

Espectroscopía Fotoacústica con luz polarizada y no polarizada en pigmentos naturales

María Fernanda Arriaga Argüelles¹, Lilia Ivonne Olvera Cano¹, Alfredo Cruz Orea^{1*}

¹ Departamento de Física, CINVESTAV–IPN, Av. IPN no. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, A.P. 14-740, 07360 México City, México

*Corresponding author email: alfredo.cruzorea@cinvestav.mx

Resumen—Esta investigación analiza el efecto de la luz polarizada y no polarizada sobre el espectro de absorción de muestras biológicas mediante espectroscopía fotoacústica. Se obtuvieron espectros de absorción la cebolla morada y la espinaca, con y sin polarizadores a distintos ángulos de polarización. Para identificar los pigmentos presentes además se aplicó el método de separación en la fase. Los resultados revelan que la luz polarizada impacta de diferentes maneras la absorción de luz según la estructura y composición de cada muestra, con efectos más pronunciados en la cebolla. Estos hallazgos resaltan la influencia de la luz polarizada en sistemas anisotrópicos, como la cebolla, y enfatizan su potencial para el análisis de otras muestras biológicas e inorgánicas.

Palabras Clave - espectros de absorción ópticos, fotoacústica, pigmentos naturales.

Abstract- This research analyzes the effect of polarized and nonpolarized light on the absorption spectrum of biological samples using photoacoustic spectroscopy. Absorption spectra of red onion and spinach were obtained, with and without polarizers at different polarization angles. To identify the present pigments phase-resolved method was also applied. The results reveal that polarized light impacts in different ways light absorption depending on the structure and composition of each sample, with more pronounced effects in onion. These findings highlight the influence of polarized light on anisotropic systems, such as onion, and emphasize its potential for the analysis of other biological and inorganic samples.

I. INTRODUCCIÓN

La luz polarizada se encuentra presente en varios fenómenos de la naturaleza y puede ser modificada debido a efectos como la reflexión, dispersión o transmisión de la luz. En el cielo y bajo el agua, la dispersión de la luz produce una polarización parcial que varía según la posición del sol y la dirección de la visión. Asimismo, la reflexión de la luz en superficies como la interfaz aire-agua, hojas, superficies mojadas, piel de animales o escamas genera algún grado de polarización en condiciones geoméricamente favorables. Para animales terrestres con visión de luz polarizada, como los artrópodos, el cielo ofrece un patrón útil para la navegación, aunque las reflexiones polarizadas pueden enmascarar los colores "verdaderos" de los objetos [1].

La polarización de la luz también ha demostrado efectos biológicos. Por ejemplo, se ha encontrado que los brotes de lentejas y guisantes crecen más rápido bajo luz polarizada circularmente hacia la izquierda [2]. Además, se ha investigado su uso como biomarcador, aprovechando la polarización circular provocada por microorganismos fotosintéticos, vegetación y minerales [3].

En la fotosíntesis, los pigmentos juegan un papel clave en la captura de luz. Las clorofilas a y b absorben en la región visible mediante múltiples bandas, debido a la asimetría de su macrociclo y al fuerte acoplamiento vibrónico [4]. El contenido de clorofila (LCC, por sus siglas en inglés) es un indicador fisiológico relevante, que refleja la capacidad fotosintética y el estado de salud de la planta. La reflexión polarimétrica se ha utilizado para estimar este contenido a partir de mediciones de múltiples ángulos [5].

Por su parte, los carotenoides actúan como pigmentos accesorios, protegiendo contra la fotooxidación causada por el exceso de luz [6]. La creciente demanda de estos compuestos impulsa su desarrollo biotecnológico para satisfacer tanto la industria como las preferencias de los consumidores. En el caso de los polifenoles, este grupo de compuestos bioactivos está ampliamente distribuido en alimentos. Los polifenoles tienen dos clases generales: los flavonoides y los ácidos fenólicos. Los flavonoides contribuyen al color de las plantas [7]. Investigaciones han revelado que los polifenoles juegan un papel clave para prevenir diversas enfermedades, como la hipercolesterolemia, la hiperglucemia, la hiperlipidemia y la aparición del cáncer [8].

