

Técnica Espectrofotométrica para Eficientar la Producción de O₂ de Áreas Verdes Urbanas

MONTIEL RUBIES GALA, SERRANO RODRÍGUEZ ROGELIO DE JESÚS

Resumen— Las áreas verdes de las ciudades son las principales fuentes fijadoras de carbono, contrario a ello, la colocación de las especies que forman dichas áreas verdes siguen directrices estéticas y económicas, sin tomar en cuenta la eficiencia de fijación de carbono y producción de oxígeno de cada especie. El presente trabajo pretende cuantificar la producción de oxígeno y la retención de dióxido de carbono mediante la reducción del DCPIP (diclorofenolindofenol) en condiciones iguales para las diferentes especies utilizadas en camellones, parques y muros verticales, identificando a las especies fotosintéticamente más eficientes, para poder utilizarlas en el mejoramiento de los servicios ambientales de las áreas verdes de las ciudades. Se utilizó la reacción de Hill como técnica espectrofotométrica para la cuantificación de oxígeno producido en la primera fase de la fotosíntesis llamado también fotosistema I. El indicador DCPIP se utilizó como receptor de electrones durante el transporte, mostrando que al tener una coloración azul se encuentra en su estado oxidado, por lo que fue posible utilizar un espectrofotómetro UV-Vis para la cuantificación en su estado reducido, mostrándose incoloro. Se evaluó la eficiencia fotosintética de las especies: *Agrostis stolonifera*, *Buxus microphylla*, *Pitosporum tobira*, *Ficus benjamina*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Jacaranda mimosifolia*, *Liquidambar formosana* y *Phyllostachys aurea*, especies usadas tradicionalmente en parques urbanos de la Ciudad de México. Los resultados preliminares demuestran la especie *Ficus benjamina* presentó un mejor desempeño respecto a las demás. Se propone realizar un mayor número de pruebas a las diferentes especies utilizadas en áreas verdes en la Ciudad de México, para poder emitir recomendaciones eficientes y efectivas en la colocación de especies en áreas verdes de la Ciudad para lograr una mayor fijación de carbono en dichas áreas.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la Zona Metropolitana del Valle de México ha estado inmersa en una problemática atmosférica ambiental que afecta a salud de la población y del medio ambiente, dicha problemática es causada por los altos niveles de gases de efecto invernadero, generados en gran medida por la emisión de dióxido de carbono de los 9.47 millones de vehículos motorizados [1], así como por la falta de áreas verdes para hacer frente a la contaminación ambiental [2].

El diseño e implementación de áreas verdes urbanas (parques, camellones, jardines y muros verticales/verdes) cuentan con

GALA MONTIEL RUBIES, ROGELIO J. SERRANO RODRÍGUEZ pertenecen a la carrera LICENCIATURA EN INGENIERÍA AMBIENTAL de la Facultad de Ciencias Químicas y realizaron el proyecto dentro del curso de Química Analítica II y el Verano de Investigación 2016 (gala.montiel@lasallistas.org.mx).

El proyecto fue asesorado por JUAN RODRIGO SALAZAR. Los autores agradecen a la dirección administrativa y de laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas.

una directriz paisajística y económica, tomando en cuenta factores como su belleza, el precio, su disponibilidad y resistencia de las especies a elegir [3], dejando de lado el factor estequiométrico en relación a la producción de oxígeno producido por cada especie.

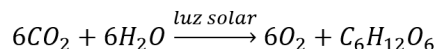
Es por eso que el presente trabajo muestra un análisis inicial de diferentes especies vegetales utilizadas comúnmente en parques urbanos, buscando la planta con una mayor producción de oxígeno, mediante la reducción del DCPIP, para que, al aumentar su uso en proyectos, estos puedan tener un mayor impacto en la mitigación de la contaminación atmosférica.

