de DCPIP relativa al control para cada fecha de medición (Fig. 5.12 B). La tasa de fotoreducción de DCPIP aumentó en presencia de NpAu. Los cambios observados para una concentración de partículas de $6.1 \times 10^{10} \text{ NP} \cdot \text{mL}^{-1}$ no fueron significativos ($p > 0.05$), mientras que sí lo fue para $1.5 \times 10^{11} \text{ NP} \cdot \text{mL}^{-1}$. La tasa de fotoreducción de DCPIP y por ende, la máxima capacidad fotosintética de cloroplastos se duplicó en presencia de la concentración más alta de nanopartículas testeadas ($1.5 \times 10^{11} \text{ NP} \cdot \text{mL}^{-1}$). Las tasas están calculadas considerando la variación de la absorbancia en oscuridad, la cual no es debida a la actividad fotosintética, tal como se mencionó en Subsección 5.2.13.

No se observó una descomposición apreciable de DCPIP en presencia únicamente de NpAu, ya sea en condiciones de luz u oscuridad. Esto indica que no hubo transferencia directa de electrones desde las NpAu hacia el DCPIP o algún otro tipo de interferencia de las NpAu en la actividad redox del DCPIP. Por lo general, esta sonda se usa para detectar electrones involucrados en la cadena fotosintética, pero en nuestros experimentos, también podría detectar el transporte de electrones desde NpAu. Es decir, habiendo planteado que el P_{680}^* podría estar transfiriendo electrones a las NpAu, el DCPIP también podría tomar electrones de estas NpAu cargadas negativamente (NpAu^-). Dicha posibilidad solo ocurriría en presencia de cloroplastos ya que la tasa de reducción del DCPIP no se vio afectada por la presencia únicamente de las NpAu.

5.3.9. Tasa de evolución de oxígeno

La tasa de evolución de oxígeno se registró en condiciones de saturación, es decir, corresponde a la máxima capacidad fotosintética de los cloroplastos bajo iluminación saturante. En presencia de nanopartículas, la tasa de evolución de O_2 aumentó a más del doble ($p < 0.001$). Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango esperado según bibliografía para la concentración de cloroplastos testeada ($30\text{-}80 \mu\text{moles } \text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl hr}^{-1}$) [74]. Los resultados pueden explicarse nuevamente suponiendo que se llevó a cabo una transferencia de carga desde el P_{680}^* a la nanopartícula. Tal como se detalló en el Capítulo 2,

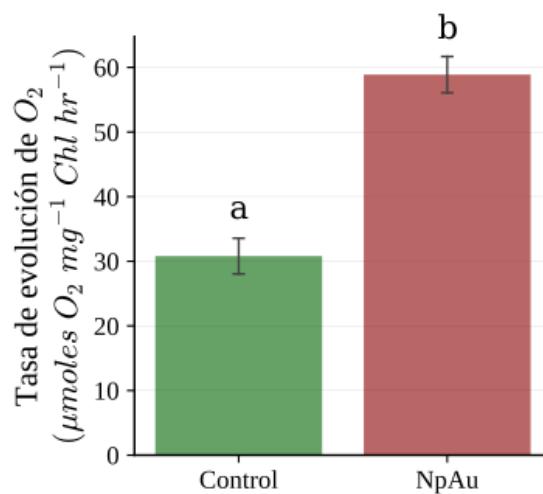
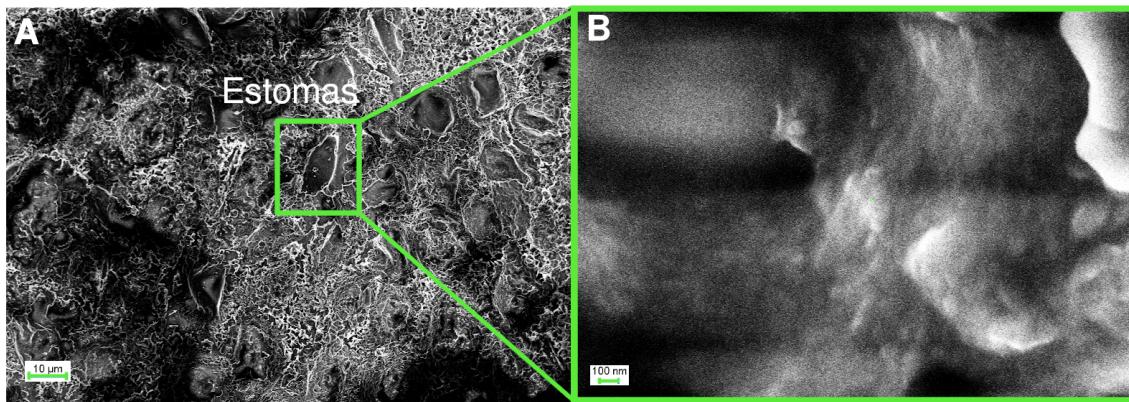


FIGURA 5.13: Tasa máxima de evolución de oxígeno de cloroplastos. Tasas obtenidas bajo iluminación saturante y concentración de cloroplastos constante ($\sim 100 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$). La concentración de NpAu estudiada fue de $2.8 \times 10^{11} \text{ Np} \cdot \text{mL}^{-1}$. Significancia estadística con $\alpha < 0.001$.

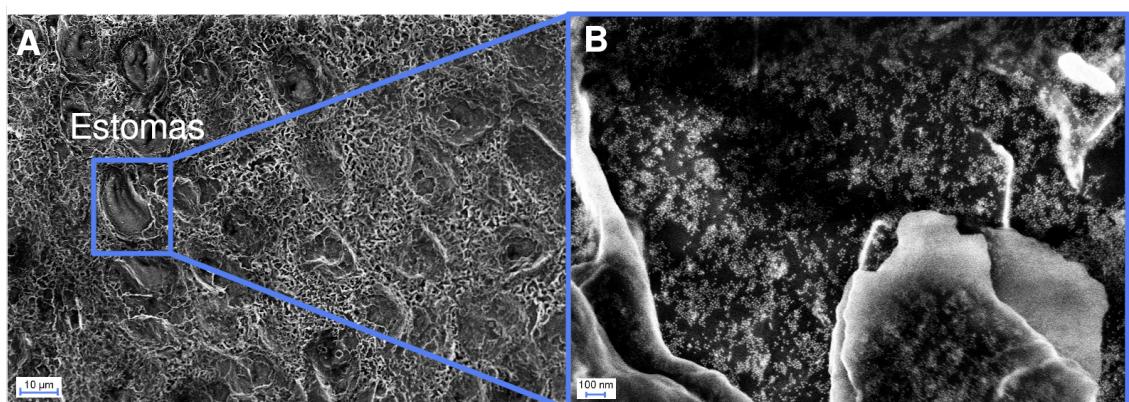
luego de transferir un electrón, el P_{680}^* forma P_{680}^+ , el cual vuelve a su estado fundamental al tomar electrones provenientes de la división del agua por el complejo proteico que desarrolla oxígeno (OEC, por sus siglas en inglés). Un aumento en la actividad del P_{680} producto de un paso adicional de transferencia de carga hacia la NpAu conduciría en un aumento proporcional en la actividad del OEC y por ende un aumento en la producción de O_2 . Este aumento en la actividad del PSII no necesariamente está relacionada con una mayor actividad fotosintética global ya que para eso, los electrones deben llegar hasta el final de la cadena fotosintética para finalmente convertirse en energía química para la asimilación del CO_2 . Debido a que por cada mol de agua se liberan 4 electrones mientras que un P_{680}^* libera solo un electrón por fotón absorbido, si se duplicó la producción de oxígeno en presencia de NpAu, la actividad del P_{680} debió aumentar 8 veces respecto al control. Sin embargo, si este fuese el caso, la tasa de fotoreducción de DCPIP debería entonces haber aumentado 8 veces y en cambio solo se duplicó. Esto nos indica que buena parte de los electrones que está liberando el P_{680}^* no están circulando por la cadena de transporte electrónico y se pierden en algún otro acceptor de electrones, posiblemente las NpAu.

5.3.10. Microscopía de hojas y cloroplastos con NpAu

Con el objetivo de comprobar la presencia de NpAu dentro de las hojas y específicamente, de los cloroplastos, se llevaron a cabo diferentes microscopías electrónicas de la superficie y el interior de las hojas y de cloroplastos aislados.



A Imágenes SEM de hojas control. Se muestran dos escalas diferentes en A y B, que corresponden a 2 kX y 200 kX, respectivamente.



B Imágenes SEM de hojas con NpAu. Se muestran dos escalas diferentes en A y B, que corresponden a 2 kX y 200 kX, respectivamente.

FIGURA 5.14: Imágenes SEM de hojas tratadas con suspensión de NpAu y solución control.

En la Fig. 5.14 A se muestran imágenes SEM de la superficie de hojas tratadas con solución control, mientras que en la Fig. 5.14 B se muestran hojas tratadas con NpAu. En ambas, el cuadrante A corresponde a un aumento tal que posibilita distinguir los estomas presentes en la superficie de la hoja, los cuales son sensibles a la luz y permiten el intercambio gaseoso de CO_2 y H_2O en la hoja. Luego, en el cuadrante B se realizó un aumento dentro de los estomas, en el cual fue posible distinguir gran cantidad de nanopartículas presentes en la muestra de hoja tratada con NpAu (Fig. 5.14 B). Es muy interesante observar que las na-

nopartículas no se encuentran formando aglomerados, sino que se observan nítidamente de forma individual dentro del estoma en la superficie de la hoja. Además, no se observaron partículas de similar tamaño, coloración y forma en las muestras correspondientes a las hojas control sin NpAu. Dada la similitud en tamaño, forma y coloración de estas partículas que fueron observadas solo en las hojas tratadas con NpAu, con las partículas que se observaron por SEM de una muestra de NpAu en suspensión (Fig. 5.15), se concluyó que estas partículas se trataban efectivamente de las NpAu y no de otro componente de la hoja. Como se comentó anteriormente, dado que la muestra no es un buen conductor eléctrico, se observaron interferencias y zonas dañadas por el haz de electrones incidente sobre la hoja. La baja conductividad eléctrica suele sortearse al depositar un material conductor sobre la superficie. En este caso, como este procedimiento reduciría ampliamente la capacidad de observar las NpAu, no se realizó. Para reducir las interferencias y los cambios inducidos sobre la muestra, la técnica a cargo del microscopio SEM, Claudia Marchi, realizó las medidas rápidamente evitando enfocar con el haz de electrones una misma zona por mucho tiempo. Gracias a estos cuidados y su amplia experiencia, se pudieron obtener las imágenes SEM presentadas en esta sección.

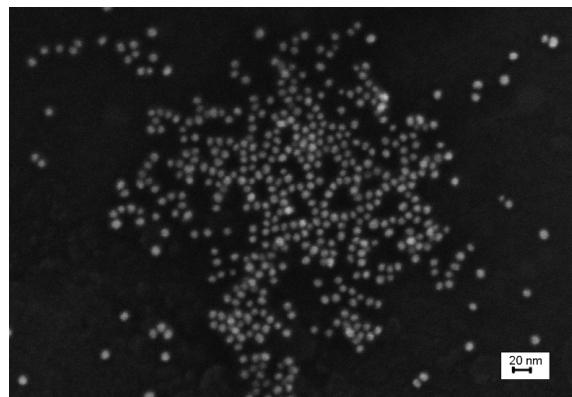


FIGURA 5.15: Imagen SEM de una suspensión de NpAu en el medio de síntesis.

Habiendo obtenido imágenes de las NpAu sobre la superficie de las hojas, se prepararon muestras para obtener imágenes del interior de las hojas. Dado que en ese momento no se contaba con las herramientas para obtener una imagen TEM de una fina lámina de hoja previamente fijada y teñida, se cortaron trozos pequeños de las hojas y se colocaron de forma tal que la sección de corte transversal quedase hacia arriba. De esta forma fueron posibles obtener imágenes SEM como las presentadas en la Fig. 5.16. En dicha figura se

distinguen bajo los distintos aumentos mostrados, la estructura de la pared vegetal y las células. Sin embargo, no fue posible distinguir de esta forma los cloroplastos y solo se observaron algunas estructuras básicas. En el panel C de la Fig. 5.16 se observaron pequeñas partículas con la forma, tamaño y coloración correspondiente a las NpAu observadas por SEM. Si bien no es posible confirmar, con ésta técnica, que las partículas observadas fueran realmente las NpAu, no se observaron estas partículas en las muestras de hoja control. Además, aunque en la figura se distingue bien el mesófilo, particularmente las células alargadas que constituyen la empalizada donde se realiza fundamentalmente la fotosíntesis, no es posible asegurar con certeza si las partículas están dentro o fuera de ella.

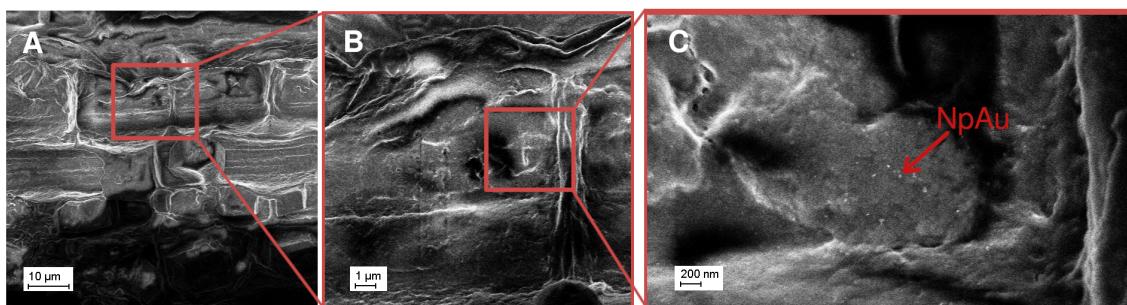


FIGURA 5.16: Imágenes SEM de un corte transversal de hoja tratada con NpAu. Las escalas en A, B y C corresponden a aumentos de 2 kX, 10 kX y 50 kX, respectivamente.

Por otro lado, las imágenes TEM de hojas no se pudieron realizar en paralelo con las imágenes SEM debido a que para ello se requiere de un procedimiento previo muy largo y complejo, al que no se tuvo acceso en ese tiempo. El primer paso de dicho procedimiento es la fijación química para preservar la muestra biológica con mínima alteración de volumen y morfología del estado nativo, y el segundo paso consiste en aplicar agentes de tinción para aumentar el contraste de la muestra, el cual de base es muy bajo. En ese momento, sí fue posible obtener imágenes TEM de muestras de cloroplastos con NpAu. Para ello, de forma análoga a las imágenes TEM de una suspensión de NpAu, se depositaron gotas de la muestra en una grilla adecuada y se obtuvieron las imágenes de la Fig. 5.17. En dicha figura se distinguen bien las nanopartículas individuales y también formando agregados, pero se visualizan pobremente los cloroplastos. No fue posible observar la estructura interna de los cloroplastos, por lo que no se pudo comprobar con estas imágenes, si las NpAu están dentro de los cloroplastos o solo adsorbidos en su membrana.

Por último, se pudo completar la información microscópica, obteniendo imágenes de Cri-

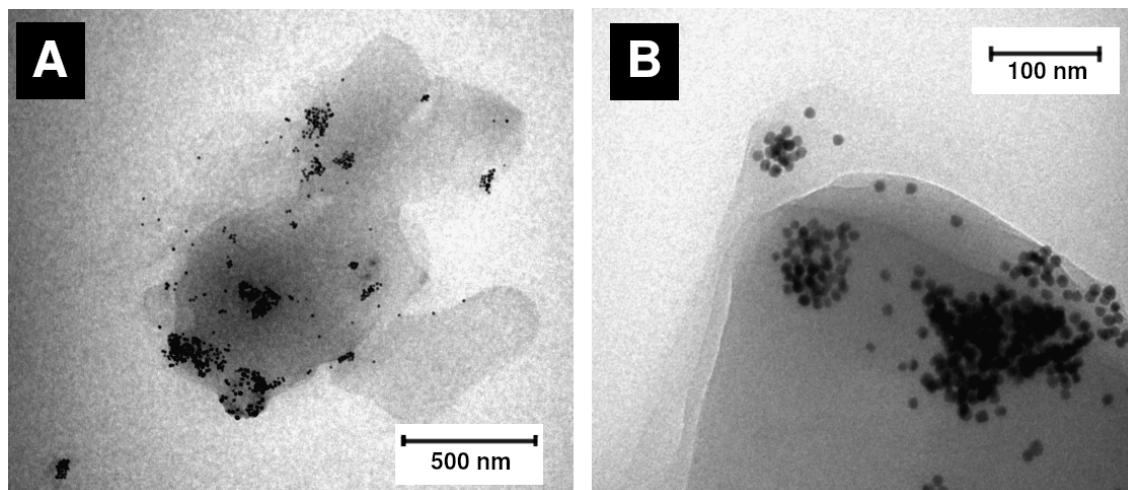


FIGURA 5.17: Imágenes TEM de cloroplastos con NpAu. En ambos cuadrantes se distinguen las nanopartículas dentro y en la periferia de la materia orgánica correspondiente al cloroplasto.

TEM en España, gracias a un trabajo en colaboración entre la Dra. Díz y el grupo de María Luisa Marín en la Universidad Politécnica de Valencia. Las imágenes presentadas en la Fig. 5.18 se realizaron utilizando un crio-ultramicrotomo, el cual presenta varias ventajas por sobre los métodos de fijación convencionales para muestras biológicas. En dichas imágenes fue posible identificar nanopartículas dentro de las hojas, y también la estructura de los cloroplastos conservada. En el panel A y B se presentan imágenes con aumentos tales donde se pueden distinguir claramente las nanopartículas de forma individual, no agregadas. Las nanopartículas se observan, al igual que en todas las imágenes TEM (sin tinción negativa), de color oscuro debido a su elevada densidad electrónica. Dada la estructura similar a un canal alrededor de las partículas en los paneles A y B de la Fig. 5.18 se supone que las NpAu se encuentran en un espacio intracelular, una vaina vascular o bien, en canales internos entre las células del mesófilo. Luego en el panel B se pueden observar otras estructuras de similar contraste y tamaño que las nanopartículas pero menos definidas en el interior de las células o compartimentos. Dado que estructuras similares se observaron en todas las imágenes, incluidas las correspondientes a las hojas control (no se muestran), deben tratarse de proteínas o agregados proteicos que luego de la fijación y tinción, mejoraron su contraste electrónico natural. Este panel se incluyó específicamente para distinguir entre NpAu y proteínas o complejos proteicos. La diferencia fundamental es la nitidez con la que se observan y la posibilidad de observar partículas esféricas individuales en el caso de las NpAu, no así para las proteínas.

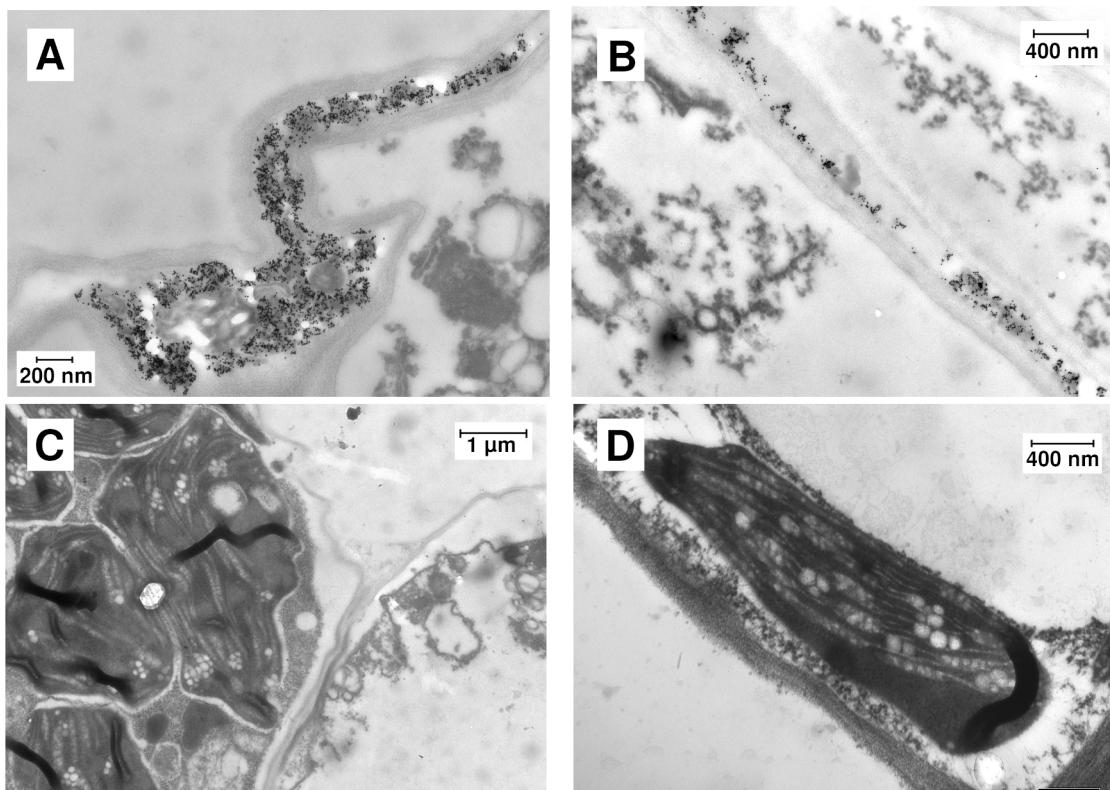


FIGURA 5.18: Imágenes de Cryo-TEM de hojas tratadas con NpAu. En A y B se muestran imágenes donde se distinguen nanopartículas individuales. En C y D, los aumentos son menores y se distinguen los cloroplastos y las membranas tilacoidales.

Luego, los paneles C y D de la Fig. 5.18 presentan zonas de las hojas donde se visualizan los cloroplastos con su estructura interna bien conservada. En ambas se identifican los cloroplastos de coloración más oscura que el medio circundante dada la mayor cantidad de materia orgánica en esa zona y por ende, una mayor fijación y tinción del material biológico. Las membranas tilacoides se visualizaron como láminas longitudinales a lo largo de todo el cloroplasto. Las zonas blancas con bordes poco nítidos corresponden a depósitos de almidón, muy comunes en este tipo de hojas. También se visualizan en el panel C zonas con artefactos en la imagen, particularmente el área blanca observada entre cloroplastos corresponde a una zona donde se rompió o daño la crio-sección, y otra zona negra más arriba que correspondería a la precipitación de algún agente de tinción o fijación. Lamentablemente, luego de la fijación y la tinción, ambas necesarias para la correcta visualización de la estructura interna de la hoja, no fue posible distinguir con claridad las nanopartículas dentro de los cloroplastos ya que ambas estructuras poseen coloración muy oscura. En el panel D de la Fig. 5.18 se distinguen dentro del cloroplasto algunas partículas esféricas que podrían corresponder a las NpAu. Sin embargo, dado que el cloroplasto

en D está rodeado de proteínas o agregados proteicos de similar tamaño y coloración (los mismos que se ven en el panel B) no fue posible asegurar que las partículas observadas dentro del cloroplasto se traten efectivamente de NpAu.

5.3.11. Extracción de clorofila y caracterización espectroscópica

Se trajeron los pigmentos fotosintéticos de hojas de espinaca y se realizó una cromatografía líquida con el objetivo de separar los carotenoides de las clorofilas. Luego, el extracto original de hoja se separó en dos, uno conteniendo principalmente carotenoides con una fuerte coloración amarilla, y otro conteniendo clorofilas (*a* y *b*) de coloración verde. En la [Fig. 5.19](#) se presentan los espectros de absorbancia obtenidos tras la extracción y la separación posterior. En ella se visualiza claramente la disminución de la absorbancia a ≈ 470 nm, la cual está asociada principalmente a los carotenoides, en el extracto de clorofilas respecto al extracto original.

En la zona de 450 - 470 nm la absorción se debe principalmente a clorofila *b* y carotenoides presentes en el extracto de hoja original. Dicha absorción disminuye notablemente, relativo al máximo, luego de la separación de los carotenoides por cromatografía. La banda situada en ≈ 470 nm en el extracto de clorofilas se debe principalmente a la absorción de clorofila *b*. Por otro lado, es notable la similitud de los espectros del extracto de carotenoides y el espectro de β -caroteno puro, indicando que este último es el carotenoide principal del extracto obtenido.

Tras calcular las concentraciones de clorofila y carotenoides en los extractos, se comprobó analíticamente la disminución de la proporción de carotenoides en la mezcla, ya que la relación Chls/Cars aumentó de ~ 3 , según el día de extracción, a ~ 15 luego de separar los carotenoides por cromatografía. La concentración de los extractos de clorofila en los experimentos se mantuvo alrededor de $10 \mu\text{M}$ en todo momento y la concentración de nanopartículas fue de 25 y $50 \mu\text{M}$.

Habiendo confirmado el éxito de la separación de las clorofilas y los carotenoides, se llevaron a cabo experimentos para determinar los tiempos de vida del singlete y el triplete de los extractos de clorofila en presencia de dos concentraciones diferentes de NpAu.

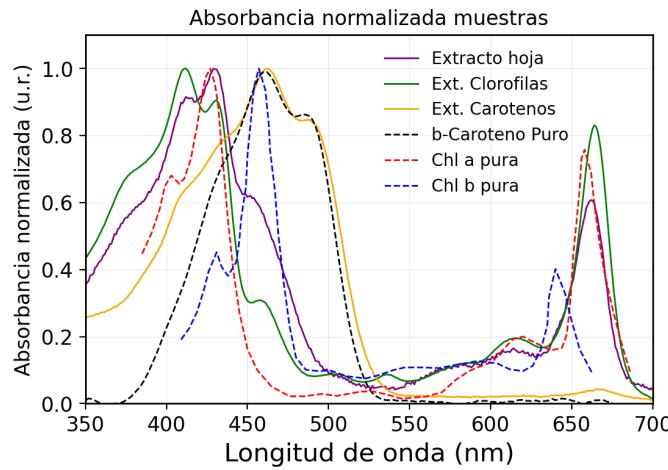
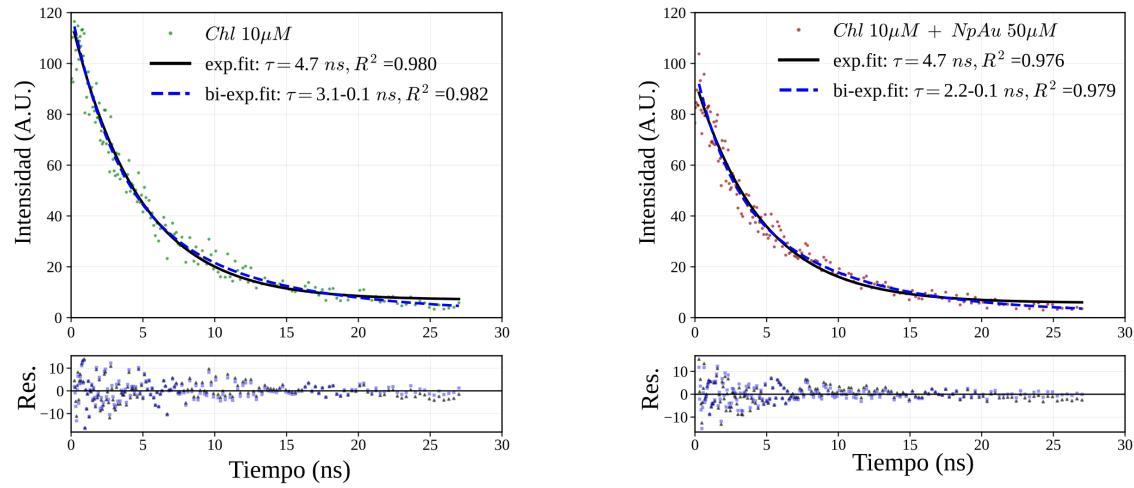


FIGURA 5.19: Espectros de absorbancia normalizados de extractos (línea sólida) y pigmentos puros (línea punteada).

5.3.12. Tiempos de vida de fluorescencia de un extracto de clorofila

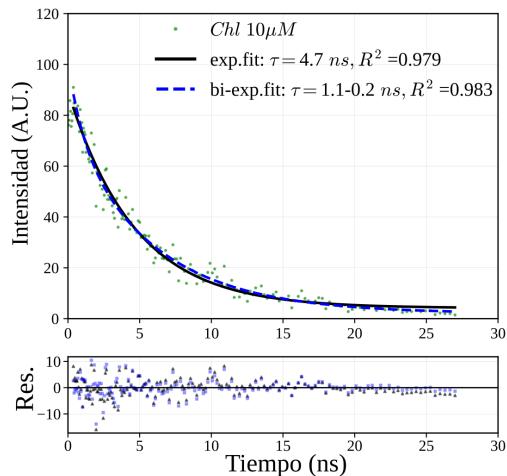
Se realizaron mediciones de tiempo de vida de fluorescencia de mezclas de clorofila extraída y NpAu, en ambiente de nitrógeno y en aire. Dado que en el proceso interviniente no involucra tripletes, los resultados deberían ser los mismos. Los decaimientos así como los ajustes y sus correspondientes residuos se muestran en las Fig. 5.20 y Fig. 5.21.



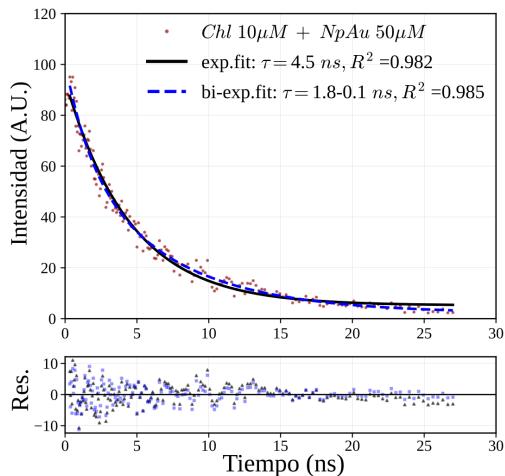
A Decaimiento de fluorescencia de una muestra de extracto de clorofilas.

B Decaimiento de fluorescencia de una muestra de extracto de clorofilas con NpAu.

FIGURA 5.20: Decaimientos de fluorescencia de extractos de clorofilas y extractos de clorofila con NpAu en atmósfera de nitrógeno. Se superponen a los puntos experimentales las curvas obtenidas tras el ajuste mono y bi-exponencial correspondientes. En la leyenda se indican los tiempos de vida obtenidos para cada ajuste. En la parte inferior se presenta la distribución de residuos para cada ajuste.



A Decaimiento de fluorescencia de una muestra de extracto de clorofillas.



B Decaimiento de fluorescencia de una muestra de extracto de clorofillas con NpAu.

FIGURA 5.21: Decaimientos de fluorescencia de extractos de clorofillas y extractos de clorofila con NpAu en atmósfera de aire. Se superponen a los puntos experimentales las curvas obtenidas tras el ajuste mono y bi-exponencial correspondientes. En la leyenda se indican los tiempos de vida obtenidos para cada ajuste. En la parte inferior se presenta la distribución de residuos para cada ajuste.

Tanto en atmósfera de nitrógeno como en aire los resultados fueron muy similares tal como se esperaba, sin embargo los cambios asociados a los tiempos de vida por la presencia de las NpAu son sutiles. Además, en ambos casos, los ajustes bi-exponentiales no generan una distribución de residuos más próxima a cero respecto a los ajustes monoexponentiales. Asimismo, los tiempos de vida obtenidos para los ajustes monoexponentiales están más próximos al rango esperado, mientras que los obtenidos tras el ajuste bi-exponencial poseen mayor variabilidad entre los duplicados y los tiempos de vida obtenidos no se corresponden bien a los esperados para clorofila *a* y *b*, separadamente. La motivación para un ajuste bi-exponencial fue la existencia de dos tipos de clorofila con tiempos de vida diferentes. Por lo tanto, si las NpAu estuviesen afectando únicamente a una de ellas, se podría identificar cual de acuerdo a los tiempos característicos de cada una. Sin embargo, dado que las diferencias en los tiempos de vida de las clorofillas no se diferencian suficientemente, la capacidad para diferenciarlas es limitada y depende fuertemente de los parámetros de entrada del ajuste y la relación señal/ruido de la fluorescencia obtenida. Los tiempos de vida de clorofila *a* y *b* en distintos solventes y en los obtenidos en los experimentos aquí descriptos se presentan en la Tabla 5.5.

En un trabajo reciente de Mezacasa y cols.[76] se observó un aumento de la fluorescencia

TABLA 5.5: Tiempos de vida del singlete experimentales y bibliográficos para clorofila *a* y *b*. Se muestran los resultados tras los ajuste mono y bi-exponentiales.

Muestra	τ (ns) (mono-exp.)	τ (ns) (bi-exp.)	Solvente	Referencia
Chl <i>a</i>	5.44 - 6.12	-	Metanol	
	5.55	-	Etanol 95 %	[75]
	6.04 - 7.19	-	Piridina, Tolueno	
	5.06	-	Metanol:H ₂ O	[76]
Chl <i>b</i>	2.9	-	Etanol	
	2.9 - 3.1	-	Acetona	[77]
Chl <i>a</i> + <i>b</i> (3:1)	4.68 ± 0.02	5.88 ± 0.14 2.08 ± 1.44		
Chl <i>a</i> + <i>b</i> (3:1) + NpAu	4.59 ± 0.12	7.33 ± 0.77 1.99 ± 0.04	AcN:H ₂ O	Este trabajo

de clorofila *a* en presencia de nanopartículas de oro de 5, 10 y 20 nm, aunque el tiempo de vida de la fluorescencia no cambió. Allí los autores reportaron un tiempo de vida de 5.06 ns para el singlete de la clorofila en una mezcla de solvente *H₂O*-Metanol. Teniendo en cuenta que en el extracto de clorofilas aquí estudiado se tiene una proporción de clorofila *a* y *b* de aproximadamente 2.7, el valor obtenido de 4.68 ± 0.02 es razonable para una mezcla de tiempos de vida de 5 - 6 ns para clorofila *a* y 3 ns para clorofila *b*. Se calculó un promedio ponderado de los tiempos de vida individuales (5.06 y 2.9 ns) considerando la población relativa de estos pigmentos ($\sim 3:1$). Se obtuvo así un tiempo de vida promedio de 4.7 ns, el cual es igual al valor obtenido para el extracto de clorofilas de acuerdo al ajuste mono-exponencial. Dado que el tiempo de vida de la clorofila *b* es menor que el de clorofila *a*, se adjudico el tiempo de vida más corto a Chl *b* y el más largo a Chl *a*, tras el ajuste bi-exponencial. En la **Tabla 5.5** se muestran dichos valores y se puede apreciar que no se corresponden tan bien a los tiempos de vida esperados para Chl *a* y Chl *b* puros y poseen alta variabilidad. Esto último sumado al hecho de que los ajustes bi-exponentiales no fueron mejores que los mono-exponentiales, los ajustes bi-exponentiales se descartaron.

Respecto a los cambios inducidos por las nanopartículas, los tiempos de vida obtenidos

tras el ajuste monoexponencial no se vieron modificados por la presencia de las NpAu. La disminución observada en los tiempos de vida no es significativa. Lo que sí se observó fue una disminución de la intensidad de la señal en los decaimientos en atmósfera de nitrógeno con NpAu (Fig. 5.20), pero esto no se repitió en aire (Fig. 5.21).

En resumen, los cambios en los tiempos de vida de las mezclas de clorofila y NpAu fueron análogos a los obtenidos por Mezacasa y cols[76].

5.3.13. Fluorescencia estacionaria de extractos de clorofila

Se determinaron los espectros de fluorescencia de mezclas de clorofilas *a* y *b* y NpAu utilizando un fluorómetro de estado estacionario. Dado que dichos espectros se registraron en conjunto con las medidas de flash fotólisis, la concentración de las muestras es alta y por ende la absorbancia de las mismas también lo es. Por ello, fue necesario corregir los espectros de emisión por efectos de filtro interno primario y secundario de acuerdo a la Ec. 3.13 que también se usó para corregir los espectros de fluorescencia de cloroplastos. La longitud de onda de excitación fue de 355, 460 y 520 nm. La excitación a 355 nm se debe a que esta fue la longitud de onda de irradiación del láser en flash fotólisis y donde la muestra presenta alta absorbancia. La excitación a 460 nm es la longitud de onda donde se observa mayor emisión en cloroplastos y hojas, es una longitud de onda estandarizada para esos sistemas. Por último, la excitación a 520 nm corresponde a la posición del máximo de absorción de las NpAu. En la Fig. 5.22 se resumen los espectros de absorbancia y los espectros de emisión experimentales y corregidos por filtro interno para una excitación a 355 nm. Los mismos resultados en los espectros de fluorescencia se observaron con excitación de 460 y 520 nm.

En presencia de nanopartículas, se observó un incremento de la fluorescencia corregida a todas las longitudes de onda de excitación siendo más significativo a 355 nm (16 %) y 520 nm (10 %).

Mezacasa y cols[76] observaron un aumento de la fluorescencia de la clorofila *a* en presencia de NpAu en el medio. Mientras que Barazzouk y cols.[7], observaron una disminución de la fluorescencia de clorofila *a*. A modo de distinguir entre estas dos posibilidades, se

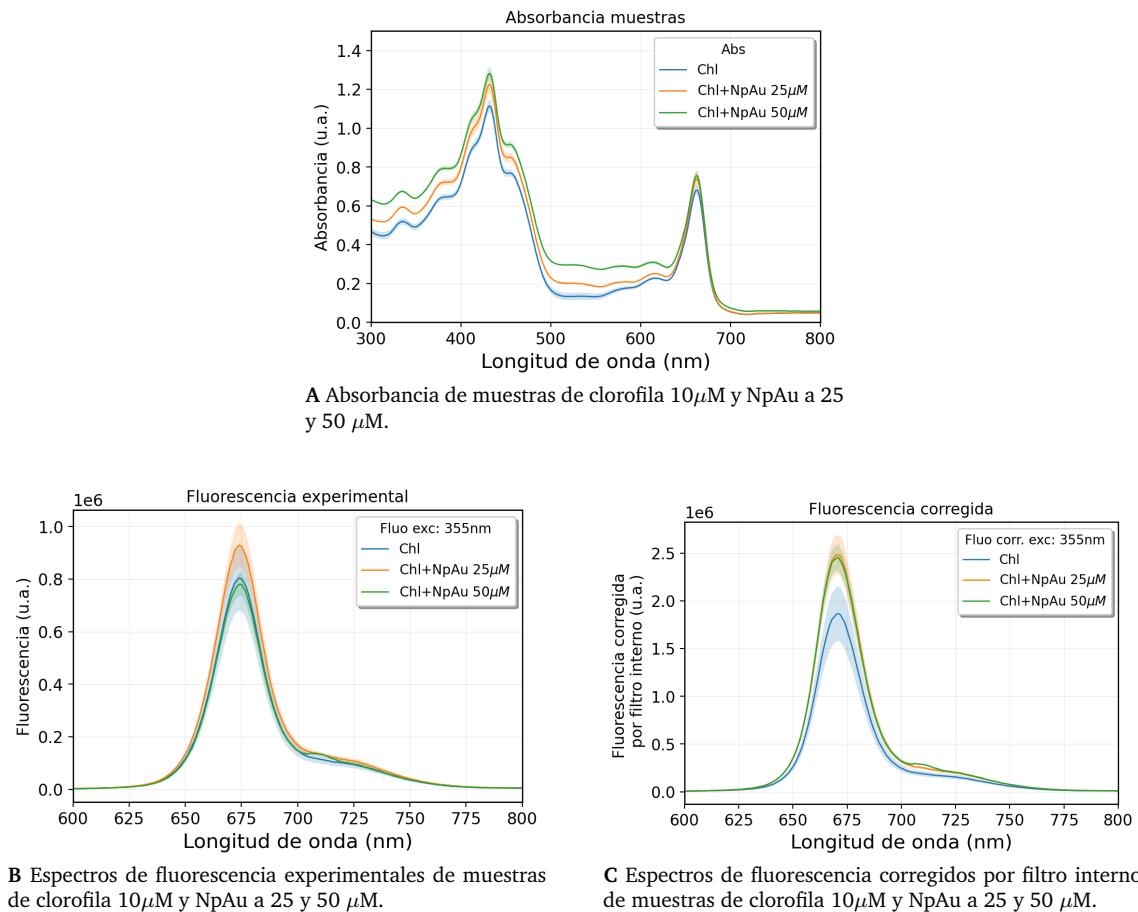


FIGURA 5.22: Espectros de absorbancia y fluorescencia de las muestras estudiadas.

analizaron los espectros de fluorescencia de un extracto de clorofilas con distintas concentraciones de NpAu. Estas determinaciones se realizaron en paralelo con las correspondientes al tiempo de vida del triplete (Subsección 5.3.14) por lo que se registró la fluorescencia de clorofila de mezclas de clorofila y NpAu antes y después de la irradiación producto del láser de flash fotólisis. Dado que el trabajo de Mezacasa y cols. es posterior a los experimentos aquí citados, los espectros de fluorescencia de las mezclas se obtuvieron para obtener un seguimiento de la concentración y particularmente identificar degradación de la muestra tras las medidas con el láser.

Si bien los cambios son sutiles, permitieron diferenciar el comportamiento entre lo que reportaron Barazzouk[7] y Mezacasa[76]. Dado que se observó un aumento de la fluorescencia y no se modificó el tiempo de vida de la fluorescencia, los resultados aquí obtenidos están en concordancia con los reportados por Mezacasa y cols.[76]. Como la relación de concentración de NpAu y clorofila utilizada fue menor a la reportada en Mezacasa y cols.,

es razonable que los cambios hayan sido menos marcados.

Este incremento de la fluorescencia observado en presencia de las NpAu es originado por el fenómeno conocido como fluorescencia reforzada por metal (MEF). La MEF está relacionada con la resonancia de plasmón la cual es la responsable de elevar el campo eléctrico incidente sobre las clorofillas cercanas a la superficies metálica de las NpAu[78, 79].

5.3.14. Fotólisis de destello láser de un extracto de clorofila

La participación del estado excitado triplete de las clorofillas se investigó mediante experimentos de fotólisis de destello láser. Por tanto, las soluciones desaireadas en acetonitrilo y agua de clorofillas $10\mu\text{M}$ y NpAu 25 y $50\ \mu\text{M}$, se sometieron a excitación por destello de láser (355 nm). Se registraron los transientes en el rango del visible y se ajustaron los decaimientos en las regiones de mayor interés. En la Fig. 5.23 se presentan algunos ejemplos de los transientes observados para las muestras en la región del visible. Alrededor de 440 nm y 660 nm se evidencian zonas bien conocidas de absorción del estado fundamental (ver Fig. 5.22 A) mientras que entre 500 nm y 540 nm se presenta la absorción del triplete de clorofila que a su vez se superpone con la del radical catión de la misma[7].

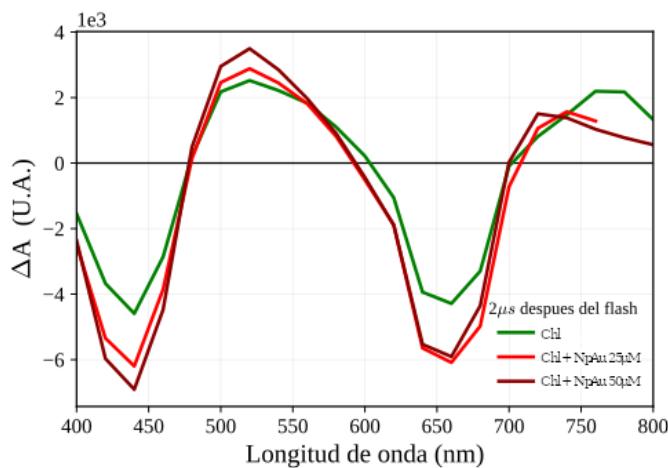


FIGURA 5.23: Espectros de absorción del transiente registrados después de $2\ \mu\text{s}$ del destello del láser (355 nm) para las muestras investigadas.

El cambio principal por acción de las NpAu en los espectros de absorción del transiente de clorofila fue el aumento de la intensidad de las bandas tanto de *bleaching* como de absor-

ción. No se observaron cambios importantes en la distribución espectral de los transientes. Estas variaciones se repiten a distintos tiempos de observación luego del destello del láser pero los cambios fueron menores conforme aumentó el tiempo. En la Fig. 5.24 se resumen los transientes obtenidos para las muestras a distintas longitudes de onda, tanto en la zona del *bleaching* como de absorción. Para cada decaimiento se ajustaron mono y bi-exponentiales tal como se realizó para los decaimientos de fluorescencia de la sección anterior. Luego de descartar los ajustes bi-exponentiales por no reproducir resultados consistentes, se graficaron las curvas correspondientes a los ajustes mono-exponentiales en la Fig. 5.24.

Nuevamente, se puede observar el aumento en la intensidad de la señal en las muestras con NpAu a todas las longitudes de onda. Los cambios en los tiempos de vida fueron sutiles y no se distinguen a simple vista en los decaimientos. Luego de ajustar mono-exponentiales para cada longitud de onda con suficiente relación señal/ruido, para cada uno de los duplicados de las muestras, se promediaron los tiempos de vida obtenidos para cada muestra considerando únicamente aquellos ajustes con una buena dispersión de residuos y un $R^2 > 0.98$.

Como se puede observar en la Fig. 5.24, las intensidades de los decaimientos son bajas. Esto se debió, por un lado, a que el medio utilizado, una mezcla de acetonitrilo-agua, no es un solvente óptimo para la clorofila como sí lo es para las nanopartículas. Al principio de los experimentos se buscó un solvente que pudiera contener ambos sistemas, evitando la floculación de las nanopartículas y la precipitación de la clorofila. La presencia de citratos en la superficie de las nanopartículas no permiten la suspensión de las mismas en solventes poco polares y la clorofila por otro lado, por su carácter fuertemente hidrófobico, presentó el comportamiento inverso. Las nanopartículas precipitaron en cualquier combinación de alcoholes y acetona en donde la clorofila era soluble. Descartando los alcoholes, se encontró que los mejores resultados se obtuvieron con mezclas de acetona o acetonitrilo con agua. Dada la mejor reproducibilidad de las medidas y la menor volatilidad del acetonitrilo, se eligió la combinación acetonitrilo-agua.

Además, las muestras preparadas contenían aproximadamente 10 μM de clorofila a pesar

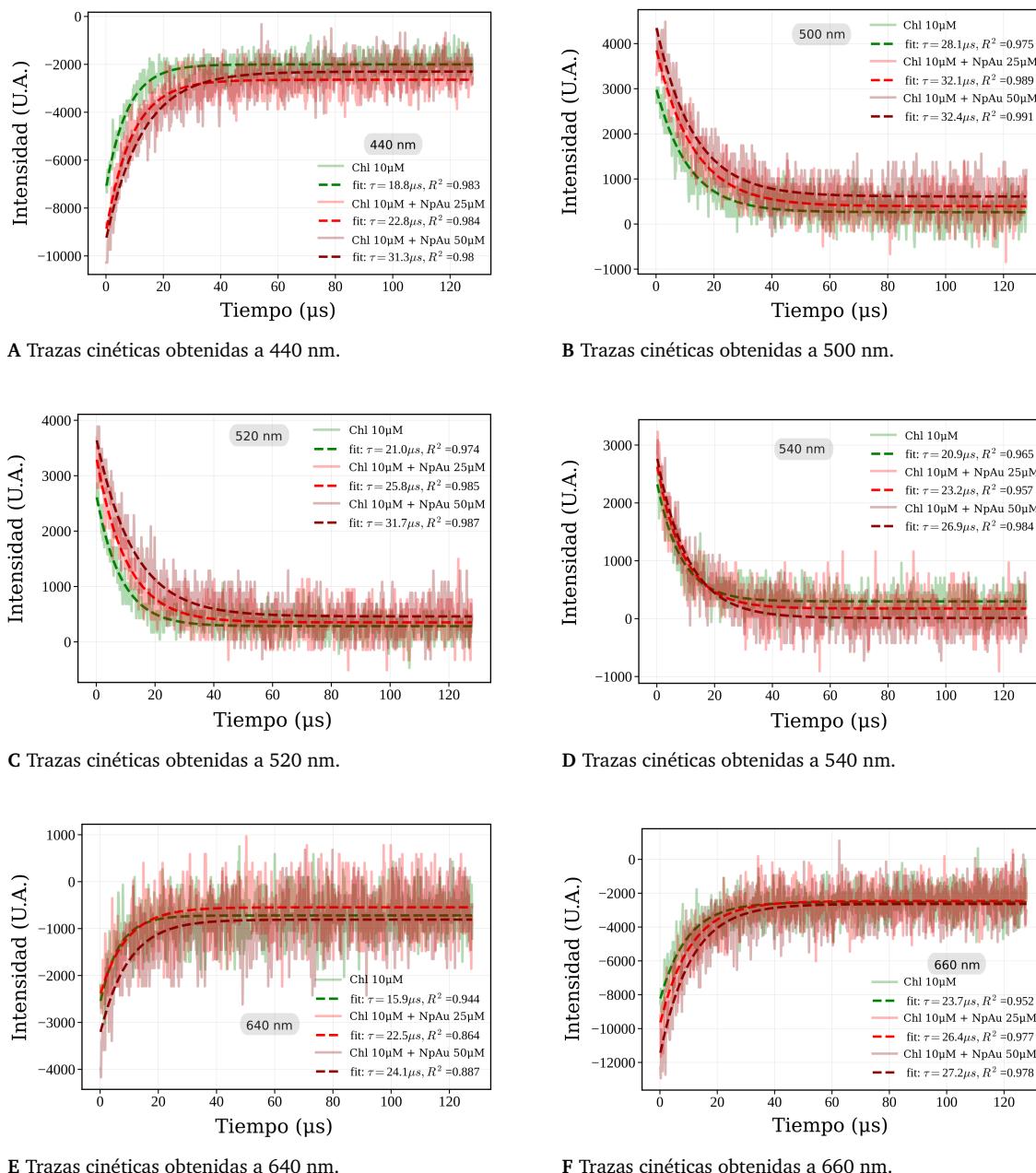


FIGURA 5.24: Trazas cinéticas obtenidas tras la excitación (355 nm) por fotólisis de destello láser a distintas longitudes de onda de observación para las muestras en estudio. Las curvas punteadas corresponden a los ajustes monoexponentiales correspondientes a cada decaimiento.

de que podían concentrarse más para determinar los transientes de absorción. La limitación experimental para ello fue la capacidad de reabsorción de la emisión de la clorofila, la cual podría interferir en los experimentos. Como se mencionó anteriormente, [Fig. 5.6](#), la emisión de la fluorescencia de clorofila, cloroplastos y hojas puede ser reabsorbida dada la superposición de las bandas de absorción y emisión en la zona del rojo del espectro. Se realizaron determinaciones a concentraciones mayores de clorofila pero la intensidad de

la señal no mejoró significativamente, presumiblemente debido al efecto de reabsorción de luz y a la elección del solvente. Por otro lado, en los trabajos de referencias se suelen utilizar cantidades similares de aceptor y donor, mientras que la concentración de las NpAu estaba limitada por la síntesis y la dilución por el cambio de solvente.

Dada la dispersión de los datos, se decidió presentar y analizar los tiempos de vida del triplete obtenidos mediante un diagrama de cajas (*box-plot*). De esta forma es posible visualizar la distribución de los tiempos de vida obtenidos, y a su vez facilitar la comparación entre grupos. Los resultados están presentados en la Fig. 5.25. El valor medio para el tiempo de vida del triplete del control de clorofila 10 μM sin NpAu fue de $18 \pm 4 \mu\text{s}$, mientras que para las muestras con 25 μM y 50 μM de NpAu aumentó a $21 \pm 5 \mu\text{s}$ y $29 \pm 6 \mu\text{s}$, respectivamente. Solo los cambios en los tiempos de vida obtenidos para el control y para 50 μM de NpAu fueron significativos.

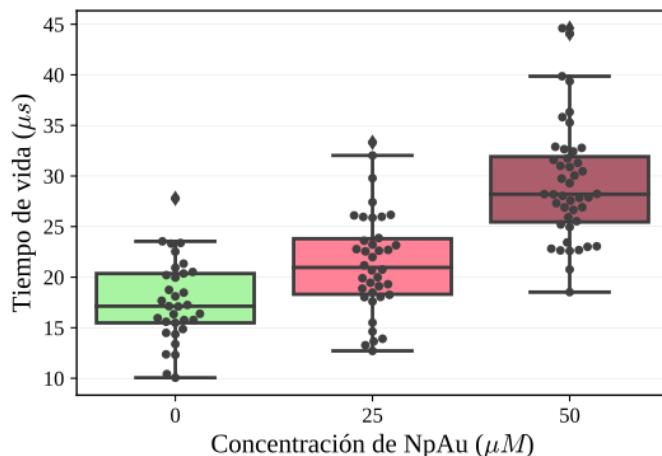


FIGURA 5.25: Diagrama de caja de los tiempos de vida de triplete de clorofila en presencia de 0, 25 ó 50 μM de NpAu. Los datos corresponden a ajustes monoexponentiales de datos con buena relación señal/ruido, resultando en aproximadamente 40 datos por muestra.

Los tiempos de vida del triplete reportados en bibliografía dependen fuertemente del solvente, variando entre 30 y 600 μs para Chl *a* y entre 150 y 1300 μs para Chl *b*[80]. Los tiempos de vida menores corresponden a solventes más polares como los aquí utilizados, por ende el valor obtenido se encuentra dentro del rango esperado. El aumento de los tiempos de vida del triplete por la presencia de las NpAu es interesante. En general, un *quenching* del estado excitado triplete es acompañado usualmente de una disminución del

tiempo de vida del mismo. Esto fue lo que observó Barazzouk y cols. en su trabajo, donde el tiempo de vida del triplete disminuyó a la mitad por las NpAu en medio orgánico. En un trabajo reciente se investigó la variabilidad del tiempo de vida del triplete de Chl *a* en distintos solventes[81]. Aunque los autores reportan valores mucho menores a los esperados (del orden de 1 a 12 μ s), observaron que si bien los tiempos de vida eran altamente variables no sucedía lo mismo con el rendimiento cuántico del triplete.

Habiendo determinado cada día de medición un blanco con xantona, un patrón bien conocido por tener un rendimiento cuántico de formación del triplete (Φ_T) de aproximadamente 1, se pudieron estimar los Φ_T para las muestras estudiadas. Dichos valores aumentaron conforme aumentó la concentración de NpAu, para el control fue de 0.12 mientras que para 25 μ M y 50 μ M de NpAu fue de 0.15 y 0.17, respectivamente.

A continuación, se buscaron referencias donde se observara un aumento del tiempo de vida del triplete como respuesta a la presencia de nanopartículas de metales pesados. Masilela y Nyokong observaron un aumento del tiempo de vida y del rendimiento cuántico de formación del triplete de ftalocianinas en presencia de NpAu[82]. Dicho aumento fue mayor cuando la ftalocianina se encontraba unida covalentemente a la nanopartícula. Mientras que el tiempo de vida y rendimiento cuántico de fluorescencia disminuyeron, producto del *quenching* de las nanopartículas. Los autores sugirieron que las NpAu fomentan el cruce entre sistemas (ISC) al estado de triplete de las ftalocianinas. También se ha reportado el aumento del tiempo de vida del triplete por la presencia de *quantum dots* que suele ir acompañado de una disminución en Φ_F , y un aumento en Φ_T y el rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_Δ)[83-85].

Por ende, el aumento del τ_T y Φ_T producto de la presencia de NpAu puede adjudicarse a un incremento en la constante cinética asociada al ISC dada la presencia de un metal pesado como el oro. Un incremento en dicha constante conduce a un aumento en la concentración de estado triplete y por ende una acumulación de la concentración del triplete. En soluciones homogéneas, la vida útil observada en estado triplete de muchos colorantes depende de varios factores, tales como la naturaleza del solvente, la concentración en el estado fundamental, la concentración del estado triplete y la presencia de *quenchers*. La

reducción de la exposición del colorante a su entorno o micro-ambiente inmediato, se ha utilizado para explicar el aumento de la vida útil de los tripletes[82]. Por ejemplo, Foley y cols., observaron un aumento del tiempo de vida del triplete de ftalocianinas al reducir la concentración de agua en el medio y por ende, en el micro-ambiente circundante al pigmento[86]. Este podría ser el caso aquí, donde no solo las NpAu aumentan la tasa de formación del estado triplete, sino que además estabilizan este estado excitado, aumentando así su tiempo de vida.