A pesar del conocimiento sobre los pigmentos naturales, aún se continúa estudiando la influencia de la luz polarizada en su absorción, debido a que estos pigmentos en los organismos están localizados, en ciertas ocasiones, en sistemas anisotrópicos y por lo que el uso de modelos de sistemas anisotrópicos y varios tipos de espectroscopía de luz polarizada han sido aplicados para investigar sus interacciones [9]. Este trabajo tiene como objetivo explorar cómo la luz polarizada afecta el espectro de absorción de muestras biológicas fotosensibles. Además, se busca identificar si existe alguna correlación entre los espectros obtenidos y la orientación de las muestras.

En este trabajo se utiliza la espectroscopía fotoacústica para analizar la cebolla morada (*Allium cepa* var. cepa), la espinaca (*Spinacia oleracea* L.). Se obtuvieron los espectros de absorción de cada muestra y, mediante los métodos de primera y segunda derivada además del método separación en la fase, se identificaron los pigmentos presentes. En el caso de la cebolla, debido a su anisotropía, se midieron los espectros en diferentes posiciones para evaluar si existe alguna orientación preferencial.

II. ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

La espectroscopía fotoacústica (PAS, por sus siglas en inglés), es una herramienta versátil y útil con la cual se puede obtener información espectral sobre las componentes de una muestra. El rango del espectro electromagnético que hemos utilizado en PAS va desde el ultravioleta hasta el infrarrojo. Las muestras analizadas en PAS requieren de una sencilla preparación y pueden ser sólidos, líquidos, gases, geles, polvos o material biológico [10].

En PAS, la muestra se ilumina con radiación electromagnética de longitud de onda específica, lo que induce la absorción de energía por parte de la muestra. Como resultado de esta absorción, la muestra experimenta un calentamiento periódico que se transmite al aire circundante y genera expansiones y contracciones periódicas en este gas, produciendo ondas acústicas. Estas ondas acústicas son detectadas por un transductor, como un micrófono, y se convierten en una señal eléctrica que puede ser analizada para obtener información sobre las propiedades de la muestra, como su composición, estructura molecular, concentración de especies químicas, entre otros [10].

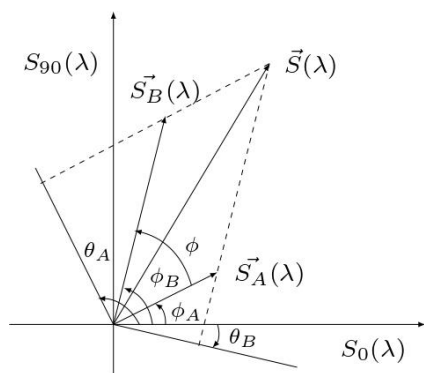


Figura 1.- Proyección de la señal fotoacústica resultante de las contribuciones $\vec{S}_A(\lambda)$ y $\vec{S}_B(\lambda)$ [10].

III. METODOLOGÍA/DESARROLLO

A. Método de separación en la fase

El método de separación en la fase permite separar las contribuciones individuales de dos centros absorbentes en un espectro de absorción efectivo [11].

Consideramos una muestra que esté constituida por dos capas, una de material A y otra de material B, con la cara de la muestra A en contacto con la columna de gas en la celda fotoacústica. Para una frecuencia de modulación fija, la señal acústica detectada por el micrófono es la resultante de la contribución de los materiales A y B. Dado que la capa B está detrás de la capa A, existe un tiempo de retardo entre las señales provenientes de A y B debido a la diferencia entre sus correspondientes tiempos de difusión térmica. Como consecuencia de este retardo entre las señales se produce una diferencia de fase ϕ en la señal fotoacústica que proviene de los dos materiales [12].

Considerando este sistema de dos capas (A y B), la señal $\vec{S}(\lambda)$ es la suma de los vectores correspondientes a la señal de cada capa $\vec{S}_A(\lambda)$ y $\vec{S}_B(\lambda)$ como se muestra en la Figura 1. Los vectores $\vec{S}_A(\lambda)$ y $\vec{S}_B(\lambda)$ están desfasados por un ángulo $\phi = \phi_B - \phi_A$. Para encontrar las componentes de capa capa, un método consiste en proyectar la señal resultante a un ángulo de fase θ . Cuando un ángulo de fase θ_B está a un ángulo 90° de una de las contribuciones, por ejemplo $\vec{S}_B(\lambda)$, como se puede ver en la Figura 1, la proyección de la señal resultante es igual a la componente de la otra contribución $\vec{S}_A(\lambda)$. El resultado de esta proyección es el espectro de absorción centrado en la capa A. Desde otro ángulo θ_A , el espectro de B también es aislado. Así, el ángulo de fase de $\vec{S}_A(\lambda)$ está dado por $\theta_A \pm 90^\circ$ en donde θ_A es el ángulo en el que el espectro de A fue separado, análogamente, el ángulo de fase de $\vec{S}_B(\lambda)$ está dado por $\theta_B \pm 90^\circ$ en donde θ_B es el ángulo en el que el espectro de B fue separado [13].

