

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y CROMÁTICO COMO MÉTODO DE CLASIFICACIÓN  
TAXONÓMICA: ESTUDIO FÍSICOQUÍMICO DE LAS ESCLERITAS DE  
OCTOCORALES DEL GÉNERO *PACIFIGORGIA*

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en Química  
para optar al grado y título de Maestría Académica en Química

ARTURO JOSUÉ ÁLVAREZ VALVERDE

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

## DEDICATORIA

*A mi madre, a mi hermana, a Mama y Tata, a  
Vivi y a los chicos, por su apoyo y cariño  
a lo largo de todos estos años.*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco enormemente a la Dra. Mavis Montero, mi tutora, por haberme aceptado como su estudiante, por haber confiado en mí y por haberme dado las herramientas y las oportunidades para llevar a cabo este proyecto. Valoro su exigencia y su apoyo. No puedo dejar de lado nuestros almuerzos hablando de ciencia, de peceras y de la vida en general; hicimos un buen equipo.

Expreso mi gratitud a los asesores de mi tesis. A la Dra. Odalisca Breedy por su guía, enseñanzas y por haberme transmitido su pasión por los octocorales y al Dr. Roberto Urcuyo por sus ideas, sus perspectivas y por su ánimo constante por plasmar nuestra investigación en publicaciones de alta calidad.

De igual manera, agradezco a los otros investigadores que forman parte del proyecto de investigación: a la MSc. Paula Calderón por su colaboración con el entrenamiento, los permisos de uso de los microscopios en el CIEMic y el intercambio de herramientas de análisis de imágenes, a la Dra. Marcela Hernández por su apoyo en la investigación, el intercambio de conocimiento y sus ideas para el análisis de datos y, por último, al Dr. Eduardo Libby, por su ayuda con la captura de fotografías y su apoyo durante el proyecto.

Al Dr. Daniel Vielzeuf por haberme facilitado los contactos para realizar mis dos pasantías en Francia. A la Dra. Angèle Ricolleau por haberme recibido en el CINaM, por enseñarme excelentes técnicas de preparación de muestras y haber establecido un muy buen ambiente para la discusión. A Synchrotron SOLEIL por aceptarme como pasante y darme financiamiento e instalaciones para realizar mediciones con radiación de sincrotrón.

Así mismo, agradezco al Dr. Jonathan Perrin por haberme tomado en cuenta, por nuestras discusiones sobre la interfaz orgánico-inorgánica en los biominerales, por haberme apoyado a lo largo de la pasantía, por las oportunidades y los contactos que encontramos juntos. A los *beamlines* ANATOMIX y de DISCO, por recibirme y hacerme parte de sus equipos. Especialmente al Dr. Timm Wietkamp por sus consejos y su gran apoyo en todo momento, al Dr. Frédéric Jamme, por transmitirme su gran pasión por la óptica, la fluorescencia y el SHG, a la Dra. Alessia Melleli, por su escucha y enseñanzas, a nivel científico y personal y, finalmente, a Guillaume Daniel, por su compañía y gran amistad.

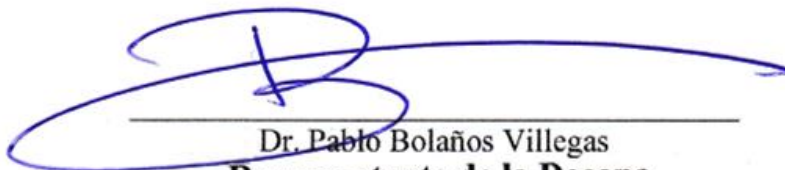
Al Programa de Posgrado en Química, especialmente a Jonathan Víquez por su excelente trabajo y asesoría en los incontables asuntos administrativos con los que se tuvo que correr muchas de las veces y, por supuesto, al Dr. Max Chavarría, por su acompañamiento y guía desde el inicio de la maestría y sus palabras de apoyo.

Agradezco al Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales (CICIMA) por facilitarme el uso de sus laboratorios y equipos durante la maestría. Al Dr. Esteban Avendaño por su apoyo como director y en el uso y capacitación de equipos. A la Dra. Pilar Madrigal, al Dr. Arturo Ramírez, al Dr. Fabian Vásquez que me capacitaron en el uso de distintas técnicas experimentales y también a Judith Rodríguez, Susanne Carranza y Jhonatan Alfaro, por su apoyo administrativo y técnico.

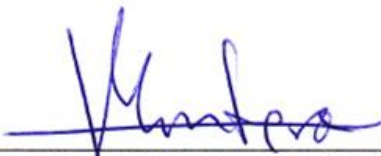
En el tema económico, agradezco al Servicio de Cooperación y de Acción Cultural de América Central de la Embajada de Francia y al Programa de apoyo a trabajos finales de graduación del Sistema de Estudios de Posgrado (SEP) por las becas recibidas para realizar mis pasantías de investigación. A la Vicerrectoría de Docencia y a la Rectoría de la Universidad de Costa Rica por la aprobación de las permisos y contratos para realizar las pasantías y a la Vicerrectoría de Investigación por el financiamiento del proyecto de investigación C2031, dentro del que se desarrolló la presente tesis.

Agradezco a mis amigos SebAbs y Fran por todas las risas, a Checho, a Chumi y a Pri por los buenos momentos, a mi novia Vivi, por ser mi fiel compañera y mi lugar seguro, a toda mi familia por su apoyo incondicional en lo afectivo, espiritual y económico, por entenderme y por haberme enseñado a ser como soy. Finalmente le doy las gracias a Dios, por haber puesto en mi vida a todas estas personas y por haberme dado la capacidad de aprovechar todas las oportunidades que se me fueron dadas.

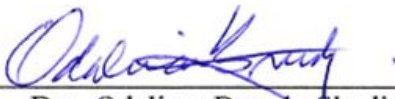
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Química de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Química.



Dr. Pablo Bolaños Villegas  
**Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado**



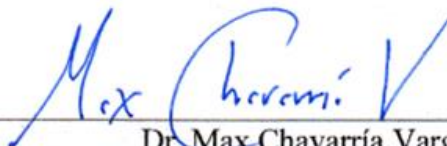
Dra. Mayis Lili Montero Villalobos  
**Directora de Tesis**



Dra. Odalisca Breedy Shadid  
**Asesora**



Dr. Roberto Urcuyo Solórzano  
**Asesor**



Dr. Max Chavarría Vargas  
**Director  
Programa de Posgrado en Química**



Arturo Josué Álvarez Valverde  
**Sustentante**

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
TABLA DE CONTENIDO .....	vi
RESUMEN EN ESPAÑOL .....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE TABLAS .....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxviii
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN .....	1
Antecedentes .....	4
Justificación .....	17
Objetivos .....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos .....	18
CAPÍTULO II METODOLOGÍA .....	19
Estrategia de investigación.....	19
Sección Experimental .....	21
Muestreo.....	21
Preparación de muestras.....	22
Análisis microscópicos .....	25
Análisis espectroscópicos .....	32
Difracción de rayos X en polvos.....	37

Fotografía digital (RGB).....	40
Técnicas de análisis con radiación de Sincrotrón .....	43
<b>CAPÍTULO III CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA.....</b>	<b>51</b>
Análisis estructural y cromático.....	51
Fotografía digital (RGB).....	51
Microtomografía computarizada de rayos X .....	56
Microscopía de luz visible .....	61
Microscopía electrónica de barrido.....	67
Análisis de composición .....	72
Difracción de rayos X en polvos.....	72
Espectroscopía IR .....	76
Microespectroscopía Raman .....	82
Microespectroscopía UV-Visible-NIR .....	89
Microespectroscopía de fluorescencia .....	93
Microscopía de fluorescencia.....	98
Microscopía óptica no lineal: SHG y 2PEF.....	102
Perspectivas finales .....	108
<b>CAPÍTULO IV ANÁLISIS TAXONÓMICO.....</b>	<b>112</b>
Técnicas de análisis cualitativo.....	112
Microscopía de luz visible .....	112
Microscopía de fluorescencia.....	114
Microscopía óptica no lineal: SHG y 2PEF.....	116
Técnicas de análisis cuantitativo evaluadas .....	116
Fotografía digital (RGB).....	116
Microespectroscopía Visible-NIR.....	126

Microespectroscopía de Fluorescencia .....	134
Microespectroscopía Raman .....	137
Microespectroscopía Infrarroja .....	143
Técnicas de análisis cuantitativo no evaluadas .....	145
Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	145
Difracción de rayos X en polvos .....	146
Microtomografía computarizada de rayos X .....	146
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	148
Conclusiones .....	148
Recomendaciones .....	153
BIBLIOGRAFÍA .....	155
ANEXOS .....	178
Anexos - Capítulo I .....	178
Anexo 1. 1 - Metodología de muestreo .....	178
Anexos - Capítulo IV .....	179
Anexo 4. 1 – Análisis estadísticos de la Fotografía Digital (RGB) .....	179
Anexo 4. 2 – Análisis estadísticos de microespectroscopía Visible-NIR .....	181
Anexo 4. 3 – Análisis estadísticos de la Microespectroscopía de Fluorescencia .....	183
Anexo 4. 4 – Análisis estadísticos de la Microespectroscopía Raman .....	186
Anexo 4. 5 – Análisis estadísticos de la Microespectroscopía Infrarroja .....	193

## RESUMEN EN ESPAÑOL

Este estudio investiga las características fisicoquímicas de las escleritas de octocorales del género *Pacifigorgia* con el objetivo de establecer una base para su clasificación taxonómica. Se utilizaron varias técnicas para caracterizar las escleritas e identificar los compuestos orgánicos en los pigmentos. Una combinación de difracción de rayos-X en polvos y espectroscopía infrarroja reveló que las escleritas de *Pacifigorgia* están compuestas de calcita magnésica y materia orgánica intracristalina, conformada por pigmentos, oligosacáridos y proteínas ácidas. El análisis estructural con microscopía electrónica de barrido (SEM) mostró escleritas mesocristalinas hechas de columnas de calcita submicrométricas formadas por gránulos cristalinos nanométricos.

La microscopía Raman indicó que los pigmentos que dan color a los octocorales son polienales parcialmente metilados, donde la longitud de cadena determina el color observado. El estudio sugirió que sutiles diferencias estructurales, la combinación de varios pigmentos muy similares entre sí y su concentración en la matriz mineral determinan los tonos específicos y la saturación de cada muestra. Los estudios de fluorescencia identificaron bandas de emisión específicas correspondientes a la autofluorescencia de proteínas, centros fluorescentes de calcita y pigmentos. El análisis cromático de fotografías digitales en el espacio de color RGB proporcionó datos cuantitativos y cualitativos sobre el color y la estructura de las escleritas.

Los métodos estadísticos multivariantes demostraron que los análisis de color en fotografías digitales podrían utilizarse para apoyar la diferenciación entre especies de *Pacifigorgia*. Además, los análisis de componentes principales mostraron que la microscopía visible-NIR también es efectiva para lograr esta tarea y se identificó como el segundo mejor método para distinguir entre especies. Aunque la microscopía de fluorescencia fue menos efectiva, muestra potencial como un potencial nuevo carácter taxonómico. La microscopía Raman e infrarroja fueron ineficaces para la diferenciación de especies, y el SEM y la difracción de rayos X en polvo no fueron adecuadas para la distinción de especies.

## ABSTRACT

This study investigates the physicochemical characteristics of octocoral sclerites from the genus *Pacifigorgia* with the objective to establish a basis for taxonomic classification. Various techniques were used to characterize the sclerites and identify the organic compounds in the pigments. A combination of powder X-ray diffraction and infrared spectroscopy revealed that *Pacifigorgia* sclerites are composed of magnesium calcite with intracrystalline organics, including pigments, oligosaccharides, and acidic proteins. Structural analysis with scanning electron microscopy (SEM) showed mesocrystalline sclerites made of sub-micrometric calcite columns formed by nanometric crystalline granules.

Raman microspectroscopy indicated that the pigments which give octocorals their coloration are partially methylated polyenals, with chain length affecting the color. The study suggested that subtle structural differences, the combination of similar pigments and their concentration in the mineral matrix determine the specific hues and saturation of each sample. Fluorescence studies identified specific emission bands corresponding to protein autofluorescence, calcite fluorescent centers, and pigments. The chromatic analysis of digital photographs using RGB color space provided quantitative and qualitative data on sclerite color and structure.

Multivariate statistical analysis of variance demonstrated that color analysis of digital photographs could be used to differentiate between species of *Pacifigorgia*. Additionally, a principal component analysis showed that visible-NIR microspectroscopy was also effective to accomplish this task and was identified as the second-best method to distinguish between species. Although fluorescence microspectroscopy was less effective, it shows potential as a new taxonomic characteristic. Raman and infrared microspectroscopy were ineffective for species differentiation, and SEM and powder X-ray diffraction were unsuitable for species distinction.

## LISTA DE CUADROS

### CAPÍTULO I

Este capítulo no posee cuadros.

### CAPÍTULO II

Este capítulo no posee cuadros.

### CAPÍTULO III

Cuadro 3. 1 Coordenadas RGB de intensidad promedio y moda calculadas a partir de los histogramas de color de las fotografías digitales de los octocorales del género *Pacifigorgia* junto al tono resultante de la combinación de cada canal (R+G+B). .....55

Cuadro 3. 2 Planos cristalográficos asociados a cada ángulo de difracción y respectiva distancia observados en los patrones de XRD de las escleritas del género *Pacifigorgia*. Para facilitar la presentación de los resultados, se muestra el promedio y la desviación estándar entre especies del ángulo  $2\theta$  y la distancia de cada plano cristalográfico. ....74

Cuadro 3. 3 Cálculo de los parámetros de celda a, c y  $V_c$  de las calcitas magnésicas de *Pacifigorgia* y del porcentaje de Magnesio estimado a partir de cada uno de ellos. Todos los resultados se reportan a un 95% de confianza. ....75

Cuadro 3. 4 Resumen de la posición de los picos 1, 2 y 3 de los espectros Raman de las escleritas del género *Pacifigorgia* y estimación del número de insaturaciones según la regresión de Schaffer (1991).<sup>136,137</sup> .....88

### CAPÍTULO IV

Cuadro 4. 1 Posición promedio de cada banda de emisión ( $\lambda$ ) junto a su desviación estándar ( $\sigma$ ) y el número (n) de veces que se identificó cada banda dentro de las muestras analizadas ( $n_T$ ) para cada especie estudiada del género *Pacifigorgia* por medio de microespectroscopía de fluorescencia. Si  $n \geq 0.5n_T$ , la banda se colorea para esa especie, de acuerdo con un color diferenciado según cada banda..... 135

## ANEXOS

Cuadro A. 1 Intensidad promedio y moda de los canales RGB calculados a partir de los histogramas de color de las fotografías digitales de cada muestra analizada. ....	179
Cuadro A. 2 Matrices SSCP por factor, por error y correlaciones parciales para la matriz SSCP por error calculadas a partir de la prueba MANOVA para las intensidades de los canales R, G, B y R+G+B en el análisis de color en las especies de <i>Pacifigorgia</i> .....	180
Cuadro A. 3 Resultados de la prueba Tukey para las diferencias entre pares de especies según cada variable dependiente utilizada (R, G, B y R+G+B).....	180
Cuadro A. 4 Resultados del cálculo de los <i>eigenvalues</i> , la varianza total y acumulada para cada componente principal calculado en el PCA realizado sobre los resultados de Microespectroscopía Visible-NIR. ....	182
Cuadro A. 5 Resultados del cálculo de los <i>eigenvalues</i> , la varianza total y acumulada para cada componente principal calculado en el PCA realizado sobre los resultados de Microespectroscopía de Fluorescencia. ....	183
Cuadro A. 6 Posición de las bandas 1, 2 y 3 obtenidas a partir de la deconvolución de los espectros de dispersión Raman de los pigmentos presentes en las escleritas de las especies de <i>Pacifigorgia</i> . ....	186
Cuadro A. 7 Matrices SSCP por factor, por error y correlaciones parciales para la matriz SSCP por error calculadas a partir de la prueba MANOVA para las intensidades de los canales R, G, B y R+G+B en el análisis de color en las especies de <i>Pacifigorgia</i> .....	189
Cuadro A. 8 Resultados de la prueba Tukey para las diferencias entre pares de especies según cada variable dependiente utilizada en Microespectroscopía Raman (Bandas 1, 2 y 3). ....	190
Cuadro A. 9 Resultados del cálculo de los <i>eigenvalues</i> , la varianza total y acumulada para cada componente principal calculado en el PCA realizado sobre los resultados de Microespectroscopía Raman.....	191

Cuadro A. 10 Resultados del cálculo de los <i>eigenvalues</i> , la varianza total y acumulada para cada componente principal calculado en el PCA realizado sobre los resultados de Microespectroscopía Infrarroja.....	194
--	-----

## LISTA DE TABLAS

### CAPÍTULO I

Este capítulo no posee tablas.

### CAPÍTULO II

Tabla 2. 1 Especímenes del género *Pacifigorgia* sometidos a los análisis fisicoquímicos.....21

### CAPÍTULO III

Tabla 3. 1 Asignación de los modos vibracionales correspondientes a cada señal encontrada en los espectros IR de las escleritas del género *Pacifigorgia*. La posición de las bandas se basa en el espectro de la *Figura 3. 25*. .....78

### CAPÍTULO IV

Tabla 4. 1 Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para el análisis de normalidad en las intensidades medias para cada canal del sistema RGB a un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ). ..... 118

Tabla 4. 2 Resultados de la prueba de Mardia para el análisis de normalidad multivariable de las variables dependientes del set de datos completo y por especie de la fotografía digital (RGB) a un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ). Colores verde, amarillo y rojo se asocian resultados positivos, no concluyentes y negativos, respectivamente..... 119

Tabla 4. 3 Resultados del análisis multivariable con las pruebas de Wilk's Lambda, Hotelling-Lawley's Trace y Roy's Largest Root con un nivel de confianza del 95% para el análisis cromático con fotografía digital (RGB)..... 122

Tabla 4. 4 Resultados de la prueba t de Student para la distinción de las medias de R, G, B y R+G+B en *P. rubinoffi*, en comparación a las demás especies al 95% de confianza. .... 125

## ANEXOS

Tabla A. 1 Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para el análisis de normalidad en las intensidades medias para cada canal del sistema RGB a un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ). .....188

Tabla A. 2 Resultados de la prueba de Mardia para el análisis de normalidad multivariable de las variables dependientes del set de datos completo y por especie de la Microespectroscopía Raman a un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ). Colores verde, amarillo y rojo se asocian resultados positivos, no concluyentes y negativos, respectivamente. ....188

Tabla A. 3 Resultados del análisis multivariable con las pruebas de Wilk's Lambda, Hotelling-Lawley's Trace y Roy's Largest Root con un nivel de confianza del 95% para el análisis de Microespectroscopía Raman. ....189

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. 1 a) Fotomicrografía de las escleritas de <i>P. firma</i> . b) Diagrama esquemático de la sección transversal de un octocoral. <sup>1</sup> .....	1
Figura 1. 2 Árbol filogenético del género <i>Pacifigorgia</i> , Bayer 1951 basado en caracteres morfológicos continuos.....	3
Figura 1. 3 Holotipo de <i>P. firma</i> conservado en seco y fotomicrografía de sus escleritas. <sup>16</sup> .....	5
Figura 1. 4 Holotipo de <i>P. rubicunda</i> preservado y fotomicrografía de sus escleritas. <sup>16</sup> .....	5
Figura 1. 5 Holotipo de <i>P. stenobrochis</i> conservado en seco y fotomicrografía de sus escleritas. <sup>16</sup> .....	6
Figura 1. 6 Holotipo de <i>P. cairnsi</i> preservado y fotomicrografía de sus escleritas. <sup>16</sup> .7	7
Figura 1. 7 Holotipo de <i>P. rubinoffi</i> preservado y fotomicrografía de sus escleritas. <sup>18</sup> .....	8
Figura 1. 8 Imágenes SEM de una esclerita de tipo mancuerna tuberculada. <sup>37</sup> .....	10
Figura 1. 9 Micrografías SEM de las escleritas del holotipo de <i>P. firma</i> (UCR 915). A) husos; B, C) cabrestantes; D) inmaduras; E) bastones antocodiales y F) cabrestante inmaduro. <sup>16</sup> .....	10
Figura 1. 10 Micrografías SEM de las escleritas del holotipo de <i>P. rubinoffi</i> (UCR 339). A) husos; B) cabrestantes; C) cruces, D) barriles; E) bastones antocodiales y F) inmaduras. <sup>18</sup> .....	11
Figura 1. 11 Micrografías SEM de las escleritas del holotipo de <i>P. rubicunda</i> (UCR 623). A, B) husos; C) cabrestantes; D) inmaduras y E) bastones antocodiales. <sup>16</sup> .....	11

Figura 1. 12 Micrograffías SEM de las escleritas del holotipo de *P. stenobrochis* (UCR 831). A, B) husos; C) cabrestantes; D) de seis radios; E) inmaduras y F) bastones antocodiales.<sup>16</sup> ..... 12

Figura 1. 13 Micrograffías SEM de las escleritas del holotipo de *P. cairnsi* (UCR 913). A, B, C) husos; D, E) formas intermedias; F) cabrestantes, G) bastones antocodiales, H) inmaduras e I) cabrestantes inmaduros.<sup>16</sup> ..... 12

Figura 1. 14 Polienales de cadena larga y carotenoides como la astaxantina identificados en octocorales mediante espectroscopía Raman.<sup>50</sup> ..... 15

## CAPÍTULO II

Figura 2. 1 Esquema de la extracción, lavado y secado de escleritas y ejes en octocorales. .... 22

Figura 2. 2 Proceso de preparación y lijado de los moldes para obtención de superficies con acabado de espejo. a) Fijación en moldes, b) vertido de resina al vacío, c) extracción del molde, d) fijación en soporte metálico, e) pulido grueso, y f) obtención de acabado de espejo. .... 23

Figura 2. 3 Proceso de corte de láminas delgadas. A) moldeado, b) obtención de un prisma c-d) corte de lámina delgada, y e) fijación en láminas de microscopio. .... 24

Figura 2. 4 Proceso de obtención de láminas pulidas en ambas caras. a) Fijación, b) moldeado, c) pulido y d) acabado de espejo. .... 25

Figura 2. 5 Comparación de la señal SHG producida por un solo dipolo, por dos dipolos paralelos y por dos dipolos antiparalelos.<sup>80</sup> ..... 30

Figura 2. 6 Comparación entre los diagramas de Jablonski de la fluorescencia causada por la excitación de a) un fotón, b) dos fotones y c) las señales de SHG.<sup>81</sup> ..... 30

Figura 2. 7 Configuración de un microscopio multifotónico SHG-2PEF con su fuente, controlador de poder, polarizador, sistema de escaneo, objetivos y detectores.<sup>80</sup> ..... 31

Figura 2. 8 Diagrama de Jablonski con las transiciones espectroscópicas correspondientes a las dispersiones elásticas e inelásticas para varios tipos de espectroscopia vibracional.<sup>86</sup> .....36

Figura 2. 9 Representación de los patrones de difracción de puntos generados por un monocristal de una sustancia arbitraria (a) y de los anillos generados por un polvo policristalino de dicha sustancia (b), a los que se superpone el patrón en a).<sup>87</sup> .....38

Figura 2. 10 Esquema de la geometría de la para focalización Bragg-Brentano y los componentes de un difractómetro de rayos X.<sup>89</sup> .....39

Figura 2. 11 Micrografía de los fotoreceptores de un detector CCD de una cámara digital.<sup>91</sup> .....40

Figura 2. 12 Ventana del programa ColorChecker Passport Camera Calibration para la generación del patrón de color. ....42

Figura 2. 13 a) Esquema general de la adquisición y procesamiento de una microtomografía para la obtención de imágenes en 3D. b) Ejemplo de un sinograma con una función de Intensidad-posición superpuesta.<sup>101</sup> .....49

Figura 2. 14 Preparación de muestras de coral para  $\mu$ -CT en pines sobre una placa de acrílico. ....49

### CAPÍTULO III

Figura 3. 1 Fotografía digital de cada espécimen estudiado del género *Pacifigorgia*, clasificados por código según su especie.....52

Figura 3. 2 Descomposición de la fotografía digital de cada espécimen en las coordenadas de color RGB. ....52

Figura 3. 3 a) Representación esquemática del espacio de color RGB, en dónde se muestran las caras externas (b) e internas (c) del cubo generado.<sup>106</sup> .....53

Figura 3. 4 Histograma general de color de cada especie del género *Pacifigorgia*. Para cada gráfico se presenta el histograma de cada canal por separado (R, G, B) y el de la suma

de los tres canales (RGB). Los recuadros “Prom.” y “Máx.”, se colorearon con la tonalidad de los valores de intensidad promedio y máximo obtenidos del histograma. El último gráfico presenta los histogramas RGB normalizados respecto al número de píxeles analizados. ....54

Figura 3. 5 Cortes de los planos XY (izquierda) y XZ (derecha) de una imagen virtual en 3D de una rama del espécimen C13CR (*P. stenobrochis*) obtenido a partir de una microtomografía computarizada de rayos X, con una resolución de 3  $\mu$ m. En a-b) se muestran la imagen en una escala de grises según la intensidad. En c-d) Se muestra la segmentación de las diferentes estructuras (ROI) identificadas en los cortes. Color según ROI: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo), eje (verde).....57

Figura 3. 6 Segmentación de una imagen virtual en 3D de una rama del espécimen C4CC (*P. firma*) obtenida a partir de una microtomografía computarizada de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, con escala volumétrica como referencia, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. Color según ROI: escleritas (magenta), tejidos del cáliz (azul), cenénquime (amarillo), eje (verde). .....58

Figura 3. 7 Segmentación de una imagen virtual en 3D de una rama del espécimen C8NI (*P. rubinoffi*) obtenida a partir de una  $\mu$ CT de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. ROIs: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo) y eje (verde). .....59

Figura 3. 8 Segmentación de una imagen virtual en 3D de una rama del espécimen C9NR (*P. rubicunda*) obtenida a partir de una  $\mu$ CT de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. ROIs: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo) y eje (verde). .....59

Figura 3. 9 Segmentación de una imagen virtual en 3D del espécimen C13CR (*P. stenobrochis*) obtenida a partir de una  $\mu$ CT de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. ROIs: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo) y eje (verde). .....60

Figura 3. 10 Segmentación de una imagen virtual en 3D del espécimen C17CR (*P. cairnsi*) obtenida a partir de una  $\mu$ CT de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. ROIs: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo) y eje (verde).....60

Figura 3. 11 Fotomicrografías de luz de las escleritas de la especie *P. firma*. a) Superficie de una rama de C4CC vista con un objetivo 10x. b) Vista general de la escleritas extraídas de C7CO, con objetivo 10x. c) Catálogo de escleritas individuales de todos los especímenes vistas con un objetivo 50x. ....61

Figura 3. 12 Fotomicrografías de luz de las escleritas de la especie *P. rubicunda*, espécimen C9NR. a) Superficie de una rama de vista con un objetivo 10x. b) Vista general de la escleritas extraídas, con objetivo 10x. c) Catálogo de escleritas individuales de C9NR vistas con un objetivo 50x. ....62

Figura 3. 13 Estrategia de color en *P. firma*. Comparación entre a) la superficie del coral, b) una pantalla OLED y c) una impresión. Imágenes tomadas de Les Numeriques (b) y Adobe.com (c). ....63

Figura 3. 14 Fotomicrografías de luz de las escleritas de las especies *P. rubinoffi*, espécimen C8NI (izquierda) y *P. stenobrochis*, espécimen C13CR (derecha). a-b) Superficie de una rama vista con un objetivo 10x. c-d) Vista general de la escleritas extraídas con un objetivo 10x. e-f) Catálogo de escleritas individuales (objetivo 50x). ....65

Figura 3. 15 Fotomicrografías de luz de las escleritas de la especie *P. cairnsi* espécimen C17CR (izquierda) y C20LL (derecha). a-b) Superficie de una rama vista con un objetivo 10x. c-d) Vista general de la escleritas extraídas, con un objetivo 10x. e-f) Catálogo de escleritas individuales vistas con un objetivo 50x. ....66

Figura 3. 16 Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de *P. firma*, espécimen C4CC.....67

Figura 3. 17 Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de *P. rubinoffi*, espécimen C8NI. ....68

Figura 3. 18 Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de <i>P. rubicunda</i> , espécimen C9NR.....	69
Figura 3. 19 Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de <i>P. stenobrochis</i> , espécimen C13CR.....	71
Figura 3. 20 Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de <i>P. cairnsi</i> , espécimen C17CR. ....	71
Figura 3. 21 Esquematación del arreglo de las columnas de calcita en la superficie de las escleritas. a) Estructura genérica propuesta para las columnas de calcita. b) Descripción de la intersección entre dos curvaturas. ....	72
Figura 3. 22 Patrones de difracción de un espécimen de cada especie estudiada del género <i>Pacifigorgia</i> e identificación de las fases cristalinas: calcita magnésica (C) y vaterita (V).....	73
Figura 3. 23 Interpretación del sistema romboédrico (a) como parte del sistema cristalino hexagonal en una celda de tipo hexagonal centrada en el romboedro (b). <sup>114</sup> .....	74
Figura 3. 24 Espectros IR de escleritas individuales de corales del género <i>Pacifigorgia</i> . Los especímenes presentados son C7CO1, C8NI, C12NC, C15CC y C18CR. ....	77
Figura 3. 25 Espectro IR del espécimen C18CR ( <i>P. cairnsi</i> ) en dónde se etiquetan los máximos de cada banda vibracional observada. ....	77
Figura 3. 26 Estructura de los residuos de aminoácidos presentes en la proteína ECPM-67 de <i>L. crassum</i> y el colágeno encontrado en <i>L. virgulata</i> . <sup>65,127</sup> .....	81
Figura 3. 27 Espectros Raman de <i>P. firma</i> (C4CC) en a) la superficie del coral y en una esclerita aislada y b) en una esclerita roja medida con una potencia variable de 1, 5 y 20 mW. Ambas mediciones se hicieron con el láser verde de 532 nm y con el objetivo de 50x. ....	83

Figura 3. 28 Muestra del fotoblanqueamiento en una esclerita antocodial de C4CC ( <i>P. firma</i> ) que ocurre después de una adquisición con 25 acumulaciones de 0.5 segundos con un láser de 532 nm y una potencia de 20 mW. ....	83
Figura 3. 29 Espectro Raman de una esclerita de <i>P. firma</i> (C4CC) junto a una tabla en la que se resumen la asignación de las bandas observadas en el espectro. La medición se hizo con el láser verde de 532 nm, 2 mW de potencia y el objetivo de 50x. Las señales C de la calcita son visibles en la <i>Figura 3. 27 b</i> ). ....	84
Figura 3. 30 Estructura de a) un polienal n = 11 parcialmente metilado y b) un polienal n = 11 sin metilaciones. <sup>49</sup> En c) se esquematiza el modelo linear simplificado de un polieno lineal, en el que se aprecia el desplazamiento por efecto del estiramiento en C=C y C-C. <sup>131</sup> .....	85
Figura 3. 31 Espectros Raman de <i>P. firma</i> (C4CC) en a) escleritas de diferente color y b) en una esclerita con diferentes intensidades de color. Estas mediciones se hicieron con el láser verde de 532 nm con una potencia de 2 mW y el objetivo de 50x.....	86
Figura 3. 32 Espectros Raman de una muestra de cada especie del género <i>Pacifigorgia</i> . Las líneas punteadas denotan los picos 1, 2 y 3 a 1020, 1125 y 1515 cm <sup>-1</sup> , respectivamente. Estas mediciones se hicieron con el láser de 532 nm, una potencia de 2 mW y el objetivo de 50x.....	87
Figura 3. 33 Relación entre el promedio de la posición de los picos 1, 2 y 3 para cada color de esclerita en las especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> . ....	89
Figura 3. 34 Espectro de reflectancia Visible-NIR de escleritas individuales de corales del género <i>Pacifigorgia</i> . A la izquierda se muestra el cambio en la reflectancia dependiente de la intensidad del color de las escleritas en el espécimen C11NR ( <i>P. rubicunda</i> ). A la derecha se muestra un espectro de reflectancia representativo de cada especie según el color de sus escleritas.....	90
Figura 3. 35 Espectros de emisión de fluorescencia por excitación de radiación de sincrotrón a 275 nm de las escleritas de los octocorales del género <i>Pacifigorgia</i> . Cada especie	

representa un promedio de los espectros de varias escleritas de todos los especímenes. Las señales están normalizadas en su máximo a ~400 nm. ....94

Figura 3. 36 Espectros de emisión de fluorescencia por excitación de radiación de sincrotrón a 275 nm de un monocristal de calcita pura de origen geológico.....96

Figura 3. 37 Fotomicrografías de fluorescencia de las escleritas del género *Pacificorgia* según especie, código de espécimen y longitud de onda del filtro de emisión ( $\lambda_F$ ). La longitud de onda de excitación utilizada fue de 275 nm. Se cambió el LUT de cada imagen para asociar la  $\lambda_F$  de cada canal con su color en el espectro visible. Así, en la última columna, al obtener la imagen compuesta de los 4 canales medidos por fluorescencia, se aproxima la coloración real que tendrían las escleritas bajo excitación con luz UV. Nota: los valores de  $\lambda$  entre paréntesis corresponden al tamaño de la ventana en nanómetros de cada filtro. ....99

Figura 3. 38 Fotografías de las escleritas de *P. firma*, espécimen C4CC, capturadas con a) microscopio de luz visible de laboratorio en modo de campo oscuro, con un objetivo 20x y en el b) microscopio de fluorescencia con radiación de sincrotrón TELEMOS, con un objetivo 50x. En b) se presenta la imagen compuesta de los filtros de emisión con  $\lambda_F = 340(22)$ ,  $400(40)$ ,  $480(30)$  y  $353(50)$  nm. Las escleritas de color están demarcadas en una elipse punteada..... 101

Figura 3. 39 Microfotografías SHG y de fluorescencia bajo diferentes aumentos de secciones delgadas de una rama de C4CC (*P. firma*). Para cada aumento, se muestra arriba la imagen compuesta construida a partir de los 3 canales ubicados en el inferior. El canal rojo contiene la señal SHG a 406 nm y el canal verde y azul las señales de fluorescencia a 460 y 550 nm, respectivamente. La longitud de onda de excitación fue de 810 nm (405 nm en 2PEF). .... 104

Figura 3. 40 Microfotografías SHG y de fluorescencia de una esclerita ubicada en una sección delgada de una rama de C8NI (*P. rubinoffi*). En a) se muestra el canal rojo contiene la señal SHG a 406 nm, en b y c) los canales verde y azul con las señales de fluorescencia a 460 y 550 nm, respectivamente y en d) la imagen compuesta de los 3 canales. La longitud de onda de excitación fue de 810 nm (405 nm en 2PEF). .... 105

Figura 3. 41 a) Fotomicrografías de la sección delgada de C4CC ( <i>P. firma</i> ) capturadas en los modos a) Luz Visible, b) SHG a 406 nm y c) 2PEF a 550 nm. ....	106
---	-----

#### CAPÍTULO IV

Figura 4. 1 Fotomicrografías de luz visible de las escleritas sobre la superficie de una rama de las especies a) <i>P. firma</i> , b) <i>P. rubicunda</i> , c) <i>P. rubinoffi</i> , d) <i>P. stenobrochis</i> , y e) <i>P. cairnsi</i> . Se utilizó un objetivo 10x en modo de luz reflejada. ....	113
---	-----

Figura 4. 2 Fotomicrografías de fluorescencia de las escleritas del género <i>Pacifigorgia</i> según especie obtenida a partir de la imagen compuesta de 4 canales: gris, magenta, azul y verde, capturados con filtros a 340, 400, 480 y 535 nm, respectivamente ( $\lambda_{\text{Excitación}} = 275$ nm). ....	115
---	-----

Figura 4. 3 Diagramas de cajas e intervalos de confianza de la prueba de Tukey para el estudio de las diferencias entre las intensidades en los canales RGB de fotografías digitales de las especies de <i>Pacifigorgia</i> . ....	124
--	-----

Figura 4. 4 Promedio de los espectros de reflectancia Visible-NIR de la superficie de los corales de las especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> utilizados para el PCA. ....	127
--	-----

Figura 4. 5 Gráfico de sedimentación con el valor de los <i>eigenvalues</i> para las componentes principales 1 a 10 obtenidos a partir del PCA para Microespectroscopía Visible-NIR. ....	129
---	-----

Figura 4. 6 Gráficos de cargas según la longitud de onda obtenidos a partir del PCA para los componentes principales 1, 2 y 3, respecto a un espectro de reflectancia normalizado de la primera muestra del espécimen C4CC de <i>P. firma</i> . ....	130
--	-----

Figura 4. 7 Biplot de PC1 y PC2 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de reflectancia en el rango Visible-NIR de las 5 especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> . ....	132
--	-----

Figura 4. 8 Biplot de PC1 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de reflectancia en el rango Visible-NIR de las 5 especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> . ....	132
--	-----

Figura 4. 9 Biplot de PC2 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de reflectancia en el rango Visible-NIR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*. ..... 133

Figura 4. 10 Diagramas de cajas e intervalos de confianza de la prueba de Tukey para el estudio de las diferencias entre la posición de las bandas 1, 2 y 3 en Microespectroscopía Raman para las especies de *Pacifigorgia*. ..... 142

## ANEXOS

Figura A. 1. Fotografías de los especímenes del género *Pacifigorgia* previo al muestreo junto a imágenes tomadas con estereoscopio a una magnificación de 2x..... 178

Figura A. 2 Espectros de reflectancia Visible-NIR de la superficie de los corales de las especies estudiadas del género *Pacifigorgia* utilizados para el PCA..... 181

Figura A. 3 Gráfico de sedimentación con el valor de los *eigenvalues* para las componentes principales 1 a 10 obtenidos a partir del PCA para Microespectroscopía de Fluorescencia. .... 183

Figura A. 4 Gráficos de cargas según la longitud de onda obtenidos a partir del PCA para los componentes principales 1, 2 y 3, respecto a un espectro de fluorescencia normalizado de la primera muestra del espécimen C4CC de *P. firma*. ..... 184

Figura A. 5 Biplot de PC1 y PC2 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las cuentas de emisión por fluorescencia de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*. ..... 185

Figura A. 6 Biplot de PC1 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las cuentas de emisión por fluorescencia de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*. ..... 185

Figura A. 7 Biplot de PC2 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las cuentas de emisión por fluorescencia de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*. ..... 186

Figura A. 8 Gráfico de sedimentación con el valor de los *eigenvalues* para las componentes principales 1 a 3 obtenidos a partir del PCA para Microespectroscopía Raman. .... 191

Figura A. 9 Biplot de PC1 y PC2 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de intensidad de dispersión Raman de las 5 especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> .	191
Figura A. 10 Biplot de PC1 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de intensidad de dispersión Raman de las 5 especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> .	192
Figura A. 11 Biplot de PC2 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de intensidad de dispersión Raman de las 5 especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> .	192
Figura A. 12 Espectros de Infrarrojo de la superficie de los corales de las especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> utilizados para el PCA en el rango de 900 a 1900 $\text{cm}^{-1}$ , normalizados a) al valor mínimo y b) a la banda del carbonato a 1800 $\text{cm}^{-1}$ .	193
Figura A. 13 Espectros de Infrarrojo de la superficie de los corales de las especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> utilizados para el PCA en el rango de 900 a 1900 $\text{cm}^{-1}$ , normalizados a la banda del carbonato a 1800 $\text{cm}^{-1}$ .	193
Figura A. 14 Gráfico de sedimentación con el valor de los <i>eigenvalues</i> para las componentes principales 1 a 10 obtenidos a partir del PCA para Microespectroscopía Infrarroja.	194
Figura A. 15 Gráficos de cargas según la longitud de onda obtenidos a partir del PCA para los componentes principales 1, 2, 3 y 4, respecto a un espectro infrarrojo normalizado de la primera muestra del espécimen C4CC de <i>P. firma</i> .	195
Figura A. 16 Biplot de PC1 y PC2 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> .	196
Figura A. 17 Biplot de PC1 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género <i>Pacifigorgia</i> .	196

