

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA



TESIS DE MAESTRÍA



**EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA FOTOSÍNTESIS Y TASA DE
TRANSPIRACIÓN EN JACINTO DE AGUA**

Autor:

Jeniffer Yeismar CALDERÓN DUARTE

Director(es):

Dr. Jose Antonio CALDERÓN ARENAS

Dr. Gabriel PEÑA RODRIGUEZ

*Con la finalidad de obtener el grado de:
Maestro en Tecnología Avanzada
En*

CICATA Unidad Legaria

17 de Diciembre de 2015



SIP-14

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 13:00 horas del día 10 del mes de Diciembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-Legaria para examinar la tesis titulada:

Efecto del ultrasonido en la fotosíntesis y tasa de transpiración en Jacinto de agua

Presentada por el alumno:

<u>Calderón</u>	<u>Duarte</u>	<u>Jeniffer Yeismar</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Con registro: <table border="1"><tr><td>A</td><td>1</td><td>4</td><td>0</td><td>7</td><td>0</td><td>2</td></tr></table>			A	1	4	0	7	0	2
A	1	4	0	7	0	2			

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. José Antonio Calderón Arenas

Dr. Gabriel Peña Rodríguez

Dr. Ernesto Marín Meares

Dr. José Bruno Rojas Trigos

Dr. Joel Hernández Wong

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. José Antonio Calderón Arenas

CICATA - I.P.N. U. LEGARIA
Centro de Investigación en Ciencia
Aplicada y Tecnología Avanzada
del Instituto Politécnico Nacional




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 10 del mes de Diciembre del año 2015, el (la) que suscribe JENIFFER YEISMAR CALDERÓN DUARTE alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA, con número de registro A140702, adscrito(a) al CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA UNIDAD LEGARIA, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. JOSE ANTONIO CALDERÓN ARENAS y del Dr. GABRIEL PEÑA RODRIGUEZ y cede los derechos del trabajo titulado EFFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA FOTOSÍNTESIS Y TASA DE TRANSPIRACIÓN EN JACINTO DE AGUA. Al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones ing.jenimar@hotmail.es, calder62@hotmail.com y ggabrielp@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Jeniffer Yeismar Calderón
Nombre y firma del alumno(a)

RESUMEN

Se reporta el efecto de las ondas sónicas y ultrasónicas en la actividad fotosintética del lirio acuático, para diferentes valores de la frecuencia y la potencia de las irradiaciones. Se utilizaron la Técnica de Espectroscopia Fotoacústica y el sistema Li-COR 6400XT en el monitoreo de la tasa fotosintética de las plantas estudiadas. Con la Técnica de Espectroscopia Fotoacústica se obtuvieron los espectros de absorción ópticos en el rango visible (longitudes de ondas donde se ubican los pigmentos fotosintéticos), antes y después de la irradiación. Con el sistema Li-COR 6400XT se realizó el monitoreo de las variables de la transpiración y la fluorescencia, antes y después de exponer las plantas a la irradiación. Se documentó la inhibición de la actividad fotosintética de las plantas de lirio acuático varios días después de la exposición a las irradiaciones, así como, de una significativa disminución de la tasa de transpiración, debida presumiblemente al fenómeno de la cavitación. Los mejores resultados se obtuvieron para una irradiación a la frecuencia sónica de 5 KHz y en el umbral inferior ultrasónico de 17 Khz, y para potencias entre 20 y 30 W.

Esta investigación es importante porque propone como metodología amigable y de bajo costo energético, un rango útil en potencia, en frecuencia con ondas sónicas y ultrasónicas, para el control y/o erradicación del Lirio acuático.

ABSTRACT

The effect of sonic and ultrasonic waves in the photosynthetic activity of aquatic irium, for different values of frequency and power of irradiation is reported. Photoacoustic Spectroscopic technique and Li-COR 6400XT system were used in monitoring the photosynthetic rate of the plant studied. By means of Photoacoustic Spectroscopy Technique the optical absorption spectra, in the visible range (wavelengths which photosynthetic pigments are located), were obtained, before and after irradiation. Using Li-COR 6400XT system, the transpiration and fluorescence variables were measured, before and after irradiation. Inhibition of photosynthetic activity in the aquatic lirim several days after exposure to irradiation was documented, as well as a significant decrease in the rate of transpiration, due presumably to cavitation phenomena. The best results were obtained for irradiation at the sonic frequency of 5 KHz and lower ultrasonic threshold of 17 kHz, and powers between 20 and 30 W.

This investigation is important because propose the sonic and ultrasonic waves, with sweeping power intensity, as control methodology to aquatic lirim in the water bodies where it reproduces and grows.

AGRADECIMIENTOS

En este apartado, quiero agradecerles de manera muy cordial a todas aquellas personas que han aportado un granito de arena a mi formación profesional y personal. En particular a:

Al Dr. Jose Antonio Calderón Arenas, quien ha sido mi guía constante en este bonito camino de formación profesional. Le considero un ejemplo a seguir, a él todo mi respeto y admiración.

Al Dr. Gabriel Peña Rodríguez, por permitirme ser su alumna, por contagiarme siempre de su buena actitud de trabajo, por creer en mis capacidades y abrir las puertas a esta grata experiencia de adquirir nuevos conocimientos.

A todo los integrantes del laboratorio, en especial al Dr. Ernesto Marín, por sus significativos aportes y sugerencias en el aprendizaje.

A todos los administrativos por guiarme en los tramites correspondientes a CICATA, en especial al Dr. Fernando Trejo.

A mis mejores amigas, Kelly Martínez; por los buenos consejos, su amistad incondicional y por ese currículo de buenos momentos que tenemos en común desde hace años, a ella, toda mi amistad. Y Monserrat Suarez, por hacerme sentir como en casa.

A Tatiana Leal y Jeniffer Olarte por brindarme su compañía, por los momentos compartidos que nos han hecho crecer como personas. A ellas todo mi cariño.

A toda mi familia en Colombia por creer siempre en mi, por los principios que desde pequeña me han inculcado. A ellos todos mis abrazos, todo mi amor. De manera particular agradezco a la familia Mantilla Correa, por brindarme su apoyo cuando más lo necesitaba.

A Conacyt, por la beca que me ha permitido estudiar la Maestría en Tecnología Avanzada. A el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA-Legaria) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), por abrirme sus puertas y permitirme escalar un poquito más en el bello y largo camino de la ciencia.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a los pilares de mi vida:

“A mi familia: mi madre Adilia Duarte, por creer siempre en mi y darme la confianza que se necesita para luchar por lo que se quiere en la vida; a mi padre Jose Calderón, a quien le debo las bases de mi aprendizaje, la esperanza de vivir y la ilusión de construir un nuevo mundo; a mis hermanos Asdrubal y William, de ellos obtengo la alegría de vivir, de ellos son casi todas las sonrisas de mi infancia... Mi Familia, el pilar más importante”

“Al arte de dudar, sin ello sería imposible el desarrollo y el cambio”

“A el científico mayor; a quien la religión apoda Dios”

*El éxito generalmente no se logra con grandes golpes de suerte; sino con pequeñas cosas que ocurren todos los días
-Benjamín Franklin-*

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	<u>9</u>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	<u>10</u>
JUSTIFICACIÓN	<u>11</u>
OBJETIVOS	<u>12</u>
I. ANTECEDENTES	<u>13</u>
A. ULTRASONIDO Y CAVITACIÓN.	<u>13</u>
B. EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE LA PLANTA.	<u>14</u>
C. LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA EN LA INVESTIGACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS.	<u>15</u>
D. SISTEMA Li-COR.	<u>16</u>
ESTADO DEL ARTE	<u>17</u>
EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA EN PLANTAS VERDES.	<u>17</u>
II. FUNDAMENTOS TEORICOS	<u>18</u>
A. CAVITACIÓN Y ULTRASONIDO.	<u>18</u>
B. LA TÉCNICA FOTOACÚSTICA.	<u>23</u>
C. SISTEMA Li-COR.	<u>26</u>
D. LIRIO ACUÁTICO	<u>30</u>
III. GENERADOR ULTRASONICO SINTONISABLE	<u>33</u>

IV.	MONITOREO DEL EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA EN EL LIRIO ACUÁTICO MEDIANTE LA TÉCNICA FOTOACÚSTICA	<u>38</u>
A.	IMPLEMENTACIÓN DE LA CELDA FOTOACÚSTICA MTEC Y CONFIGURACIÓN DE LA EFA.	<u>38</u>
B.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	<u>40</u>
C.	RESULTADOS.	<u>40</u>
D.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.	<u>42</u>
V.	MONITOREO DEL EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA EN EL LIRIO ACUÁTICO CON EL SISTEMA Li-COR	<u>44</u>
A.	IMPLEMENTACIÓN Y CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA Li-COR.	<u>44</u>
B.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	<u>44</u>
C.	RESULTADOS.	<u>45</u>
D.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	<u>50</u>
VI.	CONCLUSIONES	<u>52</u>
	BIBLIOGRAFÍA	<u>53</u>

INTRODUCCIÓN

El agua es un elemento de vida; desarrollar metodologías, estrategias y proyectos que contribuyan a la conservación de ella es de vital importancia para esta y las futuras generaciones. En los cuerpos de agua dulce y salada, crece y se reproduce la flora que en muchas ocasiones genera desventajas para la conservación de la misma, tales como las malezas acuáticas. En el control de las malezas, las algas, los manglares, los juncos, las ortigas, las monocotiledóneas, el Jacinto de agua o Lirio acuático es un ejemplo de maleza común en los cuerpos de agua. Esta investigación se enfoca al caso del Lirio acuático, planta que se reproduce en agua dulce principalmente en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo.

El Lirio acuático cuando se reproduce en abundancia sobre lagunas, canales o ríos, genera no sólo un impacto económico para las embarcaciones que transitan por ese medio, sino también en industrias como las hidroeléctricas; por otro lado, esta planta es un gran consumidor de nutrientes del agua y su evo-transpiración es elevada, tanto así que puede llegar a secar el lugar acuático donde se reproduce si no se realizan extracciones periódicas de esta planta. Dado esto, existe la necesidad de proponer metodologías eficientes y económicas que contribuyan al control y/o erradicación de esta planta..

Por otro lado, entre las técnicas usadas para el estudio y monitoreo de fotosíntesis en las plantas se usan equipos especializados tales como sondas de presión para medir transpiración de plantas; UV/VIS para el estudio de pigmentos fotosintéticos; instrumentos de medición que detectan señales en el espectro visible rojo y en el infrarrojo cercano para calcular variables como el índice de vegetación diferencial, aplicados a campos grandes de flora; entre otros.

Este proyecto propone el estudio del efecto que tienen las ondas sónicas y ultrasónicas, en la actividad fotosintética del Lirio acuático, lo cual permita sugerir una metodología útil de erradicación y/o control de la planta, que sea amigable con el medio ambiente y de bajo costo energético en la implementación de ella. Como técnicas de medición para monitorear la actividad fotosintética del Lirio acuático antes y después de irradiarse con ondas sónicas y ultrasónicas, se proponen: la Técnica Fotoacústica (TFA), para análisis de espectros de absorción en la planta; también, el sistema portátil Li-COR 6400XT para estudios cuantitativos de lo que sucede principalmente en las variables transpiración y fluorescencia del Lirio acuático. Con el objetivo principal de encontrar un rango útil en frecuencia e intensidad donde se disminuya en mayor medida la actividad fotosintética de la planta.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué efecto tiene la irradiación sónica y ultrasónica a diferentes frecuencias e intensidades en la actividad fotosintética del Lirio Acuático?

Pocos estudios se tienen sobre el impacto ambiental del Lirio acuático y su actividad fotosintética. Sin embargo las desventajas de su reproducción se evidencian en las pérdidas económicas que tienen por ejemplo: las hidroeléctricas, cuando esta planta libre flotadora ingresa en abundancia a las turbinas genera obstrucción en las hélices; por otro lado, debido a que el Lirio acuático incrementa su biomasa en un periodo de 6 a 20 días, conlleva que en los cuerpos de agua se reproduzcan de una manera acelerada, hasta el punto de impedir el paso de embarcaciones y por ende el retraso del comercio. Acerca del impacto ambiental, cuando el Lirio acuático cubre en totalidad la superficie del medio donde se reproduce, obstruye el paso de luz a la flora que crece por debajo de él, propiciando la anulación de la fotosíntesis en algunas especies de plantas; cabe resaltar que los nutrientes como el fósforo, nitrógeno y potasio, son absorbidos en gran cantidad por esta planta.

La literatura ha reportado que el uso de señales sónicas y ultrasónicas permite generar el fenómeno de cavitación en superficies acuosas. Continuando el estudio iniciado y desarrollado hace unos años por A. Cardona, se propone encontrar la "frecuencia y potencia útil" que genere un daño significativo en la actividad fotosintética de la planta que facilite el control y/o erradicación de esta planta en los cuerpos de agua donde se reproduce en abundancia. Metodologías para la erradicación de esta planta ya han sido propuestas con anterioridad, pero sus éxitos son parciales. De ahí la importancia de profundizar en este campo de estudio que nos permita proponer una metodología amigable, eficiente y energéticamente rentable para disminuir o erradicar esta maleza en los cuerpos de agua dulce.

JUSTIFICACIÓN

Esta investigación contribuye al estudio de la actividad fotosintética del Lirio acuático cuando se expone a irradiaciones sónicas y ultrasónicas. La necesidad de este estudio radica en el hecho que el Lirio acuático es considerado actualmente como una maleza en los cuerpos de agua en zonas tropicales y subtropicales del mundo y se requiere el desarrollo de nuevas metodologías para su control o erradicación, eficientes, de bajo costo y amigables con el medio ambiente. Los resultados de este trabajo tienen un impacto favorable con el medio ambiente; al tener un conocimiento del cómo se definen los espectros de absorción de los pigmentos fotosintéticos en la planta y cómo se comportan parámetros importantes en la fotosíntesis, tales como transpiración y fluorescencia, antes y después de irradiarse; se puede obtener una visión más amplia y clara para la toma de decisiones dirigidas a encontrar la alternativa más económica y favorable del control del Lirio Acuático.

OBJETIVOS

General

Estudio del efecto de la frecuencia e intensidad en la irradiación sónica y ultrasónica, en la actividad fotosintética de plantas de Lirio acuático, en el establecimiento de una metodología para el control de esta maleza.

Específicos

Adecuación del hábitat para la conservación del Lirio acuático, mediante la implementación de un acuario invernadero y la determinación de los parámetros para su control.

Configuración del sistema de generación de radiación sónica y ultrasónica, sintonizable en frecuencia e intensidad.

Configuración del sistema de medición de la técnica de espectroscopia fotoacústica, con una nueva celda fotoacústica de línea MC300.

Configuración del sistema portátil Li-COR 6400XT, para el monitoreo de la fluorescencia y la tasa de transpiración.

Irradiación sónica y ultrasónica, en las plantas del Lirio Acuático, a diferentes intensidades.

Medición de los espectros de absorción ópticos mediante la técnica de espectroscopia fotoacústica, antes y después de la irradiación con diferentes potencias y frecuencias.

Medición de la fluorescencia y la tasa de transpiración mediante el sistema Li-COR 6400XT, antes y después de la irradiación con diferentes potencias y frecuencias.

II. ANTECEDENTES

A. ULTRASONIDO Y CAVITACIÓN

Ultrasonido (US)

El sonido audible es una onda acústica cuya frecuencia esta en el rango de los 16-20Hz a los 16-20Khz, se considera US a las frecuencias ubicadas por encima del límite perceptible por el oído humano (en la literatura se encuentra este límite en 16 Khz o en 20 Khz, dependiendo la fuente).