Cuando los picos de absorción característicos de A y B están localizados a distintas longitudes de onda, se pueden determinar los ángulos θ_A y θ_B anulando uno de los picos a través de la proyección a distintos ángulos.

B. Montaje experimental

En la Figura 2, se muestra el montaje experimental que compone al espectrómetro fotoacústico, el cual consta de las siguientes componentes:

- Una fuente de luz, la cual es una lámpara de Xénon que opera a 700 W.
- Un monocromador para dispersar la luz de la lámpara en sus diferentes longitudes de onda constituyentes y seleccionar una de ellas para el análisis.
- Un modulador mecánico de luz (chopper) para modular la frecuencia del haz a 17 Hz.
- Dos polarizadores de luz

- Una fibra óptica para transmitir el haz de luz monocromador y modulado hacia la celda fotoacústica.
- La celda fotoacústica, en la cual se coloca la muestra analizar. La celda está cerrada herméticamente con grasa de vacío. Dentro que la celda se encuentra un micrófono de electroreto por el cual se detectan las ondas acústicas producidas por las variaciones de presión de la muestra.
- Dos amplificadores Lock-in para amplificar la señal proveniente del micrófono. Además, el amplificador Lock-in se sincroniza con la frecuencia de modulación de la luz para extraer la información espectral de la muestra en amplitud y fase, con alta sensibilidad y precisión.
- Una PC para la adquisición de datos. Por medio del programa LabView, se registra la amplitud y fase de la señal medida en el amplificador en función de la longitud de onda.

sobre la muestra, generando un espectro de absorción resultado de la absorción de luz de la muestra.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Cebolla Morada (*Allium cepava var. Cepa*)

Las muestras analizadas de *Allium cepava var. Cepa* (AC) fueron adquiridas de un mercado local de la Ciudad de México. Se colocó un fragmento de la muestra en la celda fotoacústica, como se observa en la Figura 3, siendo la superficie de color morado sobre la que incide el haz de luz. En la Figura 4 se presenta la imagen de la muestra utilizada obtenida por medio del microscopio.

Se obtuvo inicialmente el espectro de absorción de la muestra, el cual se presenta en la Figura 5. En dicha figura se observan dos bandas de absorción: la primera entre 300 y 400 nm, y la segunda entre 500 y 600 nm. Para asociar estas bandas con los pigmentos presentes en la cebolla, se empleó el procedimiento de separación en la fase descrito en la sección II. El espectro resultante se muestra en la Figura 6.

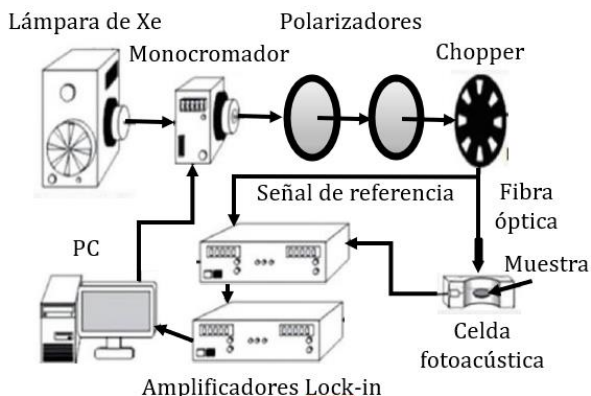


Figura 2.- Montaje experimental del equipo de espectroscopía fotoacústica con polarizadores.