Figura A. 18 Biplot de PC1 y PC4 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*. .....197

Figura A. 19 Biplot de PC2 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*. .....197

Figura A. 20 Biplot de PC2 y PC4 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*. .....198

Figura A. 21 Biplot de PC3 y PC4 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*. .....198

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado (término en inglés)</b>
2PEF	Fluorescencia de excitación con dos fotones ( <i>Two-Photon Excitation Fluorescence</i> )
A	Antocodio
AEDT	Ácido etilendiamino tetraacético
ANOVA	Análisis de Varianza ( <i>Analysis of Variance</i> )
BSE	Electrones retrodispersados ( <i>backscattered electrons</i> )
CA	Cáliz
CC	Café claro
CC	Cordón central
CG	Cavidad gastrovascular
CIBET	Centro de Investigación en Biodiversidad y Ecología Tropical
CICIMA	Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales
CIEMic	Centro de Investigación de Estructuras Microscópicas
CINaM	<i>Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille</i>
CL	Canales longitudinales
CN	Café/naranja
CO	Café oscuro
CQ	Cenénquime
CR	Café rojizo

CRR	Removedor de rayos cósmicos ( <i>Cosmic Ray Removal</i> )
E	Eje del coral
EBSD	Difracción de electrones por retrodispersión ( <i>Electron Backscattered Diffraction</i> )
EDS	Espectrómetro de rayos X de Energía Dispersiva ( <i>Energy Dispersive Spectrometer</i> )
EDX	Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva
ES	Escleritas
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
HLT	<i>Hotelling-Lawley's Trace</i>
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente ( <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy</i> )
IR	Infrarrojo, infrarroja
LINAC	Acelerador lineal ( <i>Lineal Accelerator</i> )
LL	Lila
LUT	Tabla de consulta ( <i>Look-up Table</i> )
MANOVA	Análisis Multivariante de Varianza ( <i>Multivariate Analysis of Variance</i> )
NI	Naranja intenso
NIR	Infrarrojo cercano ( <i>Near-Infrared</i> )
NR	Naranja rojizo
P	Pólipo
PCA	Análisis de Componentes Principales ( <i>Principal Component Analysis</i> )

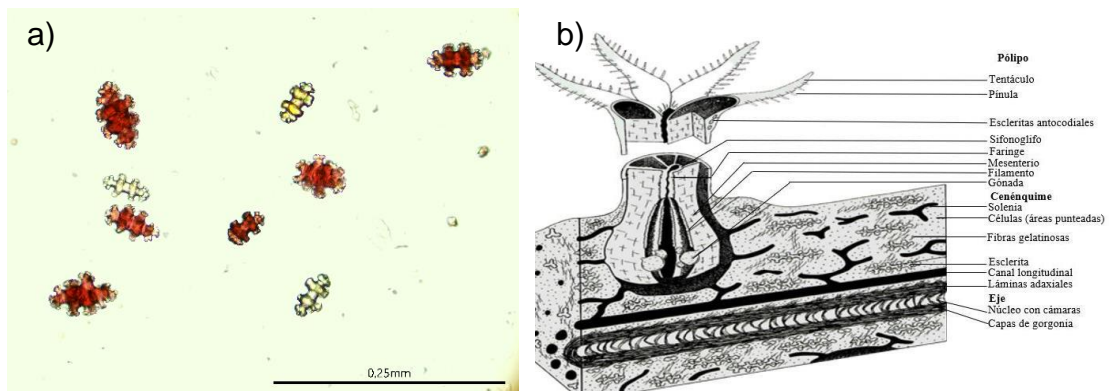
PMT	Tubo fotomultiplicador ( <i>photomultiplier tube</i> )
POM	Microscopía óptica de luz polarizada ( <i>Polarized Light Optical Microscopy</i> )
p-XRD	Difracción de rayos X en polvos ( <i>Powder X-Ray Diffraction</i> )
RGB	Rojo, Verde y Azul ( <i>Red, Green and Blue</i> )
RLR	<i>Roy's Largest Root</i>
ROI	Región de Interés ( <i>Region Of Interest</i> )
SE	Electrones secundarios ( <i>secondary electrons</i> )
SED	Detector de electrones secundarios ( <i>Secondary Electrons Detector</i> )
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SEP	Sistema de Estudios de Posgrado
SHG	Generación de Armónicos Secundarios ( <i>Second Harmonic Generation</i> )
SSCP	Suma de Cuadrados y Productos Cruzados ( <i>Sum of Squares and Cross Products</i> )
Tuckey HSD	Diferencia honesta significantive de Tuckey (Tuckey's honestly significant difference)
TXM	Microscopía de rayos X ( <i>X-ray microscopy</i> )
UCR	Universidad de Costa Rica
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VUV	Ultravioleta al vacío ( <i>Vacuum Ultraviolet</i> )
WL	<i>Wilk's Lambda</i>

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

*Pacifigorgia* es un género perteneciente a la familia Gorgoniidae del orden Malacalcyonacea que, a su vez, forma parte de la clase Octocorallia del subfilo Anthozoa, filo Cnidaria. Al igual que otros octocorales, las especies de *Pacifigorgia* son celenterados coloniales compuestos de pólipos de ocho tentáculos. Los pólipos emergen del cenénquime, un tejido basal común para toda la colonia, en el cual se desarrollan nuevos pólipos.<sup>1-3</sup>

Dentro de la matriz de este tejido existen estructuras esqueléticas microscópicas compuestas mayormente por carbonato de calcio en forma de calcita y son llamadas escleritas (ver *Figura 1. 1 a*).<sup>1,4</sup> Las mismas pueden tener distintas formas, colores y distribución según la especie, lo cual ha permitido utilizarlas como caracteres taxonómicos por muchos autores.<sup>5-7</sup> Sumada a esta variación interespecífica, también se han reportado casos de variación intraespecífica en donde la morfología y coloración de las escleritas varía entre colonias de una misma especie o entre diferentes secciones de una misma colonia.<sup>8</sup>



**Figura 1. 1 a)** Fotomicrografía de las escleritas de *P. firma*. **b)** Diagrama esquemático de la sección transversal de un octocoral.<sup>1</sup>

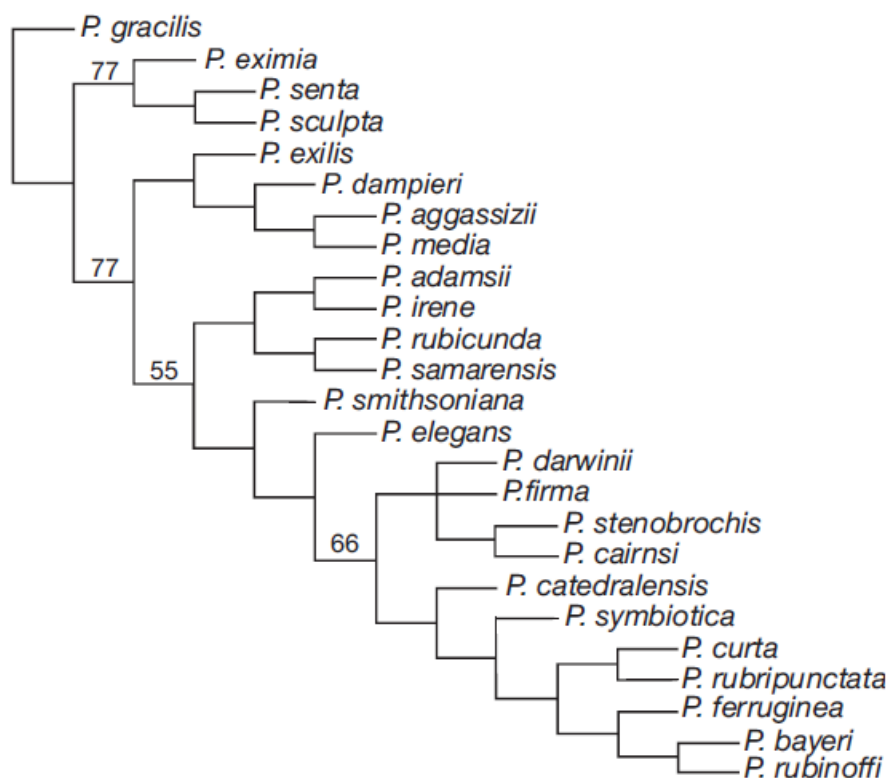
Las escleritas pueden encontrarse en la base, en las paredes del pólipo y, principalmente, en el cenénquime. Dada su amplia distribución, cumplen una función estructural al ofrecer soporte para la colonia y los pólipos<sup>1,9</sup> Cabe destacar que al igual que otras gorgonias, las especies de *Pacifigorgia* producen un eje central compuesto de una proteína flexible llamada gorgonina. Alrededor de este eje se construye el coral y proporciona

un soporte general a toda la colonia.<sup>10</sup> En la *Figura 1. 1 b*) se observa un esquema general de la estructura de un octocoral, en dónde se destaca la presencia del pólipo, el cenénquime, el eje central y las escleritas incrustadas en el cenénquime.<sup>1</sup>

Las especies de *Pacifigorgia* pueden encontrarse principalmente en la zona tropical del Pacífico Este, en aguas de poca profundidad, fuertes corrientes y oleaje, fijados a distintos tipos de sustratos (e.g. rocas, conchas, arena).<sup>11,12</sup> Las colonias se caracterizan por ser flabeliformes (forma de abanico) con ramas que se disponen en planos paralelos o perpendiculares entre sí, que suelen ubicarse de forma perpendicular al flujo de las corrientes.<sup>11</sup> Estas ramas forman un entretejido en forma de red de pesca con diferentes tamaños de ventana, característica por medio de la cual se le distingue de otros géneros.<sup>11</sup>

En *Pacifigorgia*, los pólipos están distribuidos en la totalidad o a cada lado de las ramas a lo largo de bandas. Cuando estos se retraen en el cenénquime, forman montículos elevados o planos.<sup>13</sup> El cenénquime o tejido colonial tiene una apariencia esponjosa compuesto por proteínas fibrosas (colágeno) de la mesoglea y escleritas, dentro de las que se encuentran cabrestantes con tubérculos individuales y husos ornamentados y simétricos con un aspecto más alargado.<sup>11,13</sup> En la base del pólipo, se encuentran plaquitas de bordes lobulados y bastones planos con los extremos puntiagudos o truncados, definidos como escleritas antocodiales.<sup>11,13</sup> Los corales de este género se distinguen de los otros por ser gorgonias reticulares que carecen de escleritas escafoides.<sup>2</sup>

La taxonomía de estas especies es clara hasta el nivel de subclase, en dónde las colonias pueden distinguirse como octocorales.<sup>2</sup> No obstante, la complejidad aumenta cuando se busca identificar los niveles de orden, familia y género.<sup>14</sup> Este problema tiene su origen en la continuidad de los caracteres utilizados para la clasificación taxonómica y en la discrepancia que existe a la hora de elegir la mejor metodología para realizarla. Por ejemplo, existe un debate sobre el uso métodos moleculares para clasificación en lugar de utilizar análisis morfológicos. Para construir árboles filogenéticos este último método utiliza caracteres como el color y estructura de las colonias, la presencia de ejes y las características propias de las escleritas (tipos, color, proporción e inclusive, tamaño), como se observa en la *Figura 1. 2.*<sup>14,15</sup>



**Figura 1. 2** Árbol filogenético del género *Pacifigorgia*, Bayer 1951 basado en caracteres morfológicos continuos.

En el caso de *Pacifigorgia*, a pesar de que este es uno de los géneros más abundantes y morfológicamente diversos en su familia, la clasificación e identificación de sus ejemplares o nuevas especies sigue siendo una tarea difícil y poco clara.<sup>11,14</sup> Por esta razón, autores como Bayer consideraban que estas especies habían sido poco investigadas, que era necesario desarrollar estudios a mayor profundidad y determinar si existían especies nuevas.<sup>2,11</sup> Como respuesta a lo anterior, a partir del año 2001 se han realizado intensos estudios taxonómicos en la familia Gorgoniidae, en dónde se han descrito 23 especies nuevas.<sup>15-35</sup> Hasta ahora, se han descrito 36 especies dentro de este género y en Costa Rica se pueden encontrar hasta 14 especies distintas, de las cuales se estudiarán *P. firma*, *P. rubicunda*, *P. stenobrochis*, *P. cairnsi* y la especie *P. rubinoffi* que sólo se ha encontrado en Panamá.<sup>15,16</sup>

## Antecedentes

### Análisis morfológicos

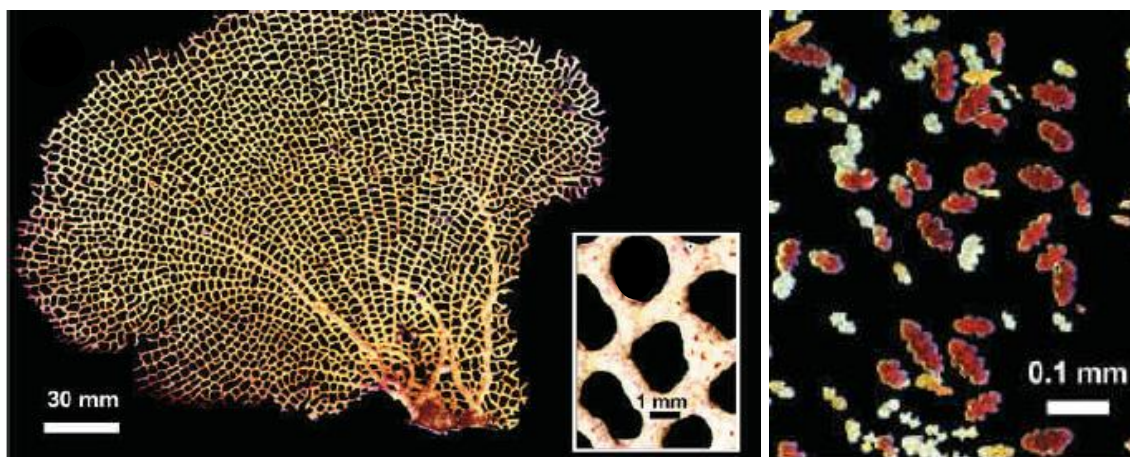
En las descripciones morfológicas de los octocorales del género *Pacifigorgia* se sigue la metodología propuesta por Breedy y Guzmán.<sup>11</sup> La caracterización involucra la toma de fotografías *in situ* o de las colonias preservadas. Las medidas de los pólipos se realizan mediante un Vernier Caliper y un estereoscopio de disección mientras que las medidas del espécimen completo se toman con una regla.

Para el estudio de las escleritas se utiliza el método de Bayer,<sup>12</sup> en el que se toman muestras de las puntas de la colonia y se sumergen en una disolución de hipoclorito de sodio para separarlas del tejido. Una vez que esto ocurre, las escleritas se lavan con 5 porciones de agua destilada y luego con etanol. Finalmente se dejan secando al aire y luego en una estufa.<sup>12</sup> A las escleritas aisladas se les hacen fotomicrografías con las que se determina el color, el tamaño y la distribución de los tipos de esclerita en la muestra.

La clasificación taxonómica mediante el análisis de escleritas se hace con base en su coloración y en la abundancia relativa entre husos y cabrestantes.<sup>11,13</sup> De acuerdo con lo anterior, a continuación, se hará una breve descripción de cada especie estudiada, en la que se resumen las características morfológicas que se han reportado en la literatura.

#### *Pacifigorgia firma*

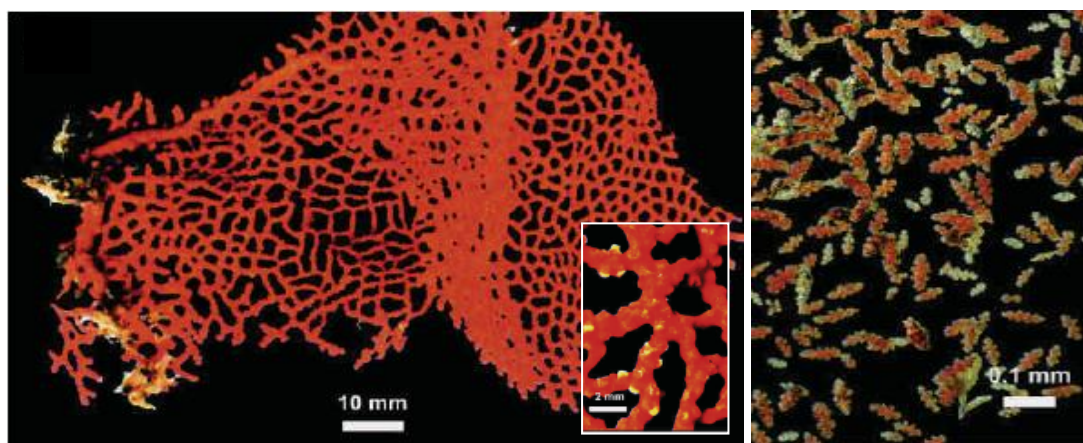
Las colonias preservadas suelen ser color café claro con secciones moradas y superficie lisa (ver *Figura 1. 3*). Sus ramas tienen un grosor de 1-2,5 mm, mismas que forman un retículo cerrado y regular, con geometría rectangular (3-12 mm x 2-6 mm). Puede evidenciarse la presencia de venas centrales (ramas gruesas), sin ramas sueltas y que el final de las mismas es libre y largo.<sup>15</sup> Cada abanico es rígido y grueso y puede tener dimensiones de hasta 250 mm de alto y 400 mm de ancho. Los pólipos están distribuidos en dos hileras longitudinales a lo largo de las ramas y cuando están abiertos son blancos y tienen un collar color rojizo en la base. Sus escleritas pueden ser pálidas, tener colores rojos, amarillos, naranjas o ser bicolors. Las escleritas antocodiales son color naranja claro.<sup>16</sup>



**Figura 1. 3** Holotipo de *P. firma* conservado en seco y fotomicrografía de sus escleritas.<sup>16</sup>

*Pacifigorgia rubicunda*

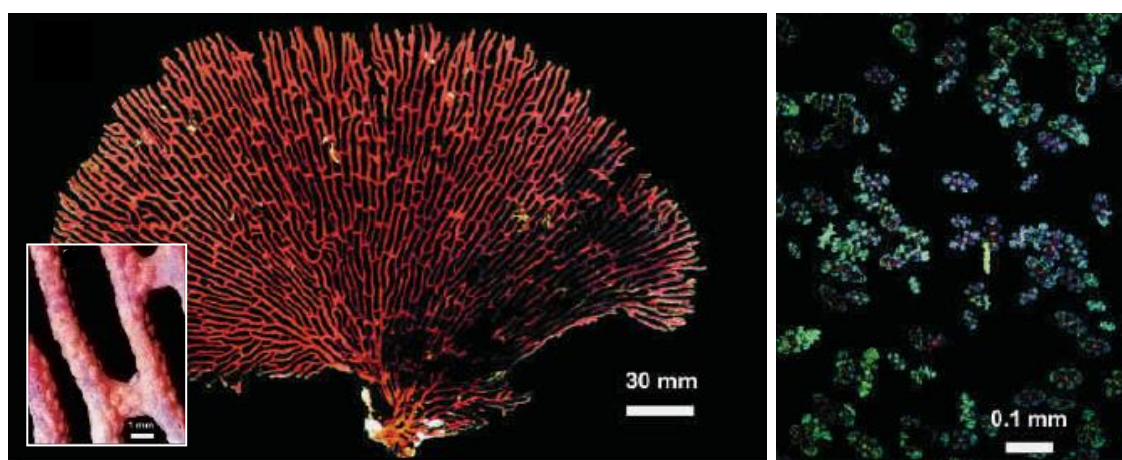
Los especímenes muestran un color naranja intenso y una superficie verrugosa (ver *Figura 1. 4*). Sus ramas tienen un grosor de 0,8-1,3 mm y forman un retículo cerrado y regular, con geometría cuadrada (1,2-5 mm x 0,9-2,51 mm). Se compone de uno o varios abanicos rígidos, gruesos y pequeños de hasta 150 mm de alto y 60 mm de ancho. Puede evidenciarse la presencia de una sola vena central paralela al sustrato. Sus ramas tienen finales cortos y no tienen apéndices libres o son muy pequeños.<sup>15,16</sup> Los pólipos son color amarillo o naranja claro y están muy bien distribuidos en las ramas, mas no en la vena central. Las escleritas del cenénquime son de colores rojos y naranjas y las antocodiales son color amarillo claro.<sup>15,16</sup>



**Figura 1. 4** Holotipo de *P. rubicunda* preservado y fotomicrografía de sus escleritas.<sup>16</sup>

*Pacifigorgia stenobrochis*

Sus colonias pueden ser color rosado intenso, morado-rojizas o amarillo oscuro y tener secciones color marrón y un aspecto liso (ver *Figura 1. 5*). Sus ramas tienen un grosor de 2-5 mm, en forma de retículo abierto y regular, con geometría oblonga o rectangular (10-35 mm x 1-4 mm). Los especímenes son rígidos, grandes (200 mm de alto x 580 mm de ancho) y se componen de un solo abanico o con 2-5 abanicos laterales. No posee venas centrales y la mayoría es uniforme, sin embargo, poseen ramas con finales alargados y libres de hasta 30 mm de largo.<sup>15,16</sup> Los pólipos se distribuyen a ambos lados de la red y son color naranja, con 1,5 mm de diámetro y un collar color amarillo claro. Las escleritas del cenénquime pueden tener colores rosados, grises o amarillentos mientras que las antocodiales son color amarillo claro.<sup>15,16</sup>

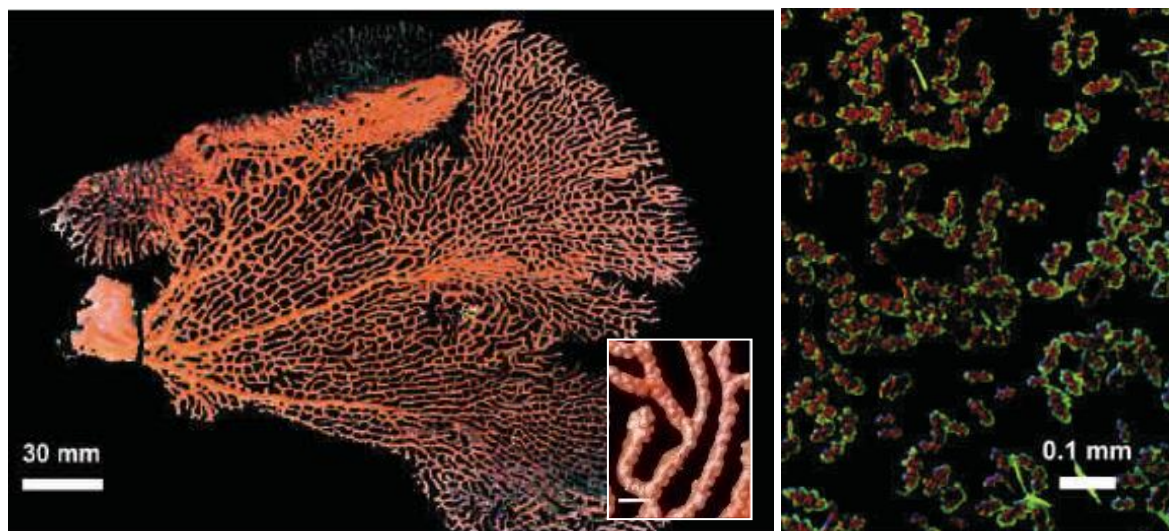


**Figura 1. 5** Holotipo de *P. stenobrochis* conservado en seco y fotomicrografía de sus escleritas.<sup>16</sup>

*Pacifigorgia cairnsi*

Los ejemplares preservados suelen ser de color morado claro y de superficie lisa (ver *Figura 1. 6*). Sus ramas tienen un grosor de 0,9-1,3 mm, y forman un retículo abierto y regular, con geometría oblonga o rectangular (1,7-9,5 mm x 1,8-3,1 mm).<sup>16</sup> Los abanicos en una colonia son grandes, numerosos y con dimensiones de hasta 340 mm de alto y 500 mm de ancho. Puede evidenciarse la presencia de venas centrales prominentes y de ramas libres muy pequeñas.<sup>16</sup> Sus pólipos están distribuidos a lo largo de todas las ramas y poseen un

color amarillo verdoso. Sus escleritas son color rojo intenso con un halo color amarillo limón. Por su parte, las escleritas antocodiales son de color amarillo limón.<sup>16</sup>

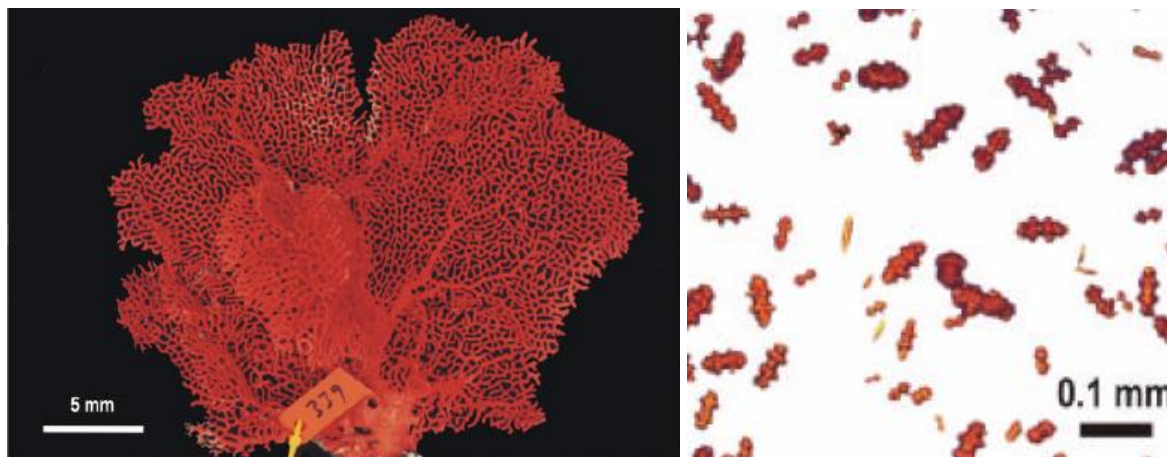


**Figura 1. 6** Holotipo de *P. cairnsi* preservado y fotomicrografía de sus escleritas.<sup>16</sup>

#### *Pacifigorgia rubinoffi*

Las colonias muestran desde un color naranja intenso hasta un amarillo oscuro, con una superficie verrugosa (ver *Figura 1. 7*). Presentan ramas gruesas de hasta 5 mm de ancho, pero no conforman venas centrales: Las ramas más delgadas tienen un grosor entre 1-2 mm de diámetro y forman un retículo cerrado y regular, con geometría circular o cuadrada (hasta 5 mm x 9 mm). Se compone de varios abanicos reticulados de hasta 250 mm de alto y 350 mm de ancho. Los abanicos surgen directamente de la base, de geometría ovalar o laminar y fuerte. Sus ramas tienen finales de hasta 7 mm de largo y tienen apéndices libres que se proyectan hacia los abanicos más grandes.<sup>18</sup>

Los pólipos son color blanco y están distribuidos en las ramas a lo largo de dos hileras, sin estar densamente poblados. Las escleritas del cenénquime son mayormente cabrestantes de color naranja o amarillo oscuro y las antocodiales son bastones color naranja claro.<sup>18</sup> Todas las descripciones de esta especie provienen de especímenes encontrados en Panamá mientras que en los demás casos provienen de varias regiones que pueden extenderse desde México hasta Perú.<sup>19-21</sup>



**Figura 1. 7** Holotipo de *P. rubinoffi* preservado y fotomicrografía de sus escleritas.<sup>18</sup>

### **Análisis con microscopía**

#### *Microscopía de luz visible y de luz polarizada*

La microscopía de luz visible se utiliza tal y como se expuso en la sección anterior, como parte de los análisis morfológicos de las colonias por medio de fotomicrografía.<sup>11</sup> Este tipo de análisis tienen la desventaja de ser muy laboriosos y, además, muchos de los caracteres estudiados pueden ser compartidos por varias especies o variar entre colonias de una misma especie. Esta marcada variación intraespecífica y la continuidad de los caracteres entre especies hacen que los métodos sean insuficientes para delimitar diferencias entre especies.

El mayor esfuerzo que se ha realizado para cuantificar los análisis morfológicos lo realizó Vargas *et al.* (2010).<sup>36</sup> En dicha investigación se propuso un método de análisis computacional con el fin de evaluar la abundancia relativa de dos tipos de escleritas en las muestras según sus dimensiones.<sup>36</sup> Para lograr esto, se tomaron fotografías de varias escleritas que fueron parametrizadas mediante dos cuantificadores de forma: la circularidad y la compacidad. La circularidad se definió como la razón entre el radio promedio y su desviación estándar. Por su parte, la compacidad se determinó como la razón entre el área y el perímetro de la sección transversal de la esclerita.<sup>36</sup>

A partir de estos parámetros se intentó clasificar automáticamente los tipos de esclerita mediante un programa que utilizaba un perceptrón simple de una celda (un algoritmo de aprendizaje). Se esperaba que el perceptrón pudiera aprender a clasificar los tipos de esclerita dadas una serie de entradas manuales. El perceptrón no pudo clasificar las escleritas usando uno sólo de los parámetros, sino que requería de ambos parámetros, con los que se logró un 80 % de exactitud en la clasificación.<sup>36</sup> Este estudio demostró la enorme dificultad que la caracterización morfométrica de las escleritas implica, gracias al gran volumen de información que necesita recopilarse para tal fin.

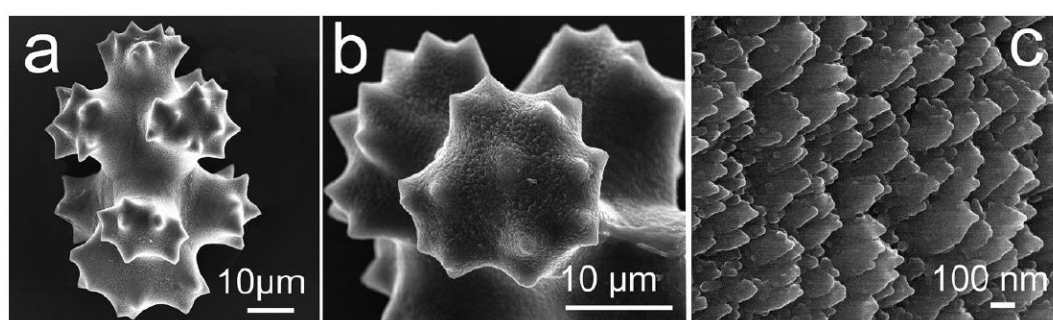
Aparte, la esclerita se ha estudiado como unidad estructural por medio de Microscopía Óptica Polarizada (POM, por sus siglas en inglés).<sup>37</sup> En estas investigaciones la POM fue utilizada en conjunto con difracción de rayos X en polvos y difracción de electrones por retrodispersión (p-XRD y EBSD, respectivamente, por sus siglas en inglés).<sup>37</sup> A partir de estos análisis se determinó que las escleritas son unidades mesocristalinas y que se clasifican en dos tipos: de dominio múltiple y de dominio simple. Estos dominios pueden ser observados mediante la técnica de POM y constituyen secciones de la esclerita con ordenamientos romboédricos o pseudoromboédricos que filtran la luz polarizada linealmente según el ángulo de rotación respecto a la radiación incidente.<sup>37</sup>

#### *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

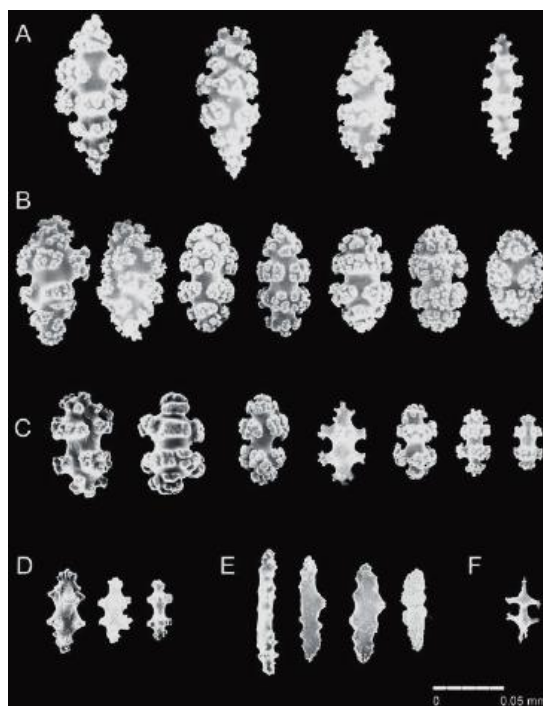
Esta técnica se ha empleado para determinar las características morfológicas superficiales a nivel micrométrico y submicrométrico de las escleritas. Como se observa en la *Figura 1. 8 a-b*), las escleritas, independientemente de su morfología, poseen irregularidades tuberculadas complejas y aparentemente aleatorias, sin embargo, exhiben un ordenamiento triédrico.<sup>37</sup> Además, en su superficie poseen unidades submicrométricas que presentan un patrón en forma de láminas concéntricas con tamaños de  $(80 \pm 30)$  nm (ver *Figura 1. 8 c*).<sup>37</sup> Estas observaciones confirman que las escleritas no son unidades monocristalinas, sino que están compuestas por unidades cristalinas submicrométricas.

No obstante, la técnica de SEM ha sido más estudiada para determinar la morfología de las escleritas en cada especie de coral contemplada en esta investigación. Lo anterior ha permitido establecer un catálogo de escleritas según especie, en dónde es posible distinguir

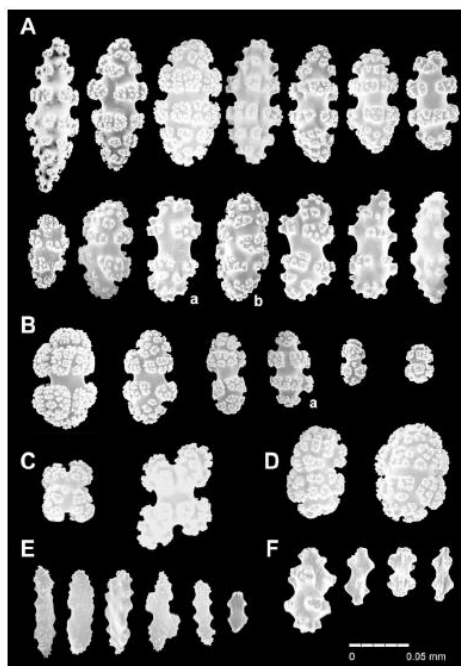
entre los diferentes tipos de escleritas que existen e inclusive, su relación con la zona del coral de dónde provienen (*e.g.* del cenénquime o del antocodio).<sup>11,13,15,16,18,38</sup> La preparación de las escleritas para SEM se describe en Breedy y Guzmán.<sup>11</sup> Las escleritas se posicionan sobre monturas de aluminio y se fijan a estas con cinta adhesiva de carbono de doble cara. Se utilizan puentes de pintura de plata para mejorar la conductividad. Las muestras se recubren con platino (30-45 nm) u oro (30 nm) y en la medición se utiliza un voltaje de aceleración de 10-20 kv.<sup>11</sup> De la *Figura 1. 9*, a la *Figura 1. 12* se muestran imágenes SEM de *P. firma*, *P. rubicunda*, *P. stenobrochis*, *P. cairnsi* y *P. rubinoffi*.