5.4. Conclusiones

La presencia de nanopartículas de oro afectó altamente las propiedades fotofísicas de las hojas, cloroplastos y extracto de clorofillas. En hojas y cloroplastos, la fluorescencia de clorofila se desactivó y la emisión del PSII se redujo en comparación con la emisión de PSI (disminución del cociente $F_{red}/F_{far-red}$). Los resultados de fluorescencia estacionaria siguieron la misma tendencia para las hojas intactas (después de la corrección para los procesos de reabsorción de luz) y para los cloroplastos. La cinética de Kautsky en hojas se alteró completamente y casi todos los parámetros fotosintéticos perdieron su significado físico original, como se demostró al resolver el mecanismo propuesto que incluía un proceso de transferencia de carga desde el P_{680}^* hacia las NpAu. La evolución de oxígeno y la tasa de fotoreducción de DCPIP en cloroplastos aislados aumentaron sensiblemente. Todos los resultados en hojas y cloroplastos pueden justificarse planteando una transferencia de electrones desde el estado excitado de P_{680}^* a las NpAu.

El aparente aumento en la actividad fotosintética observado por métodos indirectos no fue real, sino un resultado artificial causado por el proceso de transferencia de carga adicional. En otras palabras, lo que se cuantifica en el Φ_{PSII} , la tasa de evolución de O_2 y fotoreducción de DCPIP, entre otros, es el aumento de la actividad fotoquímica del PSII. En este caso, este aumento en la actividad del PSII no conduce a un aumento en la fotosíntesis neta (dada por la cantidad de ATP, NADPH y azúcares formados), sino que parte de estos electrones se pierden en el proceso de transferencia de carga que involucra las NpAu. Este es un punto crucial para la evaluación del estrés de las plantas causado por ciertos agentes.

Por otro lado, fue posible verificar mediante microscopías electrónicas la presencia de NpAu dentro de la hoja (con seguridad, dentro de los estomas y los espacios intercelulares de hojas tratadas con NpAu, (Fig. 5.18)). Esto último es importante ya que permitió plantear un efecto de transferencia de carga entre la antena y el centro de reacción del PSII con las nanopartículas, lo cual requiere de gran proximidad entre ambos sistemas.

En este capítulo, además de los resultados sobre el efecto de NpAu en las propiedades fotofísicas de las plantas, verificamos que algunos agentes pueden actuar como aceptores de electrones del P₆₈₀* y así falsificar las mediciones de actividad fotosintética basadas en la evolución de oxígeno, la reacción de Hill y fluorescencia de clorofila.

Por último, las propiedades fotofísicas de las clorofilas en presencia de NpAu cambiaron sensiblemente. Si bien el comportamiento de la clorofila en las hojas y cloroplastos es muy diferente que en solución, estos resultados nos permitieron confirmar en una escala más simple, la capacidad de las NpAu de modificar las propiedades fotofísicas de las clorofilas. De todas formas, pudo mostrarse claramente que el comportamiento fotofísico de las clorofilas en solución (en presencia de NpAu) no es extrapolable al comportamiento de estos pigmentos cuando se encuentran insertos en los fotosistemas de las hojas, que constituyen entidades biológicas mucho más complejas.

Referencias

- (1) Colomban, P. *J. Nano Res.* **2009**, 8, 109-132.
- (2) Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M. e Higgitt, C. *Gold Bull.* **2007**, 40, 270-277.
- (3) Ruivo, A.; Gomes, C.; Lima, A.; Botelho, M. L.; Melo, R.; Belchior, A. y de Matos, A. *P. J. Cult. Heritage* **2008**, 9, e134-e137.
- (4) Spadavecchia, J.; Apchain, E.; Albéric, M.; Fontan, E. y Reiche, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 126, 8503-8506.
- (5) Faraday, M. *Philos. Trans. R. Soc.* **1857**, 145-181.
- (6) Mie, G. *Ann. Phys.* **1908**, 330, 377-445.

- (7) Barazzouk, S.; Kamat, P. V. y Hotchandani, S. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 716-723, DOI: [10.1021/jp046474s](https://doi.org/10.1021/jp046474s).
- (8) Park, J. S.; Park, K.; Moon, H. T.; Woo, D. G.; Yang, H. N. y Park, K.-H. *Langmuir* **2009**, *25*, 451-457.
- (9) Paciotti, G. F.; Kingston, D. G. y Tamarkin, L. *Drug development research* **2006**, *67*, 47-54.
- (10) Duncan, B.; Kim, C. y Rotello, V. M. *Journal of controlled release* **2010**, *148*, 122-127.
- (11) Yguerabide, J. e Yguerabide, E. E. *Journal of Cellular Biochemistry* **2001**, *84*, 71-81.
- (12) Wang, Z. y Ma, L. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 1607-1618.
- (13) Liz-Marzán, L. M. *Mater. Today* **2004**, *7*, 26-31, DOI: [10.1016/S1369-7021\(04\)00080-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00080-X).
- (14) Daniel, M.-C. y Astruc, D. *Chemical reviews* **2004**, *104*, 293-346.
- (15) Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E. y Li, T. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13857-13870.
- (16) Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A.; Kinard, B. E. y Hankins, P. *Chem. Commun.* **2008**, 544-557.
- (17) Steffen, R.; Kelly, A. A.; Huyer, J.; Dörmann, P. y Renger, G. *Biochemistry* **2005**, *44*, 3134-3142.
- (18) Alivisatos, P. *Nature biotechnology* **2004**, *22*, 47-52.
- (19) Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R. R. y Sastry, M. *Langmuir* **2005**, *21*, 10644-10654.
- (20) Colvin, V. L. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1166-1170.
- (21) Boken, J.; Khurana, P.; Thatai, S.; Kumar, D. y Prasad, S. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2017**, *52*, 774-820.
- (22) Eichert, T.; Kurtz, A.; Steiner, U. y Goldbach, H. E. *Physiol. Plant.* **2008**, *134*, 151-160, DOI: [10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x).

- (23) Corredor, E.; Testillano, P. S.; Coronado, M.-J.; González-Melendi, P.; Fernández-Pacheco, R.; Marquina, C.; Ibarra, M. R.; de la Fuente, J. M.; Rubiales, D.; Pérez-de-Luque, A. y col. *BMC Plant Biol.* **2009**, *9*, 1-11.
- (24) Amendola, V.; Pilot, R.; Frasconi, M.; Maragó, O. M. y Iatí, M. A. *J. Phys.: Condens. Matter* **2017**, *29*, 203002.
- (25) Kreibig, U. y Vollmer, M. en *Optical properties of metal clusters*; Springer: 1995, págs. 13-201.
- (26) Hergert, W. y Wriedt, T., *The Mie theory: basics and applications*; Springer: 2012; vol. 169.
- (27) Link, S. y El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4212-4217.
- (28) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H. y El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238-7248.
- (29) Doak, J.; Gupta, R.; Manivannan, K.; Ghosh, K. y Kahol, P. *Physica E* **2010**, *42*, 1605-1609.
- (30) Barazzouk, S.; Bekalé, L. y Hotchandani, S. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 25316-25324.
- (31) Falco, W.; Botero, E.; Falcao, E.; Santiago, E.; Bagnato, V. y Caires, A. *Journal of Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2011**, *225*, 65-71.
- (32) Feichtmeier, N. S.; Walther, P. y Leopold, K. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 8549-8558.
- (33) Sabo-Attwood, T.; Unrine, J. M.; Stone, J. W.; Murphy, C. J.; Ghoshroy, S.; Blom, D.; Bertsch, P. M. y Newman, L. A. *Nanotoxicology* **2012**, *6*, 353-360.
- (34) Zhu, Z.-J.; Wang, H.; Yan, B.; Zheng, H.; Jiang, Y.; Miranda, O. R.; Rotello, V. M.; Xing, B. y Vachet, R. W. *Environmental science & technology* **2012**, *46*, 12391-12398.
- (35) Arora, S.; Sharma, P.; Kumar, S.; Nayan, R.; Khanna, P. y Zaidi, M. *Plant Growth Regul.* **2012**, *66*, 303-310.
- (36) Vior, M. C. G.; Awruch, J.; Dicelio, L. E. y Diz, V. E. *Journal of Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2019**, *368*, 242-247.
- (37) Gamon, J.; Peñuelas, J. y Field, C. *Remote Sens. Environ.* **1992**, *41*, 35-44.
- (38) Peñuelas, J.; Llusia, J.; Pinol, J. y Filella, I. *Int. J. Remote Sens.* **1997**, *18*, 2863-2868, DOI: [10.1080/014311697217387](https://doi.org/10.1080/014311697217387).

- (39) Seelig, H.-D.; Hoehn, A.; Stodieck, L.; Klaus, D.; Adams Iii, W. y Emery, W. *Remote Sens. Environ.* **2008**, *112*, 445-455, DOI: [10.1016/j.rse.2007.05.002](https://doi.org/10.1016/j.rse.2007.05.002).
- (40) Hunt Jr, E. R. y Rock, B. N. *Remote Sens. Environ.* **1989**, *30*, 43-54, DOI: [10.1016/0034-4257\(89\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0034-4257(89)90046-1).
- (41) Sims, D. A. y Gamon, J. A. *Remote Sens. Environ.* **2003**, *84*, 526-537, DOI: [10.1016/S0034-4257\(02\)00151-7](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00151-7).
- (42) Gao, B.-c. *Remote Sens. Environ.* **1996**, *58*, 257-266, DOI: [10.1016/s0034-4257\(96\)00067-3](https://doi.org/10.1016/s0034-4257(96)00067-3).
- (43) Ramos, M. E. y Lagorio, M. G. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 1063-1066, DOI: [10.1039/b406525e](https://doi.org/10.1039/b406525e).
- (44) Griffiths, G.; Brands, R.; Burke, B.; Louvard, D. y Warren, G. *J. Cell Biol.* **1982**, *95*, 781-792, DOI: [10.1083/jcb.95.3.781](https://doi.org/10.1083/jcb.95.3.781).
- (45) Tokuyasu, K. *J. Ultrastruct. Res.* **1978**, *63*, 287-307, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(78\)80053-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(78)80053-7).
- (46) Dean, R. L. y Miskiewicz, E. Rates of Electron Transport in the Thylakoid Membranes of Isolated, Illuminated Chloroplasts Are Enhanced in the Presence of Ammonium Chloride, 2003, DOI: [10.1002/bmb.2003.494031060265](https://doi.org/10.1002/bmb.2003.494031060265).
- (47) Joly, D. y Carpentier, R. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *684*, 321-325, DOI: [10.1007/978-1-60761-925-3_24](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-925-3_24).
- (48) Pfündel, E. *Photosynth. Res.* **1998**, *56*, 185-195.
- (49) Weis, E. *Plant Physiol.* **1984**, *74*, 402-407.
- (50) Lichtenthaler, H. K. y Buschmann, C. *Handbook of Food Analytical Chemistry* **2005**, 2-2, 171-178, DOI: [10.1002/0471709085.ch21](https://doi.org/10.1002/0471709085.ch21).
- (51) Lakowicz, J. R. en *Principles of fluorescence spectroscopy*; Springer: 1999, págs. 25-61.
- (52) Walker, D. A. *Photosynth. Res.* **2002**, *73*, 51-54.
- (53) Ventrella, A.; Catucci, L. y Agostiano, A. *Bioelectrochemistry* **2010**, *79*, 43-49.
- (54) Dean, R. L. y Miskiewicz, E. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2003**, *31*, 410-417.
- (55) Delieu, T. y Walker, D. *New Phytol.* **1972**, *71*, 201-225.

- (56) Carpentier, R. y col., *Photosynth. Res. protocols*; Springer: 2004; vol. 274.
- (57) Haiss, W.; Thanh, N. T.; Aveyard, J. y Fernig, D. G. *Analytical chemistry* **2007**, *79*, 4215-4221.
- (58) Zhou, J.; Beattie, D. A.; Ralston, J. y Sedev, R. *Langmuir* **2007**, *23*, 12096-12103.
- (59) Habib, A.; Tabata, M. y Wu, Y. G. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2005**, *78*, 262-269.
- (60) Wang, A.; Ng, H. P.; Xu, Y.; Li, Y.; Zheng, Y.; Yu, J.; Han, F.; Peng, F. y Fu, L. J. *Nanomater.* **2014**, *2014*.
- (61) Gerhards, M.; Rock, G.; Schlerf, M. y Udelhoven, T. *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.* **2016**, *53*, 27-39, DOI: [10.1016/j.jag.2016.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jag.2016.08.004).
- (62) Lagorio, M. G. en *Chlorophyll Struct. Prod. Med. Uses*; Nova Science Publishers New York: 2011, págs. 115-150.
- (63) Buschmann, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves, 2007, DOI: [10.1007/s11120-007-9187-8](https://doi.org/10.1007/s11120-007-9187-8).
- (64) Yaryura, P.; Cordon, G.; Leon, M.; Kerber, N.; Pucheu, N.; Rubio, G.; Garcíá, A. y Lagorio, M. G. **2009**, *195*, 186-196, DOI: [10.1111/j.1439-037x.2008.00359.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-037x.2008.00359.x).
- (65) Iriel, A.; Novo, J. M.; Cordon, G. B. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90*, 107-112, DOI: [10.1111/php.12142](https://doi.org/10.1111/php.12142).
- (66) Subhash, N.; Wenzel, O. y Lichtenthaler, H. K. *Remote Sens. Environ.* **1999**, *69*, 215-223.
- (67) Natarajan, L. V.; Ricker, J. E.; Blankenship, R. E. y Chang, R. *Photochem. Photobiol.* **1984**, *39*, 301-306, DOI: [10.1111/j.1751-1097.1984.tb08181.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb08181.x).
- (68) Rajagopal, S.; Egorova, E. A.; Bukhov, N. G. y Carpentier, R. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2003**, *1606*, 147-152.
- (69) Samuilov, V. D.; Borisov, A. Y.; Barsky, E. L.; Borisova, O. F. y Kitashov, A. V. *IUBMB Life* **1998**, *46*, 333-341.
- (70) Kato, Y.; Sugiura, M.; Oda, A. y Watanabe, T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 17365-17370.
- (71) Merchant, S. y Sawaya, M. R. *The Plant Cell* **2005**, *17*, 648-663.

- (72) Scanlon, M. D.; Peljo, P.; Méndez, M. A.; Smirnov, E. y Girault, H. H. *Chemical science* **2015**, *6*, 2705-2720.
- (73) Hendrickson, L.; Furbank, R. T. y Chow, W. S. *Photosynth. Res.* **2004**, *82*, 73.
- (74) Blankenship, R. E.; Babcock, G. T. y Sauer, K. *Biochimica et Biophysica Acta* **1975**, *376*, 105-115.
- (75) Connolly, J. S.; Janzen, A. F. y Samuel, E. B. *Photochem. Photobiol.* **1982**, *36*, 559-563, DOI: [10.1111/j.1751-1097.1982.tb04416.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1982.tb04416.x).
- (76) Mezacasa, A. V.; Queiroz, A. M.; Graciano, D. E.; Pontes, M. S.; Santiago, E. F.; Oliveira, I. P.; Lopez, A. J.; Casagrande, G. A.; Scherer, M. D.; dos Reis, D. D.; Oliveira, S. L. y Caires, A. R. *J. Photochem. Photobiol., A* **2020**, *389*, DOI: [10.1016/j.jphotochem.2019.112252](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.112252).
- (77) Pfarrherr, A.; Teuchner, K.; Leupold, D. y Hoffmann, P. *J. Photochem. Photobiol., B* **1991**, *9*, 35-41, DOI: [10.1016/1011-1344\(91\)80002-Y](https://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80002-Y).
- (78) Aslan, K.; Malyn, S. N. y Geddes, C. D. *J. Fluoresc.* **2006**, *17*, 7-13, DOI: [10.1007/s10895-006-0149-x](https://doi.org/10.1007/s10895-006-0149-x).
- (79) Geddes, C. D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19537, DOI: [10.1039/c3cp90129g](https://doi.org/10.1039/c3cp90129g).
- (80) Niedzwiedzki, D. M. y Blankenship, R. E. *Photosynth. Res.* **2010**, *106*, 227-238, DOI: [10.1007/s11120-010-9598-9](https://doi.org/10.1007/s11120-010-9598-9).
- (81) Kosumi, D.; Nishiguchi, T.; Amao, Y.; Cogdell, R. y Hashimoto, H. *J. Photochem. Photobiol., A* **2018**, *358*, 374-378, DOI: [10.1016/j.jphotochem.2017.09.046](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.09.046).
- (82) Masilela, N. y Nyokong, T. *J. Photochem. Photobiol., A* **2011**, *223*, 124-131, DOI: [10.1016/j.jphotochem.2011.08.009](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.08.009).
- (83) Idowu, M. y Nyokong, T. *J. Lumin.* **2009**, *129*, 356-362, DOI: [10.1016/j.jlumin.2008.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2008.11.005).
- (84) Moeno, S. y Nyokong, T. *Polyhedron* **2008**, *27*, 1953-1958, DOI: [10.1016/j.poly.2008.03.007](https://doi.org/10.1016/j.poly.2008.03.007).
- (85) Idowu, M. y Nyokong, T. *J. Photochem. Photobiol., A* **2007**, *188*, 200-206, DOI: [10.1016/j.jphotochem.2006.12.013](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.12.013).
- (86) Foley, M. S.; Beeby, A.; Parker, A. W.; Bishop, S. M. y Phillips, D. *J. Photochem. Photobiol., B* **1997**, *38*, 10-17, DOI: [10.1016/s1011-1344\(96\)07434-9](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(96)07434-9).

Nanopartículas de Magnetita

6.1. Introducción

6.1.1. Antecedentes científicos

La nanotecnología es una industria emergente que tiene un papel competente en todos los sectores de la vida, incluida la agricultura[1]. Se ha documentado bien una gran diversidad de impactos de los nanomateriales en las plantas y la agricultura, lo que demuestra que los impactos positivos y negativos dependen de sus diferentes propiedades[2-8]. La eficiencia de los óxidos de hierro a granel para proporcionar hierro a las plantas se ha multiplicado tras su conversión en nanopartículas[3, 8]; por lo que estas nanopartículas se están abriendo camino en el desarrollo de la agricultura y otras industrias. Esto se debe a sus propiedades únicas, como el confinamiento cuántico, la alta energía superficial, alta relación área superficial/volumen y una serie de propiedades catalíticas[9, 10].

La tecnología de nanopartículas de óxido de hierro ha abierto nuevas oportunidades para la producción de fertilizantes rentables y amables con el medio ambiente[11, 12]. Tienen más potencial para aumentar el rendimiento y la producción de los cultivos debido a la mayor eficiencia de fertilización debido a la liberación lenta de nutrientes; menos estrés salino en las raíces al reducir la acumulación de sales solubles en la zona de la raíz; minimización de costos y reducción de la pérdida de nutrientes al restringir su conversión de forma de consumo a forma de desecho, controlando así la contaminación ambiental[8]. Atar y cols.[13] también han señalado el papel beneficioso de las nanopartículas de óxido de hierro para la estimulación de ciertas enzimas como la catalasa, la citocromo oxidasa y la peroxidasa. Kaviani y cols.[14] informaron que las nanopartículas de óxido de hierro

desempeñan un papel de apoyo en la mejora de la tolerancia al estrés por nutrientes en las plantas al proporcionar cofactores que son los constituyentes de muchos antioxidantes. Por otro lado, el alto potencial de reducción de las nanopartículas de óxido de hierro les permite ser eficientes en la eliminación de contaminantes orgánicos como la atrazina y los compuestos clorados del agua[15, 16].

Sin embargo, estudios realizados en todo el mundo han informado efectos positivos y negativos de las nanopartículas de óxidos de hierro en plantas[4, 8, 17-19]. Dentro de los efectos positivos observados tras la aplicación foliar de nanopartículas, distintos autores reportaron el mejoramiento de la tasa fotosintética, el contenido de clorofila, la biomasa, el rendimiento de grano y la calidad nutricional en trigo[17], cebada[20] y sandía[21, 22]. Otros autores observaron una mejora en el crecimiento de plantas de trébol[23] y soja[24, 25] y por último una mejora de la absorción de nutrientes al aumentar la actividad de las enzimas microbianas en la rizosfera en arroz[26], tomate[27], maní[3], maíz[28, 29] y calabaza[30].

6.1.2. Hierro, un nutriente esencial en plantas

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para todos los organismos[31]. La deficiencia de hierro está muy extendida entre muchos cultivos diferentes[32]. La baja fertilidad del suelo nativo junto con una menor eficiencia en el uso de insumos, particularmente fertilizantes químicos, es un problema persistente de muchos sistemas de producción agrícola[18]. Si bien el contenido de hierro en el suelo suele ser alto, una gran proporción se fija a las partículas del suelo[33]. El hierro se encuentra principalmente en forma de Fe^{3+} insoluble, especialmente en suelos aeróbicos y de pH alto; por lo tanto, estos suelos suelen ser deficientes en la forma disponible para las plantas, Fe^{2+} [34]. Debido a que las plantas generalmente absorben Fe^{2+} por sus raíces, los suelos deficientes en hierro conducen a plantas deficientes en hierro[35]. En las plantas, el hierro participa en muchos procesos fisiológicos, incluidos la biosíntesis de clorofila, la respiración y las reacciones redox[33, 34, 36]. El hierro activa varias enzimas, contribuye en la síntesis de ácido ribonucleico y mejora el desempeño de los fotosistemas[18]. Además, la mayor parte del hierro foliar (alrededor del 80 %) se localiza en el cloroplasto, principalmente en los complejos molecu-

lares involucrados en la cadena de transporte de electrones fotosintéticos, que contienen aproximadamente el 60 % del hierro total de la hoja[37, 38], por lo que la deficiencia de hierro afecta principalmente la estructura y el funcionamiento del cloroplasto. Considerando la cadena trófica, la deficiencia de hierro no solo afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que también puede provocar anemia en animales y humanos[39, 40]. La deficiencia de hierro es un factor importante que puede disminuir el rendimiento y calidad del cultivo. La aplicación de fertilizantes de hierro sigue siendo el método más efectivo para mejorar la deficiencia de hierro en plantas, por lo que es importante mejorar la eficiencia de utilización de los fertilizantes de Fe[3]. No obstante, su exceso conduce a efectos tóxicos en plantas tras la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño oxidativo[41].

6.1.3. Motivación y objetivos

Las nanopartículas de magnetita (NP- Fe_3O_4 , **MAG**) también conocidas como nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (**SPION**) se pueden usar para numerosas aplicaciones *in vivo*, como la mejora del contraste de resonancia magnética, la reparación de tejidos, inmunoensayos, la desintoxicación de fluidos biológicos, la hipertermia, la administración de fármacos y la separación celular; por lo que en líneas general se las consideran biológica y químicamente inertes[42-44]. Todas estas aplicaciones biomédicas explotan las propiedades magnéticas de estas nanopartículas de pequeño tamaño y distribución de tamaño estrecha. Además de su uso en el campo biomédico[45-48], se las utiliza cada vez más para la remediación ambiental[49-51].

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar los posibles efectos de las NPs de Fe_3O_4 en la actividad fotosintética de plantas, en el transporte electrónico fotosintético y sus rendimientos cuánticos, y en el contenido de pigmentos. De esta forma, se planean determinar posibles efectos tóxicos considerando que estos nanomateriales podrían ser utilizados promisoriamente como portadores de inoculantes o bien, como fertilizantes. Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió investigar un amplio rango de concentraciones de modo de evidenciar, si fuera posible, la concentración máxima en la cual no se observan efectos adversos a la salud vegetal.

6.2. Metodología

6.2.1. Síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4

Las nanopartículas de Fe_3O_4 se sintetizaron por coprecipitación de Fe^{3+} y Fe^{2+} modificando ligeramente el protocolo previamente reportado por Sun y Zeng[52]. Un esquema general de la síntesis se presenta en la Fig. 6.1. Resumidamente, se disolvieron 6.16 g de cloruro de hierro (III) de calidad analítica ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) y 3g de cloruro de hierro (II) ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) en 100 ml de agua bidestilada con agitación vigorosa a 90°C. A continuación, se dejaron caer gradualmente 10 ml de NH_4OH al 25 % hasta que el pH de la solución llegue a 10, aproximadamente. La correcta precipitación de las nanopartículas de Fe_3O_4 se evidenció por un cambio de color de la suspensión de marrón a negro que ocurre rápidamente una vez terminado el agregado de amoníaco. Después de 30 min más de agitación a temperatura constante, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las partículas magnéticas obtenidas se lavaron repetidamente con agua destilada con ayuda de un imán de neodimio para facilitar la decantación de las partículas. Una vez que el sobrenadante fue completamente translúcido, se dejó secar el sólido magnético durante 24 horas a menos de 70°C. Posteriormente el sólido obtenido se almacenó en frasco de vidrio dentro de un desecador hasta su uso.

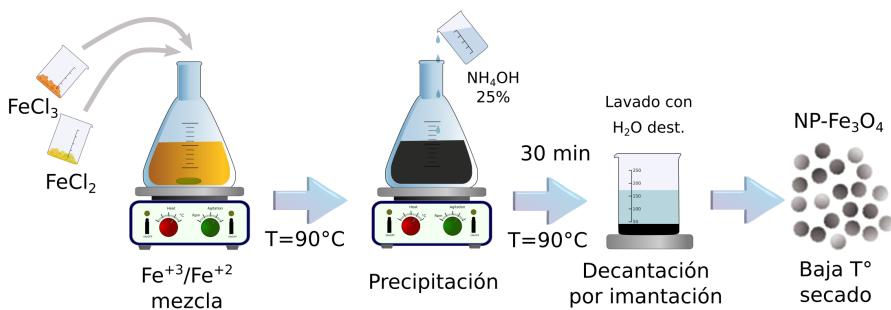


FIGURA 6.1: Esquema general de la síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 .

Para la mayoría de las caracterizaciones fue necesario realizar el secado de forma de obtener un sólido, así como también para conocer el rendimiento de la reacción. Sin embargo, dado que el tratamiento en las plantas consistió en aplicar una suspensión de nanopartículas en agua, se fraccionó una parte de la muestra y se prepararon las suspensiones directamente desde la suspensión de síntesis lavada. De esta forma se evita el secado que

no solo puede inducir oxidación superficial de la muestra, sino que el sólido posteriormente requiere molerse o bien sonicarse para obtener una suspensión homogénea como la obtenida luego de la síntesis. En la etapa de sonicado y en forma de polvo, las partículas son más propensas a oxidarse. Evitando este paso, se pudieron realizar suspensiones de nanopartículas de magnetita con reducida oxidación superficial.

6.2.2. Microscopías electrónicas

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersiva (EDS) fueron obtenidas con un equipo Zeiss Supra 40 perteneciente al Centro de Microscopías Avanzadas (FCEN, UBA) a cargo de la Dra. Claudia Marchi. Se aplicó una tensión entre 5 y 10 kV (dependiendo la muestra) y con magnificaciones entre 100 y 800 kX. Se utilizó el *software* de procesamiento de imágenes *ImageJ* y se estimó el tamaño promedio de partícula, midiendo el tamaño real, contando un total de 4758 partículas a partir de varias imágenes SEM tomadas el mismo día para la misma muestra.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) fueron tomadas con equipos Phillips EM 301, operado a 60kV con una resolución del orden de 5 nm, perteneciente al CMA de la FCEN, y un equipo JEOL JEM-1010, operado a 100 kV, perteneciente a la *Universitat Politècnica de València*, Valencia, España. Las imágenes se adquirieron con magnificaciones entre 25 y 100 kX. Las imágenes se analizaron de la misma manera que las micrografías SEM.

6.2.3. Difracción de rayos X

Para detectar la presencia de fases cristalinas en los materiales sintetizados, se utilizó difracción de rayos X (DRX) en modo incidencia rasante. En esta modalidad, el sustrato se encuentra fijo a un dado ángulo (en este caso, 3°) y únicamente rota el detector. Esto hace que el haz irradie una zona más amplia de la muestra y penetre en el la misma sin impactar sobre el sustrato, permitiendo maximizar la señal. Las medidas se realizaron con difractómetro Siemens D5000, perteneciente al INQUIMAE - FCEyN - UBA, utilizando como fuente de radiación de $Cu - K_{\alpha} = 1.54056 \text{ \AA}$. Los difractogramas fueron medidos en un intervalo de 15 a 70 grados, con un paso de lectura de 0,026° y un tiempo de conteo de 22 segundos por paso.

6.2.4. Ciclos de histéresis magnética

Los ciclos de histéresis magnética fueron medidos con un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) modelo LakeShore 7400 perteneciente del Laboratorio de Bajas Temperaturas (Departamento de Física, FCEN, UBA). Se pesó una pequeña cantidad del orden de ~ 50 mg de polvo de la muestra magnética y se los envolvió en cinta de teflón formando un pequeño paquete, que luego fue colocado en el portamuestra del equipo. Los ciclos de magnetización-desmagnetización fueron medidos a temperatura ambiente, variando el campo inducido entre -10 kOe y 10 kOe en pasos de ≈ 500 Oe, con un tiempo de integración de señal de 10 segundos para cada campo magnético aplicado.

Luego, las curvas de magnetización en función del campo se ajustaron mediante la ecuación de Langevin para partículas superparamagnéticas[53, 54]. Este ajuste permitió obtener parámetros de interés como el momento magnético de las partículas, la magnetización de saturación y el tamaño magnético[53, 55].

6.2.5. Caracterización óptica de semiconductores

Los espectros de absorción óptica de los semiconductores, como las nanopartículas de magnetita, dan información sobre las propiedades ópticas y la composición de los materiales. De esta forma, es posible estimar el *band gap* de las nanopartículas mediante el uso de un espectrómetro UV/vis. El *band gap* óptico de los materiales, denominado E_g ó E_g^{opt} , está relacionado con el coeficiente de absorción α por la relación Tauc[56, 57].

$$\alpha h\nu = B \cdot (h\nu - E_g)^n \quad (6.1)$$

donde, B es una constante, $h\nu$ es la energía del fotón, E_g es el *band gap* y n es un valor que depende de la naturaleza de la transición (2 para la transición indirecta permitida, 3/2 para la transición directa prohibida y 1/2 para la transición directa permitida). El método involucra la extrapolación de la región lineal de un gráfico de $(\alpha h\nu)^{1/n}$ vs. $h\nu$. Específicamente, en el gráfico de Tauc cuando $\alpha = 0$ se obtiene $E_g = h\nu$ de la intersección de la zona lineal de la curva con el eje. La Ec. 6.1 describe la dependencia de la señal medida con el *band gap* en el borde de absorción del semiconductor.

Davis y Mott[58] dieron una expresión para el coeficiente de absorción α en función de la energía del fotón ($h\nu$) para la transición directa e indirecta a través de la siguiente ecuación:

$$\alpha = 2,303 \frac{10^3 \rho A}{lcM} \quad (6.2)$$

donde A es la absorbancia, ρ es la densidad de Fe_3O_4 a granel ($5,18 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), l es la longitud del camino óptico de una celda, c es la concentración molar y M es el peso molecular.

De esta forma, es posible estimar tanto el *band gap* óptico para la transición directa permitida (E_{g1}^{opt}) y para la transición indirecta permitida (E_{g2}^{opt}) graficando $(\alpha h\nu)^2$ y $(\alpha h\nu)^{1/2}$ en función de la energía del fotón $h\nu$.

Los espectros de absorción y los *band gap* de las nanopartículas de magnetita ([MAG](#)) se determinaron usando un espectrómetro UV/vis (UV-3600 Plus, Shimadzu, Tokio, Japón), en el rango de 200 a 800 nm. Las nanopartículas se dispersaron ultrasónicamente en agua desionizada (sonicador Testlab 450 W, 40 kHz), de forma de obtener una dispersión uniforme de las mismas antes de la medición. Se utilizaron dispersiones de nanopartículas de dos síntesis diferentes (réplicas) y además una de las muestras no fue sonicada. Se utilizaron concentraciones bajas de nanopartícula del orden de 10 ppm para una correcta determinación espectroscópica.

6.2.6. Crecimiento de plantas

Se sembraron semillas de achicoria (*Cichorium intybus*), y cuando los brotes alcanzaron un tamaño adecuado se trasplantaron individualmente en macetas. En dos bioterios con riego e iluminación controlada se dispusieron 10 plantas hasta alcanzar un tamaño y parámetros fotosintéticos que fueran óptimos. Las plantas se aclimataron a irradiancia media ($300 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), con un fotoperíodo de 12 horas por 30 días antes de iniciar el tratamiento con nanopartículas.

6.2.7. Tratamiento con nanopartículas

Se prepararon dispersiones de 10, 100 y 1000 ppm de nanopartículas de magnetita y se rociaron sobre las hojas durante 7 días. Esta metodología fue previamente estudiada y resultó efectiva para la incorporación de nanomateriales en hojas[21]. De la misma manera se rociaron plantas con agua destilada, como control. Cada tratamiento incluyó 4 plantas de similar tamaño y número de hojas. Se rociaron 25 mL de las distintas suspensiones. En los días 1, 3, 5 y 7 se registró la curva OJIP y la cinética de Kautsky, los cuales no requieren del corte de hojas. En el día 5 ó 7, se cortaron hojas a modo de registrar la fluorescencia estacionaria y reflectancia difusa. En el día 7 se cortaron hojas para determinar por extracción el contenido de pigmentos.

6.2.8. Extracción de pigmentos

Las muestras de hojas se lavaron con agua destilada y se eliminaron los nervios y pecíolos. Los pigmentos vegetales fotosintéticos, clorofilas y carotenos, se extrajeron con acetona al 80 % utilizando un mortero. Los extractos se centrifugaron durante 3-5 minutos en tubos de vidrio hasta que el sobrenadante fue completamente transparente. Posteriormente se registró el espectro de absorbancia en el rango del visible a una dilución adecuada. Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz con cubetas de cuarzo (UV-3600 Plus, Shimadzu, Tokio, Japón). Se utilizaron los coeficientes de absorción específicos de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*) y carotenoides totales (*Cars*) informados por Lichtenhaller y Buschmann (2005)[59] los cuales fueron descriptos en la [Sección 3.3](#). Se determinaron luego los cocientes en peso de los pigmentos, Chl *a/b* y Chls/*Cars*.

6.2.9. Fluorescencia estacionaria

Las mediciones de fluorescencia estacionaria se realizaron en el lado adaxial de las hojas usando un espectrofluorómetro de estado estacionario en geometría frontal con un ángulo de 60° (*QuantaMaster*, *PTI-Brunswick*, EE. UU.). Los espectros se registraron a temperatura ambiente sobre hojas recién cortadas y adaptadas 20 minutos a la oscuridad. La longitud de onda de excitación se estableció en 460 nm, registrando los espectros entre 600 y 800 nm. Los mismos se corrigieron mediante la respuesta del detector a cada longitud de onda. Para evitar inducir la cinética de Kautsky se utilizó una apertura del monocromador

de excitación de 2 nm.

Luego, los espectros de fluorescencia estacionaria se corrigieron según Ramos y Lago-rio[60], para eliminar la distorsión producida por reabsorción de luz. Para ello, se registraron los espectros de reflectancia de las hojas a transmitancia nula. Los espectros de reflectancia difusa de una capa ópticamente gruesa de hojas se registraron usando un es-pectrofotómetro (3101PC, Shimadzu, Tokio, Japón) equipado con una esfera integradora. Se utilizó sulfato de bario para el ajuste del 100 % de reflectancia.

6.2.10. Transiente OJIP

Los transientes de fluorescencia de clorofila (OJIP) se registraron con un *Plant Efficiency Analyser (Handy-PEA, Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido)*. La curva OJIP se indujo utilizando una luz roja saturante de $3000 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La determinación se realizó sobre hojas intactas previamente adaptadas a la oscuridad. Se registraron las curvas OJIP para un promedio de 20 hojas por tratamiento. La cuantificación de los tran-sitorios rápidos de fluorescencia se realizó de acuerdo con los supuestos y el modelo de flujos descriptos previamente en la [Sección 2.5](#). Una descripción detallada de los paráme-tros derivados del transiente OJIP, las ecuaciones correspondientes y sus definiciones se encuentran en el [Apéndice A](#).

6.2.11. Cinética de Kautsky y curvas PSMT

La fluorescencia variable se investigó utilizando un fluorómetro de pulso modulado (*Hansatech Instruments, FMS1*). Dicho fluorómetro posee dos fuentes de luz diferentes, un haz de luz de iluminación de la muestra que puede ser saturante o actínica, y el haz de me-dición modulado que es de baja intensidad. El pulso de saturación utilizado, tuvo una duración de 0,5 s con una intensidad de $2700 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La luz actíni-ca fue proporcionada por la misma fuente de luz halógena, con una intensidad de $175 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se utilizaron dos protocolos para registrar la cinética de Kautsky, el primero corresponde al protocolo descripto en la [Fig. 3.7](#) en el [Capítulo 3](#), el cual incluye una única etapa de aclimatacioón actínica y se caracteriza por ser un protocolo corto en donde se obtienen pa-

rámetros relacionados a la partición de energía y aclimatación. Con este protocolo además se registró la curva PSMT, la cual corresponde al decaimiento de la fluorescencia en los primeros minutos tras encender la luz actínica.

El segundo protocolo corresponde al protocolo de la [Fig. 3.6](#) en el [Capítulo 3](#) e incluye una etapa de aclimatación actínica seguida de una etapa de recuperación del NPQ. Este protocolo de medición es mas largo, de ≈ 60 minutos y dada la limitación respecto a la cantidad máxima de hojas que se pueden medir en el día, el número de mediciones realizadas con este protocolo es baja. Se decidió registrar la cinética de Kautsky con dos protocolos, en el cual el protocolo corto tuvo prioridad sobre el protocolo largo. De esta manera, cada día de medición se pudo registrar la cinética de Kautsky corta, mientras que únicamente al final del experimento se registró la cinética con el protocolo más largo.

6.3. Resultados

6.3.1. Caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas de magnetita ([MAG](#)) se sintetizaron mediante un método sencillo y económico de coprecipitación acuosa de sales de hierro (II) y (III) a 90°C . Los polvos de óxido de hierro sintetizados eran típicamente de color negro tal como observa en la [Fig. 6.2](#), lo que indica la presencia de magnetita (Fe_3O_4) como fase dominante, aunque la presencia de $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ no puede ser descartada. A partir de diferentes técnicas se caracterizó el nanomaterial y de esta forma se determinó el tamaño de partícula, la cristalinidad de la muestra, su composición y propiedades magnéticas.

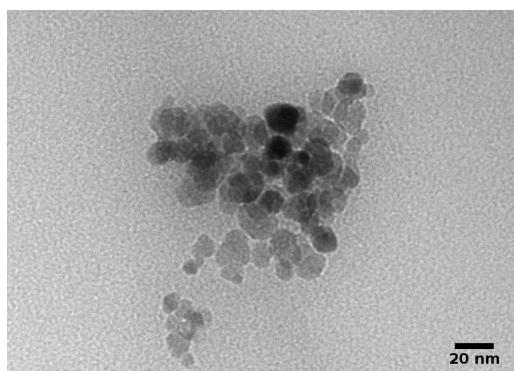
Análisis morfológico

Las imágenes de TEM para las muestras se presentan en la [Fig. 6.3](#). Las imágenes TEM revelan partículas esféricas, cristalinas y bien resueltas con una distribución de tamaño estrecha con un diámetro medio de 11 ± 2 nm. A partir de múltiples imágenes SEM como la presentada en la [Fig. 6.3 C](#) se pudieron analizar un mayor número de partículas utilizando el programa *Image J*. De esta forma se logró contabilizar el diámetro de casi cinco mil partículas en el rango de 8 a 13 nm, manteniendo una mediana alrededor de 11 nm

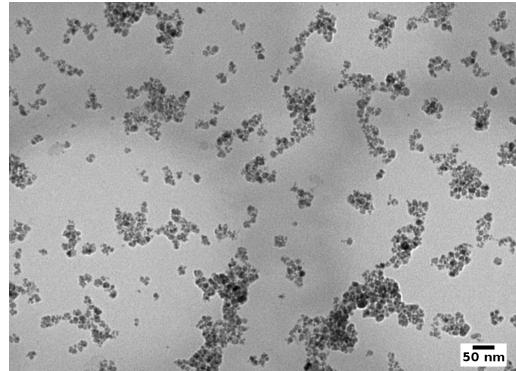


FIGURA 6.2: Fotografía de las nanopartículas sintetizadas tras haberse secado y molido.

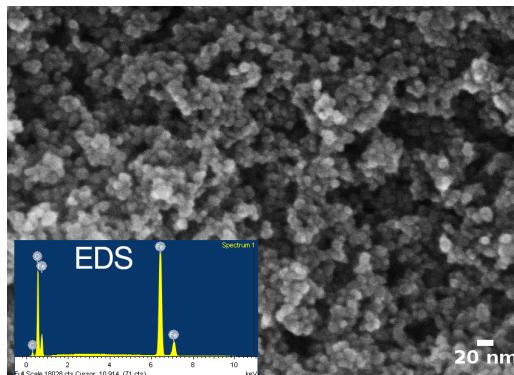
tal como se observa en la Fig. 6.3 D.



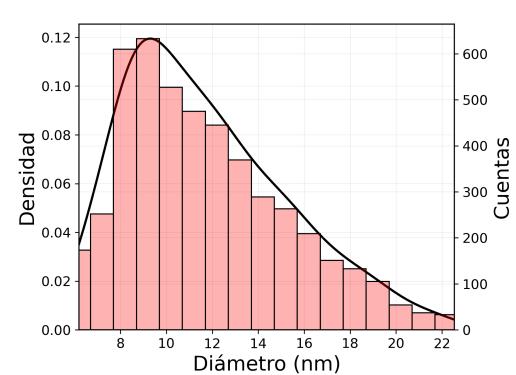
A Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de magnetita.



B Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de magnetita.



C Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de magnetita.



D Distribución de tamaños de partícula.

FIGURA 6.3: Caracterización morfológica y distribución de tamaño de nanopartículas de magnetita.

Los espectros de dispersión de energía de las muestras obtenidas mediante SEM-EDS (Fig. 6.3 C) evidenciaron claramente la presencia de una fase dominante de óxido de

hierro en la muestra. A partir del área de los picos de Fe y O, se obtuvo que la relación atómica de Fe/O fue $39.1/48.7 = 0.8$. Dado que la relación atómica Fe/O en Fe_3O_4 y Fe_2O_3 es 0.75 y 0.66, aproximadamente, el resultado obtenido indica que la fase predominante es efectivamente Fe_3O_4 .

Análisis estructural

La fase y la cristalinidad de las nanopartículas de magnetita preparadas se investigaron utilizando la técnica de difracción de rayos X y los resultados se muestran en la Fig. 6.4. Los patrones de DRX indicaron la presencia de una sola fase de espinela cúbica perteneciente al grupo espacial $Fd3m$. Los picos principales correspondientes a los valores 2θ : 30.2° (220), 35.6° (311), 43.3° (400), 53.7° (422), 57.3° (511) y 62.9° (440) están relacionados con la magnetita en comparación con los datos de referencia (JCPDS 19-0629)[61-63]. Para ello se utilizó el programa QualX con el cual se comparó el difractograma obtenido con aquellos estandarizados para diferentes fases puras conocidas. La posición y la intensidad relativa de todos los picos de difracción coincidían bien con el estándar de Fe_3O_4 . No se observó ninguna otra fase de impureza en el difractograma de la Fig. 6.4, lo que indica que las nanopartículas de magnetita sintetizadas eran nanopartículas de Fe_3O_4 de alta pureza con una estructura de espinela inversa. Los picos fuertes y nítidos revelaron que las partículas de Fe_3O_4 estaban altamente cristalizadas, lo que era consistente con las morfologías de las imágenes TEM. El ensanchamiento de los picos de difracción sugirió el pequeño tamaño de las nanopartículas de magnetita. El tamaño de partícula de las muestras se pudo estimar a partir de patrones DRX utilizando la ecuación de Scherrer. El tamaño de grano del cristal calculado de las nanopartículas de magnetita fue de 11.0 ± 0.8 nm. Los tamaños de las nanopartículas así calculados estaban en concordancia con los tamaños medios determinados por las imágenes TEM y SEM (Fig. 6.3). La consistencia respecto al tamaño evidencia la naturaleza monocrystalina de las nanopartículas de Fe_3O_4 . Utilizando el programa QualX se estimó la proporción de Fe_3O_4 y Fe_2O_3 , la cual varió entre las diferentes síntesis alcanzando un valor medio de 92.7 % de Fe_3O_4 y 7.3 % de Fe_2O_3 .

A partir de la ecuación de Scherrer se calculó el espaciado interplanar del cristal (d_{311}) utilizando el pico (311) que corresponde al pico más intenso. El d_{311} fue 2.520 nm mientras

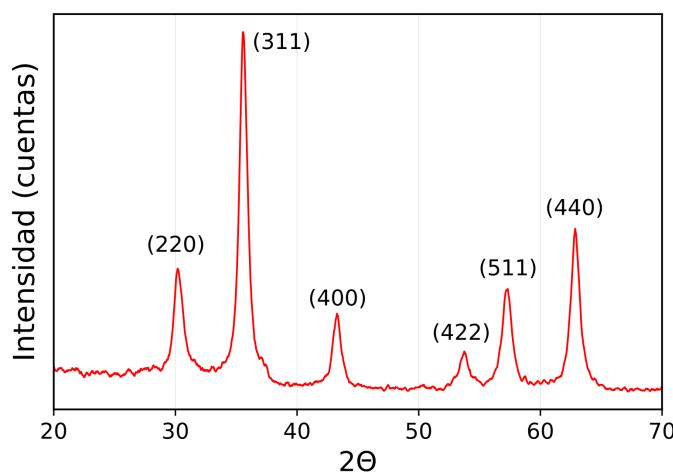


FIGURA 6.4: Espectro de difracción de rayos X de nanopartículas de magnetita.

que el parámetro de celda unitaria (a) fue de 8.357 ± 0.003 Å. El parámetro de celda y el espaciado interplanar para la muestra preparada fueron ligeramente más bajos que los reportados para el estándar JCPDS de magnetita a granel ($a = 8.394$ Å y $d_{311} = 2.531$ nm). Sin embargo, los valores fueron similares a los reportados en algunas referencias [10, 63-65]. Los valores obtenidos para la muestra se pueden atribuir a la formación simultánea de otra fase como $\gamma - Fe_2O_3$ ($a = 8.342$ Å y $d_{311} = 2.517$ nm, JCPDS Nro.39-1346) previamente identificada[64, 66]. Las diferencias en los parámetros de celda indican que el tipo de estructura se puede definir como espinela defectuosa dada la presencia de una impureza más compacta como $\gamma - Fe_2O_3$ [67].

Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Los espectros FTIR registrados de 4000 a 400 cm^{-1} de las nanopartículas de magnetita obtenidas se muestran en la Fig. 6.5. Se observó que la banda de absorción característica a 568 cm^{-1} del enlace Fe-O del Fe_3O_4 a granel se encontraba en 569 cm^{-1} [68]. Esta banda se encuentra desdoblada y se observa un pico a 640 cm^{-1} . Estas dos bandas corresponden a las bandas principales del espectro. Como $\gamma - Fe_2O_3$ a granel presenta señales a valores de frecuencias menores (481 cm^{-1}) y mayores (646 cm^{-1}) respecto de los observados para magnetita; diferentes autores atribuyeron el desdoblamiento de la banda a cambios estructurales inducidos por la forma y el orden de carga de los átomos de $Fe^{3+} - Fe^{2+}$ en los sitios B octaédricos[10, 69]. En magnetita a granel el pico a 568 cm^{-1} se despla-

za, en el caso de nanopartículas, a valores tan altos como 592 cm^{-1} [69] para partículas de 14 nm, pero toma valores intermedios según el tamaño de la partícula y su entorno. Por ejemplo Andhariya y cols.[70] observaron el pico a 580 cm^{-1} teniendo partículas de similar tamaño (11 nm) y Barreto y cols.[71] también a 580 cm^{-1} con partículas de 13 nm. Por otro lado, la banda observada a 800 cm^{-1} podría estar asociada con el modo de estiramiento Fe-O de $\alpha - Fe_2O_3$ que aparece usualmente a $780 - 790\text{ cm}^{-1}$ [72]. Este resultado sugiere la presencia de una cantidad pequeña de fase de Fe_2O_3 en la muestra que es consistente con lo observado por difracción de rayos X.

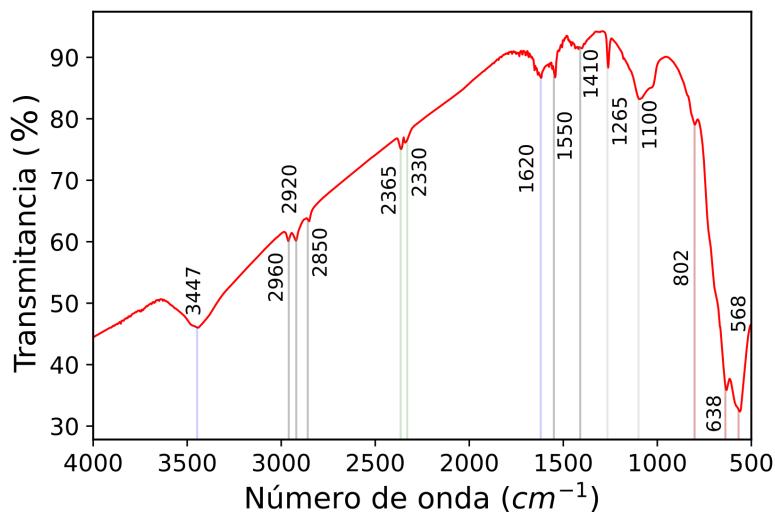


FIGURA 6.5: Espectroscopia infrarroja de las nanopartículas de magnetita. Se marcan las áreas donde se ven señales específicas.

La presencia de vibración de estiramiento O-H $\sim 3447\text{ cm}^{-1}$ y vibración deformada de O-H (modos de flexión) a 1620 cm^{-1} se atribuyen a la presencia de grupos OH coordinados o moléculas de agua en la superficie insaturada de átomos de Fe[73]. Las vibraciones de estiramiento C-O a 2365 y 2330 cm^{-1} se deben a la presencia de CO_2 atmosférico[74]. Las pequeñas bandas de absorción en 1410 , 1550 , 2850 , 2920 y 2960 cm^{-1} se deben a vibraciones de residuos de amonio NH_4^+ y NH_3 remanentes de la síntesis después del lavado y secado. Por último, los picos a 1265 y 1100 cm^{-1} son consistentes con la presencia de grupos O-H y C-O, provenientes del solvente o impurezas del solvente[74].

Propiedades magnéticas

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas de magnetita obtenidas se midieron a temperatura ambiente, y la curva de histéresis magnética (Magnetización vs Campo) se presenta en la Fig. 6.6. A simple vista se puede observar la falta de histéresis de la curva, es decir, el campo coercitivo (H_c) a $M = 0$ y la magnetización remanente (M_R) a $H = 0$, fueron nulos. Esto se evidencia en la figura insertada dentro de Fig. 6.6 que muestra el comportamiento de la curva a magnetización y campo aplicado bajos. Este comportamiento es consistente con un fuerte carácter superparamagnético de las nanopartículas. Para confirmar dicha naturaleza magnética de la muestra, se han ajustado las curvas M-H a temperatura ambiente con la ayuda de la función de Langevin modificada (detalles en Ec. 3.18 del Capítulo 3). Se lograron obtener buenos ajustes con un error cuadrático medio cercano a 0.8, tal como se observa en la curva de la Fig. 6.6.

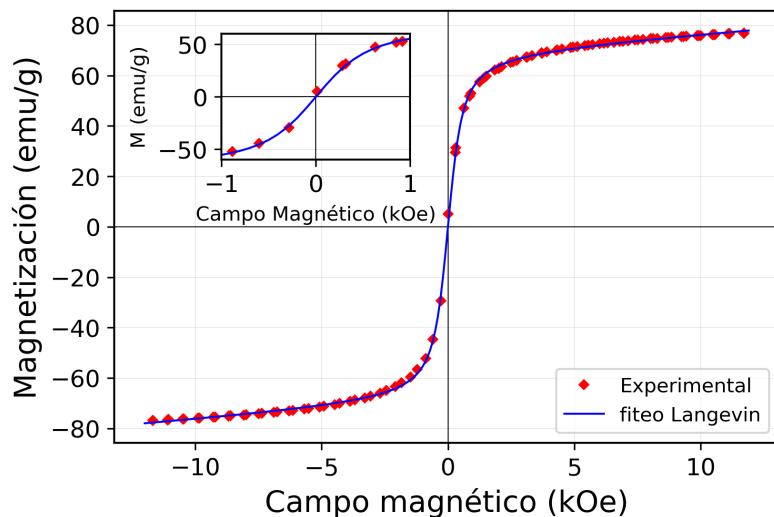


FIGURA 6.6: Curva de histéresis de magnetización medidas a 298K para nanopartículas de Fe_3O_4 . La curva azul representa el ajuste de la curva M-H de la muestra con la función de Langevin modificada.

A partir del ajuste se obtuvo una magnetización de saturación (M_S) de las nanopartículas de magnetita de 69.92 ± 0.29 emu/g. La M_S obtenida fue muy cercana al valor teórico de la Fe_3O_4 a granel (~ 90 emu/g)[75]. Además, el valor obtenido se corresponde bien con los valores obtenidos para nanoesferas y nanopartículas de magnetita por diferentes autores en el rango de 47 a 76 emu/g[10, 63, 73, 76]. Estos valores corresponden a nanopartículas de 10 a 50 nm, ya que el comportamiento magnético es fuertemente depen-

diente del tamaño de partícula y la pureza de la fase cristalina[10, 73]. Es bien sabido que un menor tamaño de partícula conduce a un aumento de la relación superficie-volumen, lo que a su vez provoca más desorden de espín de la superficie y, en consecuencia, una reducción en la magnetización de saturación[76, 77]. Por otro lado, a mayor cristalinidad y pureza de la misma, aumenta la magnetización de saturación en comparación con nanopartículas de cristalinidad baja. Por lo tanto, el alto valor obtenido para la magnetización de saturación próximo al del granel considerando el pequeño tamaño de las partículas, indica la formación de una estructura cristalina bien definida para las nanopartículas de magnetita con un alta pureza en la fase Fe_3O_4 .

Del ajuste de la curva se obtiene también el momento magnético (μ) de las partículas, el cuál se suele reportar en base al momento magnético del magnetón de Bohr ($\mu_B = 9.27 \times 10^{-24} \text{ J/T}$). El valor obtenido para el momento magnético de las partículas ($\mu = (2022 \pm 34)\mu_B$), se encuentra muy cercano a valores reportados para nanopartículas de Fe_3O_4 de similar tamaño[10, 78].

El buen ajuste de las curvas mediante la ecuación de Langevin y la evidente falta de histéresis, indicó que las nanopartículas presentaron un comportamiento superparamagnético dominante junto con algún componente paramagnético menor. El componente parámag- nético (χ^{PM}) es el último de los parámetros obtenidos tras el ajuste de la curva de magnetización usando la ecuación de Langevin. El valor del componente paramagnético (χ^{PM}) fue de 0.78 ± 0.03 , muy cercano también al valor esperado según bibliografía[10, 79]. Usualmente, el componente paramagnético aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas. Esto se ha asociado al desorden de espín de la superficie y a los espines no compensados en nanopartículas de tamaño de partícula muy pequeño[79].

Por último, fue posible estimar el tamaño de la partícula a partir de las curvas de histéresis magnética, el cual suele referirse como tamaño magnético. A partir del ajuste de la curva M-H, se obtiene el momento magnético de la partícula, el cual se puede escribir a su vez como $\mu = M_{sb} \cdot V_{mV}$, donde M_{sb} es la saturación del material a granel y V_{mV} es el volumen medio de las partículas[55]. Luego, de acuerdo a las microscopías electrónicas la geometría de las partículas puede asumirse esférica, por ende $V_{mV} = \pi \cdot D_{mV}^3 / 6$, con

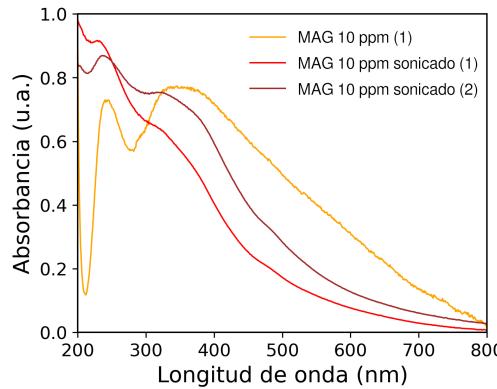
D_{mV} representando el diámetro medio en la distribución ponderada por volumen. De esta forma se obtuvo un valor de diámetro de 14.0 ± 0.24 nm, el cual es un valor muy próximo al valor obtenido por microscopías electrónicas y difracción de rayos X.