II. CONCEPTOS BÁSICOS

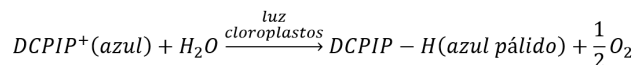
Área verde urbana. Áreas de valor ambiental que se localizan en suelo urbano, en las que predominan especies de flora arbórea y/o arbustiva, así como especies introducidas para mejorar su valor ambiental, estético, científico, educativo, recreativo, histórico o turístico, y que contribuyen a mantener la calidad del ambiente de la Ciudad de México. [2]

Cloroplasto. Organelo de células vegetales el cual almacena el pigmento fotosintético llamado clorofila, indispensable para la fotosíntesis. [4]

Fotosíntesis. Proceso natural del reino vegetal de eucariotas y algunas bacterias procariontas capaz de capturar una fracción de luz solar para almacenarla como energía química en moléculas complejas llamada carbohidratos, generando como subproducto el oxígeno. [4]. Se representa mediante la ecuación:



Reacción de Hill. Reacción utilizada para demostrar y caracterizar la relación del transporte de electrones en la reacción lumínica de la fotosíntesis (fotosistema I). En la naturaleza el captador principal de electrones es el NADP, sin embargo, al aislar los cloroplastos por medio del fraccionamiento celular in vitro es posible sustituirlo con un compuesto llamado DCPIP (2,6 diclorofenolindofenol). [5]. Se representa mediante la ecuación:



Dióxido de carbono. Gas de efecto invernadero producido por la combustión de hidrocarburos, responsable en gran medida del incremento de la temperatura en el mundo. [2]

Fraccionamiento Celular. Procedimiento utilizado para investigar la bioquímica y fisiología de organelos fuera del ambiente complejo de la célula intacta [5]

Fotosistema I. Sistema conjunto de proteínas, llamado complejo, del cual la molécula activa es la clorofila a, con un pico de absorción de 700 nm. Es el encargado del transporte de electrones en el NADP-NADPH [6]

III. METODOLOGÍA PROPUESTA

a. Extracción de Cloroplastos

Se preparó un tampón de extracción basado en Leiva, M. et al. (2010) utilizando sorbitol 330mM, KCl 0.4 mM, HEPES 2 mM y CaCl₂ 0.5 Mm, ajustando el pH hasta 5.6 utilizando una solución 0.1 M de NaOH y HCl concentrado. [7]. Para la extracción propia se basó en las Prácticas de Fisiología Vegetal de la Universidad del Jaen. [8]

1. Pesar 18 gramos de hojas desnervadas y lavadas.
2. Procesar en una máquina de pulsos por tres segundos utilizando 30 ml del tampón de extracción.
3. Filtrar el líquido obtenido a través de una manta de cielo y una bola de algodón.
4. Verter el líquido en tubos de centrifuga Eppendorf (entre 10-14 tubos utilizando 1000 μ L).
5. Verificar un mismo peso para todos ellos.
6. Programar la centrifuga a 1000 RPM a una temperatura de 4°C durante 10 minutos.
7. Desechar el sobrenadante y resuspender en 400 μ L del tampón de extracción frío.
8. Verificar un mismo peso para todos ellos.
9. Programar la centrifuga a 2400 RPM a una temperatura de 4°C durante 10 minutos.
10. Resuspender el pellet obtenido en todos los tubos de centrifuga utilizando un pincel, juntar en un tubo Falcon, el cual debe cubrirse completamente con papel aluminio y enfriarse hasta su utilización.

b. Cuantificación de Clorofila

Según “Methods in Enzymology” utilizando el procedimiento descrito por los autores Harold H. Strain, Benjamin T. Cope y Walter A. Svec, fue posible cuantificar la clorofila de tipo A para el análisis fotosintético, donde tras obtener los cloroplastos se prosiguió a determinar las cantidades de clorofila presentes. [9]

Se utilizó acetona y se utilizó un espectrofotómetro Epoch Biotech ajustado a las longitudes de 665 nm y 649 nm con una celda ELISA marca Costar 3696 de fondo plano. Se midieron 10 μ L de la suspensión de cloroplastos y 90 μ L de la acetona