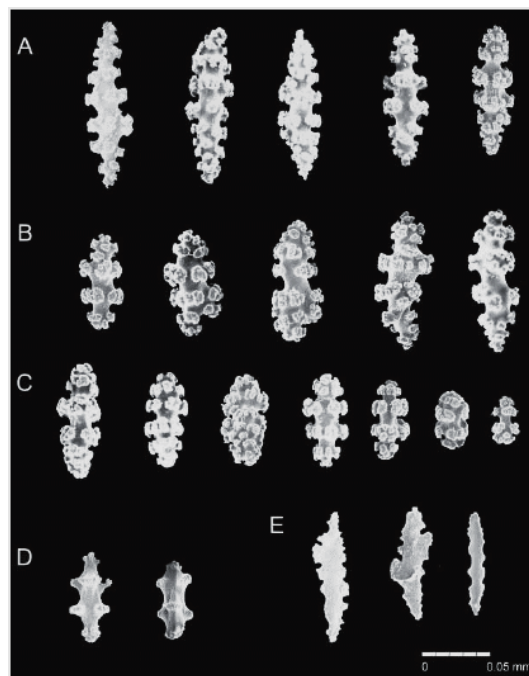
**Figura 1. 8** Imágenes SEM de una esclerita de tipo mancuerna tuberculada.<sup>37</sup>



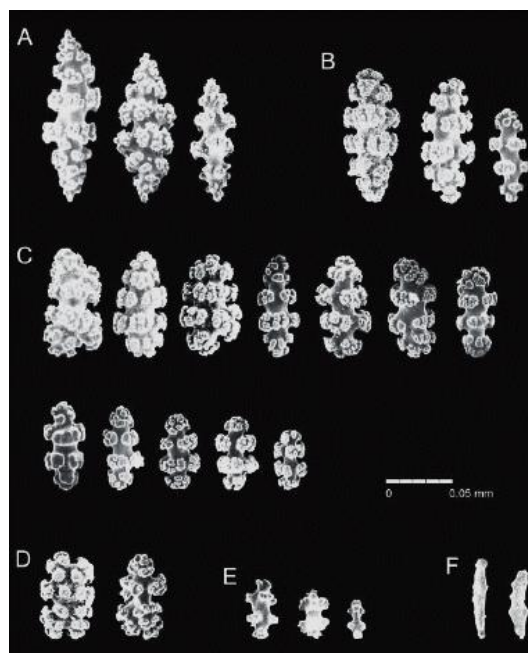
**Figura 1. 9** Micrografías SEM de las escleritas del holotipo de *P. firma* (UCR 915). A) husos; B, C) cabrestantes; D) inmaduras; E) bastones antocodiales y F) cabrestante inmaduro.<sup>16</sup>



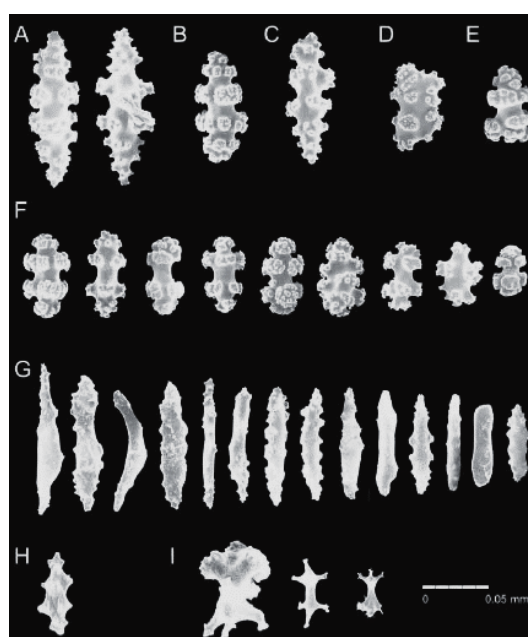
**Figura 1. 10** Micrografías SEM de las escleritas del holotipo de *P. rubinoffi* (UCR 339). A) husos; B) cabrestantes; C) cruces, D) barriles; E) bastones antocodiales y F) inmaduras.<sup>18</sup>



**Figura 1. 11** Micrografías SEM de las escleritas del holotipo de *P. rubicunda* (UCR 623). A, B) husos; C) cabrestantes; D) inmaduras y E) bastones antocodiales.<sup>16</sup>



**Figura 1. 12** Micrografías SEM de las escleritas del holotipo de *P. stenobrochis* (UCR 831). A, B) husos; C) cabrestantes; D) de seis radios; E) inmaduras y F) bastones antocodiales.<sup>16</sup>



**Figura 1. 13** Micrografías SEM de las escleritas del holotipo de *P. cairnsi* (UCR 913). A, B, C) husos; D, E) formas intermedias; F) cabrestantes, G) bastones antocodiales, H) inmaduras e I) cabrestantes inmaduros.<sup>16</sup>

## Análisis espectroscópicos

### *Espectroscopía UV-Visible*

Hasta el momento, no se ha implementado la espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) para la caracterización de pigmentos en las escleritas de corales. No obstante, varios grupos de compuestos orgánicos han sido extraídos de otros octocorales y estudiados por medio de espectroscopía UV-Vis. Entre los tipos de compuestos extraídos se encuentran pigmentos como la peridinina, y la muricellaxantina, saponinas de aminogalactosa esterificada llamadas muricinas y sesquiterpenos.<sup>39-42</sup> No obstante, no es posible determinar que los pigmentos provinieran de las escleritas puesto que fueron aislados del espécimen completo. Además, cabe notar que el peso de partida en todos los casos rondaba desde los 200 hasta los 2500 g de muestra y los compuestos extraídos tuvieron rendimientos no mayores al 0,001 % en masa respecto a la masa de muestra inicial.<sup>39-42</sup>

### *Espectroscopía Infrarroja (IR)*

Aunque sí se ha estudiado a los octocorales por medio de espectroscopía de Infrarrojo, la mayoría de las investigaciones han reportado solamente la presencia de las señales referentes al carbonato de calcio a 873, 1088, 1405, 1799 y 2523  $\text{cm}^{-1}$  (correspondientes a las vibraciones del ion carbonato  $\nu_2$ ,  $\nu_1$ ,  $\nu_3$ ,  $\nu_1+\nu_4$ ,  $\nu_1+\nu_3$ , respectivamente).<sup>43,44</sup> Aparte de este tipo de estudios, Kupka *et al.* (2010), utilizaron un microscopio IR y midieron espectros de la superficie del octocoral *Corallium rubrum*. Los espectros poseían casi completa similitud con los de patrones de  $\text{CaCO}_3$ , pero mostraron bandas débiles cercanas a 3000  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a las vibraciones  $\nu(\text{C-H})$  que muestran la presencia de compuestos orgánicos en las escleritas.<sup>45</sup>

De la misma manera que los análisis de UV-Visible, muchos espectros IR fueron tomados a extractos de octocorales que mostraron una gran diversidad de bandas de absorción. Entre los compuestos orgánicos caracterizados se encuentran pigmentos como la peridinina, y la muricellaxantina, saponinas de aminogalactosa esterificada llamadas muricinas, sesquiterpenos como el pacifigorgiol, esteroides 19-oxidados, diterpenoides como briarano y algunos de sus derivados.<sup>39-42,46-48</sup>

### *Espectroscopía Raman*

La espectroscopía Raman puede ser útil no solo para caracterizar el CaCO<sub>3</sub> coralino sino también para el análisis de pigmentos en las escleritas de los octocorales.<sup>45</sup> Tal y como lo afirman diversos autores<sup>49-51</sup>, esta técnica puede ser utilizada como complemento a los métodos más clásicos de análisis de pigmentos, como lo son la espectroscopía IR, UV-Visible, de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Sus principales ventajas involucran bajos tiempos de medición, poca cantidad de muestra y una gran versatilidad.

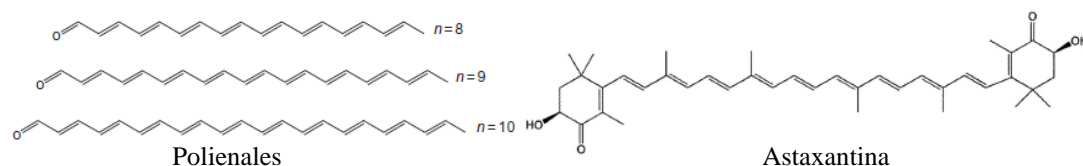
Para sistemas biológicos, es una técnica ideal puesto que permite hacer mediciones *in vivo*, en donde su baja sensibilidad por el agua le permite obtener mediciones limpias.<sup>49</sup> Esta técnica es apta para realizar mediciones en muestras orgánicas, inorgánicas o una combinación de ellas, lo que amplía el ámbito de muestras que admite.<sup>45</sup> De esta manera, la espectroscopía Raman se convierte en una de las mejores técnicas para determinar pigmentos en escleritas (una matriz compuesta, principalmente por CaCO<sub>3</sub>).<sup>50</sup>

Mediante la espectroscopía Raman se extrae información acerca de los grupos funcionales presentes en una muestra.<sup>51</sup> A través de diferentes investigaciones, se ha determinado que el principal componente de los pigmentos y la fuente del color de las escleritas en los octocorales corresponde a polienales conjugados de cadena larga, derivados de los polienos (ver *Figura 1. 14*).<sup>45,50-53</sup>

Además de estos hallazgos, en muchos corales se ha reportado continuamente la aparición de carotenoides, principalmente, astaxantina y peridinina.<sup>54-59</sup> No obstante hay que tener en cuenta que los carotenoides son pigmentos propios de organismos fotosintéticos como las zooxantelas, que viven en endosimbiosis con la mayoría de los corales estudiados. Por esta razón, se cree que los carotenoides que se han encontrado provienen de estas algas unicelulares endosimbiontes y no de estructuras propias del coral como las escleritas.<sup>55</sup>

En los espectros Raman de los pigmentos, se ha puesto principal atención a las bandas intensas a 1500-1550 y 1140-1120 cm<sup>-1</sup> que corresponden con las vibraciones por estiramiento de  $\nu_1(\text{C}=\text{C})$  y de  $\nu_2(\text{C}-\text{C})$  en las cadenas de polienos. Por otra parte, cuando se

tiene la presencia de carotenoides son particularmente importantes las señales a 1500-1550 y 1150-1170  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas a  $\nu_1(\text{C}=\text{C})$  y de  $\nu_2(\text{C}-\text{C})$ , respectivamente.<sup>49,50</sup>



**Figura 1. 14** Polienales de cadena larga y carotenoides como la astaxantina identificados en octocorales mediante espectroscopía Raman.<sup>50</sup>

La principal diferencia que se ha observado entre los espectros Raman de ambos tipos de compuestos es el corrimiento hacia el azul de 20 a 30  $\text{cm}^{-1}$  de la señal  $\nu_2(\text{C}-\text{C})$  de los carotenoides respecto a los polienales. También es posible observar una banda de mediana intensidad a 1014-1020  $\text{cm}^{-1}$  [ $\nu_3(\text{C}-\text{CH}_3)$ ] que aparece cuando la cadena poliénica está metilada y que puede variar según el grado de sustitución con metilos.<sup>49,50</sup>

## Otros análisis

### *Difracción de Rayos X en polvos*

Las especies de octocorales son biomineralizadores que logran cristalizar en sus escleritas carbonato de calcio. Cuando este proceso ocurre, es posible que se forme cualquiera de los dos alótropos más comunes del  $\text{CaCO}_3$  (calcita o aragonita) y que además ocurran sustituciones del Ca por otros metales como magnesio.<sup>60</sup> Por esta razón, la difracción de rayos X en polvos como técnica de caracterización mineralógica de los corales ha ganado popularidad y se ha utilizado ya en varias investigaciones.<sup>60-65</sup>

De esta manera, se ha determinado que en la mayoría de octocorales, la fase cristalina del  $\text{CaCO}_3$  corresponde a calcita magnésica con diferentes grados de sustitución con Mg.<sup>61-</sup>

<sup>64</sup> Es claro, que todavía existen retos en cuanto al entendimiento del proceso de mineralización, debido a que se ha demostrado que existen corales capaces de precipitar calcita en mares aragoníticos o viceversa.<sup>61</sup> Ante esto, investigadores como Rahman han rescatado el papel de proteínas extracelulares que pueden estar involucradas en los procesos de calcificación de los octocorales.<sup>65</sup>

*Fotografía RGB y fotografía multiespectral*

Las fotografías multiespectral está surgiendo como nuevos métodos de monitoreo para la salud de los arrecifes de coral.<sup>66</sup> Varios investigadores han empleado estas técnicas para determinar el grado de blanqueamiento de los corales o su contenido de clorofila, sin embargo, no se ha utilizado para la determinación de color de las especies.<sup>67-70</sup> Mediante la fotografía digital es posible cuantificar el color con el fin de lograr estudios morfométricos más precisos en octocorales y así eliminar la subjetividad del color percibido por el ojo humano.<sup>71</sup> Este tipo de metodologías se han aplicado en la caracterización taxonómica de varias especies de gasterópodos, dónde se determinó un código RBG para cada fenotipo.<sup>72</sup>

## Justificación

*Pacifigorgia* es uno de los géneros más abundantes y morfológicamente diversos de la familia Gorgoniidae, con gran importancia ecológica gracias a su papel como bio-indicadores de la degradación de los ecosistemas. Actualmente, la clasificación taxonómica de nuevos especímenes o de nuevas especies presenta un reto para los biólogos. El estudio de los caracteres morfológicos que se utilizan para distinguir entre especies, como la forma, el tamaño, el color y la abundancia relativa de sus escleritas implica una enorme cantidad de tiempo y experiencia que no es fácil de adquirir. Por ello, este enfoque resulta impráctico en el caso de identificaciones rápidas para trabajos ecológicos realizados por no taxónomos.

Sumado a esto, la continuidad de estos caracteres entre diferentes especies impide una correcta delimitación entre ellas. Algunos autores han tratado de implementar técnicas computacionales morfométricas para distinguir entre los tipos de escleritas, sin embargo, están lejos de ser 100 % exactas y no dejan de implicar un volumen de datos extenso. Ante esto, se propone una serie de análisis fisicoquímicos que permitan estudiar a las escleritas y a sus pigmentos desde una perspectiva espectroscópica, mineralógica y colorimétrica.

De esta manera, se pretendió establecer una metodología capaz de diferenciar entre las especies del género *Pacifigorgia* de manera rápida y relativamente sencilla. Esta metodología tiene la ventaja de utilizar cantidades mínimas de muestra y, además, no requiere el uso de ejemplares vivos. De acuerdo con esto, ejemplares de museo podrán ser analizados mucho tiempo después de su recolección. Además, la identificación en campo implicaría la recolección de muestras pequeñas que no afectarían de manera significativa a las colonias lo cual, facilitaría el estudio de la ecología de estas especies.

## Objetivos

### Objetivo general

Indagar sobre características fisicoquímicas asociadas a las escleritas de los octocorales del género *Pacifigorgia* que puedan servir como base para una posible clasificación taxonómica.

### Objetivos específicos

- Caracterizar las escleritas de una colección de octocorales del género *Pacifigorgia* mediante espectroscopía Raman, IR y UV-Visible, microscopía electrónica y de luz visible, fotografía multispectral y cristalografía de rayos X.
- Determinar las especies orgánicas que componen los pigmentos de los octocorales del género *Pacifigorgia*.
- Diferenciar qué propiedades fisicoquímicas de las escleritas permiten la diferenciación y caracterización taxonómica de las especies de octocorales del género *Pacifigorgia*.
- Elaborar un catálogo público que contenga la información fisicoquímica de las especies de octocorales del género *Pacifigorgia*.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### **Estrategia de investigación**

En esta investigación se evaluó cuáles de las características fisicoquímicas de las especies de octocorales del género *Pacifigorgia* podrían ser utilizadas como herramienta para su clasificación taxonómica. Es importante tener en cuenta que las muestras que se estudiaron provienen de museos y fueron preservadas en seco. Por esta razón, los análisis de metabolitos o los métodos moleculares que podrían ser utilizados para su caracterización taxonómica no se encontraban al alcance de esta investigación, por tanto, fueron descartados. De la mano con lo anterior, las muestras que se tienen son de alto valor, incluso algunas de ellas corresponden a holotipos, es decir, a los especímenes que se utilizan para describir morfológicamente a la especie. Ante esto, es crucial que a lo largo de esta investigación se utilicen técnicas no destructivas o que requieran de cantidades mínimas de muestra que impacten mínimamente a cada espécimen.

Por ello, durante el muestreo se buscó cortar solamente pequeñas secciones de las puntas de cada coral, que resultaran en unos 200 mg de escleritas extraídas. A diferencia de lo descrito por Breedy y Guzmán<sup>23</sup>, la extracción se realizó con peróxido de hidrógeno debido a que probó ser un método efectivo y de buena calidad por varios investigadores de la Escuela de Biología y la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica. Las técnicas de microscopía de luz y microscopía electrónica requirieron de cantidades mínimas de muestra y se presentaron como una excelente opción para determinar las características morfométricas de las escleritas estudiadas.

Por su parte, para las técnicas espectroscópicas de UV-Visible, Infrarrojo y Raman se utilizaron métodos micrométricos en los que se pudieron obtener espectros en zonas muy pequeñas, o bien, mapear áreas grandes a baja energía, evitando daños en la muestra. Esto permitió el análisis de escleritas individuales y la elaboración de mapeos de secciones completas de un coral, con el fin de encontrar similitudes intraespecíficas y diferencias interespecíficas significativas. Además, con base en estos espectros, se buscó determinar la

identidad de los pigmentos que le dan el color a las escleritas. La difracción de rayos X en polvos por medio de la técnica de capilaridad permitió determinar las fases cristalinas en cada muestra con cantidades muy pequeñas de la misma (~150 mg), asegurando también su recuperación luego de ser analizada. Por último, se tomaron fotografías digitales en busca de parámetros que permitieran cuantificar el color de cada espécimen y eliminar la subjetividad de la percepción del color de las descripciones morfológicas.

Aparte de esto, a pesar de no haber sido considerados en el planteamiento original de esta investigación, se tuvo la oportunidad de utilizar diversas técnicas de caracterización fisicoquímica con uso de radiación de sincrotrón. De esta manera, se hicieron estudios a mayor profundidad que permitieron describir de una manera más completa el sistema comprendido por la matriz orgánico-inorgánica encontrada en las escleritas biomineralizadas por los octocorales. Entre estos, se utilizó microtomografía computarizada de rayos X para visualizar la anatomía y una combinación de microscopía de fluorescencia y de microscopía de generación de armónicos secundarios para describir la distribución de los pigmentos en las ramas de estos ejemplares.

A continuación, se presentará la Sección Experimental. Para facilitar la comprensión de algunos detalles experimentales, en este apartado no sólo se describirán aspectos prácticos, sino que también se establecerán algunos fundamentos teóricos y características instrumentales de relevancia para cada una de las técnicas utilizadas en esta investigación.

## Sección Experimental

### Muestreo

Todas las muestras fueron proporcionadas por el Museo de Zoología de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Biodiversidad y Ecología Tropical (CIBET). Las mismas fueron conservadas en seco. Se seleccionaron solamente 4 especies del género *Pacifigorgia*, cada una con 4 especímenes. Para ello se tomó en cuenta a) la disponibilidad de especímenes conservados en el CIBET; b) la cantidad considerable de técnicas de análisis que se planteó utilizar; y c) un tamaño de muestra representativo con el que también sea posible aplicar análisis estadísticos a partir de los resultados obtenidos.

Además de esto, se eligió un espécimen extra de una especie distinta a las anteriores para emular la medición de una muestra incógnita que se pueda comparar con los resultados obtenidos para las otras especies. Lo anterior suma una muestra con un total de 17 especímenes (n=17). La distribución de los especímenes según la especie se muestra en la *Tabla 2. 1*. Para facilitar la comprensión de los resultados se volvió a etiquetar a los ejemplares con un código C#XX, que indica de manera consecutiva su número y la coloración de la colonia. Los códigos de color XX poseen la siguiente nomenclatura: CC (café claro), CR (café rojizo), CO (café oscuro), NI (naranja intenso), NR (naranja rojizo), CN (café/naranja), NC (naranja/café) y LL (lila).

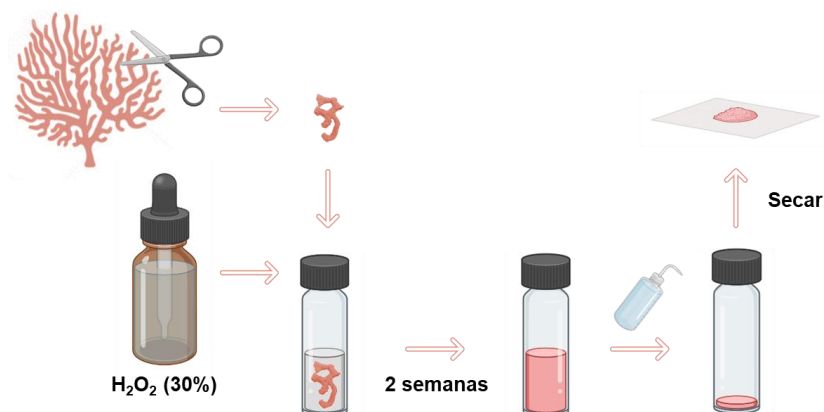
**Tabla 2. 1** Especímenes del género *Pacifigorgia* sometidos a los análisis fisicoquímicos.

Espece	Cantidad de especímenes	Código de Museo	Código de Proyecto (C#XX)
<i>P. firma</i>	4	12, 126, 128, UCR-311	C4CC, C5CR, C6CR, C7CO
<i>P. rubinoffi</i>	1	339	C8NI
<i>P. rubicunda</i>	4	104, 139, 504, UCR-623	C9NR, C10CN, C11NR, C12NC
<i>P. stenobrochis</i>	4	1, 184, 358, UCR-831	C13CR, C14CR, C15CC, C16CR
<i>P. cairnsi</i>	4	99, 100, 256, UCR-993	C17CR, C18CR, C19NC, C20LL

## Preparación de muestras

### *Extracción de escleritas*

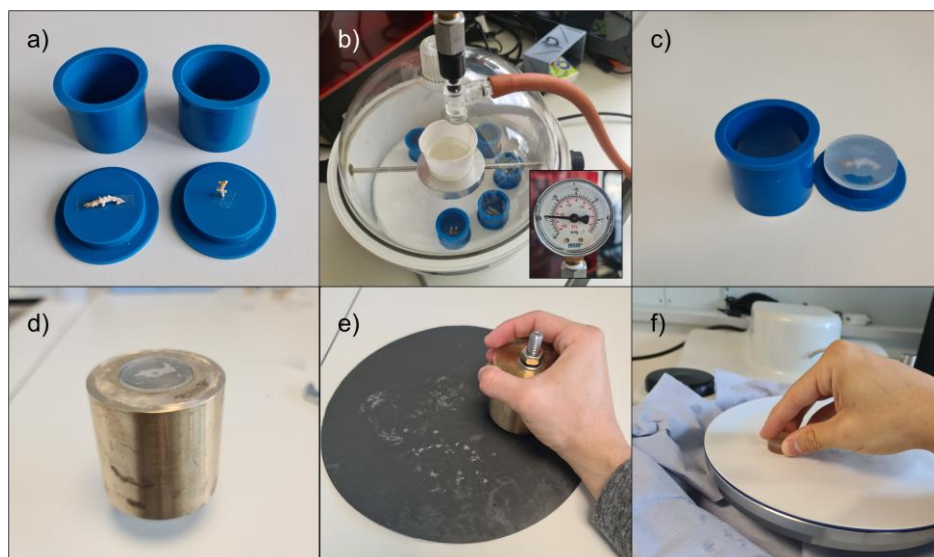
Previo a cualquier tratamiento, todas las muestras se fotografiaron con la ayuda de un estereoscopio (*Figura A. 1*, mostrada en el Anexo 1. 1). En la *Figura 2. 1* se presenta un esquema gráfico del proceso de extracción de las escleritas. Se cortó una sección de las ramas del coral con tijeras de disección. Cada muestra se sumergió en peróxido de hidrógeno al 30% durante dos semanas dentro de frascos cerrados y a temperatura ambiente. Cada dos días, los frascos fueron agitados y abiertos para liberar el CO<sub>2</sub> acumulado. Después de este período, la matriz orgánica fue consumida, y las escleritas y el eje quedaron depositadas en el fondo del frasco. Esto se lavó cinco veces con agua destilada. El eje se conserva hasta su análisis sumergido en agua para que no pierda humedad. Las escleritas se dejan secar al aire.



**Figura 2. 1** Esquema de la extracción, lavado y secado de escleritas y ejes en octocorales.

### *Obtención de láminas delgadas con acabado de espejo*

Para algunas de las técnicas de caracterización utilizadas se requirió preparar cortes o láminas delgadas de las muestras de diferentes partes del coral. Para ello se tomaron muestras del espécimen a estudiar con ayuda de tijeras de disección. Con ayuda de cinta adhesiva de doble cara, las muestras se colocaron sobre la base de moldes cilíndricos de 30 mm SamplKup 20-9179, de la marca Buehler (*Figura 2. 2. a*). La disposición de la muestra depende de la sección (transversal, longitudinal u oblicua) que se quiera revelar con el pulido. Las paredes de los moldes deben de lubricarse con Mold Release Spray 20-3050-008, Buehler. Los moldes se cierran y se continúa con la preparación de la resina.



**Figura 2. 2** Proceso de preparación y lijado de los moldes para obtención de superficies con acabado de espejo. a) Fijación en moldes, b) vertido de resina al vacío, c) extracción del molde, d) fijación en soporte metálico, e) pulido grueso, y f) obtención de acabado de espejo.

Se utiliza EpoxiCure(TM) 2 Epoxy Resin 20-3430-064 como resina epoxi y se combina con el endurecedor EpoxiCure(TM) 2 Epoxy Hardener 20-3432-016, ambos de Buehler, en una relación 4:1 en masa, respectivamente. La mezcla se realiza en un vaso de papel, con ayuda de una paleta de madera, de manera que el vaso se mantiene inclinado y se realiza un movimiento lento, de forma circular y de arriba hacia abajo, con cuidado de no introducir burbujas de aire.

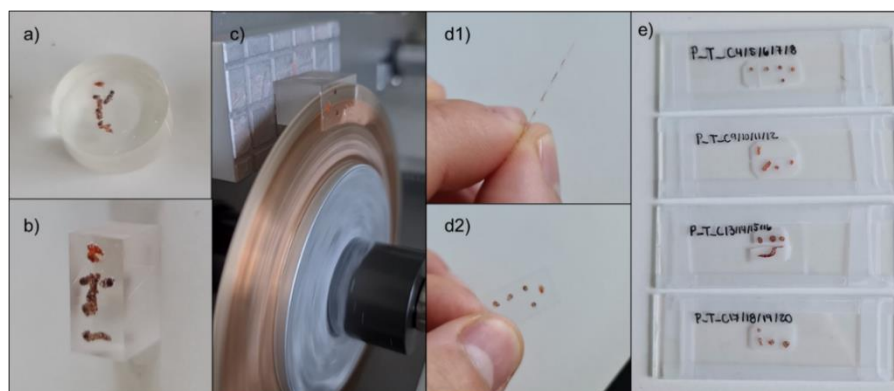
La resina se colocó dentro de la campana de vacío y se aplicó vacío hasta alcanzar -0,26 inHg (-85 kPa) respecto a la presión atmosférica. Se cerró la válvula y se apagó la bomba de vacío. Con ayuda del Castable Vacuum System, Cast N' Vac 1000 de Buehler se vertió lentamente la resina dentro de los moldes, y se dejaron reposar al vacío durante toda la noche (*Figura 2. 2. b*). Es recomendable que la profundidad de la resina se encuentre entre 1 y 1,5 cm de altura. Una vez endurecidos, los soportes de resina epoxi fueron retirados de los moldes (*Figura 2. 2. c*).

Con una lija y un soporte metálico, se desgastaron manualmente ambas caras del soporte hasta que quedaran paralelas entre sí. Se inició lijando el menisco que se forma en la parte superior al fabricar el molde y luego se continuó con la parte inferior (*Figura 2. 2. d-*

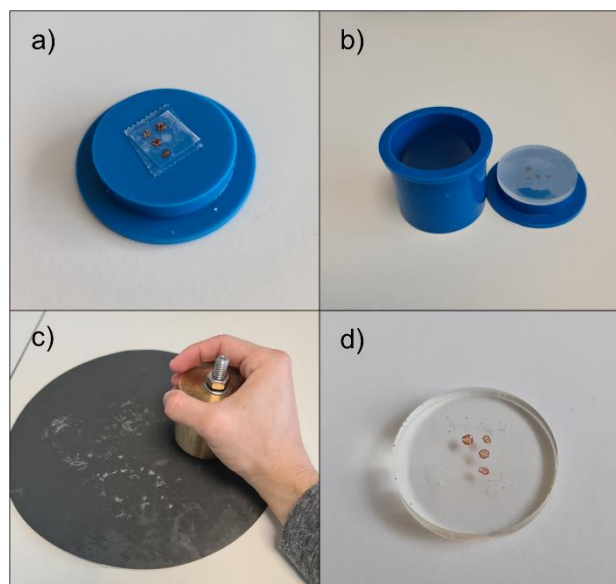
e). Las lijas que se utilizan son CarbiMet(TM), a base de carburo de silicio (SiC) de grano P400, P800, P1200 and MicroCut(TM) Discs, de grano P2500 y P4000. Entre cada uno de los pasos de pulido, se lavan los residuos con agua destilada y se aplica un baño ultrasónico por 5 minutos, para remover cualquier residuo de material abrasivo. Posteriormente, se utilizaron pastas de pulido de diamante MetaDi(R) Ultra de 6, 3, 1 y 0.25 micras junto con los discos de tela TriDent(TM), MicroCloth(R), MasterTex(R) y ChemoMet(R), respectivamente. El pulido se realizó con ayuda de la pulidora manual de un solo disco MetaServ250(R) inferior (Figura 2. 2. f). En este punto se obtuvo un acabado de espejo.

Para obtener las láminas delgadas, primero se redujo la forma cilíndrica del molde a una forma prismática y luego se cortaron láminas de 50-150  $\mu\text{m}$  de grosor con la cortadora IsoMet(TM) Low Speed con un disco de 102x0.3mm IsoMet(TM) Diamond Wafering Blades, como se muestra en la (Figura 2. 3. a-d). Las láminas se lavaron con agua destilada e isopropanol. Estas láminas se colocaron sobre un portaobjetos, cubiertas con un cubreobjetos y fijadas con cinta adhesiva (Figura 2. 3. e).

También se fabricaron muestras pulidas en ambas caras. Para ello se colocaron las láminas delgadas sobre la base de los moldes SamplKup con cinta adhesiva de doble cara, con la cara pulida hacia arriba y la cara recién cortada en contacto con la cinta (Figura 2. 4. a). La adición de resina y proceso de pulido se realizan de la misma forma que fue descrita anteriormente (Figura 2. 4. b-c). En este punto, se recomienda fabricar moldes delgados, con una profundidad de resina que no supere los 0,3 cm de altura (Figura 2. 4. d).



**Figura 2. 3** Proceso de corte de láminas delgadas. A) moldeado, b) obtención de un prisma c-d) corte de lámina delgada, y e) fijación en láminas de microscopio.



**Figura 2. 4** Proceso de obtención de láminas pulidas en ambas caras. a) Fijación, b) moldeado, c) pulido y d) acabado de espejo.

### **Análisis microscópicos**

#### *Microscopía de luz visible*

Desde el desarrollo del microscopio compuesto moderno en 1857 gracias a los avances de Carl Zeiss y Ernst Abbe, la microscopía de luz visible ha permitido el estudio de estructuras microscópicas con altas magnificaciones acompañadas de una gran resolución. De esta manera, mediante el uso de distintos lentes es posible observar objetos microscópicos muy cercanos entre sí con resoluciones de hasta  $0,2 \mu\text{m}$ .<sup>73</sup> Por ejemplo, los lentes condensadores enfocan la luz proveniente de la fuente de luz sobre la muestra, los lentes objetivo colectan la luz transmitida a través del espécimen y la magnifican, para que finalmente los lentes oculares aumenten y proyecten la imagen formada en la retina.<sup>74,75</sup> La magnificación total de un microscopio de luz viene dada por el producto de la magnificación del lente objetivo y la del ocular, dónde el máximo de magnificación utilizado ronda  $2000\times$ .<sup>75</sup>

Aunque la imagen puede magnificarse infinitamente, la resolución es el factor limitante y a partir de esta magnificación, la resolución no mejora. Esto se debe a que la resolución es dependiente de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz incidente y de la apertura numérica del lente objetivo, una propiedad que mide su capacidad para capturar la luz.<sup>75</sup> De

esta forma, el tamaño del objeto más pequeño que puede resolverse en una imagen de microscopio es igual a  $0.5 \cdot \lambda / \text{apertura numérica del lente}$ . Por esta razón, si se utiliza un lente de 100x, con una apertura numérica de cercana a 1.00 para observar una muestra iluminada con luz azul de 400 nm ( $0.4 \mu\text{m}$ ), al aplicar la fórmula se obtiene una resolución máxima de  $0,2 \mu\text{m}$ .<sup>75</sup>

La capacidad de observar detalles tan pequeños ha permitido a disciplinas como la medicina o la microbiología el estudio de tejidos y microorganismos con un gran nivel de detalle.<sup>74</sup> Por otra parte, otras disciplinas como la geología han añadido otras piezas ópticas que han favorecido el estudio de los minerales y otros materiales anisotrópicos. En el caso del microscopio petrográfico, este tiene un primer polarizador que polariza la luz en el plano, de manera que al impactar la muestra se divide en dos rayos orientados en planos perpendiculares entre sí (rayos ordinarios y extraordinarios). Posteriormente, estos dos rayos son recombinados por el analizador (un segundo polarizador), lo que permite determinar la orientación óptica y los parámetros cristalográficos de un mineral.<sup>76</sup>

Habiendo establecido lo anterior, se entiende por qué se utilizó la microscopía de luz visible para el estudio de los octocorales, dotados de tejidos y estructuras biomineralizadas. De esta forma, para el análisis estructural y morfológico de las escleritas hizo un estudio fotomicrográfico con luz visible en modo de transmisión con un microscopio de luz polarizada Delphi-X Observer Polarization DX.2058-PLPOLRi acoplado a una cámara SONY Exmor R sCMOSs CMEX-20 de Euromex. En todos los casos, se tomó una pequeña muestra del polvo de escleritas con la punta de una aguja, fue colocada y dispersada sobre portaobjetos limpios. Las fotografías fueron capturadas con objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x y 50x. Este procedimiento se realizó en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic). Las fotomicrografías en diferentes planos focales fueron apiladas usando Adobe Photoshop, con las funciones Auto-Alinear Capas y Auto-Mezclar Capas.

### *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

La microscopía electrónica surgió al reemplazar la fuente de luz de los microscopios convencionales por un haz de electrones de alta energía con el fin de mejorar su resolución. En el caso del SEM, esta es una técnica en la que este haz de electrones es enfocado en la

superficie de la muestra de manera progresiva, haciendo un barrido en su superficie.<sup>77</sup> La interacción de los electrones con la muestra produce diversas señales que son detectadas y a partir de ellas se construye una imagen. Para lograr dicha tarea, el SEM se vale de un cañón de electrones compuesto por un filamento de tungsteno que se calienta a más de 2800K y un ánodo cilíndrico, a través del cual se genera un campo eléctrico que extrae y acelera los electrones del filamento. Este haz de electrones es grueso y sufre desviaciones, por esta razón se utilizan lentes magnéticas que enfocan el haz y aumentan o reducen su tamaño.<sup>77</sup>

Al igual que en un microscopio de luz visible, estos electroimanes se usan como lentes condensadores, que hacen que el haz de electrones converja y sea colimado en una corriente paralela. Por su parte, otros lentes electromagnéticos, los lentes objetivo enfocan el haz en un solo punto sobre la muestra. Entre más pequeño sea este punto, mejor es la resolución del equipo. Además, un set de filamentos de escaneo desvía el haz, para que se lleve a cabo el barrido punto a punto sobre la superficie de la muestra. Cuando el haz incide sobre la muestra, genera una región de excitación, de la cual surgen las diferentes señales. El área, forma, volumen y profundidad de esta región depende de la energía del haz de electrones y del número atómico (densidad) de los átomos de la muestra.<sup>77</sup>

Las señales generadas corresponden usualmente a electrones que impactan en un centellador, que convierte su energía en luz. Los fotones generados son capturados por un tubo fotomultiplicador (*photomultiplier tube*, PMT).<sup>77</sup> Esta pieza convierte de nuevo la luz en corriente eléctrica, que luego es amplificada, procesada y convertida a unidades de brillo, con las que se construye la imagen píxel por píxel. La información que contienen las imágenes depende del tipo de interacciones entre el haz de electrones y la muestra. Estas interacciones se clasifican como elásticas o inelásticas.<sup>77</sup>

Un ejemplo es la dispersión elástica, que consiste en la deflexión de electrones de alta energía causada por el núcleo de los átomos en la muestra o por la capa externa de electrones que poseen una energía similar a los electrones incidentes. En estos casos, cuando la interacción genera una pérdida de energía negligible y los electrones rebotan en con un ángulo mayor a los 90°, se dice que se tienen electrones retrodispersados (*backscattered electrons*, BSE).<sup>77</sup> Este tipo de señales dan información sobre la composición y la topografía

de la muestra. Cuando se tienen muestras con átomos de núcleos más pesados, se generan más BSE. Esto que resulta en señales más intensas que generan imágenes con tonos más brillantes, permitiendo así tener un contraste para átomos con diferentes números atómicos.<sup>77</sup>

Por su parte, en la dispersión inelástica los electrones incidentes transfieren energía a la muestra de forma que se ionizan los átomos y se generan electrones secundarios (*secondary electrons*, SE) con energías menores a 50 eV, usualmente entre 3 – 5 eV. Como se trata de electrones de tan baja energía, a diferencia de los BSE, los SE sólo pueden escapar de la superficie de la muestra, desde profundidades de unos pocos nanómetros. Por esta razón, las imágenes capturadas con detectores para SE tienen un alto contraste topográfico, logrando detalles en la superficie con resoluciones de hasta 10 nm o menos. Por su parte las imágenes de BSE recuperadas sólo alcanzan resoluciones de 1.0  $\mu\text{m}$ .<sup>77</sup> A pesar de ello, ambos modos de medición contienen información valiosa y fueron útiles en este proyecto.

Para las mediciones en SEM, las muestras se trataron previamente como se describe en Breedy y Guzmán.<sup>11</sup> Para ello, trozos de coral, escleritas y ejes aislados fueron colocados sobre un soporte de metal con cinta de carbono de doble cara y fueron recubiertas con carbono por deposición con un EmiTech K950K Sputter Coater. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido JSM-7900F de Jeol Ltd., Japón. Las micrografías fueron capturadas con distintas magnificaciones (de 85x a 45000x), con un detector de electrones secundarios (SED) que logra 0.7 nm de resolución, en condiciones de alto vacío ( $3.6 \times 10^{-4}$  Pa) y con un voltaje de aceleración de 5.0 kV. Lo anterior fue realizado en el Centro Interdisciplinar de Nanociencias de Marsella (CINaM), Francia, asociado a la Universidad de Aix-Marseille.