Propiedades ópticas

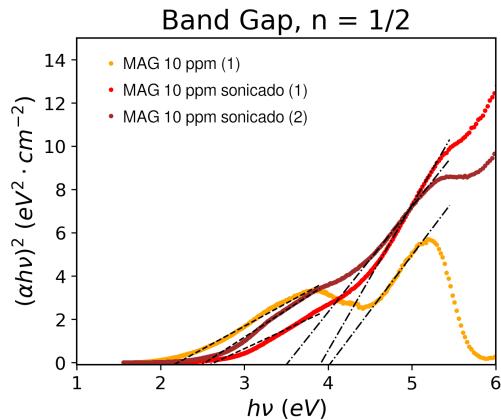
Se registraron los espectros de absorción UV/vis y se analizaron para estimar el *band gap* (E_g^{opt}) de las nanopartículas de Fe_3O_4 . Los espectros de absorción se muestran en la Fig. 6.7A. En los mismos, las muestras exhiben una absorción en el rango visible que disminuye gradualmente hasta 800 nm, lo que concuerda con la literatura[9, 10, 80]. Se observaron dos bandas de absorción, una ubicada a 240 nm y otra entre 350 y 400 nm cuya posición y forma dependió de si la muestra fue previamente sonicada o no. Durante el sonicado, es posible que las nanopartículas se oxiden parcialmente, y por ese motivo una de las muestras no fue sonicada a modo de comparar con los espectros sonicados. La muestra de nanopartículas sin sonicar presentó bandas de absorción más definidas.

Los *band gap* para las transiciones directas permitidas obtenidas a partir de los gráficos Tauc de $(\alpha h\nu)^{1/2}$ vs $h\nu$ fueron 3.8 ± 0.2 eV y 2.5 ± 0.2 eV (Fig. 6.7B). Mientras que para las transiciones indirectas permitidas obtenidas a partir de los gráficos Tauc de $(\alpha h\nu)^2$ vs $h\nu$ fueron 2.2 ± 0.2 eV y 1.4 ± 0.2 eV (Fig. 6.7C). Numerosas investigaciones han reportado los *band gap* directos (E_{g1}^{opt}) e indirectos (E_{g2}^{opt}) para nanopartículas de Fe_3O_4 preparadas mediante diferentes técnicas de síntesis obteniendo nanopartículas de diferentes tamaño de cristalita[9, 10, 81-83]. En dichos reportes se puede observar transversalmente que a menor tamaño de partícula, mayor es el *band gap* observado. Esto se debe a que a menor tamaño, mayor es el área superficial y por ende, mayor es la absorbancia y el *band gap* óptico obtenido[80, 84].

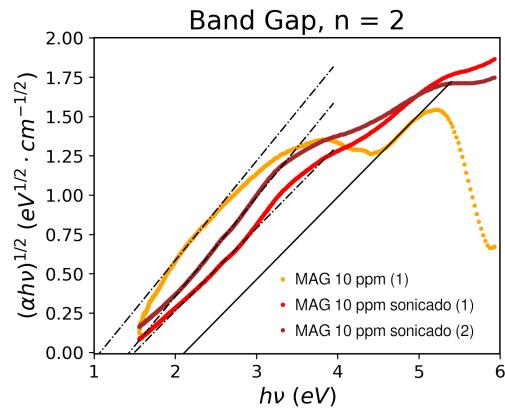
Por otro lado, valores altos de *band gap* ≈ 3.8 eV se han asociado a la transferencia de carga de $O^{2-} \rightarrow Fe^{3+}$, es decir, excitación desde la banda de valencia a la banda de conducción y a su vez la transferencia de carga de $O^{2-} \rightarrow Fe^{2+}$ induce un *band gap* inferior ≈ 2.5 eV. Los intervalos de banda observados entre 2.2 y 2.9 eV están asociados al intervalo de banda de las nanopartículas de Fe_3O_4 [9, 10, 81-83, 85]. Sin embargo, en algunos informes, valores más altos de ~ 2.5 eV de *band gap* se han correlacionado con



A Espectros de absorbancia de nanopartículas de magnetita.



B Energía de *band gap* óptico para la transición directa permitida (E_{g1}^{opt}).



C Energía de *band gap* óptico para la transición indirecta permitida (E_{g2}^{opt}).

FIGURA 6.7: Espectros de absorción y gráficos de Tauc para estimar los *band gap* para nanopartículas de magnetita dispersas en agua. Las muestras 1 y 2, corresponden a muestras de dos síntesis diferentes (réplicas).

la fase de maghemita ($\gamma - Fe_2O_3$)[86, 87] y valores menores de ~ 2.1 eV a hematita ($\alpha - Fe_2O_3$)[72, 88]. Por lo tanto, los valores observados también pueden deberse a la presencia de impurezas de óxidos de hierro (III) en la muestra.

Generalmente, varios factores, incluidos defectos, impurezas cargadas, desorden en los límites de la cristalita, distribución catiónica y efectos del tamaño, influyen en el valor de E_g de los semiconductores. En el presente estudio, los altos valores de E_g se pueden atribuir al pequeño tamaño de cristalita característica de una síntesis a altas temperaturas.

En resumen, las nanopartículas de magnetita obtenidas poseen 11 nm de diámetro, con alta proporción de la fase magnetita en comparación con maghemita y hematita según la caracterización estructural por DRX y las propiedades magnéticas obtenidas. Así mismo, se

observó que las nanopartículas absorben fuertemente en la región del UV/vis del espectro y poseen propiedades semiconductoras, a partir de lo cual podrían interactuar fotofísica y fotoquímicamente con los pigmentos fotosintéticos presentes en las hojas.

6.3.2. Contenido de pigmentos

Luego de la aplicación sobre las plantas, durante siete días, de distintas suspensiones de nanopartículas de magnetita (**MAG**) 10, 100 y 1000 ppm, además del control con agua; se extrajeron los pigmentos fotosintéticos y los resultados se muestran en la [Tabla 6.1](#). Se observó un aumento significativo en el contenido de todos los pigmentos, el cual fue más pronunciado para Chl *a* que para Chl *b* y carotenoides totales. El aumento aquí observado en el contenido de pigmentos por área foliar puede interpretarse mediante un efecto de sombreado, producto de la absorción en la región del UV/vis de las nanopartículas. Asimismo, el cociente de Chl *a/b* se mantuvo relativamente constante, observándose un brusco aumento a 100 ppm de MAG. De forma similar a lo observado tras la aclimatación a baja iluminación en el [Capítulo 4](#), un aumento en Chl *a/b* se puede relacionar a un cambio en la proporción de fotosistemas I y II. Esto se debe a que la relación Chl *a/b* de la antena del PSI (LHC-I) es mayor que para la antena del PSII (LHC-II). Un aumento de este parámetro refleja un incremento de la antena del PSI o bien, a en la proporción de PSI respecto a PSII. Dicho cambio debe luego confirmarse mediante el cociente de fluorescencia estacionaria que también es sensible a dicha población relativa.

Por otro lado, el cociente Chls/Cars aumentó conforme lo hizo la concentración de MAG. Este fue el parámetro más sensible, observándose cambios significativos a la menor concentración de MAG estudiada. Los cocientes Chl *a/b* y Chls/Cars son parámetros conocidos que reflejan la aclimatación del aparato fotosintético[89-91]. Particularmente, la relación Chls/Cars es un indicador de verdor de las hojas y un aumento en este cociente está fuertemente asociado con un nivel más bajo de carotenoides del ciclo de las xantófilas en comparación con las plantas control. Dicha respuesta es razonable considerando que uno de los efectos de las nanopartículas de magnetita sería reducir la intensidad de luz que interactúa efectivamente con las hojas, produciendo así un efecto análogo al de sombreado. Al disminuir la intensidad total de la luz incidente, la respuesta de la planta es la síntesis de mayor cantidad de pigmentos fotosintéticos, respecto al control. Luego, debido a que

las nanopartículas filtran luz principalmente de la región UV cercana, mimetizando así el efecto de los carotenoides del ciclo de las xantófilas, la proporción de estos pigmentos respecto a la clorofillas disminuye.

TABLA 6.1: Contenido y cociente de pigmentos para hojas tratadas con 0, 10, 100 y 1000 ppm de nanopartículas de magnetita. El contenido de pigmento se expresó en microgramos por gramo de materia foliar fresca ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{f.w.}$). Los valores entre los diferentes tratamientos marcados por la misma letra (a - d) no fueron significativamente diferentes en $p < 0.01$.

Pigmentos	Control	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
Chl <i>a</i>	151 \pm 4 a	147 \pm 5 a	192.4 \pm 0.1 b	206 \pm 4 c
Chl <i>b</i>	41 \pm 2 a	43 \pm 4 a	43.7 \pm 0.2 a	58 \pm 3 b
Chl <i>a + b</i>	192 \pm 3 a	190 \pm 4 a	236.1 \pm 0.2 b	264 \pm 3 c
<i>Cars</i>	50 \pm 2 a	46 \pm 2 a	52.8 \pm 0.2 a	54 \pm 1 a
Cocientes				
Chls/Cars	3.8 \pm 0.1 a	4.1 \pm 0.2 b	4.47 \pm 0.02 c	4.9 \pm 0.2 d
Chl <i>a/b</i>	3.7 \pm 0.3 a	3.4 \pm 0.4 a	4.40 \pm 0.02 c	3.6 \pm 0.2 a

El contenido de pigmentos se ha reportado en múltiples trabajos donde se aplicaron diferentes nanopartículas de óxido de hierro. Ghafari y Razmjoo observaron un aumento del contenido de clorofillas, carotenoides, y los cocientes Chl *a/b* y Chls/Cars en trigo tratado con NPs de Fe_2O_3 [17]. Ghafariyan y cols, reportaron un incremento en el contenido de clorofillas de soja tratadas con NPs de Fe_3O_4 , mientras el cociente Chl *a/b* se mantuvo constante[24]. De forma similar, Rui y cols. detectaron un aumento del contenido de pigmentos en plantas de tomate tratadas con NPs de Fe_2O_3 [3]; Trujillo-Reyes y cols., también observaron un aumento en el contenido de clorofillas en lechugas tratadas con nanopartículas *core-shell* de $\text{Fe}/\text{Fe}_3\text{O}_4$; Elanchezhian y cols., reportaron un aumento en el contenido de clorofillas y el cociente Chl *a/b* en hojas de maíz tratadas con NPs de Fe_3O_4 [18]; Alidoust y cols., observaron un aumento en la fotosíntesis neta en arroz tratado con NPs de Fe_2O_3 [25]; entre otros con resultados similares[20]. Otros autores como Yan y cols.[29] y Wang y cols.[92], no reportaron cambios significativos en el contenido de pigmentos mientras que Ding y cols.[93] y Li y cols.[22], reportaron una disminución en el contenido de clorofillas.

Considerando lo anterior de forma general, los resultados aquí obtenidos respecto al aumento del contenido de clorofillas y carotenoides tras la aplicación de NPs de Fe_3O_4 es el esperado. Si bien hay reportes con resultados inversos, son minoritarios. Dado que en la mayoría de estos estudios se investigó únicamente el efecto de estas NPs en las propiedades fisiológicas y bioquímicas, como la actividad enzimática relacionada a estrés oxidativo, no se plantearon hipótesis sobre el mecanismo de acción de las NPs. A continuación, de acuerdo a los resultados obtenidos a partir de las medidas de fluorescencia estacionaria y variable, se propone un posible mecanismo para el efecto de estas partículas en la actividad fotosintética y la salud general de la planta.

6.3.3. Reflectancia e índices espectrales

Los espectros de reflectancia difusa de hojas tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de magnetita se muestran en la [Fig. 6.8](#). Los espectros presentan las dos bandas típicas, una en la región del infrarrojo cercano (NIR, $\lambda = 700 - 1300$ nm) y otra en el rango visible del rojo ($\lambda = 550 - 700$ nm) del espectro electromagnético[94]. Las plantas generalmente tienen una reflectancia baja en la región del azul y rojo del espectro debido a la absorción de las clorofillas, con una reflectancia ligeramente mayor en el verde. La energía radiante del infrarrojo cercano se refleja fuertemente en la superficie de la hoja y la reflectancia está entonces determinada por las propiedades ópticas de los tejidos de las hojas[94]. Estas características anatómicas se ven afectadas por factores ambientales como la humedad del suelo, el estado de los nutrientes, la salinidad del suelo y el estado de las hojas[95].

Los espectros obtenidos que se muestran en la [Fig. 6.8](#), presentan cambios dependientes de la concentración de nanopartícula. En la región del visible se puede observar una disminución de la reflectancia media en el verde acorde a aumenta la concentración de magnetita. Esta disminución se asocia a un incremento en la absorción de las hojas en esa región debido a la presencia de las partículas y posiblemente a cambios en el contenido de pigmentos.

En la región del NIR no se observan cambios significativos hasta 100 ppm de magnetita,

mientras que para 1000 ppm la reflectancia disminuyó significativamente. En esta región la absorción de los pigmentos de la hoja es baja, por lo que la reflectancia está dominada por la estructura interna de la hoja[96], específicamente dada por las discontinuidades refractivas entre los espacios de aire intercelulares y las paredes celulares[97, 98]. La baja absorción de pigmentos en esta región combinada con la dispersión producto de la estructura interna de la hoja, da como resultado una reflectancia muy alta en el NIR, la denominada meseta NIR. El rápido aumento de la reflectancia entre el pozo dado por alta absorción de pigmentos fotosintéticos y la meseta NIR se ha denominado borde rojo, más conocido como *red edge* en inglés. La región de reflectancia más estudiada y con mayor sensibilidad al cambio inducido por el estrés es este borde rojo[99]. Su posición es consistente entre diferentes especies y generalmente se encuentra entre 680 y 750 nm. Se ha demostrado que el estrés en las plantas causa un cambio en este punto de inflexión hacia longitudes de onda más cortas, denominado desplazamiento del borde rojo al azul. En este caso, la posición del *red edge* aumenta conforme lo hace la concentración de MAG utilizada, pero es significativo únicamente para 1000 ppm de magnetita. Estas variaciones indican que no habría un fuerte estrés inducido por la presencia de las NPs, sin embargo la posición de este punto de inflexión puede estar distorsionada por la absorción y dispersión de las nanopartículas.

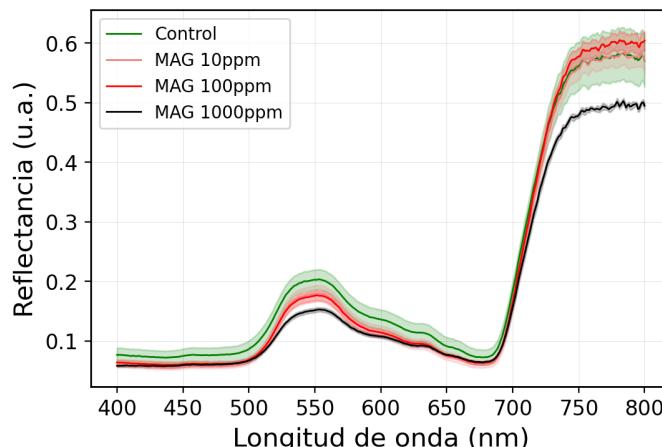


FIGURA 6.8: Espectros de reflectancia de hojas tratadas con diferente concentración de nanopartículas de mangnetita.

Teniendo en cuenta estas dos regiones en el visible y en el NIR, y los componentes que influyen en cada una, pueden usarse los espectros de reflectancia para calcular una variedad

de índices vegetativos. Estos índices están bien correlacionados con parámetros biofísicos como la actividad fotosintética y la productividad de la planta[95, 100]. Los diferentes índices calculados se presentan en la [Tabla 6.2](#).

TABLA 6.2: Índices espectrales calculados a partir de los espectros de reflectancias de plantas tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de magnetita.

Índices	Control	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
NDVI	0.77±0.06	0.81±0.02	0.807±0.007	0.8±0.1
mNDI	0.581±0.002	0.64±0.07	0.60±0.01	0.65±0.08
PSND _a	0.65±0.02	0.64±0.02	0.649±0.008	0.75±0.08
PSND _b	0.62±0.01	0.60±0.02	0.595±0.009	0.71±0.03
PRI	-0.020±0.006	-0.019±0.002	-0.018±0.004	-0.022±0.04

El índice vegetativo de diferencia normalizada (NDVI) tiene éxito en la predicción de la actividad fotosintética, porque este índice de vegetación incluye tanto la luz roja como la del infrarrojo cercano. Dicho índice aumenta conforme aumenta la concentración de nanopartículas pero los cambios observados no son significativos. Lo mismo se observa con el índice NDVI modificado (mNDI) y los índices de clorofila *a* y *b* (PSND_a y PSND_b). En general, la variabilidad de las medidas de reflectancia en combinación con el bajo número de duplicados medidos, impiden distinguir cambios significativos. Por ello, se repitieron los ensayos únicamente para el control y 1000 ppm de magnetita, de forma de aumentar el número total de duplicados medibles en el mismo día en que se registraron también los espectros de fluorescencia, las curvas OJIP y las cinéticas de Kautsky. De esta forma se obtuvieron resultados presentados en la [Tabla 6.3](#), los cuales muestran cambios significativos a diferencia de los anteriores.

De acuerdo a los índices espectrales, la concentración de pigmentos tanto clorofillas como carotenoides, aumenta tras el tratamiento con nanopartículas de magnetita. Estos resultados están en sintonía con los obtenidos por extracción directa de pigmentos presentados en la sección anterior. Luego, dado el aumento en el contenido de pigmentos es razonable el corrimiento del punto de inflexión *red edge* obtenido, el cual es un indicio preliminar de la no existencia de estrés o deterioro de la hoja producto de la presencia de las partículas.

TABLA 6.3: Índices espectrales calculados a partir de los espectros de reflectancias de plantas control y tratadas con 1000 ppm nanopartículas de magnetita. Los * representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.05$.

Índices	Control	1000 ppm
NDVI	$0.55 \pm 0.03^*$	$0.63 \pm 0.02^*$
mNDI	$0.49 \pm 0.08^*$	$0.66 \pm 0.02^*$
PSND a	$0.59 \pm 0.03^*$	$0.66 \pm 0.02^*$
PSND b	$0.71 \pm 0.02^*$	$0.77 \pm 0.02^*$
PRI	$-0.005 \pm 0.004^*$	$0.006 \pm 0.003^*$

6.3.4. Fluorescencia estacionaria

Los espectros de fluorescencia estacionaria experimentales y corregidos por reabsorción de luz se muestran en la Fig. 6.9. Para ambos espectros se observó una disminución significativa de la fluorescencia conforme aumenta la concentración de nanopartículas utilizada. La disminución máxima de la fluorescencia a 1000 ppm de magnetita fue del 36 % sobre la fluorescencia experimental y del 37 % para la fluorescencia corregida. En la Tabla 6.4 se presentan los valores y sus respectivos desvíos estándar. La disminución de la fluorescencia experimental puede deberse a la absorción o dispersión de las nanopartículas de la luz incidente, o incluso de la luz emitida. Sin embargo, la disminución de la fluorescencia corregida por fenómenos de reabsorción de luz incluye la distorsión del espectro por estos fenómenos, por lo que una variación en la fluorescencia corregida implica cambios en los fotosistemas, particularmente en su proporción o composición de pigmentos, o bien la existencia de un *quenching* del estado excitado P_{680}^* .

Dado que el cociente $F_{red}/F_{far-red}$ es sensible a la población relativa de PSI y PSII presente en la hoja, se lo ha correlacionado ampliamente en la literatura con varios factores de estrés[101-103]. Se observó que este cociente disminuye conforme aumenta la concentración de magnetita utilizada, reduciéndose un 14 % a 1000 ppm de magnetita. Una disminución de este cociente puede indicar una disminución en la proporción de fotosistemas PSII/PSI debido a que disminuyó la banda ubicada a 680 nm correspondiente al PSII respecto a la banda en 730 nm a la cual contribuyen ambos fotosistemas. Este cambio puede deberse tanto a una disminución de PSII respecto a PSI, ó bien, a un aumento de PSI

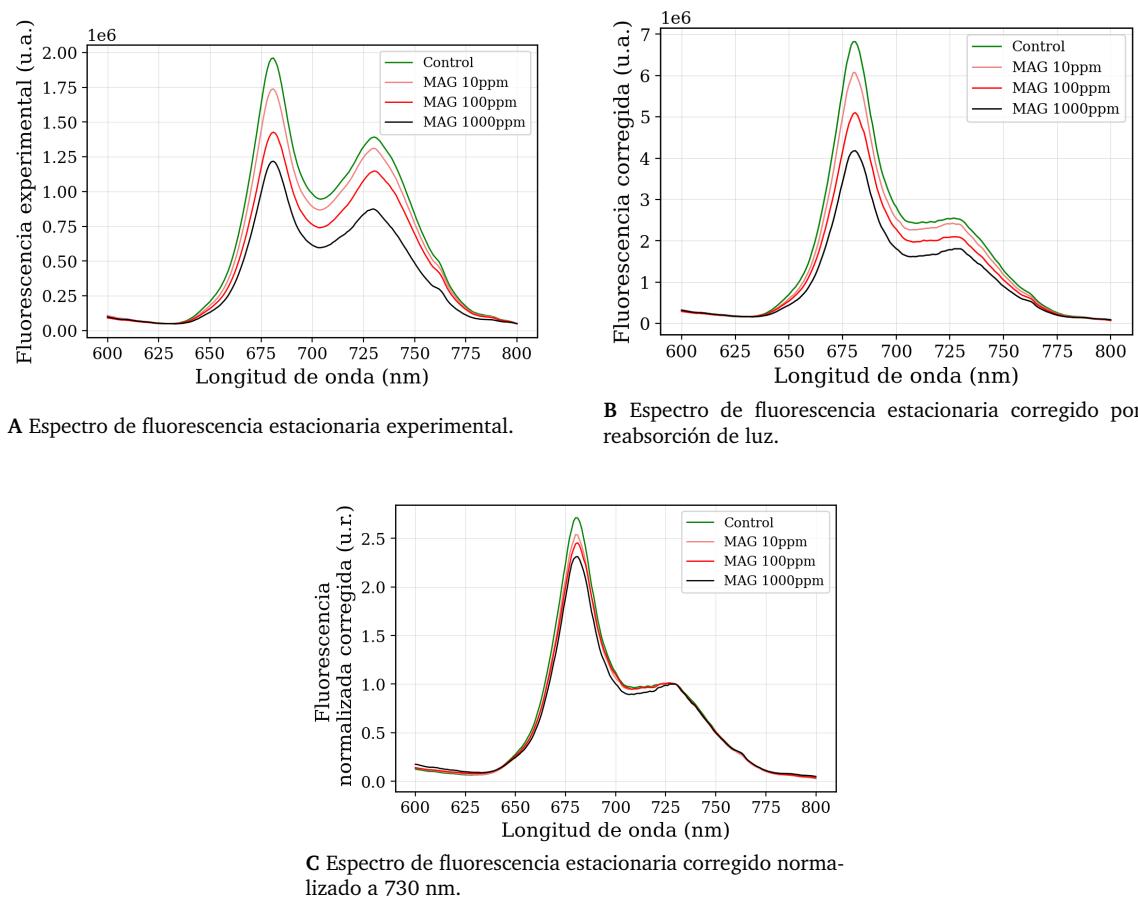


FIGURA 6.9: Espectros promedio de fluorescencia estacionaria de hojas tratadas con diferente concentración de nanopartículas de magnetita. El promedio se realizó para 6 hojas de cada tratamiento. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 460 nm.

TABLA 6.4: Valores de fluorescencia estacionaria a 680 nm, experimental y corregido, y cociente $F_{red}/F_{far-red}$ corregido, para hojas tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de magnetita. Los valores entre los diferentes tratamientos marcados por la misma letra (a - d) no fueron significativamente diferentes en $p < 0.01$.

Parámetros	$F_{exp}(680\text{nm})$	$F_{corr}(680\text{nm})$	$F_{red}/F_{far-red}(\text{corr})$
Control	$(2.11 \pm 0.10) \cdot 10^6$ a	$(7.37 \pm 0.36) \cdot 10^6$ a	2.64 ± 0.12 a
MAG 10 ppm	$(1.91 \pm 0.12) \cdot 10^6$ ab	$(6.69 \pm 0.43) \cdot 10^6$ ab	2.48 ± 0.16 ab
MAG 100 ppm	$(1.54 \pm 0.19) \cdot 10^6$ b	$(5.51 \pm 0.70) \cdot 10^6$ b	2.41 ± 0.30 b
MAG 1000 ppm	$(1.35 \pm 0.09) \cdot 10^6$ c	$(4.62 \pm 0.34) \cdot 10^6$ c	2.27 ± 0.16 c

respecto a PSII. Ambas tendencias son consistentes con el aumento en el cociente Chl a/b obtenido por extracción directa de pigmentos, ya que este parámetro tiene en cuenta también el cambio en la población relativa de fotosistemas. Sin embargo, el aumento relativo de PSI a diferencia de la disminución relativa en PSII, es consistente con el aumento en el

contenido de pigmentos, observado tanto por extracción directa como por índices especiales. No obstante, solo con estas técnicas no es posible asegurar dicho cambio, pero las técnicas de fluorescencia variable de clorofila que se describen a continuación dan cuenta de los cambios en la actividad fotosintética y particularmente en cambios en la actividad de ambos fotosistemas (curva OJIP particularmente) a modo de distinguir entre ambas hipótesis respecto a la población relativa de PSI y PSII.

6.3.5. Transiente OJIP

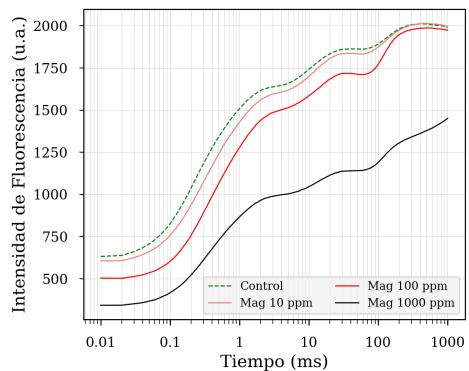
Los transientes de fluorescencia de clorofila de la Fig. 6.10A sufrieron grandes cambios en respuesta al tratamiento con magnetita, con respecto tanto a la extensión como a la naturaleza de los cambios biofísicos y bioquímicos inducidos. La intensidad de las curvas disminuyeron significativamente luego de 7 días de tratamiento, observándose un *quenching* de la fluorescencia a lo largo de toda la curva, que alcanzó el 34% para F_0 y 19% para F_M . La reducción de F_0 es consistente con lo observado por fluorescencia estacionaria. Dado que la fluorescencia de clorofila es competitiva con la fotosíntesis, una disminución de la fluorescencia suele relacionarse con un aumento en la fotosíntesis, más específicamente un aumento en la tasa de transporte electrónico más allá de Q_A , para el caso de la fluorescencia obtenida de la curva OJIP. Sin embargo, dado que aquí el sistema incorpora nanopartículas que pueden alterar la señal de fluorescencia obtenida, los parámetros derivados de ella deben analizarse cuidadosamente.

La disminución en la fluorescencia a lo largo de todo el transiente OJIP produce un aumento en el área por encima de la curva y F_M , así como de los parámetros derivados de ella como S_M y N. El área representa el número total de portadores de electrones, y por ende un aumento del área implica un aumento de dichos portadores. Dado que la mayoría de los portadores de electrones son plastoquinonas (PQs), se suele interpretar también como un aumento del *pool* de PQs, así como también la energía necesaria para cerrar un centro de reacción (RC). El parámetro S_M es el área normalizada y N es el número total de electrones transferidos el cual es proporcional al número de cambios redox de Q_A . Todos estos parámetros dependen directamente del área y aumentaron significativamente tras el tratamiento con nanopartículas de magnetita tal como se puede ver en las Fig. 6.11 y Tabla 6.5.

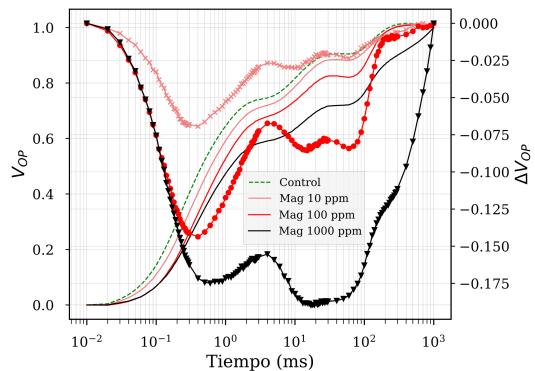
Considerando que los diferentes puntos de inflexión en la curva OJIP representan diferentes etapas del transporte electrónico, si se calcula la fluorescencia variable de cada muestra y luego se grafica la diferencia respecto al control, es posible identificar a simple vista las etapas donde ocurren los cambios principales en el transiente OJIP. De esta forma se obtuvo la Fig. 6.10 B en donde se muestra tanto la fluorescencia variable normalizada en O y P (V_{OP}) como la diferencia en este parámetro entre cada una de las muestras y el control (ΔV_{OP}). Dado que las curvas de las muestras se encuentran por debajo del control, las curvas diferencia que representan los cambios, son negativas. La disminución de la fluorescencia variable incrementa con la concentración de magnetita utilizada y se distinguen variaciones tanto sobre el punto de inflexión J como el I. Las curvas ΔV proporcionaron más información como diferencias en el comportamiento de la respuesta fotosintética de las plantas de control y tratadas con nanopartículas y revelaron bandas de diferencias ocultas que son mucho más visibles que en los transitorios de fluorescencia OJIP originales de la Fig. 6.10 A[104, 105].

A partir de la Fig. 6.10 B se observa una banda ΔV_{OJ} que aparece en aproximadamente 2 - 3 ms. Esta zona depende en gran medida del estado redox de los portadores de electrones primarios, principalmente en la relación Q_A^-/Q_A en el lado aceptor del PSII, el cual influye en la probabilidad de que un electrón avance en el transporte de electrones entre sistemas hacia PSI[106]. Eso significa que una banda ΔV_{OJ} positiva indica, una acumulación de portadores reducidos como PQs, *Cytb_{6f}* y PCs, mientras que una banda ΔV_{OJ} negativa apunta a lo opuesto y probablemente se deba a una desaceleración de la donación electrónica de H_2O a una mayor actividad de PSI o formación de ROS estimulada (compuestos reactivos de oxígeno)[107]. Cuál o cuáles de estos factores puede ser el causante dependerá de los cambios en los demás parámetros derivados de la curva OJIP.

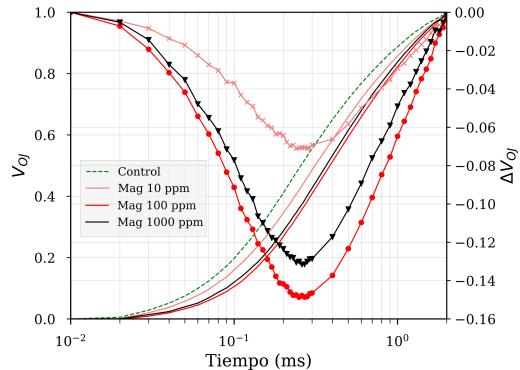
Además, se observa una banda negativa en ΔV_{OI} que aparece aproximadamente a 30 ms (Fig. 6.10 B). Cuando esta banda es positiva apunta a la inhibición de la reducción de los aceptores de electrones terminales, como Fd_{red} y $NADP^+$, o una menor actividad del PSI[108]. Como en este caso se determinó una banda ΔV_{OI} negativa, se interpreta como un aumento en la tasa de reducción de los aceptores de electrones terminales, o bien, un aumento en la actividad del PSI.



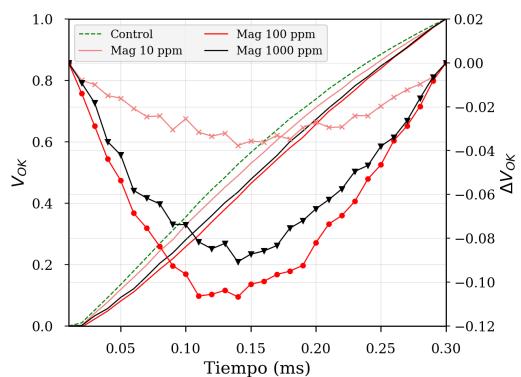
A Transitorios OJIP promedio medidas para el control y las muestras después de 7 días de tratamiento en escala semi-logarítmica.



B Fluorescencia variable normalizada en los puntos O y P ($V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$) y diferencia en la media de estos valores en relación al control ($\Delta V_{OP} = V_{OP,muestra} - V_{OP,control}$) en función del tiempo.



C Fluorescencia variable normalizada en los puntos O y J ($V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$) y diferencia en la media de estos valores en relación al control ($\Delta V_{OJ} = V_{OJ,muestra} - V_{OJ,control}$) en función del tiempo.



D Fluorescencia variable normalizada en los puntos O y K ($V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$) y diferencia en la media de estos valores en relación al control ($\Delta V_{OK} = V_{OK,muestra} - V_{OK,control}$) en función del tiempo.

FIGURA 6.10: Transientes de fluorescencia experimentales, fluorescencia variable normalizada y diferencias respecto al control en función del tiempo. Las curvas representan el promedio de 10 a 20 mediciones (obtenidas de tres plantas por tratamiento).

De forma similar a ΔV_{OP} se pueden calcular ΔV_{OJ} a partir de normalizar en O y J (V_{OJ}), y ΔV_{OK} a partir de normalizar en O y K (V_{OK}), que se presentan en las Fig. 6.10 D y Fig. 6.10 C, respectivamente. Las curvas ΔV_{OJ} mostraron la aparición de un pico K negativo ubicado a 0.3 ms, y en ΔV_{OK} un pico L a 120 μ s también negativo, dependiente de la concentraciones de magnetita utilizadas.

Un pico K positivo se ha asociado generalmente con estrés por calor[107], pero también se ha informado bajo estrés debido a deficiencia de nutrientes[109] y sequía[110], e incluso en plantas en ambientes naturales no estresadas[111]. La aparición de un pico K positivo es un fenómeno que se puede observar tanto cuando hay una inactivación del

complejo que desarrolla oxígeno (OEC), un aumento del tamaño de la antena funcional del PSII o un cambio en el estado redox del *pool* de plastoquinonas (PQ)[112, 113]. Sin embargo, el daño de OEC también se puede diagnosticar a partir de la relación F_K/F_J , que indica el grado de inactivación del lado donante del PSII[111]. Por otro lado, los centros OEC (complejos que generan oxígeno) representan la fracción activa de los centros de los complejos que generan oxígeno y se pueden calcular mediante la fórmula $OEC_{centros} = [1 - V_K/V_J]_{tratamiento}/[1 - (V_K/V_J)_{control}]$. En este caso se observó una banda ΔV_{OK} negativa, una disminución en F_K/F_J , y un aumento en los centros OEC (Tabla 6.5). Estos cambios indican que el OEC de la muestra participa más en la donación de electrones al PSII que el control, ya sea porque hay una mayor fracción de ellos activados o hay una mayor cantidad total de los mismos[107, 114].

De manera similar, la banda L que aparece típicamente en 0.12 - 0.15 ms, es un indicador de la conectividad energética o agrupamiento de las unidades PSII, siendo mayor cuando la conectividad o probabilidad de agrupamiento es menor[108, 115, 116]. Según Strasser y cols., la baja conectividad da como resultado un consumo menos eficiente de la energía de excitación[116]. Una conclusión es que la agrupación de unidades fotosintéticas y, por tanto, los movimientos de energía de excitación en estas agrupaciones aumenta la estabilidad de las unidades fotosintéticas y por tanto la resistencia al estrés. Mientras que la desagrupación de las unidades fotosintéticas, probada por la pérdida de sigmoididad de la cinética de fluorescencia entre F_0 y F_K a $300 \mu s$ (pico L positivo), aumenta la sensibilidad al estrés[108, 115]. La banda L aquí observada fue negativa, por lo que el agrupamiento de unidades fotosintéticas es más probable en las hojas tratadas con nanopartículas de magnetita respecto al control.

Las curvas de fluorescencia variable relativa y el cálculo de su diferencia respecto al control permitió diferenciar el comportamiento de las muestras y el control, y asimismo proponer algunas hipótesis acerca de las causas fisiológicas y bioquímicas que pudieron generar estos cambios. Sin embargo, dada la variedad de posibilidades para cada una, se deben analizar los parámetros específicos asociados a cada etapa de la captación de luz y transporte electrónico fotosintético a fin de reducir estas posibilidades y en el mejor de los casos, encontrar una única hipótesis que justifique todos las variaciones observadas. En

ese sentido, aplicando el modelo propuesto inicialmente por Duysens y Sweers en 1963, es posible calcular las eficiencias y rendimientos relaciones a los flujos de energía de cada etapa del transporte electrónico para los diferentes tratamientos. Los resultados se presentan en la [Fig. 6.11](#) y la [Tabla 6.5](#).

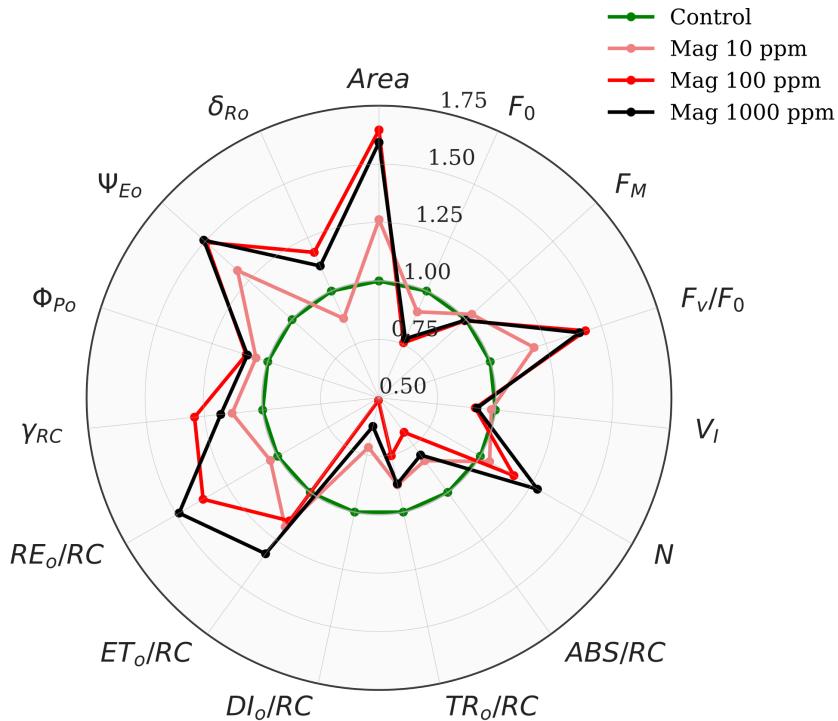


FIGURA 6.11: Gráfico de distribución radial de parámetros OJIP seleccionados para hojas tratadas con diferentes concentraciones de magnetita. Para cada parámetro, el valor del control se estableció como 1.

En cuanto a los rendimientos y eficiencias en el transporte electrónico, las hojas tratadas con nanopartículas de magnetita mostraron valores más altos para todos ellos. Se observó un aumento del +10 % en el rendimiento fotoquímico primario máximo (Φ_{Po}), del +71 % en el rendimiento cuántico del flujo de transporte de electrones de Q_A a Q_B (Φ_{ET_0}), del +57 % en la probabilidad con la que un electrón atrapado en PSII se transfiere de Q_A a Q_B (Ψ_{ET_0}), del +18 % en la probabilidad con la que se transfiera un electrón de Q_B hasta los aceptores de PSI (δ_{RE}), del +97 % en la probabilidad con la que se transfiera un electrón atrapado en PSII hasta los aceptores de PSI (Φ_{RE_0}) y del +80 % en el rendimiento cuántico del flujo de transporte de electrones hasta los aceptores de electrones del PSI (Ψ_{RE_0}). Si bien todos los rendimientos y probabilidades aumentan, se puede observar que los cambios son diferenciados entre las diferentes etapas. El aumento observado para el

TABLA 6.5: Parámetros derivados de la curva OJIP. Los valores entre los diferentes tratamientos marcados por la misma letra (a - d) no fueron significativamente diferentes en $p < 0.01$.

Parámetro	Control	Mag 10 ppm	Mag 100 ppm	Mag 1000 ppm
F_0	574 ± 90 a	592 ± 37 a	470 ± 25 b	379 ± 63 b
F_M	1990 ± 172 a	2039 ± 117 a	2001 ± 76 a	1614 ± 318 b
F_J	1605 ± 104 a	1558 ± 94 a	1422 ± 87 b	1277 ± 194 b
F_I	1863 ± 135	1899 ± 109	1732 ± 64	1569 ± 271
F_V/F_M	0.71 ± 0.05 a	0.73 ± 0.02 a	0.77 ± 0.01 b	0.77 ± 0.02 b
F_V/F_0	2.5 ± 0.5 a	2.7 ± 0.2 a	3.4 ± 0.3 b	3.4 ± 0.4 b
V_K	0.42 ± 0.08 a	0.35 ± 0.03 a	0.27 ± 0.03 b	0.31 ± 0.06 b
V_J	0.72 ± 0.07 a	0.66 ± 0.03 a	0.62 ± 0.05 b	0.63 ± 0.07 b
V_I	0.90 ± 0.02 a	0.897 ± 0.01 a	0.82 ± 0.01 b	0.83 ± 0.02 b
M_o	1.42 ± 0.28 a	1.16 ± 0.10 a	0.88 ± 0.11 b	1.0 ± 0.2 b
Área	$(2.7 \pm 0.6) \cdot 10^4$ a	$(3.2 \pm 0.3) \cdot 10^4$ a	$(4.4 \pm 0.3) \cdot 10^4$ b	$(3.7 \pm 0.1) \cdot 10^4$ b
S_M	18 ± 2 a	21 ± 1 a	28 ± 1 b	26 ± 3 b
N	35 ± 4 a	37 ± 3 a	40 ± 3 b	41 ± 3 b
OEC centros	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2
ABS/RC	2.8 ± 0.4 a	2.4 ± 0.1 a	1.8 ± 0.1 b	2.1 ± 0.3 a
DI_o/RC	0.8 ± 0.2 a	0.66 ± 0.09 a	0.42 ± 0.05 b	0.49 ± 0.12 b
TR_o/RC	1.9 ± 0.2 a	1.74 ± 0.08 a	1.4 ± 0.1 b	1.6 ± 0.2 a
ET_o/RC	0.5 ± 0.1 a	0.59 ± 0.04 b	0.54 ± 0.08 a	0.6 ± 0.1 b
RE_o/RC	0.19 ± 0.03 a	0.20 ± 0.01 a	0.25 ± 0.02 b	0.26 ± 0.03 b
Φ_{P_0}	0.71 ± 0.05 a	0.73 ± 0.02 a	0.77 ± 0.01 b	0.77 ± 0.02 b
Ψ_{ET_0}	0.28 ± 0.07 a	0.35 ± 0.03 a	0.38 ± 0.05 b	0.37 ± 0.07 b
Φ_{ET_0}	0.20 ± 0.06 a	0.25 ± 0.02 a	0.29 ± 0.04 b	0.29 ± 0.06 b
δ_{RE}	0.39 ± 0.09 a	0.33 ± 0.03 a	0.48 ± 0.06 b	0.46 ± 0.06 b
Φ_{RE_0}	0.07 ± 0.01 a	0.08 ± 0.01 a	0.14 ± 0.01 b	0.13 ± 0.02 b
γ_{RC}	0.27 ± 0.03 a	0.29 ± 0.01 a	0.35 ± 0.02 b	0.32 ± 0.03 a
PI_{ABS}	0.4 ± 0.2 a	0.6 ± 0.1 a	1.1 ± 0.3 b	1.0 ± 0.4 b
PI_{ABS}^{total}	0.2 ± 0.1 a	0.30 ± 0.08 a	1.0 ± 0.2 b	0.9 ± 0.4 c

atrapamiento de energía es del 10 %, mientras que el aumento en la transferencia de electrones de Q_A a Q_B es del 57 % y luego el aumento de la transferencia desde Q_B hasta los aceptores del PSI aumenta un 18 %. El mayor cambio resultó entonces en la transferencia de electrones desde Q_A a Q_B y corresponde al punto de inflexión J donde se observa un

mínimo local en las curvas V_{OP} de la Fig. 6.10 B. Además, el aumento en δ_{RE} es consistente con el aumento de actividad del PSI la cual fue una hipótesis planteada tras observarse una banda negativa en ΔV_{OI} a 30 ms.

Respecto a la separación de carga primaria y al rendimiento de dicha separación, se observó una disminución de hasta el -32 % en el flujo de absorción por centro de reacción del PSII activo (RC) (ABS/RC), del -25 % en el flujo de energía atrapado por RC (TR_0/RC) y del -49 % en el flujo de energía de excitación disipada (DI_0/RC), tal como se distingue en la Fig. 6.11. Por otro lado, se observó un aumento del +28 % en el flujo del transporte de electrones entre Q_A y Q_B por RC (ET_0/RC) y del +44 % en RE_0/RC correspondiente al flujo de transporte de electrones hasta los aceptores del PSI por RC activo del PSII. ABS/RC representa la absorción total de los pigmentos de la antena del PSII por RC activo. Dado que por la extracción directa de pigmentos se sabe que el contenido de pigmentos aumenta en las muestras respecto al control, el flujo de fotones absorbidos (ABS) también debe aumentar. Por ende, para que el cociente ABS/RC disminuya, el aumento en ABS debe ser compensado con un aumento de mayor magnitud en los RC activos (denominador). También es posible que las partículas reduzcan la intensidad de luz incidente mediante absorción o dispersión, y por ende, este *quenching* produzca una reducción en el flujo de fotones que llegan a las antenas y por ende también una disminución en el flujo absorbido. Dada la limitación del modelo utilizado para interpretar la curva OJIP, no es posible distinguir entre estas dos posibilidades solo con estos parámetros. Como las nanopartículas pueden absorber tanto el flujo de fotones incidente como el emitido por fluorescencia, es razonable observar una disminución de DI_0/RC que sea aún mayor que la disminución en la energía atrapada por RC (TR_0/RC), ya que la primera depende doblemente del efecto de filtro de las nanopartículas. Esto se refleja también en el cociente TR_0/ABS que corresponde a Φ_{P_0} , el cual aumentó un 10 %. Por ende, a pesar de que ambos flujos TR_0 y ABS disminuyen, la disminución en ABS es más intensa que en TR_0 . Estos cambios sugieren que una mayor proporción de energía es atrapada por los RC del PSII y una menor se disipa, a expensas de una menor absorción total. Estas variaciones también pueden explicarse suponiendo que la variación en ABS/RC es debida a un fuerte aumento en los RC activos, ya que a mayor disponibilidad de RC activos, mayor será la proporción de energía que pueda atraparse en ellos.

A pesar de la disminución en los flujos de absorción y atrapamiento, los flujos de transporte electrónico ET_0/RC y RE_0/RC aumentan significativamente (Fig. 6.11). Esto no se puede explicar con un fenómeno de filtro de luz por parte de las nanopartículas, y corresponde netamente a cambios en las tasas o cantidad de transportadores de electrones intermedios y finales, ya que el cociente ET_0/RE_0 que corresponde a δ_{RE} también aumenta. Es decir, el aumento en los cocientes ET_0/RC y RE_0/RC no se explican únicamente con una disminución en RC , que a su vez entraría en contradicción con una de las hipótesis planteadas más arriba. Los aumentos de estos dos parámetros son muy interesantes ya que TR_0/RC disminuye. Dado que entre estos parámetros el denominador es el mismo, necesariamente significa que el flujo de transporte de electrones de Q_A a Q_B aumentó a pesar de que el flujo de excitones atrapados disminuyó. Esto sugiere que tras el tratamiento con nanopartículas de magnetita aumentó específicamente la transferencia de electrones de Q_A a Q_B , entre otros cambios. Esto también se reflejó en la aparición de una banda ΔV_{OJ} negativa la cual indica un aumento en la conversión de Q_A a Q_A^- . Luego, como el aumento en RE_0/RC es mayor al correspondiente en ET_0/RC , el flujo de transporte de electrones hasta los aceptores del PSI también aumentó de forma independiente al flujo de electrones intermedios correspondiente a ET_0 . El aumento de la actividad del PSI propuesto inicialmente al observarse una banda ΔV_{OI} negativa, también explica el aumento en los flujos y rendimientos asociados al PSI como RE_0/RC , δ_{RE} , Ψ_{RE_0} y Φ_{RE_0} .

Por último, dado que múltiples rendimientos o eficiencias de las diferentes etapas del transporte electrónico aumentan tras el tratamiento con nanopartículas, los índices de rendimiento como PI_{ABS} y PI_{ABS}^{total} que son combinaciones de los parámetros anteriores, también aumentan y en mayor medida que los anteriores. El índice de rendimiento PI_{ABS} cuantifica la conservación de energía de los fotones absorbidos por el PSII hasta la reducción de los aceptores de electrones intermedios entre PSII y PSI, mientras que PI_{ABS}^{total} extiende la conversión de energía hasta los aceptores del PSI. El PI_{ABS}^{total} refleja paso a paso los parámetros de rendimiento biofísico y, por lo tanto, es un representante muy apropiado de la salud general de la unidad fotosintética[117]. El primer término para el cálculo de ambos índices utiliza el parámetro γ_{RC} que representa la probabilidad en la que una clorofila del PSII actúe como RC. Por lo tanto, $\gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC}) = Chl_{RC}/Chl_{antena} = RC/ABS$.

La expresión RC/ABS muestra la contribución al rendimiento total debido al tamaño de la antena del PSII o bien, debido a la densidad RC referida a todas las clorofilas del PSII. La contribución o rendimiento parcial debido a las reacciones de luz para la fotoquímica primaria se estima de acuerdo con el factor $\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})$, la contribución de las reacciones oscuras desde Q_A^- a PC se deriva como $\Psi_{ET_0}/(1 - \Psi_{ET_0})$ y la contribución del PSI reduciendo sus aceptores finales como $\delta_{RE}/(1 - \delta_{RE})$. Tanto en PI_{ABS} como para PI_{ABS}^{total} , todos los componentes aumentan tras el tratamiento. El cociente RC/ABS que representa la densidad de RC activos por absorción de clorofila aumenta tras el tratamiento con nanopartículas. Al igual que el cociente ABS/RC , los cambios pueden interpretarse tanto por un efecto de filtro de luz por parte de las partículas o un aumento en la cantidad de RC activos.

En resumen, a partir de una análisis detallado de las curvas y los parámetros derivados del transiente OJIP se determinaron efectos en distintos puntos de la cadena de transporte electrónico fotosintética. A partir de los parámetros derivados de la absorción y la separación de carga primaria se planteó que uno de los efectos de las partículas es el *quenching* de la luz incidente y de la fluorescencia, produciendo reducciones importantes en los valores de fluorescencia como F_0 y F_M , así como en el flujo de fotones absorbidos por RC activo (ABS/RC). Este último cambio puede también deberse a un aumento en los RC activos. Del análisis de los flujos y rendimientos del transporte electrónico se planteó un aumento en los flujos asociados a la transferencia electrónica desde Q_A hasta los aceptores del PSI. Particularmente, la hipótesis de un posible aumento en la actividad del PSI es consistente con múltiples cambios observados en las bandas ΔV_{OI} y ΔV_{OJ} , y en los parámetros δ_{RE} y RE_0/RC . Todos estos cambios además, se corresponden con el aumento en el número total de electrones transferidos (N) y el área normalizada sobre la curva (S_M).

6.3.6. Fase actínica - Partición de energía

Se registraron las cinéticas de Kautsky para las muestras durante el tratamiento. Como se mencionó en la metodología, se utilizaron dos protocolos de medición, en uno se aplicó una sola luz actínica y en el otro además se registró la fase de recuperación del NPQ. La diferencia radica en la limitación de hojas medibles en un mismo día.

A continuación se resumen en la Fig. 6.12 y Tabla 6.6 los resultados obtenidos tras 7 día de tratamiento con nanopartículas. La fluorescencia inicial, F_0 , disminuyó bajo el tratamiento con nanopartículas a lo largo de los diferentes días de medición al igual que F_M , alcanzando disminuciones del 30 % en F_0 y 7 % en F_M . Dado que la disminución de la fluorescencia en ambos puntos no es la misma, no se puede explicar únicamente con un fenómeno de *quenching*. El cociente F_V/F_M que corresponde al máximo rendimiento cuántico fotoquímico del PSII aumentó conforme aumentó la concentración de nanopartículas de magnetita. Los valores y las variaciones observadas en F_V/F_M son consistentes con los valores y las variaciones obtenidas en Φ_{P0} mediante el transiente OJIP, los cuales son equivalentes. Los resultados de la cinética de Kautsky durante la etapa oscura, en donde todavía no se encendió la luz actínica, se corresponden bien con lo observado mediante el transiente OJIP.

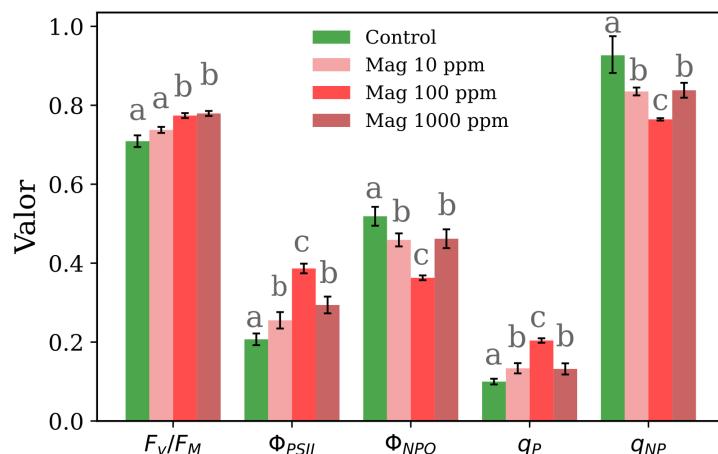


FIGURA 6.12: Parámetros derivados de la cinética de Kautsky bajo iluminación actínica para las muestras y el control. Los valores entre los diferentes tratamientos marcados por la misma letra (a - d) no fueron significativamente diferentes en $p < 0.05$.

Respecto a la partición de energía durante la iluminación actínica, se observó que el rendimiento cuántico del PSII, Φ_{PSII} , aumentó tras el tratamiento con nanopartículas alcanzando un incremento máximo del 89 % a 100 ppm de magnetita. Luego, los rendimientos de desintegración fotofísica, Φ_C , y del *quenching* no fotoquímico, Φ_{NPQ} , disminuyeron con el tratamiento y en menor medida que el aumento de Φ_{PSII} . El valor de Φ_{NPQ} disminuyó hasta un 30 % a 100 ppm de magnetita y Φ_C disminuyó progresivamente con la concentración hasta un 10 % máximo. El aumento del rendimiento cuántico del PSII puede justificarse en base al efecto de filtro de luz de las partículas. El Φ_{PSII} disminuyó con la intensidad

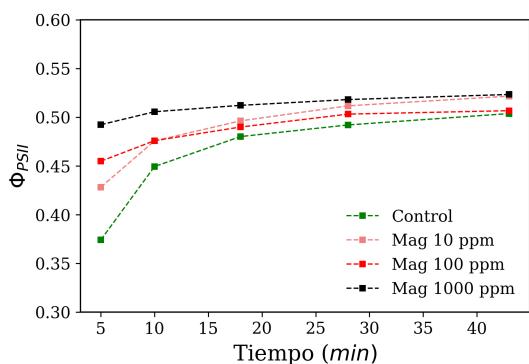
de la luz actínica (detalles en [Subsección 4.3.6](#)), por lo tanto si las partículas absorben una parte importante de la luz incidente, es posible que la intensidad de la luz actínica que realmente alcance a las hojas tratadas con nanopartícula sea de menor intensidad a la aplicada en el control. De esta forma, el mayor Φ_{PSII} se debe a que una menor luz actínica neta que alcanza a los cloroplastos. Cuando mayor es la concentración de nanopartículas, mayor es la reducción de la luz actínica y por ende mayor es el rendimiento cuántico. La disminución en el Φ_{NPQ} se puede explicar de la misma manera. Por otro lado, los carotenoides conforman el ciclo de las xantófilas, el cual es uno de los mecanismos del NPQ. Por ende, una disminución de la composición de los carotenoides totales en las antenas (aumento de Chls/Cars) como la aquí observada conduce a una disminución de los procesos asociados al ciclo de las xantófilas involucrados en el NPQ. Luego, el aumento en q_P y PS_{rate} , así como la disminución de q_{NP} siguen la misma tendencia que Φ_{PSII} y Φ_{NPQ} , respectivamente.