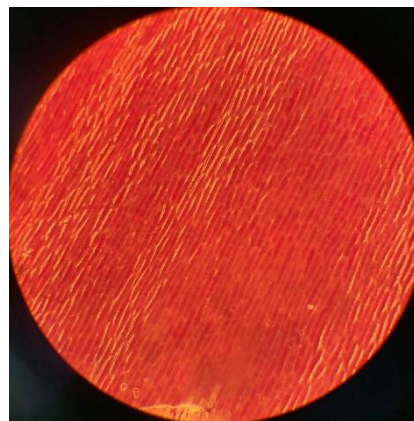


Figura 4.- Superficie de de la muestra AC.

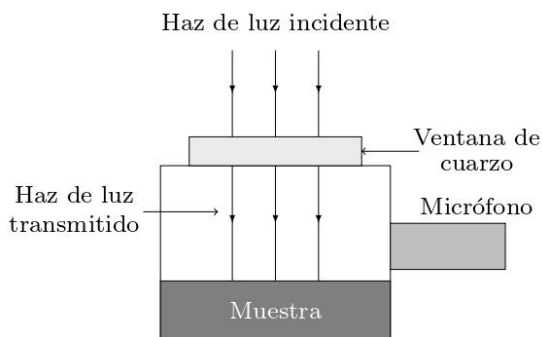


Figura 3.- Configuración de la celda fotoacústica para las muestras estudiadas en el presente artículo.

Para este trabajo, se analizaron muestras ópticamente opacas, para este tipo de muestras el montaje experimental se muestra en la Figura 3. En dicha figura, se coloca la muestra ópticamente opaca dentro de la celda. Esta se cierra herméticamente con una ventana de cuarzo y se sella con grasa de vacío. El haz de luz modulado atraviesa la ventana e incide

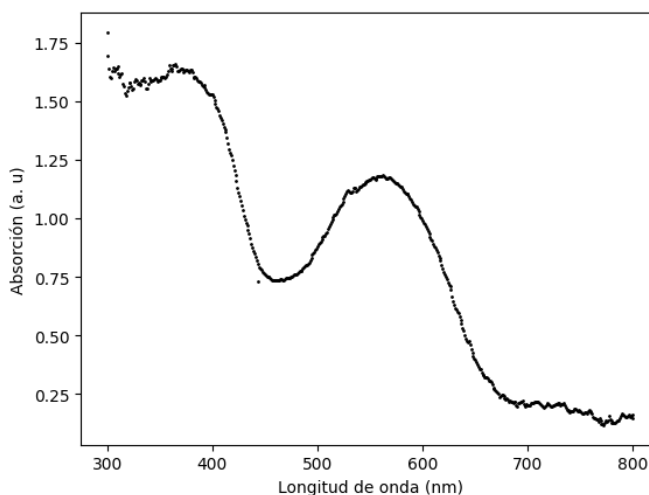


Figura 5.- Espectro de absorción óptico de la AC.

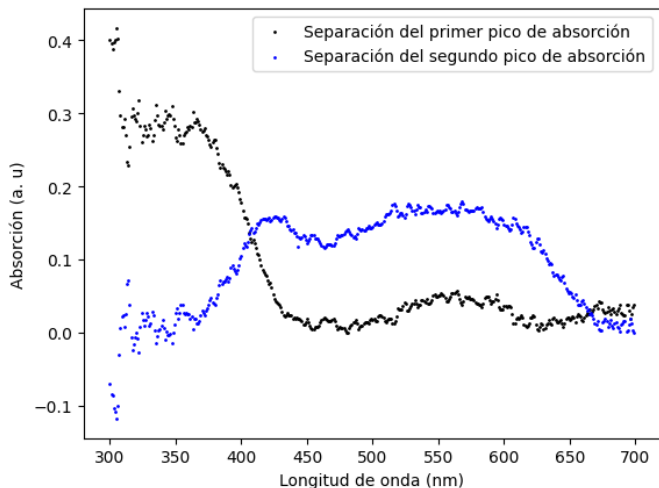


Figura 6.- Separación en la fase del espectro de absorción óptico de la AC.