#### *Microscopía óptica no lineal: SHG y 2PEF*

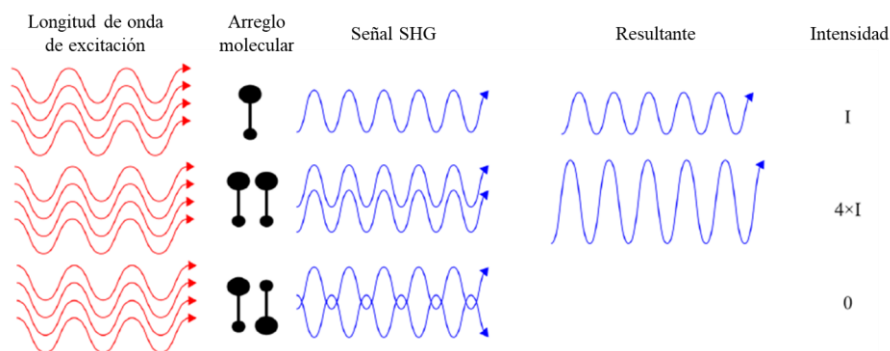
En la década de los 60, la invención de las fuentes de luz de alta intensidad de tipo láser dio paso al surgimiento de la espectroscopía no lineal.<sup>78</sup> Esta ciencia se encargó de describir aquellos fenómenos espectroscópicos que surgían de la interacción de la radiación de alta intensidad con la materia. Cuando se tiene una fuente de luz de baja intensidad, las interacciones con la materia son de primer orden, es decir, dependen linealmente de la intensidad de la luz.<sup>78</sup> Ejemplos de esto son la absorción lineal, la dispersión y la reflexión de la luz.<sup>79</sup> No obstante, cuando se utiliza como fuente de luz un láser, las interacciones ya

no varían de forma lineal respecto a la intensidad. Bajo estas condiciones, se producen interacciones de segundo o tercer orden, por ejemplo, la generación de armónicos secundarios (*Second Harmonic Generation*, SHG) y la absorción de dos o tres fotones.<sup>79</sup>

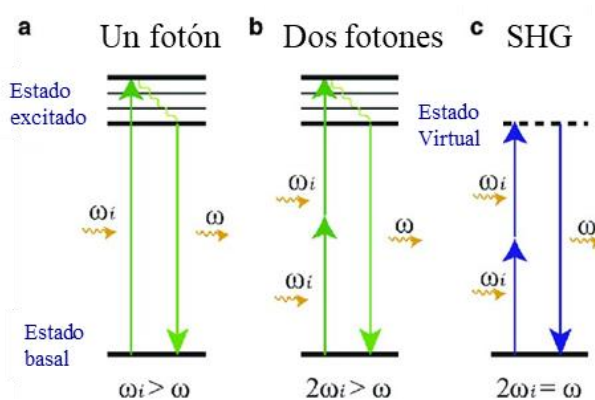
La SHG es un fenómeno particular debido a que surge de la hiperpolarizabilidad de ciertos tipos de moléculas, a los que se les llama armonóforos. Cuando un armonóforo se somete a un campo eléctrico oscilante y de alta frecuencia, como el de la luz, los electrones en dicha molécula se moverán de un lado a otro, de forma que se polarizan.<sup>80</sup> Estos procesos dependen del campo eléctrico aplicado y de factores ya conocidos para dicho armonóforo, como su momento dipolar permanente y su polarizabilidad (interacción lineal). Sin embargo, también son dependientes de otros factores, como las interacciones de segundo orden, dentro de las que se encuentra el SHG. A nivel espectroscópico, esto ocurre exactamente cuando dos fotones de frecuencia  $\omega$  se suman para llevar a la molécula a un estado virtual que se relaja sin pérdida de energía, emitiendo un solo fotón de frecuencia  $2\omega$ . A modo de ejemplo, si un láser pulsado que emite a 800 nm impacta un armonóforo, este emitirá la señal SHG exactamente a la mitad de la longitud de onda, es decir, a 400 nm.<sup>80</sup>

Este fenómeno se destaca debido a que esta hiperpolarizabilidad es fuertemente dependiente de la simetría de la molécula y por esta razón ocurre sólo en materiales no centrosimétricos. El SHG es un fenómeno coherente, lo que implica que las interacciones de la radiación en cada molécula producen una señal SHG que presentará interferencia constructiva o destructiva con la producida por otras moléculas circundantes, como se observa en la *Figura 2. 5*.<sup>80</sup>

Por esta razón, para tener una señal SHG intensa es necesario que a lo largo del material los armonóforos tengan sus dipolos orientados en la misma dirección y que estén agrupados entre sí por una distancia menor a la de la longitud de onda del láser. Esto logra la interferencia constructiva de la señal generada, posible solamente en materiales con alta densidad de armonóforos con una organización macromolecular de simetría no centrosimétrica. Como resultado, este se convierte en un método hipersensible a la distribución a distintas escalas de las moléculas no centrosimétricas en una muestra, como el caso del colágeno, la miosina y otros cristales orgánicos.<sup>78-80</sup>



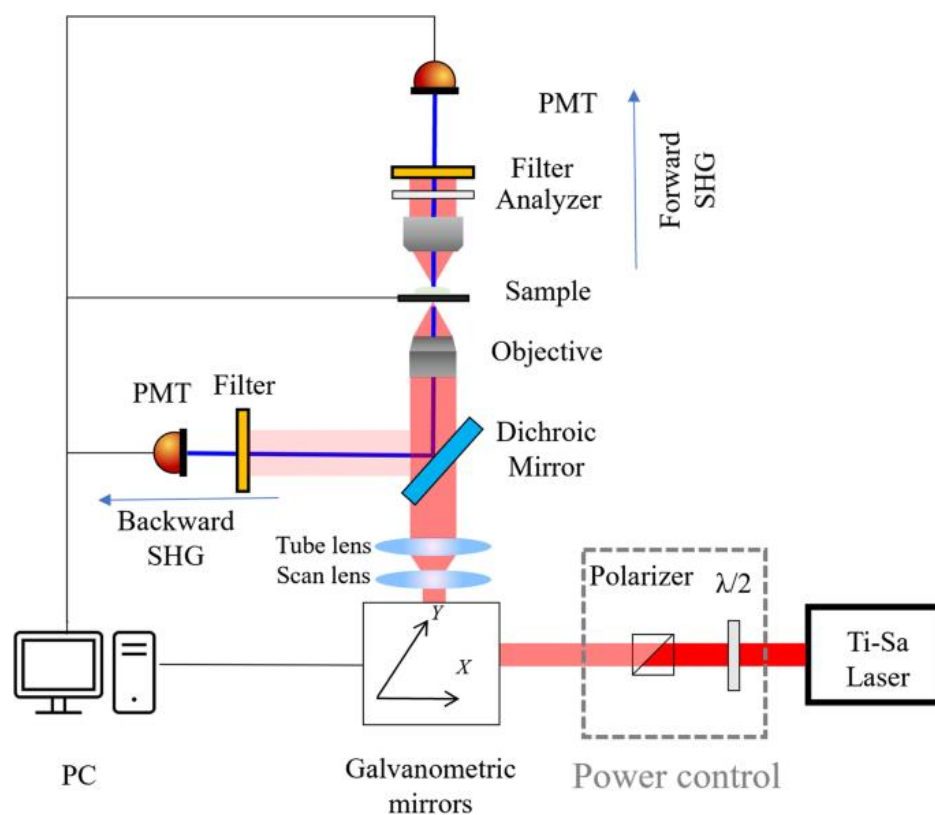
**Figura 2. 5** Comparación de la señal SHG producida por un solo dipolo, por dos dipolos paralelos y por dos dipolos antiparalelos.<sup>80</sup>



**Figura 2. 6** Comparación entre los diagramas de Jablonski de la fluorescencia causada por la excitación de a) un fotón, b) dos fotones y c) las señales de SHG.<sup>81</sup>

Por su parte, la absorción de dos fotones puede desencadenar procesos de tercer orden como la fluorescencia. Al igual que en SHG, en 2PEF también se combinan dos fotones de frecuencia  $\omega$  que llevan a la molécula a dicho estado excitado, pero en este caso sí ocurren pérdidas de energía, lo cual resultan en la emisión de un fotón de menor energía, como se observa en la *Figura 2. 6*. Por ejemplo, si se excita con el mismo láser a 800 nm, se obtendrán señales de fluorescencia a 450 o 500 nm. Dicho fenómeno ocurre de la misma forma que la fluorescencia lineal, en dónde los cromóforos en una molécula llegan a un estado excitado que posteriormente se relaja. No obstante, se utiliza radiación menor energía para la excitación, lo que evita problemas como el fotoblanqueamiento o la degradación del analito. Por esta razón, es una técnica de enorme utilidad en la biología y la medicina, sensible a moléculas autofluorescentes.<sup>80</sup>

Valiéndose de estos fenómenos y dada su conveniencia para el estudio de muestras biológicas, se desarrollaron la microscopía de barrido láser de fluorescencia de excitación de dos fotones (*two-photon excitation fluorescence*, 2PEF) y la microscopía SHG. Como ambos efectos comparten requerimientos técnicos similares, pudieron ser estudiados de manera simultánea y eficiente en un mismo instrumento.<sup>80</sup> De esta forma se implementó el uso de láseres pulsados en el infrarrojo cercano (700 – 1000 nm), con un periodo de 100 fs acoplado a un microscopio confocal modificado. Este microscopio debe contar con objetivos y un condensador de gran apertura numérica (>1) que enfoquen de manera localizada el láser sobre la muestra y recolecten la luz de forma eficiente. Además, se requiere de una óptica que permita la captura de las señales SHG y de fluorescencia producidas en dirección delantera y trasera (modos de transmisión y reflexión), como se observa en la *Figura 2. 7*.<sup>80</sup>



**Figura 2. 7** Configuración de un microscopio multifotónico SHG-2PEF con su fuente, controlador de poder, polarizador, sistema de escaneo, objetivos y detectores.<sup>80</sup>

Para el estudio de los pigmentos incluidos en las escleritas se utilizó microscopía SHG y 2PEF con el fin de evaluar el grado de ordenamiento de dichas moléculas en el biomineral.

Para ello se utilizaron láminas delgadas de cada muestra montadas sobre los portaobjetos y se colocaron en el microscopio confocal de fluorescencia multifotónica ECLIPSE Ni-E, de la marca Nikon. El objetivo utilizado fue un Apo LWD 25x 1.10W DIC N2. Para cada muestra, se tomó una microfotografía con luz polarizada para ubicar espacialmente cada región de interés (*region of interest*, ROI) con una cámara ORCA-Flash 4.0 LT C11440, de Hamamatsu. Luego, se encendió el láser infrarrojo de 810 nm, pulsado (100 fs) y con una potencia del 2% para excitar la muestra a 406 nm.

El microscopio está equipado con tres filtros que midieron de forma simultánea la luz reflejada y la luz transmitida de la señal de SHG a 406(15) nm y de fluorescencia a 460(60) nm y 550(88) nm, que suma un total de 6 canales que son capturados por un detector NDD A1plus, de Nikon. Para cada muestra se optimizaron los parámetros de intensidad [de 0 – 255] y de ganancia [de 0 a 100] hasta obtener una imagen de alta intensidad más no saturada. Se capturaron imágenes con aumento óptico de escaneo variable (entre 1x y 10x), una velocidad de escaneo de 0.5, con 8 o 16 acumulaciones, y con distintos modos de captura, entre ellos, imágenes sencillas, mosaicos y pila en “z” según fue necesario. Para la manipulación de las imágenes se utilizó el software NIS-Elements Viewer 5.21 de Nikon. Todas las mediciones fueron realizadas en el Laboratorio del Microscopía Multifotónica de Synchrotron SOLEIL.

## **Análisis espectroscópicos**

### *Espectroscopía UV-Vis-NIR*

La espectroscopía de absorción UV-Visible-NIR es una técnica que mide la atenuación de la radiación electromagnética causada por una sustancia que la absorbe. Usualmente, esta atenuación está relacionada con diferentes procesos de absorción, transmitancia y reflectancia de la luz en el rango de la luz ultravioleta, visible y en el infrarrojo cercano (*Near-Infrared*, NIR).<sup>82</sup> Cuando se hace incidir un haz de luz en dichos rangos de frecuencia sobre una molécula o un material, la radiación puede tener la energía suficiente para promover sus electrones a estados de energía más altos, llamados estados excitados. La excitación electrónica en moléculas orgánicas suele ocurrir en la región UV-Visible y es muy útil para identificar cromóforos, es decir, grupos funcionales con

electrones deslocalizados con orbitales desocupados de baja energía. Por su parte, los complejos de transferencia de carga pueden ser excitados en rangos desde el UV hasta el NIR. Aparte de esto, la radiación en el NIR puede causar la excitación de sobretonos de modos vibracionales o bandas de combinación en algunas moléculas.<sup>82</sup>

Esta técnica es utilizada frecuentemente en la cuantificación de analitos en muestras gaseosas, líquidas o sólidas, así como para la caracterización de las propiedades ópticas y electrónicas de un material. A pesar de ofrecer información útil acerca de los analitos en una muestra, algunas de las bandas observadas pueden ser anchas y dificultar la extracción de información cuantitativa, especialmente en muestras sólidas.<sup>82</sup> A pesar de esto, es muy útil en la determinación de la transmisión óptica o la reflectancia de los materiales.

Para llevar a cabo dicha labor, se requiere de un espectrofotómetro cuyo fin es cuantificar la atenuación de la luz causada por procesos de absorción, dispersión, reflexión o interferencia en la muestra. En otras palabras, determina la diferencia entre la intensidad de la luz incidente y la luz transmitida o reflejada al impactar la muestra.<sup>82</sup> Las configuraciones de cada espectrofotómetro dependerán de su función, pero poseen ciertos elementos básicos.

En primer lugar, poseen una fuente de luz, que suele tratarse de una combinación de una lámpara de deuterio para generar luz UV y una lámpara de tungsteno-halógeno, para generar luz visible y de NIR.<sup>83</sup> En segundo lugar, se tiene un soporte para muestras, distinto según cada necesidad. En tercer lugar, un monocromador difracta la luz blanca de forma que puede ser separada en las diferentes longitudes de onda del espectro y puedan llegar al detector y ser analizadas individualmente.<sup>83</sup> Los detectores pueden ser muy distintos entre sí, sin embargo, su función es determinar la cantidad de fotones de luz que provienen del monocromador según la longitud de onda. Por último, esta información es transformada y digitalizada por una unidad de procesamiento de datos, que facilita la recuperación y visualización de los resultados.<sup>83</sup>

En este caso se midieron espectros de reflectancia en el rango visible-NIR con un espectrofotómetro 508 PV™ de CRAIC Technologies acoplado a un microscopio de luz polarizada Eclipse LV100ND de Nikon ubicado en el CICIMA. Las escleritas extraídas se colocaron sobre un paño microfibras óptico color blanco. Se evaluaron diferentes colores y

tamaños de escalerita para cada espécimen. Los espectros se tomaron en modo de reflectancia de 350 a 1025 nm, con un promedio de cinco escaneos, un tiempo de escaneo de 300 ms, un factor de resolución de 1 nm, un valor de suavizado de 2, una apertura de 1 con un objetivo de 20x, que cubre un área de 50x50  $\mu\text{m}$  y una fuente de luz con un nivel intensidad de 6. Los espectros “oscuro” y de “referencia” (*Dark, Reference*) se registraron de la misma manera, enfocando sobre un estándar de reflectancia certificado USRS-99-010 de Labsphere.

### *Espectroscopía Infrarroja*

Esta es una técnica mediante la cual es posible determinar la fracción de luz infrarroja que es absorbida según su energía luego de pasar a través de una muestra. Un espectro IR se genera al graficar la cantidad de radiación absorbida según su energía, expresada en términos de número de onda ( $\bar{\nu}$ , en  $\text{cm}^{-1}$ ). En estos espectros, cada energía a la que se genera una señal corresponde con la frecuencia de un modo vibracional de una parte de las moléculas que componen dicha muestra.<sup>84</sup> No obstante, para que esto ocurra se debe cumplir con una regla de selección que requiere que estas vibraciones generen un cambio en el momento dipolar de la molécula. Estas vibraciones pueden ser generadas por un cambio en la longitud o en el ángulo de enlace entre dos átomos de una molécula, definidas como *estiramiento* y *flexión*, respectivamente.<sup>84</sup>

Las vibraciones de tipo estiramiento, estas pueden estar en fase y generar un *estiramiento simétrico* o pueden estar fuera de fase y generar un *estiramiento asimétrico*. Por su parte, las flexiones también contribuyen con vibraciones de tipo *deformación, balanceo, sacudida y torsión*.<sup>84</sup> Así mismo, las flexiones se describen respecto a un plano que resulta de partir a la molécula en dos mitades. De esta manera, puede describirse si estas flexiones se dan *en el plano o fuera del plano*, al mantener o distanciar a los átomos de dicho plano.<sup>84</sup>

Relacionado a esto, es necesario aclarar que cada molécula presenta una serie de grados de libertad dependiente del número de átomos que la conforma y estos determinan la cantidad de vibraciones que ella puede presentar.<sup>84</sup> Como cada vibración tiene una frecuencia específica cuya intensidad depende de la magnitud del cambio en el momento dipolar que genera, el conjunto de señales vibracionales de una molécula genera en el espectro IR una “huella digital” que la distingue<sup>84</sup>

Por todo lo anterior, esta técnica ha sido utilizada extensivamente en la identificación de especies químicas presentes en una amplia variedad de tipos de muestra. Para ello se han implementado diferentes tipos de espectrofotómetros que por lo general poseen un mismo arreglo de componentes: una fuente de radiación IR de Nernst, un interferómetro de Michelson, un receptáculo para muestras, un detector MCT de telururo de cadmio y mercurio, un amplificador de señal, un transductor analógico-digital y una computadora.<sup>84</sup>

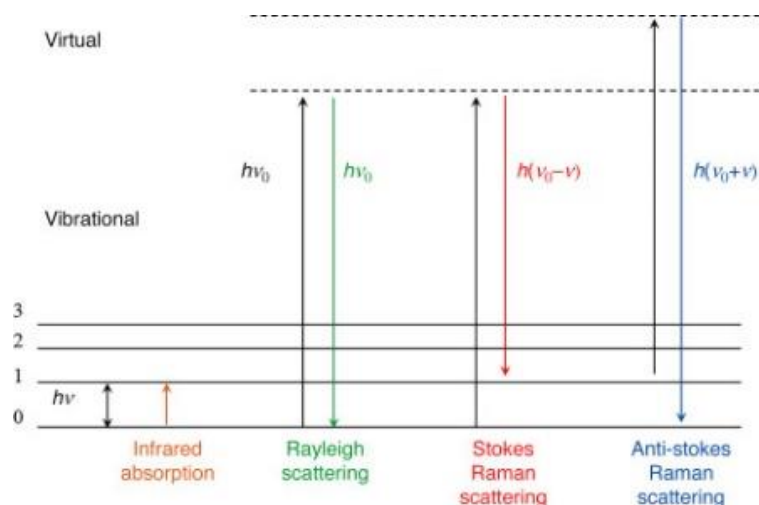
En la actualidad, la mayoría de los arreglos funcionan en modos de transmisión o reflectancia e implementan el uso del interferómetro mencionado anteriormente. Este divide en dos el haz infrarrojo que impacta la muestra y los hace viajar distancias distintas de manera que la posterior recombinación de ambos haces genera un interferograma en el ámbito de distancia y frecuencia. Este interferograma puede ser transformado al ámbito de intensidad y número de onda aplicando el método matemático llamado transformada de Fourier.<sup>84</sup> A estos equipos se les llama espectrofotómetros de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR).

En el caso de este proyecto se utilizó un microespectrofotómetro IR, que mediante el uso de un objetivo y un condensador Cassegrain, se logra enfocar el haz IR sobre la muestra y recuperar la luz reflectada sobre la muestra, respectivamente.<sup>84</sup> El análisis se realizó en el CICIMA con un espectrofotómetro micro FT-IR Spotlight 400 Imaging System de Perkin Elmer. Las escleritas extraídas se colocaron sobre un portaobjetos de oro, se enfocaron y se midieron. Los espectros IR se tomaron en modo de reflectancia de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , con intervalos de 2  $\text{cm}^{-1}$ , por 128 escaneos sobre un área enfocada de 50 x 50  $\mu\text{m}$  en la superficie de las escleritas. El espectro de fondo (*background*) se registró bajo las mismas condiciones, enfocado en la superficie de oro.

### *Espectroscopía Raman*

La dispersión Raman surge de la polarización inducida en una molécula por la acción de un campo magnético oscilante de una fuente de luz, que corresponde a un láser de frecuencia  $\nu_0$ .<sup>85</sup> En este proceso se excita la molécula a un estado virtual, de manera que se induce un dipolo que dispersa la luz en tres frecuencias luego de haber intercambiado energía o no con las vibraciones de dicha molécula. La dispersión Rayleigh conserva la misma frecuencia ( $\nu_0$ ) de la fuente de luz utilizada. Por su parte, cuando la luz interacciona con un

modo normal de vibración de la molécula de frecuencia  $\nu$ , puede producir una interacción inelástica de tipo  $\nu_0 + \nu$  o de tipo  $\nu_0 - \nu$ , generando así la dispersión Raman anti-Stokes y la dispersión Raman de Stokes, respectivamente.<sup>85</sup> Lo anterior quiere decir que la diferencia de energía de los fotones dispersados por el efecto Raman en una molécula es idéntica a los estados vibracionales o rotacionales de la misma, y por tanto es equivalente a la energía  $h\nu$  absorbida en un experimento de absorción de radiación IR, como se ejemplifica en la *Figura 2. 8*.<sup>85,86</sup>



**Figura 2. 8** Diagrama de Jablonski con las transiciones espectroscópicas correspondientes a las dispersiones elásticas e inelásticas para varios tipos de espectroscopia vibracional.<sup>86</sup>

La excitación en Raman se lleva a cabo con luz UV-Vis-NIR y no con radiación IR, como se utiliza en espectroscopía IR. A pesar de ello, las señales sí se observan entre los 220 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , valores que corresponden a la frecuencia expresada en números de onda ( $\bar{\nu}$ ).<sup>85</sup> A diferencia de la absorción intensa de radiación IR en moléculas con vibraciones asimétricas, el efecto Raman se presenta usualmente en vibraciones simétricas que cambian la polarizabilidad de las moléculas.<sup>85</sup> Por ello, según el tipo de analito estudiado, muchas de las señales son complementarias a las obtenidas por IR y no responden al mismo tipo de interferencias como por ejemplo, a la presencia de agua o al uso de vidrio.<sup>85</sup>

A pesar de sus ventajas, la dispersión Raman es un fenómeno que ocurre con muy poca frecuencia y la señal producida es muy débil.<sup>85</sup> No obstante, como la luz es dispersada en varias direcciones (de 90 a 180° respecto a la dirección del haz de luz incidente) se han

implementado diferentes configuraciones ópticas que permiten captar esta débil señal con gran eficiencia.<sup>85</sup> Al mismo tiempo, estos arreglos se han adaptado perfecta y convenientemente a microscopios ópticos. Esto permitió adaptar el tamaño, el posicionamiento y el tipo de muestras, haciendo posible la implementación de la microespectroscopía Raman. De esta manera es como se estudian muestras de pequeño tamaño o con heterogeneidad microscópica, con la capacidad de identificar la identidad de las especies químicas en ellas.<sup>85</sup>

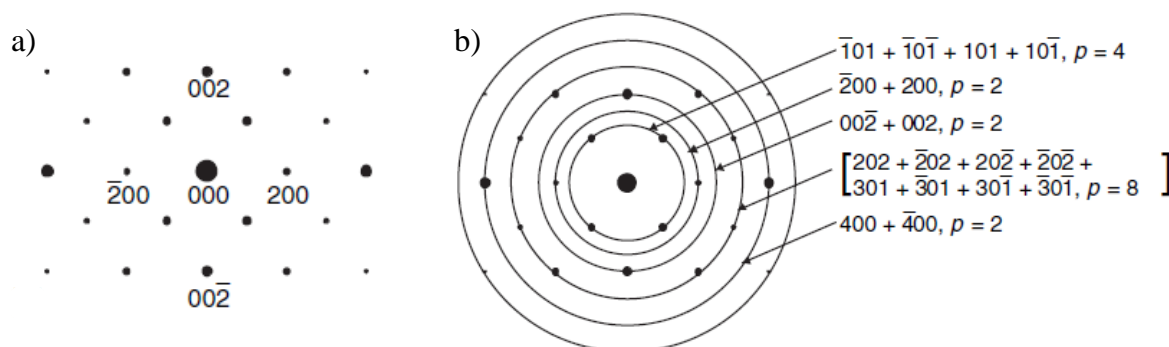
Por esta razón, se implementó el uso de esta técnica para el análisis de los pigmentos ubicados en las escleritas de coral y obtener información sobre ellos. Las mediciones se realizaron en el Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales (CICIMA) utilizando un microscopio Raman confocal alpha300 R de WITec acoplado a un espectrofotómetro UHTS 300 VIS-NIR SMFC con una rejilla de 600 g/mm con resolución espectral de  $1 \text{ cm}^{-1}$  y un detector FI-CCD. Los espectros se tomaron con un láser WITec 532NW que opera a 532.2 nm y con espectros con un rango de 0 a  $3600 \text{ cm}^{-1}$ , centrado en  $1900 \text{ cm}^{-1}$ . Se tomaron espectros puntuales en las escleritas aisladas y en la superficie de las ramas de cada espécimen colocados sobre un portaobjetos de vidrio. Para los escaneos de espectro único (*Single scan*), la potencia del láser se fijó en 2 mW, con 10 acumulaciones, un tiempo de integración de 0.5 s y un objetivo de magnificación 20x.

La adquisición y análisis de datos se realizaron con el software WITec Suite Five, donde se aplicó la función de Remoción de Rayos Cósmicos (*Cosmic Ray Removal, CRR*) + Suavizado (*Smooth function*), con un tamaño de filtro de 1 (*Filter Size = 1*) y un factor dinámico de 1 (*Dynamic Factor = 1*). La sustracción de fondo del gráfico (*Graph Background Subtraction*) se realizó con un tamaño de forma de 300 (*Shape Size = 300*).

### **Difracción de rayos X en polvos**

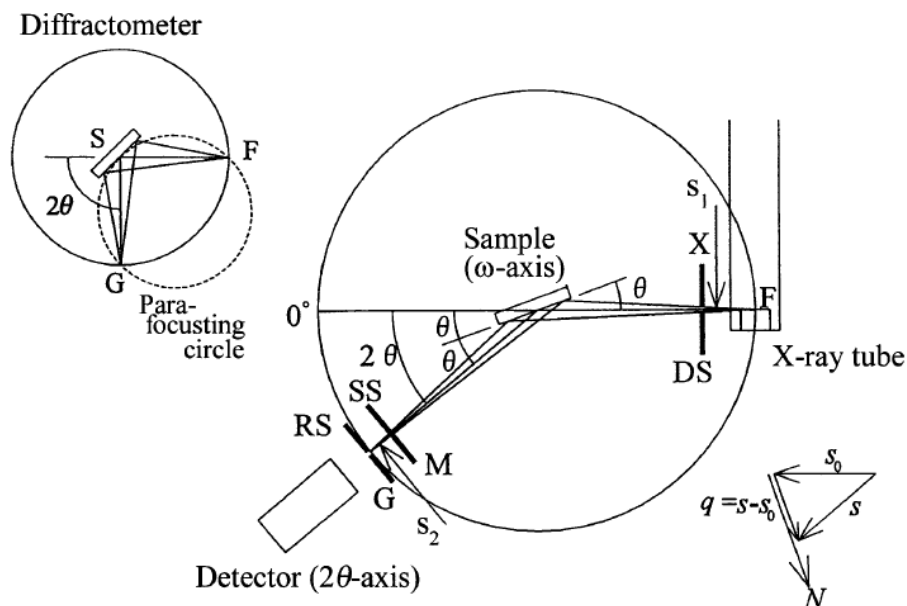
La difracción de rayos X permite obtener información cristalográfica de sólidos policristalinos. Mediante esta técnica es posible identificar las fases cristalinas presentes en mezclas de diferentes sustancias cristalinas, por ejemplo, en minerales.<sup>87</sup> Este tipo de muestras contienen una gran cantidad de cristalitos micro o nanométricos, dispuestos en orientaciones aleatorias. Por esta razón, cuando un haz monocromático de rayos X impacta

la muestra, y se difracta se genera un arreglo de redes recíprocas orientadas aleatoriamente.<sup>87,88</sup> Por esta razón, un patrón de difracción consiste en una proyección de la red recíproca ponderada en la que cada máximo de difracción se define por un ángulo de Bragg y su intensidad.<sup>88</sup> Esta red recíproca ponderada consiste en una serie de anillos concéntricos generados por la proyección de conos de difracción, cuyos valores  $hkl$  equivalen a los de un patrón de puntos de una red recíproca generada por un monocristal, como se ejemplifica en la (Figura 2. 9).<sup>87</sup>



**Figura 2. 9** Representación de los patrones de difracción de puntos generados por un monocristal de una sustancia arbitraria (a) y de los anillos generados por un polvo policristalino de dicha sustancia (b), a los que se superpone el patrón en a).<sup>87</sup>

El difractor de rayos X es el instrumento que permite obtener la intensidad de los rayos X difractados en una muestra policristalina en función de aquellos ángulos que satisfacen la ley de Bragg para una longitud de onda determinada. Para ello, cuenta con tres componentes principales: una fuente de rayos X (F) con un monocromador, un portamuestras (S), y un detector (G).<sup>89</sup> Estos están dispuestos a lo largo de la circunferencia del círculo de enfoque, en el que la fuente es fija y el detector se mueve en el eje  $2\theta$ , como se muestra en la Figura 2. 10. Por su parte, la muestra colocada en un portamuestras plano se coloca en un eje  $\omega$ , paralela al punto focal de línea en el objetivo de la fuente de rayos X.<sup>89</sup> A esto se le llama la parafoalización Bragg-Brentano.<sup>88</sup>



**Figura 2. 10** Esquema de la geometría de la para focalización Bragg-Brentano y los componentes de un difractómetro de rayos X.<sup>89</sup>

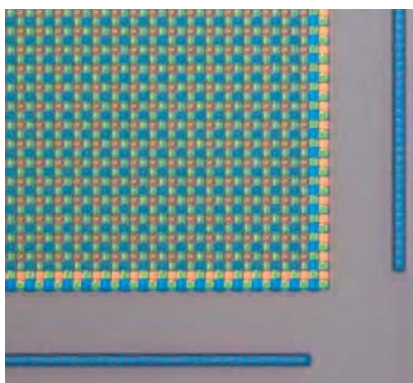
Durante la medición, el eje  $2\theta$  se desplaza el doble que el eje  $\omega$  para lograr que el ángulo  $\theta$  entre la muestra y el haz de rayos X incidente sea igual al ángulo del haz difractado respecto a la dirección de propagación del haz incidente, como se ilustra en la *Figura 2. 10*. Además de sus componentes principales, el difractómetro cuenta con rejillas denotadas como DS, SS y RS. Su función es mejorar la resolución espacial al reducir la dispersión horizontal y perpendicular del haz de rayos X incidente y difractado.<sup>89</sup>

Los patrones de difracción en este caso fueron recolectados en el CICIMA con un difractómetro de rayos X multipropósito EMPYREAN de Malvern Panalytical utilizando una configuración de Capilar Giratorio (*Capillary Spinner*). Esta configuración permite la extracción de patrones de difracción de alta calidad de muestras pequeñas (~100 mg). De esta forma, las escleritas extraídas se colocaron dentro de un capilar de vidrio que fue sellado con un soplete de butano y fijado en el portaobjetos con cera de abejas. Se utilizó un eje tipo Gonio para realizar un escaneo continuo, donde los ángulos de difracción  $2\theta$  variaron de  $20^\circ$  a  $100^\circ$  en pasos de  $0.0070^\circ$ . La medición se realizó a  $20^\circ\text{C}$ , con radiación  $K\alpha$  de Cu, una corriente de 40 mA y una energía de 40 kV. Mediante el software HighScore Plus, se realizó el refinamiento Rietveld, la identificación y la cuantificación de fases para cada muestra.

## Fotografía digital (RGB)

La fotografía digital debe entenderse como un método de adquisición de imágenes que permite obtener una gran cantidad de información sobre muestras completas y de gran tamaño. En cada píxel de una imagen generada por una cámara digital se registra la información espacial y de color del objeto estudiado.<sup>90</sup> En este proceso, la luz proveniente del objeto es capturada por los lentes ópticos de la cámara, que transmiten la luz al detector en un tiempo limitado por el obturador. El detector detecta la intensidad y el color de la imagen proyectada y genera una señal eléctrica que es amplificada por un circuito análogo y luego convertida a información digital para ser recibida por el procesador de imagen. Posteriormente la imagen es guardada en una memoria *Flash*.<sup>91,92</sup>

Los detectores pueden ser de tipo CCD (*Charge-Cuopled Device*) o CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*). Estos contienen una cuadrícula con millones de receptores de luz llamados fotositios, que convierten la luz en carga eléctrica a lo largo y ancho del detector. La magnitud de la carga depende de la intensidad de la luz, sin embargo, en sí mismos, los fotositios no miden color. Por esta razón, cada uno de estos fotositios se cubre con un filtro rojo, verde o azul, de manera que cada receptor individual mide la intensidad de cada color, como se ve en la Figura 2. 11.<sup>91,92</sup> Por esta razón, la información recuperada es una imagen de 3 canales: Rojo-Verde-Azul, llamada RGB (*Red-Green-Blue*).<sup>91</sup>



**Figura 2. 11** Micrografía de los fotoreceptores de un detector CCD de una cámara digital.<sup>91</sup>

La captura de una imagen digital en el espacio RGB responde de manera muy distinta a la luz capturada por el ojo humano. En la práctica, los valores de intensidad capturados

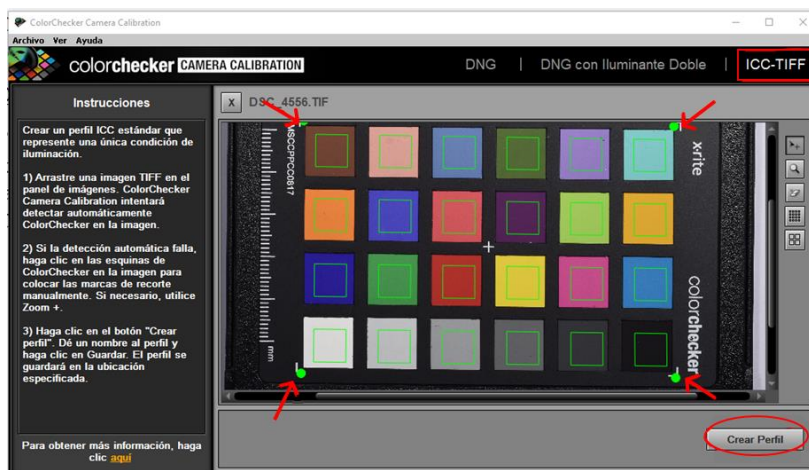
dependen de la distribución de intensidad de luz en el espectro visible de la fuente de luz que ilumina el objeto, de la reflectancia del objeto en cuestión y de respuesta espectral de cada uno de los 3 canales del detector de la cámara.<sup>71,93</sup> Por esta razón, la toma de una fotografía fiel a lo observado en el campo con la que se puedan llevar a cabo técnicas colorimétricas requiere de meticulosos procesos de calibración.<sup>94</sup> Para ello, se fotografía un set de colores de muestra, bajo las mismas condiciones de iluminación en las que se capturan las imágenes, para los cuales se conocen sus valores exactos en un espacio de color. A partir de esto, es posible ajustar la respuesta de color de la cámara bajo la misma iluminación con respecto a los valores en las coordenadas de color reportados para el patrón de color utilizado.<sup>94</sup>

En esta investigación, se capturaron imágenes digitales de cada espécimen completo con el fin de obtener su codificación hexadecimal del color en el espacio RGB. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Nikon D7200 con patrones de color ColorChecker Passport de la marca X-Rite. El objetivo de uso del ColorChecker es obtener imágenes digitales con colores fieles a los colores reales de la muestra fotografiada. Para obtener imágenes digitales calibradas, se tomó una foto al ColorChecker bajo las mismas condiciones de iluminación con la que se tomaron las fotografías de los corales.

A partir de esta fotografía, se obtuvo un perfil de color mediante el software y se corrigió el color de las fotografías de cada muestra con el programa de edición digital, Adobe Photoshop. Posteriormente, mediante el software de análisis de imágenes Fiji-ImageJ, se obtuvieron histogramas de color que ayudaron a determinar un código RGB promedio de la región de interés en cada imagen. El procesamiento de las imágenes se detalla a continuación.

#### Obtención de un perfil de color

En el software ColorChecker Passport Camera Calibration, se seleccionó la opción ICC-TIFF y arrastró la fotografía digital del ColorChecker en formato TIFF. Se ajustaron los marcadores de posición color verde en las esquinas del ColorChecker, de manera que los recuadros de color verdes estuvieran alineados con los recuadros en la fotografía digital, como se observa en la *Figura 2. 12*. Se dio clic en Crear Perfil y se guardó en formato ICM.



**Figura 2. 12** Ventana del programa ColorChecker Passport Camera Calibration para la generación del patrón de color.

### Edición digital

A cada una de las imágenes se les cambió el perfil de color en el programa de edición digital Adobe Photoshop. Para ello, en la pestaña de “Edición (*Edit*)”, se seleccionó la opción “Asignar Perfil (*Assign Profile*)”. En la ventana emergida, se seleccionó la opción “Perfil (*Profile*)” y se eligió el perfil de color correspondiente, que es el mismo que se había guardado anteriormente desde el programa ColorChecker Passport Camera Calibration. Desde el software de edición digital, por medio del uso de máscaras se descartaron todas aquellas partes de la imagen que no eran de interés (sombras, fondo). Por último, las fotografías fueron exportadas en formato TIFF.

### Análisis de Color

Las imágenes calibradas se analizaron con en el software de análisis de imagen Fiji-ImageJ. Primero, para cada coral se definió la región de interés en la que aplicará el histograma, siguiendo la ruta *Image > Adjust > Color Threshold*, con los siguientes parámetros: *Thresholding method = Default, Thresholding color = Red, Color space = RGB; Dark Background = No; Red = [0, 255], Pass = Sí; Green [0, 254], Pass = Sí; Blue [0, 254], Pass = Sí*. Se dio clic a la opción “*Select*” y con el área de interés seleccionada, se hace el histograma, siguiendo la ruta *Analyze > Histogram*. Para cada canal R, G y B en cada imagen,

los parámetros *N*, *StdDev*, *Mean*, *Mode* fueron recopilados, así como la información de intensidad (eje x) contra de cantidad de pixeles (eje y) para construir los histogramas en un software de análisis de datos.

### **Técnicas de análisis con radiación de Sincrotrón**

Durante esta investigación, se tuvo acceso a las líneas de luz DISCO y ANATOMIX, ubicadas en el sincrotrón nacional francés, llamado Synchrotron SOLEIL, ubicado en Saint Aubin, Francia. Este es un acelerador de partículas (electrones) que produce radiación de sincrotrón, caracterizada por su luz extremadamente brillante con la que es posible estudiar todo tipo de muestras biológicas e inertes.<sup>95</sup> Esto se logra gracias a su amplio rango espectral, que cubre desde el infrarrojo (unos pocos  $\mu\text{eV}$ ) hasta rayos X duros (100 keV). De esta manera, se da servicio a la investigación fundamental en física, química, biología y ciencias de materiales, de la salud, de la atmosfera y de la tierra.<sup>95</sup>

La radiación de sincrotrón es emitida por electrones de muy alta energía que viajan a velocidades relativistas en el vacío a lo largo del anillo de almacenamiento, un camino de más de 350 m de circunferencia. Estos electrones se generan de un cañón de electrones e inmediatamente son acelerados por un acelerador lineal (LINAC) hasta los 100 MeV. Posteriormente, los electrones son enviados al *booster*, un acelerador circular que los lleva a una energía de 2.7 GeV con la que pueden ser inyectados al anillo de almacenamiento.<sup>96</sup> La trayectoria lineal del haz de electrones se corrige gracias a la fuerza de Lorentz producida por campos magnéticos de alta potencia, producidos por una serie de hexa u octapolos y onduladores. De esta manera, al desviarse, los electrones producen un haz de luz extremadamente fino y de altísima energía tangente al camino de estos. A partir de aquí, cada línea de luz (*beamline*) aprovecha una fracción del espectro de la radiación generado para estudiar diferentes muestras mediante una técnica analítica específica.<sup>96</sup>

#### *Línea de luz DISCO*

DISCO (*Dichroism, Imaging, mass Spectrometry for Chemistry and biOlogy*) es una línea de luz que trabaja en un rango desde el ultravioleta al vacío (VUV, *Vacuum Ultraviolet*) hasta la luz visible (1-20 eV, 60-1200 nm), con lo cual se llevan a cabo experimentos de

dicroísmo circular, microscopía de fluorescencia y espectroscopía de fluorescencia.<sup>97</sup> Se utilizó la tercera estación, dedicada a la microespectroscopía y microscopía de fluorescencia, que cubre desde los 180 hasta los 1000 nm. Con esta configuración, se tiene la capacidad de excitar las muestras en cualquier longitud de onda en este rango y recuperar la información espectroscópica o imágenes de muestras biológicas o inertes con una resolución lateral de hasta 100 nm.<sup>97</sup>

### Microespectroscopía de fluorescencia: Polypheme

De la misma forma que en el resto de las técnicas espectroscópicas anteriormente descritas, la fluorescencia es un fenómeno físico que surge de la interacción de la luz con las moléculas de una muestra. En este caso, la fluorescencia se define como la emisión de luz que ocurre después de la absorción de radiación de mayor energía en un ámbito de tiempo que se encuentra en los nanosegundos. Esto ocurre cuando la radiación incidente es absorbida por una molécula en su estado basal con la energía suficiente como para mover sus electrones más externos a un nivel de energía mayor, el estado excitado. Dichos procesos ocurren en los fluoróforos, definidos como moléculas con una gran cantidad de electrones deslocalizados que contienen, por ejemplo, cadenas o anillos con dobles enlaces conjugados.<sup>98</sup>

Para que ocurra el fenómeno de fluorescencia, la energía de un fotón que es absorbida por la molécula debe ser disipada poco a poco por medio de procesos de relajación vibracional para dar paso a la emisión de otro fotón de menor energía que el incidente. A este cambio de energía se le denomina el desplazamiento de Stokes.<sup>98</sup> El diagrama de Jablonski para este proceso fue mostrado anteriormente, en la *Figura 2. 6. a*.