TABLA 6.6: Parámetros derivados de la cinética de Kautsky bajo aclimatación de luz actínica para hojas tratadas con nanopartículas de magnetita y el control durante 5 días luego de la primer exposición. Los valores entre los diferentes tratamientos marcados por la misma letra (a - d) no fueron significativamente diferentes en $p < 0.05$.

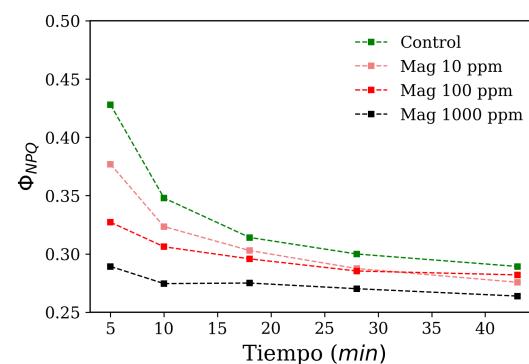
Grupo	Control	Mag 10 ppm	Mag 100 ppm	Mas 1000 ppm
F_0	$279 \pm 52 \text{ a}$	$266 \pm 37 \text{ a}$	$210 \pm 13 \text{ b}$	$198 \pm 20 \text{ b}$
F_M	955 ± 116	1011 ± 110	930 ± 37	893 ± 39
F_V / F_M	$0.71 \pm 0.03 \text{ a}$	$0.74 \pm 0.02 \text{ a}$	$0.77 \pm 0.01 \text{ b}$	$0.78 \pm 0.01 \text{ b}$
Φ_{PSII}	$0.21 \pm 0.03 \text{ a}$	$0.26 \pm 0.04 \text{ ac}$	$0.39 \pm 0.02 \text{ b}$	$0.29 \pm 0.04 \text{ c}$
Φ_C	0.27 ± 0.05	0.29 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.01
Φ_{NPQ}	$0.52 \pm 0.05 \text{ a}$	$0.46 \pm 0.03 \text{ a}$	$0.36 \pm 0.01 \text{ b}$	$0.46 \pm 0.05 \text{ c}$
q_P	$0.10 \pm 0.01 \text{ a}$	$0.13 \pm 0.03 \text{ a}$	$0.20 \pm 0.01 \text{ b}$	$0.13 \pm 0.03 \text{ a}$
q_{NP}	0.93 ± 0.06	0.83 ± 0.02	0.76 ± 0.01	0.84 ± 0.04
PS_{rate}	$39 \pm 6 \text{ a}$	$48 \pm 8 \text{ a}$	$73 \pm 4 \text{ b}$	$55 \pm 9 \text{ c}$

También se registró la dinámica temporal de los rendimiento cuánticos, a modo de dilucidar si hubo cambios cambios en los tiempos de estabilización y aclimatación de las diferentes muestras a la luz actínica de trabajo. Como se puede apreciar en la [Fig. 6.13](#), las hojas de plantas tratadas con 1000 ppm de magnetita solo requieren de 10 minutos

para alcanzar un valor estacionario tanto para Φ_{PSII} como para Φ_{NPQ} . Los controles y las muestras de menor concentración de magnetita, en cambio, requieren de 25 y 20 minutos, respectivamente. El tiempo necesario para alcanzar un valor estacionario en la fluorescencia, F_S , durante la adaptación actínica fue registrado previamente y en el [Capítulo 4](#) se discutió que dicho valor para una luz actínica media, como la aquí utilizada, ronda los 20 minutos. Los tiempos de aclimatación del control y las muestras de 10 y 100 ppm de magnetita, por ende, se encuentran dentro del rango esperado. La diferencia con respecto a la muestra con 1000 ppm no se puede explicar únicamente con un efecto de filtro de la luz incidente, ya que si fuese el caso se debería observar un cambio similar al del control pero donde la curva esté por encima del valor para el control, el cual es el comportamiento durante la aclimatación a una menor luz actínica. Durante la aclimatación actínica, se activan diferentes procesos asociados al NPQ y eventualmente, luego de ≈ 20 minutos, se alcanza un estado estacionario. Si el Φ_{NPQ} de la muestra correspondiente a 1000 ppm de magnetita prácticamente no varía a lo largo de toda la iluminación actínica, esto puede asociarse a una inhibición de los fenómenos del NPQ o bien, a un bloqueo en el transporte electrónico. Este último, no fue detectado por el transiente OJIP por lo que la hipótesis de una inhibición o limitación de los mecanismos del NPQ parece ser más probable. Además, la hipótesis es consistente con la menor proporción de carotenoides (respecto a clorofillas) obtenida por extracción directa en las muestras tratadas con magnetita.



A Rendimiento cuántico del PSII, Φ_{PSII} , en función del tiempo de aclimatación.



B Rendimiento cuántico del quenching no fotoquímico, Φ_{NPQ} , en función del tiempo de aclimatación.

FIGURA 6.13: Rendimientos cuánticos en función del tiempo de aclimatación para el control y las muestras.

6.3.7. Fase actínica - Curvas PSMT

Durante la iluminación actínica en la cinética de Kautsky, se puede observar la disminución de la fluorescencia desde un punto P (máximo) hasta un mínimo en estado estacionario (T) cuya traza temporal se denomina curva PSMT. La Fig. 6.14 muestra los gráficos semilogarítmicos de fluorescencia normalizada en función del tiempo para las muestras con nanopartículas de magnetita y el control a la intensidad de luz actínica (LA) de estudio. En primer lugar, se observó que los trazos de fluorescencia muestran decaimientos monótonos a partir de 10 segundos, lo cual es consistente con lo observado en el Capítulo 4 en donde se discutió que esta zona de la curva está dominada por el *quenching* de transición de estado (q_T) [117, 118]. El rápido decaimiento en PS es una consecuencia del *quenching* fotoquímico (q_P). Bajo luz actínica baja, la saturación de la reserva de plastoquinonas (PQs) ocurre antes de que el q_T sea significativo, lo que se refleja en una meseta o pico M alrededor de los 10 segundos. A mayores LA, la saturación del conjunto de plastoquinonas se desplaza a tiempos menores, q_T se acelera y, por lo tanto, el pico M desaparece.

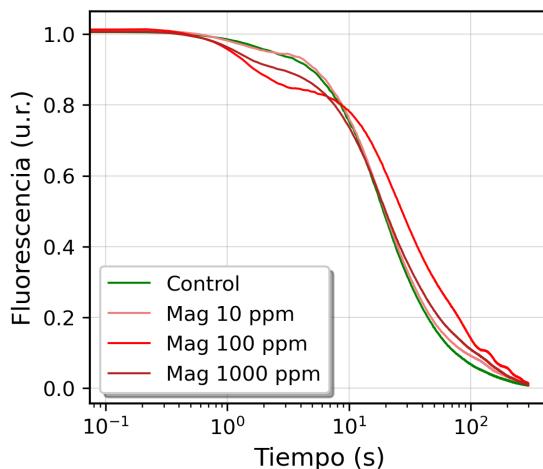


FIGURA 6.14: Curvas PSMT de plantas control y tratadas con nanopartículas de magnetita, bajo iluminación actínica en función del tiempo. La fluorescencia está normalizada a nivel del pico (P) y en el estado estacionario (T). Las intensidad de la luz actínica fueron de $175 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En la Fig. 6.14 se observa que desde el control a 100 ppm de magnetita, la meseta M se hace más evidente, y luego a 1000 ppm se revierte parcialmente. El comportamiento de las dos muestras de mayor concentración de magnetita se asemeja al esperado a bajas LA, donde la activación de q_T ocurre luego de que el conjunto de PQs se reduzca por

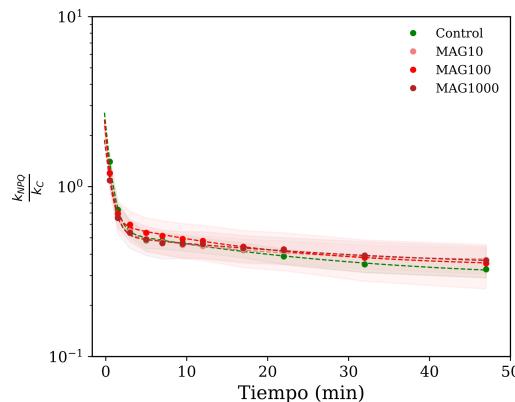
completo. Esta similitud con luces actínicas bajas se asemeja al comportamiento del Φ_{PSII} observado en la cinética de Kautsky, tanto en su magnitud como en su traza temporal respecto al control. Para dilucidar si hay un efecto sobre el tamaño del conjunto de PQs o en q_T se pueden contrastar estos resultados con los de la curva OJIP o la fase de recuperación del NPQ, respectivamente. En la curva OJIP se observó un aumento en los flujos y eficiencias del transporte electrónico desde Q_A hasta los aceptores del PSI y un aumento en el número total de electrones transportados. Dado que el conjunto de plastoquinonas son transportadores de electrones intermedios entre PSII y PSI, un aumento del mismo conduce a un incremento en los flujos, y en el número de electrones transportados. Además, la reducción del conjunto de PQs es el paso limitante de la velocidad del transporte electrónico fotosintético, un aumento del mismo conduce a un aumento proporcional de los electrones transportados y del flujo del proceso en total. Por lo que un incremento en el conjunto de PQs es consistente con los resultados anteriores. Es posible que también se deba al efecto de filtro sobre la luz incidente producto de la absorción y dispersión de las nanopartículas. A mayor concentración de estas, menor es la proporción de luz actínica neta que alcanza efectivamente a las antenas. Por ende, las hojas se comportan como si estuviesen iluminadas por una luz de menor intensidad a la real. Sin embargo, dado que el comportamiento frente a las curvas PSMT no es proporcional a la concentración de partícula, específicamente frente a lo observado para 100 y 1000 ppm de magnetita, este no puede ser el único fenómeno causante de las variaciones observadas. Luego, es posible que también esté retardada la activación del componente q_T del NPQ, es decir su tiempo característico haya disminuido, ya que los mecanismos asociados al *quenching* de transición de estado ocurren más tarde que la saturación de las PQs. Para estimar q_T y su tiempo de vida (τ_T) se debe registrar la recuperación del F_M en la cinética de Kautsky luego de la iluminación actínica. En la siguiente sección se evalúa dicha curva y se estiman los diferentes componentes del NPQ.

6.3.8. Fase de recuperación del NPQ

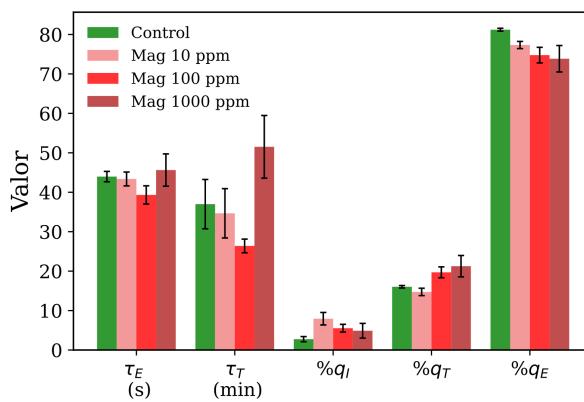
Luego de la etapa de iluminación actínica, es posible registrar la recuperación de la fluorescencia máxima dándose lugar al restablecimiento de los procesos del NPQ. Durante dicha etapa oscura, se aplican pulsos de saturación que permiten estimar la capacidad fotosintética máxima y también, si se cumplen ciertos requisitos experimentales, es posible

estimar la contribución de cada componente del NPQ al rendimiento cuántico del NPQ total. Utilizando el modelo bi-exponencial presentado en el [Capítulo 4](#) se lograron determinar tanto la contribución como los tiempos característicos de los componentes del NPQ a las muestras tratadas con nanopartícula y el control.

En la [Fig. 6.15 A](#) se comparan las curvas de k_{NPQ}/k_C a cada tratamiento. La figura en escala semi-logarítmica revela que el comportamiento no es mono-exponencial. No se observaron diferencias significativas en las curvas k_{NPQ}/k_C de las muestras y el control, aunque la media de las curvas de las muestras caen por encima del control a tiempos largos sugiriendo una leve diferencia en los tiempos de desactivación del NPQ.



A Decaimiento del k_{NPQ}/k_C en función del tiempo en escala semi-logarítmica (eje Y). Las líneas punteadas representan las curvas ajustadas utilizando el modelo bi-exponencial propuesto y las zonas sombreadas representan el error estándar experimental asociado al decaimiento de k_{NPQ}/k_C (no al ajuste).



B Porcentajes de cada componente del NPQ respecto al NPQ total y promedio de los tiempos característicos del *quenching* dependiente de energía (q_E) y del *quenching* de transición de estado (q_T) para las muestras y el control.

FIGURA 6.15: Decaimiento del cociente k_{NPQ}/k_C en función del tiempo y componentes del NPQ obtenidos tras el ajuste bi-exponencial.

Dado el bajo número de muestras que se pudieron medir, los cambios observados en la Fig. 6.15 B no son significativos. Sin embargo, a continuación se discute la tendencia general de los resultados ya que en la mayoría de los tiempos característicos y componentes sufrieron variaciones dependientes de la concentración de nanopartícula. Las magnitudes de cada parámetro se encuentran dentro del rango esperado. En líneas generales, se observó un aumento en la proporción del *quenching* de transición de estado ($\%q_T$) y una disminución en el *quenching* dependiente de energía ($\%q_E$), mientras que el *quenching* inhibitorio ($\%q_I$) permaneció constante para las muestras con nanopartículas respecto el control. Luego, el tiempo característico asociado al q_E (τ_E) permanece constante, mientras que el tiempo de vida del *quenching* de transición de estado (τ_T) disminuye desde el control hasta 100 ppm de magnetita, y luego para 1000 ppm se recupera completamente. La disminución de τ_T así como las diferencias observadas entre 100 y 1000 ppm de magnetita, son coherentes con los cambios observados en la curva PSMT. De esta forma, dado el retardo respecto a la activación de los fenómenos asociados al *quenching* de transición de estado y al aumento en el conjunto de PQs, se observa una meseta M más nítida para las muestras de mayor concentración de magnetita respecto al control en las curvas PSMT.

Los cambios observados en el $\%q_T$ y $\%q_E$, son análogos a los observados tras la aclimatación con baja iluminación correspondiente al Capítulo 4. Es decir, nuevamente los cambios asociados al tratamiento con nanopartículas se asemejan a la aclimatación con baja irradiancia. En las muestras tratadas con altas concentraciones de magnetita, la transición de estado ocurre en mayor medida respecto al NPQ total (aumento de $\%q_T$) y más rápidamente (disminución de τ_T). Las transiciones de estado son procesos de aclimatación a la luz que aumentan o disminuyen el tamaño de las antenas recolectoras de luz que alimentan la excitación a los complejos centrales de PSII y PSI. El *quenching* de transición de estado se ha asociado con la desfosforilación del complejo captador de luz asociado al PSII (LHC-II) que conduce su desprendimiento del fotosistema. Bajo condiciones de alta irradiancia, un monómero externo de la antena se conecta posteriormente al PSI, de modo de equilibrar la excitación de ambos fotosistemas. Por otro lado, el *quenching* dependiente de energía esta asociado con la acidificación del espacio intratilacoide (lumen) cuando la fotofosforilación no puede mantener la misma velocidad que la tasa de la cadena de transporte electrónico (ETC). Por ende, a altas irradiancias, se genera una acidificación

del lumen que conduce la conversión de violaxantina en zeaxantina correspondiente al ciclo de las xantófilas (q_E) y posteriormente desencadena el reordenamiento físico de la antenas (q_T). En las muestras tratadas con magnetita, q_E disminuye mientras q_T aumenta. La disminución de q_E puede estar asociada a un menor contenido de xantófilas (carotenoides) respecto a clorofilas (aumento de Chls/Cars observada por extracción de pigmentos) y al aumento de las antenas, particularmente del LHC-II. Al disminuir la población de carotenoides dentro de las antenas, disminuye la capacidad de desactivar el estado excitado por parte de las mismas el cual corresponde al q_E .

Luego, el aumento de $\%q_T$ puede deberse a una gran cantidad de PQs reducidas. En todos los organismos fotosintéticos oxigenados, la señal química que desencadenan las transiciones de estado es el estado redox del conjunto de PQs involucradas en el transporte de electrones desde PSII a PSI. Es conocido que el PSII reduce la reserva de PQs, mientras que el PSI la oxida[119-121]. Por tanto, existe una regulación antagónica (regulación por retroalimentación) del conjunto de PQs con las actividades fotoquímicas de PSII y PSI. Luego, dado que se observó un aumento en el número de electrones y transportadores de electrones mediante la curva OJIP, y que la mayoría de los portadores de electrones son plastoquinonas (PQs), el incremento en el número de transportadores de electrones se puede interpretar también como un aumento del *pool* de PQs. Además, se observó un aumento en el flujo de electrones desde Q_A hasta los aceptores del PSI, lo que incluye a las PQs. Finalmente, un aumento en la cantidad de PQs reducidas puede provocar un aumento en el *quenching* de transición de estado.

Por último, varios autores han reportado un incremento en la proporción relativa de $\%q_T$ a bajas luces actínicas. Quick y Stitt[122] que estudiaron los factores que contribuyen al NPQ, indicaron que q_T satura a niveles de luz actínica bajos. D'Ambrosio y cols.[123] estimaron los diferentes componentes del NPQ a diferentes luces actínicas y observaron que a intensidades de luz bajas, q_T fue el único componente del NPQ ($\%q_T = 100\%$) y además su valor absoluto (q_T) aumentó a irradiancias más altas. Walters y Horton[124] predijeron que las transiciones de estado saturan a baja iluminación actínica, ya que se ha demostrado en cloroplastos de maíz que el nivel de fosforilación del LHC-II se reduce bajo luz intensa[125]. Considerando entonces un efecto de filtro de la luz actínica por

parte de las nanopartículas de magnetita, es razonable observar un aumento de %_{QT} ya que corresponde con lo esperado a menores luces actínicas. Tanto el incremento en el tamaño del conjunto de PQs así como el efecto de filtro sobre la luz incidente, determinan tanto el aumento en %_{QT} como la presencia de una meseta M en las curvas PSMT a altas concentraciones de nanopartículas de magnetita.

6.4. Conclusiones

En resumen, el tratamiento con nanopartículas de magnetita mejoró los parámetros fotosintéticos y el contenido de pigmentos en plantas de Achicoria. Se observó en múltiples parámetros que los cambios positivos alcanzaron un máximo a 100 ppm de magnetita, mientras que a 1000 ppm se deterioraron. Esto se reflejó en el cociente de Chl *a/b*, en varios rendimientos y eficiencias obtenidos a partir de la curva OJIP (*ABS/RC*, δ_{RE} y el área) y en el Φ_{PSII} en la cinética de Kautsky. Si bien los valores para el tratamiento con 1000 ppm no fueron menores al control, es decir, se encontraban entre los valores obtenidos para 10 y 100 ppm de magnetita, es indicio de un posible efecto negativo. También es factible que a esa concentración elevada de partículas, se haya saturado el transporte de las partículas en las hojas, o bien, las partículas se aglomeran antes de ingresar a las hojas por su alta concentración, reduciendo así la cantidad de material que se incorporó efectivamente a la hojas.

Si bien no hay información previa sobre el efecto de estas nanopartículas en la actividad fotosintética, sí se han reportado variaciones en el contenido de pigmentos. En el rango de concentraciones aquí estudiadas, Tombuloglu y cols.[20] observó también un aumento en el contenido de clorofilas en cebada hasta una concentración de 250 ppm de nanopartículas, que luego disminuye a 1000 ppm. Por lo que concentraciones más altas de ~ 100 ppm de magnetita, limitarían la potenciación de los efectos positivos sin efectos tóxicos, aunque todavía los parámetros obtenidos fueran más altos a 1000 ppm que para el control.

Respecto al posible mecanismo de acción de las nanopartículas de magnetita, como se comentó en la introducción, el hierro es un nutriente esencial que participa en muchos procesos fisiológicos, incluida la biosíntesis de clorofila, la respiración y las reacciones re-

dox[33, 34, 36]. Particularmente la deficiencia de hierro, la cual está bien documentada, reduce el contenido de pigmentos hasta el punto de producir clorosis (hojas amarillas por falta de pigmentos) y además afectaría más al PSI que al PSII[37]. Esto puede deberse a la gran cantidad de cofactores Fe-S y aceptores de proteína de Fe-S asociados al PSI, tal como puede verse en el esquema Z de la Fig. 2.3 del Capítulo 2. Por lo tanto, es razonable que frente a las nanopartículas de magnetita que contienen hierro, se haya observado un incremento de la actividad del PSI por encima del PSII. Esto se reflejó en las variaciones observadas en los cocientes Chl *a/b* y $F_{red}/F_{far-red}$, y en los parámetros de la curva OJIP asociados al PSI como δ_{RE} . Si bien el aumento en la actividad del PSI fue mayor al correspondiente al PSII, ambos fotosistemas y toda la cadena de transporte electrónico aumentó su actividad, evidenciándose en el aumento en el número de electrones transportados por la cadena.

Cabe resaltar, que dado que Fe^{2+} es la forma de hierro que las plantas pueden utilizar, se deben usar nanopartículas que contengan este ión si se planea utilizar nanopartículas de hierro como fertilizantes. Varios de los efectos negativos reportados sobre la aplicación de nanopartículas de óxido de hierro en plantas son causadas por nanopartículas de Fe_2O_3 [22, 28, 126]. De esta forma, fue acertada la elección del material de partida ya que el óxido ferroso no es un óxido estable en general, mientras que el óxido mixto Fe_3O_4 y por ende las nanopartículas de este material, sí lo son[8, 45, 127].

La mejora en los parámetros fotosintéticos de las plantas con la concentración de magnetita indicó que el hierro en la forma nanométrica también puede desencadenar efectos de manera positiva. Estos hallazgos en combinación con los previamente reportados sobre la inexistencia de estrés oxidativo o daños fisiológicos producto de estas nanopartículas, posibilita el uso de nanopartículas de magnetita como suplemento de hierro en las plantas.

Referencias

- (1) Gogos, A.; Knauer, K. y Bucheli, T. D. *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60*, 9781-9792, DOI: [10.1021/jf302154y](https://doi.org/10.1021/jf302154y).

- (2) Du, W.; Tan, W.; Peralta-Videa, J. R.; Gardea-Torresdey, J. L.; Ji, R.; Yin, Y. y Guo, H. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *110*, 210-225, DOI: [10.1016/j.plaphy.2016.04.024](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.024).
- (3) Rui, M.; Ma, C.; Hao, Y.; Guo, J.; Rui, Y.; Tang, X.; Zhao, Q.; Fan, X.; Zhang, Z.; Hou, T. y Zhu, S. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, DOI: [10.3389/fpls.2016.00815](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00815).
- (4) Monica, R. C. y Cremonini, R. *Caryologia* **2009**, *62*, 161-165, DOI: [10.1080/00087114.2004.10589681](https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589681).
- (5) Tripathi, D. K.; Singh, S.; Singh, S.; Pandey, R.; Singh, V. P.; Sharma, N. C.; Prasad, S. M.; Dubey, N. K.; Chauhan, D. K. y col. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *110*, 2-12, DOI: [10.1016/j.plaphy.2016.07.030](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030).
- (6) Singh, S.; Vishwakarma, K.; Singh, S.; Sharma, S.; Dubey, N. K.; Singh, V. K.; Liu, S.; Tripathi, D. K. y Chauhan, D. K. *Plant Gene* **2017**, *11*, 265-272, DOI: [10.1016/j.plgene.2017.03.006](https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.03.006).
- (7) Shweta, .; Tripathi, D. K.; Singh, S.; Singh, S.; Dubey, N. K. y Chauhan, D. K. *Materials Focus* **2016**, *5*, 405-411, DOI: [10.1166/mat.2016.1327](https://doi.org/10.1166/mat.2016.1327).
- (8) Zia-ur-Rehman, M.; Naeem, A.; Khalid, H.; Rizwan, M.; Ali, S. y Azhar, M. en *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*; Elsevier: 2018, págs. 221-238, DOI: [10.1016/b978-0-12-811487-2.00010-4](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811487-2.00010-4).
- (9) Radoń, A.; Drygała, A.; Hawełek, Ł. y Łukowiec, D. *Mater. Charact.* **2017**, *131*, 148-156, DOI: [10.1016/j.matchar.2017.06.034](https://doi.org/10.1016/j.matchar.2017.06.034).
- (10) Rani, S. y Varma, G. *Physica B: Condensed Matter* **2015**, *472*, 66-77, DOI: [10.1016/j.physb.2015.05.016](https://doi.org/10.1016/j.physb.2015.05.016).
- (11) Kah, M.; Kookana, R. S.; Gogos, A. y Bucheli, T. D. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13*, 677-684, DOI: [10.1038/s41565-018-0131-1](https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1).
- (12) Kopittke, P. M.; Lombi, E.; Wang, P.; Schjoerring, J. K. y Husted, S. *Environ. Sci.: Nano* **2019**, *6*, 3513-3524, DOI: [10.1039/c9en00971j](https://doi.org/10.1039/c9en00971j).
- (13) Atar, N.; Eren, T.; Yola, M. L.; Karimi-Maleh, H. y Demirdögen, B. *RSC Advances* **2015**, *5*, 26402-26409, DOI: [10.1039/c5ra03735b](https://doi.org/10.1039/c5ra03735b).
- (14) Kaviani, B.; Negahdar, N.; Ghaziani, M. V. F. y col. *Willd Scientific Papers. Series B. Horticulture* **2014**, *58*, 337-342.

- (15) Li, R.; Jin, X.; Megharaj, M.; Naidu, R. y Chen, Z. *Chem. Eng. J.* **2015**, *264*, 587-594, DOI: [10.1016/j.cej.2014.11.128](https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.11.128).
- (16) Zhao, Y. S.; Sun, C.; Sun, J. Q. y Zhou, R. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *142*, 182-188, DOI: [10.1016/j.seppur.2014.12.035](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.12.035).
- (17) Ghafari, H.; Razmjoo, J. y col. *International Journal of Agronomy and plant production* **2013**, *4*, 2997-3003.
- (18) Elanchezhian, R.; Kumar, D.; Ramesh, K.; Biswas, A. K.; Guhey, A. y Patra, A. K. *J. Plant Nutr.* **2017**, *40*, 1969-1977, DOI: [10.1080/01904167.2016.1270320](https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1270320).
- (19) Raliya, R.; Saharan, V.; Dimkpa, C. y Biswas, P. *J. Agric. Food. Chem.* **2017**, *66*, 6487-6503, DOI: [10.1021/acs.jafc.7b02178](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02178).
- (20) Tombuloglu, H.; Slimani, Y.; Tombuloglu, G.; Almessiere, M. y Baykal, A. *Chemosphere* **2019**, *226*, 110-122, DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.03.075](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.075).
- (21) Wang, W. N.; Tarafdar, J. C. y Biswas, P. *J. Nanopart. Res.* **2013**, *15*, 1-13, DOI: [10.1007/s11051-013-1417-8](https://doi.org/10.1007/s11051-013-1417-8).
- (22) Li, J.; Chang, P. R.; Huang, J.; Wang, Y.; Yuan, H. y Ren, H. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 5561-5567, DOI: [10.1166/jnn.2013.7533](https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7533).
- (23) Feng, Y.; Cui, X.; He, S.; Dong, G.; Chen, M.; Wang, J. y Lin, X. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 9496-9504, DOI: [10.1021/es402109n](https://doi.org/10.1021/es402109n).
- (24) Ghafariyan, M. H.; Malakouti, M. J.; Dadpour, M. R.; Stroeve, P. y Mahmoudi, M. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *130906140819003*, DOI: [10.1021/es402249b](https://doi.org/10.1021/es402249b).
- (25) Alidoust, D. e Isoda, A. *Acta Physiol. Plant.* **2013**, *35*, 3365-3375, DOI: [10.1007/s11738-013-1369-8](https://doi.org/10.1007/s11738-013-1369-8).
- (26) Alidoust, D. e Isoda, A. *Environ. Earth Sci.* **2013**, *71*, 5173-5182, DOI: [10.1007/s12665-013-2920-z](https://doi.org/10.1007/s12665-013-2920-z).
- (27) Giordani, T.; Fabrizi, A.; Guidi, L.; Natali, L.; Giunti, G.; Ravasi, F.; Cavallini, A. y Pardossi, A. *EQA-International J. Environ. Qual.* **2012**, *8*, 27-38, DOI: [10.6092/issn.2281-4485/3748](https://doi.org/10.6092/issn.2281-4485/3748).
- (28) Li, J.; Hu, J.; Ma, C.; Wang, Y.; Wu, C.; Huang, J. y Xing, B. *Chemosphere* **2016**, *159*, 326-334, DOI: [10.1016/j.chemosphere.2016.05.083](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.083).

- (29) Yan, L.; Li, P.; Zhao, X.; Ji, R. y Zhao, L. *Sci. Total Environ.* **2020**, *718*, 137400, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.137400](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137400).
- (30) Zhu, H.; Han, J.; Xiao, J. Q. y Jin, Y. *J. Environ. Monit.* **2008**, *10*, 713, DOI: [10.1039/b805998e](https://doi.org/10.1039/b805998e).
- (31) Zuo, Y. y Zhang, F. *Plant Soil* **2010**, *339*, 83-95, DOI: [10.1007/s11104-010-0566-0](https://doi.org/10.1007/s11104-010-0566-0).
- (32) Sánchez-Alcalá, I.; del Campillo, M. d. C.; Barrón, V. y Torrent, J. *J. Plant Nutr. and Soil Science* **2013**, *177*, 150-158, DOI: [10.1002/jpln.201200302](https://doi.org/10.1002/jpln.201200302).
- (33) Mimmo, T.; Buono, D. D.; Terzano, R.; Tomasi, N.; Vigani, G.; Crecchio, C.; Pinton, R.; Zocchi, G. y Cesco, S. *Eur. J. Soil Sci.* **2014**, *65*, 629-642, DOI: [10.1111/ejss.12158](https://doi.org/10.1111/ejss.12158).
- (34) Ye, L.; Li, L.; Wang, L.; Wang, S.; Li, S.; Du, J.; Zhang, S. y Shou, H. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, DOI: [10.3389/fpls.2015.00953](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00953).
- (35) Kobayashi, T. y Nishizawa, N. K. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2012**, *63*, 131-152, DOI: [10.1146/annurev-arplant-042811-105522](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105522).
- (36) Zargar, S. M.; Agrawal, G. K.; Rakwal, R. y Fukao, Y. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, DOI: [10.3389/fpls.2015.00592](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00592).
- (37) Abadiéa, J. *J. Plant Nutr.* **1992**, *15*, 1699-1713, DOI: [10.1080/01904169209364432](https://doi.org/10.1080/01904169209364432).
- (38) Terry, N. y Abadia, J. *J. Plant Nutr.* **1986**, *9*, 609-646, DOI: [10.1080/01904168609363470](https://doi.org/10.1080/01904168609363470).
- (39) Guerinot, M. L. y Yi, Y. *Plant Physiol.* **1994**, *104*, 815-820, DOI: [10.1104/pp.104.3.815](https://doi.org/10.1104/pp.104.3.815).
- (40) Li, X.; Gui, X.; Rui, Y.; Ji, W.; Nhan, L. V.; Yu, Z. y Peng, S. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *274*, 173-180, DOI: [10.1016/j.jhazmat.2014.04.025](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.025).
- (41) Suh, H.-J.; Kim, C. S.; Lee, J.-Y. y Jung, J. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *75*, 513-518, DOI: [10.1562/0031-8655\(2002\)0750513peoieo2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750513peoieo2.0.co2).
- (42) Gupta, A. K. y Gupta, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021, DOI: [10.1016/j.biomaterials.2004.10.012](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012).
- (43) Mamani, J. B.; Gamarra, L. F. y de Souza Brito, G. E. *Mater. Res.* **2014**, *17*, 542-549, DOI: [10.1590/s1516-14392014005000050](https://doi.org/10.1590/s1516-14392014005000050).

- (44) Ren, H.-X.; Liu, L.; Liu, C.; He, S.-Y.; Huang, J.; Li, J.-L.; Zhang, Y.; Huang, X.-J. y Gu, N. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2011**, *7*, 677-684, DOI: [10.1166/jbn.2011.1338](https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1338).
- (45) Majewski, P. y Thierry, B. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2007**, *32*, 203-215, DOI: [10.1080/10408430701776680](https://doi.org/10.1080/10408430701776680).
- (46) Stephen, Z. R.; Kievit, F. M. y Zhang, M. *Mater. Today* **2011**, *14*, 330-338, DOI: [10.1016/s1369-7021\(11\)70163-8](https://doi.org/10.1016/s1369-7021(11)70163-8).
- (47) Wallyn; Anton y Vandamme *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 601, DOI: [10.3390/pharmaceutics11110601](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110601).
- (48) Revia, R. A. y Zhang, M. *Mater. Today* **2016**, *19*, 157-168, DOI: [10.1016/j.mattod.2015.08.022](https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.08.022).
- (49) Liu, W.; Tian, S.; Zhao, X.; Xie, W.; Gong, Y. y Zhao, D. *Curr. Pollut. Reports* **2015**, *1*, 280-291, DOI: [10.1007/s40726-015-0017-x](https://doi.org/10.1007/s40726-015-0017-x).
- (50) Panda, S. K.; Aggarwal, I.; Kumar, H.; Prasad, L.; Kumar, A.; Sharma, A.; Vo, D.-V. N.; Thuan, D. V. y Mishra, V. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19*, 2487-2525, DOI: [10.1007/s10311-020-01173-9](https://doi.org/10.1007/s10311-020-01173-9).
- (51) Qiao, K.; Tian, W.; Bai, J.; Wang, L.; Zhao, J.; Du, Z. y Gong, X. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2019**, *97*, 227-236, DOI: [10.1016/j.jtice.2019.01.029](https://doi.org/10.1016/j.jtice.2019.01.029).
- (52) Sun, S. y Zeng, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204-8205, DOI: [10.1021/ja026501x](https://doi.org/10.1021/ja026501x).
- (53) Chantrell, R.; Popplewell, J. y Charles, S. *IEEE Trans. Magn.* **1978**, *14*, 975-977, DOI: [10.1109/tmag.1978.1059918](https://doi.org/10.1109/tmag.1978.1059918).
- (54) Knobel, M.; Nunes, W. C.; Socolovsky, L. M.; Biasi, E. D.; Vargas, J. M. y Denardin, J. C. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 2836-2857, DOI: [10.1166/jnn.2008.15348](https://doi.org/10.1166/jnn.2008.15348).
- (55) El-Hilo, M. *J. Appl. Phys.* **2012**, *112*, 103915, DOI: [10.1063/1.4766817](https://doi.org/10.1063/1.4766817).
- (56) Tauc, J.; Grigorovici, R. y Vancu, A. *Phys. Status Solidi B* **1966**, *15*, 627-637, DOI: [10.1002/pssb.19660150224](https://doi.org/10.1002/pssb.19660150224).
- (57) Salem, A. M.; Selim, M. S. y Salem, A. M. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2000**, *34*, 12-17, DOI: [10.1088/0022-3727/34/1/303](https://doi.org/10.1088/0022-3727/34/1/303).
- (58) Davis, E. A. y Mott, N. F. *Philos. Mag.* **1970**, *22*, 0903-0922, DOI: [10.1080/14786437008221061](https://doi.org/10.1080/14786437008221061).

- (59) Lichtenhaler, H. K. y Buschmann, C. *Handbook of Food Analytical Chemistry* **2005**, 2-2, 171-178, DOI: [10.1002/0471709085.ch21](https://doi.org/10.1002/0471709085.ch21).
- (60) Ramos, M. E. y Lagorio, M. G. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, 3, 1063-1066, DOI: [10.1039/b406525e](https://doi.org/10.1039/b406525e).
- (61) Abbas, M.; Takahashi, M. y Kim, C. *J. Nanopart. Res.* **2012**, 15, DOI: [10.1007/s11051-012-1354-y](https://doi.org/10.1007/s11051-012-1354-y).
- (62) Khan, A. *Mater. Lett.* **2008**, 62, 898-902, DOI: [10.1016/j.matlet.2007.07.011](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.07.011).
- (63) Aphesteguy, J.; Kurlyandskaya, G.; de Celis, J.; Safronov, A. y Schegoleva, N. *Mater. Chem. Phys.* **2015**, 161, 243-249, DOI: [10.1016/j.matchemphys.2015.05.044](https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.05.044).
- (64) Jiang, W.; Lai, K.-L.; Hu, H.; Zeng, X.-B.; Lan, F.; Liu, K.-X.; Wu, Y. y Gu, Z.-W. *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 5135-5145, DOI: [10.1007/s11051-011-0495-8](https://doi.org/10.1007/s11051-011-0495-8).
- (65) Zhang, Y.; Yang, Z.; Yin, D.; Liu, Y.; Fei, C.; Xiong, R.; Shi, J. y Yan, G. *J. Magn. Magn. Mater.* **2010**, 322, 3470-3475, DOI: [10.1016/j.jmmm.2010.06.047](https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.06.047).
- (66) Tzitzios, V. K.; Bakandritsos, A.; Georgakilas, V.; Basina, G.; Boukos, N.; Bourlinos, A. B.; Niarchos, D. y Petridis, D. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, 7, 2753-2757, DOI: [10.1166/jnn.2007.605](https://doi.org/10.1166/jnn.2007.605).
- (67) Baselt, D. R.; Lee, G. U.; Natesan, M.; Metzger, S. W.; Sheehan, P. E. y Colton, R. J. *Biosensors and Bioelectronics* **1998**, 13, 731-739, DOI: [10.1016/s0956-5663\(98\)00037-2](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(98)00037-2).
- (68) Cornell, R. M. y Schwertmann, U., *The Iron Oxides*; Wiley: 2003, DOI: [10.1002/3527602097](https://doi.org/10.1002/3527602097).
- (69) Zheng, L.; Su, W.; Qi, Z.; Xu, Y.; Zhou, M. y Xie, Y. *Nanotechnology* **2011**, 22, 485706, DOI: [10.1088/0957-4484/22/48/485706](https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/48/485706).
- (70) Andhariya, N.; Chudasama, B.; Mehta, R. V. y Upadhyay, R. V. *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 3619-3631, DOI: [10.1007/s11051-011-0279-1](https://doi.org/10.1007/s11051-011-0279-1).
- (71) Barreto, A. C. H.; Santiago, V. R.; Mazzetto, S. E.; Denardin, J. C.; Lavién, R.; Mele, G.; Ribeiro, M. E. N. P.; Vieira, I. G. P.; Gonçalves, T.; Ricardo, N. M. P. S. y Fechine, P. B. A. *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 6545-6553, DOI: [10.1007/s11051-011-0559-9](https://doi.org/10.1007/s11051-011-0559-9).

- (72) Mitra, S.; Das, S.; Mandal, K. y Chaudhuri, S. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 275608, DOI: [10.1088/0957-4484/18/27/275608](https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/27/275608).
- (73) Iyengar, S. J.; Joy, M.; Ghosh, C. K.; Dey, S.; Kotnala, R. K. y Ghosh, S. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 64919-64929, DOI: [10.1039/c4ra11283k](https://doi.org/10.1039/c4ra11283k).
- (74) Badertscher, M.; Bühlmann, P. y Pretsch, E., *Structure Determination of Organic Compounds*; Springer Berlin Heidelberg: 2009, DOI: [10.1007/978-3-540-93810-1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-93810-1).
- (75) Zhang, D.; Zhang, X.; Ni, X.; Song, J. y Zheng, H. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2117-2119, DOI: [10.1021/cg060395j](https://doi.org/10.1021/cg060395j).
- (76) Shen, L.; Qiao, Y.; Guo, Y.; Meng, S.; Yang, G.; Wu, M. y Zhao, J. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 1519-1524, DOI: [10.1016/j.ceramint.2013.07.037](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.07.037).
- (77) Rajendran, M.; Pullar, R.; Bhattacharya, A.; Das, D.; Chintalapudi, S. y Majumdar, C. *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *232*, 71-83, DOI: [10.1016/s0304-8853\(01\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s0304-8853(01)00151-2).
- (78) Goya, G. F.; Berquó, T. S.; Fonseca, F. C. y Morales, M. P. *J. Appl. Phys.* **2003**, *94*, 3520-3528, DOI: [10.1063/1.1599959](https://doi.org/10.1063/1.1599959).
- (79) Castellanos-Rubio, I.; Insausti, M.; Garaio, E.; de Muro, I. G.; Plazaola, F.; Rojo, T. y Lezama, L. *Nanoscale* **2014**, *6*, 7542-7552, DOI: [10.1039/c4nr00646a](https://doi.org/10.1039/c4nr00646a).
- (80) Kouotou, P. M.; Kasmi, A. E.; Wu, L.-N.; Waqas, M. y Tian, Z.-Y. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2018**, *93*, 427-435, DOI: [10.1016/j.jtice.2018.08.014](https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.08.014).
- (81) El Ghandoor, H.; Zidan, H.; Khalil, M. M. e Ismail, M. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 5734-5745.
- (82) Bahadur, A.; Saeed, A.; Shoailb, M.; Iqbal, S.; Bashir, M. I.; Waqas, M.; Hussain, M. N. y Abbas, N. *Mater. Chem. Phys.* **2017**, *198*, 229-235, DOI: [10.1016/j.matchemphys.2017.05.061](https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.05.061).
- (83) Kulkarni, S. A.; Sawadh, P.; Palei, P. K. y Kokate, K. K. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 1945-1949, DOI: [10.1016/j.ceramint.2013.07.103](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.07.103).
- (84) Mohanraj, V.; Jayaprakash, R.; Robert, R.; Balavijayalakshmi, J. y Gopi, S. *Mater. Sci. Semicond. Process.* **2016**, *56*, 394-402, DOI: [10.1016/j.mssp.2016.08.014](https://doi.org/10.1016/j.mssp.2016.08.014).

- (85) Manikandan, A.; Vijaya, J. J.; Mary, J. A.; Kennedy, L. J. y Dinesh, A. *J. Ind. Eng. Chem.* **2014**, *20*, 2077-2085, DOI: [10.1016/j.jiec.2013.09.035](https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.09.035).
- (86) Ogholbeyg, A. B.; Kianvash, A.; Hajalilou, A.; Abouzari-Lotf, E. y Zarebkohan, A. *J. Mater. Sci. - Mater. Electron.* **2018**, *29*, 12135-12143, DOI: [10.1007/s10854-018-9321-8](https://doi.org/10.1007/s10854-018-9321-8).
- (87) Barakat, N. A. *M. J. Mater. Sci.* **2012**, *47*, 6237-6245, DOI: [10.1007/s10853-012-6543-7](https://doi.org/10.1007/s10853-012-6543-7).
- (88) Wen, X.; Wang, S.; Ding, Y.; Wang, Z. L. y Yang, S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *109*, 215-220, DOI: [10.1021/jp0461448](https://doi.org/10.1021/jp0461448).
- (89) Lichtenthaler, H. K.; Babani, F.; Navrátil, M. y Buschmann, C. *Photosynth. Res.* **2013**, *117*, 355-366, DOI: [10.1007/s11120-013-9834-1](https://doi.org/10.1007/s11120-013-9834-1).
- (90) Dai, Y.; Shen, Z.; Liu, Y.; Wang, L.; Hannaway, D. y Lu, H. **2009**, *65*, 177-182, DOI: [10.1016/j.envexpbot.2008.12.008](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.008).
- (91) Sarijeva, G.; Knapp, M. y Lichtenthaler, H. K. *J. Plant Physiol.* **2007**, *164*, 950-955, DOI: [10.1016/j.jplph.2006.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.09.002).
- (92) Wang, Y.; Wang, S.; Xu, M.; Xiao, L.; Dai, Z. y Li, J. *Environ. Pollut.* **2019**, *249*, 1011-1018, DOI: [10.1016/j.envpol.2019.03.119](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.119).
- (93) Ding, Y.; Bai, X.; Ye, Z.; Ma, L. y Liang, L. *Sci. Total Environ.* **2019**, *671*, 558-567, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.03.344](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.344).
- (94) Kumar, R. y Silva, L. *LARS Technical Reports* **1973**, *17*.
- (95) Ma, B. L.; Dwyer, L. M.; Costa, C.; Cober, E. R. y Morrison, M. *J. Agron. J.* **2001**, *93*, 1227-1234, DOI: [10.2134/agronj2001.1227](https://doi.org/10.2134/agronj2001.1227).
- (96) Slaton, M. R.; Hunt, E. R. y Smith, W. K. *Am. J. Bot.* **2001**, *88*, 278-284, DOI: [10.2307/2657019](https://doi.org/10.2307/2657019).
- (97) Blackburn, G. A. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 855-867.
- (98) Serrano, L. *Int. J. Remote Sens.* **2008**, *29*, 5265-5274.
- (99) HORLER, D. N. H.; DOCKRAY, M. y BARBER, J. *Int. J. Remote Sens.* **1983**, *4*, 273-288, DOI: [10.1080/01431168308948546](https://doi.org/10.1080/01431168308948546).
- (100) Croft, H. y Chen, J. en *Comprehensive Remote Sensing*; Elsevier: 2018, págs. 117-142, DOI: [10.1016/b978-0-12-409548-9.10547-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.10547-0).

- (101) Yaryura, P.; Cordon, G.; Leon, M.; Kerber, N.; Pucheu, N.; Rubio, G.; Garcíea, A. y Lagorio, M. G. **2009**, *195*, 186-196, DOI: [10.1111/j.1439-037x.2008.00359.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-037x.2008.00359.x).
- (102) Peterson, R. B.; Oja, V. y Laisk, A. *Photosynth. Res.* **2001**, *70*, 185-196.
- (103) Cuba, N. I.; Torres, R.; San Román, E. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol.* **2020**, DOI: [10.1111/php.13273](https://doi.org/10.1111/php.13273).
- (104) Strasser, R. J.; Srivastava, A. y Tsimilli-Michael, M. *Photosynth. Res.* **2004**, *445*-483.
- (105) Chen, S.; Yang, J.; Zhang, M.; Strasser, R. J. y Qiang, S. *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *122*, 126-140, DOI: [10.1016/j.envexpbot.2015.09.011](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.09.011).
- (106) Strasser, R. J.; Srivastava, A. y Tsimilli-Michael, M. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation* **2000**, *445*-483.
- (107) Krüger, G.; Villiers, M. D.; Strauss, A.; de Beer, M.; van Heerden, P.; Maldonado, R. y Strasser, R. S. *Afr. J. Bot.* **2014**, *95*, 85-96, DOI: [10.1016/j.sajb.2014.07.010](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.07.010).
- (108) Yusuf, M. A.; Kumar, D.; Rajwanshi, R.; Strasser, R. J.; Tsimilli-Michael, M.; Govindjee y Sarin, N. B. *BBA - Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1428-1438, DOI: [10.1016/j.bbabiobio.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.bbabiobio.2010.02.002).
- (109) Kalaji, H. M.; Oukarroum, A.; Alexandrov, V.; Kouzmanova, M.; Brestic, M.; Zivcak, M.; Samborska, I. A.; Cetner, M. D.; Allakhverdiev, S. I. y Goltsev, V. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *81*, 16-25.
- (110) Gomes, M. T. G.; da Luz, A. C.; dos Santos, M. R.; do Carmo Pimentel Batitucci, M.; Silva, D. M. y Falqueto, A. R. *Sci. Hortic.* **2012**, *142*, 49-56, DOI: [10.1016/j.scientia.2012.04.026](https://doi.org/10.1016/j.scientia.2012.04.026).
- (111) Srivastava, A.; Guissé, B.; Greppin, H. y Strasser, R. J. **1997**, *1320*, 95-106, DOI: [10.1016/s0005-2728\(97\)00017-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00017-0).
- (112) Kalaji, H. M. y col. *Photosynth. Res.* **2016**, *132*, 13-66, DOI: [10.1007/s11120-016-0318-y](https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y).
- (113) Schansker, G.; Srivastava, A.; Govindjee y Strasser, R. J. *Funct. Plant Biol.* **2003**, *30*, 785, DOI: [10.1071/fp03032](https://doi.org/10.1071/fp03032).
- (114) Ronde, J. D.; Cress, W.; Krüger, G.; Strasser, R. y Staden, J. V. *J. Plant Physiol.* **2004**, *161*, 1211-1224, DOI: [10.1016/j.jplph.2004.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.014).

- (115) BEDNARÍKOVÁ, M.; FOLGAR-CAMEÁN, Y.; KUČEROVÁ, Z.; LAZÁR, D.; ŠPUNDROVÁ, M.; HÁJEK, J. y BARTÁK, M. *Photosynthetica* **2020**, 58, 646-656, DOI: [10.32615/ps.2019.180](https://doi.org/10.32615/ps.2019.180).
- (116) Strasser, R. J.; Tsimilli-Michael, M. y Srivastava, A. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer Netherlands: 2004, págs. 321-362, DOI: [10.1007/978-1-4020-3218-9_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12).
- (117) Papageorgiou, G. C.; Tsimilli-Michael, M. y Stamatakis, K. *Photosynthesis Research* **2007**, 94, 275-290, DOI: [10.1007/s11120-007-9193-x](https://doi.org/10.1007/s11120-007-9193-x).
- (118) Stirbet, A.; Riznichenko, G. Y.; Rubin, A. y col. *Biochemistry (Moscow)* **2014**, 79, 291-323.
- (119) *Photosystem II*; Wydrzynski, T. J., Satoh, K. y Freeman, J. A., eds.; Springer Netherlands: 2005, DOI: [10.1007/1-4020-4254-x](https://doi.org/10.1007/1-4020-4254-x).
- (120) Golbeck, J. H., *Photosystem I: the light-driven plastocyanin: ferredoxin oxidoreductase*; Springer Science & Business Media: 2006; vol. 24, DOI: [10.1007/978-1-4020-4256-0](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4256-0).
- (121) Papageorgiou, G. C. y Govindjee en *Advances in Photosynthesis and Respiration*; Springer Netherlands: 2014, págs. 1-44, DOI: [10.1007/978-94-017-9032-1_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9032-1_1).
- (122) Quick, W. P. y Stitt, M. *BBA - Bioenerg.* **1989**, 977, 287-296, DOI: [10.1016/s0005-2728\(89\)80082-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(89)80082-9).
- (123) D'Ambrosio, N.; Guadagno, C. R. y Santo, A. V. D. en *Photosynthesis. Energy from the Sun*; Springer Netherlands: 2008, págs. 1001-1004, DOI: [10.1007/978-1-4020-6709-9_218](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6709-9_218).
- (124) Walters, R. G. y Horton, P. *Photosynth. Res.* **1991**, 27, 121-133, DOI: [10.1007/bf00033251](https://doi.org/10.1007/bf00033251).
- (125) Fernyhough, P.; Foyer, C. y Horton, P. *FEBS Letters* **1984**, 176, 133-138, DOI: [10.1016/0014-5793\(84\)80927-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80927-8).
- (126) Jeyasubramanian, K.; Thoppey, U. U. G.; Hikku, G. S.; Selvakumar, N.; Subramania, A. y Krishnamoorthy, K. *RSC Advances* **2016**, 6, 15451-15459, DOI: [10.1039/c5ra23425e](https://doi.org/10.1039/c5ra23425e).

- (127) Paterson, E. *Clay Minerals* **1999**, *34*, 209-210, DOI: [10.1180/claymin.1999.034.1.03](https://doi.org/10.1180/claymin.1999.034.1.03).

Nanopartículas de carbono

7.1. Introducción

7.1.1. Antecedentes científicos

Los nanomateriales basados en carbono se consideran los nanomateriales más discutidos y utilizados en esta última década. Las nanopartículas de carbono o *carbon dots* (CD) se clasifican como un tipo notable de nanomateriales carbonosos quasi esféricos desarrollados recientemente, con tamaños inferiores a 10 nm [1, 2]. Aunque no ha pasado mucho tiempo desde el descubrimiento de los CD en 2004, los puntos cuánticos de carbono han sido objeto de numerosos estudios de investigación óptica para su uso en áreas como biomonitoring, detección, fotocatálisis, suministro de fármacos y genes, conversión solar y LED [3]. Gracias a la existencia de numerosos restos carboxílicos en la superficie, los CD tienen una excelente solubilidad en agua y capacidad de funcionalización, como con moléculas poliméricas, orgánicas, inorgánicas y biológicas. Además, los CD se han utilizado en aplicaciones de conversión de energía luminosa [4, 5] porque son buenos donantes y aceptores de electrones [6, 7].

Otras propiedades únicas de los CD, incluida una forma bien definida; pequeñas dimensiones; funcionalidades de superficie armónica y ajustable; y sus procedimientos de síntesis simples, rápidos, económicos y no tóxicos las convierten en una alternativa prometedora a otras nanopartículas, especialmente a los puntos cuánticos basados en metales tóxicos [1]. Además, las propiedades ópticas de los CD reveladas por los espectros de emisión de fluorescencia y absorción ultravioleta-visible (UV/vis) sugieren que los CD tienen una alta capacidad de recolección de luz, que podría usarse para mejorar la eficiencia de la fotosíntesis.

tesis de las plantas [8]. Recientemente se ha demostrado que el uso de nanopartículas en plantas es una metodología prometedora para transferir energía a los centros de reacción fotosintéticos [9, 10], lo que aumentará la absorción de luz. Esto se ha confirmado mediante la aplicación de nanopartículas a base de metales (*quantum dots*)[11, 12] que, sin embargo, presentan un riesgo de toxicidad por metales. Los CD se han considerado como alternativas a los puntos cuánticos metálicos convencionales para superar su toxicidad y preocupaciones ambientales [13].

Se han reportado investigaciones sobre las interacciones de los nanomateriales con las plantas, incluidos los nanomateriales carbonosos (fullerenos, nanotubos, GO (óxido de grafeno), GQD (puntos cuánticos de grafeno), nano-cebollas, nano-cuernos, entre otros [1, 14-18]. Una vez que las nanopartículas se incorporan a las plantas a través de una vía aérea o terrestre, pueden tener un efecto beneficioso o adverso en el crecimiento y la productividad de las plantas. Los resultados cambian una vez que varía la composición, la concentración, el tamaño y el recubrimiento de las nanopartículas [19]. Hasta ahora, la mayoría de los reportes dan cuenta de efectos positivos. De esta forma, se ha demostrado un rendimiento superior de las CD en varios procesos fisiológicos de las plantas, incluido el crecimiento [20], la fotosíntesis [21] y la resistencia al estrés [22]. Además, los tratamientos con CD también han mostrado efectos mejorados de la fijación biológica de nitrógeno [23], entre otros [2]. Por ejemplo, un estudio de Sonkary cols.[24], reveló que las plantas de *Cicer arietinum* tratadas con nano-cebollas de carbono solubles en agua aumentaron su tasa de crecimiento general en comparación con el control. El estudio de transferencia de electrones de plantas de frijol mungo expuestas a CD ha sido estudiado sistemáticamente en detalle por Chandra y colaboradores [10]. Los autores postulan que la propiedad de alta luminiscencia de CD es capaz de promover el proceso de fotosíntesis mediante la transferencia de electrones de CD al cloroplasto de frijol mungo, donde puede actuar como donante de electrones y acelerar la conversión de luz en energía química. Como era de esperar, el papel de CD como potenciador del crecimiento de las plantas se demostró como lo indica el aumento en la altura de las plantas en comparación con las plantas no tratadas.