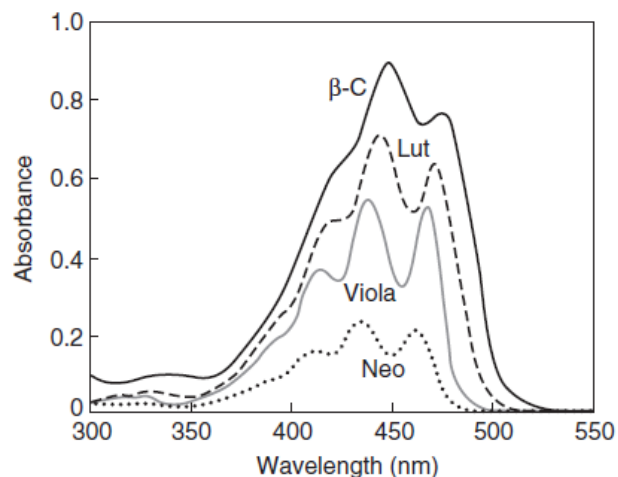


Figura 7.- Espectro de absorción de algunos tipos de carotenos [15].

El espectro de la separación del primer pico de absorción muestra una banda de absorción entre 300 y 400 nm, asociada a los flavonoles, que absorben en el rango de 352 a 385 nm [7]. Los flavonoles son los flavonoides predominantes en las escamas pigmentadas de las cebollas, siendo la quercetina la principal.

Por otro lado, el espectro de la separación del segundo pico de absorción revela dos bandas de absorción: la primera, entre 400 y 500 nm, corresponde a los carotenoides presentes en la cebolla, que absorben en este rango, como se observa en la Figura 7. La segunda banda, entre 500 y 600 nm, está asociada a las antocianinas, una de las seis subclases de flavonoides [14], las cuales absorben entre 500 y 550 nm [7]. Las antocianinas son pigmentos disueltos en la savia vacuolar de los tejidos epidérmicos de flores y frutos, a los que aportan colores rosados, rojos, azules o púrpuras [14].

Sin embargo, en la Figura 4 se observa que la superficie morada de la cebolla presenta anisotropía. Por ello, se optó por

obtener el espectro de absorción de la misma cara, pero ahora realizando una rotación extrema de 90°, con el fin de determinar si existía alguna orientación preferencial.

En la Figura 8 se presenta el espectro de absorción a dos ángulos de polarización de la superficie morada de la (AC) en la posición inicial y en la posición rotada. En la figura 8, se puede observar que los espectros de absorción de los dos ángulos de polarización analizados rotados se encuentra por encima de los de la posición inicial. Para cuantificar la relación entre los espectros de absorción, se calculó la razón entre los picos ubicados en 561 nm para el espectro de absorción suavizado. Se obtuvo que el valor de la absorción a 60° entre la absorción a 0° en las posiciones inicial y rotada fueron 0.824 y 0.942 respectivamente. Con base en los valores obtenidos de las razones entre picos y de la figura 8, se puede observar claramente que la cebolla tiene una absorción anisotrópica.

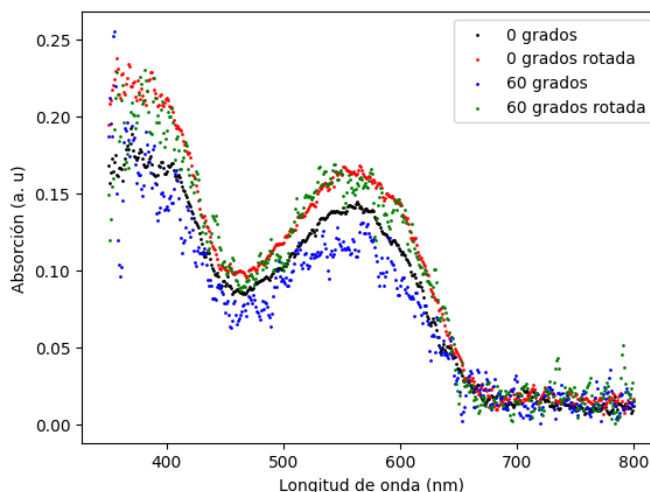


Figura 8.- Espectro de absorción óptico de la AC.

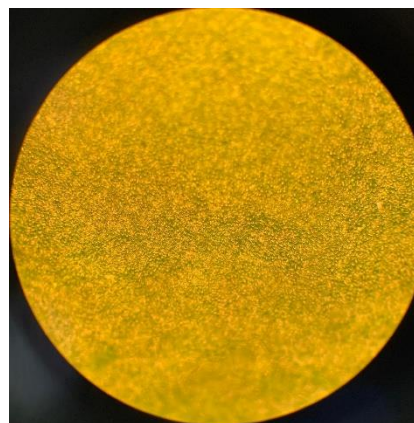


Figura 9.- Superficie de de la muestra SO.