Si se utiliza un espectrofotómetro para captar la fluorescencia de una muestra, se puede medir un espectro que contiene el rango de longitudes de onda de los fotones emitidos de las moléculas que la componen. Mientras la radiación incidente sea lo suficientemente energética como para excitar una molécula, el rango de longitudes de onda de los fotones emitidos no dependerá de la longitud de onda de la radiación incidente.<sup>98</sup>

Es precisamente esta la base de la microespectroscopía de fluorescencia. A un microscopio se le acopla una fuente de luz ultravioleta, de manera que es posible excitar una

muestra de tamaño microscópico y recuperar la fluorescencia emitida en esa zona. Esta fluorescencia será descompuesta a lo largo del espectro por un monocromador, que enviará la intensidad de luz emitida para longitud de onda al detector.<sup>83</sup> De esta manera, al acoplar la espectroscopía a las imágenes por microscopía surge la imagenología espectral. Así es posible obtener información espectral de varios puntos de la muestra, de forma que se construye un mapa en el que cada píxel está caracterizado por un espectro de fluorescencia.<sup>99</sup>

Previo a la medición de las muestras, se alineó el haz de luz y se calibró el espectrofotómetro contra un patrón de referencia conocido (su composición es confidencial). Posteriormente, se colocó directamente una muestra de escleritas sobre el portaobjetos circular de cuarzo. Para ello se introdujo una aguja dentro del polvo de escleritas y la muestra recolectada se dispersó sobre el portaobjetos. Este último fue fijado dentro de un adaptador circular de acero inoxidable a la platina del microscopio.

La muestra preparada se colocó en el microscopio, asegurando un contacto indirecto entre el objetivo y el cristal de cuarzo mediado por una gota de glicerina. El microscopio se utilizó en el modo de transmisión con un objetivo de 40x y una configuración de captura de imagen. Se seleccionó una zona de interés en la muestra y se enfocó. A partir de este punto, se trabajó a oscuras para evitar la contaminación con fuentes de luz externas. Posteriormente, por medio del programa LabSpec 6, se hace un segundo enfoque con la cámara del microscopio y se capturan las fotos del mosaico del área en el que se harán las mediciones.

En este punto, se cambió la configuración del microscopio para la captura de espectros. Se seleccionaron distintas ROI sobre las cuales se midieron los espectros de fluorescencia, correspondientes con escleritas de distintas formas y tamaños. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 275 nm y los espectros se midieron de 280 a 550 nm, con el monocromador de 150 gr/mm centrado en 420 nm. Para cada punto (píxel) de la ROI, se realiza una sola medición con un tiempo de adquisición de 10 segundos.

#### Microscopía de fluorescencia: Telemos

Por su parte, la microscopía de fluorescencia funciona mediante los mismos principios físicos que la espectroscopía de fluorescencia, sin embargo, el objetivo de la

técnica es distinto. En este caso, se busca capturar varias imágenes de alta calidad, que responden a la intensidad de la emisión de una muestra en distintas secciones del espectro visible.<sup>98</sup> De esta manera, es posible caracterizar morfológicamente aquellas estructuras compuestas por moléculas fluorescentes al bloquear completamente la luz utilizada para la excitación. Para ello presenta diferentes cambios a nivel técnico. En este caso, el microscopio suele estar epi-iluminado por una fuente de luz UV de arco de Mercurio o Xenón. En esta configuración los objetivos del microscopio no sólo captan la luz emitida por fluorescencia y magnifican la imagen, sino que transmiten la luz de excitación a la muestra.<sup>98</sup>

Cuando esto sucede, la radiación de excitación reflejada en la muestra y la emitida se combinan en el objetivo. Para separar ambas longitudes de onda, se requiere del uso de un espejo dicróico colocado a 45°, especialmente diseñado para reflejar la longitud de onda de excitación y dejar pasar hacia el detector aquellas longitudes de onda emitidas de menor energía.<sup>98</sup> Entre el espejo dicróico y el detector, se encuentra un carrusel con filtros diseñados para dejar pasar selectivamente ciertas bandas del espectro visible con el objetivo de detectar de manera específica la luz emitida por un fluoróforo determinado.<sup>98</sup> Esto permite generar imágenes compuestas al combinar microfotografías de una misma ROI capturadas con diferentes filtros. Por su parte, el detector suele ser una cámara digital de tipo CCD, que capta la intensidad de la luz luego de haber sido filtrada.<sup>98</sup>

En este caso, previo a la medición de las muestras, se alineó el haz de luz sobre un patrón de referencia conocido. El microscopio se utilizó en el modo de transmisión con un objetivo de 40x. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 275 nm, se seleccionó un espejo dicróico a 310 nm y varios filtros para capturar las imágenes de fluorescencia, específicamente: #3) 340(22) nm, #4) 370(36) nm, #5) 480(30) nm, #6) 425(26) nm, #9) 535(50) nm y #10) 400(40) nm. A un portaobjetos de cuarzo vacío se le tomaron la imagen del blanco (*white*) a lo largo del todo el rango focal en “z”, con el haz de luz abierto y sin filtros. Además, se tomó la imagen oscura del blanco (*dark of white*) sin rango focal, con el haz de luz cerrado y un tiempo de adquisición de 100 ms.

Posteriormente, se colocó directamente una muestra de escleritas sobre el portaobjetos circular de cuarzo con una aguja y fue dispersada. El portaobjetos fue fijado

dentro del adaptador circular de acero inoxidable a la platina del microscopio. Se aseguró un contacto indirecto entre el objetivo y el cristal de cuarzo mediado por una gota de glicerina. Se seleccionó una zona de interés en la muestra y se enfocó. A partir de este punto, se trabajó a oscuras para evitar la contaminación con fuentes de luz externas. Posteriormente, se hizo un segundo enfoque con la cámara del microscopio y se capturaron las fotos del mosaico que representó el área en el que se hicieron las mediciones.

Para cada ROI se capturaron las imágenes de fluorescencia con cada filtro, optimizando el punto focal en el eje “z” y el tiempo de adquisición para cada filtro, que se fijó en 20 s. Luego, se capturó la imagen oscura (*dark*) de cada filtro utilizando los mismos parámetros que se utilizaron para capturar las imágenes de las muestras. Posteriormente, mediante el uso de un plugin en FIJI(ImageJ) diseñado por DISCO, se corrigió cada imagen utilizando la *Ecuación 1*, en donde  $I_c$  es la intensidad corregida de la imagen,  $I$  es la intensidad original de la imagen,  $D_{(t, filter)}$  es la intensidad del *dark*,  $W$  es la intensidad del *white* y  $D_{(100 ms, no filter)}$  es la intensidad del *dark of white*.

$$I_c = \frac{I - D_{(t, filter)}}{W_{(z)} - D_{(100 ms, no filter)}} \quad [ 1 ]$$

### *Línea de luz ANATOMIX*

ANATOMIX (*Advanced NAnoTOMographic Imaging with coherent X rays*) es una línea de luz para micro- y nano- tomografía computarizada ( $\mu$ CT y nano-CT). Cuenta con dos cabinas experimentales ubicadas a 170 y 200 m de la fuente, en las que se pueden utilizar tanto un haz de rayos X monocromático o blanco (policromático), mediante el uso de un monocromador de doble cristal de Si-111.<sup>100</sup> Para  $\mu$ CT, utiliza una geometría de haz paralelo, con energías de 10 a 50 keV para haz blanco o de 10 a 25 keV para un haz monocromático, pudiendo admitir muestras de hasta 20 x 15 mm con una resolución máxima de 0.3  $\mu$ m.<sup>100</sup>

Por su parte, la nano-CT posee una modalidad de microscopía de rayos X (TXM), con la capacidad de analizar muestras pequeñas con una resolución máxima de 20 nm, con energías de 7 a 17 keV.<sup>100</sup> Esta línea de luz permite obtener imágenes en 3 dimensiones (3D) útiles para hacer estudios estructurales de materiales, pruebas mecánicas, anatomía de organismos, y en el campo biomédico, en donde se vale de su excelente desempeño en

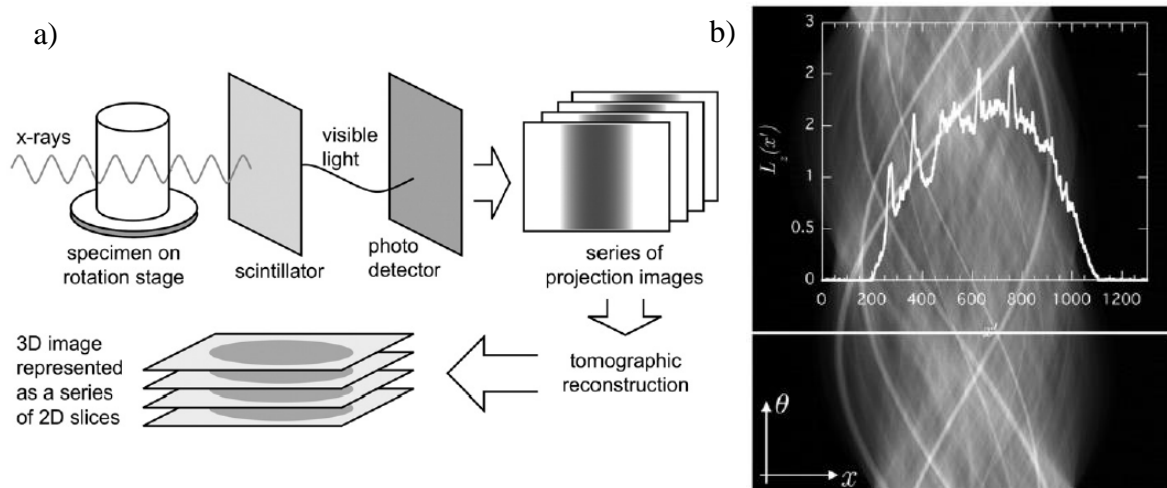
contraste de fase, ideal para estudiar sistemas heterogéneos con tejidos blandos y estructuras calcificadas.<sup>100</sup>

### Microtomografía computarizada de rayos X ( $\mu$ -CT)

La microtomografía de rayos X se basa en los escáneres de tomografía axial computarizada, usados desde hace 40 años como una técnica de imagenología médica. Una tomografía se construye a partir de varias radiografías, que se definen como una proyección de un cuerpo impactado por un haz de rayos X.<sup>101</sup> Estas proyecciones se generan debido a que los rayos X son absorbidos por un cuerpo en función de la absorptividad de los materiales que lo componen y de la distancia por la que la radiación viaja a través de ellos. A su vez, la absorptividad molar del material depende de su densidad y del número atómico de los átomos que lo componen.<sup>101</sup> Así, a mayor densidad y número atómico el haz será más absorbido y la proyección aparecerá más oscura. Por ello se tiene la capacidad de obtener contraste en las radiografías, propiedad con la que es posible identificar distintas estructuras en una muestra.<sup>101</sup>

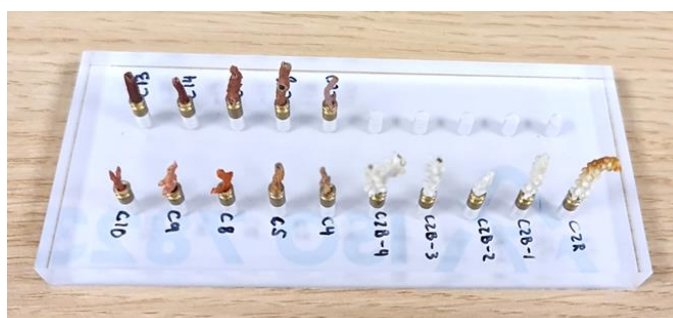
Para construir una imagen tomográfica, es necesario tomar una serie de proyecciones de la muestra mientras esta gira sobre un eje definido, como se observa en la *Figura 2. 13 a*). Posteriormente, se hace un proceso crítico llamado reconstrucción tomográfica, que comprende complejos algoritmos matemáticos, cuya estructura general se describe a continuación. Primero, a la imagen de cada proyección tomada se extrae una línea de píxeles, y se analiza su intensidad a lo largo de la línea.<sup>101,102</sup> A partir de aquí, se calcula una función de posición vs intensidad para cada ángulo de rotación, y genera un gráfico llamado sinograma (*Figura 2. 13 b*).

La reconstrucción de las imágenes tridimensionales se puede hacer mediante distintos métodos, como *Filtered Back Projection* o *Direct Fourier Inversion*,<sup>101</sup> basada en el teorema de las rebanadas de Fourier. En este último caso, al sinograma se le aplica una transformada de Fourier, para obtener un nuevo set de datos para el cual es más sencillo aplicar una serie de filtros que reducen algunos de los artefactos (defectos) propios de la medición. Finalmente, se aplica el inverso de la transformada de Fourier para obtener la retroproyección de cada imagen y así obtener una imagen en 3D reconstruida.<sup>102</sup>



**Figura 2. 13** a) Esquema general de la adquisición y procesamiento de una microtomografía para la obtención de imágenes en 3D. b) Ejemplo de un sinograma con una función de Intensidad-posición superpuesta.<sup>101</sup>

En las microtomografías de las ramas de coral se utilizó la modalidad de microimagen con haz paralelo para realizar las mediciones. Se tomaron varias muestras del espécimen a estudiar con ayuda de tijeras de disección. Se colocaron sobre los portaobjetos (pines metálicos) con pegamento de cianoacrilato. Para facilitar su manipulación, los mismos se colocaron en una placa de acrílico, como se muestra en la *Figura 2. 14*. Antes de la medición, el pegamento se dejó secar por un tiempo no menor a 5 horas.



**Figura 2. 14** Preparación de muestras de coral para  $\mu$ -CT en pines sobre una placa de acrílico.

Las tomografías se realizaron en dos configuraciones distintas según cada caso. Para conocer la morfología general de ramas completas de coral, se utilizó un haz policromático de rayos X. El tamaño efectivo de píxel fue de  $3 \mu\text{m}$  y la distancia entre el centellador y la

muestra fue de 20 mm. El tiempo de exposición fue de 35 ms por proyección, lo que resultó en una duración de aproximadamente 3 min para cada escaneo. Para la óptica de microscopio se utilizó un objetivo con un aumento de 2x.

Por su parte, para estudiar la morfología a mayor resolución, se empleó un haz monocromático de rayos X, con una energía de 10 keV. El tamaño efectivo de píxel fue de 0,325  $\mu\text{m}$  y la distancia entre el centellador y la muestra fue de 5 mm. El tiempo de exposición fue de 300 ms por proyección, lo que resultó en una duración de aproximadamente 11 min para cada escaneo. Para la óptica de microscopio se utilizó un objetivo con un aumento de 20x (Mitutoyo, Kawasaki, Japón). Para ambos arreglos, se hicieron escaneos de 2000 proyecciones en un rango angular de 180°. Además, se utilizó un detector con un centellador de granate de aluminio y lutecio (LuAG:Ce) monocristalino y una cámara CMOS de grado científico con 2048  $\times$  2048 píxeles (Orca Flash 4.0 V2, Hamamatsu, Japón).

Los volúmenes 3D de los corales se reconstruyeron con un tamaño de vóxel de 3 y 0,325  $\mu\text{m}$ , según fue necesario, utilizando el flujo de procesamiento de datos estándar de la línea ANATOMIX con el programa PyHST2.<sup>103</sup> Las imágenes se recortaron, se convirtieron a un formato de 8-bit y se analizaron con FIJI (ImageJ-win64, National Institute of Health, Rockville Pike Bethesda, Maryland, Estados Unidos de América).<sup>104</sup> Además, las imágenes 3D fueron segmentadas de manera interactiva con el software Dragonfly versión 2022.2 (Object Research Systems (ORS), Montreal, Canada). De esta manera, cada tipo de estructura se pudo aislar, etiquetar como una ROI, resaltar y parametrizar. Para la representación de los volúmenes, se asignó un color constante a cada ROI.

## CAPÍTULO III

### CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

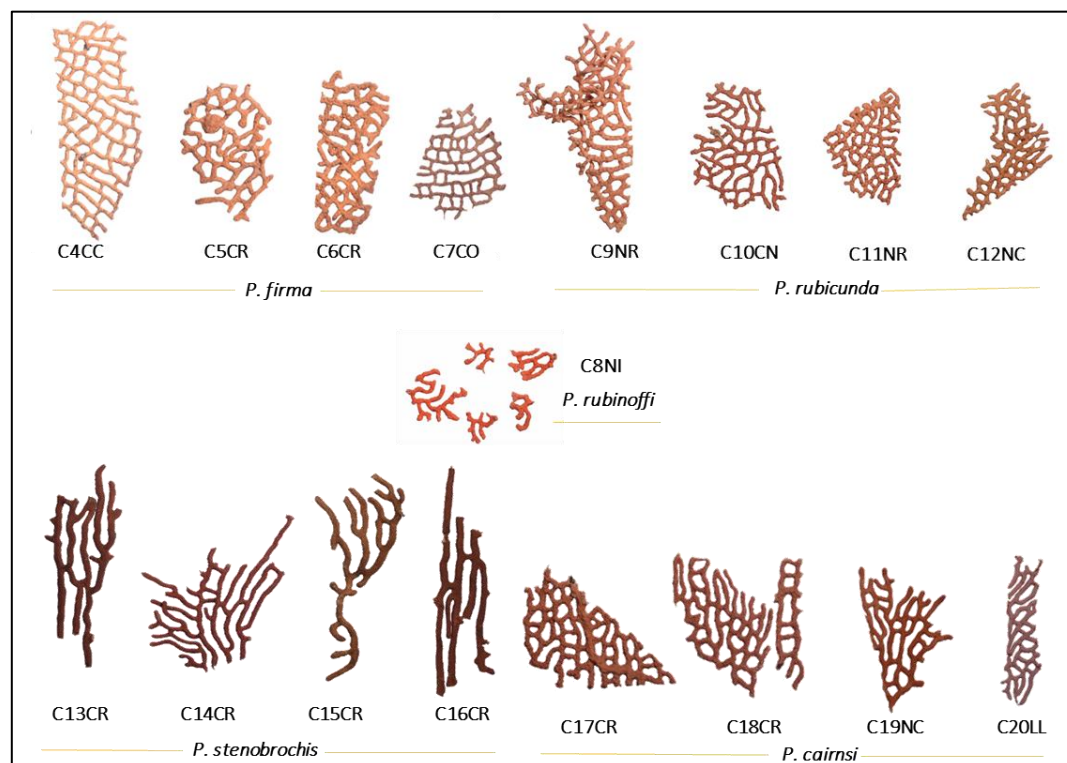
En lo subsecuente se describirán los octocorales estudiados desde una perspectiva, fisicoquímica, partiendo de la escala macroscópica hasta una escala molecular. Para ello, los tópicos se dividen en el análisis de estructura y color, dónde se especifican los aspectos físicos de las escleritas y en el análisis de composición, que consistirá en la caracterización de las especies químicas presentes en las escleritas de los octocorales. Es importante aclarar que en este capítulo no se pretende describir las características morfológicas de estos octocorales desde un punto de vista anatómico; este ha sido un trabajo realizado previamente por otros autores y se encuentra resumido en el Capítulo I de esta investigación.<sup>11-13,15,16,18</sup>

#### **Análisis estructural y cromático**

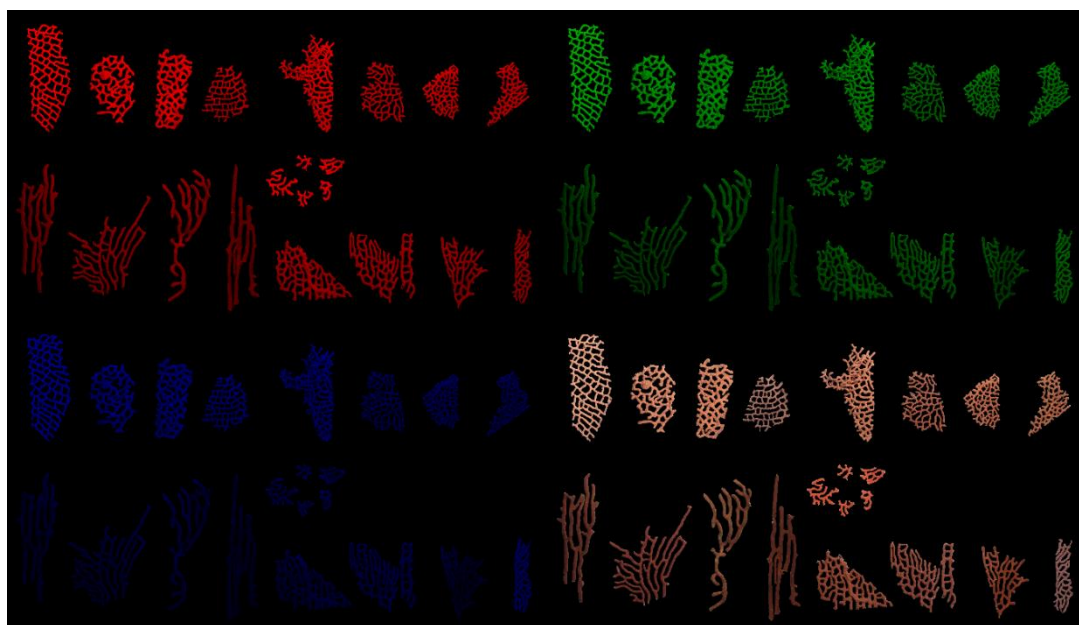
##### **Fotografía digital (RGB)**

Por sí sola, una fotografía digital permite obtener información acerca del color y la estructura de muestras con superficies irregulares, brillo o rugosidad.<sup>90</sup> En este caso, las fotografías fueron tomadas con la idea de recuperar información cuantitativa acerca del color de cada espécimen. En la *Figura 3. 1* se muestran las fotografías de cada espécimen, clasificados por código según su especie. El uso de una herramienta de calibración como el ColorChecker, permitió obtener diferentes fotografías comparables entre sí en términos de color, lo que permitió estudiar por separado las contribuciones de cada canal en el espacio RGB para formar las imágenes.

La contribución cualitativa de intensidad en cada uno de los canales RGB se representan pictóricamente en la *Figura 3. 2*. Mediante la descomposición del color es posible entender cómo se combinan estos tres canales para generar *hues* o tonos específicos en cada imagen digital (*hue* = tono, en inglés).<sup>105</sup> La obtención del color en el espacio RGB surge de la generación aditiva del color, en dónde los colores rojo y azul de máxima intensidad se combinan para formar magenta; rojo y verde generan amarillo; y azul y verde el color cian.<sup>105</sup> Así mismo, la máxima intensidad en los 3 canales genera el color blanco y la mínima, el negro, como se representa en la *Figura 3. 3*.<sup>106</sup>

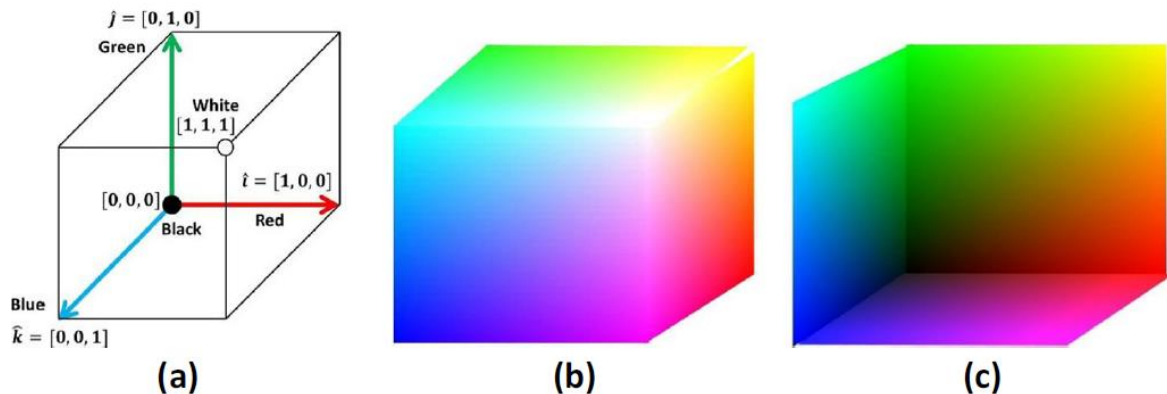


**Figura 3. 1** Fotografía digital de cada espécimen estudiado del género *Pacifigorgia*, clasificados por código según su especie.



**Figura 3. 2** Descomposición de la fotografía digital de cada espécimen en las coordenadas de color RGB.

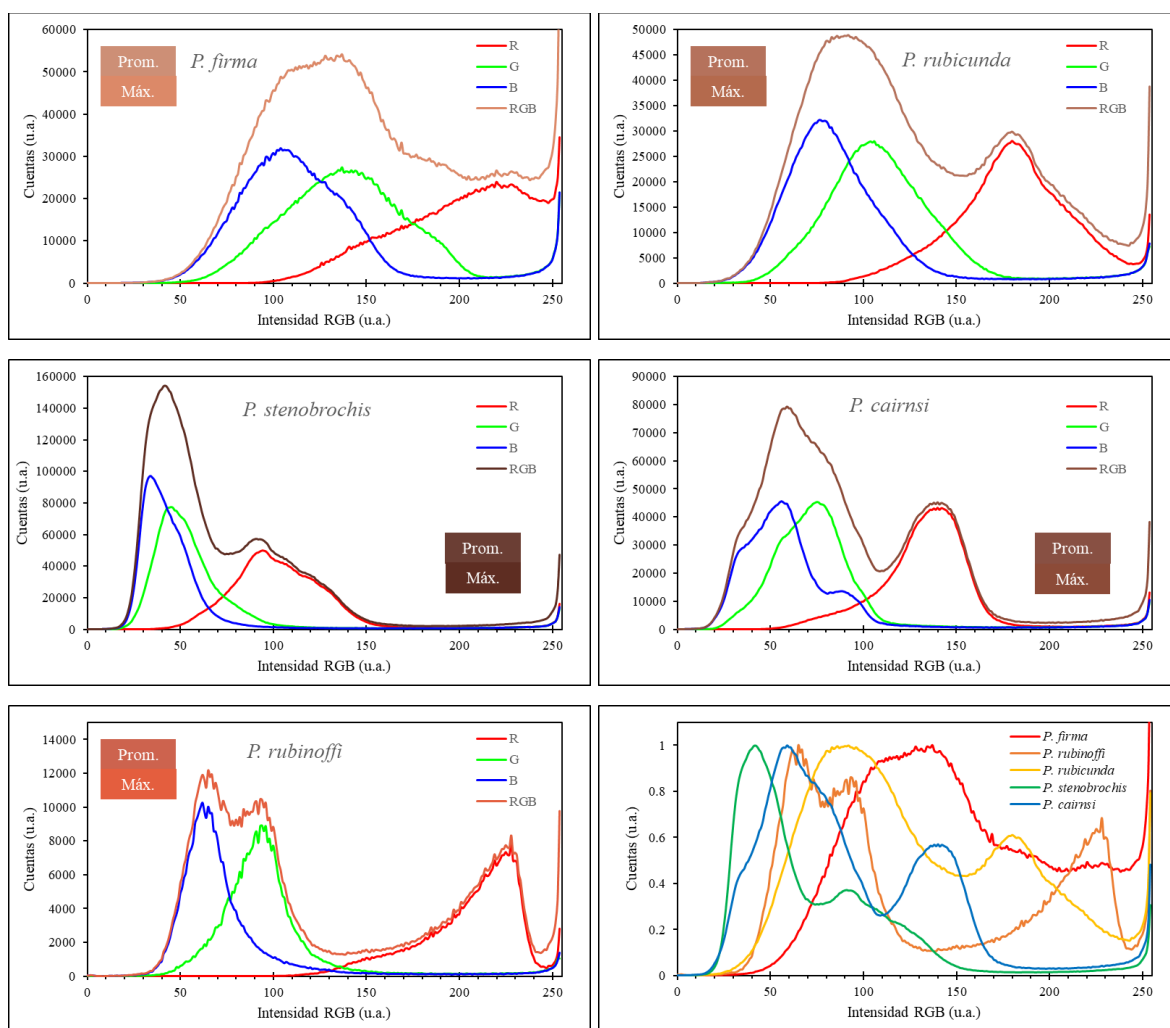
De acuerdo con esta conceptualización del color aditivo, es posible entender cómo la combinación de estos tres canales resulta en los colores naranjas y marrones observados en las fotografías digitales. Para facilitar esta tarea, se puede observar el cubo de colores según las intensidades de color en cada canal en la *Figura 3. 3*.<sup>106</sup> A nivel general, todos los colores en los octocorales tienen alta intensidad en los canales rojo y verde, sin embargo, el rojo es predominante. Por esta razón las tonalidades tienden a ser más anaranjadas que amarillas. Por su parte, el papel del canal azul es mucho más sutil. Intensidades medias resultan en la obtención de tonos más brillantes y blanquecinos, como en el caso de *P. firma* y *P. rubicunda*. Por otro lado, intensidades más bajas, resultan en colores marrones, como en *P. stenobrochis* y *P. cairnsi*.



**Figura 3. 3** a) Representación esquemática del espacio de color RGB, en dónde se muestran las caras externas (b) e internas (c) del cubo generado.<sup>106</sup>

A pesar de que la información cualitativa es útil para entender la generación del color en la imagen digital de cada espécimen, es la información cuantitativa utilizada para obtener dichas tonalidades la que es útil para describir al coral y reproducir estos colores en otros medios digitales o impresos. En el espacio RGB, cada canal tiene valores discretos de intensidad que van de 0 a 255 (en números enteros), de manera que es capaz de representar  $256^3$  colores, es decir, 16 777 216 colores.<sup>106</sup> Por su parte, una imagen digital está conformada por una cuadrícula de píxeles, cada uno con un valor de intensidad, que se combinan en una pantalla para generar una imagen. De esta manera, en una imagen digital en el espacio RGB, el tono de cada píxel está descrito por las 3 coordenadas [R, G, B], con los valores de 0 a 255. A partir de esto, al cuantificar la cantidad de píxeles que están

caracterizados por cada valor unitario de intensidad en un canal, se obtiene un histograma.<sup>104</sup> Mediante los histogramas, fue posible estudiar la totalidad de las muestras al representar la distribución total de los valores de intensidad en la superficie de cada octocoral.



**Figura 3. 4** Histograma general de color de cada especie del género *Pacifigorgia*. Para cada gráfico se presenta el histograma de cada canal por separado (R, G, B) y el de la suma de los tres canales (RGB). Los recuadros “Prom.” y “Máx.”, se colorearon con la tonalidad de los valores de intensidad promedio y máximo obtenidos del histograma. El último gráfico presenta los histogramas RGB normalizados respecto al número de píxeles analizados.

En la *Figura 3. 4* se muestra el histograma de cada canal del espacio RGB, por separado y combinados para cada especie. A partir de ellos, se calculó el valor de intensidad promedio y la moda de intensidad de cada canal, obteniendo así las coordenadas de color

promedio y moda de la fotografía de cada especie. En el caso de estos histogramas, el valor de intensidad promedio ( $\bar{I}_c$ ) de un canal corresponde a la sumatoria del producto de la cantidad de pixeles con un valor intensidad ( $P_i$ ) y dicho valor de intensidad ( $i$ ), dividido entre la cantidad de pixeles muestreados totales ( $P_t$ ), como se muestra en la ecuación 2. Por su parte, la moda corresponde con el pico máximo en el histograma y por ello se denota como máximo (Máx.) en la *Figura 3. 4*, no obstante, representa el valor de intensidad más común entre los pixeles de cada imagen. Dichos resultados se resumen en el *Cuadro 3. 1*, junto al color resultante de la combinación de la intensidad de cada canal en el espacio RGB.

$$\bar{I}_c = \frac{\sum_{i=0}^{255} (P_i * i)}{P_t} \quad [ 2 ]$$

**Cuadro 3. 1** Coordenadas RGB de intensidad promedio y moda calculadas a partir de los histogramas de color de las fotografías digitales de los octocorales del género *Pacifigorgia* junto al tono resultante de la combinación de cada canal (R+G+B).

Especie y Tipo	Promedio				Moda			
	R	G	B	R+G+B	R	G	B	R+G+B
<i>P. firma</i> general	205	144	118		220	137	104	
<b><i>P. firma</i> individual</b>	<b>206</b>	<b>151</b>	<b>128</b>		<b>212</b>	<b>140</b>	<b>106</b>	
<i>P. rubinoffi</i> general	205	99	78		228	94	62	
<b><i>P. rubinoffi</i> individual</b>	<b>205</b>	<b>99</b>	<b>78</b>		<b>228</b>	<b>94</b>	<b>62</b>	
<i>P. rubicunda</i> general	181	114	92		180	106	77	
<b><i>P. rubicunda</i> individual</b>	<b>182</b>	<b>117</b>	<b>95</b>		<b>191</b>	<b>109</b>	<b>83</b>	
<i>P. stenobrochis</i> general	107	62	52		94	45	34	
<b><i>P. stenobrochis</i> individual</b>	<b>109</b>	<b>64</b>	<b>54</b>		<b>109</b>	<b>54</b>	<b>40</b>	
<i>P. cairnsi</i> general	136	80	67		140	75	56	
<b><i>P. cairnsi</i> individual</b>	<b>140</b>	<b>87</b>	<b>76</b>		<b>141</b>	<b>74</b>	<b>60</b>	

Nota: El tipo “general”, se refiere a que la fotografía analizada contiene a todos los especímenes de una especie. El tipo “individual” corresponde a fotografías que contenían sólo un espécimen, por tanto, los valores reportados por especie representan la media de la intensidad promedio y moda del histograma de cada espécimen por separado.

Por medio del *Cuadro 3. 1* se hacen evidentes las diferencias en los tonos según el tratamiento de datos utilizado y por ello, se debe de tener cuidado a la hora de interpretar este resultado. Teniendo en cuenta que cada muestra tiene un área distinta, si se combinan los

valores de cada píxel en una imagen con varias muestras, las muestras más grandes tendrán mayor peso al determinar el valor de intensidad promedio (o moda) para esa especie. Como es inviable muestrear corales con una misma área, se determinó que el procedimiento más indicado consiste en obtener para cada muestra el valor de intensidad promedio (o moda) en cada canal y determinar la media de estos valores entre los especímenes. Por esta razón, en el *Cuadro 3. 1* se resaltan los resultados de tipo individual.

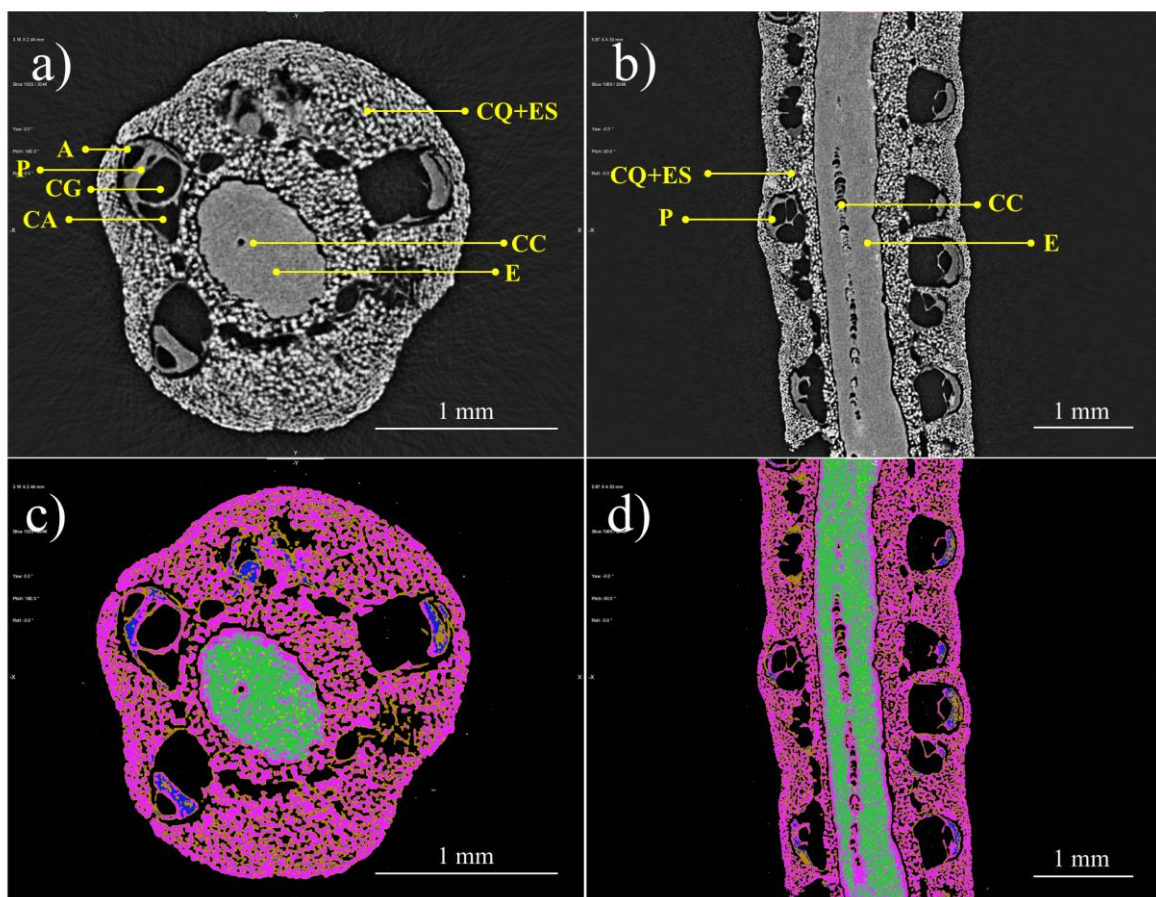
Aparte de esto, las diferencias entre el cálculo de la moda y el promedio de intensidad se vuelven más complejas de interpretar. En el caso del promedio de intensidad, esta toma en cuenta los valores a lo largo de todo el rango de intensidad. Por ello, este valor puede verse afectado y cambiar por la presencia de brillos y/o sombras en la fotografía que actúan como valores alejados de las medidas de tendencia central.<sup>94</sup> Es probable que, por esta misma razón, los colores obtenidos a partir del promedio de intensidad en cada canal resultan en tonos menos saturados que los calculados a partir de la moda de intensidad. En contraposición a esto, la moda de intensidad es menos sensible a la presencia de brillos y sombras en fotografías bien tomadas, puesto que para su cálculo no se toman en cuenta aquellos valores de intensidad alejados de las medidas de tendencia central, solamente involucra aquellos valores de intensidad más comunes.

De acuerdo con lo anterior, el cálculo de la moda en este tipo de análisis fotográficos se propone como el método más fiel de representar el color de un espécimen. Así mismo, para representar el color más común en una especie se recomienda el análisis de fotografías individuales, y no de fotografías grupales. Por último, es importante tener en cuenta la variabilidad intraespecífica del color en *Pacifigorgia* y, por ello, se recomienda el uso de rangos tonales, más que el reporte de un solo tono para una especie.