A pesar de los efectos positivos de las CD sobre el crecimiento y actividad fotosintética de varias plantas de cultivo mencionados anteriormente, también se observó inhibición del

crecimiento y estrés oxidativo [2]. Como ejemplo, después de la exposición a plantas de maíz con CD, se redujo significativamente el peso fresco de las raíces y los brotes de las plantas y se observó daño oxidativo [25]. Del mismo modo, Wang y cols. [26] investigaron sistemáticamente el destino y la fitotoxicidad de los CD usando *Arabidopsis thaliana* (L.). Los CD a más de 125 mg/L redujeron significativamente la elongación de la raíz en comparación con los grupos control. Además, los autores detectaron variaciones en la regulación de genes involucrados en el desarrollo de raíces y brotes. Se observó una respuesta anti-oxidante así como una disminución en enzimas involucradas en la fotosíntesis.

En síntesis, de los estudios mencionados anteriormente, se descubrió que los efectos potenciales de las CD en el crecimiento, desarrollo y actividad fotosintética de las plantas dependen de la concentración. Los CD en la mayoría de los estudios mostraron un efecto positivo en las plantas, incluido su crecimiento y resistencia contra el estrés abiótico y biótico, a menos que se aplicaran en concentraciones más altas. Los CD, en una dosis óptima, pueden promover el crecimiento de las plantas de cultivo acelerando la fotosíntesis y la asimilación de la nutrición en las plantas [1, 2, 14].

7.1.2. Clasificación de CD

CD es un término genérico para varios nanomateriales de carbono. Los CD siempre poseen al menos una dimensión de menos de 10 nm de tamaño y fluorescencia como sus propiedades distintivas. La estructura de los CD consta de grupos basados en carbono sp^2/sp^3 y oxígeno/nitrógeno o agregados poliméricos. Los CD incluyen principalmente GQD (puntos cuánticos de grafeno), CND (nanopuntos de carbono) y PD (puntos de polímeros). Los GQD tienen una o más capas de grafeno y grupos químicos conectados en los bordes. Son anisótropos con dimensiones laterales mayores que su altura. Los CND son siempre esféricos y se dividen en nanopartículas de carbono que no tienen una red cristalina, y puntos cuánticos de carbono (CQD), que tienen una red cristalina obvia. Como resultado, el mecanismo de fotoluminiscencia es muy diferente para los diferentes tipos de CND. Los PD son polímeros agregados o reticulados preparados a partir de polímeros o monómeros lineales [27].

Debido a la diversidad de CD, existen muchos enfoques para fabricarlos, el más común es el corte "de arriba hacia abajo"(*top-down*) de diferentes fuentes de carbono que a menudo forman GQD o CND, y la síntesis "de abajo hacia arriba"(*bottom-up*) a partir de moléculas orgánicas o polímeros y la modificación de la funcionalidad de la superficie, con la que se pueden sintetizar todos los tipos de nanomateriales de carbono anteriormente descriptos.

Mediante los métodos *top-down*, los CD se obtienen cortando y óxidando compuestos de carbono como el polvo de grafito [28], varillas de carbono [29], fibras de carbono [30], nanotubos de carbono [31, 32], negro de carbón ó negro de humo [33] e incluso con hollín de las velas [34]. Estos materiales de carbono poseen una estructura de carbono sp^2 perfecta y carecen de una banda prohibida eficiente para dar fluorescencia. Para hacer que estos tipos de fuentes de carbono sean fotoluminiscentes, su tamaño y química superficial deben modularse cuidadosamente. El método de corte más común utiliza un ácido oxidante concentrado (HNO_3 o una mezcla de H_2SO_4/HNO_3) [35]. En este proceso, los materiales de carbono a granel se cortan en piezas pequeñas y las superficies de las piezas se modifican con grupos basados en oxígeno, que otorga solubilidad en agua. El pequeño producto de carbono resultante se suele clasificar como GQD, CQD o CND.

Los métodos *bottom-up* son rutas eficientes para producir CD fluorescentes a gran escala. Por ejemplo, las moléculas pequeñas y los polímeros pueden sufrir deshidratación y carbonización adicional para formar CND y PD. Las moléculas aplicadas siempre poseen grupos $-OH$, $-COOH$, $-C=O$ y $-NH_2$, que pueden deshidratarse a temperaturas elevadas. Existen muchos enfoques para llevar a cabo los procesos de deshidratación y carbonización, como métodos hidrotermales [36], microondas [27] y combustión [37], pirólisis [38], pirólisis en ácido concentrado [39], carbonización en un microrreactor [40], entre muchos otros métodos [5, 27, 41]. Es difícil controlar estos procesos de formación, lo que da como resultado CD con polidispersidad. Sin embargo, el uso de precursores diseñados puede permitirnos obtener con precisión GQD con el peso molecular y el tamaño deseados.

7.1.3. Motivación

Los puntos de carbono se han convertido en una estrella en ascenso en los nanomateriales basados en carbono debido a su fotoluminiscencia, baja o nula toxicidad, alta solubilidad

en agua, biocompatibilidad y bajo costo [2, 18, 27]. Por lo tanto, los CD son buenos candidatos como material modelo para explorar el impacto de las nanopartículas de carbono en la actividad fotosintética de las plantas.

Asimismo, como el rango de emisión de los CD se superpone parcialmente con las bandas de absorción de la clorofila, es viable que los CD puedan transferir energía al sistema fotosintético y mejorar así su eficiencia. Lo que estaría de acuerdo a lo observado previamente por Chandra y cols. [10] en cloroplastos. Además, la alta solubilidad en agua, el pequeño tamaño y las propiedades anfifílicas de los CD facilitan su penetración en los poros de la pared celular y evitan su agregación o su unión a los polímeros que la forman. Teniendo todas estas propiedades en mente, en este trabajo, nuestro objetivo fue estudiar si el uso de CD puede inducir variaciones en la actividad y eficiencia fotosintética en achicoria, que sirvió como planta modelo y especie agrícola.

7.2. Metodología

7.2.1. Cultivo y crecimiento de plantas

Se compraron en un vivero local unos 14 plantines de Achicoria (*Cichorium intybus*) y se aclimataron por 30-45 días bajo irradiancia continua y riego controlado. La aclimatación se realizó con luces LED con una irradiancia de $300 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 16 horas.

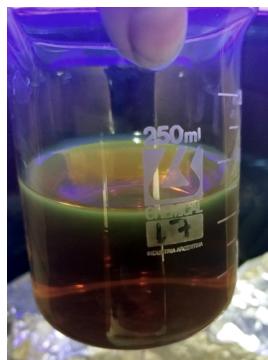
7.2.2. Síntesis de nanopartículas

A partir del negro de humo o *carbon black* comercial de *Full Black S.R.L.*, que posee un diámetro medio de 10-300 nm según el fabricante, se prepararon nanopartículas de carbono fluorescentes por un método de exfoliación ácida. El procedimiento fue optimizado luego de varias pruebas con otros agentes oxidantes y combinación de ácidos fuertes. Se utilizaron como base las síntesis de puntos de carbono (*carbon dots*) reportadas por Hu y cols.[42], Ray y cols.[43] y Ye y cols.[44]. Estos autores utilizaron medios oxidantes dados por H_2O_2 , $\text{H}_2\text{SO}_4(c) + \text{HNO}_3(c)$ y $\text{HNO}_3(c)$, respectivamente, manteniendo a reflujo la mezcla de reacción entre 2 a 8 horas dependiendo del tamaño del material de carbono de partida y de las características del ácido o agente oxidante. Se lograron sintetizar pun-

tos de carbono a partir de negro de humo comercial (nano-CB) utilizando una mezcla de H_2O_2 y H_2SO_4 en reflujo por 3 horas. Primeramente se dispersó 1 g de negro de humo en agua y se sonicó con una sonicador *Testlab* (450 W, 40 kHz) por 30 minutos para desaglomerar las micropartículas y mejorar el mojado de las mismas. Luego, se adicionaron 50 mL una mezcla de H_2O_2 al 30 % y $H_2SO_4(c)$ aproximadamente en relación 3:1. Luego de 3 horas a reflujo a 80 °C, a la mezcla de reacción fría se le adicionó un 10 % en volumen de acetona y se centrifugó a 20.000 RPM por 15 minutos. Como las nanopartículas resultaron ser muy pequeñas, no fue posible precipitarlas a 20.000 RPM a menos que se adicionara algún solvente como acetona o etanol el cual disminuyera su solubilidad en agua. Cabe señalar que la mezcla de reacción resultante no contenía un precipitado negro, es decir, restos de negro de humo utilizado como materia prima. Luego, se descartó el sobrante que contenía principalmente ácido remanente de la reacción, y el precipitado se dispersó en agua y se neutralizó con $NaOH(s)$ hasta pH neutro. Durante este proceso precipitó Na_2SO_4 el cual se filtró en frío a modo de reducir la concentración de esta sal en la dispersión de nanopartículas resultante. Finalmente se volvió a centrifugar la muestra adicionando un poco de acetona para facilitar la precipitación de las nanopartículas obtenidas. El precipitado se volvió a resuspender en agua destilada y se almacenó para su posterior caracterización espectroscópica. Se probó la fluorescencia de las nanopartículas obtenidas tras iluminar bajo iluminación ultravioleta la suspensión concentrada de nanopartículas obtenidas (Fig. 7.1 A). Debido a la alta concentración de nanopartículas, solo se observó fluorescencia de la capa superficial de líquido en contacto directo con la luz incidente de la lámpara. Esta muestra de nanopartículas se denominará a continuación como nano-CB ya que proviene de una muestra comercial de *carbon black*.

Por otro lado, se sintetizaron *quantum dots* de grafeno (GQD) siguiendo el protocolo descripto en el trabajo de Wu y cols.[38] basado en la pirólisis de ácido L-glutámico. Resumidamente, se añadieron 2,0 g de ácido L-glutámico en un vaso de precipitados apropiado y se calentó directamente sobre una manta calefactora a ≈ 210 °C. Durante este proceso, el ácido L-glutámico sólido se fundió y el líquido resultante, inicialmente incoloro, se tornó marrón luego de unos 45 segundos; lo que resultó un indicador de la formación de GQD. Luego se añadieron 15 ml de agua a la solución aún caliente, seguido de agitación durante 10 min. Cuando la solución se enfrió a temperatura ambiente, se centrifugó a 22.000 RPM

durante 30 min. Finalmente se recogió el sobrenadante y se almacenó para su posterior caracterización. De forma análoga a lo realizado con las nano-CB, se ensayó rápidamente su fluorescencia tras iluminar con luz ultravioleta la suspensión de nanopartículas obtenidas tras la síntesis (Fig. 7.1 B), observándose una intensa fluorescencia verde.



A Suspensión concentrada de nano-CB obtenida tras su síntesis bajo iluminación de luz UV.



B Suspensión concentrada de GQD obtenida tras su síntesis bajo iluminación de luz UV.

FIGURA 7.1: Imágenes de las suspensiones resultantes tras las síntesis de las nanopartículas bajo iluminación de una lámpara negra (luz UV-A).

7.2.3. Caracterización de nanopartículas

Ambos sistemas nanoparticulados se caracterizaron de igual manera. Se registraron los espectros UV/vis utilizando un espectofotómetro de doble haz (UV-3600 Plus, Shimadzu, Tokio, Japón). Se midieron sus correspondientes espectros de excitación y emisión a temperatura ambiente en un amplio rango de longitudes de onda de modo de obtener sus matrices de emisión correspondientes. Para ello se utilizó un espectrofluorómetro de estado estacionario (QuantaMaster, PTI-Photon Technology International-Brunswick, EEUU) a un ángulo de 90°. Con este mismo espectrofluorómetro, se midieron los rendimientos cuánticos de las nanopartículas usando como referencia Rodamina 101 en etanol, por triplicado (3 muestras con concentración diferente) a varias longitudes de onda. Los decaimientos y los tiempos de vida de fluorescencia fueron registrados utilizando un espectrómetro de tiempos de vida (PTI TimeMaster), utilizando como fuente de luz pulsada una lámpara de arco de hidrógeno a presión media. Para determinar las propiedades estructurales de las nanopartículas sintetizadas se utilizó un espectrofotómetro FTIR Nicolet 8700, con una resolución de 4 cm^{-1} utilizando un accesorio ATR. Se observó la morfología de las nanopartículas bajo un microscopio electrónico de barrido Zeiss SUPRA 40 (SEM) tras colocar gotas de las muestras sobre piezas de sílice con cinta adhesiva de doble faz.

7.2.4. Aplicación de nanopartículas

Se aplicaron utilizando un rociador dispersiones de nano-CB y GQD en agua destilada con una absorbancia en el máximo de $\approx 0,2$. Las concentraciones resultantes fueron similares, de 1,15 g/L ($\approx 9 \times 10^{18}$ NP/mL para GQD y 2,3 g/L ($\approx 2 \times 10^{19}$ NP/mL) para nano-CB. En la [Subsección 7.3.1](#) se discuten las propiedades ópticas de las mismas. La aplicación se realizó en 4 plantas para cada muestra, únicamente sobre las hojas y se roció un volumen de 25 mL de cada suspensión en cada aplicación. Para las muestras control se roció agua destilada de la misma manera que se hizo con las muestras de nanopartículas. Este procedimiento se repitió 4 veces en 4 semanas y luego se registraron los espectros de fluorescencia de clorofila rápida y la cinética de Kautsky que no requirieron del corte de una hoja (se miden *in vivo*). Posteriormente, se midió la fluorescencia estacionaria y reflectancia de hojas cortadas, y por último se realizó la extracción de pigmentos, ya que se requiere del corte de un número importante de hojas.

7.2.5. Contenido de pigmentos

Se cortaron hojas de cada planta, se lavaron con agua destilada y se eliminaron los nervios centrales y pecíolos. Para cada grupo de muestras se cortaron dos grupos de hojas, por lo que la determinación se realizó por duplicado. Las clorofilas y los carotenoides totales (xantófilas y carotenos) se trajeron con acetona al 80 % utilizando un mortero y luego se centrifugaron durante 3 a 5 minutos a 3000 RPM hasta que el extracto fue completamente translúcido. Se ensayó inmediatamente una dilución adecuada de los extractos resultantes mediante espectrofotometría UV/vis (UV-3600 Plus, Shimadzu, Tokio, Japón). Se utilizaron los coeficientes de absorción específicos de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*) y carotenoides totales (Cars) informados en [Sección 3.3](#), reportados previamente por Lichtenthaler y Buschmann [45]. Se determinaron las relaciones en peso de los pigmentos, Chl *a/b* y Chls/Cars. El contenido de pigmentos se informan en base al área foliar como $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$.

7.2.6. Índices espectrales

Para complementar los resultados y el análisis del contenido de pigmentos de las distintas muestras y controles, y habiendo registrado los espectros de reflectancia de las hojas para

la corrección por reabsorción de los espectros de fluorescencia estacionaria, se calcularon distintos índices espetrales. A partir de las ecuaciones descriptas en la ?? se calcularon los índices NDVI, mNDVI, PRI, $PSND_a$ y $PSND_b$, los cuales estiman el contenido de clorofilas, carotenoides, clorofila a y b, respectivamente.

Los espectros de reflectancia difusa se determinaron para una capa ópticamente gruesa compuesta por varias hojas (4 - 5 hojas) de modo que la transmitancia sea ≈ 0 en toda la región del visible. Para ello se usó un espectrofotómetro (3101PC, Shimadzu, Tokio, Japón) equipado con una esfera integradora, para lo cual se utilizó sulfato de bario para ajustar el 100 % de reflectancia.

7.2.7. Curva de inducción de fluorescencia de clorofila rápida (OJIP)

Las curvas de inducción de fluorescencia de clorofila (OJIP) se registraron con un *Plant Efficiency Analyser* (Handy-PEA, Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido). La curva OJIP se indujo sobre hojas previamente adaptadas a la oscuridad utilizando el clip provisto por el equipo. El protocolo consiste en registrar la fluorescencia durante 1 segundo mientras se ilumina con un pulso de luz saturante de $3000 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se registraron las curvas OJIP para un promedio de 4 a 5 hojas por planta, para cada muestra y control, sumando un total de ≈ 20 -30 mediciones para cada muestra.

Luego se calcularon diferentes parámetros de forma similar a lo indicado en capítulos anteriores. Detalles de los cálculos y definiciones de cada uno de los parámetros se encuentran debidamente descriptos en la [Sección 3.9](#) y en el [Apéndice A](#).

7.2.8. Fluorescencia variable (cinética de Kautsky)

Se registró la fluorescencia de clorofila variable usando un fluorómetro de clorofila de pulso modulado (FMS1, Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido), en hojas que habían sido previamente adaptadas a la oscuridad durante 15 min. El haz de excitación modulada indujo una señal de fluorescencia modulada en condiciones en las que se excluyó la luz ambiental al utilizar el clip provisto por el equipo. El pulso saturante (luz halógena) tuvo una duración de 0,75 s con una intensidad de $2700 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La luz actínica fue proporcionada por una fuente de luz halógena y se utilizaron intensidades de

12, 185 y 627 μmol de fotones $\cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El protocolo experimental corresponde al protocolo descripto en la Fig. 3.8 en el Capítulo 3, el cual consta de tres etapas de iluminación actínica de creciente intensidad. Cada etapa de iluminación tuvo una duración acorde a la necesaria para alcanzar el estado estacionario correspondiente. Este protocolo se repitió en 5 hojas diferentes de cada planta para cada muestra y la duración total del mismo fue de ≈ 65 minutos. Los diferentes tiempos necesarios para la estabilización de las luces actínicas fueron previamente optimizados y depende de la proporción de centros de reacción fotosintéticamente activos a una dada iluminación actínica. Con este protocolo además se registraron las curvas PSMT, que corresponden al decaimiento de la fluorescencia en los primeros minutos tras encender la luz actínica.

7.2.9. Fluorescencia estacionaria de hojas

El registro de la fluorescencia estacionaria se realizó sobre la cara adaxial de las hojas utilizando un espectrofluorómetro de estado estacionario en geometría frontal (Quantamaster, PTI-Photon Technology International-Brunswick, EE.UU.) a temperatura ambiente. Las hojas fueron previamente cortadas, y adaptadas a la oscuridad por 20 minutos. De forma similar a lo reportado en los capítulos anteriores, se registraron los espectros de fluorescencia de una ó más capas de hojas superpuestas o dobladas sobre sí mismas de forma que la transmitancia fuera igual a cero. La longitud de onda de excitación se fijó en 460 nm donde se observó un máximo de emisión. Dichos espectros se registraron entre 600 y 800 nm y se corrigieron mediante la respuesta del detector a cada longitud de onda. Se utilizó una ranura de excitación pequeña de 0,50 mm que corresponde a un intervalo de 2 nm, evitando así la inducción de la cinética de Kautsky. Este procedimiento se realizó para 5 ó 6 hojas por planta y muestra.

Para eliminar la distorsión de la reabsorción de fluorescencia, los espectros de fluorescencia de las hojas intactas se corrigieron mediante una función de corrección en base a medidas de reflectancia difusa de una capa de hojas de acuerdo al modelo usado por Ramos y Lagorio [46]. Los espectros de reflectancia difusa de una capa ópticamente gruesa de hojas se registraron usando un espectrofotómetro (3101PC, Shimadzu, Tokio, Japón) equipado con una esfera integradora. Se utilizó sulfato de bario para un ajuste de reflectancia del

100 %. A partir de estos datos, la función de remisión, una cantidad proporcional a la concentración de cromóforo, se utilizó para obtener el espectro de emisión corregido de los cloroplastos [46, 47]. En la Sección 3.6 se describieron en mayor detalle el modelo y las ecuaciones correspondientes para la corrección por reabsorción de luz en hojas.

7.2.10. Aislamiento de cloroplastos y estudio de transferencia de energía

Con el objetivo de determinar posibles transferencias de energía o carga, en mezclas de nanopartículas y cloroplastos, se llevó a cabo un experimento basado en el protocolo presentado por Chandra y cols. [10], con algunas modificaciones, tal como se indica a continuación.

Aislamiento de cloroplastos

Para el aislamiento de cloroplastos se preparó previamente un *buffer* TRIS-HCl 50 mM (pH = 7,5), sacarosa 0,5 M, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 1 mM. Se cortaron hojas de achicoria, se lavaron y se retiraron los nervios y pecíolos. Se cortaron, usando una tijera, pequeños trozos de las hojas y se colocaron sobre un mortero previamente refrigerado. Luego, se agregaron 2 - 3 ml de *buffer* frío y se mortereó por unos minutos hasta que no se observaron trozos de hoja remanente. Se agregaron otros 2 - 3 ml de *buffer* y se trasvasó el contenido del mortero a un embudo recubierto con 4 capas de gasa. Posteriormente se estrujó la gasa de forma tal que todo el líquido se escurriese hacia un vaso de precipitados frío y recubierto con papel aluminio. Una vez obtenido el extracto se refrigeró en el congelador de una heladera o baño de hielo, tapado y recubierto con papel de aluminio. Luego se centrifugó por 5 minutos a 3000 RPM de forma de eliminar trozos de material vegetal de gran tamaño. El sobrenadante se refrigeró nuevamente por unos minutos y se volvió a centrifugar por 5 minutos a 3800 RPM. El precipitado se resuspendió en *buffer* frío y se guardó en un baño de hielo protegido de la luz ambiente, hasta su utilización (hasta 8 hs desde su extracción).

Para determinar la concentración de cloroplastos, se tomó una alícuota de 100 μ L del extracto de cloroplastos y se diluyó en 3 ml de acetona 80 %. La suspensión resultante se centrifugó 5 minutos a 2000 RPM de modo de precipitar restos insolubles. Se registró el espectro de absorbancia entre 400 y 800 nm del sobrenadante y se determinó la

concentración de clorofillas de acuerdo a las absorbividades específicas en acetona 80 % reportadas por Lichtenhaler y Buschmann [45]. Esta determinación se realizó por duplicado. La concentración de clorofila en los extractos de cloroplastos fue de ≈ 140 - $200 \mu\text{g clorofila}/\text{ml}$ en los diferentes días de extracción.

Experimento de transferencia de energía

El estudio de transferencia de energía se realizó agregando volúmenes de 50, 100, 150, 200, 300 y $500 \mu\text{L}$ de un concentrado de nanopartículas (GQD ó nano-CB) en agua Milli-Q en una suspensión de cloroplastos contenido 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de extracto de cloroplastos y 3 mL de *buffer*. La composición de las muestras conteniendo nanopartículas y cloroplastos se detalla en la [Tabla 7.1](#).

TABLA 7.1: Composición de las mezclas de cloroplastos y nanopartículas para el estudio de transferencia de carga. El factor de dilución se utilizará posteriormente para corregir la intensidad de los espectros.

Exp	Cloroplastos		NP			Vol. Final (μL)	Factor
	Vol.	Conc	Vol	[nano-CB]	[GQD]		
	(μL)	($\mu\text{g}/\text{mL}$)	(μL)	(mg/mL)	(mg/mL)		
0	50	3.3	0	0	0	3050	1.000
1	50	3.2	50	1.9×10^{-5}	8.5×10^{-6}	3100	1.016
2	50	3.2	100	3.7×10^{-5}	1.7×10^{-5}	3150	1.033
3	50	3.1	150	5.5×10^{-5}	2.5×10^{-5}	3200	1.049
4	50	3.1	200	7.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}	3250	1.066
5	50	3.0	300	1.0×10^{-4}	4.7×10^{-5}	3350	1.098
6	50	2.8	500	1.6×10^{-4}	7.4×10^{-5}	3550	1.164

Como puede observarse en [Tabla 7.1](#), el volumen final de la mezcla cambia con los agregados por lo que será necesario posteriormente corregir los espectros de emisión obtenidos. El experimento fue llevado a cabo de esta manera debido a que la suspensión concentrada de cloroplastos suele ser viscosa y se dificulta tomar pequeños volúmenes de muestra de forma suficientemente reproducible, como se requieren en estas medidas espectroscópicas. No es recomendable diluir el extracto original de cloroplastos ya que al ser los

cloroplastos intrínsecamente microparticulas que decantan con facilidad, se genera un gradiente de concentración que requeriría agitación y facilitaría la ruptura de la membrana de los cloroplastos. Además, un gran volumen necesitaría una gran cantidad de hielo para mantenerlos en buen estado y dificultaría la buena termostatización de la suspensión. En general, el extracto de cloroplastos primario se mantiene concentrado, en baño de hielo y en oscuridad, y solo se diluye en el *buffer* correspondiente cuando se realiza el ensayo deseado. De esta forma, un experimento sencillo desde el punto de vista experimental, es adicionar un volumen creciente de nanopartículas sobre un determinado volumen de cloroplastos.

Por otro lado, se realizaron controles de nanopartícula y cloroplastos. El esquema de volúmenes y muestras fue el mismo que el informado en la [Tabla 7.1](#) pero para el control de cloroplastos en lugar de emplear una suspensión de nanopartículas en agua se utilizaron volúmenes de agua Milli-Q, y para el control de nanopartículas en lugar de la dispersión de nanopartículas en *buffer*, se tomó el mismo volumen de *buffer* puro.

Sobre cada muestra se registraron los espectros de absorción utilizando un espectofotómetro de doble haz (UV-3600 Plus, Shimadzu, Tokio, Japón) y los espectros de emisión utilizando un espectrofluorómetro de estado estacionario (QuantaMaster, PTI-Photon Technology International-Brunswick, EEUU) a temperatura ambiente.

Corrección de espectros de fluorescencia por efecto de filtro interno

Como la concentración de los crómoforos era demasiado alta para asumir una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de cromóforo, debido a efectos de filtro interno primario y secundario, fue necesario corregir los espectros de fluorescencia obtenidos. Está bien establecido que la intensidad de fluorescencia registrada es proporcional a la absorbancia hasta 0,05 de la misma. Es posible corregir aproximadamente la intensidad de fluorescencia por efectos de filtro interno utilizando la [Ec. 3.13](#) presentada en el [Capítulo 3](#). En esta ecuación se consideran la absorbancia a las longitudes de onda de excitación y emisión, las cuales atenuan la excitación y la emisión en $10^{-0,50A_{ex}}$ y $10^{-0,50A_{em}}$, respectivamente [48]. De esta manera, los espectros de fluorescencia experimentales de cloroplastos y nanopartículas, se corrigieron tanto por efectos de filtro interno

como por el factor de dilución.

Quenching de fluorescencia - Stern-Volmer

En el caso particular de un *quenching* estático dominante debido a la formación de complejos en el estado fundamental, el modelo clásico de Stern-Volmer establece que el tiempo de vida es independiente de la concentración del *quencher* ($[Q]$) y permanece sin cambios $\tau = \tau_0$ con la adición de Q . Además, la relación de *quenching* debe aumentar linealmente con la concentración del mismo como se describe en la ecuación de Stern-Volmer siguiente:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{obs} \cdot [Q] \quad (7.1)$$

donde K_{obs} usualmente denominada K_{SV} es la constante de Stern-Volmer para la formación de complejos. De acuerdo con la Ec. 7.1, un diagrama de I_0/I en función de $[Q]$, el llamado diagrama de Stern-Volmer, debería dar una línea recta con una pendiente igual a K_{SV} . La ecuación de Stern-Volmer se puede derivar considerando las intensidades de fluorescencia observadas en ausencia y presencia del *quencher*.

Distintas desviaciones, positivas y negativas, a dicha linealidad entre I_0/I y $[Q]$ pueden interpretarse de distinta manera. En el caso de que la relación I_0/I en función $[Q]$ muestra una curvatura hacia abajo, más específicamente alcance un valor de saturación y el cociente I_0/I permanezca constante a partir de ese punto, suele atribuirse a que parte de la concentración del fluoróforo no es accesible al *quencher* y frecuentemente se observa en proteínas [48]. Tal es así, que se utiliza el *quenching* de los residuos de triptófano en las proteínas para distinguir los residuos accesibles e inaccesibles al solvente. En este caso, se plantea la existencia de dos poblaciones de fluoróforos, una de las cuales es accesible (a) y la otra es inaccesible (b) a los *quenchers*. La fluorescencia total en ausencia de extintor (F_0) viene dada por la suma de la fluorescencia en ausencia de *quencher* en ambos sitios (a y b). En presencia de un *quencher*, la intensidad de la fracción accesible (f_a) disminuye de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer, mientras que la fracción oculta o inaccesible

no se apaga. Por lo tanto, la intensidad observada viene dada por:

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a \cdot [Q]} + F_{0b} \quad (7.2)$$

donde K_a es la constante de extinción de Stern-Volmer de la fracción accesible, y $[Q]$ es la concentración del *quencher*. Luego, reordenando la ecuación es posible obtener nuevamente una relación lineal:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \cdot \left(\frac{K_a \cdot [Q]}{1 + K_a \cdot [Q]} \right) \quad (7.3)$$

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{f_a \cdot K_a \cdot [Q]} \quad (7.4)$$

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0a} + F_{0b}} \quad (7.5)$$

donde f_a es la fracción de la fluorescencia inicial que es accesible al *quencher*. Esta forma modificada de la ecuación de Stern-Volmer permite determinar gráficamente f_a y K_a , de a ordenada y la pendiente, respectivamente. El valor $F_0/(F_0 - F)$ representa el recíproco de la fluorescencia que fue desactivada. A una alta concentración de *quencher*, solo los residuos inaccesibles serán fluorescentes.

7.3. Resultados

7.3.1. Caracterización de nanopartículas

Análisis morfológico

Se lograron sintetizar nanopartículas a base de carbono tanto por vías *top-down* como *bottom-up*. Los *quantum dots* de grafeno (GQD) fueron sintetizadas mediante la pirólisis de ácido glutámico, obteniéndose así nanopartículas de 6 ± 1 nm de diámetro según las imágenes de microscopía electrónica obtenidas (Fig. 7.2 A). En dichas imágenes si bien se observa una variedad de tamaños en las partículas, el rango de tamaño es estrecho ya que la mayor parte de las partículas tienen entre 4 y 8 nm como puede distinguirse en la Fig. 7.2 C, encontrándose muy pocas partículas de más de 10 nm de diámetro. El diámetro medio fue de $5,5 \pm 1,5$ nm. De forma similar, se muestra en la Fig. 7.2 B una micrografía SEM de las nanopartículas sintetizadas a partir de *carbon black* (nano-CB). Las nanopartículas de geometría esférica tienen un diámetro medio de 12 ± 4 nm. En la

Fig. 7.2 D se distingue una distribución de tamaños amplia, que cubre el rango de 9 a 16 nm. Dada la morfología de estas partículas, es posible clasificar las nanopartículas de la muestra nano-CB como *carbon dots* de carbono [27].

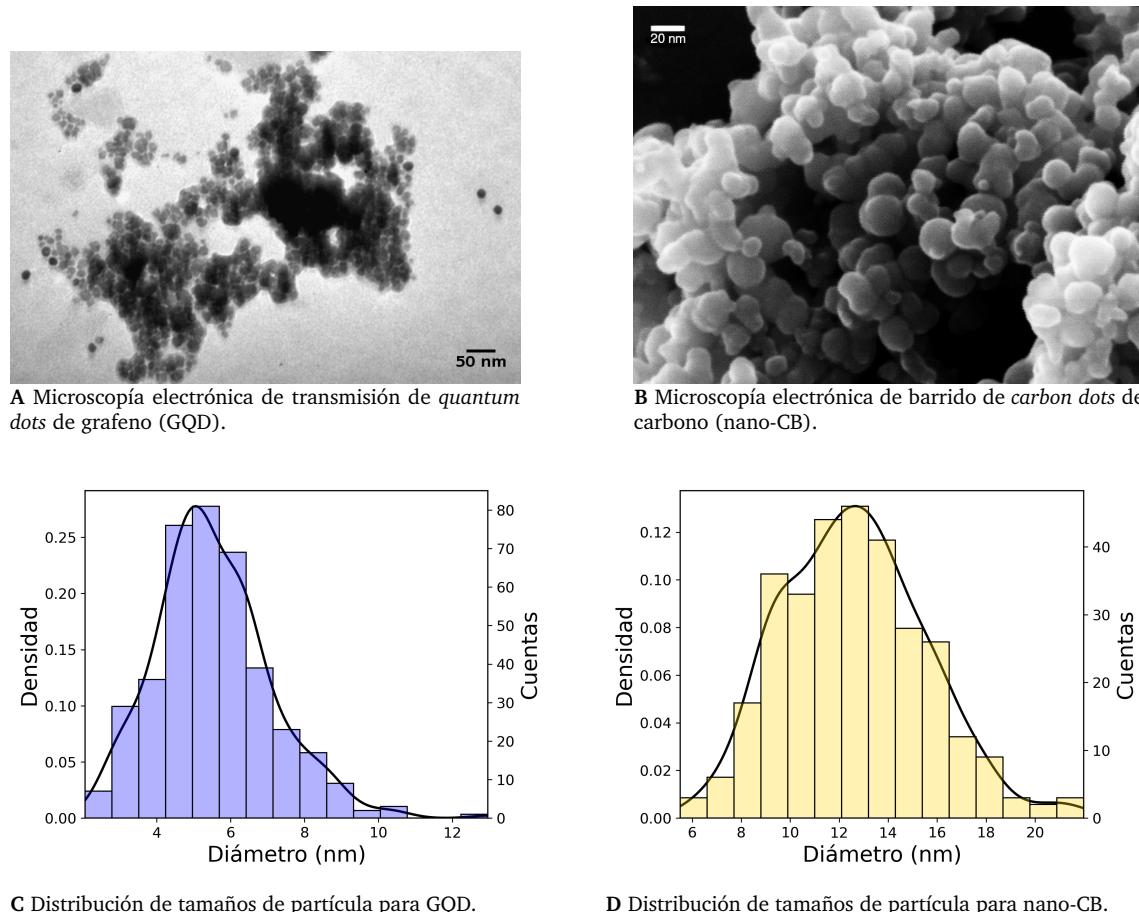


FIGURA 7.2: Microscopía electrónica de nanopartículas de carbono (GQD y nano-CB) sintetizadas.

Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Del análisis de la espectroscopia infrarroja en base a la Fig. 7.3 se pueden distinguir señales características de la nanopartícula y el precursor de ácido glutámico, que no se observan en la señal de base del soporte utilizado. Particularmente interesa identificar señales correspondientes a grupos funcionales amida y uniones C=C, los cuales no están presentes en el ácido glutámico pero deberían observarse en la nanopartícula.

Las bandas ubicadas a 1230 y 825 cm^{-1} corresponden a estiramientos de grupos -O-C-O- ó C-O-C, mientras que los ubicados en ≈ 1400 y 1100 cm^{-1} corresponden a estiramien-

tos de C-O de grupos -COOH carboxílicos [49, 50]. Alrededor de 1650 cm^{-1} se registró una banda ancha y muy intensa que se encuentra desdoblada. En esta zona del espectro se presentan estiramientos C=O de amidas primarias (-CO-NH-) y estiramientos C=C de dobles enlaces conjugados [38, 50]. Dadas las características de la banda, es posible que estén presentes ambas señales superpuestas.

En la región de $4000 - 3000\text{ cm}^{-1}$ se suelen observar señales O-H, N-H y C-H. Particularmente en compuestos derivados del grafito se observan estiramientos =C-H de CH con geometría sp^2 de anillos aromáticos en $3100 - 3000\text{ cm}^{-1}$ y estiramientos C-H de grupos CH₂ y CH₃ en $2960 - 2850\text{ cm}^{-1}$ [29, 49, 50]. En el espectro de la Fig. 7.3 se presentan múltiples bandas poco intensas pero muy anchas en esa zona del espectro. Como todos los grupos funcionales antes mencionados pueden estar presentes en la muestra, la banda presente $\approx 2900\text{ cm}^{-1}$ puede corresponder a estiramientos =C-H aromáticos o bien a C-H metílicos. Por último, a diferencia de las señales anteriores, el pico observado a 3300 cm^{-1} es intenso y profundo, por lo que podría corresponder a un estiramiento N-H ó COOH con H unido por puente de hidrógeno [50, 51]. De esta manera, se pudieron identificar grupos funcionales específicos de los *quantum dots* de grafeno como los grupos amida, carboxilo y dobles enlaces carbono-carbono.

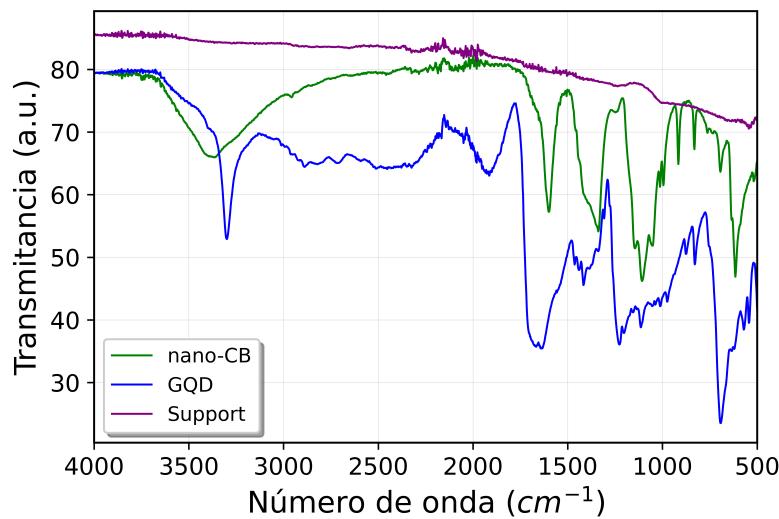


FIGURA 7.3: Espectroscopia infrarroja de nanopartículas GQD y nano-CB sobre un soporte polimérico. Se marcan ciertas áreas donde se ven señales específicas.

En la Fig. 7.3 también se presenta el espectro infrarrojo de los nano-CB el cual difiere sen-

siblemente del espectro de GQD. Los estiramientos observados a 615 (intenso), 690, 835 y 910 cm^{-1} se corresponden a señales de un núcleo aromático. La fuerte banda observada a $\approx 1100\text{ cm}^{-1}$ corresponde a estiramientos de grupos epóxido C-O-C ó C-OH de carboxilos [49-51]. Esta banda se encuentra desdoblada en tres, y evidencian la presencia de múltiples uniones C-O presentes en la muestra. La banda presente entre 1330 y 1400 cm^{-1} es una banda profunda, ancha y asimétrica, y puede atribuirse a estiramientos C-O-H y O-H en el plano [50, 52]. La banda a 1600 cm^{-1} corresponde a estiramientos C-C de grupos aromáticos ó aromáticos policíclicos [29, 38, 49, 50]. Por último, se observó una banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} característica de estiramientos O-H.

A partir de los espectros infrarrojos se pudieron identificar los grupos funcionales presentes en ambas nanopartículas. Mientras que en la muestra de GQD se observaron señales de los grupos amida, ácido carboxílico y uniones carbono-carbono, en la muestra de los nano-CB se identificaron señales de grupos aromáticos, grupos con uniones C-O variadas y alcoholes. La presencia de grupos que contienen oxígeno y nitrógeno evidencian la alta solubilidad en agua y la estabilidad de ambas nanopartículas en agua.

Propiedades ópticas

Los espectros de absorción UV/vis de nanopartículas GQD dispersas en agua se muestran en la Fig. 7.4A junto con los espectros de excitación y emisión correspondientes. El espectro de absorción de GQD muestra una banda de absorción típica en alrededor de 250 nm que puede atribuirse a la transición $\pi - \pi^*$ de enlaces C=O ó C=C sp^2 y una banda bien definida centrada en 318 nm que se extiende hacia el rango visible, asociada a la transición $n - \pi^*$ de los grupos C=O [27, 49].

Respecto a la fluorescencia, podemos observar en las Fig. 7.4A, Fig. 7.4C y Fig. 7.4B que la longitud de onda donde se observó la máxima emisión es aproximadamente 330 nm y el máximo de emisión presentó un comportamiento longitud de onda dependiente, típico para puntos cuánticos de carbono [27, 53]. Los picos de emisión de las nanopartículas de carbono, generalizadas bajo el nombre CD, suelen ser amplios, con grandes corrimientos de *Stokes* en comparación con la emisión de colorantes orgánicos. La posición del pico de emisión siempre suele estar relacionada con la longitud de onda de excitación, lo que

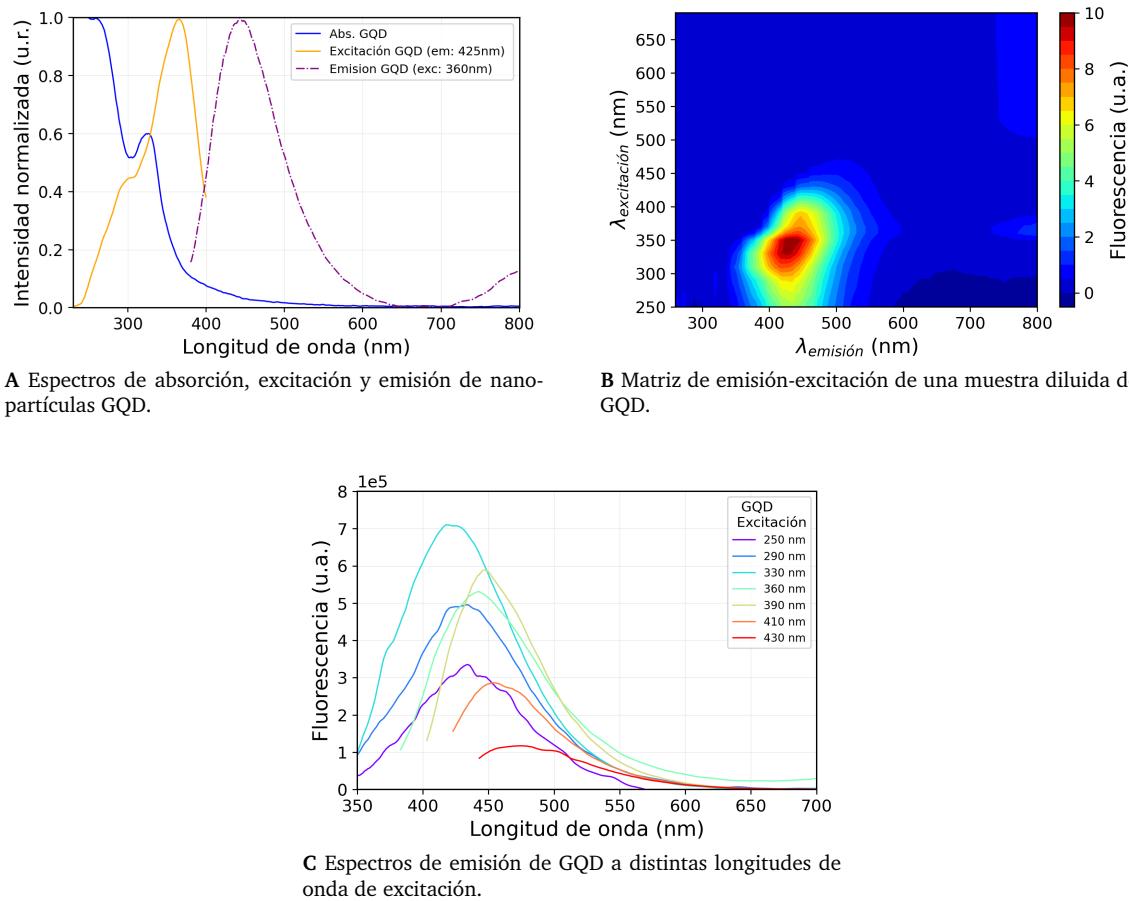


FIGURA 7.4: Caracterización espectroscópica de las nanopartículas GQD.

se conoce como comportamiento dependiente de la longitud de onda. Diferentes autores han sugerido que dicho comportamiento resulta de la amplia distribución de partículas de diferentes tamaños y la química de la superficie, diferentes trampas emisivas (efecto de solvatación) u otro mecanismo desconocido [27]. De esta manera, como se distingue en las Fig. 7.4 C y Fig. 7.4 B, bajo excitación de luz de 250 nm, el máximo de emisión se presenta a 425 nm y se corre a 450 nm bajo excitación de luz de 430 nm. A diferencia de otras nanopartículas de carbono donde este corrimiento puede alcanzar los 100 nm [27], para las GQD aquí sintetizadas es de ≈ 25 nm como máximo. Yang y sus colaboradores mencionaron que los CD que exhiben luminiscencia independiente de la longitud de onda de excitación, la fluorescencia es debida a estados superficiales en lugar de atribuirse a un efecto de tamaño el cual se refleja en emisión dependiente de la longitud de onda de excitación [54]. Dada la pequeña variación en los espectros de emisión con la excitación, los estados superficiales deberían ser bastante uniformes. Sin embargo, este tipo de nanopartículas de carbono suelen presentar rendimientos cuánticos de fluorescencia relativamente

bajos [53, 55, 56]

Por otro lado, en sintonía con las dos bandas observadas en los espectros de absorción, los espectros de excitación también presentan dos bandas, una ubicada a 279 nm y otra a 360 nm, siendo la última más intensa. Algunos pocos autores han reportado simultáneamente los espectros de absorción, excitación y emisión de GQD, en los cuales se distingue una separación evidente entre los espectros [30, 57, 58]. Las dos transiciones electrónicas de 279 nm (4,44 eV) y 360 nm (3,44 eV) observadas en los espectros de excitación pueden considerarse como una transición desde orbitales σ y π (HOMO) al orbital molecular desocupado más bajo (LUMO). De acuerdo a Che y cols.[58] se propone que la bandas de excitación en la región de 250-320 nm, aquí observada a 279 nm, se asignen a la transición $\pi - \pi^*$ (HOMO \rightarrow LUMO) de los enlaces C=C sp^2 , mientras que las bandas de excitación en la regiones de 320-420 nm y 420-500 nm se atribuyen a transiciones de los estados π a los estados defectuosos relacionados con átomos de oxígeno y nitrógeno en la superficie de los GQD [59]. En este caso, dada la ubicación de la banda, la composición estructural observada por espectroscopia infrarroja y el precursor ácido glutámico, es más probable de que se trate de estados asociados al nitrógeno de grupos $NH-$ ó NH_2- . De esta manera tras la absorción, los electrones en los π^* se relajan de de manera no radiativa al estado de defecto relacionado con N para producir una única banda de emisión a 425 - 450 nm. Por otro lado, altas temperaturas de síntesis como la aquí utilizada para los GQD, convierten el estado N activado en uno inerte, desde el cual los electrones se desactivan no radiativamente, lo que justifica los bajos rendimientos cuánticos asociados a nanopartículas de carbono con alto contenido de nitrógeno [30, 58].

De acuerdo a la posición de los máximos de excitación y emisión, y comparando con múltiples referencias bibliográficas, las características espectroscópicas observadas sugieren un tamaño de partícula de 3 - 6 nm, el cual está en sintonía con lo obtenido por microscopía electrónica [49, 53].

De forma análoga a lo realizado para los *quantum dots* de grafeno, se presentan en la Fig. 7.5 A los espectros de absorción UV/vis, excitación y emisión de una solución diluida de nanopartículas obtenidas a partir de la degradación en medio ácido oxidante de mi-

cropartículas de negro de humo (nano-CB). Respecto a la absorción UV/vis, no se observó un pico de absorción claro como para GQD, sino que se observó un borde de absorción largo. Dadas estas características se deconvolucionó dicho espectro en tres bandas, con máximos estimados en ≈ 221 , 278 y 342 nm. Nuevamente, los espectros de fluorescencia son amplios y dependen de la longitud de onda de excitación (Fig. 7.5 C). En la Fig. 7.5 B se representa la matriz de emisión de las nanopartículas donde se observa un corrimiento de la emisión conforme aumenta la longitud de onda de excitación de unos 75 nm, mayor al observado para GQD. El espectro de excitación posee dos bandas, una centrada en 310 nm y otra a 370 nm, mientras que la emisión cubre el rango entre 400 nm y 520 nm. Peng y cols.[30], que fue la referencia para la síntesis de nano-CB, también observaron un desdoblamiento en los espectros de excitación. Además, dicho desdoblamiento fue más evidente que el observado en el espectro de excitación de GQD.

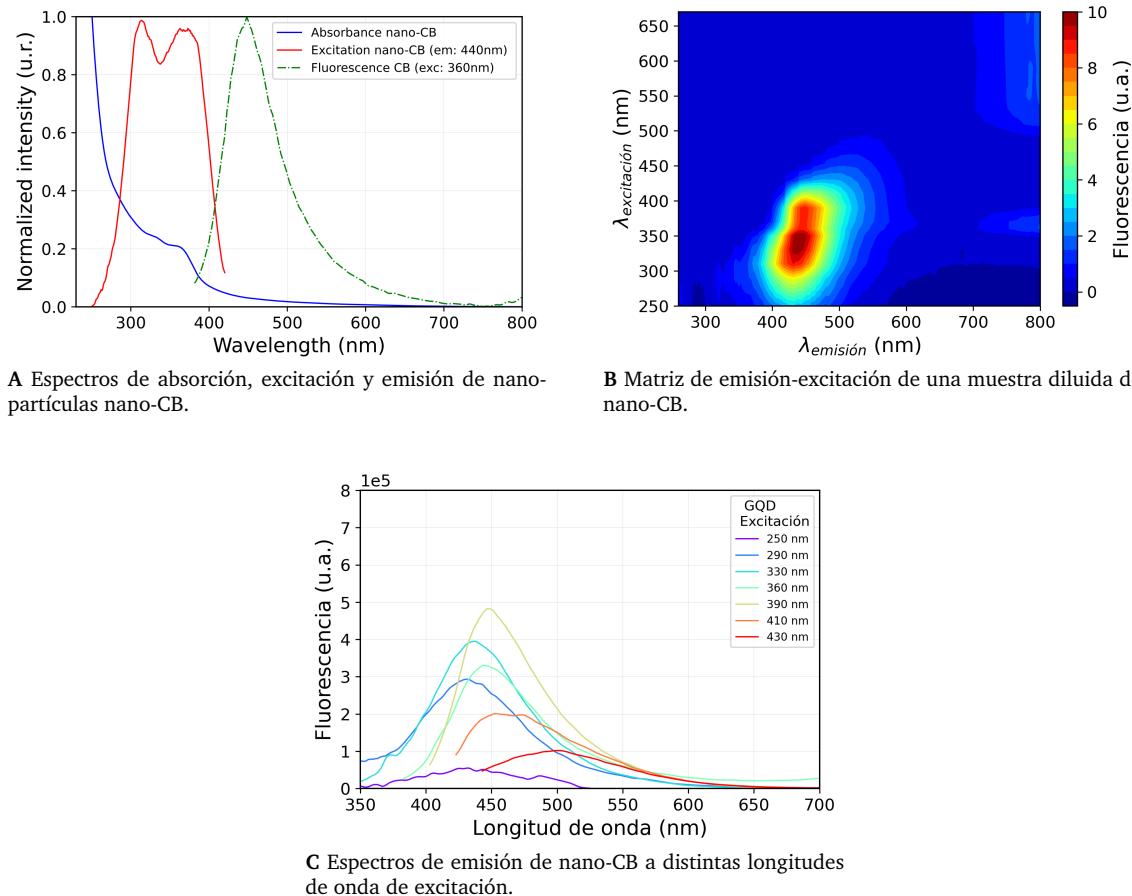


FIGURA 7.5: Caracterización espectroscópica de las nanopartículas nano-CB.

La interpretación de estas características y el mecanismo de luminiscencia es similar al

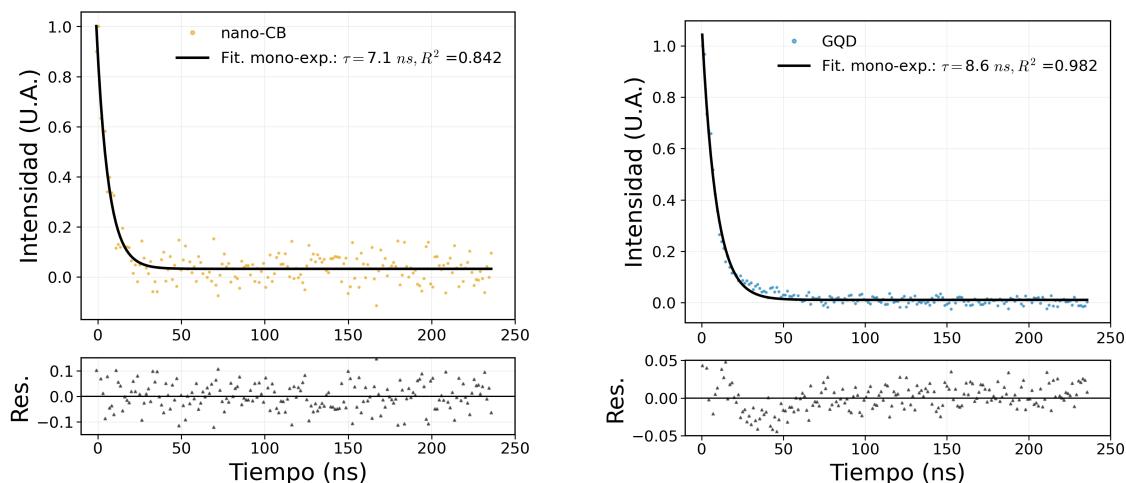
sugerido para GQD, a diferencia que en nano-CB los estados no son de N sino de O. Se propone entonces, que la banda de excitación a 310 nm (3,99 eV) se asigne a la transición $\pi - \pi^*$ (HOMO \rightarrow LUMO) de los enlaces C=C con geometría sp^2 del C, mientras que la banda de excitación en 370 nm (3,35 eV) se atribuye a la transición de los estados π a los estados defectuosos relacionados con O en la superficies de las partículas [58, 59]. De forma análoga con GQD, los electrones en los π^* pueden decaer no radiativamente al estado de defecto relacionado con O para producir una emisión azul.

Por otro lado, la emisión dependiente de la longitud de onda de excitación es más evidente en estas partículas en comparación con GQD. Esto indica que las nano-CB poseen una amplia distribución de partículas de diferentes tamaños o bien poseen defectos superficiales que impactan directamente en la forma de los espectros de emisión y particularmente en el rendimiento cuántico [27]. Shamsipur y cols. [60] observaron que a menor tamaño de partícula, mayor fue la dependencia de la emisión con la longitud de onda de excitación, y menor fue el rendimiento cuántico de fluorescencia de las mismas. Estas características se observan en las nano-CB comparativamente con las GQD, lo que sugiere un menor tamaño medio de partícula y a su vez una mayor dispersión de tamaño de las mismas, en conjunto con un menor rendimiento cuántico. Por último, de acuerdo a las propiedades ópticas de las nano-CB el tamaño de partícula se estima entre 2 y 6 nm [53].

Se cuantificaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia utilizando rodamina 101 en etanol como estándar de referencia. Se obtuvo un Φ_F de 0.25 ± 0.05 para GQD mientras que para los nano-CB fue de 0.04 ± 0.01 . Los valores obtenidos para GQD son similares a los reportados en bibliografía para *quantum dots* de grafeno de composición, espectroscopía y tamaño similar [49, 61-63]. Sin embargo, el rendimiento cuántico para las nano-CB es menor al esperado para *carbon dots*. Una de las referencias utilizadas para la síntesis de nano-CB, Ye y cols. [44], también sintetizaron nanopartículas de carbono a partir de un precursor de carbono oxidado como carbón y coque, y obtuvieron nanopartículas de bajo rendimiento cuántico con espectros de absorción de bandas poco definidas como las aquí observadas. De forma análoga, otros autores que sintetizaron nanopartículas de carbono a partir de hollín de vela o similares, obtuvieron partículas muy pequeñas de 2 - 6 nm, de bajo rendimiento cuántico de fluorescencia en el rango de 0.008 - 0.12 [28, 34, 53].

Por lo tanto, el bajo rendimiento cuántico obtenido para las nano-CB se encuentra dentro del rango esperado para nanopartículas de carbono sintetizadas a partir de compuestos de carbono provenientes de combustión de materia orgánica.

Por último, se registraron los decaimientos de fluorescencia a temperatura ambiente para ambas nanopartículas y se obtuvieron los tiempos de vida correspondientes. En la Fig. 7.6 se presentan las curvas y los ajustes correspondientes. Se ajustaron los datos experimentales mediante un decaimiento monoexponencial y biexponencial. Sin embargo, no se obtuvieron mejores ajustes bajo un modelo biexponencial por lo que solo se presentan los resultados correspondientes al modelo más simple. Los tiempos de vida obtenidos bajo excitación de 460 nm, para las nanopartículas GQD fue de 8.3 ± 0.3 ns, y para nano-CB fue de 7.2 ± 0.2 ns. Los valores anteriores corresponden a un promedio de cuatro duplicados. Ambos valores se encuentran dentro del rango esperado para puntos cuánticos de carbono de tamaño similar [53].