La cuantificación de clorofila se describe en las siguientes ecuaciones:

$$Cl_A \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = 11.63(A_{665}) - 2.39(A_{649})$$

$$Cl_B \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = 20.11(A_{649}) - 5.18(A_{665})$$

$$Cl_{TOTAL} \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = 6.45(A_{665}) + 17.72(A_{649})$$

c. Cuantificación de clorofila en las muestras analizadas

Para la medición sistemática de ocho muestras diferentes de la reacción de Hill se utilizó un espectrofotómetro Epoch Biotech ajustado a una longitud de onda de 620 nm con una celda ELISA marca Costar 3696 de fondo plano y con una capacidad de 96 pozos. Fue preciso utilizar una placa Biomachin modelo 1202 a 160 RPM para homogenizar las soluciones. Se utilizó un foco de 25 W colocado a una distancia constante de 8.5 cm de los pozos. Se tomó el tiempo con un cronómetro digital, dejando transcurrir un minuto de irradiación a través de un frasco Coring de 500 ml con una solución al 1% de CuSO₄, para posteriormente someter la placa a lectura, completando un total de 10 minutos de irradiación. Para la proporción de las soluciones utilizadas en la celda ELISA se basó en el trabajo de Leiva, M. et al. (2010) [7], donde se ajustaron las medidas para el modelo de placa a utilizar, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Volumen de contenido dentro de cada pozo para la Reacción de Hill

Contenido	Cantidad utilizada (μ L)
Tampón extracción	23.16
Solución Cloroplastos	114.25
DCPIP	12.6
Total	150

Se realizó una curva de calibración del indicador DCPIP, preparando una solución 1 mM de DCPIP la cual fue diluida siete veces en matraces aforados de 10 ml, tomando alícuotas de 5 ml de la ya preparada, hasta obtener una concentración de 0.0078 mM. Se colocó un blanco por cada muestra, colocando agua en lugar de la solución de DCPIP. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

En la Figura 1 y 2 se muestran los acomodados realizados en la celda ELISA marca Costar 3696 de fondo plano, para las diferentes medidas realizadas en torno a las especies mencionadas.

Blanco	1	2	3	4	5	6	8	9	10	<i>α Agrostis stolonifera</i> <i>β Buxus elegantissima</i> <i>γ Buxus sempervirens</i> <i>δ Phyllostachys aurea</i> <i>ε Ficus benjamina</i> <i>φ Fraxinus pennsylvanica</i> <i>ο Jacaranda mimosifolia</i> <i>κ Liquidambar formosana</i>
	A	α	β	γ	δ	ε	φ	ο	κ	
B	α	β	γ	δ	ε	φ	ο	κ		
C	α	β	γ	δ	ε	φ	ο	κ		
D	α	β	γ	δ	ε	φ	ο	κ		
E	α	β	γ	δ	ε	φ	ο	κ		
F	α	β	γ	δ	ε	φ	ο	κ		
G	α	β	γ	δ	ε	φ	ο	κ		
H	1	0.50	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	0.008		
Curva de Calibración DCPIP										

Figura 1. Acomodo realizado en la celda ELISA marca Costar 3696 de fondo plano, para medir la absorbancia del colorante DCPIP, y determinar la producción de oxígeno.

Muestra	1	2	3	4	<i>α Agrostis stolonifera</i> <i>β Buxus elegantissima</i> <i>γ Buxus sempervirens</i> <i>δ Phyllostachys aurea</i> <i>ε Ficus benjamina</i> <i>φ Fraxinus pennsylvanica</i> <i>ο Jacaranda mimosifolia</i> <i>κ Liquidambar formosana</i>
	A	α	α	α	
B	β	β	β		
C	γ	γ	γ		
D	δ	δ	δ		
E	ε	ε	ε		
F	φ	φ	φ		
G	ο	ο	ο		
H	κ	κ	κ		

Figura 2. Acomodo realizado en la celda ELISA marca Costar 3696 de fondo plano, para medir la absorbancia de la clorofila A y B, y así determinar su concentración.