Los animales han usado el US mucho antes que los humanos, para detectar, localizar, determinar movimientos, capturar sus presas, evitar obstáculos y depredadores. Sin embargo, a partir del siglo XVIII se hace notar el US como un fenómeno de la naturaleza cuando el biólogo italiano, Lazzaro Spallanzani descubre en 1700 la existencia de estas ondas, observando cómo los murciélagos atrapaban sus presas. En la primera mitad del siglo XIX, entre 1803 y 1853, el físico y matemático austriaco Christian Andreas Doppler presenta su trabajo sobre el "Efecto Doppler", observando ciertas propiedades de la luz en movimiento, que son aplicables a las ondas US. En la segunda mitad del siglo XIX los hermanos Pierre y Jacques Curie descubren las propiedades de algunos cristales, conocidos como "Efecto piezo-eléctrico", lo cual sirve de base para las diversas utilidades de las ondas de US, en los transductores. A comienzos del siglo XX, se realiza una de las primeras aplicaciones en el área de la marina, después de que el físico francés Paul Langevin inventara el Sonar, en el cual se basó el posterior desarrollo de los equipos usados en la aviación y luego en medicina terapéutica y diagnóstica [1].

En la actualidad una de las aplicaciones más comunes del US está en el campo de la medicina, la limpieza de materiales, así como en los mecanismos para generar la cavitación que permita inhibir el crecimiento y la reproducción en algas, cianobacterias y plantas consideradas malezas en cuerpos de agua [2-6]. Los efectos del US como ya se ha mencionado aplican a muchas disciplinas, y ello se debe al uso regulable en frecuencia e intensidad. En este orden de ideas, se encuentran dos tipos de generadores, los de alta frecuencia y los de alta potencia US. Para aplicaciones industriales, soldaduras de plásticos, medidor de espesores de piezas y filtros de limpieza, entre otros, se usan los generadores US en alta potencia. Para aplicaciones médicas, sonoquímica y de fines terapéutico se utiliza el US en alta frecuencia.

Cavitación

Los efectos de la cavitación, no entendidos en un principio, se presentaron desde el desarrollo de los sistemas hidráulicos donde había cambios bruscos en la velocidad de algún líquido, para el caso de partes móviles fue notorio en las hélices de turbinas, rodets de bombas, hélices de barcos, válvulas reguladoras, entre otros; evidenciándose con ruidos, golpeteos, vibraciones y erosiones del material donde se presentaba la cavitación; esto genero una alerta principalmente en la industria porque

generaba pérdida de tiempo, ruido y deterioro en los materiales. Esto dio lugar a la necesidad de estudiar el fenómeno [7].

La cavitación está definida como la formación de burbujas en un medio líquido inicialmente homogéneo. Los primeros análisis de este fenómeno fueron presentados por Reynolds en 1884. A través del tiempo, se ha evidenciado que los efectos de la cavitación no han sido solo perjudiciales, sino que también han sido útiles para su aplicación en campos como la industria, la medicina, química, biología, sonoquímica entre otros [7].

La investigación contemporánea de este fenómeno se divide principalmente en tres etapas. La primera se refiere al desarrollo del modelo que describe los efectos de cavitación, lo que refleja la dinámica de burbujas que implosionan en el medio acuoso; estos primeros modelos clásicos fueron iniciados por Rayleigh en 1917, en ellos hay una serie de simplificaciones donde se omiten muchos factores que afectan significativamente los procesos físico-químicos que ocurren durante la cavitación, que más adelante fueron propuestos por Brennen y Margulis [8,9]. La segunda etapa se centró en el impacto negativo de la cavitación hidrodinámica en líquidos, demostrado por diversos estudios [10,11]. La tercera etapa de investigación se ajusta a la búsqueda de usos positivos de los efectos de cavitación, en un área tan amplia como sea posible, los ejemplos incluyen la aceleración de las reacciones sonoquímicas [12] para la eliminación de contaminantes en el agua, así como en procesos químicos especialmente en metodologías enfocadas en la degradación de sustancias perjudiciales en los seres humanos [13-16].

Por otro lado, la literatura reporta estudios relacionados con la cavitación acústica y su uso en la aceleración de reacciones convencionales, descomposición y reacciones en solventes orgánicos, degradación de polímeros y estructuras moleculares en plantas [2, 3, 17, 18].

B. EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA EN PLANTAS

Los efectos del US en los organismos vivos se encontraron entre las primeras observaciones de Langevin y se extendieron en el trabajo de Wood y Loomis en 1927, en particular en aspectos químicos. Un gran número de estudios se realizaron en la década de 1930 sobre los efectos biológicos del ultrasonido, en tejido muscular [19].

Harvey y Loomis en 1928 observaron desorden y rupturas de estructuras celulares en la planta acuática *Egeria Densa* sometida a una irradiación sónica de 4Khz. Ellos consideraron su efecto a mecanismos no térmicos ya que la temperatura de la hoja nunca excedió 30 °C durante la sonificación. En esa época no se conocía el fenómeno de la cavitación. Por otro lado, en 1952 Goldman y Lepeschkin evidenciaron la rotación de cloroplastos y piezas de protoplasma, así como el inflado del núcleo a bajas amplitudes y la desintegración a altas amplitudes con irradiaciones ultrasónicas

de 85Khz en Egeria Densa. Dos décadas después, en 1979 Miller reportó el rango de frecuencias (450 khz – 10 Mhz) para la muerte celular en Egeria Densa, para irradiaciones ultrasónicas continuas por 100 segundos e intensidades de 75 mW/cm² a 180 mW/cm² [20].

C. LA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA EN LA INVESTIGACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS.

En 1880, Alexander Graham Bell, descubrió que cuando un haz luminoso, periódicamente interrumpido incide sobre la superficie de un sólido colocado en el interior de un recipiente herméticamente cerrado, se detecta una respuesta audible, mediante un tubo de audición acoplado al recipiente. Este fenómeno se conoce como Efecto Fotoacústico en materiales sólidos. Sin embargo, la primera descripción teórica de Efecto Fotoacústico en sólidos sobre la base de las ondas térmicas fue en 1976 por Rosencwaig y Gerso [20].

La Espectroscopia Fotoacústica (EFA), se basa en el fenómeno fotoacústico. Durante un tiempo se denominó espectroscopia optoacústica [21], y es usada para estudiar resultados de fenómenos presentes en una muestra después de que se incide luz. Se han publicado una diversidad de estudios de aplicaciones de diversa naturaleza [22-25], y aún en aplicaciones bilógicas [20, 26, 27]. Una ventaja importante que hace de la EFA una técnica adecuada para el estudio de material biológico es que se puede aplicar in vivo, la EFA en tejidos vegetales se ha usado desde 1976 para la detección y caracterización de pigmentos fotosintéticos [28], en tejidos o capas celulares, incluyendo el análisis a profundidad [29, 30]. La EFA en combinación con otros tipos de espectroscopia (fluorescencia y absorción) y estudios de intercambio de gases se propone como una herramienta valiosa para investigación de fotosíntesis [31].

Adams, Kirkbright y King, en 1976 estudiaron parámetros que interfieren en la intensidad de la señal fotoacústica, tanto como instrumentales como los intrínsecos en la muestra: El flujo de luz incidente en el material a estudiar (este debe de ser el adecuado para que no sea fotodestructor), el ajuste de la frecuencia de modulación (normalmente entre 5Hz y 500Hz), en el material debe considerarse la conductividad térmica, el rendimiento cuántico y la capacidad de absorción que tiene la muestra [32].

Buschaman expresó en 1984, que la TFA ofrecería nuevas posibilidades que la convertirían en una valiosa herramienta para la evaluación de la actividad fotosintética in vivo, permitiendo la medición de la emisión de calor que contribuye a los procesos no radiactivos en los pigmentos de los vegetales, para el cálculo de la cinética de inducción de la señal fotoacústica como parámetro indicador de la evolución del oxígeno en la planta, en el estudio de los cambios de la señal fotoacústica debido a la inhibición o la saturación de la fotosíntesis dado por el rendimiento cuántico [30].

En las últimas décadas, se han realizado varias investigaciones [2, 28, 31], con el uso de la TFA para analizar el proceso de relajación térmica en pigmentos fotosintéticos en plantas, donde se evidencia la contribución de fenómeno fototérmico y fotobárico en la componente de la señal, estudios que concluyen con la respuesta en fase y amplitud del espectro (400 -700 nm) donde se ubican los pigmentos importantes para el proceso de fotosíntesis activa. Por otro lado, Zakhidov y Kokhkharov han analizado con esta técnica las características de fotoactivación y fotoreducción de los procesos de las hojas causados por los cambios de intensidad de la radiación solar [33].

Desde los trabajos realizados por Rosencwaig en 1972, la técnica fotoacústica resuelta en longitud de onda ha sido un sistema de medición para realizar estudios ópticos en la materia. Para los 80's ésta técnica se empezó a usar para el estudio de la fotosíntesis en plantas y hasta la actualidad muchas investigaciones [20, 30, 31, 34] la han utilizado para el análisis de parámetros fotosintéticos, para la medición de procesos fotobáricos en plantas tratadas con biofertilizantes [35], en la caracterización de propiedades térmicas de materiales [36] y en películas de proteína de suero en la leche y goma gelana [37]; permitiendo resultados cualitativos de los espectros. Por otro lado, la fotosíntesis también se puede medir cuantificando la cantidad de CO₂ que absorbe la planta, a través de analizadores de gases por infrarrojo (IRGA's) o detectando la cantidad de O₂ que se desprende mediante electrodos, como también la fluorescencia que se presenta en el pigmento de la clorofila; estos métodos cualitativos han sido utilizados regularmente en las dos últimas décadas [38-40].

D. SISTEMA LI-COR

Algunas investigaciones recientes [41-43] posicionan actualmente al sistema portátil LI-COR como un sistema de medición fiable por su versatilidad en la determinación de parámetros como la conductividad estomática, la fluorescencia, la asimilación neta y flujo de CO₂, entre otros. Este sistema de medición, en sus inicios, se ofreció al mercado como un pequeño equipo analizador de CO₂ en el año 1983, con referencia LI-6000. Tres años después (1986), apareció en el mercado la versión LI-6200, con el propósito de eliminar la señal de ruido del analizador en la medición de la fotosíntesis, con mejoras en el software y métodos más eficientes para el cálculo de las pendientes. Para la época, fue lo apropiado. Sin embargo, todavía era un sistema cerrado para CO₂, aun así poseía mediciones de transpiración. Para el año 1990, existió la necesidad de mostrar curvas de respuestas correspondientes a la medición de parámetros fotosintéticos, así como el control en variables como temperatura, humedad, luz y H₂O (software), y la reducción de personal para la medición (Hardware, un equipo más portable); entonces para esta versión hubo mejora en peso, potencia y tamaño compacto [44].

Para 1995, el desafío fue complementar el sistema con IRGA's, las cuales permitirían un control mejorado para los analizadores de gases de CO₂ y H₂O, incluyendo

respiración en suelo; y se crea la versión LI-6400, siendo este un equipo más completo y apto para el trabajo de investigación. En 2002 se cambió el tablero digital (procesador de 200 MHz, el sistema operativo Linux, 128 MBytes de memoria, sistema operativo de 64 bits), y aparece la versión de software 5.0, abriendo la puerta a muchas nuevas y emocionantes posibilidades. Para el 2007 apareció la versión mejorada LI-6400XT, que consistió en un cambio en la consola, con un software de versión 6.0, un procesador de 400 MHz y una ranura de expansión para memoria flash con conectividad a Ethernet, haciendo posible el control remoto de múltiples unidades, y añadiendo la capacidad de generar archivos de datos. De esta manera se completó la versión LI-6400XT, con aproximadamente 30 años de historia [32].

ESTADO DEL ARTE

A. Efecto del US en la actividad fotosintética en plantas verdes.

El US como metodología aplicada al efecto en la actividad fotosintética en plantas ha sido un tema con escasos reportes en la literatura, de los cuales los más recientes son los realizados en China y México [2, 45] para diferentes plantas acuáticas.

En China, Hongwei y Wua utilizaron el US para prevenir la floración y crecimiento de *Spirulina Platensis* (antes conocidas como algas verdeazuladas), dado que el crecimiento de estas algas verde-azuladas puede comunicar un olor desagradable al agua, producir una capa de verdín en la superficie e incluso representar un riesgo para la salud; para ello usaron US para ocasionar daño a las estructuras celulares producto de la cavitación, con frecuencia fija de 200 Khz y variaciones de potencias de irradiación en el orden de los 120 Watts [45]. En México, Calderón y Cardona usaron US para inhibir la actividad fotosintética en el Lirio Acuático (*Eichhornia crassipes*) considerado como una maleza acuática por sus daños ambientales, industriales y al igual que las algas verdes azuladas generan un riesgo a la salud; en México se usó la frecuencia del umbral inferior US a 17 Khz potencias de irradiación a 60 W [2], un poco más baja que las usadas por los investigadores de China. La diferencia en tiempo de irradiación US, depende de la potencia usada, por ejemplo la potencia usada para el control de las algas en China ocasiona que en cuestión de minutos se genere la cavitación; por otro lado, la potencia usada para erradicar el Lirio Acuático fue más baja, lo que llevó a que la cavitación se generará en horas de irradiación.

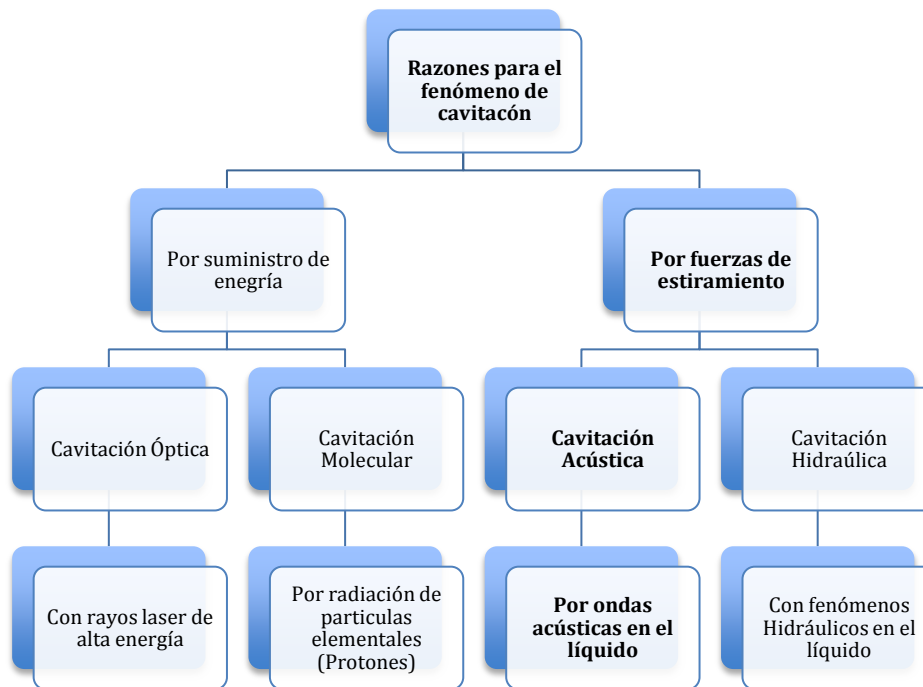
Cabe resaltar que son pocos los trabajos realizados en esta área, donde se hace uso del US para afectar los pigmentos fotosintéticos de las plantas.

III FUNDAMENTOS TEORICOS

A. CAVITACIÓN Y ULTRASONIDO

Cavitación

El fenómeno de cavitación está definido como la aparición de cavidades de vapor dentro de un medio líquido inicialmente homogéneo, se puede presentar por varias situaciones, que son dependientes del flujo, las propiedades físicas y químicas del líquido. Janusz Ozonok en su libro *Application of Hydrodynamic Cavitation in Environmental Engineering* [7], clasifica las diferentes razones por las cuales ocurre la cavitación. El esquema 1, muestra las principales causas de cavitación en líquidos.



Esquema 1. Tipos y causas de la cavitación descritas por Janusz Ozonok [7].