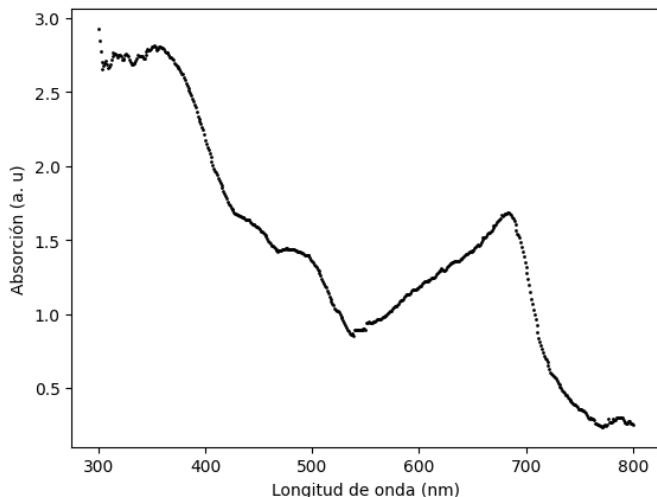


Figura 10.- Espectro de absorción óptico de la SO.

B. *Espinaca (Spinacia oleracea L.)*

Las muestras analizadas de *Spinacia oleracea L.* (SO) en este estudio fueron adquiridas de un mercado local de la Ciudad de México. En la Figura 9, se presenta una imagen de la superficie de una de las muestras obtenida mediante el microscopio óptico.

La muestra de la (SO) es ópticamente opaca y, se colocó un fragmento en la celda fotoacústica, tal como se ilustra en la Figura 3. Primero, se obtuvo el espectro de absorción, el cual es mostrado en la Figura 10. En este espectro se observa la presencia de varios picos y hombros de absorción en diferentes longitudes de onda. Para identificar dichos picos y hombros, se realizó una separación en la fase según el procedimiento descrito en la sección II, cuyos resultados se presentan en la Figura 11.

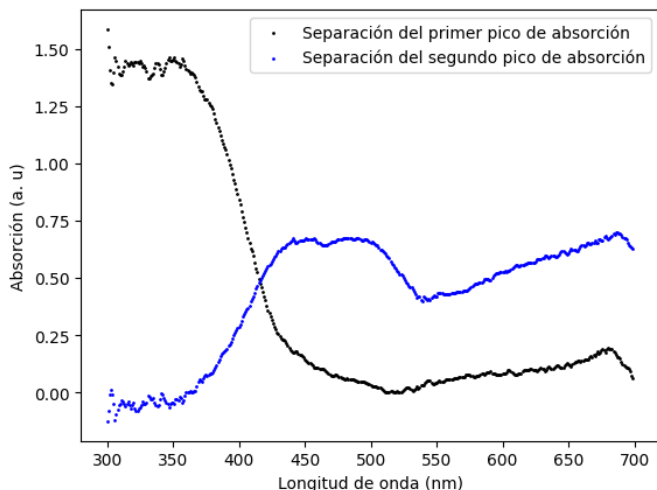


Figura 11.- Separación en la fase del espectro de absorción óptico de la SO.

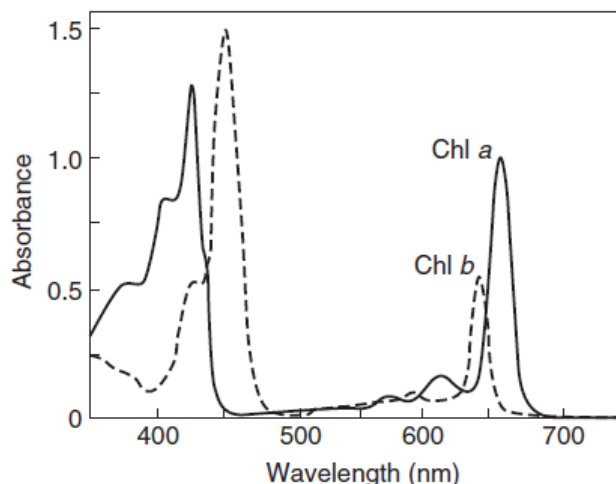


Figura 12.- Espectro de absorción de las clorofilas a y b [15].