### **Microtomografía computarizada de rayos X**

En contraste con el análisis cromático anterior, la microtomografía ofrece una perspectiva más estructural de las características macro y microscópicas de los octocorales. En este apartado, se aprovecharon las excelentes capacidades de esta técnica de alto contraste para obtener información que ayuda a distinguir las diferentes estructuras mineralizadas y los tejidos en estos octocorales.<sup>100</sup> Ejemplo de ello se muestra en la *Figura 3. 5 a-b*), dónde se

muestran cortes en dos planos XY y XZ de una rama de C13CR (*P. stenobrochis*). A partir de estas imágenes, la diferencia entre la absorción de los rayos X dependiente de la densidad y la composición de cada material, permite distinguir varias estructuras del coral.<sup>102</sup>

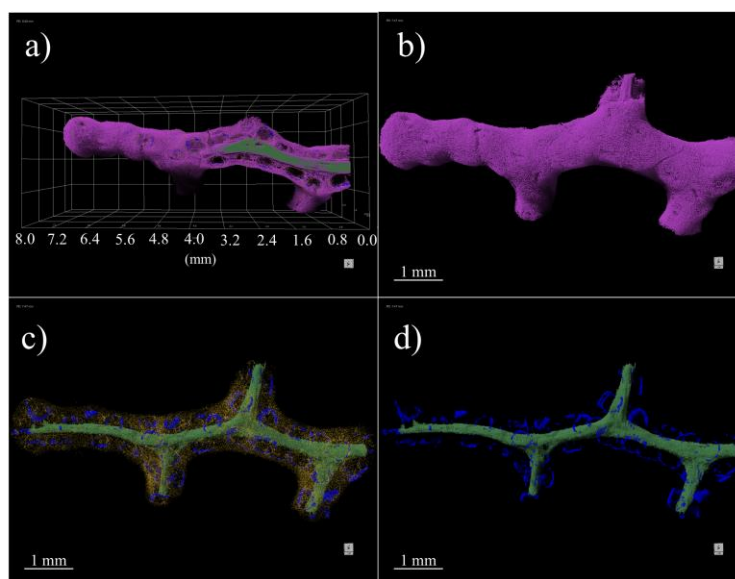


**Figura 3. 5** Cortes de los planos XY (izquierda) y XZ (derecha) de una imagen virtual en 3D de una rama del espécimen C13CR (*P. stenobrochis*) obtenido a partir de una microtomografía computarizada de rayos X, con una resolución de 3  $\mu\text{m}$ . En a-b) se muestran la imagen en una escala de grises según la intensidad. En c-d) Se muestra la segmentación de las diferentes estructuras (ROI) identificadas en los cortes. Color según ROI: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo), eje (verde).

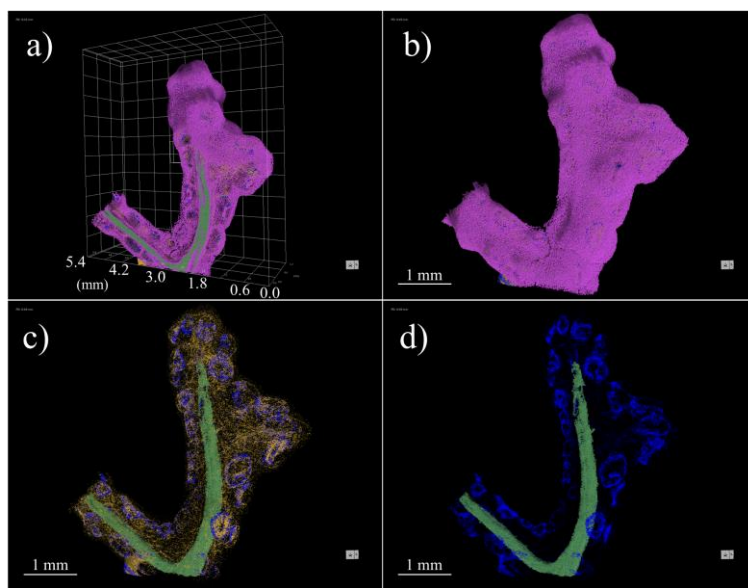
Entre estas estructuras se distinguen el eje del coral (E) con el núcleo o cordón central hueco (CC) en su interior, compuesto por cámaras con paredes mineralizadas y los canales longitudinales (CL), que rodean al eje. Sumado a esto, la presencia de las escleritas (ES) densamente pobladas en todo el volumen del cenénquime (CQ) es evidente. También se

observa el tejido seco de los pólipos (P) dentro del cáliz (CA), dónde son visibles en algunos casos el antocodio (A) y la cavidad gastrovascular (CG) de cada pólipo.<sup>1,38</sup> Así, con base en la intensidad y en la morfología de cada estructura de la imagen virtual en 3D se hizo una segmentación en la que se agruparon dichas estructuras y se definieron como ROIs.

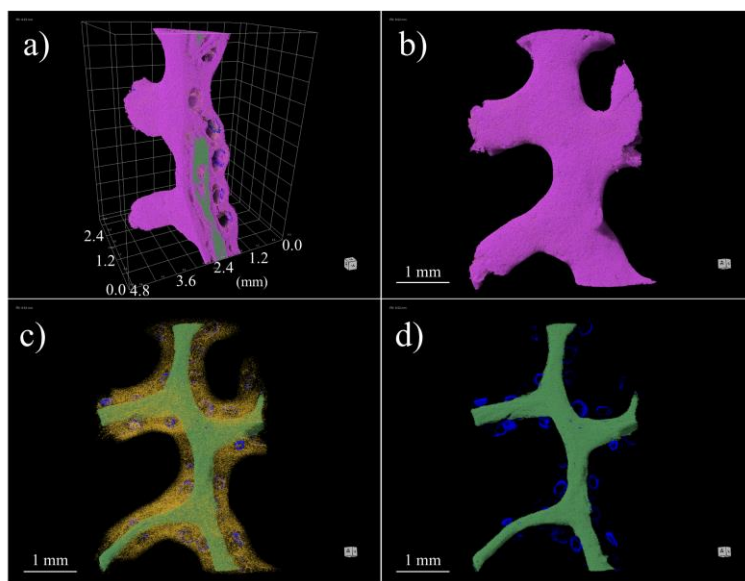
Para ello, se utilizó un algoritmo de segmentación con *Machine Learning* en el software Dragonfly (ORS, Canadá). Los tejidos de baja densidad se clasificaron como pólipos y cenénquime en color azul y amarillo. Las estructuras de mayor densidad como escleritas y eje están etiquetadas de color magenta y verde, respectivamente, como se observa en la *Figura 3. 5 c-d*). El resultado de la segmentación en 3D se presenta de la *Figura 3. 6* a la *Figura 3. 10*, en dónde se muestra un espécimen por especie. A partir de estas imágenes se comprueban las diferencias morfológicas entre las especies, anteriormente descritas en el Capítulo I. Por su parte, la mayor ventaja obtenida mediante esta técnica en el contexto de esta investigación es que ofrece una clara idea de la composición estructural de un octocoral, permitiendo la comprensión de la distribución espacial de las escleritas en la rama.



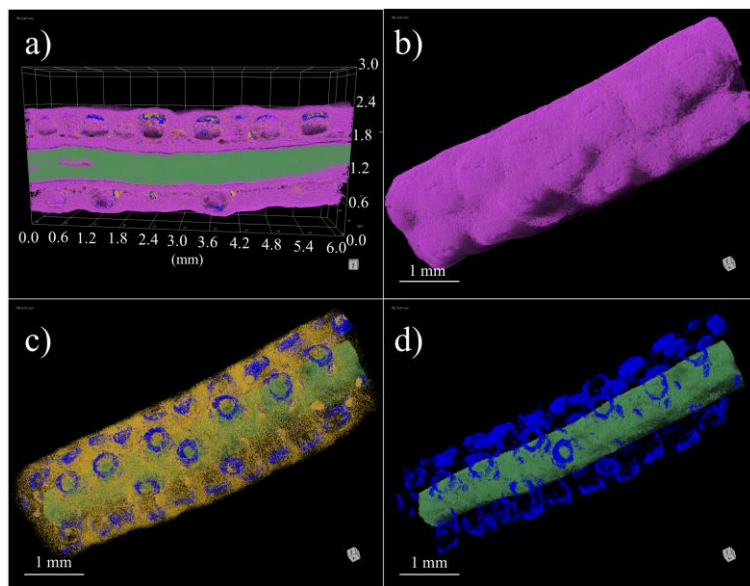
**Figura 3. 6** Segmentación de una imagen virtual en 3D de una rama del espécimen C4CC (*P. firma*) obtenida a partir de una microtomografía computarizada de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, con escala volumétrica como referencia, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. Color según ROI: escleritas (magenta), tejidos del cáliz (azul), cenénquime (amarillo), eje (verde).



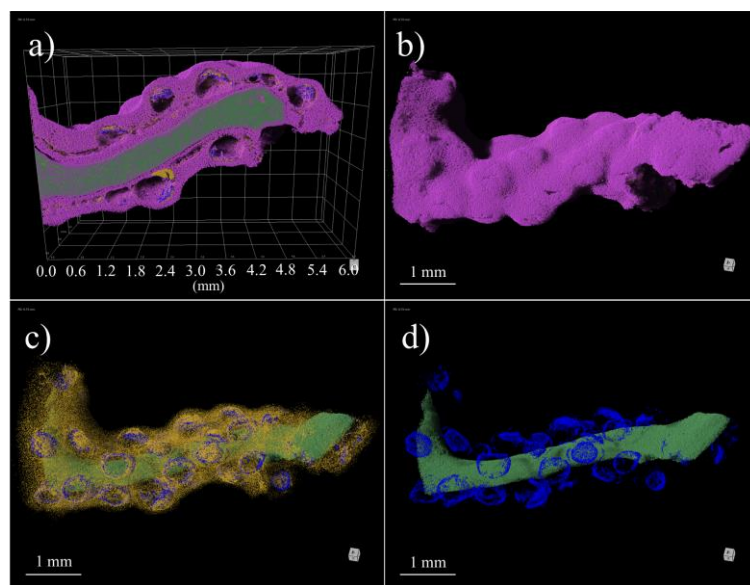
**Figura 3. 7** Segmentación de una imagen virtual en 3D de una rama del espécimen C8NI (*P. rubinoffi*) obtenida a partir de una  $\mu$ CT de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. ROIs: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo) y eje (verde).



**Figura 3. 8** Segmentación de una imagen virtual en 3D de una rama del espécimen C9NR (*P. rubicunda*) obtenida a partir de una  $\mu$ CT de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. ROIs: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo) y eje (verde).



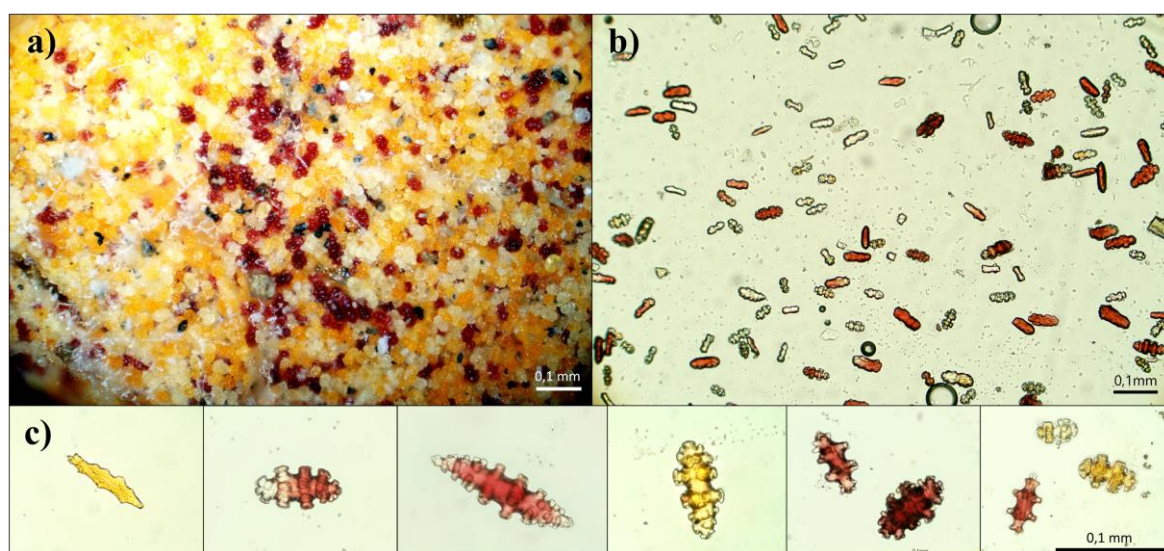
**Figura 3. 9** Segmentación de una imagen virtual en 3D del espécimen C13CR (*P. stenobrochis*) obtenida a partir de una  $\mu$ CT de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. ROIs: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo) y eje (verde).



**Figura 3. 10** Segmentación de una imagen virtual en 3D del espécimen C17CR (*P. cairnsi*) obtenida a partir de una  $\mu$ CT de rayos X. Se muestra a) un corte transversal, b) una rama completa, c) una rama sin escleritas y d) una rama sin escleritas ni cenénquime. ROIs: escleritas (magenta), pólipos (azul), cenénquime (amarillo) y eje (verde).

### Microscopía de luz visible

Por medio de las microtomografías se observó cómo las escleritas pueblan el cenénquime del coral, desde el eje y hasta la superficie de la rama del coral. Justo en el borde exterior de las ramas, no existe una cantidad apreciable de cenénquime y por ello en la capa exterior sólo se observan escleritas. De la misma manera, la microscopía de luz visible refleja esto, por lo cual, es posible asegurar que el color de un coral con los pólipos retraídos está dado por el color de la capa más externa de las escleritas en su superficie, tal y como se muestra en la *Figura 3. 11 a)*, *Figura 3. 12 a)*, *Figura 3. 14 a-b)* y *Figura 3. 15 a-b)*.

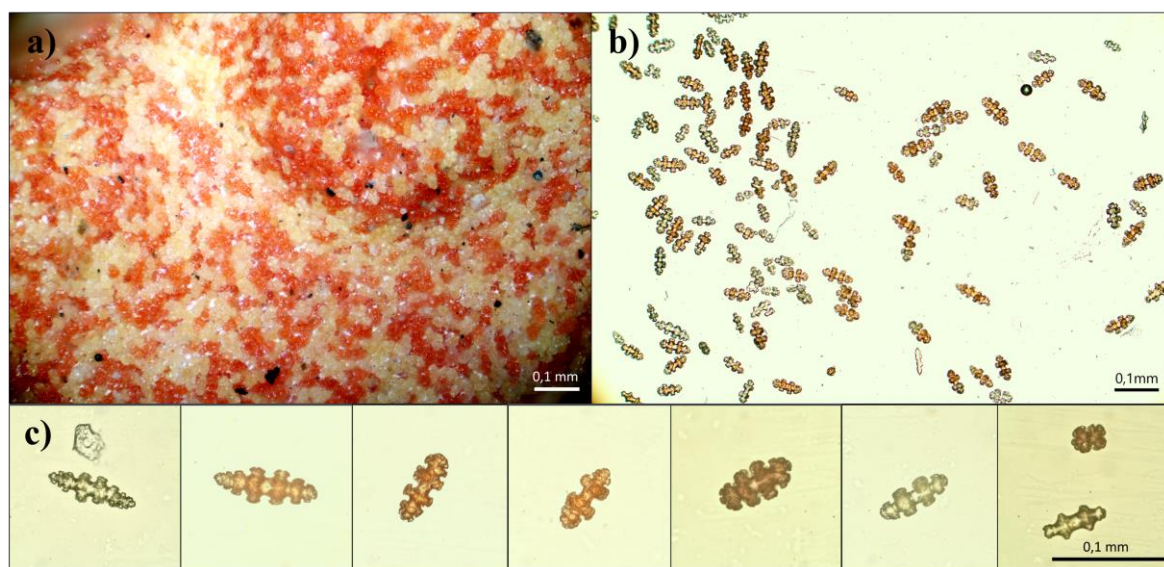


**Figura 3. 11** Fotomicrografías de luz de las escleritas de la especie *P. firma*. a) Superficie de una rama de C4CC vista con un objetivo 10x. b) Vista general de la escleritas extraídas de C7CO, con objetivo 10x. c) Catálogo de escleritas individuales de todos los especímenes vistas con un objetivo 50x.

Si bien es cierto el objetivo de esta caracterización no es hacer la descripción de los distintos tipos de escleritas, se pretende hacer una descripción del color en función de su estructura. En la *Figura 3. 11 a-b)* se puede apreciar cómo *P. firma* está compuesto por escleritas semitransparentes con 3 tonalidades, rojas, anaranjadas y amarillo pálido/blancas (incoloras). Estas tres tonalidades se presentan indistintamente de la forma de la esclerita, como ha sido previamente descrito por Breedy, *et al.* 2003.<sup>16</sup> A pesar de que no existe una

norma en la coloración según la estructura, es común encontrar ciertas tendencias. Algunos ejemplos de ello se encuentran en los distintos paneles de la *Figura 3. 11 c*).

Por ejemplo, las escleritas antocodiales con forma de barra son usualmente de color naranja, como se observa en el primer panel. Hay escleritas, usualmente cabrestantes, con combinaciones de dos colores, llamadas bicolor, como la presentada en el segundo panel.<sup>16</sup> Además de esto, los husos de puntas agudas son más comunes en coloraciones rojizas, como en el tercer panel, no obstante, estas puntas tienden a tener colores menos saturados (pálidos). Por su parte, los cabrestantes se pueden encontrar en las tres coloraciones, como en los paneles 4 a 6, dónde es común observar que en las partes más distales de los tubérculos (verrugas) esta coloración suele disminuir, tendiendo al blanco (incoloro).

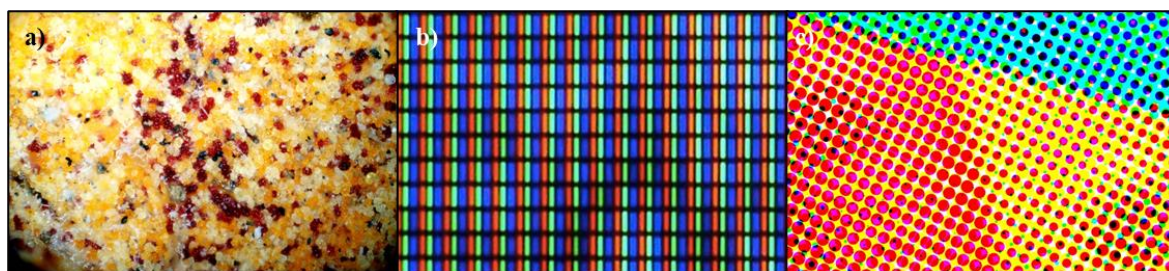


**Figura 3. 12** Fotomicrografías de luz de las escleritas de la especie *P. rubicunda*, espécimen C9NR. a) Superficie de una rama de vista con un objetivo 10x. b) Vista general de la escleritas extraídas, con objetivo 10x. c) Catálogo de escleritas individuales de C9NR vistas con un objetivo 50x.

En el caso de *P. rubicunda*, en la *Figura 3. 12 a-b*) se observa una coloración similar a lo observado en *P. firma*. La superficie del coral está cubierta por escleritas de dos tonalidades: naranjas y amarillo pálido o blancas.<sup>16</sup> En este caso, tanto husos como cabrestantes presentan ambas tonalidades, sin alguna tendencia observable. En los paneles 1

y 2 de la *Figura 3. 12 c)* se observan husos naranjas y blancos, mientras que en los paneles 3 a 7, se presentan cabrestantes de colores variados. En el último panel, cabe destacar también la presencia de una esclerita de tipo cruz, color naranja.

A partir de lo observado en la superficie de *P. firma* y *P. rubinoffi* se propone una analogía para lograr una reinterpretación del color de estas dos especies. La superficie de un coral podría ser comparada con una imagen digital compuesta por píxeles de diferentes tonos e intensidades o como una imagen impresa, compuesta por puntos de tinta sobre el papel. De esta manera, los octocorales han desarrollado una estrategia de color, en la que el color y la distribución de las escleritas determinan la coloración de la superficie del coral, de la misma manera en la que los píxeles de una pantalla se combinan para formar una imagen digital, como se representa en la *Figura 3. 13*.



**Figura 3. 13** Estrategia de color en *P. firma*. Comparación entre a) la superficie del coral, b) una pantalla OLED y c) una impresión. Imágenes tomadas de Les Numeriques (b) y Adobe.com (c).

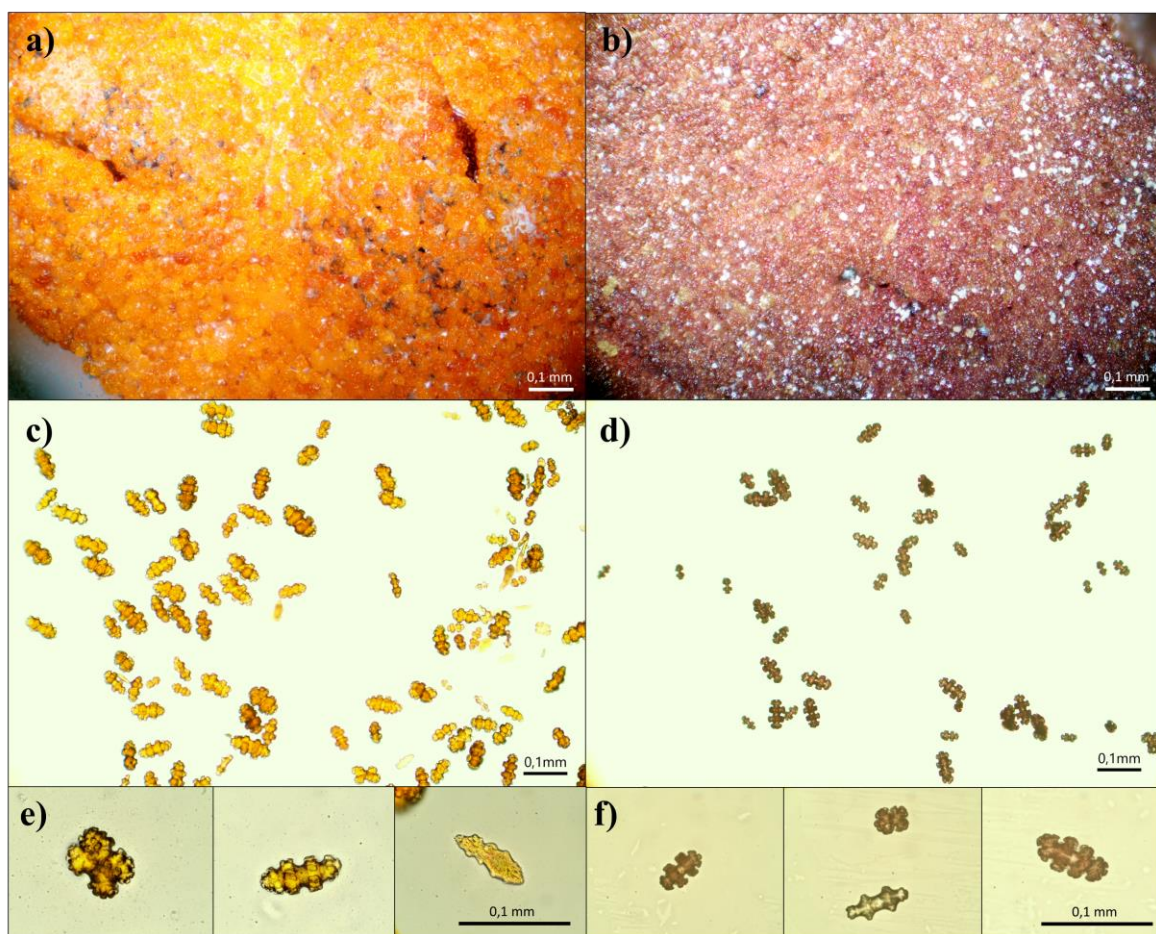
Para determinar la proporción de escleritas de distintos colores en la superficie de los corales, se analizaron micrografías como la presentada en la *Figura 3. 11 a)* y *Figura 3. 12 a)*. Para ello se utilizó el software Fiji-ImageJ con el fin de transformar la imagen RGB a una imagen de 8 bits, en escala de grises. De acuerdo con la intensidad del color se estableció un valor de umbral (*Threshold*) para cada tonalidad y se cuantificó el área cubierta por los píxeles dentro de este valor. Para *P. firma* se analizaron dos zonas por especie y en *P. rubicunda* solamente una zona por espécimen. En el caso de *P. firma* hay un 16% de escleritas rojas, 38% de color naranja y 46% de color blanco, con desviaciones estándar de 7, 6 y 11%, respectivamente. Para *P. rubicunda* hay 46% de escleritas naranjas y 54% de color amarillo pálido/blanco con desviaciones estándar de 20 y 21%, respectivamente.

La alta variabilidad entre las muestras responde a los cambios que se observan en el color a gran escala de un espécimen respecto a otro, no obstante, dependen en parte de la recolección y el tratamiento de datos utilizado. En primer lugar, para la captura de imágenes en el microscopio se recuperan varios planos focales que se unen para formar una sola imagen. Aunque esto permite enfocar toda la superficie de la rama, no corrige la presencia de sombras y brillos, que actúan como colores más o menos saturados en imágenes en blanco y negro. Por esta razón, al convertir esta imagen a color a una en escala de grises, los brillos y sombras podrían ser clasificados como escleritas de otros colores y afectar la distribución de cada tonalidad. Para contrarrestar dicho efecto, se muestrearon zonas de cada fotomicrografía en las que la presencia de estos cambios en la luminosidad fuera reducida.

Otra de las opciones propuestas es la cuantificación de la distribución de color en escleritas aisladas sobre un portamuestras. Aunque este método podría eliminar el efecto de brillos y sombras, no estaría dando respuesta al color superficial del coral, sino a la coloración de las escleritas en todo el volumen de una rama. De esta manera, se eligió la primera metodología descrita puesto que el interés estaba en la superficie, no obstante, no se descarta que la segunda metodología sea efectiva para dar respuesta a la distribución de las escleritas en todo el volumen del coral. Por otra parte, el uso de las fotomicrografías de las escleritas aisladas como las observadas en la *Figura 3. 11 b*), *Figura 3. 12 b*), *Figura 3. 14 c-d*) y *Figura 3. 15 c-d*) fue útil para definir el tamaño del área de las escleritas.

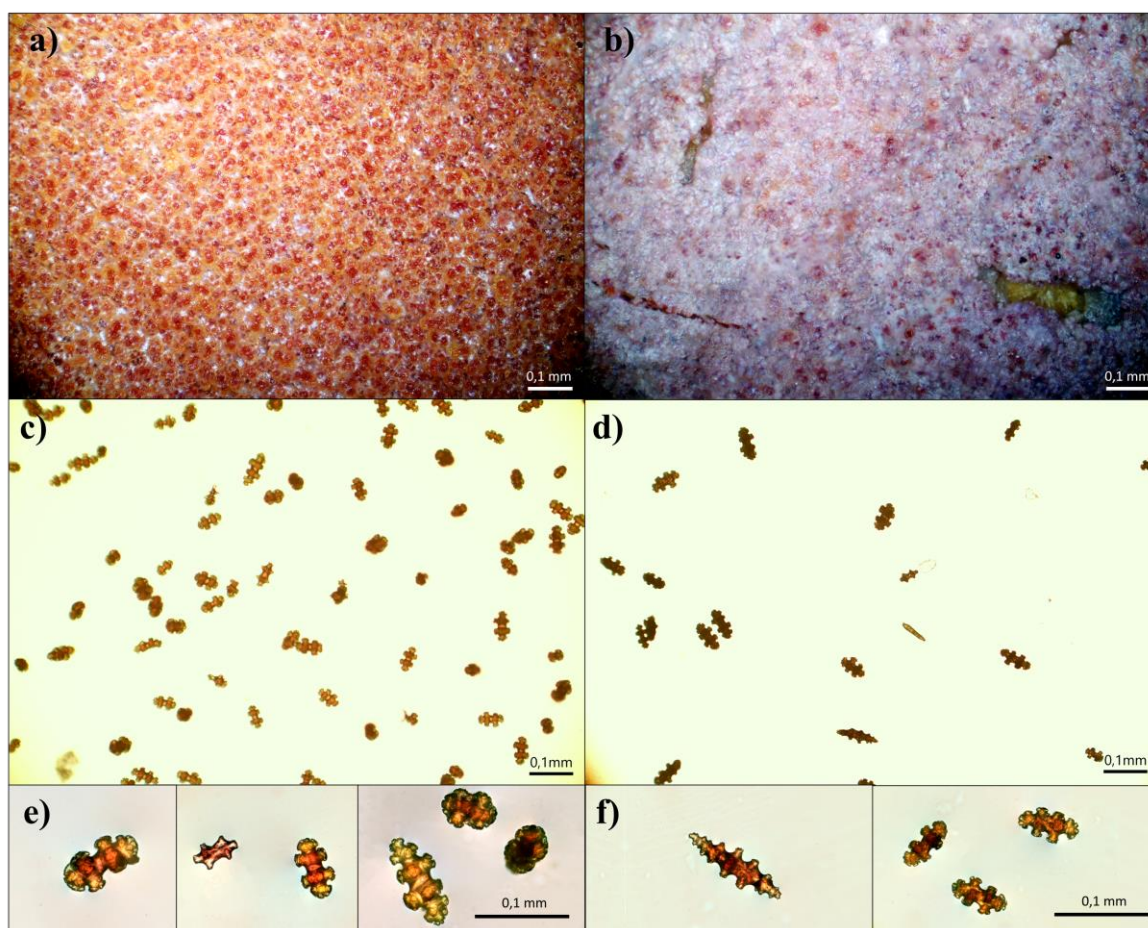
Para ello se utilizó el mismo método descrito anteriormente, sin embargo, se cuantificó el área cubierta por cada esclerita en la imagen indistintamente de su color. Esta magnitud puede ser comparada con los valores de longitud, circularidad o la compacidad de las escleritas reportados por otros autores, sin embargo, representa un método reproducible, sencillo y rápido.<sup>16,36</sup> Además, se presenta como una medida dimensional detallada, dado a que toma en cuenta no sólo las dimensiones gruesas de una esclerita, sino que también involucra el tamaño y forma de las verrugas en la superficie y la asimetría que muchas escleritas presentan. Así, los tamaños del área promedio de las escleritas son 934  $\mu\text{m}^2$  para *P. firma*, 1469  $\mu\text{m}^2$  para *P. rubinoffi*, 1083  $\mu\text{m}^2$  para *P. rubicunda*, 1046  $\mu\text{m}^2$  para *P. stenobrochis* y 1108  $\mu\text{m}^2$  para *P. cairnsi*, con desviaciones estándar de 408, 756, 392, 529 y 304  $\mu\text{m}^2$ , respectivamente.

Para *P. rubinoffi*, *P. stenobrochis* y *P. cairnsi*, se encontró muy poca variabilidad en el color de las escleritas, tal y como se ha reportado anteriormente.<sup>16,18</sup> En la *Figura 3. 14 a,c,e*) se muestra el color naranja intenso tanto de la superficie como de las escleritas aisladas de *P. rubinoffi*. En los paneles inferiores se muestra la presencia de escleritas de tipo cruz, cabrestantes y antocodiales, respectivamente. No obstante, en esta especie la presencia de cabrestantes es muy predominante. Por su parte, en *P. stenobrochis* pueden encontrarse principalmente cabrestantes de color rosado que bajo el microscopio se aprecian con colores de diferentes intensidades, que pueden ir desde el marrón hasta un amarillo pálido, siendo el primero el más predominante (*Figura 3. 14 b,d,f*).



**Figura 3. 14** Fotomicrografías de luz de las escleritas de las especies *P. rubinoffi*, espécimen C8NI (izquierda) y *P. stenobrochis*, espécimen C13CR (derecha). a-b) Superficie de una rama vista con un objetivo 10x. c-d) Vista general de la escleritas extraídas con un objetivo 10x. e-f) Catálogo de escleritas individuales (objetivo 50x).

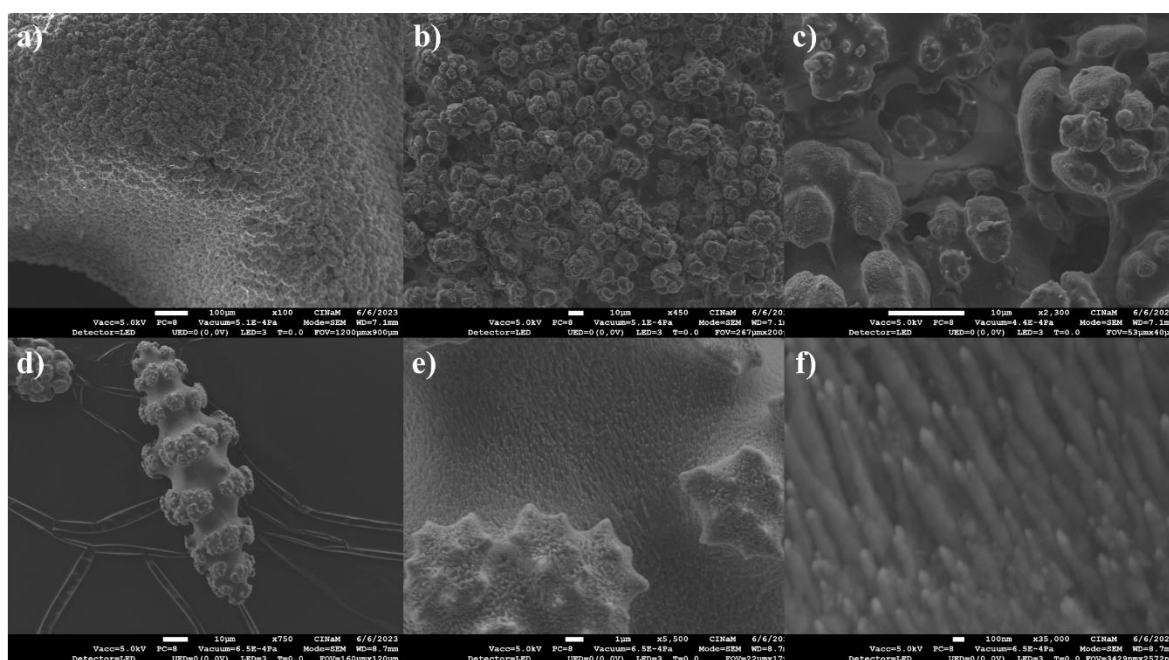
En *P. cairnsi* las muestras C17CR, C18CR y C19NC cuentan con escleritas de color marrón o café rojizo, de tipo cabrestante, con poca variabilidad en cuanto a forma y color. No obstante, la superficie de la muestra C20LL muestra una coloración muy pálida, en tonos rosados-lila. Bajo el microscopio, la pigmentación de las escleritas es similar, sin embargo, las diferencias son apreciables a nivel macroscópico. El perfil de color en el espacio RGB para *P. cairnsi* tiene las coordenadas [141,74,60] dónde el verde y, principalmente el azul tiene poca intensidad y resultan en un tono rojizo oscuro. Por otra parte, las coordenadas de color para C20LL son [141,103,102], lo cual indica coloraciones con más intensidad en el verde y mayor proporción de azul, lo que genera un color más blanquecino.



**Figura 3. 15** Fotomicrografías de luz de las escleritas de la especie *P. cairnsi* espécimen C17CR (izquierda) y C20LL (derecha). a-b) Superficie de una rama vista con un objetivo 10x. c-d) Vista general de la escleritas extraídas, con un objetivo 10x. e-f) Catálogo de escleritas individuales vistas con un objetivo 50x.

## Microscopía electrónica de barrido

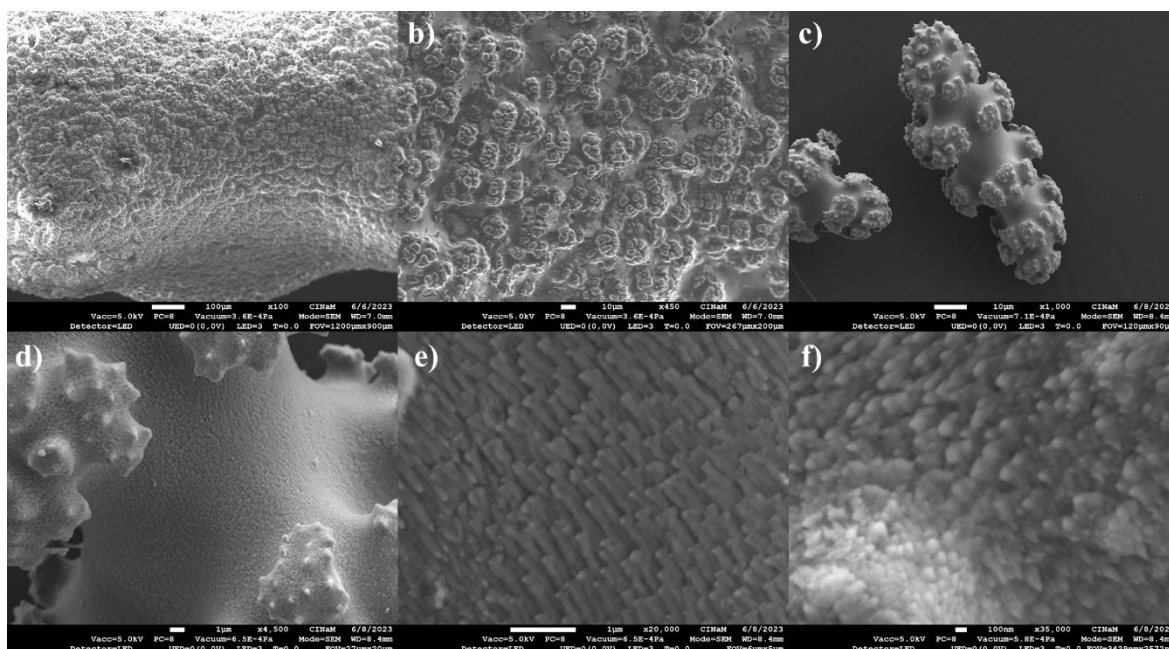
Como último apartado en los análisis cromáticos y estructurales, la microscopía electrónica ofrece una capacidad de análisis de la superficie de los corales inigualable. Todas las micrografías fueron capturadas con el detector de tipo SED. De acuerdo con esto, las imágenes obtenidas responden sólo a los electrones secundarios que son emitidos a pocos nanómetros de la superficie de la muestra, lo que resulta en un alto contraste topográfico, de manera que se observan los detalles superficiales con muy alta resolución.<sup>77</sup> Así, fue posible capturar imágenes a distintas magnificaciones tanto de las ramas de los corales como de escleritas individuales, como se observa en las imágenes de la *Figura 3. 16* a la *Figura 3. 20*.