Desde un punto de vista físico, hay tres formas de generar la burbuja de cavitación, tomando como ejemplo de líquido el agua, se clasifican como:

1. Burbujas de cavitación de vapor: Ocurre cuando hay una serie de cambios transitorios en la fase: de líquido a vapor y de vapor a líquido. En este caso, la cavitación está formada por vapor húmedo saturado, el cual está en contacto con el líquido a partir del cual se originó. El crecimiento de la burbuja depende del aumento de la presión parcial del vapor interno.
2. Burbujas de Cavitación de gas-vapor: El gas que contiene la burbuja es el resultado de la evaporación del líquido y la difusión de gases que ocurre en el

umbral de la transición de fase. Aquí el agua se encuentra sometida a cambios de transición de fases: líquido – vapor húmedo saturado – líquido.

3. Burbujas de Cavitación gaseosas: En el líquido existen condiciones favorables para que se libere la concentración de gas y exista difusión en las regiones de cavitación. Esta burbuja se caracteriza principalmente por el llenado debido a los gases liberados por el líquido.

La formación de la burbuja puede ocurrir de dos formas: ya sea por el aumento de la temperatura por encima de la condición de equilibrio para la transición de fase en condiciones isobáricas (Punto de ebullición) o a través de la disminución de la presión por debajo de la misma condición de punto de equilibrio, en condiciones isotérmicas. En la figura 1, se muestra el diagrama de fases del agua. La curva que se inicia en el punto triple T_r y finaliza en el punto C, representa la separación del estado líquido y vapor. Cruzando esta curva se manifiestan transformaciones reversibles bajo condiciones estáticas (o equilibrio) tales como la evaporación o condensación del fluido en el punto de presión P_v , o presión de vapor que está en dependencia con la temperatura (T). Sin embargo, es importante considerar que la curva $P_v(T)$ no es un límite absoluto entre el estado líquido y vapor. Esta curva puede desviarse con un cambio drástico de fase.

Así, la cavitación es muy similar al fenómeno de ebullición, excepto que el mecanismo de accionamiento no es un cambio de temperatura, sino el cambio de presión. Por otro lado, desde un punto de vista teórico, se pueden distinguir varios pasos en los primeros instantes de la cavitación: Nucleación o formación de la burbuja, llenado de este vacío con vapor, saturación del vapor en la burbuja.

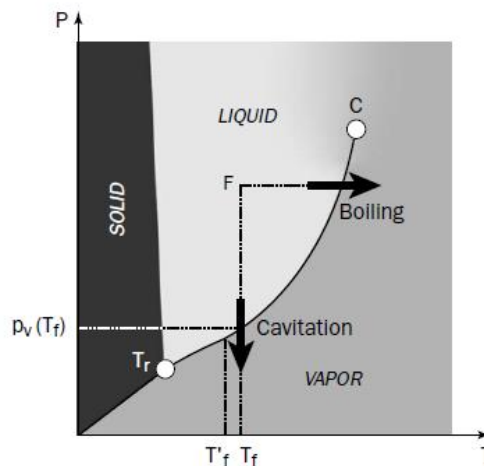


Figura 1. Diagrama de fases del agua [7].

En esta investigación se lleva a cabo la cavitación acústica. En este tipo de cavitación las fuerzas que causan la formación y el colapso de las cavidades están determinadas por series continuas de alta amplitud o pulsaciones de presión de alta frecuencia (17Khz). En el líquido a través del cual se propaga la señal US existe compresión y rarefacción en la onda, que depende de la frecuencia a la cual se irradie; llega un punto en el líquido donde los niveles de presión y depresión son tan abruptos que se rompe

el enlace de Van der Waals, dando inicio una burbuja de cavitación con radio r , la burbuja puede estar constituida por vapor del mismo liquido o de algún gas que contenga en este caso el tejido de la hoja del Lirio Acuático. La burbuja de cavitación estará sujeta a los cambios de presión asociados al US, y por ello se contraerá y expandirá, hasta que la burbuja alcance un valor máximo e implota librando gran cantidad de energía que ocasiona el daño en la superficie donde cavita la burbuja. En la figura 2, se representa el crecimiento de la burbuja.

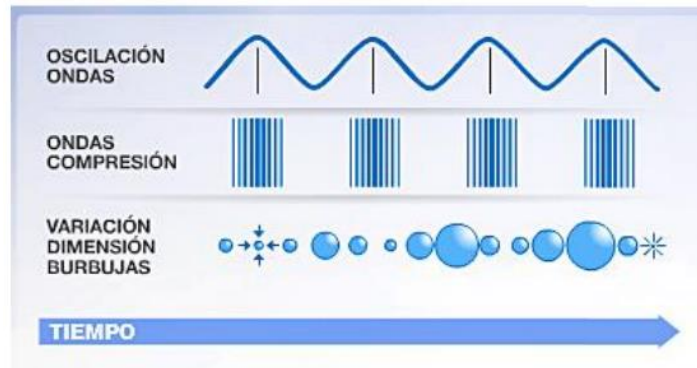


Figura 2. Efecto del US en un líquido: burbuja de cavitación. Disponible en http://www.dam-aguas.es/idi_ultrasonidos2.php

El número de cavitación (Ca) es un número adimensional utilizado en mecánica de fluidos. Expresa la relación entre la diferencia de la presión local absoluta del fluido con respecto a su presión de vapor y la energía cinética por volumen del flujo. Se usa para caracterizar el potencial cavitatorio de un fluido. Los resultados negativos de cavitación, por debajo de un determinado umbral (llamado umbral de Blake) aseguran la existencia de cavitación en el fluido, dado por [7]:

$$c_a = \frac{P - P_v}{0.5\rho v^2} \quad (1)$$

donde ρ es la densidad del fluido, p la presión local del fluido, p_v es la presión de vapor del fluido, V es la velocidad característica del flujo. Mayor información del modelo termodinámico que describe la formación, la presión y el radio de la burbuja en un medio homogéneo, puede encontrarse en el capítulo (1) y (2) del libro de Janusz Ozonk [7]. La cavitación de interés en este trabajo es la generada por US, para ello es importante tener en cuenta los siguientes términos con respecto a la densidad de potencia acústica suministrada a la planta, viene dada por [7]:

$$I = \frac{N}{A} \quad (2)$$

donde N es la potencia transferida por el transductor acústico (W) y A es el área superficial donde la onda acústica se propaga (m^2). La intensidad de la onda acústica I

es una magnitud característica del US y depende de la velocidad de la onda de propagación y la densidad del medio, viene dada por la siguiente ecuación:

$$I = \frac{\rho w}{2} F^2 \omega^2 \quad (3)$$

donde ρ es la densidad del medio (Kgm^{-3}), w es la velocidad de propagación de la onda US en el medio (ms^{-1}), F la amplitud de la onda de US (m) y ω viene dado por $2\pi f$; siendo f la frecuencia US. En la figura 3, se muestra el comportamiento de la curva de cavitación en función de la frecuencia y su dependencia con la Intensidad de irradiación US.

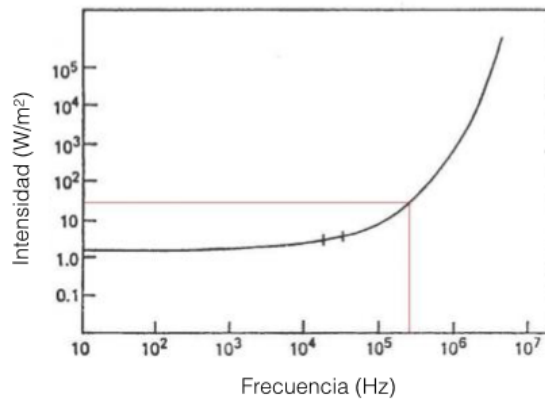


Figura 3. Curva de cavitación en función de los parámetros US en función de la frecuencia e intensidad de irradiación.

Ultrasonido

Las ondas acústicas que producen la sensación de sonido son parte de una variedad de perturbaciones de presión que se pueden propagar a través de un fluido compresible. Las ondas US están por encima de la percepción del oído humano, en un rango mayor o igual a los 17Khz. Existen dos tipos de ondas según la dirección de propagación: longitudinales y transversales. Las ondas acústicas son ondas longitudinales, si por ejemplo el medio donde se propaga la señal acústica es el aire, éste se comprime y expande en la misma dirección en que avanza el sonido.

Características de la onda sonora. Las ondas sonoras, como se mencionó antes, se basan en el movimiento oscilatorio longitudinal de las partículas en el medio, su velocidad de propagación (v) viene dada según [46] como la razón entre la densidad del medio ρ y el módulo volumétrico de compresión β

$$v = \sqrt{\frac{\beta}{\rho}} \quad (4)$$

Cuando una onda sonora se transmite por un medio homogéneo lo hace en forma de onda esférica, mencionado por Kinsler en su libro *Fundamentos de acústica* [47]. Para la onda acústica en un fluido, dada la característica de su propagación, las moléculas del fluido oscilan de un lado a otro en una dirección, produciendo regiones adyacentes de compresión y rarefacción similares a las producidas por las ondas longitudinales en una barra. La ecuación que define una onda longitudinal en una barra viene dada por la siguiente ecuación

$$\frac{\partial^2 \xi}{\partial x^2} = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \xi}{\partial t^2} \quad (5)$$

donde ξ es el desplazamiento longitudinal. Por otro lado, La intensidad de la onda de sonido es la razón media a la cual la onda transporta la energía por unidad de área a través de una superficie perpendicular a la dirección de propagación. Sus unidades fundamentales son watt por metro cuadrado (W/m^2). Frederick en su libro *Sonography, principles and instruments*, tras demostrarla la expresa como:

$$I = \frac{P}{4\pi r^2} \quad (6)$$

donde P es la potencia de la onda (W), r el radio aproximado de impacto de la onda (m). Las intensidades audibles van desde aproximadamente 10^{-12} a $10 \text{ W}/\text{m}^2$. El uso de escalas logarítmicas comprime la gama de números requeridos para describir este gran intervalo de intensidades, la escala logarítmica da un uso más general para describir niveles de sonido en escala de decibeles. Kinsler en [47], demuestra que la intensidad (I) y la presión efectiva de las ondas planas y esféricas están relacionadas por

$$I = \frac{P_e^2}{\rho_0 v} \quad (7)$$

donde P_e es la presión efectiva media de la onda sonora, ρ_0 la densidad del medio y v la velocidad del sonido.

En la propagación de las ondas se presentan fenómenos tales como reflexión, refracción, interferencia, difracción, dispersión y el llamado efecto Doppler. Para el caso de una onda acústica que viaja en un medio encuentra la frontera de un segundo medio, se generan ondas reflejadas y transmitidas. Cuando una onda cambia de medio,

su frecuencia y período permanecen constantes. El cociente entre las amplitudes transmitidas (A_t) e incidente (A_i) viene dado por la siguiente ecuación

$$\frac{A_t}{A_i} = \frac{2Z_1}{Z_1 + Z_2} \quad (8)$$

Z_1 y Z_2 son impedancias del primer y segundo medio. El coeficiente de transmisión es el cociente entre la intensidad transmitida (I_t) y la incidente (I_i), viene dado por:

$$\frac{I_t}{I_i} = \frac{Z_2 A_t^2}{Z_1 A_i^2} = \frac{4Z_1 Z_2}{(Z_1 + Z_2)^2} \quad (9)$$

Y el coeficiente de reflexión es igual a:

$$\frac{I_r}{I_i} = \frac{(Z_1 - Z_2)^2}{(Z_1 + Z_2)^2} \quad (10)$$

Si se desea profundizar en las demostraciones dirigirse a [48].

B. LA TÉCNICA FOTOACÚSTICA

Como se ha mencionado anteriormente el efecto fotoacústico (FA) fue descubierto por A. G. Bell en 1880. Sin embargo la primera interpretación teórica del efecto fotoacústico en sólidos fue dada por Rosencwaig y Gersho en 1976. El modelo de Rosencwaig y Gersho considera como principal mecanismo de la señal fotoacústica al de difusión de calor, generado en la muestra. Ellos realizaron un análisis unidimensional del flujo de calor en la celda y demostraron que solamente una capa relativamente delgada de aire en su interior (decimas de espesor); adyacente a la superficie del sólido, responde térmicamente al flujo de calor periódico proveniente del sólido. Esta capa de aire sufre un calentamiento y enfriamiento alternado y se comporta como un pistón vibratorio, el cual genera la señal fotoacústica detectada. Considerando una celda como se muestra en la figura 4.

La muestra posee un coeficiente de absorción β , supongamos que la luz antes de penetrar la muestra tiene una intensidad I_o y se propaga con una determinada longitud de onda λ , w la frecuencia de modulación; la luz sobre la muestra puede expresarse como

$$I = \frac{1}{2} I_o (1 + \cos(wt)) \quad (11)$$

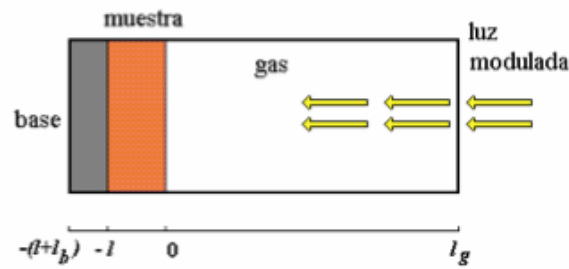


Figura 4. Sección transversal de una celda fotoacústica cerrada convencional [20].

Por un lado la ley de Lambert Beer relaciona la absorbancia que tiene una muestra cuando se incide luz sobre ella y viene dada por

$$I(x) = \frac{I}{2} e^{-\beta x} \quad (12)$$

Sustituyendo (11) en (12), para el intervalo $-l_s \leq x \leq 0$, la expresión se reescribe como

$$I = \frac{1}{2} I_0 \beta e^{\beta x} (1 + \cos(\omega t)) \quad (13)$$

Entonces, la señal fotoacústica resulta de la luz modulada periódicamente que es absorbida y convertida en calor por la muestra. En donde una parte de la onda de calor llega a la superficie de la muestra (borde muestra-gas) y causa una capa delgada que se expande y se contrae, causando una modulación periódica de presión en el gas. Considerando solo la contribución armónica dependiente del tiempo para la intensidad se tiene la siguiente expresión

$$I = \frac{1}{2} I_0 e^{i\omega t} \quad (14)$$

Y el calor superficial de la muestra viene dado por

$$\Theta = \Theta_0 e^{(i\omega t + \varphi)} \quad (15)$$

donde la variable Θ representa el calor en el medio. Si se considera la contribución armónica dependiente del tiempo de la intensidad de luz y la variación de calor en la

superficie de la muestra, con artificios matemáticos se llega a la conclusión que la variación de presión en el gas viene dada por la siguiente ecuación

$$P = \frac{\gamma p_o \mu_s}{\sqrt{2} T_o l_g} \Theta e^{-i\frac{\pi}{4}} \quad (16)$$

donde γ es la constante adiabática del gas, p_o y T_o presión y temperatura ambiente respectivamente, μ_g longitud de difusión térmica en el gas y l_g longitud entre el gas y la muestra. Ahora bien, considerando las fronteras y ecuaciones que rigen los estados: antes, durante y después de la incidencia de luz en la muestra. Antes de incidir la luz en la muestra, la ecuación de difusión de calor en el gas se expresa como

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} \Theta_g(x, t) - \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial}{\partial t} \Theta_g(x, t) = 0 \quad 0 \leq x \leq l_g \quad (17)$$

la ecuación de difusión de calor en el sólido tomando en cuenta la fuente de calor distribuida

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} \Theta_s(x, t) - \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial}{\partial t} \Theta_s(x, t) = -g(x, t) \quad -l_s \leq x \leq 0 \quad (18)$$

después de incidir luz en la muestra, la ecuación de difusión de calor

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} \Theta_b(x, t) - \frac{1}{\alpha_b} \frac{\partial}{\partial t} \Theta_b(x, t) = 0 \quad -(l_s + l_g) \leq x \leq l_s \quad (19)$$

para las ecuaciones (11-13), α es la difusividad del medio, Θ_i denota la diferencia de temperatura entre el medio ambiente y el medio i (g, s, b). Por otro lado, las condiciones de frontera de continuidad de la temperatura y el flujo de calor entre los medios g, s y b , están dadas por

$$\Theta_g(0) = \Theta_s(0) \quad (20)$$

$$\Theta_g(-l_s) = \Theta_s(-l_s) \quad (21)$$

$$K_g \frac{d}{dx} \Theta_g(0) = K_s \frac{d}{dx} \Theta_s(0) \quad (22)$$

$$K_b \frac{d}{dx} \Theta_b(-l_s) = K_s \frac{d}{dx} \Theta_s(-l_s) \quad (23)$$

La solución a estas ecuaciones se encuentran en [20] capítulo 2, las cuales dependen en gran medida los parámetros propios de la muestra. Por otro lado, se puede considerar que la absorción de radiación ocurre de dos formas distintas, dependiendo de las propiedades ópticas de la muestra, lo que da lugar a dos modelos para la fuente de calor: el modelo de Ley de Beer (modelo de fuente en el volumen) y el modelo de fuente superficial [20].