En la separación del segundo pico de absorción del espectro, se observó que los hombros entre 400 y 500 nm se transforman en dos picos de absorción en esa misma región. Estos picos corresponden a pigmentos como las clorofilas a y b, y carotenoides como β -caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina, todos presentes en la espinaca, y cuyas absorciones en ese rango de longitudes de onda se muestran en las Figuras 7 y 12. Además, el pico a 683 nm está relacionado con la absorción de la chl a en la región de 600 a 700 nm.

Por otro lado, la separación del primer pico de absorción del espectro revela una banda de absorción entre 300 y 400 nm, asociada a flavonoides como la quercetina, la miricetina y la espinacina [16], así como a ácidos fenólicos como el ferúlico y el caféico, presentes en la espinaca [17]. Los flavonoides absorben entre 304 y 385 nm, mientras que los ácidos fenólicos los hacen entre 200 y 375 nm, como se muestra en la Figura 13.

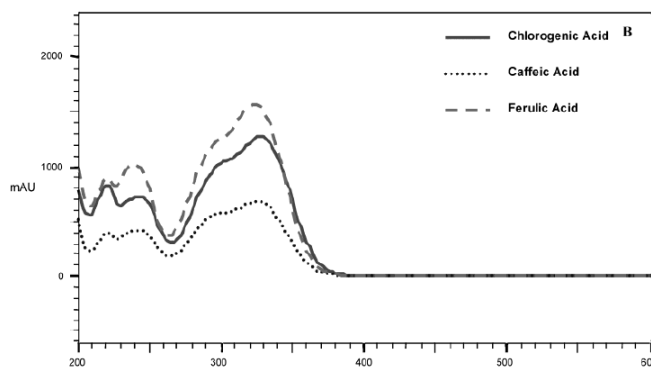


Figura 13.- Espectro de absorción de algunos tipos de ácidos fenólicos [18].

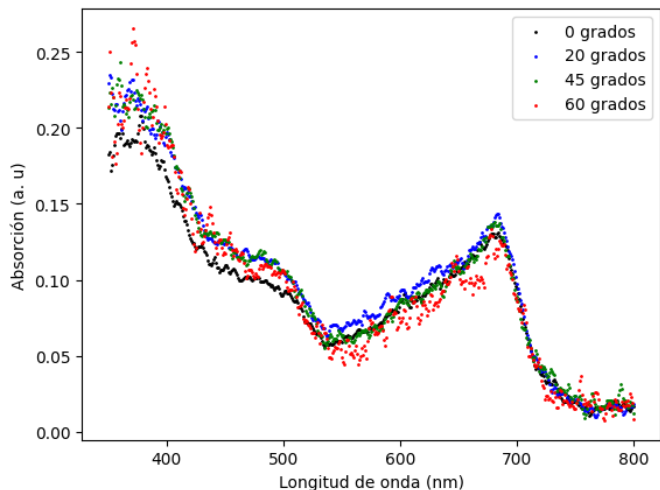


Figura 14.- Espectro de absorción de los ácidos fenólicos.

Utilizando la configuración mostrada en la Figura 2, se obtuvo el espectro de absorción óptica de la (SO) para distintos ángulos de polarización. De la figura 14, se puede observar los espectros a 20° y 45° se encuentran ligeramente por arriba del espectro a cero grados hasta antes de llegar al pico de absorción a 683 nm. Sin embargo, para el ángulo de 60° no se repite el mismo patrón. Lo anterior sugiere que, en el caso de la espinaca, podría existir un ángulo de polarización óptimo entre 20° y 45° . Sin embargo, de la imagen 9 no parece presentar anisotropía, por lo cual sugiere que un mayor estudio es requerido.

V. CONCLUSIONES

Esta investigación analizó el impacto de la luz polarizada en la absorción de pigmentos en muestras biológicas mediante espectroscopía fotoacústica, identificando en algunas muestras variaciones espectrales a distintos ángulos de polarización.

El método de separación en fase permitió identificar, con base en la literatura, los pigmentos presentes en cada muestra. Se observó que la orientación de la muestra afecta el espectro de absorción, como fue en el caso de la cebolla. Para cuantificar estas diferencias, se calculó la razón entre picos a una longitud de onda específica. Los espectros obtenidos revelan que la luz polarizada influye de manera diferente, dependiendo del ángulo de polarización, la composición pigmentaria y la estructura geométrica de la muestra analizada.