IV. RESULTADOS PRELIMINARES

Debido al alcance y magnitud del proyecto, se muestran los resultados preliminares, respecto a la amplia gama de familias que se pueden analizar. Siendo ello las especies *Agrostis stolonifera*, *Buxus microphylla*, *Pitosporum tobira*, *Ficus benjamina*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Jacaranda mimosifolia*, *Liquidambar formosana* y *Phyllostachys aurea*

a. Cuantificación de Clorofila

La determinación de clorofila se representa en la Tabla 2, indicando los diferentes niveles de clorofila.

Tabla 2. Cuantificación de Clorofila

Especie	Clorofila A (µg/ml)	Clorofila B (µg/ml)	Clorofila Total (µg/ml)
<i>Agrostis stolonifera.</i>	0.1655	2.6964	2.8619
<i>Baxus microphylla</i>	0.4052	7.9336	8.3388
<i>Pittosporum tobira</i>	0.0969	0.7461	0.8430
<i>Ficus benjamina</i>	0.2859	0.4060	0.6918
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	0.4957	0.6172	1.1129
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	0.8119	0.9843	1.7962
<i>Liquidambar formosana</i>	0.1137	1.9441	2.0578
<i>Phyllostachys aurea</i>	0.2582	4.4197	4.6779

b. Reacción de Hill

Como el fotosistema I es el más importante en la Reacción de Hill; pues es el encargado en el transporte de electrones en la fotosíntesis, se toma en cuenta la clorofila A, misma razón por la que se decide irradiar a través de una solución de CuSO₄, la clorofila es una molécula que refleja ondas de contenido energético intermedio (verde) por lo tanto absorbe ondas largas y cortas (azul-violeta), por lo tanto se hace más eficiente la absorción lumínica para el funcionamiento del fotosistema I.

Tabla 3. Síntesis de la determinación de reducción de DCPIP

Especie	DCPIP Inicial (mMol)	DCPIP Final (mMol)	Δ DCPIP (mMol)	Reducción de DCPIP por µg de clorofila
<i>Agrostis stolonifera.</i>	0.084	0.01370	0.07030	0.42500
<i>Baxus microphylla</i>	0.084	0.04750	0.03650	0.09000
<i>Pittosporum tobira</i>	0.084	0.04328	0.04072	0.42005
<i>Ficus benjamina</i>	0.084	0.03930	0.04470	0.15638
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	0.084	0.04903	0.03497	0.07055
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	0.084	0.03568	0.04832	0.05951
<i>Liquidambar formosana</i>	0.084	0.00890	0.07510	0.66030
<i>Phyllostachys aurea</i>	0.084	0.00580	0.07820	0.30290

Tabla 4. Síntesis de la determinación de producción de oxígeno de cada especie:

Especie	Clasificación	Captura de CO ₂ en bruto(g)	Producción de O ₂ por µg de clorofila (ajustada)	
			mol de O ₂	g de O ₂
<i>Ficus benjamina</i>	arbol perenifolio	0.03020	0.00069	0.01060
<i>Liquidambar formosana</i>	arbol caducifolio	0.01450	0.00033	0.01060
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	arbol caducifolio	0.01360	0.00031	0.00990
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	arbol caducifolio	0.01150	0.00026	0.00840
<i>Agrostis stolonifera.</i>	planta perenifolia	0.00940	0.00021	0.00680
<i>Pittosporum tobira</i>	arbusto perennifolio	0.00920	0.00021	0.00670
<i>Phyllostachys aurea</i>	planta perenifolia	0.00670	0.00015	0.00480
<i>Baxus microphylla</i>	arbusto perennifolio	0.00200	0.00005	0.00140

De acuerdo a las tablas 3 y 4 se muestra que la especie, que presenta una mayor reducción de DCPIP por µg de clorofila, así como una mayor producción de gramos y/o moles de O₂ por µg de clorofila es la especie *Ficus benjamina*.