En el estudio de los materiales, es importante identificar el tipo de material que estamos analizando según su estructura y la capacidad de absorción que posee. Por ende, se clasifican en ópticamente opacas o transparentes y térmicamente delgada o gruesa. Se considera ópticamente opaca si la longitud de absorción óptica es pequeña comparada con su espesor y ópticamente transparente si su longitud de absorción óptica es mayor que su espesor. Una muestra térmicamente delgada es considerada si el espesor de la muestra es menor que la longitud de difusión térmica y térmicamente gruesa si el espesor es mucho mayor que su longitud de difusión térmica. Para profundizar en las ecuaciones que satisfacen estos casos dirigirse a [20]. Para el caso particular de la hoja del Lirio Acuático se considera una muestra térmicamente delgada.

C. SISTEMA LI-COR

El sistema Li-COR 6400 portátil, es un equipo de medición de parámetros fotosintéticos, tales como tasa de fotosíntesis, humedad, fluorescencia, rendimiento cuántico en función de fotones emitidos y absorbidos, conductancia estomática, humedad, tasa de transpiración, entre otros. Es considerado según la literatura [20, 30, 31, 34, 36-39, 42, 43] como un equipo de alta confiabilidad. La figura 5, muestra los componentes principales de los cuales está compuesto el sistema. El equipo a grandes rasgos está compuesto por una consola (donde se encuentra el software y se configura los parámetros a medir), una IRGA's (donde se realiza la comparación entre los parámetros de referencia y los medidos) y la cámara de la hoja (donde se ubica la muestra a analizar).



Figura 5. Sistema Li-COR portátil 6400 [44].

Hay varias versiones de este equipo, actualmente el Laboratorio de Física cuenta con la última versión (Li-COR 6400XT). En la figura 6, se observa la diferencia entre las versiones antiguas y el 6400. Esta última versión la diferencia de la anterior (Li-COR 6200) porque tiene los dos analizadores de CO₂ y los dos de humedad, en la cabeza de los sensores (Cámara) lo cual genera los siguientes beneficios con respecto al 6200.

- ✓ Los cambios dinámicos que ocurren en la hoja son medidos en tiempo real, porque no hay retrasos en tiempo de la consola a la cámara.
- ✓ Cuando hay que hacer análisis de tasas fotosintéticas con tratamientos muy altos, el hecho que el CO₂ y H₂O se controlen desde las IRGA's evita que se obtengan conclusiones sesgadas.
- ✓ Se obtiene más precisión en la medida de la fotosíntesis, hay eliminación de ruido.
- ✓ La ausencia de tubos entre la cámara y los analizadores elimina tiempos de equilibrio.

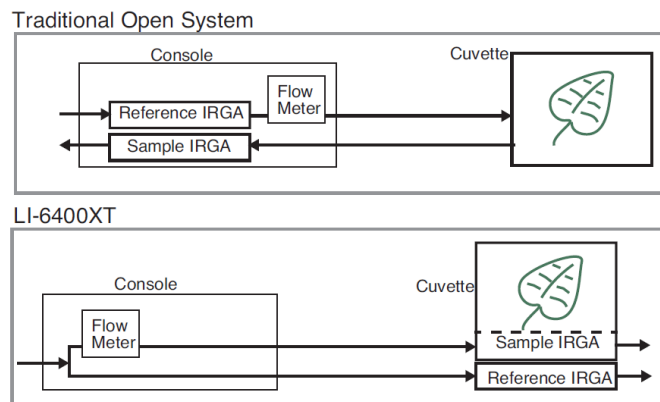


Figura 6. Esquema de sistema de medición tradicional y el sistema Li-COR [44].

En la operación del equipo; los rayos IR se reflejan 90° por espejos de oro, dos veces. Estos rayos pasan por la cámara de la hoja. Después que se refleja a través de la cámara donde se produce la absorción de IR, la radiación infrarroja pasa a través de

una rueda de filtros y el detector analizador de muestras. Seguido de ello, pasa por 4 filtros con longitudes de ondas específicas: longitudes de ondas de absorción y de referencias ópticas para CO₂ y H₂O; esos filtros eliminan efectos de otros gases de absorción de IR. Por otro lado, el balance entre la captura de la luz y la producción metabólica está relacionado fuertemente con las señales y las respuestas a los cambios de condiciones ambientales.

Es de considerar que bajo diversas condiciones de estrés ambiental, la asimilación de CO₂, la transpiración y la capacidad de la planta para absorber luz se ve disminuida. Una gran fracción de este exceso de energía se disipa de manera segura a través de una variedad de procesos no fotosintéticos y se miden de forma rutinaria como la extinción de la fluorescencia de clorofila "a". Cabe resaltar que la medición de este parámetro proporciona una imagen completa de la fotosíntesis de la hoja, mediante la medición de la energía absorbida para la fotosíntesis y el calor.

La medición de la tasa fotosintética está en función del CO₂ medido. Sin embargo internamente el equipo propone las siguientes ecuaciones para el cálculo de la fotosíntesis. La figura 7, representa la tasa de fotosíntesis y la transpiración de una hoja.

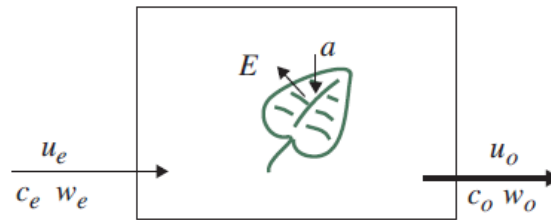


Figura 7. Representación tasa de transpiración y tasa de fotosíntesis en una hoja [44].

Tasa de fotosíntesis

El balance de masa de CO₂ en el sistema de la figura viene dado por

$$sa = u_e c_e - u_o c_o \quad (24)$$

donde a es la tasa de asimilación ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), c_e y c_o representa la entrada y salida de las fracciones molares de dióxido de carbono ($\text{mol CO}_2 \text{ air}^{-1}$). Usando la deducción realizada en [32] la transpiración E que se presenta en la hoja viene dada por la siguiente expresión

$$sa = u_e c_e - (u_e + sE)c_o \quad (25)$$

despejando a se tiene.

$$a = \frac{u_e(c_e - c_o)}{s} - Ec_o \quad (26)$$

usando las relaciones deducidas en [35] para el fenómeno de transpiración y fotosíntesis se calcula

$$c_e = \frac{c_r}{10^6} \quad (27)$$

$$c_o = \frac{c_s}{10^6} \quad (28)$$

$$a = \frac{A}{10^6} \quad (29)$$

donde c_r y c_s es la concentración de CO_2 en la muestra y la referencia ($\mu\text{mol CO}_2$ (mol air^{-1})), y A es la asimilación neta de CO_2 en la hoja ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Expresado de otra manera, como el producto del flujo por la diferencia de CO_2 entre el área de la hoja.

$$A = \frac{F(c_r - c_s)}{100S} - c_s E \quad (30)$$

donde E es la transpiración y viene dada por:

$$E = \frac{F(W_s - W_r)}{100 S (1000 - W_r)} \quad (31)$$

donde F corresponde al flujo molar del aire entrante en la cámara ($\mu\text{mol s}^{-1}$), S área foliar (cm^2), W_s fracción molar de vapor de agua en la muestra ($\text{mmol H}_2\text{O air}^{-1}$), W_r fracción molar de vapor de agua de referencia ($\text{mmol H}_2\text{O air}^{-1}$). Por otro lado, la tasa de fluorescencia PSI, viene dada por la ecuación

$$PSI = \frac{F'_m - F'_s}{F'_m} = \frac{\Delta F}{F'_m} \quad (32)$$

donde F'_m es la fluorescencia máxima durante un destello de luz saturante (Luz roja a 660 nm), F'_s es el estado de equilibrio de fluorescencia. En el proceso hay un tiempo de oscuridad y tiempo de saturación blanca y roja. En la figura 8, se describe en una

gráfica las etapas que existen para la medición del fenómeno de fluorescencia en la planta.

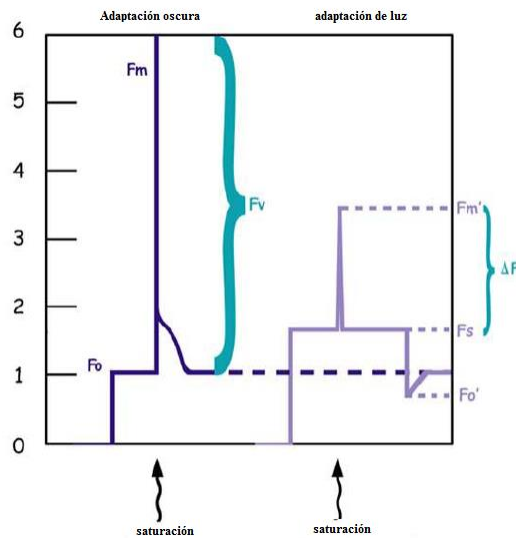


Figura 8. Gráfica descriptiva del proceso de medición del Li-COR para la medición de la fluorescencia [44].

D. LIRIO ACUÁTICO

Eichhornia Crassipes o Lirio acuático, es una planta libre flotadora, perteneciente a la familia de las Pontederiaceas. Originaria de América del Sur (Amazonas), la que por la belleza de su flor se ha propagado a casi todas las áreas tropicales y sub-tropicales del mundo. Uno de los factores que pueden limitar su propagación es la salinidad, ya que no tolera el agua salobre, por lo que serán los cuerpos de agua continentales donde se encuentra dicha especie. Su rápida reproducción, así como la ausencia de enemigos naturales en los nuevos lugares de su introducción, además de su excelente capacidad de adaptación a casi cualquier cuerpo de agua, han provocado la rápida diseminación de la planta, convirtiéndose así en una maleza [49].

La fotosíntesis es el único mecanismo mediante el cual los seres vivos disponen de una fuente externa de energía. La fotosíntesis implica reacciones de oxidación-reducción. El agua es la fuente de los electrones y de los protones que reducen al CO₂ para formar compuestos orgánicos. Ahora bien, la característica esencial de la fotosíntesis es la absorción de energía luminosa mediante moléculas de pigmento especializadas [50]. En la figura 9, se muestra el espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos, es una reconstrucción realizada en Origin Pro 8.1, de pigmentos según lo reportado en [51].

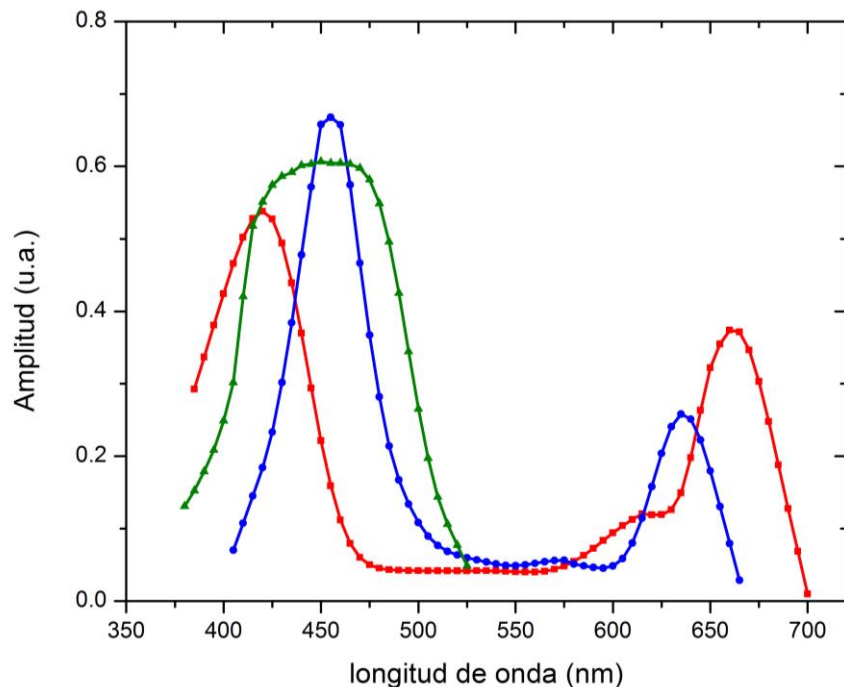


Figura 9. Espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos en una planta verde: ** Clorofila "b", ** Clorofila "a", ** Caroteno.

Según la fijación del carbono las plantas superiores se clasifican en C_3 , C_4 y plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Las especies C_3 fijan el CO_2 a través del ciclo de Calvin. La fotosíntesis C_4 requiere de la coordinación de las funciones de las células mesofílicas (CM) y de las células de la vaina vascular (CVV), las cuales presentan un complemento enzimático diferencial. El CAM es una adaptación a ambientes áridos: Los estomas se cierran de día y se abren de noche; así, la fijación del carbono ocurre en un solo tipo celular, separándose temporalmente la fijación inicial del CO_2 [52]. En este orden de ideas, el Lirio Acuático pertenece a la clasificación C_4 [53].

Por otro lado, los pigmentos y las proteínas responsables de las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis de las plantas en general se encuentran dentro de la membrana de la tilacoide, la mayoría de estas moléculas están organizadas en las unidades funcionales de la fotosíntesis [50]:

- ✓ Fotosistema I: (PSI I), actúa como pigmento antena, proporciona energía y transfiere los electrones a los centros de reacción.
- ✓ Fotosistema II: (PSI II), su función es oxidar las moléculas de agua y ceder los electrones energizados a los transportadores electrónicos que finalmente reducen al fotosistema I.
- ✓ Complejo citocromo b_6f , su función principal es la transferencia de electrones del PSI II al PSI I.
- ✓ Sintasa de ATP, contiene un componente complejo proteínico transmembrana (CF_0) que contiene un conducto que transporta protones. Un gradiente de

protones transmembrana que se produce durante el transporte de electrones impulsados por la luz da lugar a la fosforilación del ADP.

El intercambio de gases se realiza a través de los estomas. En la epidermis de las hojas se encuentran estomas, orificios limitados por células oclusivas que pueden aumentar o disminuir su tamaño y definir así la magnitud del intercambio de gases: oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua [20].

IV GENERADOR ULTRASONICO SINTONISABLE

A. GENERADOR DE FRECUENCIA ULTRASÓNICA INFERIOR A 25KHZ

El esquema del generador de frecuencia US menor a 25 KHz con el cual se irradiaron las plantas vía aire se muestra en la figura 10, en ella se observa a modo de caja negra los equipos usados para la configuración del sistema generador de ultrasonido.