Uno de los desafíos más relevantes para un futuro trabajo será controlar con exactitud la orientación de las muestras para reducir la variabilidad en los datos. Asimismo, en el caso de la cebolla, su coloración cambia tras varias horas de exposición a la luz, lo cual puede afectar resultados, debido a la fotodegradación de la muestra. Para estudios futuros también, se recomienda considerar con mayor detalle la estructura y composición de las muestras.

En conclusión, esta investigación demuestra que la luz polarizada es una herramienta poderosa para explorar la interacción entre luz y materia en sistemas anisotrópicos,

abriendo nuevas oportunidades para su aplicación en el estudio de muestras biológicas e inorgánicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Física del CINVESTAV y al SECIHTI por el apoyo brindado.

DECLARACIÓN ÉTICA

Los autores no tienen conflictos de intereses que declarar que sean relevantes para el contenido de este artículo.

REFERENCIAS

- [1] Thomas W Cronin et al. "Polarization vision and its role in biological signaling". En: *Integrative and Comparative Biology* 43.4 (2003), págs. 549-558.
- [2] Pavel P Shibayev y Robert G Pergolizzi. "The effect of circularly polarized light on the growth of plants". En: *Int J Bot* 7 (2011), págs. 113-117.
- [3] Claude Houssier y Kenneth Sauer. "Circular dichroism and magnetic circular dichroism of the chlorophyll and protochlorophyll pigments". En: *Journal of the American Chemical Society* 92.4 (1970), págs. 779-791.
- [4] Elisabeth Gruber et al. "Intrinsic Photophysics of Light-harvesting Charge-tagged Chlorophyll a and b Pigments". En: *Chemistry—A European Journal* 25.39 (2019), págs. 9153-9158.
- [5] Ce Yao, Shan Lu y Zhongqiu Sun. "Estimation of leaf chlorophyll content with polarization measurements: Degree of linear polarization". En: *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 242 (2020), pág. 106787.
- [6] Elisabeth Gantt y Francis X Cunningham Jr. "Algal pigments". En: *e LS* (2001).
- [7] Jeffrey B Harborne, Helga Marby y TJ Marby. *The flavonoids*. Springer, 2013.
- [8] Munawar Abbas et al. "Natural polyphenols: An overview". En: *International Journal of Food Properties* 20.8 (2017), págs. 1689-1699.
- [9] D Fraćkowiak y B Smyk. "Interactions between photosynthetic pigments in organisms and in model systems". En: *Photosynthetica* 45 (2007), págs. 1-8.
- [10] Roberto Carlos García Gómez. "Espectroscopia Fotoacústica: Una teoría antigua con nuevas aplicaciones". En: *Conciencia Tecnológica* 24 (2004), pág. 2.
- [11] Lilia Ivonne Olvera Cano. "Relación entre glucemia y hemoglobina libre en diabetes tipo 1 experimental". Escuela Superior de Física y Matemáticas del Instituto Politécnico Nacional, de 2018.
- [12] A Garcia-Quiroz et al. "Photoacoustic spectroscopy of layered samples: Phase-detection technique". En: *Instrumentation science & technology* 26.2-3 (1998), págs. 227-239.
- [13] Antonio Manoel Mansanares. "Caracterização Fotoacústica de Materiais: Difusividade Térmica e Perfil de Profundidade". Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Março de 1991.
- [14] Claudine Manach et al. "Polyphenols: food sources and bioavailability". En: *The American journal of clinical nutrition* 79.5 (2004), págs. 727-747.
- [15] Claus Buschmann Harmut K. Lichtenthaler. "Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy". En: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (2001)
- [16] Breetha Ramaiyan et al. "Spinach (*Spinacia oleracea* L.)" En: *Antioxidants in vegetables and nuts-Properties and health benefits* (2020), págs. 159-173.

- [17] M Antonia Murcia et al. "Spinach". En: Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables. Elsevier, 2020, págs. 181-195.
- [18] Rebecca J Robbins. "Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology". En: *Journal of agricultural and food chemistry* 51.10 (2003), págs. 2866-2887.