**Figura 3. 16** Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de *P. firma*, espécimen C4CC.

En todos los casos es posible apreciar en la superficie de las ramas partes del cenénquime, probablemente, mesoglea que se encuentra entre los intersticios de las estructuras esqueléticas y que mantiene ancladas a estas escleritas unas con otras.<sup>1</sup> No obstante, al igual que en la microtomografía computarizada, se observa como el cenénquime no cubre la superficie del coral, sino que más bien, el área superficial de la capa de escleritas más externas se mantiene completamente descubierta. A pesar de ello, es en estas capas

exteriores en dónde queda reflejada la función primordial de las verrugas o microprotuberancias que poseen las escleritas. Estas las dotan de un anclaje firme de las escleritas con otras y al resto de los tejidos del coral.<sup>107</sup>



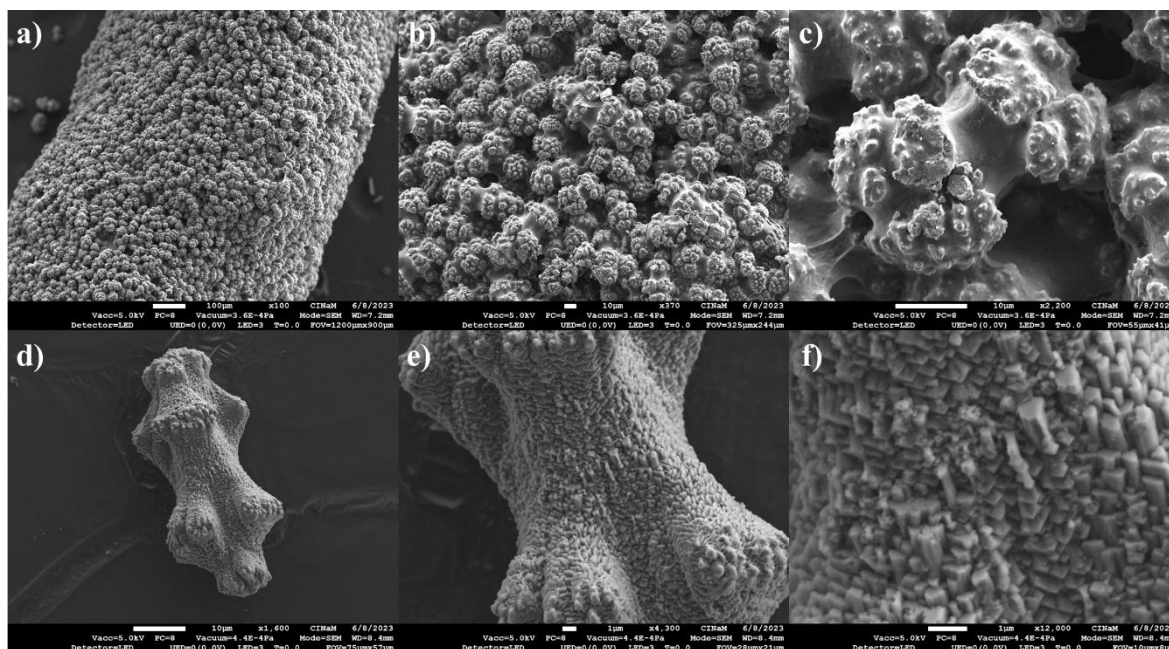
**Figura 3. 17** Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de *P. rubinoffi*, espécimen C8NI.

Además de la anterior, la cualidad más destacable es la topología de la superficie de las escleritas. Tal y como fue descrito por otros autores para escleritas de la especie *Sinularia polydactyla*, las escleritas del género *Pacifigorgia* están construidas a base de fibras cristalizadas compuestas de cristalitas submicrométricas. Estas fibras conforman columnas de calcita de 200 a 500 nm de largo y de 80 a 150 nm de diámetro.<sup>37,108</sup> Dichas columnas están formadas por granos de tamaño nanométrico (~80 nm) y presentan a lo largo de su longitud un aspecto de bandas que refleja niveles de ordenamiento en capas a menor escala.<sup>37</sup>

Por sus cualidades, estas estructuras biomineralizadas pueden ser caracterizadas como mesocristales, unidades distintas a la conceptualización que se tiene de un monocristal clásico. Este fue un término acuñado por Helmut Cölfen y Stephen Mann, que describen a aquellas superestructuras formadas por granos nanométricos cuyo ordenamiento a largo

alcance surge del ordenamiento cristalino de las partículas nanométricas que lo constituyen.<sup>108-110</sup>

En este tipo de superestructuras tridimensionales mesocristalinas, los componentes submicrométricos preservan, en parte, su registro cristalográfico a través de largas distancias. Así, todo el conjunto de cristalitas conserva una orientación similar, no obstante, esta no es idéntica, dado a que es común encontrar desviaciones originadas por defectos y que dan origen a cambios morfológicos macroscópicos. Este hecho permite que a base de estos bloques sea posible construir estructuras ordenadas de gran tamaño, pero con estructuras muy complejas, como una esclerita.<sup>108</sup> De esta manera, las escleritas pueden entenderse como mesocristales, dónde fibras de calcita están orientadas a lo largo del eje largo de la esclerita (eje c en cristalografía, [001]) y presentan desviaciones que se proyectan de forma colectiva en dirección de las microprotuberancias, poblando toda su superficie.<sup>37</sup>



**Figura 3. 18** Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de *P. rubicunda*, espécimen C9NR.

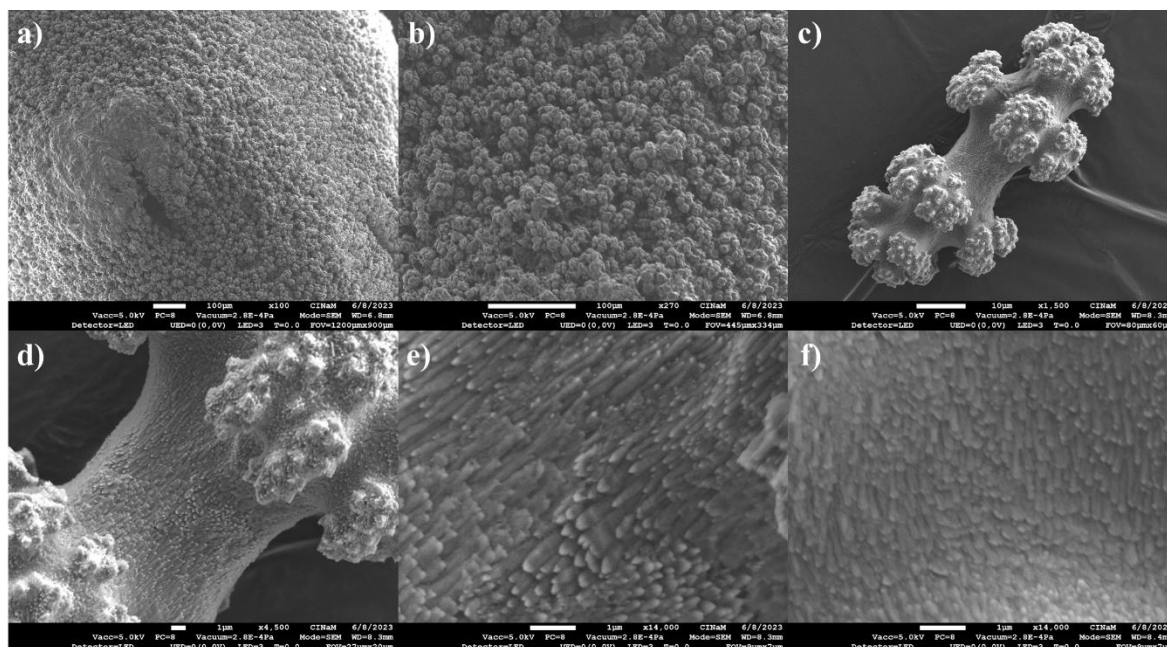
Las geometrías de columnas que se han encontrado son variadas. Por ejemplo, en la *Figura 3. 16 f*), en la *Figura 3. 19 e*) y en la *Figura 3. 20 e,f*) las columnas de husos y cabrestantes tienen extremos con puntas agudas y redondeadas. Sumado a esto, formas más

angulares se han observado en la superficie de las verrugas como en la *Figura 3. 17 f)*. Por otra parte, en la *Figura 3. 18 d-f)* se muestra una esclerita inmadura, en dónde la morfología de las columnas refleja el hábito cristalino rómbico característico de la calcita y, en general es congruente con la forma general de la esclerita, caracterizada por bordes más agudos y ángulos más marcados que en husos y cabrestantes completamente desarrollados.

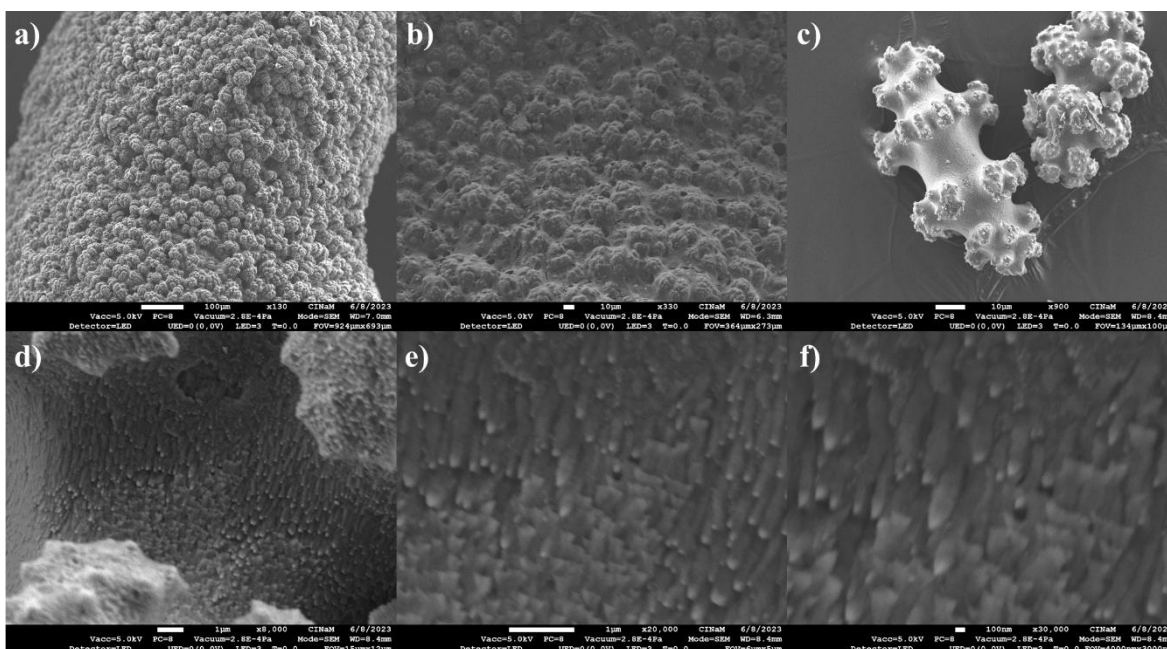
Aunque no se puede asegurar para este caso en específico, a partir de estas observaciones se podría entender desde una perspectiva mesocristalina cómo la morfología de las subunidades submicrométricas puede determinar o estar directamente relacionada con la morfología de la pieza macroscópica. Esta teoría puede ser respaldada con las observaciones realizadas por Vielzeuf *et al.* (2017), en dónde relacionaron protoescleritas (escleritas inmaduras) con estructuras mono-mesocristalinas y escleritas maduras con formas poli-mesocristalinas.<sup>108</sup> De esta manera tendría sentido el mayor grado de preservación del hábito cristalino de la calcita en una esclerita inmadura como la de la *Figura 3. 18 d-f)*, al ser un material cristalino más cercano a un monocristal clásico.

Aparte de esto, una morfología que destaca y contrasta con las formas de punta redondeada es la de columnas de extremos ensanchados que, en algunos casos, parecen estar divididos en dos o tres secciones granuladas. Ejemplos de esta morfología aislada pueden verse en la *Figura 3. 17 e)* y en la *Figura 3. 19 f)*. No obstante, es en la *Figura 3. 19 e)* y en la *Figura 3. 20 e)*, en dónde se comprende la relación y la ocurrencia de esta forma junto a la de columnas de puntas redondeadas. En estas micrografías es posible apreciar cómo se trata, en realidad, de las mismas estructuras, sin embargo, aparentan ser diferentes debido a que se está observando a un mismo tipo de columna desde diferentes direcciones.

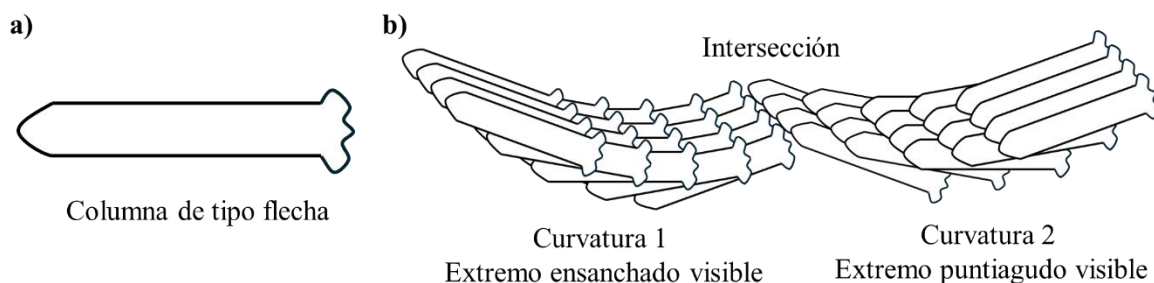
Esto implica que las columnas tienen una morfología asimétrica con un extremo puntiagudo y redondeado y otro de apariencia ensanchada y dividida. De acuerdo con la curvatura de la superficie y a su posición respecto al eje c, las columnas están acomodadas de una manera, mostrando colectivamente sus puntas redondeadas o sus extremos granulados. Cuando dos curvaturas de la superficie de una esclerita se acoplan, es posible observar en esta intersección las dos morfologías, como es apreciable en la *Figura 3. 19 e)* y en la *Figura 3. 20 e-f)* y se esquematiza en la *Figura 3. 21*.



**Figura 3. 19** Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de *P. stenobrochis*, espécimen C13CR.



**Figura 3. 20** Micrografía SEM de la superficie de una rama (a-c) y una esclerita (d-f) de *P. cairnsi*, espécimen C17CR.



**Figura 3. 21** Esquematización del arreglo de las columnas de calcita en la superficie de las escleritas. a) Estructura genérica propuesta para las columnas de calcita. b) Descripción de la intersección entre dos curvaturas.

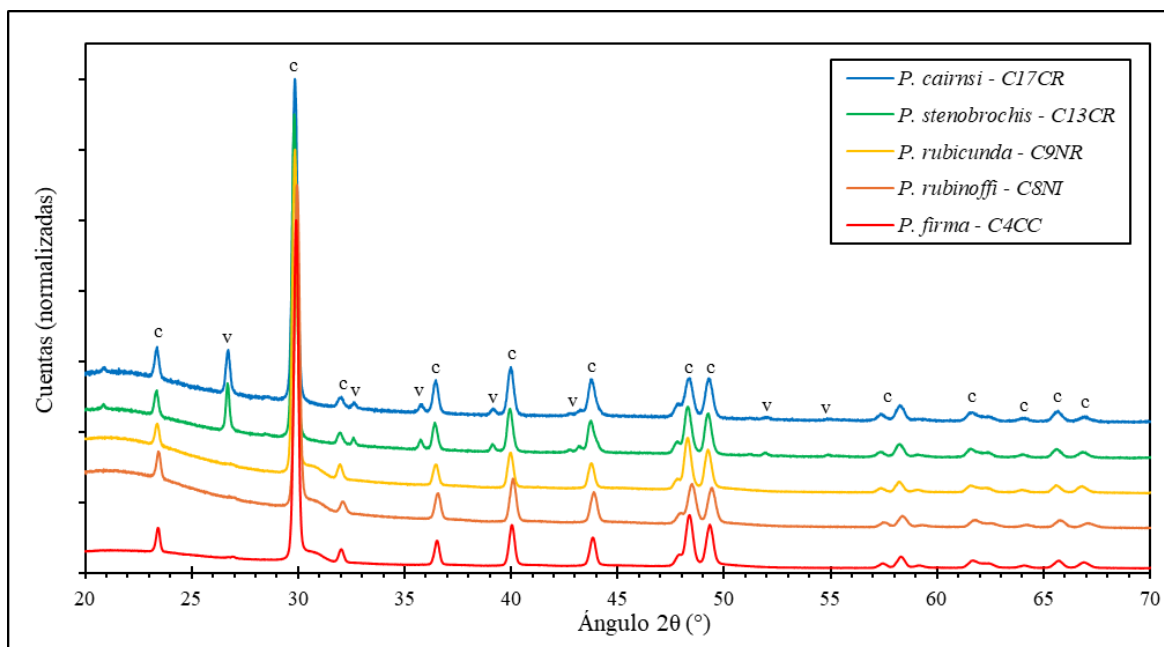
## Análisis de composición

### Difracción de rayos X en polvos

Tal y como ha sido reportado por otros autores, las escleritas de los octocorales están compuestas en un 98% por calcita magnésica ( $\text{Ca}_{(1-x)}\text{Mg}_{(x)}\text{CO}_3$ ) y 2% de materia orgánica y el género *Pacifigorgia* no es la excepción.<sup>37</sup> La combinación entre la materia orgánica y la sustitución con Mg que otorga mayor fuerza y resistencia a los cristales resulta en un material resistente al estrés y el desgaste de las corrientes marinas.<sup>111</sup> En cuanto a la fase inorgánica, la p-XRD fue utilizada para determinar las fases cristalinas presentes en cada muestra estudiada. En cada caso se cuantificó el porcentaje de las fases presentes y se determinaron los parámetros de celda para la calcita.

En la *Figura 3. 22* se presenta un patrón de difracción por cada especie. En general, como era esperado, se observó principalmente la fase de calcita magnésica, sin embargo, también se encontró vaterita, en todas las muestras. La vaterita es un polimorfo metaestable del  $\text{CaCO}_3$  que ha sido observado principalmente en minerales de origen biológico (biominerales), como en el nácar de las conchas de algunos moluscos.<sup>111–113</sup> En *P. stenobrochis* y en *P. cairnsi*, se ven claramente los máximos de difracción, demarcados con una V en la *Figura 3. 22*. Después de aplicar el refinamiento Rietveld, se calculó la proporción entre las fases y para estas especies, la vaterita se encuentra presente en

proporciones entre 3 y 5%, respectivamente. Por su parte, para el resto de las especies, solamente el máximo a  $26.68^\circ$  es visible, y se le asignó una proporción  $<1\%$ .

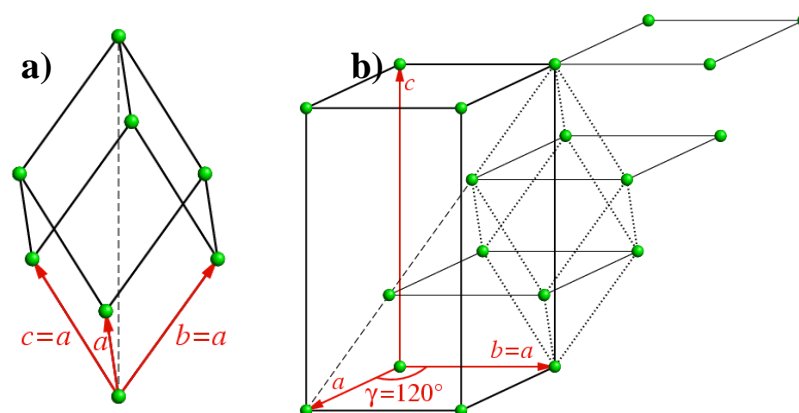


**Figura 3. 22** Patrones de difracción de un espécimen de cada especie estudiada del género *Pacifigorgia* e identificación de las fases cristalinas: calcita magnésica (C) y vaterita (V).

La diferencia entre la calcita y la vaterita a nivel cristalográfico se encuentra asociada a su simetría. La calcita es perteneciente al sistema cristalino trigonal (romboédrico), no obstante, este sistema puede ser considerado como con una variante del sistema cristalino hexagonal, como se visualiza en la *Figura 3. 23*.<sup>114</sup> Al igual que la calcita, la vaterita está clasificada dentro del sistema cristalino hexagonal, no obstante, su grupo espacial es  $P63/mmc$ , mientras que el de la calcita corresponde al grupo  $R\bar{3}c$ , dotado de elementos de simetría distintos a los observados en la vaterita.<sup>111-113</sup> Esta fase metaestable puede ser reconvertida a calcita con el tiempo, por lo tanto, la proporción de esta fase en las muestras que aquí se presentan podría ser inferior a la presente en los organismos vivos en el momento de su recolección.<sup>112</sup>

A partir de los patrones de difracción, se calcularon los parámetros de celda en Ångströms (Å) para la calcita en cada especie, según el método de Holland (1997), mediante el software UnitCell.<sup>115</sup> En el *Cuadro 3. 2* se presentan el promedio y la desviación estándar

entre especies de los ángulos de difracción  $2\theta$  y su correspondiente desplazamiento ( $\text{\AA}$ ) para cada plano cristalográfico denotado por sus índices de Miller con la nomenclatura  $hkl$ . Por su parte, en el *Cuadro 3. 3* se muestran los resultados del cálculo de estos parámetros para cada especie del género *Pacifigorgia*.<sup>115</sup> Los parámetros de celda promedio calculados al 95% de confianza para la calcita magnésica en *Pacifigorgia* son:  $a = (4.925 \pm 0.001) \text{\AA}$ ,  $c = (16.772 \pm 0.006) \text{\AA}$ , y un volumen de celda ( $V_c$ ) de  $(352.4 \pm 0.2) \text{\AA}^3$ .



**Figura 3. 23** Interpretación del sistema romboédrico (a) como parte del sistema cristalino hexagonal en una celda de tipo hexagonal centrada en el romboedro (b).<sup>114</sup>

**Cuadro 3. 2** Planos cristalográficos asociados a cada ángulo de difracción y respectiva distancia observados en los patrones de XRD de las escleritas del género *Pacifigorgia*. Para facilitar la presentación de los resultados, se muestra el promedio y la desviación estándar entre especies del ángulo  $2\theta$  y la distancia de cada plano cristalográfico.

Ángulo $2\theta$ ( $^\circ$ )	Desviación Estándar ( $^\circ$ )	Distancia ( $\text{\AA}$ )	Desviación Estándar ( $\text{\AA}$ )	Índices de Miller (hkl)
23.37	0.04	3.803	0.007	012
29.85	0.05	2.99	0.005	104
36.46	0.05	2.462	0.003	110
39.98	0.05	2.253	0.003	$01\bar{3}$
43.75	0.08	2.067	0.004	202
48.34	0.08	1.881	0.003	018
49.27	0.07	1.848	0.003	$11\bar{6}$
58.24	0.06	1.583	0.001	$10\bar{1}0$
62.31	0.13	1.489	0.003	$21\bar{5}$

**Cuadro 3. 3** Cálculo de los parámetros de celda a, c y  $V_c$  de las calcitas magnésicas de *Pacifigorgia* y del porcentaje de Magnesio estimado a partir de cada uno de ellos. Todos los resultados se reportan a un 95% de confianza.

Especie	a (±0.001) [Å]	%Mg (a)	c (±0.006) [Å]	%Mg (c)	V de celda (±0.2) [Å <sup>3</sup> ]	%Mg (V <sub>c</sub> )
<i>P. firma</i>	4.921	17.83	16.765	16.72	351.6	17.33
<i>P. rubinoffi</i>	4.916	19.10	16.732	18.55	350.2	18.80
<i>P. rubicunda</i>	4.928	16.05	16.802	14.67	353.4	15.45
<i>P. stenobrochis</i>	4.936	14.02	16.794	15.11	354.4	14.40
<i>P. cairnsi</i>	4.927	16.31	16.767	16.61	352.5	16.39
<b>Promedio</b>	<b>4.926</b>	<b>16.56</b>	<b>16.772</b>	<b>16.33</b>	<b>352.4</b>	<b>16.50</b>

Al comparar los parámetros de celda con los de la calcita pura ( $a = 4.989$  Å,  $c = 17.062$  Å) se evidencia una clara reducción del tamaño de la celda unidad. El origen de esta reducción surge del efecto de la sustitución del Ca por Mg. Como el radio iónico del  $Mg^{2+}$  es menor al del  $Ca^{2+}$ , la sustitución con Mg causa una reducción del tamaño de la celda, lo que afecta directamente al resultado de los parámetros de celda.<sup>116</sup> A partir de estos cambios, autores como Titschack (2011) o Fahad (2018), han desarrollado métodos para el cálculo de la fracción molar de Mg en calcitas magnésicas.<sup>117,118</sup> Este método está basado en una regresión lineal, en dónde se calcula el porcentaje de magnesio (%Mg) a partir de los valores de a, c y  $V_c$ . De esta manera, se utilizaron las ecuaciones 3-5 para calcular los %Mg que se presentan en el Cuadro 3. 3.<sup>117</sup>

$$\%Mg(a) = -254.268064 * a + 1269.083982 \quad [ 3 ]$$

$$\%Mg(c) = -55.423796 * c + 945.901576 \quad [ 4 ]$$

$$\%Mg(V_c) = -1.047482 * V_c + 385.628601 \quad [ 5 ]$$

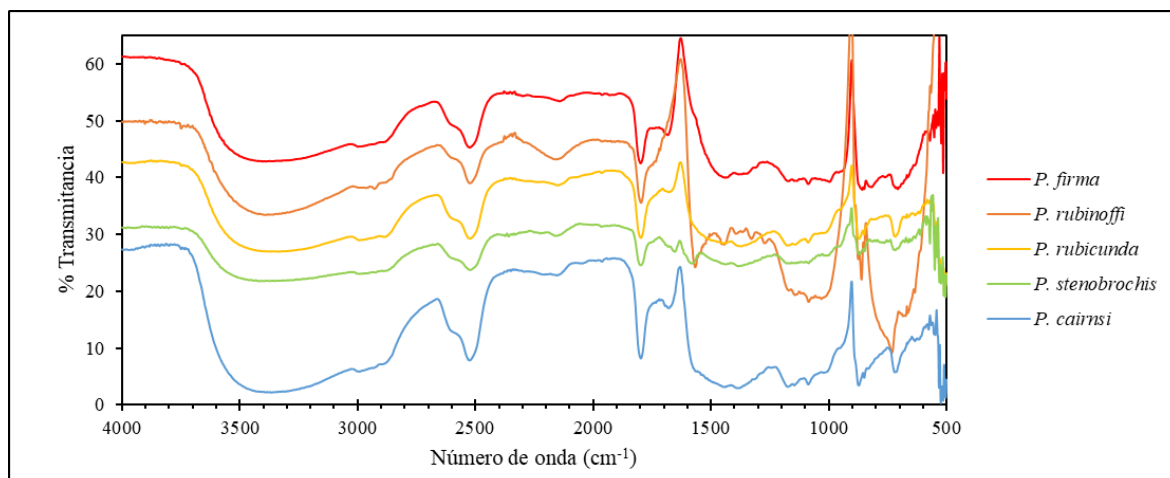
Si bien es cierto las aproximaciones del %Mg mediante los parámetros c y a son buenas, se debe tener en cuenta que estos resultados podrían tener cierto grado de desviación respecto al %Mg real presente. Esto se debe a que estos biominerales conforman un material mesocristalino, con materia orgánica intracristalina.<sup>108</sup> Autores como Pokroy *et al.* (2006)

han reportado efectos considerables causados por una interacción preferencial en ciertas caras cristalinas de la calcita y la materia orgánica, causando mayores distorsiones de red en el eje c.<sup>119</sup> A pesar de ello, también se ha reportado que el  $Mg^{2+}$  interacciona de manera específica con las caras {011} de la calcita, lo que provoca que haya un efecto de elongación del eje c que se suma a la distorsión producida por la materia orgánica.<sup>120</sup>

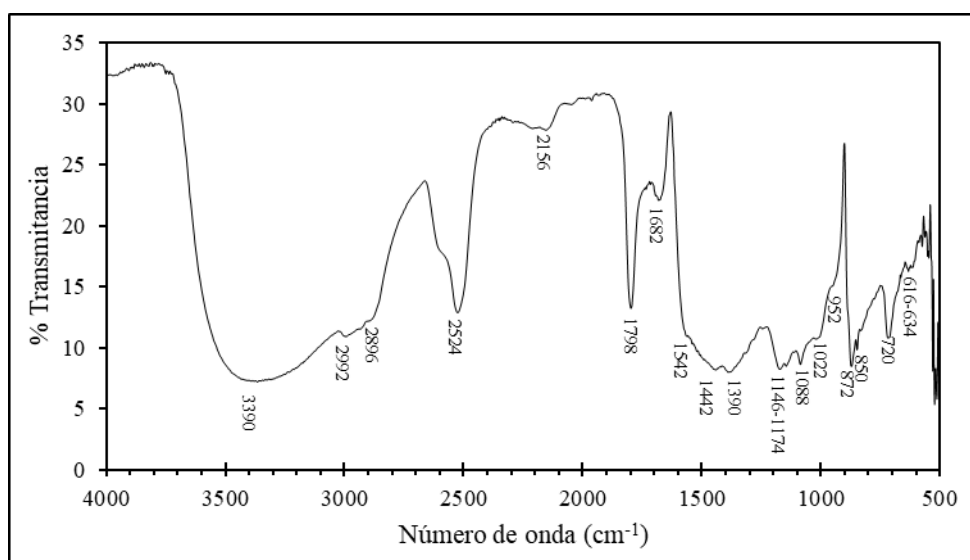
En respuesta a esto, se les atribuye mayor importancia a las determinaciones de %Mg basadas en el volumen de celda, que toma en cuenta ambos parámetros de celda. Sin embargo, para lograr una determinación exacta del %Mg presente en las muestras se deberían implementar otro tipo de técnicas analíticas, como espectroscopía de absorción, no obstante, esto se encuentra fuera del foco de esta investigación.<sup>117</sup> Sumado a esta, otra metodología que se podría utilizar es la calcinación de las muestras previo a la medición de los patrones de difracción, lo cual, eliminaría el efecto generado por la presencia de materia orgánica. Como nota final, es bueno tomar en cuenta que las calibraciones para realizar estas regresiones se hacen con muestras de calcitas magnéticas de origen biológico, por lo tanto, en algunos casos también estos efectos de la matriz orgánica suelen ser tomados en cuenta.<sup>117</sup>

### **Espectroscopía IR**

En la Figura 3. 24 se muestran los espectros IR de las escleritas de los especímenes del género *Pacificorgia*. En general, los espectros recuperados en cada muestra presentan las mismas señales. No obstante, dada la irregularidad de la superficie de las escleritas y el uso de un método de análisis microscópico, los espectros no son idénticos en cuanto a intensidad o a la forma de algunas señales. En muchos casos, la topografía de la esclerita y la dificultad para enfocar la mayoría de la superficie hace que en algunas mediciones las bandas sean tenues y aparentan una forma menos definida. A pesar de ello, fue posible recuperar buenos espectros con información tanto de la fase inorgánica como de la fase orgánica presente en las muestras. Contrario a esto, el uso de Espectroscopía IR de transmisión con pastillas de KBr o con Reflectancia Total Atenuada (ATR-IR) resultó en espectros en donde la fracción mineral predominó por completo el perfil del espectro. De esta manera, las señales de la calcita magnética opacaron totalmente las señales de las otras especies y por ello, estos resultados no se tomaron en cuenta en esta discusión.



**Figura 3. 24** Espectros IR de escleritas individuales de corales del género *Pacifigorgia*. Los especímenes presentados son C7CO1, C8NI, C12NC, C15CC y C18CR.



**Figura 3. 25** Espectro IR del espécimen C18CR (*P. cairnsi*) en dónde se etiquetan los máximos de cada banda vibracional observada.

La asignación de todas las señales se presenta en la *Figura 3. 25* y se encuentra resumido en la *Tabla 3. 1*. Tal y como se observa, la mayoría de estas señales están asignadas a la fase inorgánica de las escleritas, es decir, a la calcita magnésica. Esto es esperado, dado a que se estima que esta fase corresponde a más del 98% de la composición de las escleritas de octocorales.<sup>37</sup> Respecto a esta fase, se confirma que se trata de calcita magnésica gracias a las señales observadas a 720, 872, 1088, 1442  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes con los modos

vibracionales de una estructura de simetría trigonal plana de tipo  $\text{XO}_3$ , como el  $\text{CO}_3^{2-}$ , es decir, con estiramiento simétrico ( $\nu_4$ ), flexión fuera del plano ( $\nu_2$ ), estiramiento asimétrico doblemente degenerado ( $\nu_1$ ) y la flexión en el plano doblemente degenerada ( $\nu_3$ ), respectivamente.<sup>121</sup>

**Tabla 3. 1** Asignación de los modos vibracionales correspondientes a cada señal encontrada en los espectros IR de las escleritas del género *Pacifigorgia*. La posición de las bandas se basa en el espectro de la *Figura 3. 25*.

Señal ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional	Modo vibracional	Especies químicas relacionadas
3390	(O-H)	Estiramiento	Carbohidratos (oligosacáridos) <sup>65</sup>
2992	(C-H)	Estiramiento asimétrico $\nu_{as}$	Alcanos en proteínas <sup>65,122</sup>
2896	(C-H)	Estiramiento simétrico $\nu_s$	Alcanos en proteínas <sup>65,122</sup>
2524	( $\text{CO}_3^{2-}$ )	Banda de combinación $\nu_3 + \nu_1$	Calcita magnésica <sup>43</sup>
2156	(N-H)	Banda de combinación	Proteína <sup>122</sup>
1798	( $\text{CO}_3^{2-}$ )	Banda de combinación $\nu_4 + \nu_1$	Calcita magnésica <sup>43,121</sup>
1682	(C=O)	Estiramiento (amida I)	Proteína (Asp+Asn, Glu+Gln) <sup>65,122</sup>
1442	( $\text{CO}_3^{2-}$ )	Estiramiento asimétrico $\nu_3$	Calcita magnésica <sup>121</sup>
1390	( $\text{CO}_3^{2-}$ )	Estiramiento asimétrico $\nu_3$	Calcita magnésica <sup>43,121</sup>
1174 1146	( $\text{SO}_4^{2-}$ )	Estiramiento asimétrico $\nu_3$	Sustitución de $\text{CO}_3^{2-}$ en calcita <sup>43</sup>
1088	( $\text{CO}_3^{2-}$ )	Estiramiento simétrico $\nu_1$	Calcita magnésica <sup>43,121</sup>
1021	(C-O)	Estiramiento asimétrico $\nu_{as}$	Carbohidratos (oligosacárido) <sup>65,122</sup>
952	(=C-H)	Flexión fuera del plano	Polienal (posible) <sup>45</sup>
872 850	( $\text{CO}_3^{2-}$ )	Flexión asimétrica fuera del plano $\nu_2$ + su satélite	Calcita magnésica <sup>43,121,123</sup>
720	( $\text{CO}_3^{2-}$ )	Flexión simétrica en el plano $\nu_4$	Calcita magnésica <sup>43,121</sup>
616 634	( $\text{SO}_4^{2-}$ )	Flexión asimétrica $\nu_4$	Sustitución de $\text{CO}_3^{2-}$ en calcita <sup>43</sup>

Mientras que la calcita pura ( $a = 4.989$ ,  $c = 17.062$ ,  $[\text{Mg}] \approx 0\%$ ) presenta bandas a 881, 1087 y 1432  $\text{cm}^{-1}$ , la calcita magnésica ( $a = 4.832$ ,  $c = 15.920$ ,  $[\text{Mg}] \approx 50\%$ ) las tiene a, 883, 1087 y 1480  $\text{cm}^{-1}$ , dónde el corrimiento de la banda a 1432  $\text{cm}^{-1}$  en calcita hacia 1480  $\text{cm}^{-1}$  es característico para la sustitución de iones  $\text{Ca}^{2+}$  con iones  $\text{Mg}^{2+}$ .<sup>121</sup> De esta manera, la magnitud de este corrimiento podría explicar la posición de la banda  $\nu_3$  en 1460  $\text{cm}^{-1}$  para la calcita magnésica presente en las escleritas dotadas con un 16% de Mg.<sup>121</sup> Sumado a esto, el

desdoblamiento observado en  $\nu_3$ , que genera las señales a 1460 y 1390  $\text{cm}^{-1}$  también puede ser explicado por la sustitución de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$ , que genera distorsiones de la simetría plana regular en el anión  $\text{CO}_3^{2-}$ .<sup>43</sup>

A pesar de esto, la posición de esta banda no se encuentra en concordancia con otras calcitas magnésicas encontradas en la literatura. En las escleritas del coral rojo (*Corallium rubrum*) la posición de las señales a 1405 y 1398  $\text{cm}^{-1}$  no concuerdan con las observadas, a 1460-1390  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>43</sup> Tampoco concuerdan con los valores a  $\sim 1418 \text{ cm}^{-1}$  observados en roca caliza con calcita magnésica con un porcentaje de sustitución con Mg entre el 8 y 10% Mg o con valores de 1422 y 1426  $\text{cm}^{-1}$  de calizas con un 23 y 40% de Mg.<sup>116</sup> De forma similar, la banda  $\nu_4$  a 720  $\text{cm}^{-1}$  se aproxima, pero no calza del todo con la posición de las bandas en las escleritas de coral a 713  $\text{cm}^{-1}$  y en calcitas sustituidas por  $\text{Mg}^{2+}$  en un 10-50%, fijadas en 712  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>43,116</sup> Aunque no se ha identificado una razón específica para ello, es posible que la posición de estas señales pueda variar según el instrumento de medición utilizado. Efectos ópticos según cada arreglo instrumental y la capacidad del equipo para detectar las bandas de los otros elementos de la matriz de las escleritas pueden haber influido en estos resultados.

A excepción de los modos  $\nu_3$  y  $\nu_4$ , las bandas observadas en las escleritas de *C. rubrum* concuerdan en gran medida con las observadas en las escleritas del género *Pacificorgia*. Estas presentan la banda de poca intensidad a 1088  $\text{cm}^{-1}$ , generada por un modo vibracional prohibido según las reglas de selección del IR.<sup>43</sup> Asimismo, la banda de  $\nu_2$  reportada a 873  $\text{cm}^{-1}$ , se encuentra centrada en la misma zona, a 872  $\text{cm}^{-1}$ . Relacionada con esta banda, es posible observar la banda satélite a  $\nu_2$  de 848 a 850  $\text{cm}^{-1}$ , reportada previamente a 848  $\text{cm}^{-1}$ , la cual es generada producto de la sustitución de  $^{12}\text{C}$  por  $^{13}\text{C}$  en el anión  $\text{CO}_3^{2-}$ .<sup>43,123</sup>

También relacionadas con la calcita magnésica, la banda intensa a 1798  $\text{cm}^{-1}$  encontrada en las escleritas de *Pacificorgia*, concuerda con las bandas encontradas en 1799 correspondientes a la combinación de los modos  $\nu_1 + \nu_4$ . De la misma manera, la señal observada a 2524  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a una banda de combinación de los modos  $\nu_1 + \nu_3$ , presente también a 2523  $\text{cm}^{-1}$  en las escleritas del coral rojo.<sup>43</sup> Por su parte, las dos bandas observadas a 1146 y 1174  $\text{cm}^{-1}$  se asocian con el estiramiento asimétrico del ion sulfato ( $\nu_3$ ) reportado de 1145 a 1166  $\text{cm}^{-1}$  por Floquet (2015).<sup>43</sup> Sumado a estas, las bandas observadas a 616 y

634  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la flexión asimétrica ( $\nu_4$ ) del ion sulfato, por lo cual, es posible identificar la presencia de sustituciones de  $\text{CO}_3^{2-}$  por  $\text{SO}_4^{2-}$  en la red cristalina de la calcita magnésica que no fueron identificadas en los patrones de difracción.<sup>124</sup> Cabe destacar que esta asignación es probable pero no exclusiva, dado a que cerca de esta región podrían aparecer algunas señales de algunos componentes orgánicos presentes en las escleritas, incluidos los pigmentos.<sup>43</sup>

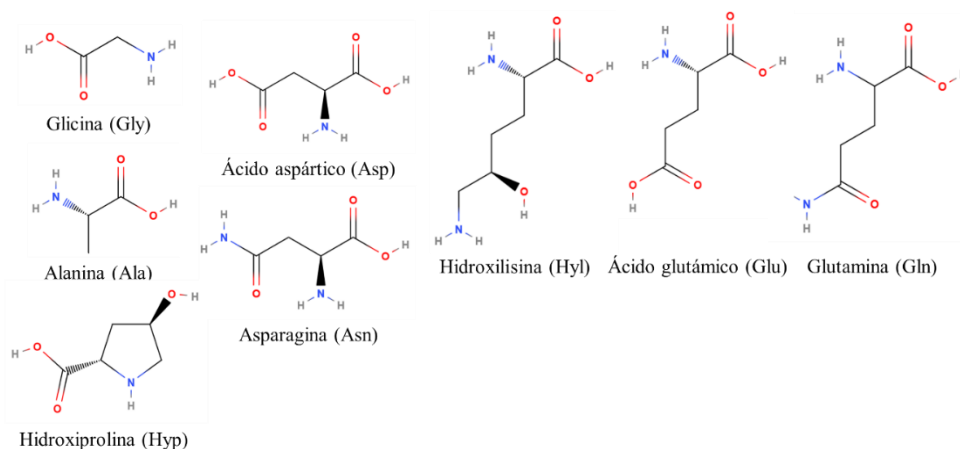
Por último, con respecto a la fase inorgánica no fue posible distinguir de las señales de calcita, las señales características de la vaterita a 850-878, 1090 o 1450  $\text{cm}^{-1}$  en los espectros analizados.<sup>121</sup> Además, aunque hay señales a 3380  $\text{cm}^{-1}$  y la señal exacta a 872  $\text{cm}^{-1}$  que podrían sugerir la presencia de  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , la ausencia de esta fase en los patrones de XRD y la incongruencia entre las bandas observadas y las esperadas para esta fase (750, 1405 y 1492  $\text{cm}^{-1}$ ) descartan esta posibilidad.<sup>125</sup> En favor de esto, es muy probable que la señal a 3380  $\text{cm}^{-1}$  corresponda con la presencia de humedad dentro de la esclerita o que esté relacionada a grupos funcionales -OH de la materia orgánica intracristalina.