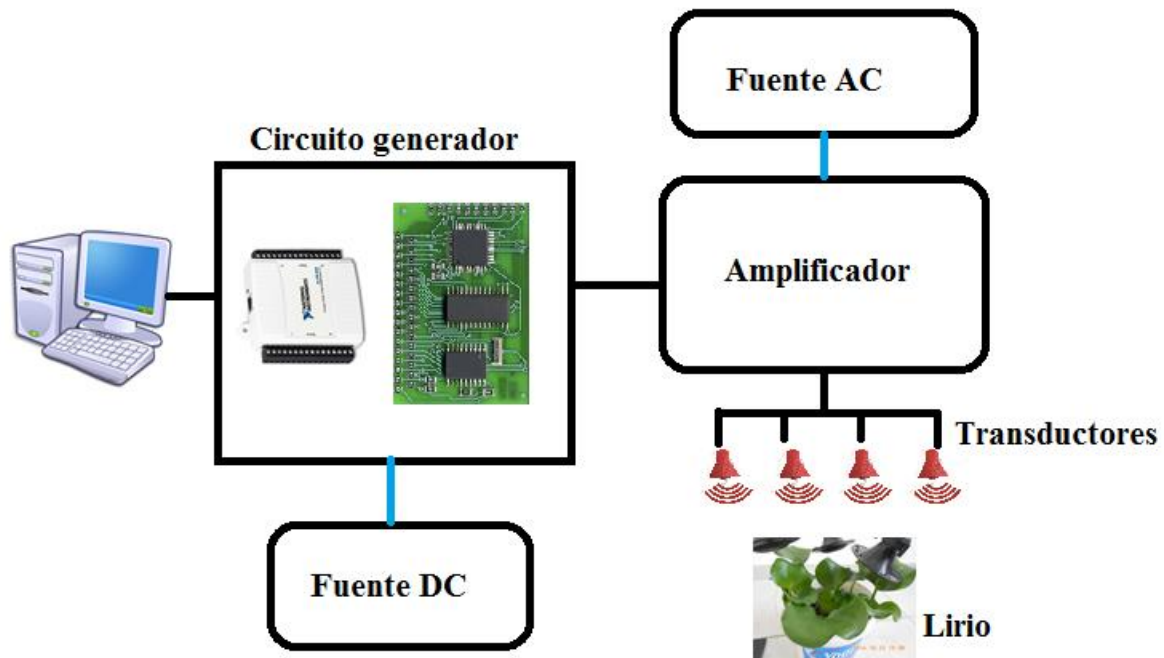


Figura 10. Esquemático de la configuración del generador US para frecuencias inferiores a 25KHz.

Descripción de componentes

Software

Nos basamos en el software elaborado por A. Cardona en [20], desarrollado en LabVIEW; en el diagrama de bloques se encuentra la programación para el ajuste de la frecuencia, y una interfaz amigable con el usuario; las funciones principales que el usuario puede manipular son:

- ✓ Selección de frecuencias mayor (botón más) y menor (botón menos).
- ✓ Reset de frecuencia (referencia a 520Hz).
- ✓ Ajuste de frecuencia (hasta 25KHz).

Hardware

DAQ

Se usó un sistema DAQ, el cual está formado por tres tipos básicos de hardware, un bloque Terminal, un cable y un instrumento DAQ. El bloque Terminal consiste en unos terminales de conexión para las señales y otro conector para poder conectarlo al dispositivo DAQ. Los dispositivos DAQ tienen cuatro elementos estándares: entradas analógicas, salidas analógicas, E/S digitales y contadores. Los dispositivos DAQ más comunes de National Instruments son de las series E y M. La serie E consta de 16 entradas analógicas, 2 salidas analógicas, 8 líneas digitales de E/S y 2 contadores.

La serie M se diferencia de la serie E por tener 24 líneas digitales de E/S y dos contadores/temporizadores. Conector E/S, es el medio por el cual las señales entran y salen del dispositivo DAQ. El conector tiene 100, 68, 50 pines dependiendo del dispositivo. Un extremo del cable se conecta al conector E/S y el otro extremo al bloque Terminal. Circuito de interfaz E/S del PC, transfieren la información entre el DAQ y el PC se pueden diferenciar dependiendo del protocolo de bus que se utilice. Internamente posee circuitos analógicos, multiplexores, amplificadores de instrumentación, convertidores D/A, contadores entre otros que permiten el funcionamiento óptimo de la DAQ. Dado la necesidad y disponibilidad del laboratorio de contar con una DAQ, se ajustó ella para nuestro propósito de control.

Circuito

El circuito que recibe la señal de la DAQ está compuesto por un conjunto de resistencias, capacitores e integrados que dan un acople para el amplificador de audio que más adelante explicaremos. En la tabla 1, se muestran los valores nominales del integrado usado en el circuito para la conversión de voltaje a frecuencia. En la tabla 2, las especificaciones del integrado usado como potenciómetro digital. Por otro lado, en la figura 11, se evidencia el acople de la DAQ con el circuito.

Parámetro	Valores
V_{cc}	$\pm 15V$
V_{amp} ($0mA < I < 0.25mA$)	0V a -10V
Rango frecuencia	0 – 500Khz
Pines	14

Tabla 1, Valores nominales del convertidor voltaje-frecuencia de referencia ADVF32K

Parámetro	Valores
V_{cc}	5V
$P_{nominal}$	16mW
$I_{activación}$	3mA
R_{min}	40 ohm
R_{max}	1000 ohm
V	4V – 10V
Pines	8

Tabla 2, Valores nominales de potenciómetro digital referencia X9C102P



Figura 11, Foto DAQ y circuito generador US.

Amplificador

El amplificador de audio usado fue Dub Megaudio 2400W, es un amplificador 4 canales, marca Dub, modelo Dub6004, tiene una potencia de salida continua nominal 60 watts x 4 a 4 ohms, de 90 watts x 4 a 2 ohms , de 180 watts x 2 bridget a 4 ohms, da una respuesta de frecuencia 2 dB 20Hz-20KHz, tiene una sensibilidad de entrada de señal 0.15 - 8 V, trabaja con un fusible de 25 Amperios y sus dimensiones son 350mm x 238mm x 50mm. En la figura 12, se muestra el amplificador. La corriente y el voltaje de salida del amplificador dependen de la Ganancia de ajuste que se le coloque, dado que se busca un barrido.



Figura 12. Foto amplificador Dub Megaudio 2400W.

Fuentes

Se usan dos fuentes, una de corriente continua para alimentar el circuito generador US y otra de corriente alterna para alimentar el amplificador. La fuente DC proporciona al circuito voltajes de 15v, -15v y 5v, y corriente en el orden de mili Amperios. Para el caso de la fuente AC de referencia HP 6206B, le proporciona al amplificador un voltaje de 12V y corriente en el orden de los Amperios. En la figura 13, se ve la configuración de las fuentes que alimentan el sistema.



Figura 13. Foto conexión de fuentes al circuito US y al amplificador.

Transductores

Se usaron Tweeters de piezoeléctrico e imán. Para potencias bajas (1W y 12W), donde el piezoeléctrico nos proporcionó salidas para potencias bajas, para potencias mayores se recurre a los Tweeter con estructura de imán. En la tabla 3, se muestran los valores nominales de los Tweeter con referencia 066-654, marca Radox, con estructura interna de piezoeléctrico. Por otro lado, la tabla 4 muestra los valores nominales de los Tweeter con base de imán, marca Amitzu. En este orden de ideas la figura 14, muestra la configuración completa del sistema de generación US.

Parámetros	Valores
Rango Fr	4.5 – 20Khz
$P_{\min-max}$	1W-12W
Sensibilidad	102 dB
Impedancia	4 – 8 ohm
Tamaño	85cm * 85cm

Tabla 3, Valores nominales de Tweeter referencia 006-654 marca Radox (piezoeléctrico).

Parámetros	Valores
Rango Fr	1.5 – 25Khz
P_{\max}	Hasta 1000W
Sensibilidad	104 dB
Impedancia	4 – 8 ohm
Peso imán	300z

Tabla 4, Valores nominales de Tweeter referencia TW-4700D marca Amitzu (imán o bala titanio)



Figura 14. Foto configuración generador US.

V. MONITOREO DEL EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA EN EL LIRIO ACUÁTICO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.

A. IMPLEMENTACIÓN DE LA CELDA FOTOACÚSTICA MTEC 300 Y CONFIGURACIÓN DE LA EFA.

Celda Fotoacústica

La celda fotoacústica usada para EFA es de referencia PAC 300 de proveedor MTEC Photoacoustics. Esta celda se caracteriza por su alta fidelidad en la señal, dispone principalmente de las siguientes características:

- ✓ Cámara de muestra purgada.
- ✓ Amplía gama espectral (del UV lejano al IR).
- ✓ Respuestas cualitativas con cortos tiempos de respuesta.
- ✓ Se pueden analizar muestras en sólido, semisólido, polvos y líquidos.
- ✓ Permite variación de profundidad para el análisis de la muestra.

En la figura 15, se aprecia la celda fotoacústica MTEC PAC 300. La celda cuenta con un amplificador de señal con ganancia hasta 10.000 (switch 12), porta muestras para líquidos, polvos y sólidos. Para el análisis del espectro de absorción en el Lirio Acuático se usó una porta muestras en sólidos y la posición del switch (2) que proporciona una ganancia de 5 en la señal.



Figura 15. Foto celda de línea Fotoacústica MTEC 300.

Configuración de la EFA

Para la configuración del sistema de medición se usan varios equipos, para el montaje se toma como base en los trabajos realizados por A. Cardona [48,49] se realiza la configuración como se muestra en la figura 16, esquemático de la configuración EFA.

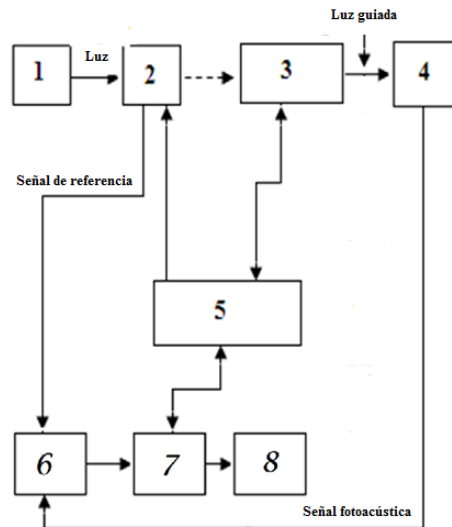


Figura 16. Esquemático de la configuración EFA. (1) Lámpara de halógeno, (2) Monocromador, (3) Chopper, (4) Celda Fotoacústica, (5) Computador, (6) Amplificador lock-in, (7) Software, (8) Gráficos [20].

La lámpara de halógeno usada se ajustó a una potencia de 800 watts. La potencia ajustada depende de las muestras a caracterizar, para el caso del Lirio acuático basándonos en lo que propuso A. Cardona en [2], 800W es la potencia adecuada. Por otro lado, el monocromador es un dispositivo para obtener radiación monocromática a partir de una fuente poli cromática, su función principal es proporcionar un haz de energía radiante con una longitud de onda nominal y un ancho de banda. Cabe resaltar que el monocromador con el que cuenta el laboratorio es de rendija, cuenta con un lente colimador y una red de difracción. El chopper (modulador mecánico), su función es modular la luz usando discos, por un lado del disco incide luz continua y por el otro lado se obtiene luz modulada que va a depender del tamaño de las aspas del disco y la frecuencia a la que se configure el giro del disco; en este caso la frecuencia se controla por medio de una de las salidas de voltaje del lock-in. El lock-in tiene como función medir señales pequeñas que están espuesta a ruido, usando una señal de referencia; para esta configuración se utilizó un lock-in de referencia SR850, proveedor Stanford Research System.

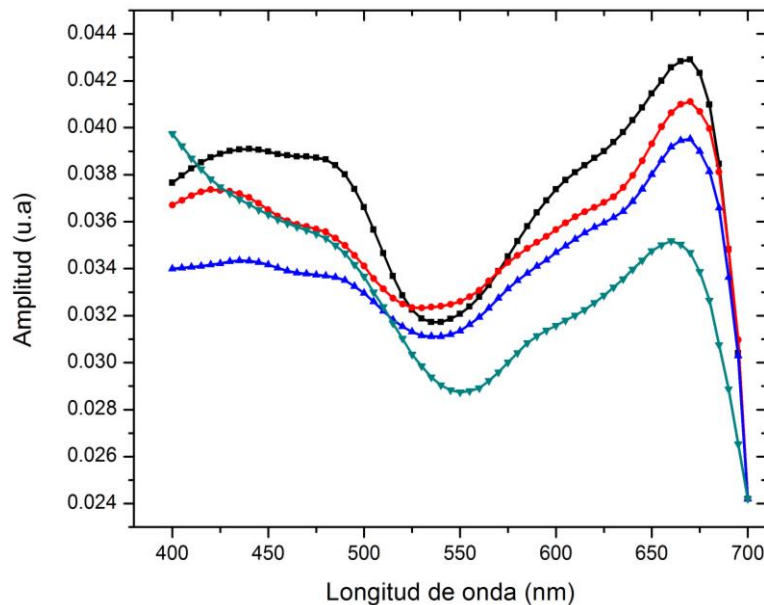
En este orden de ideas, para llevar a cabo la automatización se reconfiguró el software usado por A Cardona para el control del lock-in, del monocromador, el chopper; empleando el lenguaje de programación LabVIEW.

B. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La lámpara de halógeno se usó con una bombilla de 800 Watts, cuyo haz se hace pasar al monocromador el cual se ajustó a una apertura de 3mm. El haz que emerge del monocromador pasa por el chopper el cual cuenta con una frecuencia de oscilación de 17hz, la luz fue guiada por una fibra óptica de agua, después que la luz modulada llega a la celda fotoacústica, se genera una señal acústica que viene siendo la superposición en respuesta fototérmica y fotobárica. Luego, la señal llega al Lock-in, después al computador donde se genera una data en Amplitud y Fase de la señal para ser procesada por el software LabVIEW y finalmente obtener los gráficos correspondientes.

C. RESULTADOS

En la figura 17, se presentan los espectros de absorción ópticos obtenidos con la EFA, para el Lirio acuático antes y después de irradiar con US a una frecuencia de 17Khz e intensidad de potencia de 4 mW/cm^2 .



*Figura 17, En la gráfica superior (Amplitud vs Longitud de onda), espectros de absorción de los pigmentos fotosintéticos del Lirio Acuático antes y después de exponerse a US durante 4 horas y 30 minutos, con frecuencia de irradiación 17Khz e intensidad de potencia US de 4 mW/cm^2 : ** espectro antes de la irradiación US, ** 2 días después ** 4 días después ** 6 días después.*

En la figura 18, se presentan los espectros que corresponden al lirio antes y después de irradiado a una intensidad de potencia de 8 mW/cm^2 .