A Decaimiento de la fluorescencia de nanopartículas nano-CB.

B Decaimiento de la fluorescencia de nanopartículas GQD.

FIGURA 7.6: Decaimientos de fluorescencia de suspensiones de nanopartículas de carbono a temperatura ambiente. Se superponen a los puntos experimentales las curvas obtenidas tras un ajuste mono-exponencial. En la parte inferior se presenta la distribución de residuos para cada ajuste.

7.3.2. Contenido de pigmentos e índices espectrales

Se calcularon a partir de medidas de reflectancia difusa diversos índices espectrales que poseen una correlación con diferentes pigmentos fotosintéticos. Dichos valores presenta-

dos en [Tabla 7.2](#) se utilizan como complemento del contenido de pigmentos obtenidos por extracción directa presentados en la [Tabla 7.3](#).

El índice NDVI guarda una relación empírica con la cobertura vegetal y es linealmente dependiente del contenido de clorofilas [64]. En este caso dicho parámetro disminuye no significativamente para las hojas tratadas con ambos tipos de nanopartículas respecto del control. El índice NDVI modificado también disminuye significativamente en las muestras. Ambos parámetros indican que la cantidad de clorofilas en las hojas tratadas con nanopartículas disminuyó respecto al control. Como este parámetro se lo ha correlacionado también a la producción primaria neta y a la tasa fotosintética, es posible inferir indirectamente que las hojas tratadas con nanopartículas tendrán menor capacidad fotosintética que las hojas control. Utilizando otras técnicas, principalmente de fluorescencia de clorofila *a*, se determina con mejor precisión dicho comportamiento, pero la variación del NDVI de estas hojas indican un posible efecto negativo sobre el contenido de pigmentos.

TABLA 7.2: Índices espectrales de hojas control y hojas con nanopartículas nano-CB y GQD. Los * representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.05$.

Índices	Control	nano-CB	GQD
NDVI	0.78 ± 0.02	0.77 ± 0.01	0.76 ± 0.01
PRI	0.027 ± 0.003	0.015 ± 0.006	0.013 ± 0.008
mNDI	0.58 ± 0.02	$0.53 \pm 0.02^*$	0.54 ± 0.03
PSND α	$0.81 \pm 0.01^*$	0.80 ± 0.01	$0.79 \pm 0.01^*$
PSND β	0.77 ± 0.02	0.76 ± 0.01	0.75 ± 0.01

Por otro lado, el índice PRI estima las fluctuaciones a corto plazo en los niveles relativos de pigmentos del ciclo de las xantófilas y, por lo tanto, sirve como una estimación de la eficiencia del uso de la luz fotosintética [65]. Se observó que este índice disminuyó en las hojas tratadas con nanopartículas respecto al control. Esto refiere a una disminución de los carotenoides del ciclo de las xantófilas. La reflectancia a 531 nm que contribuye al PRI está relacionada con la desepoxidación de xantófila (aumento de la concentración de zeaxantina) inducida por un aumento del ΔpH transtilacoide [66, 67]. Es bien conocido que este aumento del ΔpH transtilacoide es un mecanismo importante del componente dependiente de energía del *quenching* no fotoquímico (NPQ) [68]. Además, esta variación

puede influir fuertemente en el transporte de electrones fotosintéticos en los cloroplastos [69]. Por lo tanto, como la dinámica de las xantófilas está fuertemente relacionada con el estrés de las plantas al contribuir en la disipación térmica del exceso de energía, existe entonces una fuerte conexión entre el PRI y el NPQ (especialmente bajo la acción de factores estresantes). En el trabajo recientemente publicado de Yudina y colaboradores [70], los autores mostraron que existe una relación entre el PRI y el componente de NPQ dependiente de la energía bajo distintas situaciones de estrés. Muy recientes publicaciones siguieron reforzando la evidencia entre estas variables como en el trabajo de Kohzuma y cols.[71], Alonso y cols.[72] y Sukhova y Sukhov[66, 73], entre otros.

En base a lo expuesto, la disminución del PRI en las plantas tratadas con nanopartículas podría asociarse con un ciclo de xantófilas reducido y por consiguiente con una menor capacidad de estas plantas de disipar el exceso de energía por esta vía.

Luego, los índices $PSND_a$ y $PSND_b$, que guardan una relación con Chl *a* y Chl *b*, respectivamente, disminuyeron en hojas tratadas con ambas nanopartículas; lo que está en sintonía con los cambios observados en los índices NDVI y mNDVI. Es importante señalar que aunque dichas variaciones son sutiles, los cambios inducidos por los *quantum dots* (GQD) son más significativos que los inducidos por las nanopartículas sintetizadas a partir de negro de humo comercial (nano-CB).

El contenido de pigmentos por área foliar obtenido por extracción directa en acetona 80% se presenta en la Tabla 7.3. El contenido de Chl *a* y Chl *b* disminuye significativamente en hojas tratadas con ambas nanopartículas de carbono respecto al control, lo cual está en concordancia con los cambios observados en los índices espectrales. El contenido de carotenoides también disminuye significativamente. Cabe destacar que el cambio es más significativo que con las clorofilas y se corresponde también con la disminución en el índice PRI ya que las xantófilas son carotenoides. De forma similar, se observa una disminución del cociente Chl *a/b* y un aumento del cociente Chls/Cars en las hojas tratadas con nanopartícula respecto al control. Por otro lado, los valores obtenidos son los esperados de acuerdo a la bibliografía para este tipo de especie vegetal [74, 75].

TABLA 7.3: Contenido de pigmentos de hojas control y tratadas con nanopartículas de carbono. El contenido de pigmentos se expresan por área foliar ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ por hoja). Los * representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.05$ entre muestras y control.

Pigmentos	Control	nano-CB	GQD
Chl <i>a</i>	$24.3 \pm 2.6^*$	$19.7 \pm 2.7^*$	$19.0 \pm 2.2^*$
Chl <i>b</i>	8.8 ± 0.9	7.6 ± 1.2	7.6 ± 0.7
Chl <i>a + b</i>	$33 \pm 3^*$	27 ± 4	27 ± 2
Carotenoides	$5.4 \pm 0.6^*$	$4.1 \pm 0.5^*$	$4.0 \pm 0.5^*$
Cocientes			
Chl <i>a/b</i>	$2.77 \pm 0.01^*$	2.6 ± 0.1	$2.47 \pm 0.06^*$
Chls/Cars	$6.08 \pm 0.01^*$	$6.6 \pm 0.2^*$	$6.6 \pm 0.2^*$

La variación en el cociente Chl *a/b* puede interpretarse como un cambio en la relación o población relativa de los fotosistemas. Dicho cociente de Chl *a* y Chl *b* es un indicador de la antena funcional y la adaptación a la luz del aparato fotosintético [76, 77]. Chl *b* se encuentra exclusivamente en la antena, mientras que Chl *a* está presente en los centros de reacción de ambos fotosistemas (RC-PSI y RC-PSII) y en las antenas (LHC-I y LHC-II). Mientras que la antena del PSI (LHC-I) tiene una relación Chl *a/b* de ~ 3 , la relación de la antena del PSII (LHC-II) presenta una relación Chl *a/b* de 1,1 a 1,3. El nivel de LHC-II es variable y muestra una respuesta de adaptación a la luz. Las plantas de sombra poseen cantidades mucho más altas de LHC-II que las plantas expuestas al sol y, en consecuencia, sus proporciones Chl *a/b* son más bajas que en las plantas expuestas al sol. Por tanto, una disminución en la relación Chl *a/b*, puede interpretarse como una ampliación del sistema de antenas del PSII [78, 79].

Si bien todos los valores obtenidos en muestras y controles se encuentran dentro del rango de hojas de sombra, Bailey y cols.[80] mostraron que hay una correlación entre la intensidad de luz a la que se expone la planta y el cociente Chl *a/b* obtenido, lo cual se corresponde bien con lo establecido actualmente respecto a la adaptación del aparato fotosintético en hojas de sombra y sol. Debido a que los cocientes Chl *a/b* de las muestras con nanopartícula son menores al obtenido para el control, se puede deducir que las hojas

tratadas con las nanopartículas se adaptaron de forma análoga a lo que lo harían estando en un ambiente de menor irradiancia. Debido a que experimentalmente las plantas que fueron tratadas con nanopartículas y el control compartían la misma irradiancia, es posible pensar que las nanopartículas filtraron la luz recibida por los cloroplastos de forma tal que esta fue menor para los cloroplastos de las hojas tratadas que para las hojas control. De hecho, el cambio producido en este parámetro es muy similar para ambas nanopartículas lo cual tiene sentido si lo anterior es correcto, ya que la absorbancia máxima de ambas muestras nanoparticuladas eran iguales por lo que es razonable que la fracción de luz absorbida por ambas nanopartículas sea comparable y por ende el efecto sobre la relación Chl a/b sea similar. En consecuencia, el sombreado producido por estas nanopartículas, considerando su espectro de absorbancia (Fig. 7.4 y Fig. 7.5) consistió en reducir la intensidad de la luz incidente en el UV y el azul, por lo que la irradiancia se enriqueció en longitudes de onda larga respecto a los de longitud de onda corta, una distribución espectral con las mismas características que la correspondiente a la sombra.

Por otro lado, hojas completamente desarrolladas y hojas de plantas C3 como la *achicoria* aquí estudiada, tienen cocientes Chl a/b entre 2,5 - 3,5, por lo que los valores obtenidos se corresponden bien con lo esperado [76, 79].

Por último, la relación en peso de Chl $a + b$ a carotenoides totales (*Cars*) es un indicador del verdor de las plantas. La relación Chls/Cars normalmente se encuentra entre 4,2 y 5 en hojas y plantas expuestas al sol, y entre 5,5 y 7,0 en hojas y plantas expuestas a sombra [77]. Valores más bajos para la relación Chls/Cars son un indicador de senescencia, estrés y daño a la planta y el aparato fotosintético, que se expresa por una descomposición más rápida de clorofilas que de carotenoides. Los valores aquí obtenidos (Tabla 7.3) se encuentran nuevamente en el rango característico de hojas de sombra.

Un aumento de la relación Chls/Cars, se debe principalmente a un menor nivel de carotenoides del ciclo de las xantófilas [79, 81]. Globalmente, todas las variaciones aquí observadas se corresponden con una respuesta de aclimatación a la sombra. La disminución en el cociente Chl a/b es propio de una mayor proporción de LHC-II respecto a LHC-I y un número menor de proteínas del centro de reacción (RC) sobre una base de clorofilas totales,

en comparación con hojas de sol [76, 79, 82, 83]. Lichtenthaler y cols. [84] estudiaron el efecto de distintos sombreados intermedios, entre ellos media-sombra y sombreado-azul, en donde las hojas estaban expuestas a muy poca y nada de luz directa, respectivamente. Los cambios observados son intermedios a los que se observa para sombra, es decir, disminución de Chl *a*, Chl *b*, *Cars*, Chl *a/b* y un aumento en Chls/Cars. Esta tendencia es análoga a la aquí obtenida para las hojas tratadas con nanopartículas GQD y nano-CB respecto al control. Esta última correlación contribuye a pensar que los cambios producidos en el contenido de pigmentos del aparato fotosintético guardan gran analogía con un fenómeno de sombreado parcial, por lo que el efecto evidente de las nanopartículas sería el filtrado de la luz incidente. De acuerdo a los resultados de las siguientes determinaciones se pone a prueba esta suposición a fin de establecer una causa consistente con los fenómenos y variaciones obtenidas.

7.3.3. Fluorescencia Estacionaria

Los espectros de fluorescencia de clorofila *a* en hojas a temperatura ambiente, se caracterizan por presentar dos bandas, una banda ubicada en el rojo, generalmente conocida como F_{red} centrada alrededor de ≈ 680 nm y otra banda situada en el rojo lejano, conocida como $F_{far-red}$ que se ubica entre los 730 y 735 nm. La contribución de cada fotosistema a cada una de estas bandas es diferente, siendo la banda ubicada en el rojo originada por la emisión del PSII mientras que la banda en el rojo lejano es debida a la emisión de ambos fotosistemas [85, 86]. Por lo tanto, el cociente $F_{red}/F_{far-red}$ depende de la estequiométría de los fotosistemas y por ende se lo ha relacionado ampliamente en la literatura con varios factores de estrés [87-89]. En la [Tabla 7.4](#) se resumen las intensidades de fluorescencia en el rojo (F_{680nm}) de los espectros experimentales y corregidos por reabsorción de luz, así como el cociente entre las bandas en el rojo y rojo lejano ($F_{red}/F_{far-red}$) tras la corrección por reabsorción de luz.

En los espectros experimentales se observa una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia en las hojas tratadas con nanopartículas de carbono. La misma tendencia se observa con los espectros corregidos. Sin embargo, el cociente $F_{red}/F_{far-red}$ se mantiene constante. Dichos cambios en la intensidad de la fluorescencia se visualizan mejor en la [Fig. 7.7](#) en donde se presenta la intensidad de fluorescencia experimental y corregida

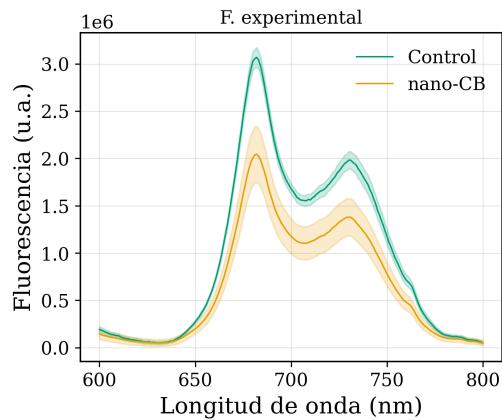
TABLA 7.4: Valores de fluorescencia estacionaria experimental y corregida a 680 nm, y cociente $F_{red}/F_{far-red}$ corregido, para hojas tratadas con nanopartículas de carbono. Los valores entre los diferentes tratamientos marcados por la misma letra (a - d) no fueron significativamente diferentes en $p < 0.05$.

Parámetros	$F_{exp}(680\text{nm})$	$F_{corr}(680\text{nm})$	$F_{red}/F_{far-red}(\text{corr})$
Control	$(3.02 \pm 0.10) \cdot 10^6$ a	$(11.2 \pm 0.6) \cdot 10^7$ a	2.36 ± 0.13
nano-CB	$(2.00 \pm 0.28) \cdot 10^6$ b	$(7.51 \pm 0.11) \cdot 10^7$ b	2.22 ± 0.33
GQD	$(2.48 \pm 0.23) \cdot 10^6$ a	$(9.21 \pm 0.9) \cdot 10^7$ a	2.40 ± 0.25

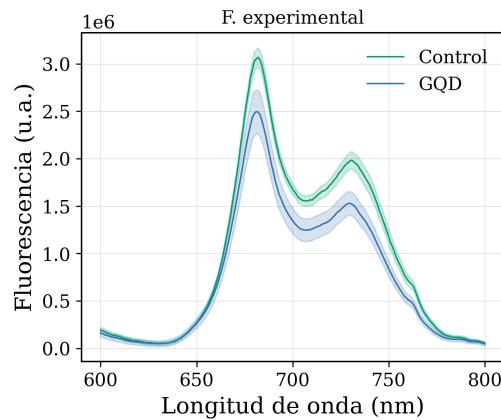
de cada una de las muestras.

La disminución de la fluorescencia, experimental y corregida, en hojas tratadas con ambos tipos de nanopartícula podría relacionarse con el menor contenido de clorofillas obtenida para estas muestras. Sin embargo, no hay consenso en la bibliografía al respecto [85]. También hemos observado una disminución significativa de la fluorescencia de clorofila *a* en hojas tratadas con nanopartículas de oro ([Capítulo 5](#)) pero en ese caso fue acompañado de una disminución en el cociente $F_{red}/F_{far-red}$. En este caso, el cociente no cambia por lo que no habría un cambio en la población relativa de PSI y PSII, como sí ocurrió con las NpAu.

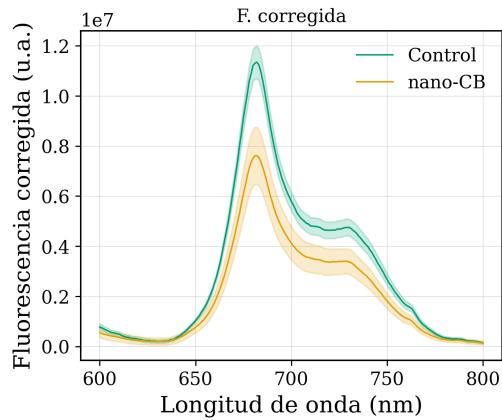
El hecho de que el cociente $F_{red}/F_{far-red}$ se mantenga constante implica que no hay cambios significativos en la población de fotosistemas (PSI y PSII), pero sí podría haber cambios en el tamaño de las antenas, manteniendo la relación de fotosistemas similar entre las muestras y el control. Como el contenido de clorofillas y el cociente Chl *a/b* disminuyen, podría pensarse que hay un aumento del tamaño de la antena del PSII (LHC-II) pero manteniendo la misma proporción de RC y por ende la relación de PSI y PSII no cambiará. Es decir, la misma proporción de PSI y PSII, pero las antenas de los PSII son más grandes (mayor contenido de pigmentos) característico de una respuesta de aclimatación a baja irradiancia o sombreado [90]. Esto último debido a que la antena LHC-II posee una absorción mayor a longitudes de onda corta (la cual está atenuada en la sombra) respecto a la antena LHC-I. Recordemos que la disminución de clorofillas y carotenoides es por área foliar, como las hojas de sombra son más grandes que las de sol, el contenido de pigmentos disminuye en hojas de sombra, cuando en realidad la tendencia por unidad de peso



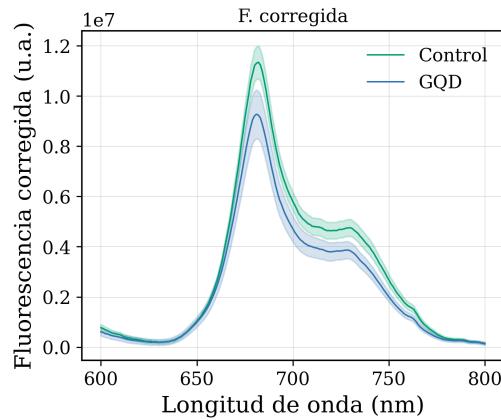
A Fluorescencia experimental de hojas tratadas con nano-CB y el control.



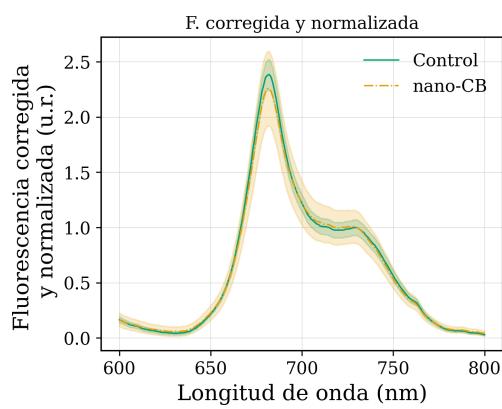
B Fluorescencia experimental de hojas tratadas con GQD y el control.



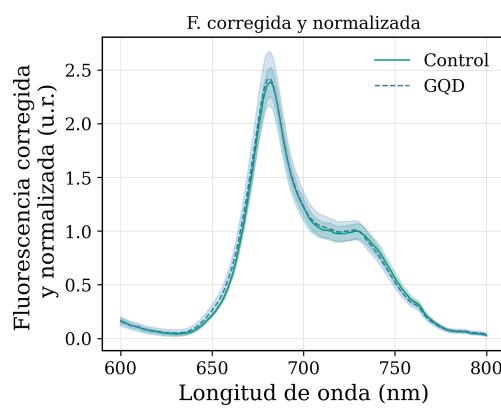
C Fluorescencia corregida de hojas tratadas con nano-CB y el control.



D Fluorescencia corregida de hojas tratadas con GQD y el control.



E Fluorescencia corregida y normalizada de hojas tratadas con nano-CB y el control.



F Fluorescencia corregida y normalizada de hojas tratadas con GQD y el control..

FIGURA 7.7: Espectros de fluorescencia experimental, corregidos por reabsorción de luz y normalizados de hojas tratadas con nanopartículas y hojas control.

seco es inversa [79]. Luego, aunque el tamaño de la antena del PSII depende de las condiciones lumínicas de crecimiento, se ha demostrado que el tamaño de la antena de PSI no cambia [91, 92]. Por otro lado, la emisión observada en estos espectros corresponden

a las clorofilas presentes en los centros de reacción de cada fotosistema, mientras que la absorción es producida en las antenas (detalles en [Capítulo 2](#)).

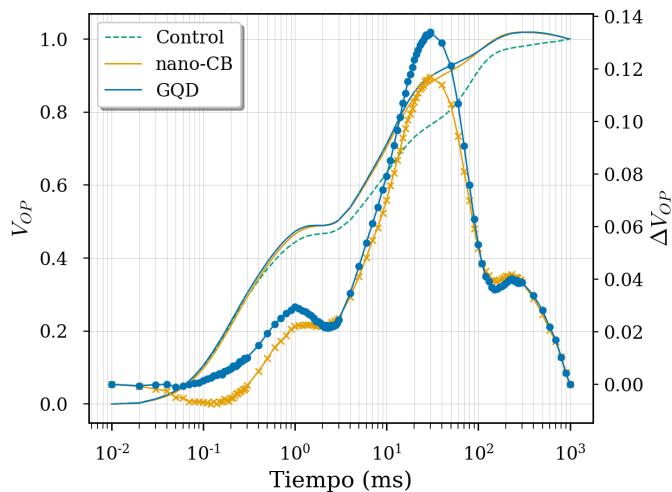
7.3.4. Curvas OJIP y fase I-P

Las curvas de inducción de fluorescencia rápida de Chl *a* proporcionan información sobre el transporte de electrones luego de Q_A en PSII. Las curvas se caracterizan por tres elevaciones rápidas, O-J, J-I e I-P, que reflejan tres procesos de reducción diferentes de la cadena de transporte de electrones [93, 94]. La fase OJ sigue a la reducción del lado aceptor del PSII (Q_A y Q_B); JI representa a la reducción del conjunto de plastoquinonas (PQ) e IP es paralela a la reducción de los aceptores de transporte de electrones en y alrededor del PSI [95-97]. Esto significa que los transitorios OJIP brindan información sobre el estado del transporte electrónico de la cadena fotosintética ([ETC](#)). Schansker y col. demostraron que la amplitud del aumento de I-P se correlaciona muy bien con el transporte de electrones a través del PSI [98]. Además, se demostró que dicha fase es paralela a la re-reducción de plastocianina (PC)⁺ + y P_{700}^+ en el fotosistema I [99].

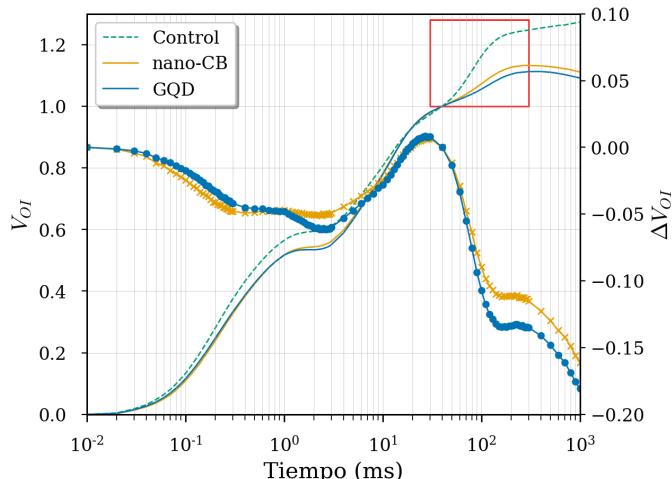
En la [Fig. 7.8](#) se presentan las curvas normalizadas, mientras que en la [Tabla 7.5](#) se presentan distintos valores de fluorescencia en distintos puntos de la curva OJIP y diversos parámetros derivados de la misma.

Se observó una disminución en la fluorescencia inicial, F_0 , del $\approx 10\%$ para ambas muestras de nanopartícula respecto al control. La disminución en este parámetro se corresponde con lo observado por fluorescencia estacionaria. Sin embargo, la fluorescencia en el punto de inflexión J, F_J , no se observaron diferencias significativas, mientras que para F_I se observó un aumento del 13% y para F_M el aumento observado no fue significativo.

Los transientes doblemente normalizadas entre F_0 y F_M se presentan en la [Fig. 7.8 A](#) como fluorescencia relativa variable $V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_P - F_0)$ y $\Delta V_{OP} = V_{OP,muestra} - V_{OP,control}$ en una escala de tiempo logarítmica. Considerando que los diferentes puntos de inflexión en la curva OJIP representan diferentes etapas del transporte electrónico, si se calcula la fluorescencia variable de cada muestra y luego se grafica la diferencia respecto al control, es posible identificar a simple vista las etapas donde ocurren los cambios



A Fluorescencia variable normalizada en los puntos O y P ($V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$) y diferencia en la media de estos valores en relación al control ($\Delta V_{OP} = V_{OP,muestra} - V_{OP,control}$) en función del tiempo.



B Fluorescencia variable normalizada en los puntos O e I ($V_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$) y diferencia en la media de estos valores en relación al control ($\Delta V_{OI} = V_{OI,muestra} - V_{OI,control}$) en función del tiempo. El recuadro rojo resalta la zona correspondiente a la fase I-P.

FIGURA 7.8: Transientes de fluorescencia experimentales, fluorescencia variable normalizada y diferencias respecto al control en función del tiempo. Las curvas representan el promedio de 20 mediciones.

principales en el transiente OJIP [94, 100].

A partir de la Fig. 7.8A se observa una banda ΔV_{OP} que aparece en aproximadamente 2 ms. Como se mencionó en capítulos previos, esta zona depende en gran medida del estado redox de Q_A en el lado aceptor del PSII la cual influye en la probabilidad de que un electrón avance en el transporte de electrones entre sistemas hacia PSI [101]. Por ende, una banda ΔV_{OJ} (punto de ΔV_{OP} a 2 ms corresponde al punto J) positiva, o bien, un rápido

aumento del paso J (más difícil de ver a simple vista) reflejan una acumulación de portadores de electrones reducidos [102]. Una acumulación de Q_A^- puede deberse a un bloqueo del flujo de electrones más allá de Q_A [94]. Un aumento en la concentración de Q_A resulta entonces en la inactivación de los RC del PSII. M_0 , es la pendiente inicial aproximada de la fase O-J que indica la velocidad de cierre de los RC [94]. Los valores obtenidos para M_0 de las muestras y controles fueron similares por lo que no hay evidencia de cambios entre las tasas de reducción de Q_A entre las muestras y el control, lo que sugiere que el bloqueo no es debido a cambios en la actividad redox de los RC del PSII. Los factores que pueden ser los causante de dicho bloqueo, dependerán de los cambios en los demás parámetros derivados de la curva OJIP.

Además, en la Fig. 7.8 A se puede observar fácilmente un aumento de la intensidad de fluorescencia variable en I (30 ms) para ambas muestras de nanopartícula y por consiguiente se reduce la amplitud de la fase I-P respecto al control, como se puede ver en el recuadro de la Fig. 7.8 B. El aumento en la fluorescencia en el punto I se hace aún más evidente en la curva ΔV_{OP} observándose un banda positiva a 30 ms. Cuando esta banda es positiva refleja la inhibición de la reducción de los aceptores de electrones terminales, como Fd_{red} y $NADP^+$, o una menor actividad del PSI [103]. Por ende, se observó una acumulación de Q_A^- y a su vez, una inhibición de la reducción de los aceptores de electrones finales. Ambas variaciones son consistentes con un bloqueo del transporte de electrones más allá de Q_A .

Schansker y cols. [104] revisaron las diferentes interpretaciones y causas posibles de la fase I-P. Los autores, los cuales son reconocidos en el área, concluyeron que un bloqueo transitorio en el lado aceptor del PSI y un atasco de electrones formados transitoriamente en la cadena de transporte de electrones son responsables de la fase de inducción de I-P. Una menor amplitud de I-P sugiere que ambas nanopartículas causaron una pérdida del contenido o actividad del PSI, de acuerdo a publicaciones recientes en el tema [105, 106]. La zona con $\Delta V_{OI} \geq 1$ marcada sobre el gráfico en el rango de tiempo de 30 a 270 ms muestra la fase I-P. La amplitud máxima de la curva V_{OI} , en la zona entre I y P, brinda información sobre el tamaño del conjunto de aceptores de electrones finales en el lado aceptor del PSI. Una amplitud más pequeña como la observada en las muestras nos indica

una reducción sobre el tamaño del *pool* de aceptores de electrones disponible. Ambos tipos de nanopartículas redujeron significativamente la amplitud máxima de las curvas ΔV_{OI} en un 45 %.

Si bien se realizó la doble normalización V_{IP} (normalizado en I y P), no se encontraron diferencias entre las curvas de las muestras y el control. El valor de tiempo donde $V_{IP} = 0,5$ se utiliza para estimar la tasa de reducción del grupo de aceptores de electrones finales del PSI. Como no se observaron cambios en este parámetro entre muestras y controles, dicha tasa de reducción es similar entre las mismas [107]. De acuerdo a lo anterior y los cambios observados en V_{OP} se deduce que, si bien el tamaño del *pool* de aceptores del PSI se reduce, su tasa de reducción se mantiene constante. Yusuf y cols. [103] han sugerido que la regulación del tamaño de dicho *pool* es independiente del cambio de su tasa de reducción.

Además de dichas normalizaciones, es posible obtener información sobre el transporte de electrones a partir del área y el tiempo necesario para alcanzar F_M (t_{Fmax}). El aumento de la fluorescencia observado, particularmente en I, produce una disminución en el área por encima de la curva así como de los parámetros derivados de ella como S_M y N. El área representa el número total de portadores de electrones, y por ende una disminución en el área implica una disminución de dichos portadores [108]. Dado que la mayoría de los portadores de electrones son plastoquinonas (PQs), se suele interpretar también como una disminución del *pool* de PQs, así como también la energía necesaria para cerrar un centro de reacción (RC). El parámetro S_M es el área normalizada y N es el número total de electrones transferidos el cual es proporcional al número de cambios redox de Q_A . Todos estos parámetros dependen directamente del área sobre la curva y disminuyeron significativamente tras el tratamiento con ambas nanopartículas de carbono tal como se puede ver en las [Fig. 7.8](#) y [Tabla 7.5](#).

La disminución en S_M indica que la cadena de transporte de electrones en las plantas tratadas con nanopartículas de carbono contiene un menor número de aceptores de electrones por RC-PSII ya que se requiere menos energía para cerrar dichos RC. Se observó además, una disminución del cociente S_M/t_{Fmax} que expresa el estado redox promedio

de Q_A en el intervalo de tiempo de 0 a t_{Fmax} y, representa la fracción promedio de centros de reacción abiertos durante el tiempo necesario para completar su cierre. Por lo tanto, este parámetro se puede utilizar para la cuantificación de la actividad de transporte de electrones [94]. Tu y colaboradores[109] correlacionaron la disminución de S_M/t_{Fmax} y la perdida de la fase I-P de la curva con una actividad de PSI inhibida que reduce la tasa global del transporte de electrones. La reducción en S_M/t_M indica entonces, que en promedio los RC de las muestras tratadas con nanopartículas están más tiempo cerrados y esto ocurre cuando los aceptores de electrones se encuentran reducidos. Esto refleja que en las muestras hay una menor cantidad de estos aceptores o bien, hay un bloqueo de dicha transferencia. Consecuentemente, un menor número de aceptores (equivalentemente a un *pool* de PQ reducido) produce una disminución de la actividad del PSI el cual permanece más tiempo cerrado (sin poder reducirse por falta de su dador de electrones) y finalmente la tasa global de la cadena de transporte electrónico se reduce.

7.3.5. Parámetros derivados de la curva OJIP

A partir del transiente rápido de fluorescencia de clorofila *a* es posible obtener una gran cantidad de parámetros de las distintas etapas de la cadena fotosintética. Estos parámetros se derivan en base al modelo de Duysens y Sweers (1963), el cual fue descripto en la Sección 3.9. Para un detalle de los cálculo de cada parámetro y su interpretación, ver el Apéndice A.

En la Tabla 7.5 se resumen los parámetros más representativos derivados de la curva OJIP para las muestras y el control. Sin embargo, debido a la gran cantidad de parámetros suele ser más representativa una figura como la Fig. 7.9 en donde se visualizan las amplitudes de diferentes parámetros relativos al control. De esta forma es fácilmente identificable la variación o no, de cada uno de ellos. Si bien se pierde información de las amplitudes absolutas y la estadística, suele ser muy útil para una primera interpretación integrada de los parámetros.

Después de la exposición de las nanopartículas, la mayoría de las relaciones de flujo del PSII se mantienen constantes. Dichos parámetros son: Φ_{P_0} , el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria; Ψ_{ET_0} , la probabilidad de que un excitón atrapado trans-

TABLA 7.5: Efectos de las nanopartículas de carbono en los parámetros derivados de la curva OJIP. ** y * representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente, entre muestra y control, con $n = 12$.

Parámetro	Control	nano-CB	GQD
F_0	433 ± 32	391 ± 35	423 ± 22
F_M	2495 ± 149	2494 ± 268	2596 ± 99
F_J	1458 ± 56	1435 ± 132	1503 ± 80
F_I	2071 ± 124	2215 ± 236 **	2349 ± 81 **
F_V/F_M	0.823 ± 0.005	0.842 ± 0.005 *	0.836 ± 0.005 *
F_V/F_0	4.8 ± 0.4	5.4 ± 0.4 *	5.1 ± 0.4 *
V_K	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.32 ± 0.05
V_J	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.03
V_I	0.80 ± 0.03	0.87 ± 0.02 **	0.89 ± 0.02 **
t_{FM}	370 ± 119	297 ± 54	359 ± 105
Área	$(4.3 \pm 0.5) \cdot 10^4$	$(3.5 \pm 0.6) \cdot 10^4$	$(3.5 \pm 0.6) \cdot 10^4$
S_M	20 ± 1	16 ± 1 **	16 ± 2 **
N	44 ± 2	34 ± 2 **	34 ± 3 **
M_0	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Φ_{P_0}	0.823 ± 0.005	0.842 ± 0.005 *	0.836 ± 0.005 *
Ψ_{ET_0}	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.03
Φ_{ET_0}	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.03
δ_{RE}	0.41 ± 0.06	0.26 ± 0.05 **	0.22 ± 0.04 **
Ψ_{RE_0}	0.20 ± 0.03	0.13 ± 0.02 **	0.11 ± 0.02 **
Φ_{RE_0}	0.17 ± 0.03	0.11 ± 0.02 **	0.09 ± 0.02 **
RC/ABS	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.39 ± 0.04
ABS/RC	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.2
TR/RC	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2
ET/RC	1.11 ± 0.08	1.05 ± 0.07	1.07 ± 0.08
RE/RC	0.44 ± 0.07	0.27 ± 0.05 **	0.24 ± 0.04 **
RC/CS	166 ± 19	159 ± 23	166 ± 14
γ_{RC}	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.02
PI _{ABS}	1.9 ± 0.3	2.2 ± 0.5	2.1 ± 0.5
PI _{ABS} ^{total}	1.3 ± 0.5	0.8 ± 0.3 **	0.6 ± 0.3 **

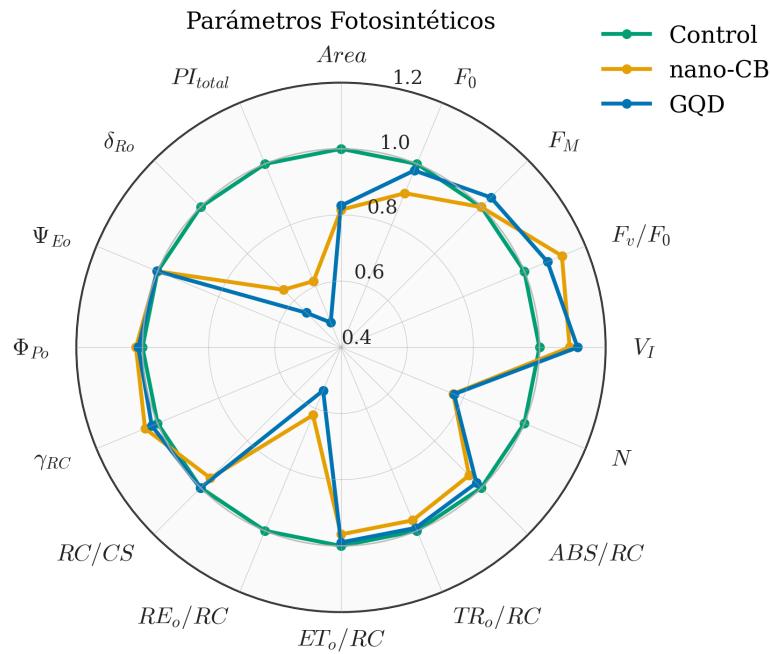


FIGURA 7.9: Gráfico de distribución radial de parámetros OJIP seleccionados para hojas control y tratadas con nanopartículas GQD y nano-CB. Para cada parámetro, el valor del control se estableció como 1.

porte un electrón hacia la cadena de transporte de electrones más allá de Q_A^- ; Φ_{ET_0} , el rendimiento cuántico del transporte de electrones; y Φ_{DI} , la probabilidad de que un fotón absorbido se disipe. Se observó un aumento significativo de Φ_{P_0} y consecuentemente una disminución de Φ_{DI} debido a la relación entre ambos parámetros, mientras que el resto se mantuvo constante.

Por otro lado, los parámetros relacionados con la actividad del PSI disminuyeron drásticamente. Estos parámetros incluyen: δ_{RE} , la eficiencia con el cual un electrón puede moverse desde los aceptores de electrones reducidos entre sistemas a los aceptores de electrones del PSI; Φ_{RE_0} , el rendimiento cuántico del transporte de electrones desde Q_A^- a los aceptores de electrones del PSI; Ψ_{RE_0} , la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón en la cadena de transporte de electrones desde Q_A^- hasta los aceptores del PSI. En la Fig. 7.9, se destaca la disminución en δ_{RE} para ambos tipos de nanopartículas, indicando que tanto nano-CB como GQD inhiben parcialmente la actividad del PSI. Dicha variación en el parámetro δ_{RE} refiere al cambio más significativo en los parámetros derivados en la curva OJIP, reduciendo un $\approx 50\%$ el valor obtenido para el control.

Similar es la tendencia en los flujos de energía específicos por RC los cuales incluyen: absorción (ABS/RC), atrapamiento (TR/RC), transporte de electrones (ET/RC), disipación (DI/RC), y reducción de los aceptores finales en el lado del aceptor de electrones del PSI (RE/RC). Donde la disipación y reducción de aceptores finales disminuye en las hojas tratadas con nanopartículas mientras que el resto permanece constante. Por último, el índice de rendimiento describe la conservación de energía entre los fotones absorbidos por PSII y la reducción de los aceptores de electrones entre sistemas (PI_{ABS}), mientras PI_{ABS}^{total} describe la conservación de energía entre la absorción de fotones y la reducción de los aceptores finales de PSI [110]. Para ambas nanopartículas se observó un aumento no significativo de PI_{ABS} en paralelo a una disminución significativa de PI_{ABS}^{total} .

Muchos estudios han utilizado el máximo rendimiento cuántico fotoquímico ($F_V/F_M = \Phi_{P_0}$), como un indicador del estrés ambiental [111] pero en los últimos años con el impulso que ha tomado el registro e interpretación de la curva OJIP se ha demostrado que no es un indicador útil si el estrés no se produce sobre el PSII. Por ejemplo en este caso, se observó un ligero aumento de Φ_{P_0} pero la eficiencia total del transporte electrónico se ve drásticamente reducida por el efecto inhibidor sobre el PSI o sus aceptores, de acuerdo a la reducción observada en la fase I-P y los parámetros δ_{RE} , Φ_{RE_0} , RE/RC y PI_{ABS}^{total} .

Los resultados muestran que ambos tipos de nanopartículas producen cambios similares y esencialmente negativos en el transporte electrónico fotosintético. Este efecto negativo se caracteriza principalmente por cambios significativos en: (a) una reducción del tamaño del *pool* de plastoquinonas reducidas (área sobre la curva de inducción de fluorescencia de Chl *a*) acompañada de una reducción de S_M y N los cuales indican una disminución de la cantidad de electrones transportados y portadores de electrones reducidos, y (b) un menor índice de rendimiento total desde la absorción hasta los aceptores del PSI (PI_{ABS}^{total}) debido principalmente a una disminución drástica en δ_{RE} el cual refleja una reducción en la probabilidad o eficiencia con la que un electrón puede moverse desde los aceptores de electrones entre sistemas a los aceptores de electrones del PSI. Al mismo tiempo hay algunos parámetros que sufren ligeros cambios en el sentido contrario. Se observó un leve aumento de varios parámetros como la actividad fotoquímica máxima del PSII ($F_V/F_M = \Phi_{P_0}$) y de la eficiencia del complejo que desarrolla oxígeno (OEC, por sus siglas en inglés) en el lado donante del PSII (inferido por el aumento en el cociente F_V/F_0)

[108].

A partir de los cambios observados en los rendimientos cuánticos y eficiencias por fotón absorbido es posible dilucidar el cambio en la proporción de energía que se disipa y se transfiere al centro de reacción. El parámetro Φ_{P_0} corresponde a analíticamente a la proporción de fotones absorbidos que se transfieren al RC del PSII, mientras que Φ_{DI} a la proporción que se disipa incluyendo disipación térmica y radiativa, ya que es energía que no se transfiere al centro de reacción. Se observó que, para ambos tipos de nanopartículas, el Φ_{P_0} aumentó levemente mientras que Φ_{DI} disminuyó. Si observamos en detalle las ecuaciones referidas a ambos rendimientos:

$$\Phi_{P_0} = \frac{TR}{ABS} = \uparrow \quad (7.6)$$

$$\Phi_{DI} = \frac{DI}{ABS} = \downarrow \quad (7.7)$$

$$ABS = TR + DI \quad (7.8)$$

Como ambos rendimientos son cocientes respecto de ABS y uno aumenta y el otro disminuye, los cambios no pueden deberse únicamente a variaciones en el flujo de fotones absorbidos (ABS). Dado que los flujos TR y DI están relacionados, de acuerdo a la conservación de la energía, y como TR aumenta mientras DI disminuye, es posible que ABS se mantenga aproximadamente constante entre las muestras y el control. Este primer resultado es interesante ya que si bien el contenido de pigmentos por área foliar fue menor en las hojas tratadas con nanopartícula, el flujo de fotones absorbidos (ABS) se mantuvo constante. Otro resultado interesante es el cambio en la proporción del flujo transferido al RC del PSII (TR) y el flujo que se disipa. En las muestras resultó mayor la proporción de energía que se transfiere al RC. Esto podría deberse a un aumento de los RC activos del PSII, hipótesis que puede verificarse analizando los parámetros correspondientes.

Por otro lado, es la antena la que transfiere energía al centro de reacción de ambos fotosistemas, y luego ese RC transfiere un electrón al acceptor correspondiente. Una vez hecho esto, el centro de reacción queda cargado positivamente y no puede aceptar un nuevo excitón (esta cerrado). Para el RC del PSII el donor de electrones es el complejo proteico

adyacente que desarrolla oxígeno (comúnmente llamado OEC) mientras que para el caso del RC del PSI este donor es una plastocianina (PC) la cual es el último transportador de electrones de los aceptores intermedios de la cadena de transporte electrónico. Un mal funcionamiento del OEC que es característico del estrés por calor o sequía, entre otros, suele ser acompañado de la aparición de un pico K en la curva OJIP, el cual no se observa en este caso. Sin embargo, se observó un aumento en la eficiencia del OEC (F_V/F_0) lo cual conduce necesariamente a una mejora en la recuperación del RC del PSII (ya que el OEC reduce al RC^+) y por ende debería producir un aumento del transporte de electrones fotosintéticos [108]. No obstante, esto no se observa, ya que el área por encima de la curva de fluorescencia de la clorofila entre F_0 y F_M disminuye considerablemente por lo que si bien el flujo de energía y los electrones transferidos hasta el primer acceptor del RC del PSII aumentarían (en base a los cambios observados en Φ_{P_0} , Φ_{DI} y F_V/F_0) no sucede lo mismo con el flujo de energía en la última etapa del transporte electrónico ni con los electrones totales transferidos (en base a Φ_{RE_0} , δ_{RE} y S_M). Se mantiene entonces la incertidumbre respecto en cual etapa del transporte electrónico luego de Q_A , ocurre la inhibición de dicho transporte.

Otra posibilidad es que la cantidad de centros de reacción estén aumentando, esta posibilidad se descarta debido a que el parámetro ABS/RC se mantiene constante (la disminución de la media es no significativa). ABS/RC representa el tamaño de antena efectiva de un RC activo y se calcula como el número total de fotones absorbidos por las moléculas de clorofila de todos los RC dividido por el número total de RC activos [112]. Por lo tanto, está influenciado por la proporción de RC activos/inactivos. Como ABS es relativamente constante, entonces necesariamente la cantidad de RC activos también lo es. Otro parámetro que refiere a la cantidad de RC es γ_{RC} el cual representa la probabilidad de que una clorofila del PSII funcione como RC [96]. Nuevamente no se observan cambios significativos en este parámetro por lo tanto la probabilidad de que una clorofila actúe como RC entre las muestras y el control se mantiene constante. Por ende, el tamaño relativo de la antena por RC del PSII no sufrió variaciones.

Habiendo descartado un cambio en la cantidad de RC activos o bien, la antena aparente por RC, se pueden discutir los cambios observados en la cadena de transporte electróni-

ca a partir de Q_A . Los parámetros relativos al flujo de transporte de electrones de Q_A a Q_B son relativamente constantes, incluyen: Φ_{ET_0} , Ψ_{ET_0} , ET/RC y V_J . Del análisis de Φ_{P_0} , Φ_{DI} y F_V/F_0 se concluyó que hay una mejora en la tasa de recuperación del RC del PSII y por ende hay un aumento de la tasa de transporte de electrones hasta Q_A . Luego, como ninguno de los parámetros dependientes de dicho transporte (ET) aumenta, sino que son constantes, el aumento en el transporte identificado anteriormente debe ser inhibido o reducido, de forma que tal que finalmente la tasa de transporte electrónico de Q_A a Q_B se mantenga constante. Hasta aquí entonces, uno de los efectos de las nanopartículas es bloquear dicho transporte o la capacidad del PSII de reducir a Q_B .

Luego, las siguientes etapas de la cadena de transporte de electrones desde Q_B hasta los aceptores del PSI se engloban en los parámetros derivados al flujo RE, los cuales disminuyen drásticamente, incluyendo: δ_{RE} , Φ_{RE_0} , Ψ_{RE_0} , RE/RC y V_I . Debido a este bloqueo en el transporte electrónico, se puede concluir que la reducción del área y S_M se deben principalmente a la pérdida de energía (electrones) en etapas de la cadena de transporte electrónico relacionadas al PSI. Lo que no es posible identificar puntualmente, utilizando únicamente los resultados de la curva OJIP, es si dicho bloqueo o inhibición del transporte ocurre justo antes o después del RC del PSI.

En el trabajo de Schansker y cols.[104] describen el comportamiento de la curva OJIP en presencia de metilviológeno (MV) el cual es un aceptor de electrones muy eficaz que compite fuertemente con la ferredoxina por los electrones de los grupos $Fe - S$ del PSI y, como consecuencia, suprime fuertemente la transferencia cíclica de electrones alrededor de PSI [113, 114]. Las curvas presentadas en el trabajo de Schansker y col. (2005) en presencia de MV sufren variaciones muy similares respecto al control de las aquí observadas en las hojas tratadas con nanopartículas. Por ello, estos autores evaluaron diferentes hipótesis respecto a la supresión de la fase I-P. Schansker y cols. concluyen que un bloqueo transitorio en el lado aceptor de PSI y un atasco de electrones formados transitoriamente en la cadena de transporte de electrones son responsables de la fase de inducción de I-P. Tanto en el tratamiento con MV como el de nanopartículas de carbono se caracterizan por la reducción o pérdida de la fase I-P de la curva OJIP. Siendo que está demostrado el efecto que tiene el MV sobre el PSI, es posible plantear como hipótesis que las nano-

partículas tienen un efecto análogo debido a la similitud en los cambios inducidos en la curva OJIP. De esta manera, los cambios que se observan en la curva OJIP producto del tratamiento con nanopartículas de carbono son compatibles con una transferencia de electrones desde PSI a las nanopartículas, es decir, un mecanismo similar al MV bien descripto en bibliografía. Se pone a prueba esta hipótesis de transferencia de carga posteriormente, al registrar la fluorescencia estacionaria de cloroplastos en presencia de nanopartículas (Subsección 7.3.7).

7.3.6. Partición de energía bajo iluminación actínica

Se registró la cinética de Kautksy utilizando el protocolo detallado en la metodología, en el cual se aplicaron tres luces actínicas de intensidad creciente durante el tiempo suficiente para que se alcance un estado estacionario para cada una de ellas. Este tipo de curvas para la el registro de la cinética de Kautsky se suelen denominar *Curve-Light*. Las luces actínicas (LA) aplicadas fueron de 10, 25 y 40 que refieren a intensidades de 12, 185 y $627 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ siendo intensidades baja, media y alta, respectivamente. Al final de cada etapa de iluminación actínica se iluminó la muestra con luz saturante con el objetivo de bloquear el transporte de electrones al excitar todos los RC del PSII disponibles y así obtener los parámetros fotosintéticos principales.

Los rendimientos cuánticos del fotosistema II (Φ_{PSII}), fotofísico (Φ_{C}) y del *quenching* no fotoquímico (Φ_{NPQ}) están relacionados y suman 1 en total. Por ello, en la Fig. 7.10 donde se muestran estos parámetros se debe observar que la suma de los tres desde la base de las barras suman 1 justamente. Esto se debe a que en el modelo utilizado para describir la cinética de Kautsky por cada fotón absorbido en la antena LHC-II que llega al centro de reacción del PSII, este puede disiparse como calor o emitiendo un fotón (con una constante específica de velocidad k_c), puede inducir el proceso de fotosíntesis reduciendo el primer aceptor electrónico (k_p) o bien puede iniciar procesos fisiológicos que facilitan la liberación del exceso de energía en forma de calor denominados en conjunto como *quenching* no fotoquímico (k_{NPQ}).

A baja iluminación actínica, $12 \mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se observa a simple vista en la Fig. 7.10 que si bien los cambios no son abruptos, hay un aumento significativo del Φ_{NPQ} en las hojas tratadas con nanopartícula en decremento del Φ_{PSII} , manteniendo Φ_{C}

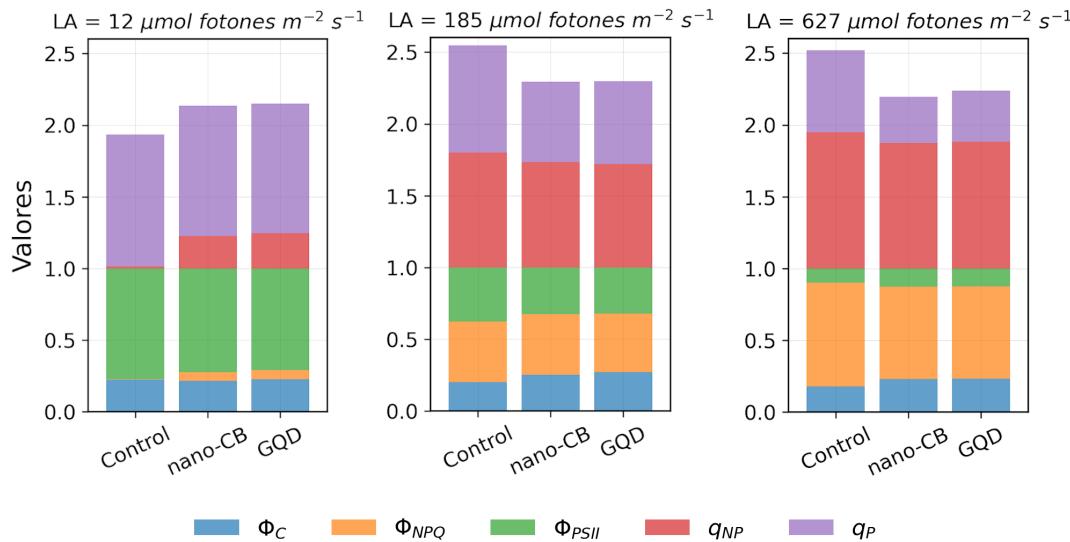


FIGURA 7.10: Rendimientos cuánticos y *quenching* fotoquímico y no fotoquímico para las muestras y controles a diferente iluminación actínica (de izquierda a derecha: 12, 185 y 627 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

constante. Esto nos indica que las hojas tratadas con GQD y nano-CB, aún a bajas iluminaciones actínicas requieren disipar exceso de energía mediante mecanismos de NPQ, a diferencia del control. Esto podría ser indicio de algún tipo de estrés ya que a baja LA es baja la proporción de centros de reacción excitados por lo que no debería ser necesario un mecanismo de disipación de exceso de energía como son los mecanismos del NPQ. A medida que aumenta la intensidad de la luz actínica, mayor es la proporción de energía disipada como NPQ por fotón absorbido y consecuentemente menor la que se utiliza para la fotosíntesis. Luego, entre muestras y control la relación se invierte y a alta iluminación actínica las hojas tratadas con nanopartículas poseen significativamente menor Φ_{NPQ} que el control. A LA intermedia las muestras y el control poseen similar Φ_{NPQ} .

La variación de los rendimientos cuánticos a distintas LA se estudiaron principalmente en plantas aclimatadas a diferentes intensidades lumínicas. Las respuestas de estos parámetros frente al tratamiento con nanopartículas de carbono se asemeja a la respuesta observada en plantas aclimatadas a baja irradiancia respecto a un control aclimatado a irradiancia media (tal como es esperado). Si bien son pocos los trabajos donde se determinan estos rendimientos cuánticos bajo distintas luces actínicas, la respuesta típica es un aumento del NPQ en función de LA [85, 115, 116]. A continuación se analiza la tendencia de dicho cambio, ya que a bajas LA y altas LA la relación del NPQ entre muestras y control

se invierte.

Debido a que el NPQ es uno de los principales mecanismos utilizados por las plantas superiores para hacer frente al exceso de luz, la respuesta lumínica del NPQ refleja la saturación de la tasa fotosintética, aumentando rápidamente cuando la fotosíntesis neta por fotón absorbido satura [117-119]. Sin embargo, el aumento del NPQ está limitado por la capacidad intrínseca de la hoja para disipar ese exceso de luz en forma de calor. Por ejemplo, Serôdio y Lavaud [118] informaron que las plantas cultivadas en condiciones de alta irradiancia desarrollaron un *pool* de xantófilas más grande para disipar más energía lumínica en exceso, en comparación con las plantas cultivadas con iluminación baja o intermedia [116-118, 120]. Como resultado, el NPQ satura a niveles más bajos de LA en plantas cultivadas con luz intermedia-baja, en comparación con plantas cultivadas con mucha luz, donde la respuesta del NPQ a la LA puede parecer lineal para el mismo rango de iluminación que las anteriores. La relación directa entre NPQ y el ciclo o el contenido de xantófilas está bien establecido, particularmente es claro que las xantófilas son importantes para el componente q_E del NPQ que se desarrolla y se relaja rápidamente, pero que también contribuye al componente q_I de relajación lenta [121, 122]. El comportamiento del NPQ en función de la intensidad de LA en plantas aclimatadas a diferente intensidad lumínica se ha reportado previamente [85, 118, 123], habiéndose discutido algunos resultados en el [Capítulo 4](#). En el trabajo resumido en dicho capítulo, también se observó que a bajas LA, las plantas aclimatadas a baja irradiancia tenían un mayor NPQ que las hojas aclimatadas a irradiancia media, mientras que a altas LA esta tendencia se invierte.