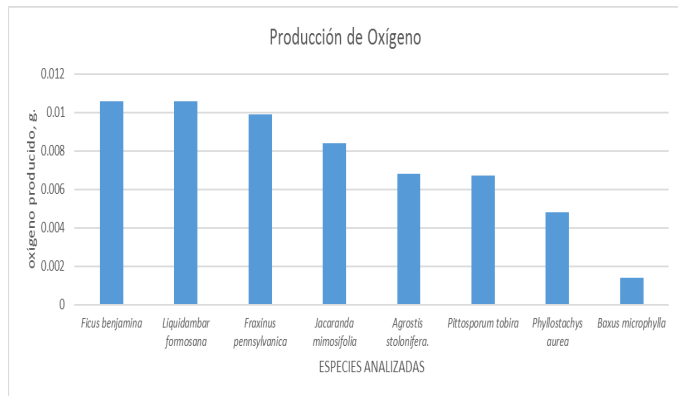


Figura 3. Comparación gráfica de los resultados obtenidos, en relación a la producción de oxígeno con la especie analizada

Para el análisis de resultados se consideró la desviación estándar como valor estadístico de medida de dispersión experimentalmente trascendente al realizar más de dos repeticiones, dichas desviaciones se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Desviación estándar de los resultados obtenido por especie.

Especie	Desviación Estándar (concentración mMol)
<i>Agrostis stolonifera</i>	0.0077
<i>Buxus microphylla</i>	0.0044
<i>Pittosporum tobira</i>	0.0021
<i>Ficus benjamina</i>	0.001
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	0.0036
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	0.0048
<i>Liquidambar formosana</i>	0.0022
<i>Phyllostachys aurea</i>	0.0034

I. DISCUSIÓN

Considerando que en promedio se tienen 500,000 cloroplastos por mm² de hoja [12] se realizaron los siguientes cálculos para mitigar las 3.9 toneladas de CO² producidas per cápita en México de acuerdo a las estadísticas del Banco Mundial en el 2011 [10]. Dichos cálculos son los propuestos por el proyecto al tener una cantidad conocida de dióxido de carbono que se desea mitigar, hablando de este como el dióxido de carbono en bruto que se podría llegar a mitigar. Debido a que se desconoce el peso del cloroplasto se obtuvo indirectamente siguiendo la propuesta de Wayne, R. en su libro [11] considerando una forma esférica, un diámetro de cinco micrómetros y la densidad del agua obteniendo un peso de 8.181 x 10⁻¹² g. Posteriormente se calculó la cantidad de cloroplastos obtenidos en las pruebas con cada especie utilizando la clorofila A como base. A partir de este dato se realizó una relación entre la cantidad obtenida y la cantidad

meta del gas invernadero producido. A continuación, se muestran los datos obtenidos de área para cada una de las especies propuestas. Es importante destacar que dichos cálculos son en base a una estimación teórica:

Tabla 6: Cuantificación de área verde de cada especie para la mitigación de la producción anual de dióxido de carbono en México, tomando en cuenta una fijación de dióxido de carbono en bruto.

Especie	clorofila A (g)	cloroplastos en la muestra	mm ² hoja equivalente	captura de CO ² (g)	m ² captura 3.9 toneladas de CO ²
<i>Agrostis stolonifera</i>	0.0019	231118951.4561	462.2379	0.0094	19177.9555
<i>Buxus microphylla</i>	0.0046	565857396.5561	1131.7148	0.0020	220684.3847
<i>Pittosporum tobira</i>	0.0011	135386385.7466	270.7728	0.0092	11478.4110
<i>Ficus benjamina</i>	0.0033	399195728.9655	798.3915	0.0302	10310.3533
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	0.0057	692272247.3432	1384.5445	0.0136	39703.8495
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	0.0093	1133814181.3094	2267.6284	0.0115	76902.1793
<i>Liquidambar formosana</i>	0.0013	158780814.3841	317.5616	0.0145	8541.3128
<i>Phyllostachys aurea</i>	0.0029	360573494.0542	721.1470	0.0067	41977.2127