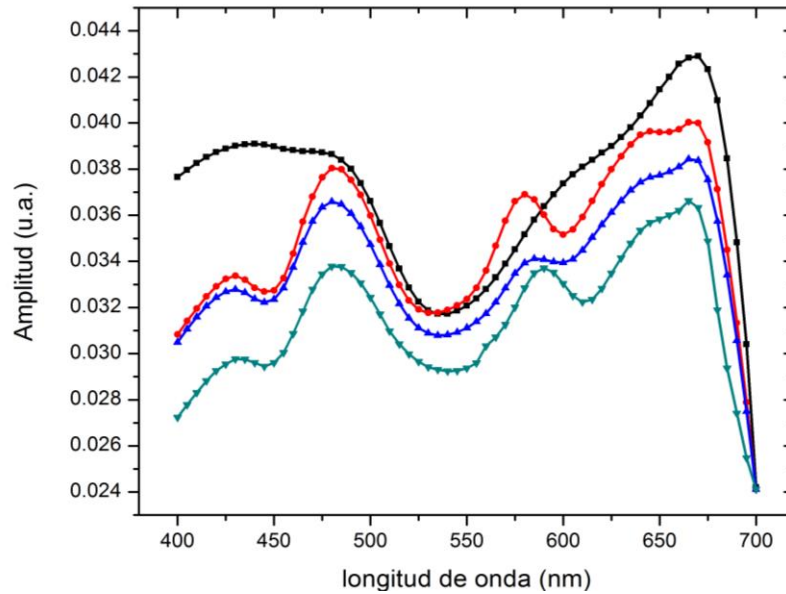
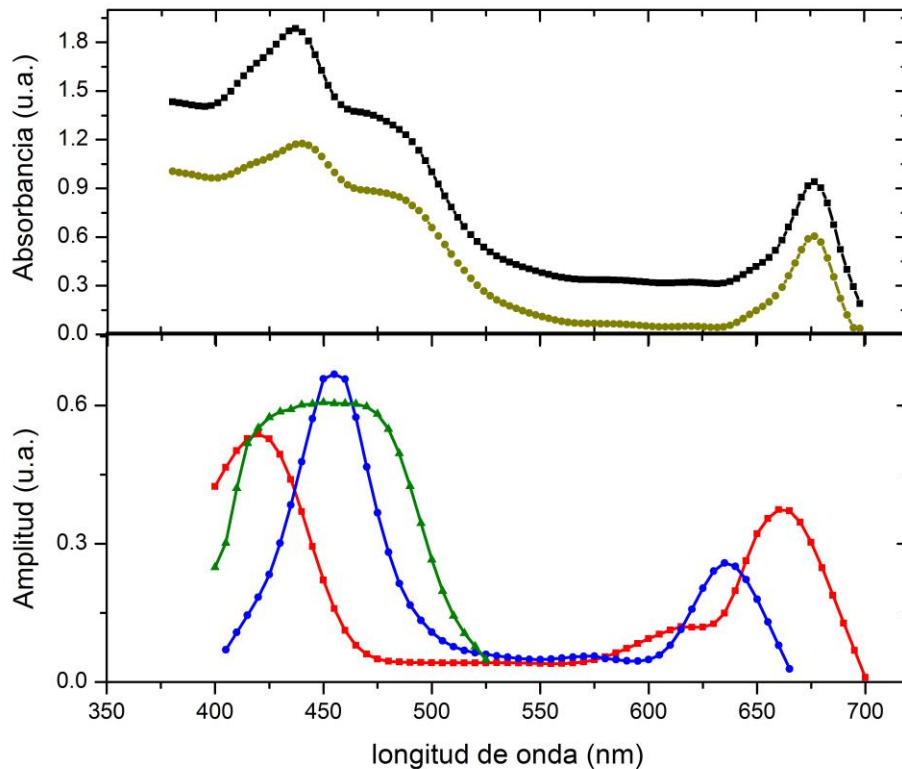


Figura 18, En la gráfica superior (Amplitud vs Longitud de onda), espectros de absorción de los pigmentos fotosintéticos del Lirio Acuático antes y después de exponerse a US durante 4 horas y 30 minutos, con frecuencia de irradiación 17Khz e intensidad de potencia US de $8mW/cm^2$: ** espectro antes de la irradiación US, * 2 días después * 4 días después * 6 días después.

Con el fin de probar la potencia y utilidad de la EFA, se realizara un análisis cualitativo entre los espectros de absorción a las plantas irradiadas y no irradiadas, usando UV /VIS; cuando la planta se irradió a una potencia US mayor, de 20W y 17Khz en frecuencia.

El aislamiento de los cloroplastos de las células vegetales fue realizado a través de centrifugaciones diferenciales, aplicando diferentes revoluciones por minuto (rpm) en forma consecutiva, con el fin obtener suspensiones de cloroplastos puros. Para este método se llevó a cabo seleccionar varias hojas de lirio en las mismas condiciones (sin irradiar e irradiadas), previamente enjuagadas y secas, para obtener 6 gramos de hoja cortada en pequeños pedazos. Estas cantidades fueron colocadas en morteros de porcelana con 5 ml de solución de sacarosa 0.5 M, contenidos en recipientes con hielo y sal de grano, para mantener el material y las muestras a temperaturas bajas que permitieran conservar las células. Después de la adición en los morteros se procedió a macerar el tejido y adicionar sacarosa lentamente hasta completar 15 ml. El líquido obtenido fue filtrado a través de 5 capas de gasa de algodón con ayuda de un embudo, y el producto filtrado fue transferido a tubos de centrifuga fríos y centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos, obteniendo y eliminando la pastilla de organelos grandes, procediendo a una segunda centrifugación de 3000 rpm durante 10 minutos. Finalmente el líquido para cada muestra fue medido en el espectrofotómetro Genesys 10 uv/vis, en función de un blanco como testigo para la obtención de los espectros de absorción.

En la figura 19, se muestran resultados del espectro de absorción obtenidos con UV/VIS del Lirio antes y después de irradiado con US, expuesto a una intensidad de potencia de 16 mW/cm^2 y una frecuencia constante de 17 KHz .



*Figura 19, En la gráfica superior (Absorbancia vs Longitud de onda), espectros de la actividad fotosintética del Lirio Acuático antes y después de irradiar, con frecuencia de irradiación 17 KHz e intensidad de potencia US de 16 mW/cm^2 . Donde ** espectro antes de la irradiación US, ** 6 días después de irradiado con US. En la gráfica inferior (Amplitud vs Longitud de onda), los pigmentos fotosintéticos: ** Clorofila "b", ** Clorofila "a", ** Caroteno.*

D. ANALISIS DE RESULTADOS

En la figura 17, observa que hay una disminución en las bandas de absorción donde se ubican las clorofilas "a" y "b". Pues bien, se hallaron las pendientes en el rango desde 400 nm hasta los 490 nm donde se presenta la superposición de los pigmentos caroteno, clorofila "b" y parte de la clorofila "a"; para cada uno de los espectros obtenidos: Lirio sin irradiar, dos, cuatro y seis días después de haber expuesto la planta a US, se obtuvo una pendiente positiva de $2.88 \cdot 10^{-6}$ para el Lirio sin irradiar como era de esperarse y pendientes negativas para los espectros de absorción en el Lirio irradiado $19.11 \cdot 10^{-6}$ a los dos días, de $5.55 \cdot 10^{-6}$ a los 4 días y de $56.6 \cdot 10^{-6}$ a los 6 días, donde la mayor inclinación ocurre a los seis días. Este cambio en la forma del espectro (pendiente negativa) con el paso del tiempo, se debe probablemente al efecto generado por el US, esto es, la formación de burbujas en la parte acuosa de la hoja (membrana de los tilacoides), que implotan generando radicales que afectan la estructura biológica de la planta, específicamente donde están las clorofilas;

cavitación generada por US [11]. Consecuente a ello, en la otra banda de absorción que corresponde a la clorofila "a", se calcularon pendientes positivas de $97.2 \cdot 10^{-6}$, $75.6 \cdot 10^{-6}$, $72.5 \cdot 10^{-6}$ y $62.5 \cdot 10^{-6}$ para el Lirio sin irradiar, a los dos, cuatro y seis días, respectivamente, después de haber aplicado US. Donde la pendiente menos inclinada corresponde igualmente al Lirio medido a los 6 días.

En la figura 18, se observa que no sólo se disminuyen las bandas de la clorofila "a" y "b", sino que hay una mayor deformación, que posiblemente esté relacionado con el aumento en el número de cavitación, pues este depende de la intensidad de potencia US y la frecuencia de irradiación, según [11].

Por otro lado, comparando la figura 19 con la figura 18, se esperaría que en la última figura, el espectro de absorbancia se deformara en mayor cantidad en los picos de la longitud de onda correspondiente a las clorofilas, pero no sucede, se observa una disminución en las bandas pero no hay una deformación. Adicional a esto, notamos que el espectro UV/VIS que corresponde al Lirio sin irradiar presenta máximos contrarios a los de la EFA, dado que la banda de absorción más alta obtenida con la EFA del Lirio sin irradiar se encuentra en los 660 nm (clorofila "a"); para el caso del espectro obtenido con UV/VIS se encuentra en los 440nm (clorofila "b"). Pues bien, la literatura [51] reporta que cuando se realiza el proceso de aislamiento de cloroplastos en plantas a través de centrifugaciones, las membranas de los cloroplastos se rompen y pueden separarse en partículas pesadas y ligeras. Las partículas pesadas tienen una mayor concentración en la clorofila "b", razón por la cual con esta técnica se evidencia el pico más alto en los 440nm.

VI. MONITOREO DEL EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA EN EL LIRIO ACUÁTICO CON EL Li-COR

A. IMPLEMENTACIÓN Y CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA Li-COR.

Los parámetros de medición seleccionados son fluorescencia y transpiración; la fluorescencia representa la capacidad que tiene la planta para absorber luz, por otro lado, la transpiración, la cantidad de agua que libera la planta durante el proceso de fotosíntesis.

Para la medición de fluorescencia se usó una fuente de luz compuesta con una base de leds rojos con una longitud de onda (λ) de 640nm, en el rojo lejano una λ de 740nm, 3 leds azules con una λ 460nm y blancos para los flashes de excitación. El elemento clave para la producción de fluorescencia es la saturación de luz en la planta y la fuente de luz que se use. Con los 27 leds rojos se logra un nivel mayor de $700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Si se usará la saturación con led azul, se lograrían niveles de fluorescencia alrededor de los $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las frecuencias de muestreo que proporciona el sistema Li-COR van desde 0.25 Hz hasta 20 Khz.

Por otro lado, la transpiración está definida como la pérdida de agua en la planta en forma de vapor; más del 90% del vapor del agua se escapa por las hojas, el otro 10% se pierde entre el tallo y las ramas a través de unas aberturas llamadas lenticelas. La magnitud que rige los movimientos del agua se utiliza para expresar el estado hídrico de la planta (potencial hídrico). En la literatura [51], el potencial hídrico está definido como la energía potencial del agua (Energía libre) que poseen las moléculas de agua para realizar trabajo, es decir, la fuerza motriz para el movimiento del agua dentro de la planta. Las válvulas que regulan el intercambio de gases en la hoja para que se presente el fenómeno de la transpiración, son los estomas. En la noche cuando no hay fotosíntesis, y por tanto no existe demanda de CO_2 en el interior de la hoja, las aberturas estomáticas se reducen, impidiendo la pérdida de agua. La transpiración se puede considerar como un proceso de difusión, donde su intensidad depende tanto del suministro de energía para evaporizar el agua como la presión de vapor y magnitudes de resistencias [51].

Entre los instrumentos usados para medir el potencial hídrico de la planta se encuentran termopares, cámaras y sondas de presión. El sistema portátil Li-COR 6400XT, utilizado en este trabajo, usa termopares. Las mediciones se realizaron en el transcurso del día, en la presencia de luz solar; buscando en lo posible mantener los parámetros de entorno similares en el proceso de medida.

B. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Para la medición de fluorescencia se seleccionó un periodo de tiempo de muestreo de 10 minutos, de los cuales 5 de ellos se usaron para la etapa de oscuridad, existe un

pulso de saturación con luz blanca de 1 minuto, y los 4 minutos restantes se usan para la excitación de los electrones en la longitud de onda del rojo visible (680nm). La frecuencia seleccionada para el muestreo de data fue de 1Khz, permitiendo un tiempo de 1 ms para el salto de electrones de un fotosistema a otro. Para la transpiración, como para las medidas realizadas en fluorescencia, se seleccionaron áreas foliares en las plantas de 3x2 cm, una fracción molar de referencia de $400 \text{ mmol } H_2O \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un flujo molar de aire de $500 \text{ mol air m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los barridos de frecuencia e intensidad de potencia US en el Lirio que se procedieron a medir con este sistema se muestran en la tabla 5.

	Frecuencia (Khz)			densidad de potencia US (mW/cm ²)
	5Khz	10Khz	17Khz	
Potencia US (W)		20 W		16
		30 W		24
		40 W		32
		50 W		40

Tabla 5. Barrido en densidad de potencia y frecuencia, a la que se expuso la planta.

C. RESULTADOS.

La figura 20, muestra el comportamiento del parámetro fluorescencia en el Lirio acuático cuando se irradió con US de 5Khz y un barrido en potencia de 20W a 50W. Cabe resaltar que una planta verde con un PSI óptimo se encuentra en el rango de unidades arbitrarias de 0.75 a 0.85, según [32], lo cual corresponde a la curva obtenida con el Lirio sin irradiar (línea negra). Es importante aclarar que las barras de error son relativamente grandes, debido a que se obtuvieron de los resultados en plantas de Lirio acuático de varios tamaños y edades.

En la figura 21, se muestra el comportamiento del Lirio cuando se irradia a 10Khz, de igual manera, haciendo un barrido en potencia US de 20W a 50W con incrementos de 10W.

La figura 22, muestra el comportamiento de la actividad de la variable PSI en la planta cuando fue irradiada en el umbral del US, a 17Khz, manteniendo el barrido en potencia. Hasta ese momento, se tiene que a mayor potencia, mejor respuesta en la inhibición de la variable PSI. En la figura 23, se muestran las mejores respuestas (es decir a 50W) para las plantas irradiadas a 5Khz, 10Khz y 17Khz.

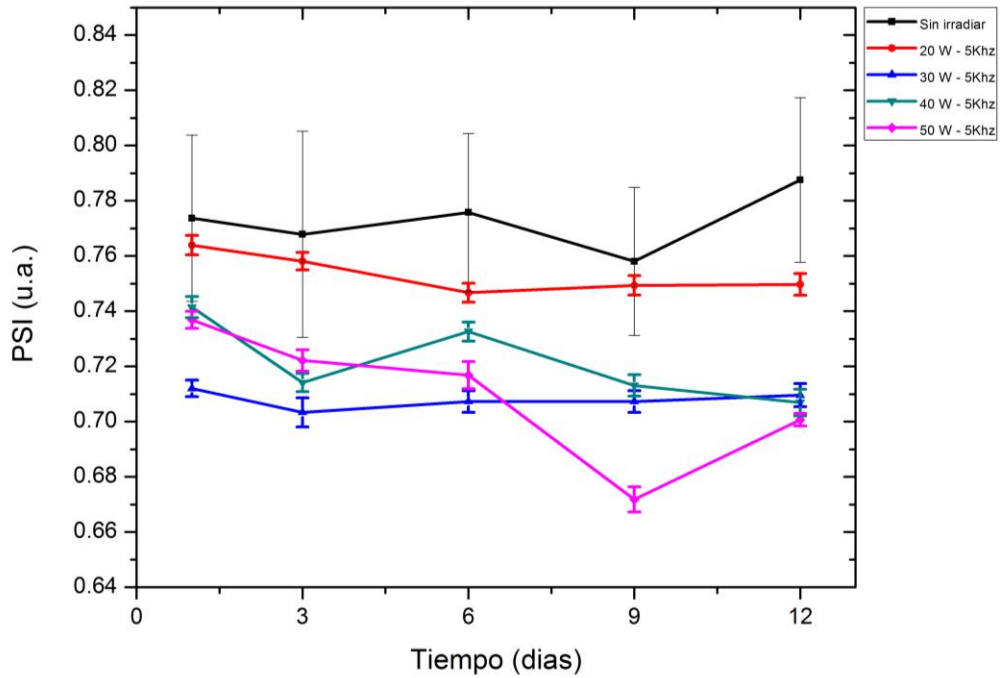


Figura 20, Monitoreo del comportamiento de la variable PSI hasta el día 12 después de irradiar a una frecuencia fija de 5Khz y barrido en potencia de 20W hasta 50W, con incrementos de 10W.