Por ende, el menor Φ_{NPQ} observado en las muestras con nanopartículas a altas LA no se debe a que la fotosíntesis sea mayor que en el control, sino que los mecanismos del NPQ están saturados debido a que las muestras con nanopartículas poseen un *pool* de xantófilas menor que las hojas del control. Esto último está en sintonía con lo observado por extracción de pigmentos, tanto en el contenido de carotenoides como en el cociente Chls/Cars, así como también en los índices espectrales, particularmente el índice PRI que está relacionado al ciclo de xantófilas. De esta manera es posible relacionar la disminución del contenido de carotenoides totales en las hojas tratadas con nanopartículas con un posible efecto de sombreado, producto de su absorción en la zona del UV cercano y el azul del espectro electromagnético. Este menor contenido de carotenoides produce un

respuesta limitada del NPQ, particularmente en el mecanismo que involucra el ciclo de xantófilas. En dicho ciclo, la conversión entre xantófilas se induce por un Δ pH intermembrana generado por el transporte electrónico fotosintético. De esta forma se produce la conversión a zeaxantina la cual induce la disipación térmica de la energía de excitación absorbiendo dicha energía de las moléculas de Chl *a* excitadas (más detalle en [Capítulo 2](#)) [119]. Luego, frente a otras situaciones de estrés como sequía y deficiencia de nutrientes, se observa generalmente un aumento del NPQ para una dada LA [124]. Como aquí se observa esto solo a bajas LA, se deduce que el factor relativo al ciclo de xantófilas es el cambio dominante entre las muestras y el control. Un menor NPQ a altas irradiancias produce un aumento de los RC sobre-excitados (aumenta su tiempo de vida) que al no desactivarse por mecanismos del NPQ pueden formar especies reactivas de oxígeno que dañan el aparato fotosintético afectando negativamente la salud de la planta.

Luego, los cambios observados en Φ_{PSII} poseen una tendencia inversa al Φ_{NPQ} . A bajas LA, se espera un valor alto de Φ_{PSII} y uno menor a mayor LA. No debe confundirse un menor Φ_{PSII} a altas LA con una menor fotosíntesis ya que Φ_{PSII} es un rendimiento cuántico y está normalizado por fotón absorbido. A mayor LA, mayor es en valor absoluto la cantidad de fotones absorbidos y también lo es la cantidad de aceptores de electrones reducidos en la cadena de transporte electrónico fotosintético y por ende mayor es la fotosíntesis neta. Sin embargo, en términos relativos a la energía absorbida, a mayor LA, mayor es la energía disipada por mecanismos de NPQ, y menor es la utilizada para iniciar la fotosíntesis [125]. Luego, otro fenómeno que se observa es la saturación de la fotosíntesis. A diferencia de la saturación de los mecanismos del NPQ (que puede o no observarse ya que depende de la planta y las condiciones de aclimatación), la saturación de la tasa fotosintética siempre se observa a una dada LA suficientemente alta. Como hay un número finito de aceptores de electrones, la cantidad de electrones transportados en la cadena también lo es y por lo tanto a muy altas LA (según la planta y las condiciones) los aceptores de electrones se pueden reducir por completo y por ende la fotosíntesis alcanza un valor de saturación (más detalles en [Subsección 2.4.2](#)). Debido a que el parámetro Φ_{PSII} no refleja realmente la fotosíntesis neta sino más bien la actividad del PSII, se utiliza el producto entre Φ_{PSII} y la intensidad de la luz actínica, dando como resultado el parámetro PS_{rate} , que posee una buena correlación con la tasa fotosintética del PSII. Dicho parámetro aumenta con la

intensidad de LA hasta que se alcanza una meseta característica de la saturación fotosintética. En los resultados aquí presentados, se observó un menor Φ_{PSII} y PS_{rate} en las hojas tratadas con nanopartícula a baja LA respecto al control. Luego, a LA medias y altas no se observan cambios significativos entre las muestras y el control, para ambos parámetros. Un menor Φ_{PSII} de las hojas tratadas con nanopartículas de carbono (y un mayor Φ_{NPQ}) a baja LA, es un indicador de que la actividad fotosintética del PSII se encuentra reducida y es una respuesta típica frente a estrés del aparato fotosintético [126].

Otro parámetro que sigue la tendencia observada entre hojas de plantas aclimatadas a baja y alta irradiancia es el F_S , que corresponde a la emisión de fluorescencia de hojas bajo iluminación actínica en estado estacionario. Las plantas han desarrollado mecanismos activos para ajustar la fotosíntesis neta y el NPQ, pero no así F_S . F_S es un residuo de des-excitación de la luz que no se utiliza para la fotosíntesis ni se disipa térmicamente. Serôdio y Lavaud [118] reportaron que este parámetro disminuye en plantas aclimatadas a alta irradiancia respecto a plantas aclimatadas a baja irradiancia. Por otro lado, Cendrero-Mateo y cols. [124] observaron que frente a estrés por deficiencia de nutrientes el F_S tiende a aumentar. Estos autores también detectaron un aumento a LA intermedias y una disminución a altas LA en el F_S . Esta tendencia también se observa en la [Tabla 7.6](#). La tendencia de este parámetro con LA está fuertemente relacionada con el *quenching* fotoquímico (q_P). El q_P es la proporción de energía utilizada para iniciar la fotosíntesis y es proporcional a la fracción de RC abiertos del PSII en estado estacionario. Bajos valores de q_P indican que la mayoría de los RC de PSII están cerrados y su Q_A está en el estado reducido [127, 128]. Los valores cercanos a 1 indican que Q_A está en estado oxidado y casi todos los centros de PSII están abiertos. A medida que aumenta la luz actínica, aumenta la proporción de RC cerrados y q_P disminuye, tal como se observa en la [Fig. 7.10](#). Por ende, menores q_P observados en las muestras indican que una mayor proporción de los RC están cerrados y que una mayor proporción de Q_A están reducidos. Esto implica que en las muestras tratadas con nanopartículas se alcanza la saturación del transporte de electrones más fácilmente (con menor cantidad de fotones) que las hojas control. Cabe resaltar que el q_P a bajas LA en muestras y control son similares, pero decae más fuertemente para las muestras que para el control conforme LA se incrementa.

En resumen, la tendencia general de los parámetros fotosintéticos en función de la LA es

TABLA 7.6: Parámetros derivados de la cinética de Kautsky a diferentes intensidades de luz actínica. ** y * representan diferencias estadísticamente significativas al nivel $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente, entre muestra y control.

Parámetros	LA	Control	nano-CB	GQD
F_0	-	205 ± 19	202 ± 14	211 ± 18
F_M	-	1300 ± 88	1259 ± 84	1252 ± 137
F_V	-	1094 ± 72	1056 ± 72	1042 ± 124
F_V/F_M	-	0.84 ± 0.01	0.84 ± 0.00	0.83 ± 0.01
F_V/F_0	-	5.3 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.4
	10	1281 ± 66	$1020 \pm 178 *$	$995 \pm 143 **$
F_M'	25	424 ± 77	484 ± 78	500 ± 140
	40	260 ± 45	$335 \pm 38 *$	$330 \pm 35 *$
	10	293 ± 35	274 ± 21	285 ± 24
F_S	25	263 ± 34	321 ± 29	$336 \pm 82 *$
	40	234 ± 37	$291 \pm 29 *$	$289 \pm 34 *$
	10	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.02
Φ_C	25	0.20 ± 0.02	0.26 ± 0.01	$0.27 \pm 0.07 *$
	40	0.18 ± 0.02	$0.23 \pm 0.01 **$	$0.23 \pm 0.04 **$
	10	0.00 ± 0.01	$0.06 \pm 0.05 *$	$0.06 \pm 0.03 *$
Φ_{NPQ}	25	0.42 ± 0.06	0.42 ± 0.09	0.41 ± 0.09
	40	0.72 ± 0.03	$0.64 \pm 0.04 **$	$0.64 \pm 0.03 **$
	10	0.77 ± 0.02	0.72 ± 0.05	$0.71 \pm 0.04 *$
Φ_{PSII}	25	0.38 ± 0.05	0.33 ± 0.09	0.32 ± 0.07
	40	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.12 ± 0.03
	10	9.3 ± 0.2	8.7 ± 0.6	$8.5 \pm 0.4 *$
PS_{rate}	25	63 ± 11	80 ± 23	$79 \pm 16 *$
	40	62 ± 11	80 ± 22	$78 \pm 16 *$
	10	0.92 ± 0.02	0.91 ± 0.02	0.90 ± 0.02
q_P	25	0.75 ± 0.05	$0.56 \pm 0.11 **$	$0.58 \pm 0.10 **$
	40	0.57 ± 0.20	$0.32 \pm 0.07 **$	$0.36 \pm 0.10 **$
	10	0.02 ± 0.05	$0.23 \pm 0.15 **$	$0.25 \pm 0.10 **$
q_{NP}	25	0.80 ± 0.06	0.73 ± 0.06	0.72 ± 0.12
	40	0.95 ± 0.03	$0.88 \pm 0.03 **$	$0.88 \pm 0.04 **$

la esperada. Adicionalmente, las diferencias entre las muestras y el control a LA bajas e intermedias es la típica respuesta frente a estrés donde el rendimiento fotoquímico del PSII disminuye y es menor la población de RC reducidos (Φ_{PSII} y q_P). Sin embargo, otras variaciones requieren de un mayor análisis, como la disminución de la energía disipada mediante mecanismos no-fotoquímicos en las muestras. En la mayoría de los estudios previos en el tema [85, 115, 120, 124, 129], un aumento de Φ_{PSII} suele ir acompañado de una disminución de Φ_{NPQ} , ya que Φ_C se mantiene constante. El Φ_C es el rendimiento cuántico fotofísico y considera la desactivación del estado excitado del RC de PSII por decaimiento radiativo (fluorescencia) y no radiativo (calor). Dicho parámetro suele ser constante en un amplio rango de LA y se encuentra habitualmente entre 0,2 y 0,3. Si bien los valores obtenidos se encuentran dentro del rango esperado, el Φ_C en las hojas tratadas con nanopartículas de carbono es significativamente mayor que en las hojas control, para LA media y alta. Si bien el aumento de Φ_C es consistente con el de F_S , al no haber referencias en bibliografía de un agente o situación que produzcan un aumento de Φ_C solo es posible discutir su implicancia de manera teórica. No es este el caso del Φ_{NPQ} para el cual, dada la existencia de estudios previos, es posible relacionar la variación observada en este parámetro con un cambio en el contenido de carotenoides en las plantas tratadas con nanopartículas [120]. Teóricamente, Φ_C podría estar aumentando al incrementarse la tasa de desactivación fotofísica: es decir si el RC se desactiva en mayor medida por fenómenos no radiativos o emisión de fluorescencia respecto al control. Cabe resaltar la diferencia fundamental con los resultados obtenidos para las nanopartículas de oro ([Capítulo 5](#)) donde se observó un incremento en el Φ_{PSII} abrupto (y parámetros asociados). En ese caso, los resultados indicaban un aumento de la tasa fotosintética (transferencia de carga), por lo que era posible suponer que el efecto se debía a una transferencia de carga adicional entre el RC y las NpAu. En este caso, Φ_{PSII} no se ve afectado en gran medida, pero Φ_{NPQ} y Φ_C sí, por lo que el efecto de estas nanopartículas en la fotoquímica del aparato fotosintético es, en principio, diferente al efecto producido por las NpAu.

7.3.7. Estudio de transferencia de energía

En esta sección se describen los resultados de dos experimentos en los cuales se combinaron cloroplastos con nanopartículas de carbono a diferente concentración y se registraron los espectros de emisión a longitudes de onda asociadas con la excitación de las

nanopartículas y los cloroplastos, respectivamente. En ambos casos se tomó una alícuota constante de cloroplastos y se fueron añadiendo volúmenes crecientes de nanopartícula (más detalles en la [Subsección 7.2.10](#)). El objetivo de dichos experimentos fue estudiar la posibilidad de una transferencia de energía o carga entre cloroplastos y nanopartículas de carbono, hipótesis que es capaz de justificar múltiples variaciones observadas en los parámetros fotosintéticos previamente reportados. En las siguientes secciones se muestran los resultados obtenidos para cada nanopartícula (nano-CB y GQD), separadamente.

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) involucra una molécula donante (D) en estado excitado y una molécula aceptora (A) en estado fundamental. Las moléculas donantes normalmente emiten en longitudes de onda más cortas que se superponen con el espectro de absorción del aceptor. La transferencia de energía ocurre sin la aparición de un fotón y es el resultado de interacciones dipolo-dipolo de largo alcance entre el donante y el aceptor. Se prefiere el término más general, transferencia de energía por resonancia (RET), porque el proceso no implica la aparición de un fotón. La tasa de transferencia de energía depende fuertemente de la extensión del solapamiento espectral del espectro de emisión del donante con el espectro de absorción del aceptor, entre otros como: el rendimiento cuántico del donante, la orientación relativa de los dipolos de transición, y la distancia entre las moléculas.

7.3.8. Transferencia de energía entre cloroplastos y GQD

En la [Fig. 7.11 A](#) se muestra un espectro de absorción de un extracto de clorofillas (que contienen clorofillas y carotenoides) superpuesto a la emisión de las nanopartículas GQD, mientras que en la [Fig. 7.11 B](#) se presentan el espectro de absorción de las nanopartículas superpuesto a la emisión de los cloroplastos. Estas figuras permiten diferenciar entre donar y aceptor frente a una posible transferencia de energía. El espectro de absorción corresponde a un extracto de pigmentos de una muestra de cloroplastos, y se utilizó este espectro aquí debido a que la absorbancia registrada en los cloroplastos está distorsionada por la dispersión de estas micropartículas en solución, especialmente en la zona del azul del espectro electromagnético. Dado que la proporción de pigmentos es análoga a la que hay en cloroplastos, no afecta al análisis preliminar que aquí se realiza. Adicionalmente, en la [Fig. 7.11](#) se incluyó una matriz de emisión de las nanopartículas y de un extracto

de pigmentos para visualizar las áreas en donde se observa emisión para ambos sistemas. De acuerdo a lo mencionado previamente, las longitudes de onda de excitación elegidas fueron 360 nm y 480 nm, ya que corresponden a las longitudes de onda de excitación que conducen a la máxima emisión para nanopartículas GQD y cloroplastos, respectivamente.

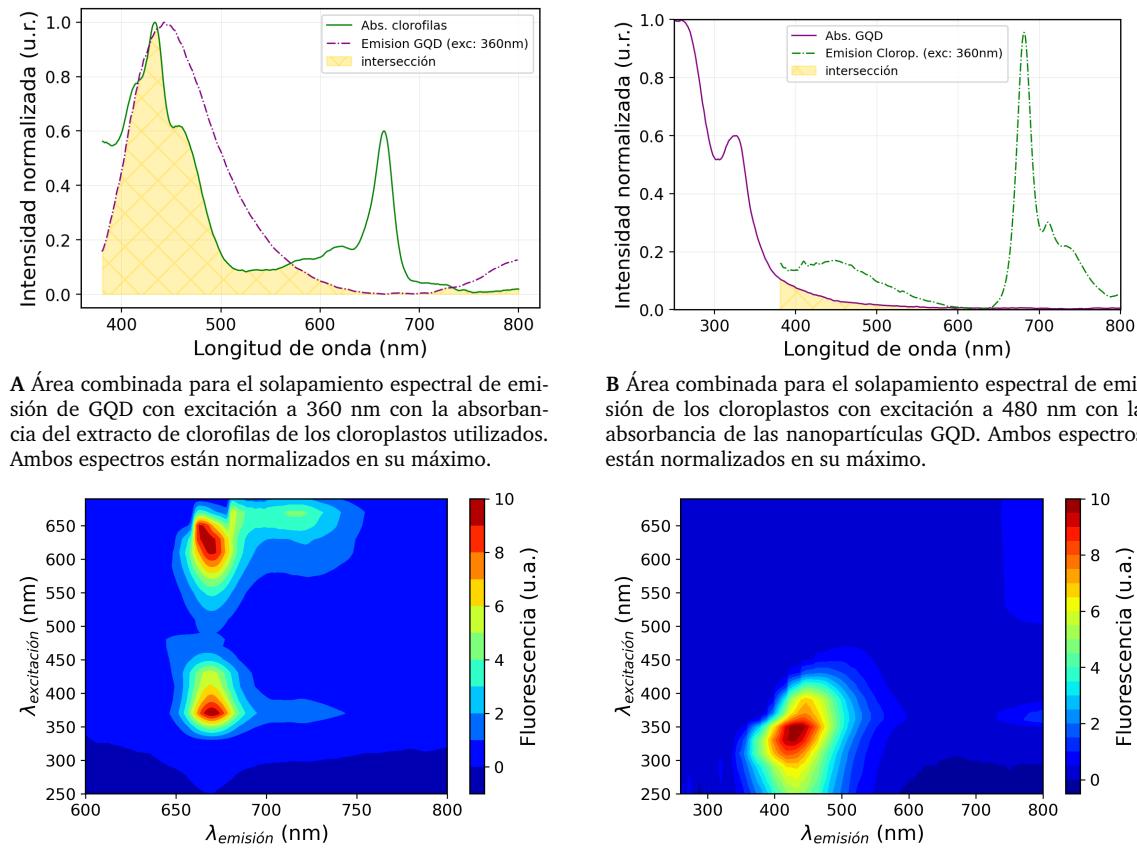


FIGURA 7.11: Superposiciones espetrales para la emisión y absorción entre cloroplastos y nanopartículas GQD y matrices de emisión de cada sistema.

Como se puede ver en la Fig. 7.11 A, hay una gran área donde se superpone el espectro de emisión de las nanopartículas con el de absorción de las clorofillas. Esto permitiría la transferencia de energía desde las nanopartículas (donor) a las clorofillas en los cloroplastos (aceptor), particularmente al estado S_2 de las clorofillas el cual se corresponde con la banda de absorción en el azul (más detalle en Fig. 2.4 en el Capítulo 2). Por otro lado, la transferencia inversa desde los cloroplastos hacia la nanopartícula es mucho menos probable dado el pequeño solapamiento observado en la Fig. 7.11 B. Además, las clorofillas no son responsables de la emisión en la zona del verde en los cloroplastos, sino los compuestos polifenólicos. Otra cuestión interesante es que la banda que aparece en el NIR en la

emisión de las nanopartículas no se corresponde con ninguna banda de absorción en esa zona.

En la Subsección 7.2.10 de materiales y métodos de este capítulo se informaron los volúmenes utilizados para preparar las muestras (Tabla 7.1). Se prepararon siete muestras desde Exp.0 a Exp.6 donde la concentración de cloroplastos disminuyó levemente por la dilución y la de GQD aumentó en un factor de ≈ 10 . Chandra y cols.[10] observaron transferencia de energía desde nanopartículas de carbono a los cloroplastos. Si bien esa transferencia es factible según la Fig. 7.11, no se la observó en nuestros experimentos. Más aún, en este trabajo, se observó quenching de la fluorescencia de los cloroplastos en presencia de las nanopartículas, tal como se muestra a continuación. Dado que las absorbancias de las muestras no eran suficientemente bajas como para que la fluorescencia fuera linealmente dependiente de la concentración, se corrigieron los espectros por efectos de filtro interno. A continuación en la Fig. 7.12 se muestran los espectros de fluorescencia de mezclas de cloroplastos y GQD corregidos tanto por filtro interno como por el factor de dilución.

Previamente a los resultados aquí informados, se realizó un experimento con concentraciones de cloroplastos similares a las informadas por Chandra y cols.[10], cuyo trabajo se utilizó como base. En ese trabajo se adicionaron volúmenes crecientes de cloroplastos a un volumen de nanopartículas. Sin embargo, la concentración de los cloroplastos resultaba ser tan elevada que distorsionaba sensiblemente los espectros de emisión en la zona donde emiten las nanopartículas. Se decidió mantener la concentración de cloroplastos constante y menor, y añadir volúmenes crecientes de GQD como se describió anteriormente. La intensidad de la fluorescencia tanto de las nanopartícula como de los cloroplastos resultaron similares.

Se realizaron controles de nanopartícula y cloroplastos, es decir, mezclas de cloroplastos y agua y mezclas de GQD con *buffer*. En la Fig. 7.13 se muestran los espectros de fluorescencia (excitando a 360 y a 480 nm) corregidos por efecto de filtro interno y por dilución, y los espectros de absorbancia correspondientes, para controles de cloroplastos.

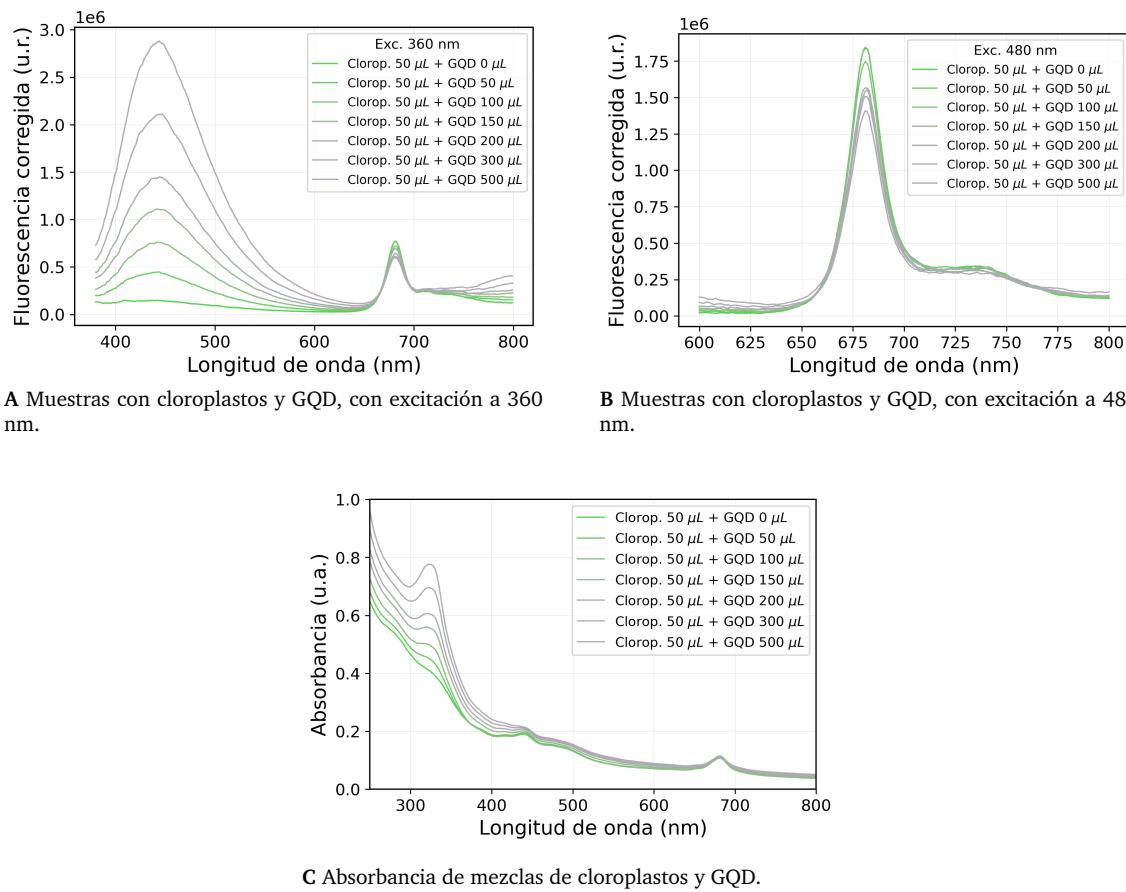


FIGURA 7.12: Espectros de fluorescencia corregidos por filtro interno y por dilución para las distintas muestras con excitación a 360 y 480 nm.

En las mezclas de cloroplastos y nanopartículas (Fig. 7.12) frente al aumento de la concentración de GQD, disminuye la emisión de la banda correspondiente a los cloroplastos (\approx 680-730 nm) a ambas longitudes de onda de excitación. Esta variación no puede atribuirse al factor de dilución porque este último está ya considerado. Esta misma disminución en la intensidad de la banda de emisión de los cloroplastos no se observa en los espectros obtenidos para el control de cloroplastos (Fig. 7.13). El *quenching* de fluorescencia de la clorofila *a*, en presencia de nanopartículas, excitando tanto a 360 nm como a 480 nm, podría deberse a una simple atenuación del haz de excitación por la presencia de las nanopartículas o a una transferencia de energía del estado excitado de la clorofila hacia la nanopartícula. Un incremento de la emisión de las nanopartículas en presencia de cloroplastos, podría ser indicio de este último caso. Para aclarar estos aspectos, se obtuvieron los espectros de emisión de las nanopartículas, en ausencia de cloroplastos (Fig. 7.14) y se compararon con los obtenidos en la Fig. 7.12.

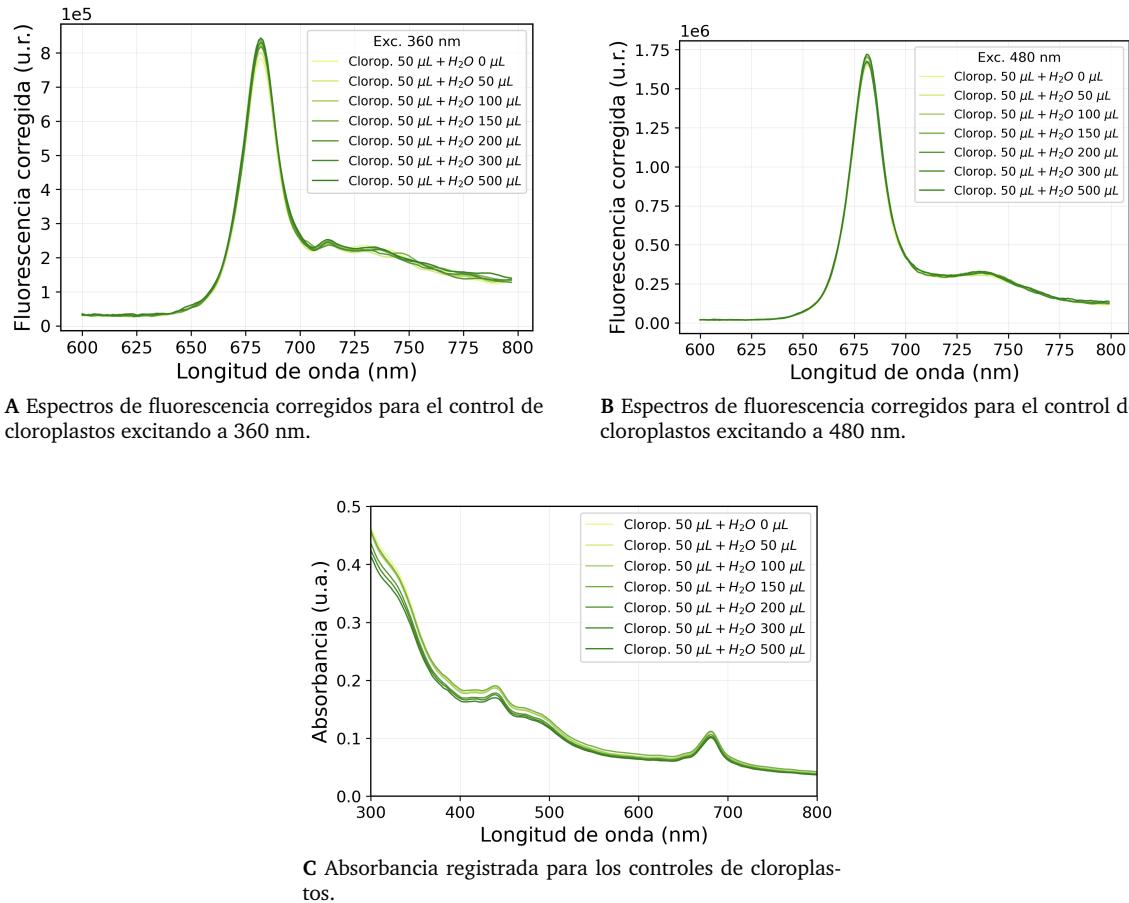
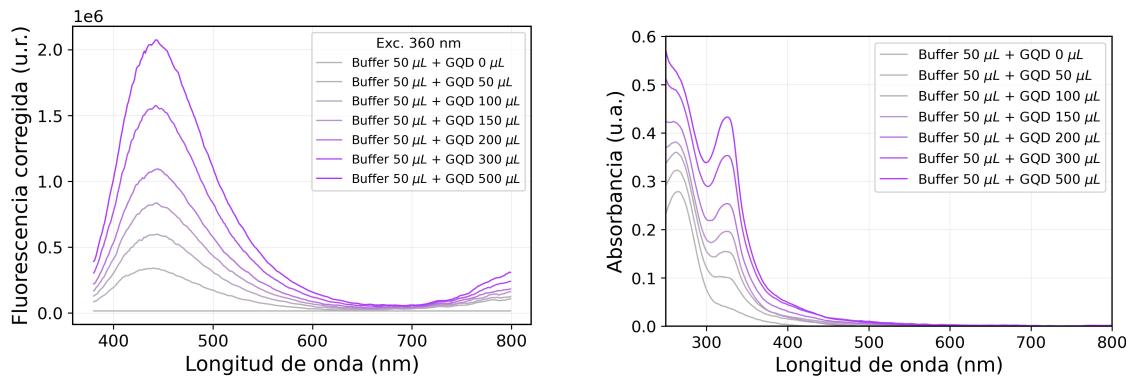


FIGURA 7.13: Espectros de fluorescencia corregidos y absorbancia para el control de cloroplastos.

Está bien establecido en bibliografía que las nanopartículas de carbono (específicamente puntos cuánticos de carbono) pueden aceptar electrones o energía de una gran variedad de compuestos [130, 131] y de acuerdo con la Fig. 7.11 A existe una superposición no nula en los espectros. Sin embargo, la banda de emisión principal de las nanopartículas se encuentra a menores valores de longitud de onda (mayor energía) que la banda de emisión principal de los cloroplastos; por lo que se podría suponer que una transferencia desde el S_1 de la clorofila en los cloroplastos hacia la nanopartícula no es viable. En el Capítulo 2 se comentó que la clorofila posee dos estados excitados singlete, S_1 y S_2 . La absorción en el azul corresponde a la transición al estado S_2 y la absorción en el rojo al estado S_1 (más detalles en Fig. 2.4). Sin embargo, la emisión se observa desde el estado S_1 dado que los electrones en S_2 decaen no radiativamente a S_1 . Desde el estado S_1 ocurren los procesos fotoquímicos conocidos de la especie. Por lo tanto, no se debe descartar una transferencia de energía desde el estado S_2 de los cloroplastos a las nanopartículas [132].



A Espectros de fluorescencia corregidos para el control de GQD excitando a 360 nm.

B Absorbancia registrada para los controles de GQD.

FIGURA 7.14: Espectros de fluorescencia corregidos y absorbancia, para las distintas concentraciones de nanopartículas en ausencia de cloroplastos.

En la Fig. 7.14 se muestran los espectros de fluorescencia corregidos y la absorbancia para soluciones de nanopartículas en ausencia de cloroplastos. De acuerdo a la matriz de emisión presentada anteriormente, se observó que la emisión de las nanopartículas con excitación a 480 nm es despreciable entre 650 y 750 nm, por lo que no se registraron esos espectros para este experimento. Por ende, a 480 nm solo los cloroplastos presentan absorción apreciable. Es importante destacar que para corroborar una transferencia de energía de este tipo, el estudio debería complementarse con estudios de cinéticas resueltas en el tiempo ultra-rápidas.

En la Fig. 7.15 se muestran gráficos de Stern-Volmer para el *quenching* de fluorescencia de los cloroplastos en presencia de nanopartículas.

En la Fig. 7.15 A, se observa claramente el *quenching* de la fluorescencia de la clorofila y a partir de los gráficos de Stern-Volmer, se calculó un valor de K_{SV} a ambas longitudes de onda (360 y 480 nm) de $\approx 7.68 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

El *quenching* de fluorescencia alcanza una aparente saturación a $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (moles de NP /L) de GQD, y por ende la regresión lineal se realizó solo hasta ese punto. Está bien establecido en proteínas que dada la diferente accesibilidad de los residuos de triptofano, se observa *quenching* únicamente de aquellos residuos accesibles para el *quencher* [48]. Los gráficos de Stern-Volmer para estos casos usualmente poseen una tendencia asintótica

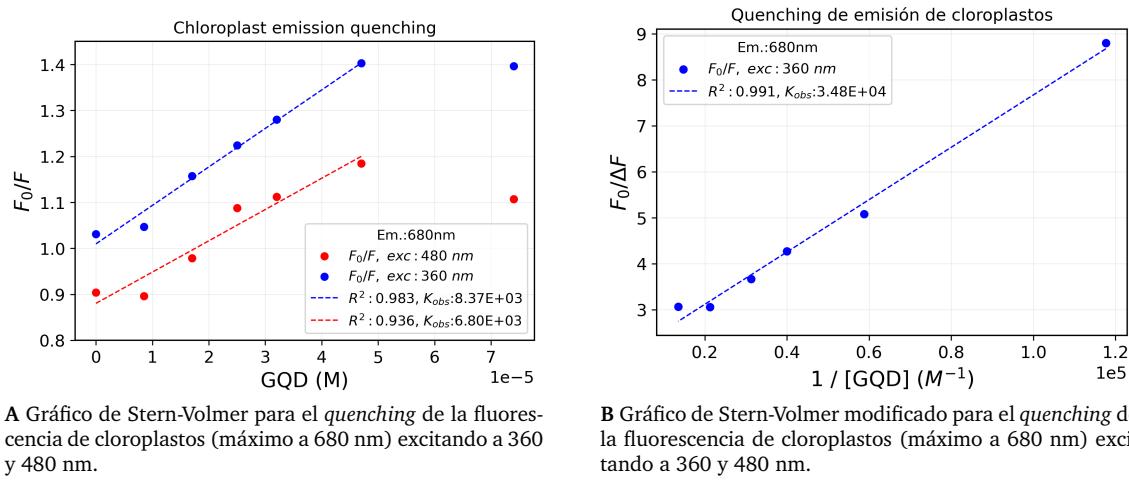


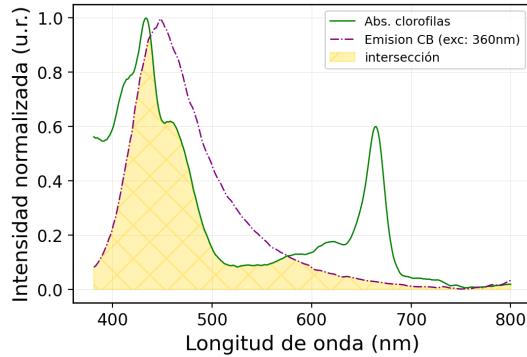
FIGURA 7.15: Gráficos de Stern-Volmer y Stern-Volmer modificado para distintas muestras de cloroplastos y GQD.

como la aquí presentada en la Fig. 7.15 A. En estos casos se puede suponer la existencia de dos poblaciones de fluoróforos, aquellos accesibles e inaccesibles para el *quencher* y plantear la ecuación de Stern-Volmer únicamente para la población accesible. Reordenando luego dicha ecuación, se encuentra una relación lineal entre $F_0/\Delta F$ y $1/[Q]$, de cuya ordenada al origen y pendiente se obtienen la fracción de fluoróforo accesible al *quencher* (f_a) y la constante cinética asociada al proceso (K_{obs}). De esta forma, únicamente para evidenciar que el comportamiento observado se debe principalmente a la existencia de clorofila que es inaccesible a las GQD, se presenta el gráfico de Stern-Volmer modificado en la Fig. 7.15 B. No se encontró un comportamiento lineal para los datos obtenidos bajo excitación a 480 nm, pero sí bajo excitación a 360 nm con mejor ajuste respecto al Stern-Volmer de la Fig. 7.15 A. Se obtuvo una constante cinética un poco mayor que la obtenida previamente, de $3.45 \times 10^4 M^{-1}$ y una fracción de fluoróforo accesible del 0.5 (50%). La transferencia de energía aquí descripta puede ser uno de los factores que conducen a la disminución de la fluorescencia observada en hojas tratadas con GQD, además de las variaciones en la concentración de pigmentos, entre otros cambios.

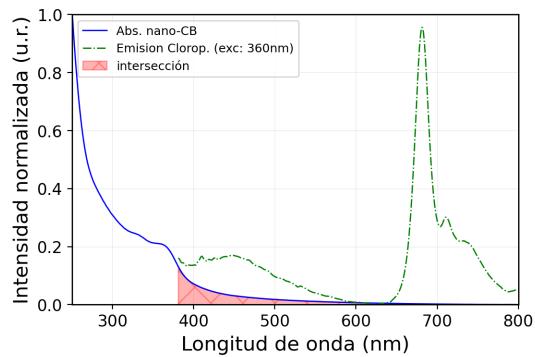
7.3.9. Transferencia de energía entre cloroplastos y nano-CB

De forma análoga a lo realizado en la sección anterior, se presenta en la Fig. 7.16 A el espectro de emisión normalizado de nanopartículas de negro de humo (nano-CB) superpuesto al espectro de absorción de un extracto de pigmentos, y en la Fig. 7.16 B un

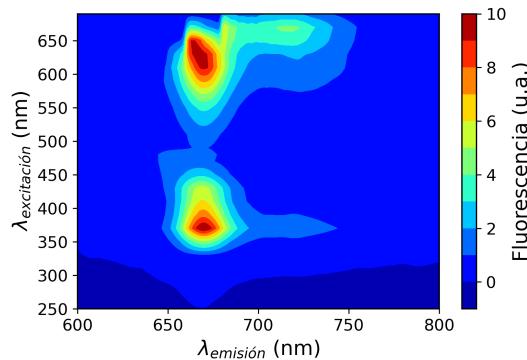
espectro de absorción de las nanopartículas superpuesto a la emisión de los cloroplastos. Adicionalmente, en la Fig. 7.16 se incluyó una matriz de emisión de las nanopartículas y de un extracto de pigmentos a modo de visualizar las áreas en donde se observa excitación y emisión para ambos sistemas.



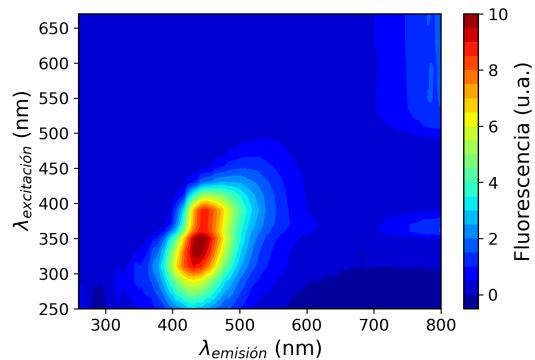
A Área combinada para el solapamientopectral de emisión de nano-CB con excitación a 360 nm con la absorbancia del extracto de clorofila de los cloroplastos utilizados. Ambos espectros están normalizados en su máximo.



B Área combinada para el solapamientopectral de emisión de los cloroplastos con excitación a 480 nm con la absorbancia de las nanopartículas nano-CB. Ambos espectros están normalizados en su máximo..



C Matriz de emisión-excitación de un extracto de pigmentos.



D Matriz de emisión-excitación de una muestra diluida de nano-CB.

FIGURA 7.16: Superposiciones espectrales para la emisión y absorción entre cloroplastos y nanopartículas nano-CB y matrices de emisión de cada sistema.

Como se puede ver la Fig. 7.16 A hay una gran área donde se superponen los espectros de absorción y emisión de nanopartícula y clorofila, respectivamente. Esto permitiría nuevamente la transferencia de energía desde la nanopartícula hacia los cloroplastos. Por otro lado, la transferencia inversa desde los cloroplastos hacia la nanopartícula es menos probable (Fig. 7.16 B).

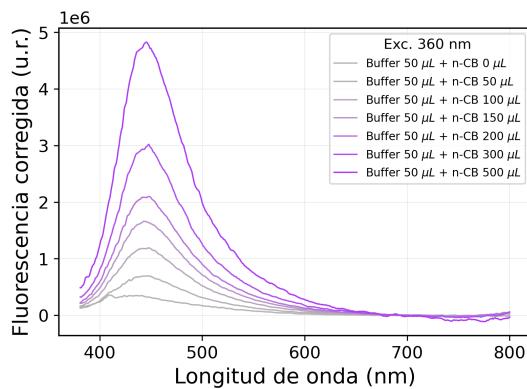
Dadas las propiedades ópticas ya mencionadas de las nano-CB, tanto a longitudes de onda de excitación de 320 nm como de 360 nm se obtienen espectros de fluorescencia de

máxima intensidad. Si bien el experimento siguiente donde se combinaron cloroplastos y nano-CB se estudió excitando a 320 nm, 360 nm y 480 nm, los dos primeros para excitar la nanopartícula y el tercero a los cloroplastos, la absorción de los cloroplastos a 320 nm es muy alta y la distorsión de los espectros de emisión fue considerable. Por ello se muestran únicamente los resultados excitando a 360 nm y 480 nm.

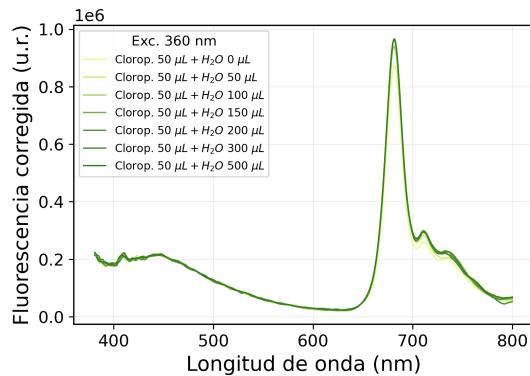
De forma análoga a los experimentos de la sección anterior, se realizaron distintas mediciones de fluorescencia de mezclas de cloroplastos y nanopartículas nano-CB. En la Subsección 7.2.10 de materiales y métodos de este capítulo se informaron los volúmenes utilizados y concentraciones finales de las muestras estudiadas (Tabla 7.1). Para los controles con nanopartículas solas se tomaron los mismos volúmenes que en las mezclas nanopartícula y cloroplastos, pero en lugar de volúmenes de cloroplastos se utilizó *buffer*. Similarmente para los controles con cloroplastos solos en vez de tomar un volumen creciente de nanopartículas se tomó un volumen creciente de agua Milli-Q. El procesamiento de datos fue similar al de la sección anterior, primero se corrigieron los espectros de fluorescencia por efecto de filtro interno y luego se aplicó un factor apropiado correspondiente a la dilución entre las muestras a cada uno de los espectros corregidos. Los resultados excitando a 360 nm se muestran en la Fig. 7.17, los resultados excitando a 480 nm en la Fig. 7.18 y los espectros de absorbancia de las muestras y controles en la Fig. 7.19.

En la Fig. 7.17 se distingue una pequeña pero significativa disminución, del orden del 10 %, de la emisión a 680 nm de los cloroplastos a concentración creciente de nanopartículas, bajo excitación a 360 nm.

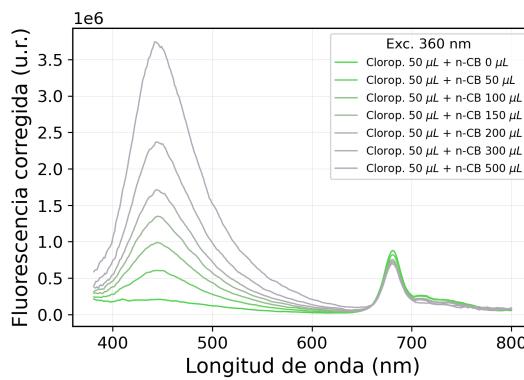
En la Fig. 7.20, se muestran gráficos de Stern-Volmer para el *quenching* de fluorescencia de los cloroplastos en presencia de nanopartículas. De acuerdo con los resultados obtenidos y los gráficos de Stern-Volmer correspondientes a las Fig. 7.20A y Fig. 7.20B, se observa un *quenching* de la emisión de los cloroplastos dependiente de la concentración de nano-CB. De forma similar a GQD, también se observa que dicho fenómeno alcanza la saturación a 1×10^{-4} M de nano-CB. Nuevamente, la constante cinética asociada resultó mayor a 360 nm que a 480 nm, dada la menor superposición de los espectros a 480 nm previamente revisada. Dichas constantes presentaron valores de 4.03×10^3



A Espectros de fluorescencia para nanopartículas en ausencia de cloroplastos con excitación a 360 nm.

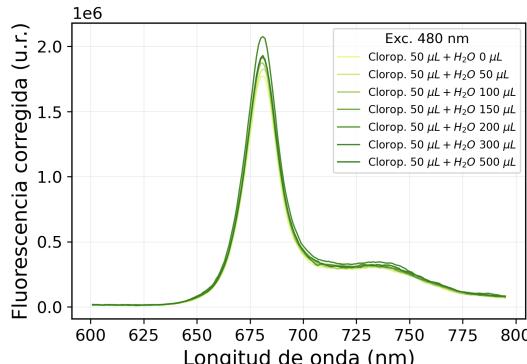


B Espectros de fluorescencia para cloroplastos en ausencia de nanopartículas con excitación a 360 nm.

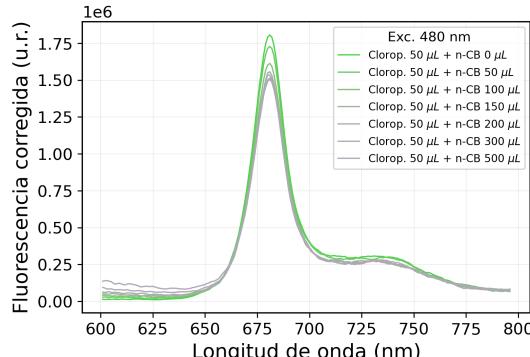


C Espectros de fluorescencia para mezclas de cloroplastos y nanopartículas con excitación a 360nm.

FIGURA 7.17: Espectros de fluorescencia corregidos por filtro interno y por la dilución para las distintas muestras con excitación a 360 nm.



A Espectros de fluorescencia para el control con cloroplastos solos con excitación a 480 nm.



B Espectros de fluorescencia para mezclas de cloroplastos y nanopartículas con excitación a 480 nm.

FIGURA 7.18: Espectros de fluorescencia corregidos por filtro interno y por dilución para las distintas muestras con excitación a 480 nm.

M^{-1} y $3.84 \times 10^3 M^{-1}$ a 360 y 480 nm, respectivamente. A diferencia de lo observado con GQD, se observó un comportamiento lineal bajo ambas longitudes de onda de excitación a partir de la ecuación de Stern-Volmer modificada. Se obtuvo así, una fracción de

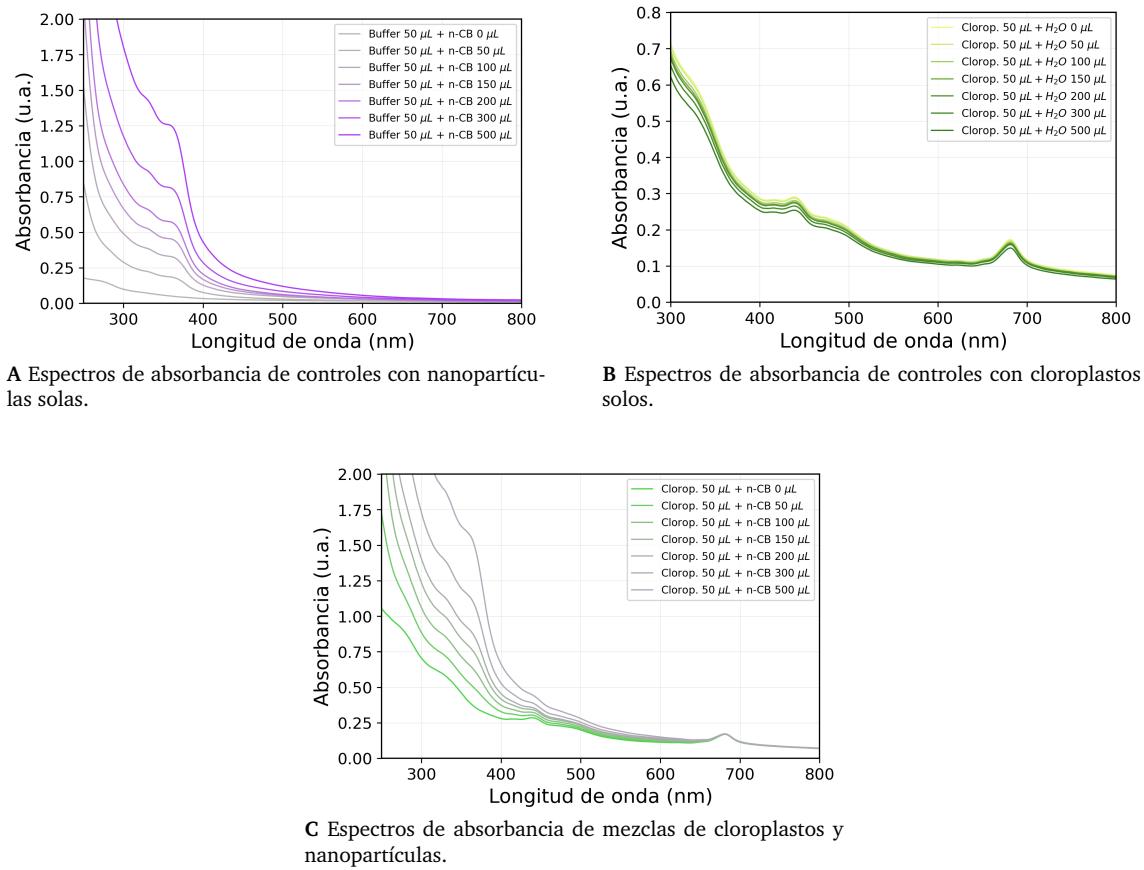


FIGURA 7.19: Espectros de absorbancia para las distintas muestras estudiadas.

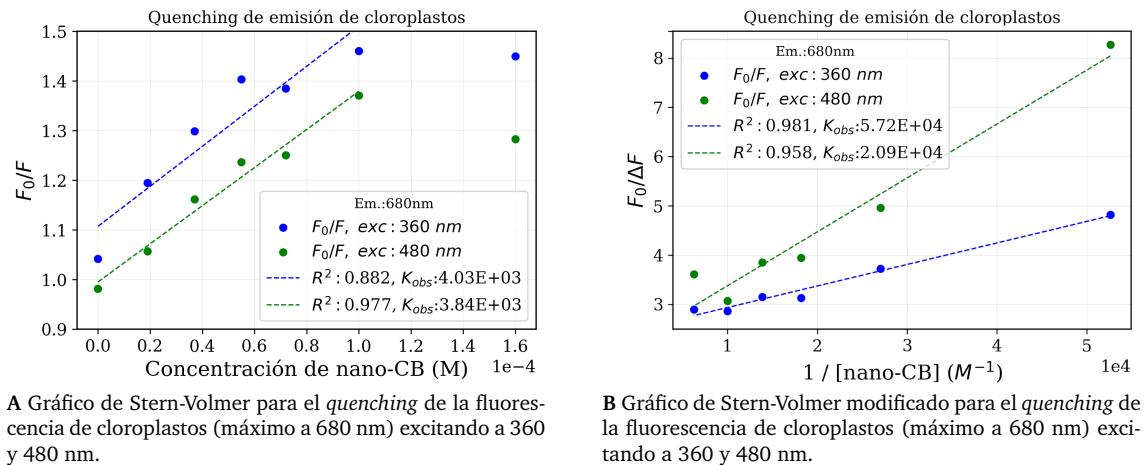


FIGURA 7.20: Gráficos de Stern-Volmer y Stern-Volmer modificado para distintas muestras de cloroplastos y nano-CB.

fluoróforo accesible de 0.40 (40 %) y 0.44 (44 %), y una constante cinética asociada de $5.72 \times 10^4 M^{-1}$ y $2.09 \times 10^4 M^{-1}$, bajo excitación de 360 y 480 nm, respectivamente. La constante de *quenching* resultó menor a 480 nm de forma similar a lo observado en GQD, el cual puede asociarse al menor solapamiento espectral a esa longitud de onda.

Comparativamente, entre GQD y nano-CB, se observó una reducción similar de hasta el 40 % en la fluorescencia de los cloroplastos, siendo levemente mayor para nano-CB posiblemente debido a su mayor concentración respecto a GQD. Dado que las nanopartículas poseen similar tamaño, la similitud en la de fluoróforo accesible a ambas nanopartículas (40 - 50 %) resultó coherente, siendo levemente mayor para nano-CB que para GQD. Por último, las constantes cinéticas observadas fueron similares entre si, del orden de 6×10^3 - $4 \times 10^4 M^{-1}$, siendo levemente mayor para nano-CB que para GQD. Como este parámetro es relativo a la concentración de partícula, la mayor constante asociada a nano-CB puede atribuirse a un menor tamaño de partícula, lo cual también permite justificar la mayor fracción de fluoróforo accesible para nano-CB frente a GQD.

7.4. Conclusiones

En este trabajo se ha reportado el efecto de dos tipos de puntos cuánticos de carbono (nano-CB y GQD) en la actividad fotosintética de plantas de achicoria. Se observó un acentuado *quenching* de la fluorescencia de los cloroplastos, y a su vez se detectaron varios efectos negativos en los parámetros fotosintéticos de las hojas tratadas con ambos tipos de nanopartícula.

Las nanopartículas sintetizadas fueron fluorescentes con bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia, resultando GQD unas seis veces más fluorescente que nano-CB, ambas con tiempo de vida de fluorescencia del orden de 8 ns. El tamaño medio de partícula para GQD fue de 6 ± 1 nm, mientras que para nano-CB se estimó un tamaño del mismo orden o menor.

Respecto al efecto en hojas, ambas nanopartículas redujeron el contenido de pigmentos y el cociente Chl *a*, mientras el cociente Chls/Cars aumentó. Los cambios obtenidos en el contenido de pigmentos son análogos a los que se observan frente a un fenómeno de sombreado bien reportado en biliografía. La disminución el contenido de carotenoides sugiere una reducción del contenido de xantófilas lo que conduce a una menor capacidad para disipar energía en exceso de las hojas tratadas con nanopartículas de carbono. Esto

último está en concordancia con lo observado mediante la cinética de Kautsky, en la cual el rendimiento cuántico del Φ_{NPQ} se redujo en las plantas expuestas a las nanopartículas. Las variaciones en el contenido de pigmentos se reflejan a su vez en cambios similares en los índices espectrales aquí presentados, los cuales guardan una relación con el contenido de clorofilas (NDVI, mNDVI, PSNDA y PSNDb) y carotenoides (PRI).

Luego, mediante la curva OJIP, se observó una disminución drástica de los rendimientos y eficiencias asociadas a la actividad fotoquímica del PSI y de los electrones totales transportados a lo largo de la cadena. Habiendo observado tanto un *quenching* de la fluorescencia de clorofila tanto en cloroplastos como en hojas, cuya fluorescencia es debida tanto por el PSI como al PSII, un mecanismo hipotético es el *quenching* del estado excitado del PSI producto de la presencia de las nanopartículas de carbono. Dicho mecanismo es similar a la acción del metil-viológeno que estudiaron Schansker y cols.[104], en el cual también se observó como cambio principal la reducción de la fase I-P de la curva OJIP y los parámetros derivados de ella. Además, este posible mecanismo es capaz de explicar la reducción en el número total de electrones transportados y de aceptores reducidos (inferido en función de la reducción de S_M , N y el área). Una transferencia de energía desde el PSI a la nanopartícula, bloquea el transporte electrónico de la cadena fotosintética a nivel del PSI. Al reducir la tasa de formación de PSI^+ , los transportadores de electrones intermedios se quedan en estado reducido. Estando reducidos, no son capaces de aceptar nuevos electrones provenientes del PSII, y finalmente se observa una reducción en la cantidad de electrones transportados y aceptores reducidos.

Si bien los cambios más significativos en la curva OJIP se relacionan con la fase I-P discutida anteriormente, también se observó un aumento en Φ_{PSII} y en $F_V F_0$. Estos leves cambios pueden explicarse mediante las variaciones en el contenido de pigmentos. El aumento aparente de la antena del PSII, aumenta la tasa de excitación del RC del PSII y esto conduce a un incremento en los parámetros mencionados. Sin embargo, dicho aumento en la actividad es inhibido por un bloqueo posterior en el transporte producto del efecto inhibitorio de las nanopartículas de carbono en la actividad fotoquímica del PSI.