Es necesario mencionar que el experimento se realizó a las mismas condiciones dentro de un laboratorio, condiciones que probablemente sean diferentes a las del entorno; sin embargo, dicho ensayo exsitu, puede no representar una varianza en los resultados mayor, pues, el organelo básico de la fotosíntesis, los cloroplastos, mostraron una buena respuesta a lo largo del experimento. Por lo que, si se considera que las especies evaluadas tienen el comportamiento similar en la naturaleza, los presentes estudios son equivalentes a los que se llevan insitu, por las diferentes especies. Lo explicado anteriormente se puede comprobar y/o justificar con [13] Pérez Soto, 2007, que concluye: “La fijación de carbono por la especie *Ficus benjamina*, es la más eficiente dentro de la mayoría de especies de árboles que se encuentran en ciudades, fijando altas concentraciones de carbono a altas concentraciones de carbono en la atmósfera”, dando validez al método para justificar la fijación bruta de carbono en especies de áreas verdes urbanas.

Los resultados preliminares demuestran que las especies evaluadas *Buxus mycrophylla*, *Pittosporum tobira*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Ficus benjamina*, *Jacaranda mimosifolia*, *Liquidambar formosana* y *Phyllostachys aurea*, de carácter perenne (que viven más de dos años) y *Agrostis stolonifera* (planta no perennes) no presentan un rendimiento similar entre sí, significando que la caracterización en función del tiempo de vida, no se relaciona con la producción de oxígeno de cada especie.

Por otra parte, dichas especies no son especies nativas del Valle de México, siendo el desempeño fotosintético variado, indicando la posibilidad de adaptación de la especie ante diferentes climas y altitudes. Los resultados obtenidos sugieren un nuevo parámetro para la planificación en las ciudades. Una base de datos conteniendo características como: producción de oxígeno por metro cuadrado de plantas, tipo de clima preferente y espacio requerido. Dicho compendio podría eficientar los espacios destinados a los servicios ambientales que proporcionan las áreas verdes urbanas.

Es necesario seguir con la obtención de dichos datos hasta tener una cantidad significativa de especies intentando introducir especies endémicas prioritariamente ya que estos sugieren a primera instancia una mejor adaptación. Así mismo es necesario realizar una prueba en laboratorio, en la que se compruebe que la cadena de transporte electrónico fotosintética y la de fotofosforilación oxidativa, se encuentren en un óptimo estado, comprobando la integridad de los cloroplastos [14].

Las aplicaciones de esta propuesta innovadora serían el poder ahorrar los impuestos destinados al convenio firmado en la COP21 de París, al tener una exacta producción de oxígeno, así como la cuantificación de CO₂ fijado en bruto por un tipo de planta en específico, o bien podría significar una característica determinante en la venta de muros verdes de empresas particulares. Incluso podría sentar las bases para un nuevo rubro de las normas mexicanas al cambiar el tipo de uso de suelo, y dictaminando las directrices ambientales en la colocación de nuevas áreas verdes urbanas. Es decir, podría hablarse de un parámetro legal capaz de impedir proyectos al significar cantidades reducidas o nulas de producción de oxígeno en un cierto espacio.

I. CONCLUSIONES

Ficus benjamina presenta ser la especie con una mayor reducción de DCPIP, una mayor generación de O₂ y la mayor fijación de CO₂ en bruto. *Liquidambar formosana* presenta la menor área para la mitigación del dióxido de carbono producida per cápita al año en México, esto se debe a una mayor cantidad obtenida de la clorofila A.