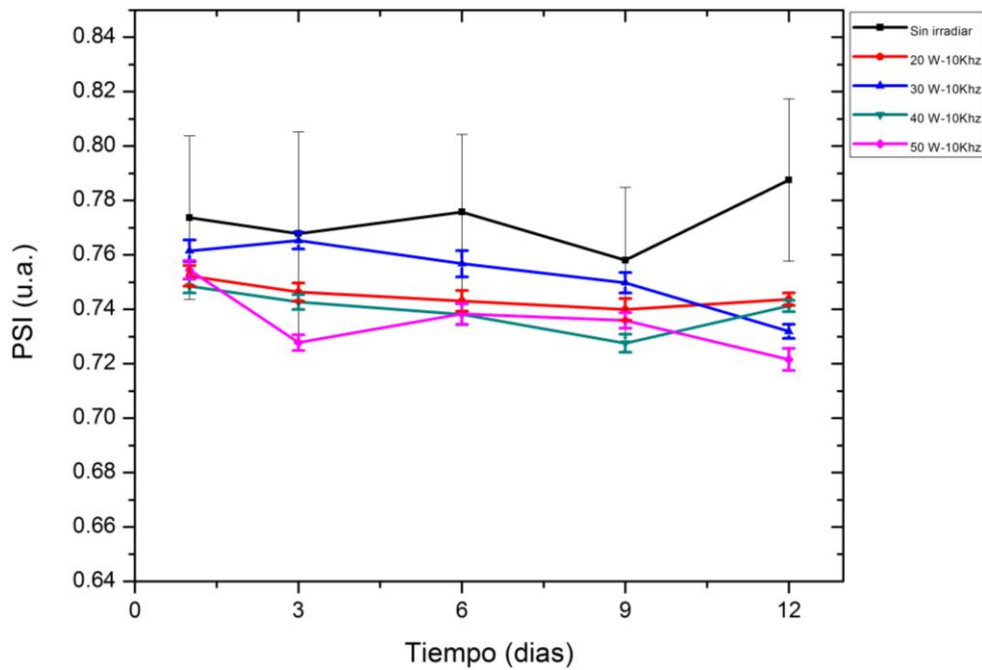


Figura 21, Monitoreo del comportamiento de la variable PSI hasta el día 12 después de irradiar a una frecuencia fija de 10Khz y barrido en potencia de 20W hasta 50W, con incrementos de 10W.

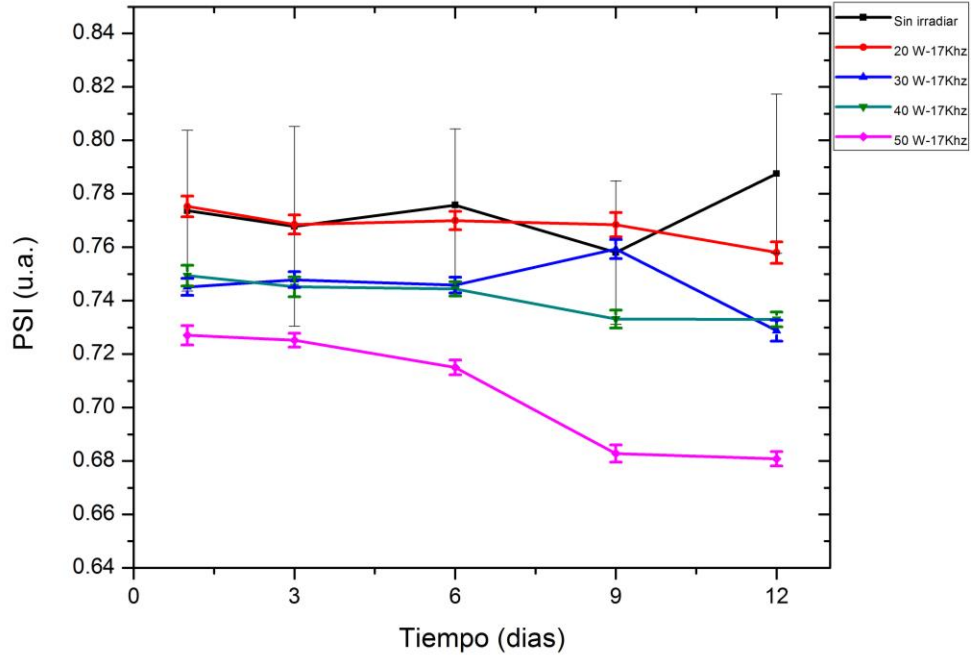


Figura 22, Monitoreo del comportamiento de la variable PSI hasta el día 12 después de irradiar a una frecuencia fija de 17Khz y barrido en potencia de 20W hasta 50W, con incrementos de 10W.

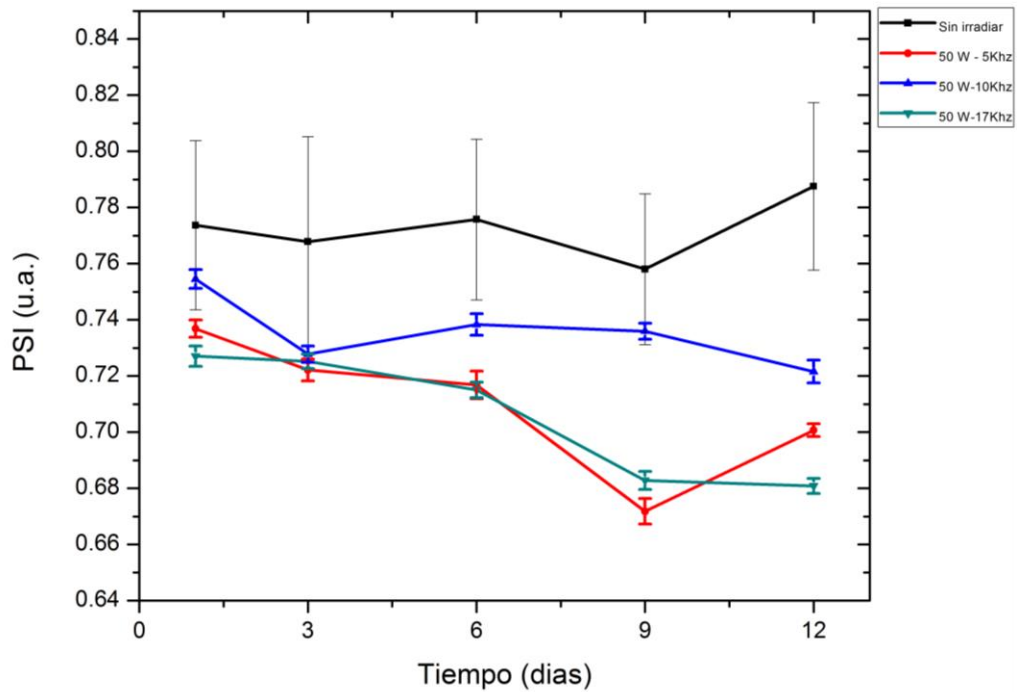


Figura 23, Monitoreo del comportamiento de la variable PSI hasta el día 12 después de irradiar a una frecuencia potencia fija de 50W y frecuencia de 5Khz (línea roja), de 10Khz (línea azul) y 17Khz (línea verde).

En la figura 24, se muestra el comportamiento de transpiración en la planta hasta los 12 días después de irradiarse a una frecuencia fija de 5Khz y el barrido de potencia.

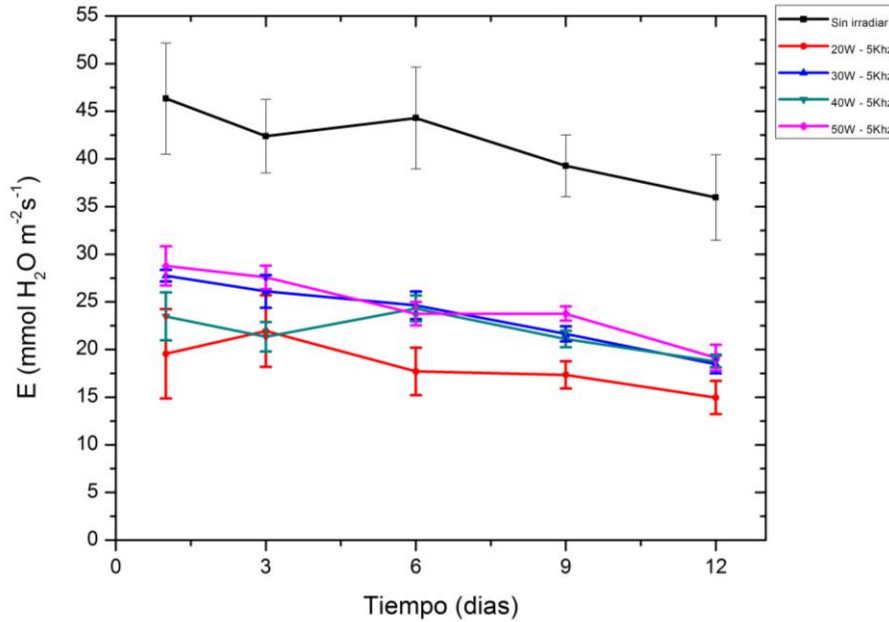


Figura 24, Monitoreo del comportamiento de la variable Transpiración, hasta el día 12 después de irradiar a una frecuencia fija de 5Khz y barrido en potencia de 20W hasta 50W, con incrementos de 10W.

En la figura 25, se muestran los resultados obtenidos para la variable transpiración, cuando se incrementa la frecuencia a 10Khz, manteniendo el barrido en potencia.

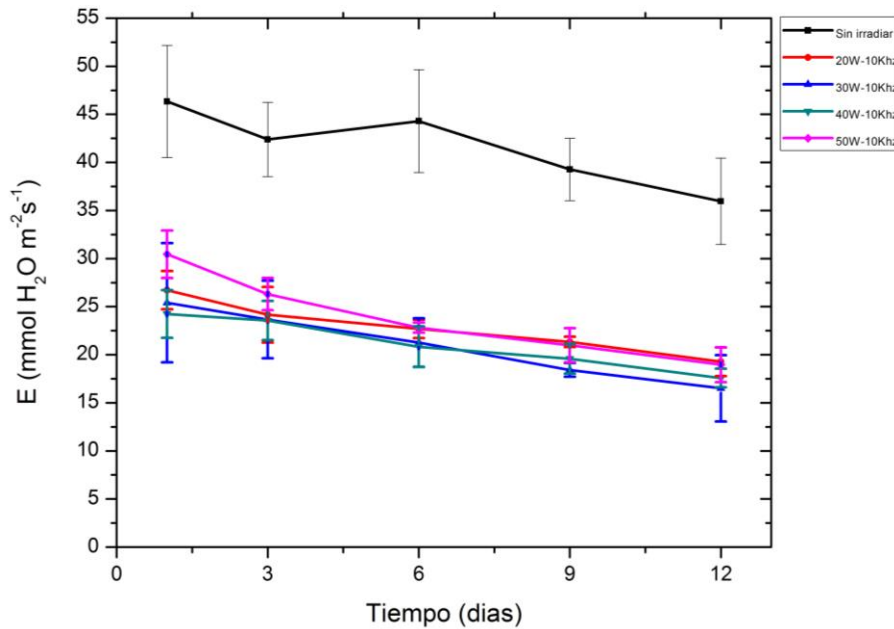


Figura 25, Monitoreo del comportamiento de la variable Transpiración, hasta el día 12 después de irradiar a una frecuencia fija de 10Khz y barrido en potencia de 20W hasta 50W, con incrementos de 10W.

En la figura 26, se muestran los resultados obtenidos para la variable transpiración, cuando se incrementa la frecuencia a 17Khz, manteniendo el barrido en potencia.

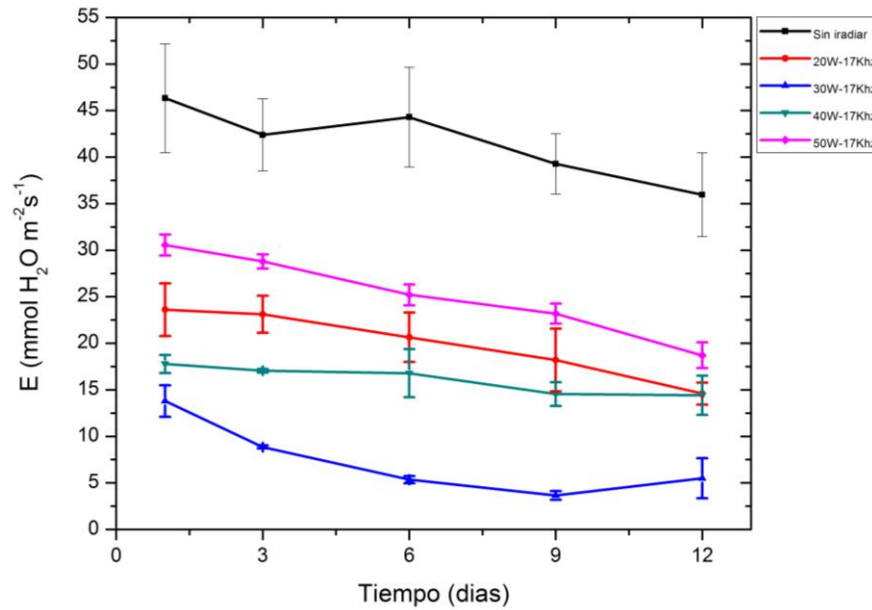


Figura 26, Monitoreo del comportamiento de la variable Transpiración, hasta el día 12 después de irradiar a una frecuencia fija de 17Khz y barrido en potencia de 20W hasta 50W, con incrementos de 10W.

La figura 27, las mejores respuestas en la inhibición de la variable transpiración cuando se irradió a 5Khz, 10Khz y 17Khz.

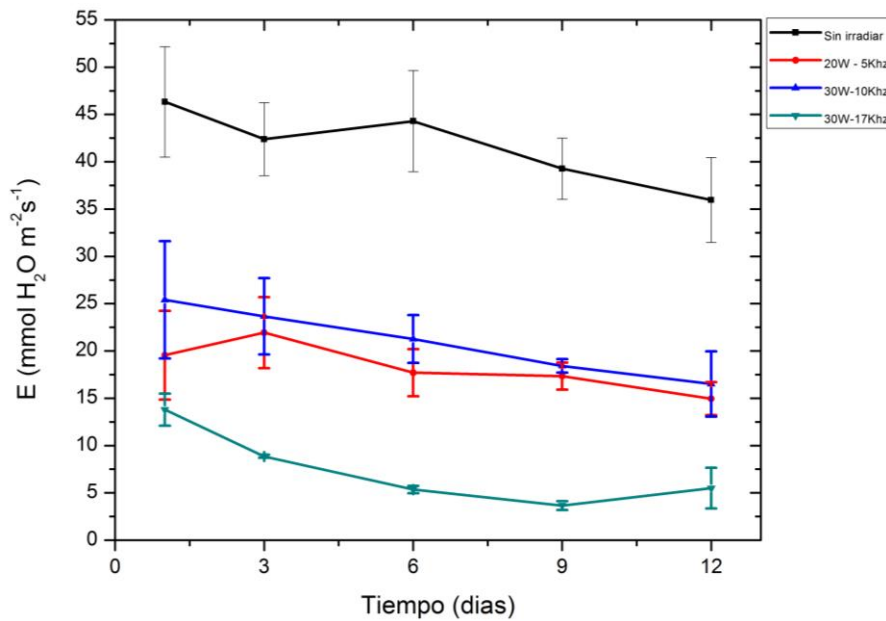


Figura 27, Monitoreo del comportamiento de la variable transpiración hasta el día 12 después de irradiar a una frecuencia de 5Khz y 20W (línea roja), a 10Khz y 30W (línea azul), a 17Khz y 30W (línea verde).

D. ANALISIS DE RESULTADOS

De la Fig. 20 se sigue que para las hojas de lirio sin irradiar la curva PSI vs t es la más alta en intensidad y con una pendiente ligeramente positiva de su línea de tendencia. Con el incremento en la potencia US la intensidad PSI decrece, así como la pendiente de la línea de tendencia hasta que se hace negativa y llega al valor de -3.28×10^{-3} para la potencia US de 50 W. Se observa que la curva a 40 W de potencia tiene una intensidad mayor que la de 30 W, y que la pendiente de la línea de tendencia de la curva a 30 W es mayor que la de 20 W, hechos que parecerían ir en contra de lo esperado, sin embargo, tomando en consideración el tamaño de las barras de error, las diferencias entre los resultados para 30 W y 40 W no son significativos. Por la misma razón, la diferencia entre las pendientes de las líneas de tendencia de las curvas obtenidas para 20 W y 30 W es tan pequeña que tampoco es significativa.