Respecto a la actividad fotosintética bajo luz fotosintéticamente activa, en líneas generales

se observó un incremento en el rendimiento cuántico fotofísico (Φ_C), una disminución del rendimiento cuántico del *quenching* no fotoquímico (Φ_{NPQ}), mientras que el rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) se mantuvo constante. El aumento en Φ_C puede explicarse planteando una transferencia de energía entre las nanopartículas de carbono y PSII. En el experimento con cloroplastos y nanopartículas, se observó disminución de la fluorescencia de los cloroplastos la cual es debida tanto por el PSI como el PSII, por ende, con este experimento no es posible discernir si el *quenching* se presenta sobre PSI, PSII ó ambos. Por ende, es posible también una transferencia de energía desde el PSII a las nanopartículas de carbono. Siendo así, la constante k_C que combina los decaimientos fotofísicos (fluorescencia y decaimiento no radiativo) aumenta producto de un nuevo paso de desactivación del PSII que no se engloba en las constantes asociadas a la fotosíntesis ($k_p \cdot f_{Q_A}$) o el NPQ (k_{NPQ}). El aumento de k_C justifica el aumento en Φ_C . Por otro lado, habiéndose observado una disminución en el contenido de carotenoides, los cuales son constituyentes del ciclo de las xantófilas, sería razonable que k_{NPQ} disminuyera producto de la menor capacidad de las plantas tratadas con nanopartículas de carbono de disipar el exceso de energía por esta vía. La disminución en k_{NPQ} justifica la disminución en el Φ_{NPQ} . Luego, bajo las suposiciones anteriores, dado que k_C aumenta pero el k_{NPQ} disminuye, la suma de los procesos que desactivan el RC del PSII se mantiene relativamente constante ($k_C + k_p \cdot f_{Q_A} + k_{NPQ}$), y eso conduce a un Φ_{PSII} aproximadamente constante.

En resumen, se observó un deterioro en la actividad y eficiencia fotosintética de plantas de achicoria en presencia de nanopartículas de carbono, GQD y nano-CB. Dada la similitud en las propiedades y características de las nanopartículas, el efecto que ambas tuvieron sobre las hojas y cloroplastos fue similar, ya que en la mayoría de los casos no se observaron diferencias entre los parámetros fotosintéticos de plantas tratadas con GQD respecto a aquellos correspondientes a nano-CB. Posiblemente, la similitud en las propiedades y en las concentraciones de partícula utilizadas sean las responsables de tal paridad de efectos.

A diferencia de otras referencias de puntos cuánticos de carbono, los cambios observados resultaron en esencia negativos para la salud de la planta. Cabe señalar que las concentraciones aquí utilizadas de nanopartícula son mayores a las concentraciones medias utilizadas en dichas referencia [1, 14, 17, 18].

Este estudio proporciona información novedosa sobre los efectos en la actividad fotoquími-

ca y fotosintética de cloroplastos y hojas, expuestas a puntos cuánticos de carbono. Dado que se espera que la producción y los usos de las nanopartículas de carbono sigan aumentando, su difusión en el medio ambiente continuará aumentando. Por lo tanto, es esencial evaluar mejor el comportamiento y los impactos de estas nanopartículas en los ecosistemas. Por otro lado, se debe revisar en detalle el efecto de las mismas sobre los cultivos, dado el impulso reciente para su uso como agroquímicos o en el *delivery* de compuestos activos. Se necesitan con urgencia más estudios para comprender las vías mecánicas de penetración, biodistribución y sitios de acción de las nanopartículas de carbono, particularmente aquellas solubles en agua, en plantas, microorganismos y macroorganismos para permitir, si es posible, un uso seguro de los mismos. También es esencial evaluar la influencia de los parámetros físico-químicos de las nanopartículas de carbono en el impacto que producen en plantas, tal como fue revisado aquí. Conocer los efectos de estos parámetros permitirá desarrollar nanopartículas de carbono más seguras.

Referencias

- (1) Shojaei, T. R.; Salleh, M. A. M.; Tabatabaei, M.; Mobli, H.; Aghbashlo, M.; Rashid, S. A. y Tan, T. en *Synthesis, Technology and Applications of Carbon Nanomaterials*; Elsevier: 2019, págs. 247-277, DOI: [10.1016/b978-0-12-815757-2.00011-5](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815757-2.00011-5).
- (2) Li, Y.; Xu, X.; Wu, Y.; Zhuang, J.; Zhang, X.; Zhang, H.; Lei, B.; Hu, C. y Liu, Y. *Mater. Chem. Front.* **2020**, 4, 437-448, DOI: [10.1039/c9qm00614a](https://doi.org/10.1039/c9qm00614a).
- (3) Molaei, M. J. *Talanta* **2019**, 196, 456-478, DOI: [10.1016/j.talanta.2018.12.042](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.042).
- (4) Baker, S. y Baker, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6726-6744, DOI: [10.1002/anie.200906623](https://doi.org/10.1002/anie.200906623).
- (5) Li, H.; Kang, Z.; Liu, Y. y Lee, S.-T. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 24230, DOI: [10.1039/c2jm34690g](https://doi.org/10.1039/c2jm34690g).
- (6) Mitra, S.; Chandra, S.; Patra, P.; Pramanik, P. y Goswami, A. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 17638, DOI: [10.1039/c1jm13858h](https://doi.org/10.1039/c1jm13858h).

- (7) Cao, L.; Sahu, S.; Anilkumar, P.; Bunker, C. E.; Xu, J.; Fernando, K. A. S.; Wang, P.; Guliants, E. A.; Tackett, K. N. y Sun, Y.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4754-4757, DOI: [10.1021/ja200804h](https://doi.org/10.1021/ja200804h).
- (8) Milenković, I.; Borišev, M.; Zhou, Y.; Spasić, S. Z.; Leblanc, R. M. y Radotić, K. J. *Agric. Food. Chem.* **2021**, *69*, 5446-5451, DOI: [10.1021/acs.jafc.1c01094](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01094).
- (9) Nabiev, I.; Rakovich, A.; Sukhanova, A.; Lukashev, E.; Zagidullin, V.; Pachenko, V.; Rakovich, Y. P.; Donegan, J. F.; Rubin, A. B. y Govorov, A. O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7217-7221, DOI: [10.1002/anie.201003067](https://doi.org/10.1002/anie.201003067).
- (10) Chandra, S.; Pradhan, S.; Mitra, S.; Patra, P.; Bhattacharya, A.; Pramanik, P. y Goswami, A. *Nanoscale* **2014**, *6*, 3647-3655, DOI: [10.1039/c3nr06079a](https://doi.org/10.1039/c3nr06079a).
- (11) Khatri, K. y Rathore, M. S. en *Photosynthesis - From Its Evolution to Future Improvements in Photosynthetic Efficiency Using Nanomaterials*; InTech: 2018, DOI: [10.5772/intechopen.76815](https://doi.org/10.5772/intechopen.76815).
- (12) Swift, T. A.; Oliver, T. A. A.; Galan, M. C. y Whitney, H. M. *Interface Focus* **2018**, *9*, 20180048, DOI: [10.1098/rsfs.2018.0048](https://doi.org/10.1098/rsfs.2018.0048).
- (13) Zuo, P.; Lu, X.; Sun, Z.; Guo, Y. y He, H. *Microchim. Acta* **2015**, *183*, 519-542, DOI: [10.1007/s00604-015-1705-3](https://doi.org/10.1007/s00604-015-1705-3).
- (14) Mukherjee, A.; Majumdar, S.; Servin, A. D.; Pagano, L.; Dhankher, O. P. y White, J. C. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, DOI: [10.3389/fpls.2016.00172](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00172).
- (15) Navarro, E.; Baun, A.; Behra, R.; Hartmann, N. B.; Filser, J.; Miao, A.-J.; Quigg, A.; Santschi, P. H. y Sigg, L. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 372-386, DOI: [10.1007/s10646-008-0214-0](https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0).
- (16) Khot, L. R.; Sankaran, S.; Maja, J. M.; Ehsani, R. y Schuster, E. W. *Crop Prot.* **2012**, *35*, 64-70, DOI: [10.1016/j.cropro.2012.01.007](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007).
- (17) Raliya, R.; Saharan, V.; Dimkpa, C. y Biswas, P. J. *Agric. Food. Chem.* **2017**, *66*, 6487-6503, DOI: [10.1021/acs.jafc.7b02178](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02178).
- (18) Zaytseva, O. y Neumann, G. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2016**, *3*, DOI: [10.1186/s40538-016-0070-8](https://doi.org/10.1186/s40538-016-0070-8).
- (19) Li, J.; Hu, J.; Ma, C.; Wang, Y.; Wu, C.; Huang, J. y Xing, B. *Chemosphere* **2016**, *159*, 326-334, DOI: [10.1016/j.chemosphere.2016.05.083](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.083).

- (20) Li, H.; Huang, J.; Lu, F.; Liu, Y.; Song, Y.; Sun, Y.; Zhong, J.; Huang, H.; Wang, Y.; Li, S.; Lifshitz, Y.; Lee, S.-T. y Kang, Z. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1*, 663-672, DOI: [10.1021/acsabm.8b00345](https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00345).
- (21) Wang, H.; Zhang, M.; Song, Y.; Li, H.; Huang, H.; Shao, M.; Liu, Y. y Kang, Z. *Carbon* **2018**, *136*, 94-102, DOI: [10.1016/j.carbon.2018.04.051](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.04.051).
- (22) Su, L.-X.; Ma, X.-L.; Zhao, K.-K.; Shen, C.-L.; Lou, Q.; Yin, D.-M. y Shan, C.-X. *ACS Omega* **2018**, *3*, 17770-17777, DOI: [10.1021/acsomega.8b02604](https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02604).
- (23) Wang, H.; Li, H.; Zhang, M.; Song, Y.; Huang, J.; Huang, H.; Shao, M.; Liu, Y. y Kang, Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 16308-16314, DOI: [10.1021/acsami.8b03758](https://doi.org/10.1021/acsami.8b03758).
- (24) Sonkar, S. K.; Roy, M.; Babar, D. G. y Sarkar, S. *Nanoscale* **2012**, *4*, 7670, DOI: [10.1039/c2nr32408c](https://doi.org/10.1039/c2nr32408c).
- (25) Chen, J.; Dou, R.; Yang, Z.; Wang, X.; Mao, C.; Gao, X. y Wang, L. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 818-828, DOI: [10.3109/17435390.2015.1133864](https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1133864).
- (26) Chen, J.; Liu, B.; Yang, Z.; Qu, J.; Xun, H.; Dou, R.; Gao, X. y Wang, L. *Environ. Sci.: Nano* **2018**, *5*, 2672-2685, DOI: [10.1039/c8en00674a](https://doi.org/10.1039/c8en00674a).
- (27) Zhu, S.; Song, Y.; Zhao, X.; Shao, J.; Zhang, J. y Yang, B. *Nano Res.* **2015**, *8*, 355-381, DOI: [10.1007/s12274-014-0644-3](https://doi.org/10.1007/s12274-014-0644-3).
- (28) Qiao, Z.-A.; Wang, Y.; Gao, Y.; Li, H.; Dai, T.; Liu, Y. y Huo, Q. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8812, DOI: [10.1039/c0cc02724c](https://doi.org/10.1039/c0cc02724c).
- (29) Li, H.; He, X.; Kang, Z.; Huang, H.; Liu, Y.; Liu, J.; Lian, S.; Tsang, C.; Yang, X. y Lee, S.-T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4430-4434, DOI: [10.1002/anie.200906154](https://doi.org/10.1002/anie.200906154).
- (30) Peng, J. y col. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 844-849, DOI: [10.1021/nl2038979](https://doi.org/10.1021/nl2038979).
- (31) Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K. y Scrivens, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12736-12737, DOI: [10.1021/ja040082h](https://doi.org/10.1021/ja040082h).
- (32) Shinde, D. B. y Pillai, V. K. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 12522-12528, DOI: [10.1002/chem.201201043](https://doi.org/10.1002/chem.201201043).
- (33) Dong, Y.; Chen, C.; Zheng, X.; Gao, L.; Cui, Z.; Yang, H.; Guo, C.; Chi, Y. y Li, C. M. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 8764, DOI: [10.1039/c2jm30658a](https://doi.org/10.1039/c2jm30658a).

- (34) Liu, H.; Ye, T. y Mao, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6473-6475, DOI: [10.1002/anie.200701271](https://doi.org/10.1002/anie.200701271).
- (35) Tao, H.; Yang, K.; Ma, Z.; Wan, J.; Zhang, Y.; Kang, Z. y Liu, Z. *Small* **2011**, *8*, 281-290, DOI: [10.1002/smll.201101706](https://doi.org/10.1002/smll.201101706).
- (36) Yang, Z.-C.; Wang, M.; Yong, A. M.; Wong, S. Y.; Zhang, X.-H.; Tan, H.; Chang, A. Y.; Li, X. y Wang, J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11615, DOI: [10.1039/c1cc14860e](https://doi.org/10.1039/c1cc14860e).
- (37) Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M. y Giannelis, E. P. *Small* **2008**, *4*, 455-458, DOI: [10.1002/smll.200700578](https://doi.org/10.1002/smll.200700578).
- (38) Wu, X.; Tian, F.; Wang, W.; Chen, J.; Wu, M. y Zhao, J. X. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 4676-4684, DOI: [10.1039/c3tc30820k](https://doi.org/10.1039/c3tc30820k).
- (39) Peng, H. y Travas-Sejdic, J. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 5563-5565, DOI: [10.1021/cm901593y](https://doi.org/10.1021/cm901593y).
- (40) Zong, J.; Zhu, Y.; Yang, X.; Shen, J. y Li, C. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 764-766, DOI: [10.1039/c0cc03092a](https://doi.org/10.1039/c0cc03092a).
- (41) Jamaludin, N.; Rashid, S. A. y Tan, T. en *Synthesis, Technology and Applications of Carbon Nanomaterials*; Elsevier: 2019, págs. 109-134, DOI: [10.1016/b978-0-12-815757-2.00005-x](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815757-2.00005-x).
- (42) Hu, S.; Wei, Z.; Chang, Q.; Trinchi, A. y Yang, J. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *378*, 402-407, DOI: [10.1016/j.apsusc.2016.04.038](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.04.038).
- (43) Ray, S. C.; Saha, A.; Jana, N. R. y Sarkar, R. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18546-18551, DOI: [10.1021/jp905912n](https://doi.org/10.1021/jp905912n).
- (44) Ye, R.; Xiang, C.; Lin, J.; Peng, Z.; Huang, K.; Yan, Z.; Cook, N. P.; Samuel, E. L.; Hwang, C.-C.; Ruan, G.; Ceriotti, G.; Raji, A.-R. O.; Martíé, A. A. y Tour, J. M. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, DOI: [10.1038/ncomms3943](https://doi.org/10.1038/ncomms3943).
- (45) Lichtenhaller, H. K. y Buschmann, C. *Handbook of Food Analytical Chemistry* **2005**, 2-2, 171-178, DOI: [10.1002/0471709085.ch21](https://doi.org/10.1002/0471709085.ch21).
- (46) Ramos, M. E. y Lagorio, M. G. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 1063-1066, DOI: [10.1039/b406525e](https://doi.org/10.1039/b406525e).
- (47) Cordón, G. B. y Lagorio, M. G. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2006**, *5*, 735-740.

- (48) Lakowicz, J. R. en *Principles of fluorescence spectroscopy*; Springer: 1999, págs. 25-61.
- (49) Fan, T.; Zeng, W.; Tang, W.; Yuan, C.; Tong, S.; Cai, K.; Liu, Y.; Huang, W.; Min, Y. y Epstein, A. J. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, DOI: [10.1186/s11671-015-0783-9](https://doi.org/10.1186/s11671-015-0783-9).
- (50) Tucureanu, V.; Matei, A. y Avram, A. M. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *46*, 502-520, DOI: [10.1080/10408347.2016.1157013](https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1157013).
- (51) Badertscher, M.; Bühlmann, P. y Pretsch, E., *Structure Determination of Organic Compounds*; Springer Berlin Heidelberg: 2009, DOI: [10.1007/978-3-540-93810-1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-93810-1).
- (52) Zhang, H.; Han, X.; Yang, Z.; Zou, J. y Tang, H. *J. Nanomater. & Molec. Nano.* **2014**, *s1*, DOI: [10.4172/2324-8777.s1-003](https://doi.org/10.4172/2324-8777.s1-003).
- (53) Yan, F.; Sun, Z.; Zhang, H.; Sun, X.; Jiang, Y. y Bai, Z. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, DOI: [10.1007/s00604-019-3688-y](https://doi.org/10.1007/s00604-019-3688-y).
- (54) Yang, X.; Wang, Y.; Shen, X.; Su, C.; Yang, J.; Piao, M.; Jia, F.; Gao, G.; Zhang, L. y Lin, Q. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *492*, 1-7, DOI: [10.1016/j.jcis.2016.12.057](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.12.057).
- (55) Wang, H.; Sun, C.; Chen, X.; Zhang, Y.; Colvin, V. L.; Rice, Q.; Seo, J.; Feng, S.; Wang, S. y Yu, W. W. *Nanoscale* **2017**, *9*, 1909-1915, DOI: [10.1039/c6nr09200d](https://doi.org/10.1039/c6nr09200d).
- (56) Wu, M.; Zhan, J.; Geng, B.; He, P.; Wu, K.; Wang, L.; Xu, G.; Li, Z.; Yin, L. y Pan, D. *Nanoscale* **2017**, *9*, 13195-13202, DOI: [10.1039/c7nr04718e](https://doi.org/10.1039/c7nr04718e).
- (57) Zhu, J.; Tang, Y.; Wang, G.; Mao, J.; Liu, Z.; Sun, T.; Wang, M.; Chen, D.; Yang, Y.; Li, J.; Deng, Y. y Yang, S. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 14470-14477, DOI: [10.1021/acsami.6b11525](https://doi.org/10.1021/acsami.6b11525).
- (58) Chen, D.; Gao, H.; Chen, X.; Fang, G.; Yuan, S. y Yuan, Y. *ACS Photonics* **2017**, *4*, 2352-2358, DOI: [10.1021/acsphtnics.7b00675](https://doi.org/10.1021/acsphtnics.7b00675).
- (59) Nie, H.; Li, M.; Li, Q.; Liang, S.; Tan, Y.; Sheng, L.; Shi, W. y Zhang, S. X.-A. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 3104-3112, DOI: [10.1021/cm5003669](https://doi.org/10.1021/cm5003669).
- (60) Shamsipur, M.; Barati, A.; Taherpour, A. A. y Jamshidi, M. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 4189-4198, DOI: [10.1021/acs.jpclett.8b02043](https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.8b02043).
- (61) Wang, H.; Gao, P.; Wang, Y.; Guo, J.; Zhang, K.-Q.; Du, D.; Dai, X. y Zou, G. *APL Materials* **2015**, *3*, 086102, DOI: [10.1063/1.4928028](https://doi.org/10.1063/1.4928028).

- (62) Wang, L.; Wang, Y.; Xu, T.; Liao, H.; Yao, C.; Liu, Y.; Li, Z.; Chen, Z.; Pan, D.; Sun, L. y Wu, M. *Nature Communications* **2014**, 5, DOI: [10.1038/ncomms6357](https://doi.org/10.1038/ncomms6357).
- (63) Shen, J.; Zhu, Y.; Chen, C.; Yang, X. y Li, C. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2580-2582, DOI: [10.1039/c0cc04812g](https://doi.org/10.1039/c0cc04812g).
- (64) Chen, J. M. y Cihlar, J. *Remote Sens. Environ.* **1996**, 55, 153-162.
- (65) Sims, D. A. y Gamon, J. A. *Remote Sens. Environ.* **2002**, 81, 337-354.
- (66) Sukhova, E. y Sukhov, V. *Remote Sens.* **2018**, 10, 771.
- (67) Peñuelas, J.; Garbulsky, M. F. y Filella, I. *New Phytol.* **2011**, 191, 596-599.
- (68) Ruban, A. V. *J. Exp. Bot.* **2015**, 66, 7-23.
- (69) Kramer, D. M.; Sacksteder, C. A. y Cruz, J. A. *Photosynth. Res.* **1999**, 60, 151-163.
- (70) Yudina, L.; Sukhova, E.; Gromova, E.; Nerush, V.; Vodeneev, V. y Sukhov, V. *Photosynth. Res.* **2020**, 146, 175-187, DOI: [10.1007/s11120-020-00718-x](https://doi.org/10.1007/s11120-020-00718-x).
- (71) Kohzuma, K.; Tamaki, M. e Hikosaka, K. *Journal of Plant Research* **2021**, 1-12.
- (72) Alonso, L.; Van Wittenberghe, S.; Amorós-López, J.; Vila-Francés, J.; Gómez-Chova, L. y Moreno, J. *Remote Sens.* **2017**, 9, 770.
- (73) Sukhova, E. y Sukhov, V. *Remote Sens.* **2019**, 11, 810.
- (74) Dhir, B.; Mahmooduzzafar; Siddiqi, T. O. e Iqbal, M. *Plant Biol.* **2001**, 44, 97-102, DOI: [10.1007/bf03030282](https://doi.org/10.1007/bf03030282).
- (75) Devacht, S.; Lootens, P.; Roldán-Ruiz, I.; Carlier, L.; Baert, J.; Waes, J. y Bockstaele, E. *Photosynthetica* **2009**, 47, DOI: [10.1007/s11099-009-0058-8](https://doi.org/10.1007/s11099-009-0058-8).
- (76) Lichtenthaler, H. K. y Babani, F. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer: 2004, págs. 713-736, DOI: [10.1007/978-1-4020-3218-9_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_28).
- (77) Lichtenthaler, H. K. y Buschmann, C. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **2001**, 1, F4.3.1-F4.3.8, DOI: [10.1002/0471142913.faf0403s01](https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01).
- (78) Sarijeva, G.; Knapp, M. y Lichtenthaler, H. K. *J. Plant Physiol.* **2007**, 164, 950-955, DOI: [10.1016/j.jplph.2006.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.09.002).
- (79) Lichtenthaler, H. K.; Ač, A.; Marek, M. V.; Kalina, J. y Urban, O. *Plant Physiol. Biochem.* **2007**, 45, 577-588, DOI: [10.1016/j.plaphy.2007.04.006](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.04.006).

- (80) Bailey, S.; Walters, R. G.; Jansson, S. y Horton, P. *Planta* **2001**, *213*, 794-801, DOI: [10.1007/s004250100556](https://doi.org/10.1007/s004250100556).
- (81) Thayer, S. S. y Björkman, O. *Photosynth. Res.* **1990**, *23*, 331-343, DOI: [10.1007/bf00034864](https://doi.org/10.1007/bf00034864).
- (82) Lichtenthaler, H. K.; Buschmann, C.; Döll, M.; Fietz, H.-J.; Bach, T.; Kozel, U.; Meier, D. y Rahmsdorf, U. *Photosynth. Res.* **1981**, *2*, 115-141, DOI: [10.1007/bf00028752](https://doi.org/10.1007/bf00028752).
- (83) Wild, A.; Höpfner, M.; Rühle, W. y Richter, M. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **1986**, *41*, 597-603, DOI: [10.1515/znc-1986-5-618](https://doi.org/10.1515/znc-1986-5-618).
- (84) Lichtenthaler, H. K.; Babani, F.; Navrátil, M. y Buschmann, C. *Photosynth. Res.* **2013**, *117*, 355-366, DOI: [10.1007/s11120-013-9834-1](https://doi.org/10.1007/s11120-013-9834-1).
- (85) Torres, R.; Romero, J. y Lagorio, M. *J. Photochem. Photobiol., B* **2021**, *218*, 112182, DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2021.112182](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112182).
- (86) Lagorio, M. G. en *Chlorophyll Struct. Prod. Med. Uses*; Nova Science Publishers New York: 2011, págs. 115-150.
- (87) Yaryura, P.; Cordon, G.; Leon, M.; Kerber, N.; Puche, N.; Rubio, G.; Garciéa, A. y Lagorio, M. G. **2009**, *195*, 186-196, DOI: [10.1111/j.1439-037x.2008.00359.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-037x.2008.00359.x).
- (88) Peterson, R. B.; Oja, V. y Laisk, A. *Photosynth. Res.* **2001**, *70*, 185-196.
- (89) Cuba, N. I.; Torres, R.; San Román, E. y Lagorio, M. G. *Photochem. Photobiol.* **2020**, DOI: [10.1111/php.13273](https://doi.org/10.1111/php.13273).
- (90) Terashima, I.; Sakaguchi, S. y Hara, N. *Plant Cell Physiol.* **1986**, *27*, 1023-1031.
- (91) Ballottari, M.; Dall'Osto, L.; Morosinotto, T. y Bassi, R. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 8947-8958.
- (92) Wientjes, E.; van Amerongen, H. y Croce, R. *BBA - Bioenergetics* **2013**, *1827*, 420-426.
- (93) Strassser, R. J.; Srivastava, A. y Govindjee, **1995**, *61*, 32-42, DOI: [10.1111/j.1751-1097.1995.tb09240.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb09240.x).
- (94) Strassser, R. J.; Srivastava, A. y Tsimilli-Michael, M. *Photosynth. Res.* **2004**, 445-483.
- (95) Schansker, G.; Tóth, S. Z. y Strassser, R. J. *BBA - Bioenerg.* **2006**, *1757*, 787-797, DOI: [10.1016/j.bbabi.2006.04.019](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.019).

- (96) Stirbet, A. y Govindjee *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2011**, *104*, 236-257, DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010).
- (97) Stirbet, A.; Riznichenko, G. Y.; Rubin, A. y col. *Biochemistry (Moscow)* **2014**, *79*, 291-323.
- (98) Schansker, G.; Tóth, S. Z.; Kovács, L.; Holzwarth, A. R. y Garab, G. *BBA - Bioenerg.* **2011**, *1807*, 1032-1043, DOI: [10.1016/j.bbabi.2011.05.022](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.022).
- (99) Schansker, G.; Srivastava, A.; Govindjee y Strasser, R. J. *Funct. Plant Biol.* **2003**, *30*, 785, DOI: [10.1071/fp03032](https://doi.org/10.1071/fp03032).
- (100) Chen, S.; Yang, J.; Zhang, M.; Strasser, R. J. y Qiang, S. *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *122*, 126-140, DOI: [10.1016/j.envexpbot.2015.09.011](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.09.011).
- (101) Strasser, R. J.; Srivastava, A. y Tsimilli-Michael, M. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation* **2000**, 445-483.
- (102) Krüger, G.; Villiers, M. D.; Strauss, A.; de Beer, M.; van Heerden, P.; Maldonado, R. y Strasser, R. S. *Afr. J. Bot.* **2014**, *95*, 85-96, DOI: [10.1016/j.sajb.2014.07.010](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.07.010).
- (103) Yusuf, M. A.; Kumar, D.; Rajwanshi, R.; Strasser, R. J.; Tsimilli-Michael, M.; Govindjee y Sarin, N. B. *BBA - Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1428-1438, DOI: [10.1016/j.bbabi.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.002).
- (104) Schansker, G.; Tóth, S. Z. y Strasser, R. J. *BBA - Bioenerg.* **2005**, *1706*, 250-261, DOI: [10.1016/j.bbabi.2004.11.006](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.11.006).
- (105) Oukarroum, A.; Schansker, G. y Strasser, R. J. *Physiol. Plant.* **2009**, *137*, 188-199, DOI: [10.1111/j.1399-3054.2009.01273.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01273.x).
- (106) Ceppi, M. G.; Oukarroum, A.; Çiçek, N.; Strasser, R. J. y Schansker, G. *Physiol. Plant.* **2012**, *144*, 277-288, DOI: [10.1111/j.1399-3054.2011.01549.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01549.x).
- (107) Guo, Y.; Lu, Y.; Goltsev, V.; Strasser, R. J.; Kalaji, H. M.; Wang, H.; Wang, X.; Chen, S. y Qiang, S. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *156*, 39-48, DOI: [10.1016/j.plaphy.2020.08.044](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.044).
- (108) Kalaji, H. M.; Govindjee; Bosa, K.; Kościelniak, J. y Żuk-Gołaszewska, K. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 64-72, DOI: [10.1007/978-3-642-32034-7_164](https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_164).
- (109) Tu, W.; Li, Y.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Liu, H.; Liu, C. y Yang, C. J. *Plant Physiol.* **2012**, *169*, 1463-1470, DOI: [10.1016/j.jplph.2012.05.027](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.027).

- (110) Strasser, R. J.; Tsimilli-Michael, M.; Qiang, S. y Goltsev, V. *BBA - Bioenerg.* **2010**, 1797, 1313-1326, DOI: [10.1016/j.bbabi.2010.03.008](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.008).
- (111) Adams, W. W. y Demmig-Adams, B. en *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer Netherlands: 2004, págs. 583-604, DOI: [10.1007/978-1-4020-3218-9_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_22).
- (112) LIU, M.; HUANG, X.; WANG, R.; XU, H. y ZHU, F. *Photosynthetica* **2021**, 59, 148-159, DOI: [10.32615/ps.2021.006](https://doi.org/10.32615/ps.2021.006).
- (113) Heber, U. en *Discoveries in Photosynthesis*; Springer: 2005, págs. 551-559, DOI: [10.1007/1-4020-3324-9_51](https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9_51).
- (114) Cornic, G.; Bukhov, N. G.; Wiese, C.; Bligny, R. y Heber, U. *Planta* **2000**, 210, 468-477, DOI: [10.1007/pl00008154](https://doi.org/10.1007/pl00008154).
- (115) Guadagno, C.; Santo, A. V. D. y D'Ambrosio, N. *BBA - Bioenerg.* **2010**, 1797, 525-530, DOI: [10.1016/j.bbabi.2010.01.016](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.016).
- (116) Verhoeven, A. S.; Demmig-Adams, B. y III, W. W. A. *Plant Physiol.* **1997**, 113, 817-824, DOI: [10.1104/pp.113.3.817](https://doi.org/10.1104/pp.113.3.817).
- (117) Gilmore, A. M. *Physiol. Plant.* **1997**, 99, 197-209, DOI: [10.1111/j.1399-3054.1997.tb03449.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03449.x).
- (118) Serôdio, J. y Lavaud, J. *Photosynth. Res.* **2011**, 108, 61-76, DOI: [10.1007/s11120-011-9654-0](https://doi.org/10.1007/s11120-011-9654-0).
- (119) Goss, R. y Lepetit, B. **2015**, 172, 13-32, DOI: [10.1016/j.jplph.2014.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004).
- (120) Logan, B. A.; Demmig-Adams, B.; Adams, W. W. y Bilger, W. en *Advances in Photosynthesis and Respiration*; Springer Netherlands: 2014, págs. 187-201, DOI: [10.1007/978-94-017-9032-1_7](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9032-1_7).
- (121) Demmig-Adams, B. y Adams, W. W. *New Phytol.* **2006**, 172, 11-21, DOI: [10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x).
- (122) Demmig-Adams, B.; Ebbert, V.; Mellman, D. L.; Mueh, K. E.; Schaffer, L.; Funk, C.; Zarter, C. R.; Adamska, I.; Jansson, S. y Adams, W. W. *Physiol. Plant.* **2006**, 127, 670-680, DOI: [10.1111/j.1399-3054.2006.00698.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00698.x).
- (123) Serôdio, J.; Ezequiel, J.; Frommlet, J.; Laviale, M. y Lavaud, J. *Plant Physiol.* **2013**, 163, 1089-1102, DOI: [10.1104/pp.113.225243](https://doi.org/10.1104/pp.113.225243).

- (124) Cendrero-Mateo, M. P.; Carmo-Silva, A. E.; Porcar-Castell, A.; Hamerlynck, E. P.; Papuga, S. A. y Moran, M. S. *Funct. Plant Biol.* **2015**, *42*, 746, DOI: [10.1071/fp15002](https://doi.org/10.1071/fp15002).
- (125) Endo, T.; Uebayashi, N.; Ishida, S.; Ikeuchi, M. y Sato, F. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *81*, 115-120, DOI: [10.1016/j.plaphy.2014.03.018](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.018).
- (126) Kalaji, H. M. y col. *Photosynth. Res.* **2016**, *132*, 13-66, DOI: [10.1007/s11120-016-0318-y](https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y).
- (127) Porcar-Castell, A.; Tyystjärvi, E.; Atherton, J.; van der Tol, C.; Flexas, J.; Pfundel, E. E.; Moreno, J.; Frankenberg, C. y Berry, J. A. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 4065-4095, DOI: [10.1093/jxb/eru191](https://doi.org/10.1093/jxb/eru191).
- (128) Kalaji, H. M. y col. *Photosynth. Res.* **2014**, *122*, 121-158, DOI: [10.1007/s11120-014-0024-6](https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6).
- (129) Giorio, P.; Giorio, G.; Guadagno, C. R.; Cellini, F.; Stigliani, L. A. y D'Ambrosio, C. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *75*, 1-8, DOI: [10.1016/j.envexpbot.2011.08.009](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.009).
- (130) Wang, X.; Cao, L.; Lu, F.; Meziani, M. J.; Li, H.; Qi, G.; Zhou, B.; Harruff, B. A.; Kermarrec, F. y Sun, Y.-P. *Chem. Commun.* **2009**, 3774, DOI: [10.1039/b906252a](https://doi.org/10.1039/b906252a).
- (131) Zu, F.; Yan, F.; Bai, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Huang, Y. y Zhou, X. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 1899-1914, DOI: [10.1007/s00604-017-2318-9](https://doi.org/10.1007/s00604-017-2318-9).
- (132) Han, M.; Zhu, S.; Lu, S.; Song, Y.; Feng, T.; Tao, S.; Liu, J. y Yang, B. *Nano Today* **2018**, *19*, 201-218, DOI: [10.1016/j.nantod.2018.02.008](https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.02.008).

Conclusiones y perspectivas

8.1. Conclusiones generales

En los últimos años se han realizado notables avances en el desarrollo de la nanotecnología, lo que ha llevado al rápido desarrollo de aplicaciones comerciales que involucran el uso de una amplia variedad de nanomateriales. Su uso extensivo puede resultar en la descarga de estos materiales al medio ambiente. Aunque la investigación y los informes sobre los efectos de los nanomateriales en el medio ambiente se han multiplicado en la última década, existen muchos vacíos en el conocimiento sobre la toxicidad de las nanopartículas (NP) y muchos problemas sin resolver. En esta tesis se ha asumido este reto y se ha investigado la variación de las propiedades ópticas, espectroscópicas y fotoquímicas del material fotosintético cuando interactúa con nanopartículas. Con el fin de investigar nanopartículas con diversas propiedades, se estudió el efecto de las NPs metálicas (NpAu), NPs de óxidos metálicos (magnetita) y NPs de carbono (nano-CB y GQD) sobre la actividad fotosintética de las plantas desde una perspectiva fotoquímica.

De lo estudiado en esta tesis, en combinación con información previa de literatura, se desprende que la interacción entre plantas y nanopartículas es muy compleja y depende, por un lado, de factores como: forma, tamaño, características superficiales, química del material, concentración, propiedades ópticas, etc., y por otro: de la planta (genotipo), edad, suelo o medio que soporta el crecimiento de la planta, intensidad de iluminación, vía de exposición (raíces, hojas, u otra), etc. Mientras que una gran cantidad de nanomateriales, tales como las nanopartículas de carbono, según los resultados de esta tesis, provocan efectos tóxicos, muchas otras, como las nanopartículas de magnetita, actúan como reguladores del crecimiento vegetal o de la actividad fotosintética, pudiendo así favorecer el

desarrollo de las plantas, anunciando su potencial aplicación en la agricultura como fertilizantes nanoparticulados.

Cabe señalar que en esta tesis se logró sintetizar y caracterizar cada una de estas nanopartículas. Dado que el tamaño de las nanopartículas juega un papel importante en su comportamiento, reactividad y toxicidad, no sorprende encontrar efectos tanto positivos como negativos de las nanopartículas en las plantas. Particularmente, a partir de la aplicación de diferentes nanopartículas en hojas, se observaron cambios en las propiedades fotofísicas y se pudieron distinguir diferentes efectos en diferentes puntos de la cadena de transporte electrónico a partir del registro de fluorescencia de clorofila. Sin embargo, dadas las propiedades ópticas de las partículas, en algunos casos, la señal de fluorescencia obtenida tuvo que ser cuidadosamente corregida o analizada, e incluso en algunos casos se perdió la correspondencia de los parámetros derivados de la presencia de NPs. Por otro lado, se requirieron experimentos adicionales con cloroplastos para determinar una posible transferencia de energía o carga entre la NP y el/los RC de los fotosistemas, como fue el caso de las NpAu y las NP de carbono.

Actualmente, las nanopartículas se utilizan de forma intensiva, sin embargo no se puede descuidar el medio ambiente. Es evidente que el efecto de las nanopartículas depende fuertemente de su concentración. A partir de los resultados descritos aquí en los [Capítulo 6](#) y [Capítulo 7](#), las nanopartículas en exceso son dañinas para las plantas, mientras que, cuando están presentes en trazas, pueden ser beneficiosas. Por lo tanto, la creciente concentración de nanopartículas en el medio ambiente puede causar un grave impacto en el futuro. Por otro lado, nanopartículas compuestas de metales pesados, revisado en el [Capítulo 5](#), independientemente de su baja reactividad química, producen efectos esencialmente tóxicos. Luego, nanopartículas de composición a base de carbono y oxígeno también pueden producir efectos adversos dado su pequeño tamaño y alta reactividad química y fotoquímica, tal como fue explorado en el [Capítulo 7](#). En ese sentido, no es sorprendente que las nanopartículas con mayor cantidad de efectos beneficiosos reportados en esta tesis sean las nanopartículas de magnetita, ya que desde el punto de vista de su composición, no están compuestas de metales pesados o materiales con baja predominancia en el suelo, y además contienen Fe (II) el cual es un nutriente vital para la planta.

Tanto las nanopartículas aquí estudiadas, dadas sus propiedades espectroscópicas (plasmon superficial (NpAu), semiconductor (MAG), y fluorescencia (CD)) y su capacidad para aceptar electrones o energía de los RC de los fotosistemas, tienen potencial para su uso en sensores o materiales híbridos con múltiples aplicaciones.

Esta tesis proporcionó información novedosa a la literatura conocida al mostrar la influencia de las nanopartículas de óxidos metálicos, metálicos y no metálicos en las plantas. Son pocas las investigaciones donde se realice un estudio fisicoquímico de la interacción de nanomateriales y plantas como el aquí descrito, ya que la mayor parte de la bibliografía realiza un estudio morfológico que solo da cuenta de los efectos finales de dicha interacción. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender los mecanismos moleculares de la interacción de las nanopartículas en los vegetales y en otros organismos fotosintéticos.

8.2. Perspectivas futuras

Si bien esta tesis ha logrado dar luz respecto a los interrogantes iniciales respecto al efecto de las nanopartículas en las plantas, ha impulsado nuevas preguntas que abren un camino a recorrer a futuro. En lo que sigue se resumen las preguntas más relevantes, las cuales representan a su vez las perspectivas futuras del trabajo de tesis presentado:

Dependencia del efecto del tamaño de las nanopartículas en las plantas

Aunque a lo largo de la tesis se utilizaron nanopartículas de distinto diámetro, no se realizó un estudio sistemático de variación de los tamaños dentro de cada tipo de nanopartícula. Una investigación futura con foco en este aspecto sería muy interesante. A juzgar por los métodos de síntesis, el tamaño de las nanopartículas de oro sería el más fácil de modificar, variando la concentración del reductor y el estabilizador de superficie. Sin embargo, estudiar el efecto de los tamaños de NP en las plantas presenta un desafío en la interpretación de los resultados ya que una modificación en las dimensiones va ligada a variaciones en otras propiedades como su espectro de absorción o emisión, reactividad, estabilidad en suspensión, etc. Es previsible, entonces, que haya una dificultad intrínseca en relacionar los efectos que puedan encontrarse con cada variable por separado.

Biosensores y materiales híbridos

La nanotecnología tiene el potencial de habilitar propiedades funcionales nuevas en organelas y organismos fotosintéticos que permiten, en ciertos casos, mejorar el aprovechamiento de la energía solar y la detección bioquímica. Si bien hay múltiples reportes de transferencia de carga o energía desde las NP a cloroplastos, todas las nanopartículas estudiadas en la tesis produjeron un *quenching* de la fluorescencia de la clorofila de las hojas. Por un lado, las NpAu serían capaces de aceptar electrones desde el RC del PSII, mientras que por otro, las NP de carbono aceptan energía desde ambos fotosistemas. Por ende, dados los resultados presentados en la tesis, ni las nanopartículas de oro ni las de carbono inducen un aumento neto en la fotosíntesis ya que ambas contribuyen a la pérdida de energía, la cual impacta negativamente en el desarrollo y la salud general de la planta. Sin embargo, esta capacidad de ambas partículas de aceptar energía o carga de los cloroplastos permite su potencial uso como materiales híbridos para el desarrollo de biosensores. Para el caso de las nanopartículas de magnetita no se encontró evidencia de una transferencia de carga o energía con los fotosistemas, pero dadas las propiedades magnéticas de las partículas es posible utilizarlas como sensores por sí mismas. Actualmente hay en desarrollo una gran variedad de nanopartículas, usualmente funcionalizadas o unidas a moléculas específicas, que son capaces de monitorear cambios en la concentración de diferentes compuestos objetivo en el interior de la célula. Los materiales híbridos compuestos por nanopartículas incluidas en material fotosintético, serán seguramente candidatos promisorios para el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico en los próximos años.

NP y su uso en la agricultura

Parte de la motivación del estudio del efecto de las nanopartículas en las plantas estuvo dividida entre los posibles efectos negativos que pudieran aparecer, producto de su presencia en el medio ambiente, y los posibles efectos positivos para su utilización como agroquímicos inteligentes. En este último caso, no solo se debe revisar que los nanomateriales utilizados no produzcan toxicidad o consecuencias adversas a la salud de la planta, sino también debe tenerse en cuenta la capacidad del nanomaterial de permanecer y bioacumularse en el suelo o fuentes de agua. Es importante, también, comparar los efectos positivos con los del material a granel o sus respectivos análogos convencionales. En ese

sentido, los resultados presentados en esta tesis no dan cuenta de ello, al no estudiarse comparativamente el efecto de, por ejemplo, nanopartículas de magnetita y magnetita en suspensión o a granel. De esta forma, para el desarrollo de nanotecnologías para una agricultura sustentable es necesario que se realicen estudios donde se investigue específicamente la mejora real en el crecimiento o desarrollo de la planta (en el caso que se trate de un fertilizante) entre la aplicación de nano-formulaciones y el material a granel o sus análogos convencionales, así como su permanencia en el suelo y posible bioacumulación y expansión en la cadena trófica. Es vital que se inviertan importantes esfuerzos de investigación en el desarrollo de productos novedosos que sean realmente competitivos y tengan el potencial de hacer que la agricultura del mañana sea más sostenible. Se espera que la aplicación responsable de las nanotecnologías pueda desempeñar un papel importante para alcanzar este objetivo.

Apéndices

A. Parámetros derivados del transiente OJIP

TABLA A.1: Ecuaciones y definiciones de los parámetros OJIP (basadas en la información presentada por Stirbet, Strasser, Kalaji y colaboradores ([1-3]). Para mayor claridad, se han simplificado varias notaciones y definiciones de los parámetros OJIP utilizados..

Parámetro	Definición
<i>Parámetros básicos derivados de la curva</i>	
$F_o = F_{20\mu s} \text{ o } F_{50\mu s}$	Primer valor de fluorescencia confiable después del inicio de la iluminación actínica; utilizado como valor inicial de la fluorescencia
F_M	Máxima intensidad de fluorescencia de clorofila medida cuando todos los centros de reacción del fotosistema II (PSII) están cerrados.
F_t	Intensidad de fluorescencia al tiempo t
$F_I = F_{30ms}$	Valor de fluorescencia a 30 ms (nivel I)
$F_J = F_{2ms}$	Valor de fluorescencia a 2 ms (nivel J)
$F_K = F_{300\mu s}$	Valor de fluorescencia a 300 us
F_v	Fluorescencia de clorofila variable máxima($F_m - F_o$)

Continua en la siguiente página

Tabla A.1 – Continua desde la página anterior

Parámetro	Definición
$\frac{F_V}{F_M}$	Cociente relacionado al rendimiento cuántico máximo del PSII
$\frac{F_V}{F_0}$	Valor que es proporcional a la actividad del complejo separador de agua en el lado del PSII
<i>Parámetros técnicos de fluorescencia</i>	
$V_t = \frac{F_t - F_0}{F_M - F_0}$	Fluorescencia relativa variable de Chl
$V_v = F_t - F_0$	Fluorescencia variable de Chl
$Area$	Área entre la curva OJIP y la línea $F = FM$
$\frac{\Delta V}{\Delta t})_0$	pendiente inicial de V_t que describe directamente el flujo de captura TRo/RC; por tanto, esta relación también expresa la tasa de acumulación de centros de reacción cerrados; $\frac{\Delta V}{\Delta t} = \frac{\Delta F}{(F_M - F_0) \cdot \Delta t_0} = \frac{\Delta(\frac{QA^-}{QA_{total}})}{\Delta t_0}$
$M_0 = (dV/dt)_o = 4ms^{-1} \cdot \frac{F_K - F_0}{F_M - F_0}$	Valor aproximado de la pendiente inicial de la curva OJIP (para $F_0 = F_{50us}$)
$S_M = \frac{Area}{F_M - F_{50us}}$	Area normalizada, proporcional al número de portadores de electrones tamaño del pool de PQ \sim energía necesaria para cerrar todos los RC

Continua en la siguiente página

Tabla A.1 – Continua desde la página anterior

Parámetro	Definición
$\frac{S_M}{t_{FM}}$	la relación que representa el estado redox promedio de QA en el lapso de tiempo de 0 a TFM y, concomitantemente, la fracción promedio de centros de reacción abiertos durante el tiempo necesario para completar su cierre.
$N = S_M \cdot \frac{V_L}{M_0}$	Número de rotación, es el número total de electrones transferidos a la cadena de transporte de electrones (número de cambios redox de Q_A hasta que se alcanza Fm)
t_{FM}	Tiempo para alcanzar el valor máximo de fluorescencia FM
<i>Definiciones de flujos de energía (notación simplificada de [1])</i>	
$ABS \text{ o } J_{ABS} = TR + DI$	Tasa de absorción de fotones por antena PSII total, denotada como flujo de fotones absorbidos
$DI = J_{DI}$	Tasa de disipación de energía en todos los PSII, en procesos distintos al atrapamiento - denotado como flujo de energía disipada
$ET = J_{ET20}$	Flujo de transporte de electrones de QA a QB
$RE = J_{RE10}$	Flujo de transporte de electrones hasta los aceptores de PSI (definido en t = 30 ms, correspondiente al nivel I)

Continua en la siguiente página

Tabla A.1 – Continua desde la página anterior

Parámetro	Definición
$TR = J_{TR}$	Tasa de atrapamiento de excitones (que conduce a la reducción de QA) por todos los flujos de excitones atrapados denotados por RC de PSII
$TR_0 = J_{TR0}$	Flujo de excitón atrapado máximo (inicial)
<i>Rendimientos cuánticos y eficiencias/probabilidades</i>	
$\Phi_{PO} = \frac{TR_0}{ABS} = 1 - \frac{F_0}{F_M}$	Rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria de PSII
$\Phi_{PT} = \frac{TR}{ABS} = 1 - \frac{F_t}{F_M} = \Phi_{PO} \cdot (1 - V_t)$	Rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria de PSII
$\Phi_{ET} = \frac{ET}{ABS} = 1 - \frac{F_J}{F_M} = \Phi_{PO} \cdot (1 - V_J)$	Rendimiento cuántico del flujo de transporte de electrones de QA a QB
$\Phi_{RE} = \frac{RE}{ABS} = 1 - \frac{F_I}{F_M} = \Phi_{PO} \cdot (1 - V_I)$	Rendimiento cuántico del flujo de transporte de electrones hasta los aceptores de electrones PSI
$\Psi_{ET} = \frac{ET}{TR} = 1 - V_J$	Eficiencia / probabilidad con la que un electrón atrapado en PSII se transfiere de QA a QB
$\Psi_{RE} = \frac{RE}{TR} = 1 - V_I$	Eficiencia / probabilidad con la que se transfiere un electrón atrapado en PSII hasta que los aceptores de PSI
$\delta_{RE} = \frac{RE}{ET} = \frac{1 - V_I}{1 - V_J}$	Eficiencia / probabilidad con la que se transfiere un electrón de QB hasta los aceptores de PSI
$\Phi_{DI} = \frac{DI}{ABS} = \frac{F_0}{F_M}$	Rendimiento cuántico de disipación térmica
<i>Flujos de energía específicos (por centro de reacción PSII activo)</i>	

Continua en la siguiente página

Tabla A.1 – Continua desde la página anterior

Parámetro	Definición
$\frac{ABS}{RC} = \frac{Mo}{V_J} \cdot \frac{1}{\Phi_{PO}}$	Flujo medio de fotones absorbidos por centro de reacción PSII (o también, tamaño de antena aparente de un PSII activo)
$\frac{RC}{ABS} = \Phi_{PO} \cdot \frac{V_J}{Mo} = \frac{\gamma_{RC2}}{(1-\gamma_{RC2})}$	Número de RC reductores de QA por antena PSII Chl
$\frac{DI}{RC} = \frac{\partial V}{\partial t_o \cdot V_J} \cdot \frac{Fm}{Fo}$	Disipación de energía efectiva in RC activos
$\frac{TR}{RC} = \frac{Mo}{V_J}$	Tasa de atrapamiento máxima de los fotones absorbidos en RC
$\frac{ET}{RC} = \frac{Mo}{V_J} \cdot (1 - V_J)$	Flujo de transporte de electrones de QA a QB por RC-PSII
$\frac{RE}{RC} = \frac{Mo}{V_J} \cdot (1 - V_I)$	Flujo de transporte de electrones hasta los aceptores de PSI por RC-PSII
$\gamma_{RC2} = \frac{Chl_{RC}}{Chl_{tot}}$	Probabilidad de que un PSII Chl funcione como RC (ver RC/ABS)
<i>Flujos/actividades de energía fenomenológica (por sección transversal excitada CS)</i>	
$\frac{ABS}{CS_o} = F_0$ y $\frac{ABS}{CS_M} = F_M$	Flujo de fotones absorbido por sección transversal (o también, tamaño aparente de antena PSII)
$\frac{TR}{CS} = \frac{TR}{ABS} \cdot \frac{ABS}{CS}$	Flujo máximo de excitón atrapado por sección transversal
$\frac{ET}{CS} = \frac{ET}{ABS} \cdot \frac{ABS}{CS}$	Flujo de transporte de electrones de QA a QB por sección transversal

Continua en la siguiente página

Tabla A.1 – Continua desde la página anterior

Parámetro	Definición
$\frac{RE}{CS} = \frac{RE}{ABS} \cdot \frac{ABS}{CS}$	Flujo de transporte de electrones hasta aceptores de PSI por sección transversal
$\frac{RC}{CS} = \frac{RC}{ABS} \cdot \frac{ABS}{CS}$	El número de RC PSII activos por sección transversal
<i>Índices de rendimiento (combinación de parámetros)</i>	
$PI_{ABS} = \frac{\gamma_{RC2}}{(1-\gamma_{RC2})} \cdot \frac{\Phi_{PO}}{(1-\Phi_{PO})} \cdot \frac{\Psi_{ET}}{(1-\Psi_{ET})}$	Índice de rendimiento para la conservación de energía de los fotones absorbidos por la antena PSII, hasta la reducción de QB
$PI_{ABS}^{total} = PI_{ABS} \cdot \frac{\delta_{RE}}{(1-\delta_{RE})}$	Índice de rendimiento para la conservación de energía de los fotones absorbidos por la antena PSII, hasta la reducción de los aceptores PSI
$SFI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} \cdot \Phi_{PO} \cdot \Phi_{ET}$	Indicador de estructura y funcionamiento del PSII
<i>Fuerzas impulsoras (fuerzas impulsoras totales de la actividad fotoquímica)</i>	
$DF_{ABS}^{total} = \log(PI_{ABS}^{total})$	Fuerza motriz en base a absorción
$DF_{CS}^{total} = \log(PI_{CS}^{total})$	Fuerza impulsora en base de la sección transversal
<i>Constantes de tasa de desexcitación de la antena PSII</i>	
$k_N = k_F \cdot \frac{ABS}{F_M}$	La constante de velocidad de desexcitación no fotoquímica en las antenas excitadas (vía no fotoquímica) ; kF es la constante de velocidad para la emisión de fluorescencia

Continua en la siguiente página

Tabla A.1 – Continua desde la página anterior

Parámetro	Definición
$k_P = \frac{k_F \cdot ABS \cdot F_V}{F_0 \cdot F_M} = k_N \cdot \frac{F_V}{F_0}$	Constante de velocidad de desexcitación fotoquímica en las antenas excitadas (vía fotoquímica)
<i>Conectividad entre unidades del PSII</i>	
$W_E = 1 - \left[\frac{F_J - F_K}{F_J - F_{50\mu s}} \right]^{1/5}$	Valor derivado del modelo relativo a la fluorescencia variable a 100 μs calculado para unidades de PSII desconectadas
$W = \frac{F_{100\mu s} - F_{50\mu s}}{F_J - F_{50\mu s}}$	Fluorescencia variable relativa a 100 μs
$C = \frac{W_E - W}{W \cdot (1 - W_E \cdot V_J)}$	Constante de curvatura de la fase inicial de la curva O - J
$p_{2G} = C \cdot \left(\frac{F_{50\mu s}}{F_J - F_{50\mu s}} \right)$	Probabilidad global de agrupación
$p = \frac{p_{2G} \cdot \left(\frac{F_M}{F_{50\mu s}} - 1 \right)}{1 + p_{2G} \cdot \left(\frac{F_M}{F_{50\mu s}} - 1 \right)}$	Parámetro de conectividad
$\omega = p \cdot \frac{F_M - F_{50\mu s}}{F_M}$	Probabilidad de la conectividad entre unidades del PSII

B. Parámetros derivados de la cinética de Kautsky

TABLA B.2: Definición de parámetros y cocientes de fluorescencia de clorofila (Chl) a partir de las señales medidas durante la cinética de inducción (efecto Kautsky) de hojas con el fluorómetro de pulso modulado.

Cálculo	Definición
Valores de fluorescencia obtenidos directamente de la curva	
$F_0 = F_{20\text{us}} \text{ o } F_{50\text{us}}$	Primer valor de fluorescencia fiable tras el inicio de la iluminación; utilizado como valor inicial de la fluorescencia
F_M	Valor de fluorescencia en el pico de la curva OJIP; valor máximo bajo iluminación saturada a partir de una muestra previamente adaptada a la oscuridad
$F_V = F_M - F_0$	fluorescencia variable en el estado adaptado a la oscuridad
F_S	Nivel de fluorescencia en estado estacionario inducido por luz actínica
F_M'	Máxima fluorescencia en el estado de adaptación a la luz de las hojas (inducida por una luz saturada)
Cocientes de fluorescencia	
F_V/F_M	Cociente relacionado con el rendimiento cuántico máximo de PSII
F_v/F_0	Cociente proporcional a la actividad del complejo de división del agua en el lado donante del PSII
Rendimientos cuánticos bajo aclimatación actínica	
$\Phi_C = F_S/F_M$	Rendimiento cuántico del decaimiento fotofísico, incluye decaimiento no radiativo, cruce entre sistemas y fluorescencia.
$\Phi_{NPQ} = \frac{F_S \cdot (F_M - F_M')}{F_M \cdot F_M'}$	Rendimiento cuántico del <i>quenching</i> no fotoquímico (NPQ)
$\Phi_{PSII} = \frac{F_M' - F_S}{F_M'}$	Rendimiento cuántico real o efectivo de conversión fotoquímica del PSII
Parámetros derivados asociados al aprovechamiento de la energía	
$PS_{\text{rate}} = \Phi_{PSII} \cdot LA$	Tasa fotosintética estimada del PSII
$q_P = \frac{F_M' - F_S}{F_M - F_0}$	<i>Quenching</i> fotoquímico
$q_{NP} = \frac{F_M - F_M'}{F_M - F_0}$	<i>Quenching</i> no fotoquímico

Referencias

- (1) Stirbet, A. y Govindjee *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2011**, *104*, 236-257, DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010).
- (2) Zivcak, M.; Brestic, M.; Kalaji, H. M. y Govindjee *Photosynth. Res.* **2014**, *119*, 339-354, DOI: [10.1007/s11120-014-9969-8](https://doi.org/10.1007/s11120-014-9969-8).
- (3) Kalaji, H. M.; Govindjee; Bosa, K.; Kościelniak, J. y Żuk-Gołaszewska, K. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 64-72, DOI: [10.1007/978-3-642-32034-7_164](https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_164).