La mejora de las áreas verdes, así como la instalación de jardines verticales puede ser de gran ayuda para mitigar el efecto contaminante del dióxido de carbono, un gas de efecto invernadero, en la Ciudad de México. Sin embargo, es necesario proponer al gobierno de la ciudad y las diferentes empresas y organizaciones que tomen en consideración la capacidad fotosintética de las especies que utilizan.

Es necesario seguir con el proyecto propuesto para poder relacionar el comportamiento fotosintético de cada especie en relación a las diferentes variables que puedan afectar su metabolismo y a su vez la producción de oxígeno, dicha propuesta representa la formulación íntegra de un inventario que permita suponer un nuevo parámetro para las normas ambientales del país, así como variables considerables en asuntos internacionales como la COP21.

Las líneas de investigación futuras pretenden la comparación extensiva de especies nativas o endémicas contra especies introducidas o no nativas, para así poder formular adecuadamente el inventario propuesto. Así mismo se plantea la identificación de las especies en función de su metabolismo, pudiendo indicar si existe algún metabolismo óptimo para las áreas verdes urbanas de la Ciudad de México.

REFERENCIAS

- [1] Banco de Información INEGI: Registro de Vehículos Motorizados en Circulación. [en línea] Edición 2014, Ciudad de México, 20 abril 2014, [citado abril 2016], Vehículos Motorizados en Circulación (Ciudad de México y Estado de México), Disponible en INEGI: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/economicas/vehiculos/>
- [2] Procuraduría Ambiental y del Ordenamiento de la Ciudad de México. PAOT. "Reporte sobre la problemática ambiental y urbana de la CDMX". Ekilibria, pp. 28-44, 2014.
- [3] D.R. Torres, "Planeación, espacios verdes y sustentabilidad en el Distrito Federal" Universidad Autónoma de México, pp. 152-161, 2005
- [4] G. Auderisk, B. Byers. "Conceptos de Bioquímica". Editorial Pearson Education, pp. 144-145, 2004
- [5] A.G. Funkhouser, E.D. Ballint. "Methods in Enzymology: The Hill Reaction: In Vitro and In Vivo Studies" Academic Press, pp 7-9, 1984.
- [6] J.K. Curtis et al. "Biología". Editorial Panamericana, pp 112-117, 2000.
- [7] M.A. Leiva, Y.M. Acosta, M.C. Sánchez. "Protocolo para el aislamiento de cloroplastos intactos de hojas de plantas de *Musa spp.* obtenidas por cultivo in vitro y evaluación de la actividad fotosintética." Biotecnología Vegetal. pp 49-52, 2010.
- [8] Prácticas de Fisiología Vegetal: Extracción de Cloroplastos y Medida de la Reacción de Hill en Cloroplastos Aislados. [PDF en línea]. Edición 2016, Jaén-España, febrero 2016 [citado mayo 2016] Metodología. Disponible en: <http://www4.ujaen.es/~amocana/F.V/Reaccion%20de%20Hill.pdf>
- [9] H.J. Strain, B.T. Coppe, W.A. Svec. "Methods in Enzymology: Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls". Academic Press, pp23:453-466, 1971
- [10] CO₂ emissions (metric tons per capita) [en línea] 2011, The World Bank, Disponible en: http://data.worldbank.org/indicator/EN.ATM.CO2E.PC?locations=MX&name_desc=true
- [11] Wayne, R., *Plant Cell Biology: from Astronomy to Zoology*, pp. 7-9, 2009, Academic Press
- [12] González, C. *Cloroplastos* [en línea] 2002, disponible en: <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/LaCelula/Cloroplastos.htm>
- [13] D.I. Pérez. "Evaluación de la Respuesta Fisiológica de FICUS (*Ficus benjamina*) al CO₂ atmosférico". Universidad de Guadalajara. Centro de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, pp 30-31. (2007)
- [14] L.P. Vincent. "Methods in Enzymology: Mitochondrial Function, Part A: Mitochondrial Electron Transport" Academic Press, pp 3-680, 1983