Cuando se incrementa la frecuencia de irradiación US a 10 KHz, Fig. 21, la intensidad PSI decrece también en todos los casos, pero en una menor medida que en el caso de la irradiación a 5 kHz, y lo mismo ocurre con la pendiente de la línea de tendencia que alcanza su valor más bajo de 2.99×10^{-3} .

Para el caso de la aplicación de la frecuencia de irradiación de 17 khz, Fig. 22, los resultados son similares que en el caso de los 10 khz, excepto para la mayor potencia de 50 W para la que se tiene un decremento significativo de la intensidad PSI, inclusive un poco menor que el obtenido para el caso de los 5 khz, y una disminución de la pendiente de la línea de tendencia de 4.205×10^{-3} .

La comparación de curvas de PSI vs t para la misma máxima potencia de 50 W y a las tres frecuencias US utilizadas, Fig. 23, muestra la similitud del comportamiento de las curvas para 5 khz y 17 khz.

Respecto a los resultados de la medición de la transpiración, a diferencia de lo obtenido para la variable PSI, la mayor disminución de la transpiración de la planta no toma lugar a la mayor potencia. Para una frecuencia de irradiación US de 5 khz, Fig. 24, se observa que el mayor decaimiento de la transpiración ocurre a 20W con un valor mínimo de $15.012 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una pendiente negativa de su línea de tendencia de valor 0.875. En el caso de la frecuencia de irradiación US de 10 khz, Fig. 25, el mayor decaimiento de la transpiración ocurre a 30W con un valor mínimo de $17.553 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una pendiente negativa de su línea de tendencia de valor 1.043. Finalmente, para la frecuencia de irradiación US de 17 khz, Fig. 26, se observa que el mayor decaimiento de la transpiración ocurre también a 30W con un valor notablemente bajo de $5.542 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una pendiente negativa de su línea de tendencia de 1.077.

Hasta el momento, se puede evidenciar que en la variable transpiración no se presenta el mismo comportamiento de que a mayor potencia se obtiene mejor respuesta en la inhibición de su capacidad para evaporar agua. Este hecho se le puede atribuir probablemente a la curva que describe la cavitación [7]; considerando que la frecuencia US de la onda proporciona un tiempo de actuación para los fenómenos de

compresión y depresión, a la potencia US se le puede atribuir la fuerza con la que se comprimen y se estiran las moléculas donde impacta la onda, hasta el punto de formar la burbuja de cavitación y por ende presentarse este fenómeno destructivo en la parte acuosa de la hoja; probablemente se puede atribuir esto a que la mejor respuesta en el fenómeno de transpiración sea a 17Khz con 30W de potencia y no la 5Khz a 20W como se muestra en la figura 27; de esa figura se puede observar que para que haya mayor cavitación lo más significativo es una tensión (potencia) y esta no necesariamente debe tener tiempo largos de compresión y depresión en la onda de impacto (frecuencia).

VII. CONCLUSIONES

La aplicación de la técnica espectroscopia fotoacústica (EFA) en el monitoreo del espectro de absorción óptico en el rango de 400 a 700 nm en las hojas de Lirio acuático, antes y después de las irradiaciones, muestra una notable disminución de las bandas de absorción óptica de las clorofilas, en particular para la clorofila "b" en ambos extremos del intervalo, y por lo tanto un importante daño en los centros generadores de la fotosíntesis. Estos resultados corresponden al creciente daño estructural que se observa a simple vista en las plantas irradiadas con el transcurso de los días posteriores a la irradiación hasta llegar a una completa muerte celular.

Además de la ventaja que representa obtener los espectros de absorción óptico, mediante la EFA, del no requerir la muestra tratamiento alguno, la comparación de resultados con los espectros obtenidos mediante el sistema de UV/VIS se observa una diferencia significativa de los resultados de EFA en cuanto a la completa información que proporciona de los componentes de la hoja, lo cual no es posible obtener de los espectros obtenidos por el sistema de UV/VIS, ya que la muestra es alterada para su estudio y se pierde una diversidad de información de sus componentes. De esta manera, se reitera lo útil que resulta la técnica de EFA para estudios de pigmentos fotosintéticos en plantas.

De la aplicación del sistema LiCOR al estudio de la fluorescencia y la tasa de respiración en las plantas de lirio expuestas a irradiación US de frecuencia 5 khz, 10 khz y 17 khz, y potencia en el rango de 20 W a 50 W, se obtiene lo siguiente:

La capacidad de las plantas de adquirir energía luminosa (fluorescencia) decrece en todos los casos de irradiación US en forma proporcional al incremento de la potencia US, lo cual es congruente a lo esperado por el incremento de la cavitación con la potencia. Sin embargo, aun cuando la fluorescencia es menos afectada para las plantas irradiadas con 10 khz que para las irradiadas con 5 khz, como se espera de acuerdo a las características de la cavitación, para las plantas irradiadas con 17 khz y 50 W se obtiene un comportamiento similar de la fluorescencia como la obtenida para 5 khz y 50W.

La capacidad de liberación de agua por la fotosíntesis (transpiración) decrece en todos los casos de irradiación US, sin embargo, no es proporcional a la potencia como la fluorescencia, sino que tiene su máximo entre 20 W y 30 W. Lo cual puede explicarse por el ajuste de la frecuencia y la potencia US útil para la cavitación; fenómeno que presumiblemente ocurre en las partes acuosas de la planta.

Por otra parte, en la simulación del hábitat para el Lirio acuático en un laboratorio, es de importancia considerar y mantener estables variables como el PH del agua, la cantidad de lúmenes que llegan a la superficie de la hoja, la concentración de nutrientes del agua y el medio (ambiente abierto o cerrado) donde la planta habita. Para evitar problemas de deterioro, baja clorosis en el Lirio o necrosis producto del aumento de temperatura en ambientes cerrados.

Bibliografía

- [1] Ortega D, Seguel S. (2004). Historia del Ultrasonido: El caso chileno. Radiología, vol.10 (2), 89-92.
- [2] Calderón A, Cardona A, Nogal U, Juárez A, Marin E, Muñoz R. (2014). Photoacoustic analysis of the ultrasonic irradiation effect in the photosynthetic activity in aquatic liriium plants. Journal Applied Radiation and Isotopes , 83, 261-268.
- [3] Hongwei H, Minsheng W, yifang C, Jiaowen T, Quingyu W, 2004, Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation, Journal Colloids and surfaces, Biointerfaces, 33 (3), 151-156.
- [4] Hao H, Wu M, Chen Y, Tang J, Wu J, 2004, Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation, Journal Colloids and Surface, 33, 151-156.
- [5] Gerde J, Montalbo M, Yao L, Grewell D, Wang T, 2012, Evaluation of microalge cell disruption by ultrasonic treatment, Journal Bioresource Technology, 125, 175-181.
- [6] Wang M, Yuan W, Jiang X, Jing Y, Wang Z, 2014, Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound, Journal Bioresource Technology, 153, 315-321.
- [7] Janusz O, 2012, Application of Hydrodynamic Cavitation in Environmental Engineering, University of Technology, Tayloy & Francis Group, London.
- [8] Brennen C, 1995, Cavitation and Bubble Dynamics, Oxford University Press, New York.
- [9] Margulis M.A. 1995, Sonochemistry and cavitation, Gordon and Breach Publishers, Amsterdam.
- [10] Kumar P.S. Moholkar V.S., 2007. Conceptual design of a novel hydrodynamic cavitation reactor, Chemical Engineering Science, 62, 2698-2711.
- [11] Capin F., Herbert E., 2006. Cavitation in water: a review, Comptes Rendus Physique, 7, 1000-1017.
- [12] Gogate P.R., 2008, Cavitation reactors for process intensification of chemical processing flow, Journal of Thermal Science, 18, 338-344.
- [13] Braeutigam P., Franke M., Wu Z.L., Ondruschka B., 2010, Role of different parameters in the optimization of hydrodynamic cavitation, Chem. Eng. Technol., 33(6), 932-940.
- [14] Chakinala A.G., Gogate P.G., Burgess A.E., Bremner D.H., 2008, Treatment of industrial wastewater effluents using hydrodynamic cavitation and the advances Fenton process, Ultrasonics Sonochemistry, 152, 498-502.
- [15] Wang X, Wnag J, Guo P., Wang C., 2009, Degradation of rhodamine B in aqueous solution by using swirling jet-induced cavitation combined with H₂O₂, Journal of Hazardous Materials, 169, 486-491.

- [16] Arrojo S., Benito Y., Tarifa A., 2008, A parametrical study of disinfection with hydrodynamic cavitation, *Ultrasonics Sonochem.* 15, 903-908.
- [17] Feng R., Shao Y., Zhu C., Mason T.J., 2002, Enhancement of ultrasonic cavitation yield by multi-frequency sonication, *Ultrasonics Sonochemistry*, 9, 231-236.
- [18] Colussi A.J., Weavers L.K., Hoffman M.R., 1998, Chemical bubble dynamics and quantitative sonochemistry, *J Phys, Chem A*, 102, 6927-6934.
- [19] Mason W., Thurston R., 1981, *Physical Acoustics*, vol (15), Academic Press, London, pp 49-51
- [20] Cardona A., 2009, Estudio del efecto del ultrasonido en plantas de Lirio Acuático mediante técnicas fototérmicas, en Tesis grado Doctorado, Cicata-IPN.
- [21] Bell G., 1881, Upon the production of sound by radiant energy, London, *Magazine and journal of Science* 11: 510-528.
- [22] Pao Y., 1997, *Optoacoustic spectroscopy and detection*. New York: Academic Press.
- [23] Prehn H., 1979, Photoakustische Spektroskopie, *GIT-Fachzeitschrift für das Laboratorium* 23: 281-289.
- [24] Rosencwaig A., 1975, Photoacoustic spectroscopy of solids, *Physics today* 28: 23-30.
- [25] Rosencwaig A., 1980, *Photoacoustic and photoacoustic spectroscopy*, New York: John Wiley.
- [26] Balasubramanian D., Rao C., 1981, Photoacoustic spectroscopy of biological system, *Photochem pothobiol* 34: 749-752.
- [27] Neubacher H., Scharmann., Lohmann W., 1982, Die Anwendung der Photoakustischen Spektroskopie in der Biophysik, in Hoppe W et al., eds. *Biophysik* 116-122. Berlin: Springer.
- [28] Ortner P., Rosencwaig A., 1977, Photoacoustic spectroscopy analysis of marine phytoplankton. *Hydrobiologia* 56:3-6.
- [29] Adams M., Beadle B., King A., Kirkbright G., 1976, Analytical acoustic spectroscopy. Part II, Ultraviolet and visible optoacoustic spectra of some inorganic, biochemical and phytochemical samples, *Analyst* 101:553-561.
- [30] Buschmann C., Prehn H., 1981, In vivo studies of radiative and non-radiative de excitation processes of pigments in *Raphanus* by photoacoustic spectroscopy, *photobiochem photobiophys* 2: 209-215.

- [31] Buschmann C., Prehn H., Lichtenthaler H., 1984, Photoacoustic spectroscopy (PAS) and its application in photosynthesis research, in photosynthesis research 5: 29-46.
- [32] Manual LiCOR 6400-XT
- [33] Zakhidov E., Kokhkharov V., Kuvondikov Sh., Nematov K., Saparbaev A., 2012, Photoacoustic Spectroscopy of thermal relaxation processes of Solar Energy in the Photosynthetic Apparatus of plants, Applied Solar Energy, vol. 48, pp 62-66.
- [34] Havaux M., 1988, Photoacoustic characteristics of leaves of atrazine-resistant weed mutants, Photosynthesis Research, 21: 51-59.
- [35] Gordillo F., Zárate F., Mejias C., Rivera L., Ariza H., 2008, Analisis de la Actividad Fotosintetica de las plantas de Café utilizando la Tecnica fotoacústica. En: Revista Colombiana de Física, vol. 40, No. 1, Abril
- [36] Gutierrez A., Giraldo J., 2011 Tecnica fotoacústica aplicada a la determinación de propiedades térmicas de muestras de silicio poroso. En: Revista Mexicana de Física, Vol 57, N° 2, p 99-105, Abril.
- [37] León M., Martínez S., Balderas J., Yáñez J., 2009, Tecnica Fotoacústica aplicada a la caracterización iptica de películas de proteína de suero de leche y goma gelana. En: XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniera, México.
- [38] Gonzales M., 1998, Caracterización fotosintética de árboles de la Laurisil Canaria, Tesis doctoral, Universidad de la Laguna.
- [39] Wang J., Xing D., Zhang L., Jia L., 2007, A new Principle photosynthesis capacity biosensor based on quantitative measurement of delayed fluorescence in vivo, Biosensors and Bioelectronics, 22: 2861-2868.
- [40] Wang C., Xiang D., Chen Q., 2004, A novel method for measuring photosynthesis using delayed fluorescence of chloroplast, Biosensors and Bioelectronics, 20: 454-459.
- [41] Hooper D., Gardon Z., Chapin F., 2002, Corrected calculations for soil and ecosystem measurements of CO₂ flux using the Li-COR 6200 portable photosynthesis system, Springer 132: 1-11.
- [42] Flexas J., Díaz A., Berry J., Cifre J., Galmes J., Kaldenhoff., Medrano H., Ribas M., 2007, Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization, Journal of Experimental Botany, Vol 58 (6) pp 1533-1543.
- [43] Pérez J., Rodriguez R., García F., Jasso D., 2010, Conductancia estómatica y asimilación neta de CO₂ en Sábila (Aloe vera Tourn) bajo sequía, en Revista Fitotec Mex, Vol 33 (4): pp 305-314.
- [44] LI-COR. (2012). Manual Li-COR 6400XT. 2013, de Biosciences LICOR Sitio web: <https://www.licor.com/env/products/photosynthesis/technology.html>

- [45] Hao H., Wu M., Chen Y., Tang J., Wu Q., 2004, Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation, *Journal Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol (33) pp 151-156.
- [46] Frederick W., 2011, *Sonography Principles and Instruments*, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania.
- [47] Kinsler L., 1999, *Fundamentos de acústica*, Editorial Limusa S.A., México D.F., pp143-266.
- [48] Cardona A., 2006, *Monitoreo de fotosíntesis en plantas mediante la técnica fotoacústica: Aplicación al estudio del Lirio Acuático (EICHHORNIA CRASSIPES)*, Tesis Maestría, Cicata-Legaria, IPN, México, D.f.
- [49] Cardona A., Abdelarrague R., Peña G., Marin E., Calderón A., 2013, *Aplicación de la Técnica Fotoacústica Resuelta en Tiempo al monitoreo de la Fotosíntesis en Plantas de Lirio Acuático (Eichhornia Crassipes)*, en *Revista Respuesta*, N°1 ISSN 0122-820X, Universidad Francisco de Paula Santander, Colombia, pp. 5-12.
- [50] Trudy M., James R., 2009, *BIOQUÍMICA LAS BASES MOLECULARES DE LA VIDA*, editorial Mc Graw Hill, cuarta edición, pp. 469-497
- [51] R.G.S. Bidwell, *Fisiología vegetal. Primera Edición en Español*, AGT Editor S.A., Copyright, ISBN: 968-463-015-8, México D.F. pp 167-205. 1990.
- [52] Black, C.C. 1986. Effects of CO₂ Concentration on Photosynthesis and Respiration of C₄ and CAM Plants. In: H.Z. Enoch and B.A. Kimball (Eds.). *Carbon Dioxide Enrichment of Greenhouse Crops. Volume II. Physiology, Yield, and Economics*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. USA. pp. 29-40.
- [53] Bermudez S., 1996. *EFEECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN LA DIGESTION ANAZROBIA SECA DEL LIRIO ACUATICO (Eichhornia crassipes)*, En Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciencias Biológicas y de la Salud.