Relacionado a esto, las señales que han sido asignadas a la materia orgánica en la Tabla 3. 1 concuerdan en gran medida con los grupos funcionales que conforman las moléculas orgánicas que han sido encontradas dentro de escleritas de otros octocorales.<sup>60,126</sup> Autores como Rahman (2011) encontraron varias proteínas extracelulares dentro de las escleritas de *Lobophytum crassum*, de las cuales la ECPM-67 mostró ser determinante para la obtención de la fase calcita.<sup>65</sup> Este polipéptido, se compone principalmente de proteínas acídicas, con un 37% de ácido aspártico + asparagina, 14% de alanina, 11% de glicina y 8% de ácido glutámico + glutamina (ver *Figura 3. 26*).<sup>65</sup>

Otros autores han encontrado en especies como *Leptogorgia virgulata* una gran cantidad de colágeno, que corresponde a la mayor cantidad de la matriz insoluble en AEDT de las escleritas (Ácido etilendiamino tetraacético, AEDT). Este presenta cantidades considerables de hidroxiprolina, hidroxilisina, glicina y residuos ácidos, cuya composición cambia respecto a la época del año (ver *Figura 3. 26*).<sup>127</sup> Además, se cree que estas proteínas podrían estar glucosiladas en los grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) libres de la asparagina o glutamina.

Esto quiere decir que la proteína posee residuos unidos a oligosacáridos; moléculas compuestas por dos o más monosacáridos cíclicos unidos (glucosa y glucosamina).<sup>127,128</sup>

En cuanto a los aminoácidos, la banda de amida I, corresponde a la vibración por estiramiento del grupo carbonilo observada a  $1682\text{ cm}^{-1}$ .<sup>65</sup> Su desplazamiento a mayor energía indica que la concentración de estas moléculas en la matriz es muy baja, lo cual tiene sentido con el bajo contenido de materia orgánica en la matriz.<sup>122</sup> Las bandas de amida II y amida III se encuentran superpuestas por otras señales y no se distinguen.<sup>122</sup> Por su parte, las bandas de alcanos observados entre  $2896$  y  $2990\text{ cm}^{-1}$  corresponden con los estiramientos del enlace C-H en las cadenas laterales de los residuos de la proteína, así como también corresponden a los grupos C-H en los oligosacáridos.<sup>65,122</sup> Sumado a esto, los oligosacáridos y residuos como Hyp y Hyl también se evidencian en la fuerte absorción del grupo -OH en  $3400\text{ cm}^{-1}$  y por la banda a  $1022\text{ cm}^{-1}$  correspondiente con el estiramiento C-O típico de grupos -OH primarios.<sup>65,122</sup>



**Figura 3. 26** Estructura de los residuos de aminoácidos presentes en la proteína ECPM-67 de *L. crassum* y el colágeno encontrado en *L. virgulata*.<sup>65,127</sup>

En lo referente al pigmento, en los espectros de infrarrojo no se obtuvo ninguna señal que pudiera permitir la identificación inequívoca de un polienal. La única señal que podría estar relacionada es el hombro observado a  $952\text{ cm}^{-1}$ , que correspondería a una banda intensa que debería observarse por la flexión fuera del plano del enlace C-H en un carbono conjugado de tipo  $sp^2$ .<sup>45</sup> Otros autores han realizado esfuerzos similares, pero el pigmento se encuentra en tan baja concentración que todas sus señales se ven opacadas por el ruido del espectro o

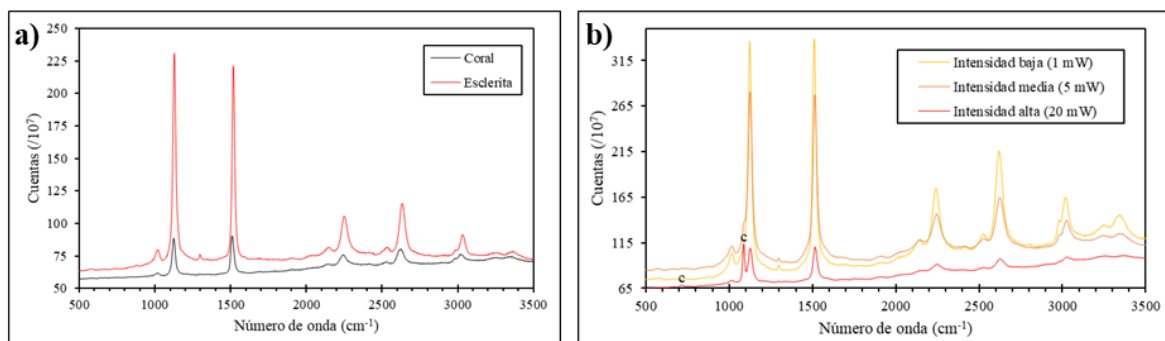
por las señales intensas del carbonato de calcio.<sup>45,54</sup> De encontrarse señales en el infrarrojo, estas corresponderían al estiramiento del carbonilo [ $\nu(\text{C}=\text{O})$ ], del enlace simple entre carbonos conjugados [ $\nu(\text{C}-\text{C})$ ] y el estiramiento del metilo terminal [ $\nu(\text{C}-\text{CH}_3)$ ].<sup>54</sup>

### **Microespectroscopía Raman**

Para llevar a cabo los estudios por medio de microespectroscopía Raman, fue necesario optimizar primero las condiciones de medición. En primer lugar, tomando en cuenta la disponibilidad técnica, se prefirió utilizar la longitud de onda de excitación a 532 nm, frente a la excitación con láseres de 785 y 1064 nm. Si bien es cierto que el láser rojo y el NIR-IR disminuyen la fluorescencia con respecto al láser verde, se ha reportado que, bajo estas condiciones a 532 nm, los pigmentos en octocorales experimentan resonancia Raman. Esto ocurre cuando se da un acoplamiento entre las transiciones electrónicas y vibracionales, causado por la excitación de la muestra con un láser con una longitud de onda cercana al máximo de absorción de la molécula.<sup>50,54,129,130</sup> Este fenómeno hace que la intensidad de sus señales incremente hasta en 5 órdenes de magnitud, permitiendo el estudio selectivo del pigmento aun cuando este está en muy baja concentración, como en el caso de las escleritas.<sup>130</sup>

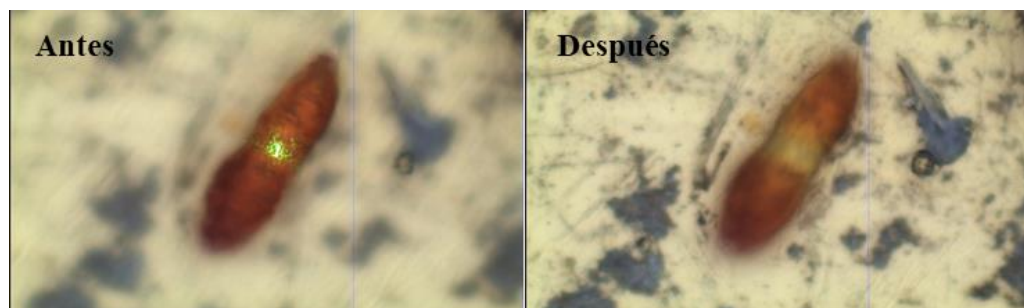
En segundo lugar, se determinó si había alguna diferencia al realizar la medición directamente sobre el coral o sobre las escleritas. En la *Figura 3. 27 a)* se observa cómo mientras que la posición y número de bandas se mantiene constante, la intensidad de las señales es mayor al medir sobre la esclerita comparada con la medición sobre el coral. A pesar de esto se pudo obtener una buena señal en las mediciones directas al optimizar el número y duración de las adquisiciones.

Aunque la relación señal/ruido es mejor al medir sobre la esclerita, la facilidad y rapidez que ofrece la espectroscopía Raman para realizar mediciones *in situ*, es explotada al máximo al medir sobre el coral directamente. Por esta razón, las mediciones sistemáticas se hicieron de esta manera, no obstante, los estudios sobre el fotoblanqueamiento y la determinación las diferencias espectrales según el tono y la intensidad de color de las escleritas se hicieron sobre escleritas aisladas para asegurar que el láser impactara solamente en una esclerita a la vez.



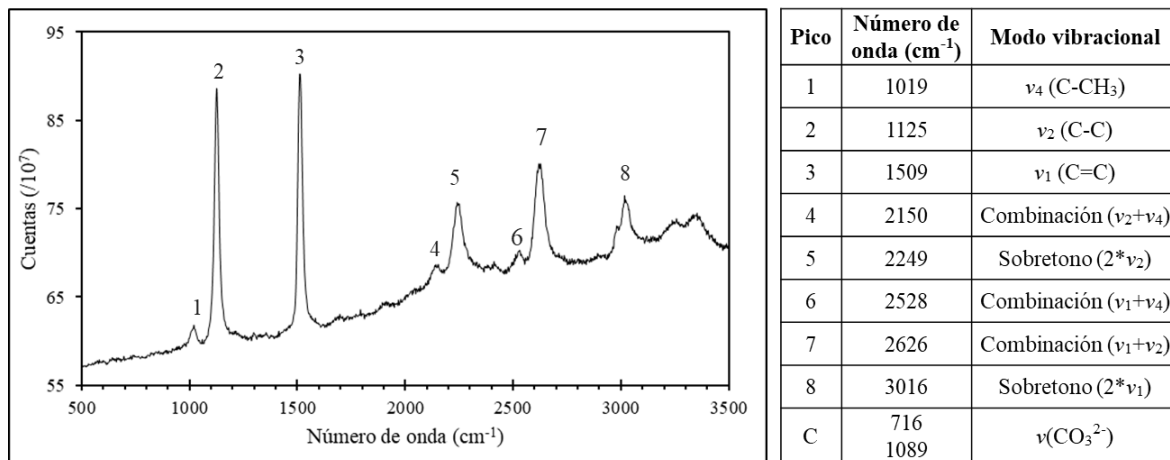
**Figura 3. 27** Espectros Raman de *P. firma* (C4CC) en a) la superficie del coral y en una esclerita aislada y b) en una esclerita roja medida con una potencia variable de 1, 5 y 20 mW. Ambas mediciones se hicieron con el láser verde de 532 nm y con el objetivo de 50x.

En tercer lugar, se optimizó la potencia del láser, utilizando diferentes potencias de excitación entre 1 y 20 mW. Mediante este estudio se evidenció cómo la intensidad de los picos del pigmento es mayor a menor potencia del láser, tal y como se observa en la Figura 3. 27 b). Esto se debe a la degradación del pigmento provocado por el láser, que causa la disminución de la intensidad del coral, como se observa en la Figura 3. 28. Como el foco de esta investigación se encuentra alrededor de los pigmentos, se maximizó la intensidad de sus señales al fijar la potencia del láser en 2 mW. Una observación que también se destaca es que, conforme se aumenta la potencia del láser, las señales de la calcita se hacen más evidentes, pudiéndose identificar las señales a  $716.6$  y  $1089.1$   $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes con los modos  $\nu_4$  y  $\nu_1$  de la calcita. Estas señales se encuentran denotadas con una “C” en la Figura 3. 27 b) para el espectro etiquetado en rojo, realizado a una intensidad de 20 mW.



**Figura 3. 28** Muestra del fotoblanqueamiento en una esclerita antocodial de C4CC (*P. firma*) que ocurre después de una adquisición con 25 acumulaciones de 0.5 segundos con un láser de 532 nm y una potencia de 20 mW.

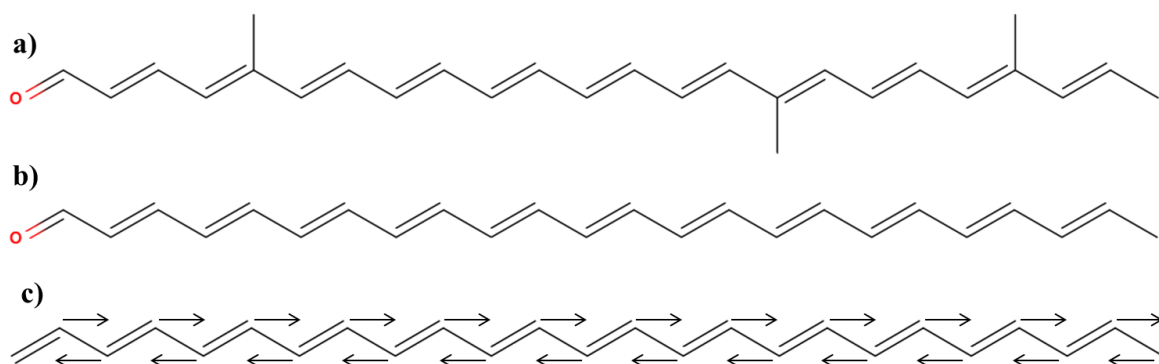
Una vez discutida la optimización de la adquisición de datos, se puede hacer el análisis de los resultados recuperados. En la *Figura 3. 29* se muestra un espectro Raman en dónde se observan las principales señales asociadas a los pigmentos en la muestra junto a su asignación. Al igual que en escleritas de otros octocorales, las señales observadas indican de manera inequívoca la presencia de un polienal parcialmente metilado, es decir, una cadena poliénica con un grupo aldehído conjugado en uno de sus extremos y sustituida por grupos metilo en regiones puntuales (*Figura 3. 30 a-b*).<sup>45,50,129–133</sup> Como es característico de estos y otros polienos de cadena larga, el espectro Raman muestra dos señales intensas a  $\sim 1125\text{ cm}^{-1}$  y  $\sim 1510\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a los estiramientos  $\nu_2(\text{C-C})$  y  $\nu_1(\text{C=C})$ , respectivamente. Estas vibraciones se visualizan mediante el esquema presentado en la *Figura 3. 30 c*.<sup>131</sup>



**Figura 3. 29** Espectro Raman de una esclerita de *P. firma* (C4CC) junto a una tabla en la que se resumen la asignación de las bandas observadas en el espectro. La medición se hizo con el láser verde de 532 nm, 2 mW de potencia y el objetivo de 50x. Las señales C de la calcita son visibles en la *Figura 3. 27 b*).

Por su parte, la banda a  $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$  ha sido asignada a las vibraciones de los grupos metilo, específicamente al modo  $\nu_4(\text{C-CH}_3)$ . Cabe destacar que esta banda podría ser malinterpretada y confundida con las bandas del anión sulfato, que se encuentran en el mismo rango misma energía.<sup>49</sup> La presencia del sulfato en este espectro no sería descabellada, dado a que este anión ha sido detectado previamente por medio de espectroscopía IR. No obstante, es necesario tener en cuenta que el  $\text{SO}_4^{2-}$  sólo reemplaza una pequeña fracción de los aniones

$\text{CO}_3^{2-}$ , por tanto, dada su baja concentración, sería muy difícil detectar su presencia si ya las bandas del carbonato son muy débiles y no presentan resonancia de ningún tipo. Por su parte, la señal a  $1019 \text{ cm}^{-1}$ , aunque debería ser débil, presenta una intensidad considerable, por lo cual, se cree que al estar unido al pigmento experimenta un incremento en la intensidad por la resonancia Raman de este.<sup>49</sup>



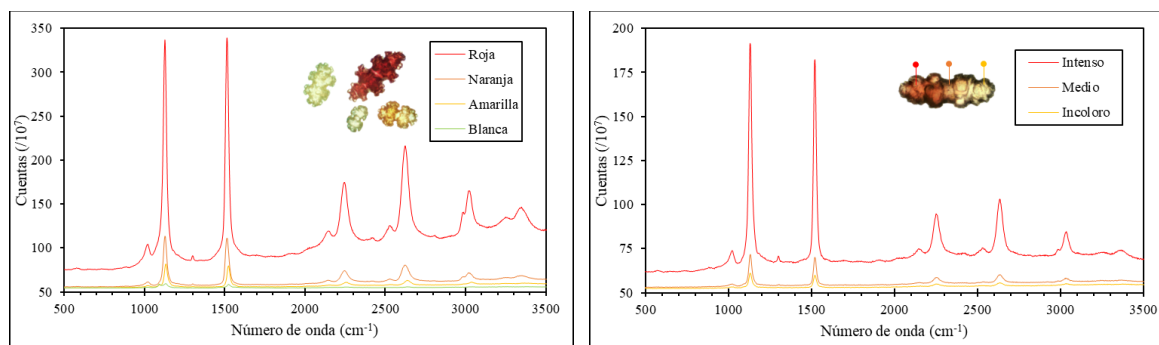
**Figura 3. 30** Estructura de a) un polienal  $n = 11$  parcialmente metilado y b) un polienal  $n = 11$  sin metilaciones.<sup>49</sup> En c) se esquematiza el modelo lineal simplificado de un polieno lineal, en el que se aprecia el desplazamiento por efecto del estiramiento en  $\text{C}=\text{C}$  y  $\text{C}-\text{C}$ .<sup>131</sup>

Sumado a esto, la asignación de esta banda a sulfato se descarta completamente debido a que la metilación de las cadenas de polienales se puede confirmar gracias a la presencia de las bandas de combinación a  $2150$  y  $2528 \text{ cm}^{-1}$ . Estas dos bandas se encuentran exactamente a la energía que corresponde a la resonancia entre el modo  $\nu_4$  del metilo y los modos  $\nu_1(\text{C}=\text{C})$  y  $\nu_2(\text{C}-\text{C})$  del polienal.<sup>54</sup> De esta manera,  $\nu_4(\text{C}-\text{CH}_3) + \nu_2(\text{C}-\text{C}) = 2144 \text{ cm}^{-1}$ , muy cercano a los  $2150 \text{ cm}^{-1}$  observados y  $\nu_4(\text{C}-\text{CH}_3) + \nu_1(\text{C}=\text{C}) = 2528 \text{ cm}^{-1}$ , el valor exacto del máximo registrado para el pico 6 en la *Figura 3. 29*. Si el metilo, con el modo  $\nu_4(\text{C}-\text{CH}_3)$  no estuviera unido a la cadena poliénica con los modos  $\nu_1(\text{C}=\text{C})$  y  $\nu_2(\text{C}-\text{C})$ , no habría forma de que estas vibraciones se acoplaran para generar las bandas de combinación observadas. Esta misma observación se ha realizado en numerosas investigaciones, en donde la ausencia del metilo en polienos poliinsaturados resulta en la ausencia de las bandas de combinación a  $\sim 2145$  y  $\sim 2530 \text{ cm}^{-1}$  aún si existe una señal alrededor de  $1010 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>50-55,130-135</sup>

Al analizar los espectros de escleritas de distintos colores, como en la *Figura 3. 31 a)*, permite notar que diferentes tonalidades resultan en espectros con intensidades muy

variables y en el cambio sutil en la posición de los máximos de cada señal. Por ejemplo, en el caso de *P. firma*, las escleritas rojas suelen tener intensidades de absorción mucho mayores que las de escleritas naranjas, amarillas o claras. Esto ha sido observado y se ha demostrado que tanto la intensidad de la señal en Raman como la fluorescencia de fondo varían en función del color macroscópico del coral, siendo mayores para colores más intensos.<sup>133</sup>

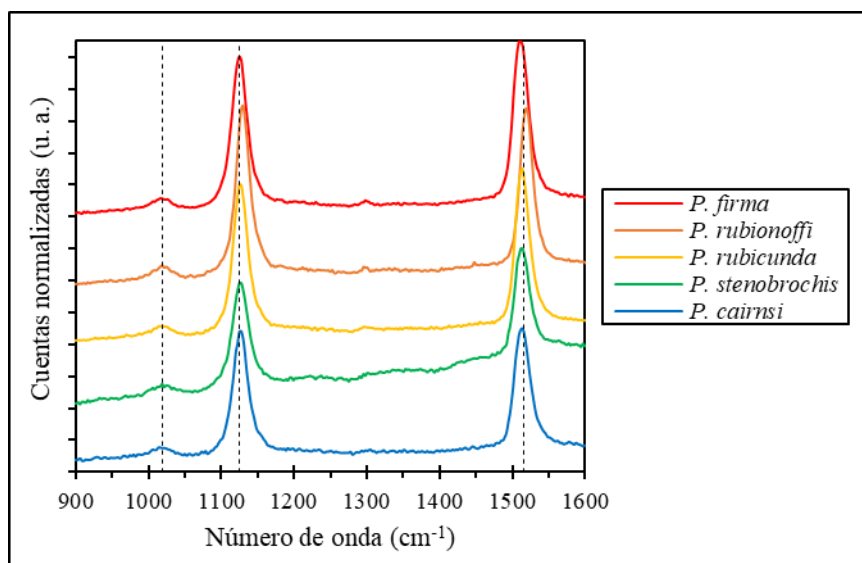
Aparte de la intensidad, la posición de los picos 1, 2 y 3 también varía. En escleritas rojas y naranjas es 1019, 1125 y 1512  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, mientras que las escleritas de tonos más amarillentos tienen sus máximos en 1019, 1132 y 1521  $\text{cm}^{-1}$ . Este cambio se ha observado en otros octocorales del género *Leptogorgia* y *Muricea*, donde la tendencia marca una disminución en los números de onda conforme se pasa de colores amarillos a colores rojizos o violetas.<sup>50</sup> A partir de esto, se observa un desplazamiento a mayor energía en los picos 2 y 3. No obstante, el análisis de las escleritas bicolor indica que la intensidad de las señales asociadas al pigmento es mayor en escleritas más coloreadas y su posición se mantiene, por lo cual, se ha determinado que a mayor intensidad de color, mayor es la concentración del pigmento en la esclerita.



**Figura 3. 31** Espectros Raman de *P. firma* (C4CC) en a) escleritas de diferente color y b) en una esclerita con diferentes intensidades de color. Estas mediciones se hicieron con el láser verde de 532 nm con una potencia de 2 mW y el objetivo de 50x.

A partir de todas las observaciones realizadas, se pueden analizar los espectros Raman para cada especie, mismos que se presentan en la *Figura 3. 32*. En general, para el pico 1 se observaron señales desde 1014 hasta 1035  $\text{cm}^{-1}$ , lo que quiere decir que en general, el grado de metilación de la cadena poliénica es variable entre las especies. Aunque no es posible

asegurar ni la posición ni la cantidad de metilos, se sabe que, a mayores números de onda, menor cantidad de metilaciones en la cadena.<sup>50</sup> Así mismo, la presencia de números de onda mayores a  $1010\text{ cm}^{-1}$  es un claro indicador de que, en todos los casos, la posición de estos no refleja la simetría de las metilaciones encontradas en moléculas como carotenoides, sino que su posición no sigue un patrón simétrico.<sup>45,132</sup>



**Figura 3. 32** Espectros Raman de una muestra de cada especie del género *Pacifigorgia*. Las líneas punteadas denotan los picos 1, 2 y 3 a  $1020$ ,  $1125$  y  $1515\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Estas mediciones se hicieron con el láser de  $532\text{ nm}$ , una potencia de  $2\text{ mW}$  y el objetivo de  $50\times$ .

Por su parte, los picos 2 y 3 correspondientes con las bandas  $\nu_2(\text{C-C})$  y  $\nu_1(\text{C=C})$  del polienal, también fueron variables, con valores entre  $1125$  y  $1133\text{ cm}^{-1}$  y  $1511$  y  $1531\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Lo anterior puede ser utilizado para estimar la cantidad de insaturaciones en los polienales encontrados en las escleritas de *Pacifigorgia*, según las ecuaciones 6 y 7, donde  $A_2 = 1082$  y  $B_2 = 476$ ; y  $A_3 = 1438$  y  $B_3 = 830$ . Estas ecuaciones surgen de una regresión lineal del inverso de la conjugación ( $1/N$ ,  $N$  = número de dobles enlaces) y el valor en números de onda del máximo de los picos 2 y 3, que son  $R_2$  y  $R_3$ , respectivamente.<sup>136,137</sup> De acuerdo con esto, la cantidad de insaturaciones (enlaces dobles) en los polienales de *Pacifigorgia* se resumen en el Cuadro 3. 4.

$$N_2 = \frac{B_2}{R_2 - A_2} \quad [ 6 ]$$

$$N_3 = \frac{B_3}{R_3 - A_3} \quad [ 7 ]$$

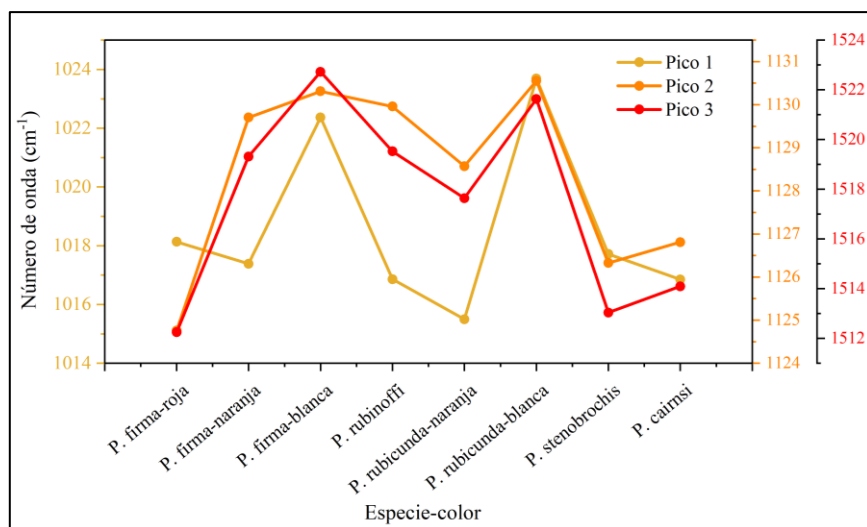
**Cuadro 3. 4** Resumen de la posición de los picos 1, 2 y 3 de los espectros Raman de las escleritas del género *Pacifigorgia* y estimación del número de insaturaciones según la regresión de Schaffer (1991).<sup>136,137</sup>

Especie	Número de onda promedio (cm <sup>-1</sup> )			Número de enlaces dobles		
	Pico 1	Pico 2 (R <sub>2</sub> )	Pico 3 (R <sub>3</sub> )	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	Estimado
<i>P. firma</i> - roja	1018	1125	1512	11.1	11.2	11
<i>P. firma</i> - naranja	1017	1130	1519	10.0	10.2	10
<i>P. firma</i> - blanca	1022	1130	1523	9.9	9.8	10
<i>P. rubinoffi</i>	1017	1130	1520	9.9	10.2	10
<i>P. rubicunda</i> - naranja	1015	1129	1518	10.2	10.4	>10
<i>P. rubicunda</i> - blanca	1024	1131	1522	9.8	9.9	10
<i>P. stenobrochis</i>	1018	1126	1513	10.7	11.1	11
<i>P. cairnsi</i>	1017	1127	1514	10.6	10.9	<11

La determinación de la cantidad de insaturaciones según la posición de las bandas  $\nu_2(\text{C-C})$  y  $\nu_1(\text{C=C})$  en el espectro Raman, permite reforzar la idea de que en estas matrices es probable que exista una mezcla de pigmentos. Aunque muy similares entre sí, se pueden tener concentraciones variables de polienales con diferentes largos de cadena, lo que resulta en las estimaciones observadas en el *Cuadro 3. 4*. Asimismo, la variación en la posición de la banda  $\nu_4(\text{C-CH}_3)$  implica la presencia de variaciones tanto en el número como en la posición de las metilaciones. Ante esto, para visualizar de manera pictórica las diferencias entre estas bandas, se elaboró la *Figura 3. 33*. Mediante dicha gráfica, se puede observar cómo la posición de las bandas  $\nu_2(\text{C-C})$  y  $\nu_1(\text{C=C})$  correspondientes a los picos 2 y 3, casi siempre varía de la misma manera, por lo tanto, tienen una correlación positiva entre ambas, e inversamente proporcional a la cantidad de insaturaciones.<sup>136,137</sup>

Esta relación puede explicarse debido a que para sistemas más conjugados (mayor N), la energía requerida para provocar la polarización de la nube electrónica es menor. Por esta razón, el cambio en la polarización ocurre a menor energía y, por tanto, a menor número de onda para cadenas largas. De manera contraria ocurre para cadenas más cortas, cuyas bandas aparecen a mayores números de onda puesto que requieren de mayor energía para excitarse.<sup>136,137</sup> Por su parte, la posición de la banda  $\nu_4(\text{C-CH}_3)$  etiquetada como pico 1 parece

seguir la misma tendencia y tener una correlación positiva con los picos 2 y 3. A pesar de ello, en *P. rubinoffi* y en *P. stenobrochis* se rompe este patrón y la correlación es inversa, no obstante, no se tiene una explicación para ello. Es probable que tanto la posición como el número de grupos metilo en el polienal afecten al rango de aparición de esta banda.



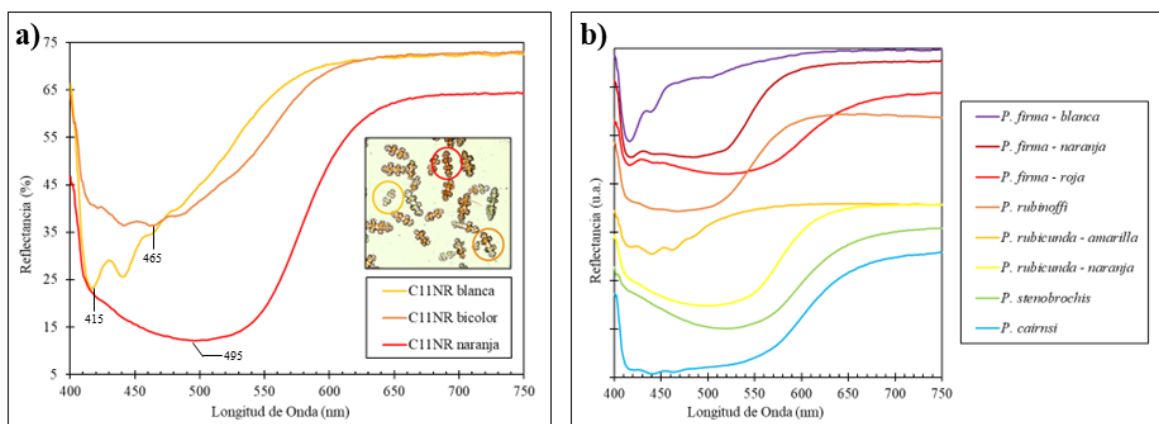
**Figura 3. 33** Relación entre el promedio de la posición de los picos 1, 2 y 3 para cada color de esclerita en las especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.

### Microespectroscopía UV-Visible-NIR

Respecto a la caracterización del color en organismos pigmentados, autores Masello (2004) y McGraw (2005) han recalcado la importancia de los espectros de reflectancia para hacer una correcta evaluación de este parámetro físico.<sup>134,138</sup> Se dice que, si bien es cierto, pigmentos como los polienales se pueden describir de manera relativamente precisa mediante el color, muchas veces el ojo humano no posee los receptores específicos para captar la luz reflejada en el rango de longitudes de onda en el ultravioleta o NIR. Por esta razón, el uso de espectroscopía UV-Visible-NIR de reflectancia se convierte en una herramienta necesaria que puede ofrecer más información acerca de estos sistemas.<sup>134,138</sup>

En la *Figura 3. 34*, se presentan los espectros de reflectancia de los polienales en *Pacifigorgia*, caracterizados por una banda ancha en la región visible y en el UV-cercano. A diferencia de un espectro de absorbancia, los espectros de reflectancia presentan como máximos aquellas longitudes de onda que son reflejadas por un material y como mínimos

aquellas que no. En materiales opacos, las longitudes de onda no reflejadas pueden interpretarse como pérdida de la intensidad de la luz reflejada por efectos de dispersión y, principalmente, absorción. De esta manera, un mínimo de reflectancia coincide muchas veces con el máximo de absorción para un mismo material y por ello, para esta discusión, ambos términos se utilizan como sinónimos, aunque no se trate del mismo fenómeno físico.



**Figura 3. 34** Espectro de reflectancia Visible-NIR de escleritas individuales de corales del género *Pacifigorgia*. A la izquierda se muestra el cambio en la reflectancia dependiente de la intensidad del color de las escleritas en el espécimen C11NR (*P. rubicunda*). A la derecha se muestra un espectro de reflectancia representativo de cada especie según el color de sus escleritas.

En el caso de las escleritas del género *Pacifigorgia*, estas presentan solamente una banda ancha, con máximos de absorción (mínimos de reflectancia) entre los 400 y 550 nm. Estos espectros de reflectancia son similares a los espectros de los polienales y carotenoides encontrados en el plumaje de algunos loros y otros pájaros.<sup>134</sup> Autores han descrito los pigmentos encontrados en octocorales del género *Muricella*, en donde se ha descrito al carotenoide muricellaxantina con máximos de absorción a 232, 269, 338 y 453 nm.<sup>41</sup> Otro ejemplo se encuentra en la astaxantina y cantaxantina, carotenoides extraídos de *Corallium rubrum*, que tienen picos a 300 y 485 nm.<sup>139</sup> Aunque en su mayoría los espectros coinciden con los carotenoides y polienales encontrados en otros animales, dada la ventana espectral del equipo utilizado no se puede ver la pequeña banda que aparece aproximadamente a 300 nm, no obstante, la banda de interés es perfectamente visible.<sup>54,134</sup>

Al analizar los espectros de reflectancia a detalle, se determina que la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  es la responsable de la banda de absorción más intensa observada.<sup>140-144</sup> En ciertas investigaciones se ha reportado la existencia de un corrimiento batocrómico de esta señal conforme aumenta el largo de la cadena poliénica conjugada.<sup>135,140,141</sup> La razón por la que esto ocurre es que al aumentar la extensión del sistema conjugado, incrementa también la deslocalización de los electrones, logrando un sistema  $\pi$  que requiere de menor energía para experimentar la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ . De esta manera, se ha observado cómo la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción varía linealmente según la raíz cuadrada de la longitud efectiva del sistema  $\pi$  conjugado y no se observó que dependiera de la presencia de otros sustituyentes en la molécula. En efecto, este corrimiento es la prueba de que la banda observada corresponde a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  hacia un estado triplete.<sup>140,142-144</sup>

Esta misma tendencia puede ser observada en la *Figura 3. 34 a)* dónde, conforme se tienen coloraciones más intensas, partiendo de blanco hasta el naranja, se observa un corrimiento del máximo de la banda a mayores longitudes de onda. Si contrastamos esta información con los resultados de la espectroscopía Raman en el *Cuadro 3. 4*, se observa cómo para *P. rubicunda*, las escleritas más claras poseen pigmentos con longitudes de cadena menores a las de escleritas más oscuras. En la *Figura 3. 34 b)* se puede observar cómo en *P. firma*, existe la misma tendencia y de la misma manera, escleritas rojas poseen pigmentos con longitudes de cadena mayores que las calculadas para escleritas blancas. Si bien es cierto la diferencia entre escleritas rojas y naranja es más sutil en los espectros Raman, en el espectro UV-Visible-NIR, es más evidente.

Por otra parte, es evidente que los espectros no varían solamente en cuanto a la posición de las bandas, sino en cuanto a sus formas. En las mismas investigaciones mencionadas anteriormente, los estudios se hicieron con polienales disueltos en disolventes de polaridad variable y no en matrices sólidas, como en el caso de las escleritas.<sup>140,141,145</sup> A pesar de ello, en ambos casos se observan efectos similares que vale la pena señalar. Por ejemplo, se habla sobre los efectos de la polaridad del disolvente sobre la forma del espectro y la posición del máximo de absorción en polienales. Utilizando disolventes como metil- y trimetil- pentano, perfluorodimetilciclobuteno o metil-tetrahidrofurano, todos de muy baja polaridad, a nivel cualitativo se obtuvieron espectros muy similares al de la esclerita bicolor

en la *Figura 3. 34 a*). Por su parte, las disoluciones en dimetilsulfóxido resultaron en espectros comparables a los de la esclerita blanca en la misma figura. Finalmente, las disoluciones en cloroformo, tetrahidrofurano diclorometano, metanol, etanol y acetonitrilo resultaron en espectros comparables a los de las escleritas color naranja en *P. rubicunda*.<sup>140</sup>

Los autores señalan cómo en disolventes muy poco polares y en el dimetilsulfóxido se resuelve de buena manera la estructura fina vibracional de los polienales que, en disoluciones con otros disolventes sólo se observa como una banda ancha de un solo máximo. Esta estructura aparece por la superposición de las bandas vibracionales con las transiciones electrónicas de esa molécula, no obstante, su visualización en el espectro depende de factores como temperatura, el disolvente utilizado y la propia molécula estudiada.<sup>140,145,146</sup> De la misma manera, en los espectros de las escleritas de *Pacificorgia* los colores menos intensos resultaron en bandas con mayor resolución vibracional, mientras que los colores más intensos, resultaron en bandas anchas.

Sumado a esto, los autores de esta investigación observaron solvatochromismo con el cambio de disolventes, que se refiere al corrimiento de los máximos de absorción según la polaridad del disolvente.<sup>140,141,146</sup> Así, en el caso de disolventes no polares se observó un solvatochromismo positivo a medida que aumentaba la polaridad, es decir, se observaba un corrimiento batocrómico. Mientras tanto, en el caso de disolventes polares, se observó un solvatochromismo negativo, que resultó en un desplazamiento hipsocrómico de las bandas para la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  a medida que se aumentó la polaridad del disolvente. Ambos fenómenos ocurren debido a que el solvente induce cambios en el estado basal electrónico de las moléculas de pigmento. En medios no polares, la molécula se encuentra en una estructura menos dipolar, es decir, con una densidad electrónica distribuida de forma más homogénea que bajo disolventes polares, que inducen un dipolo en la molécula.<sup>140</sup>

A todo esto, en el caso de los pigmentos incluidos dentro de la calcita, estos no se encuentran solvatados por disolventes de polaridad variable, sin embargo, se toma en cuenta este mismo razonamiento para comprender qué podría generar algunos desplazamientos observados en los espectros de reflectancia que no es posible explicar solo mediante el largo de cadena. De acuerdo con lo anterior, se destaca el papel del medio como un determinante

del estado electrónico basal del pigmento. De esta manera, se establece que cambios en el ambiente químico de los pigmentos podrían dar lugar a este tipo de fenómenos.

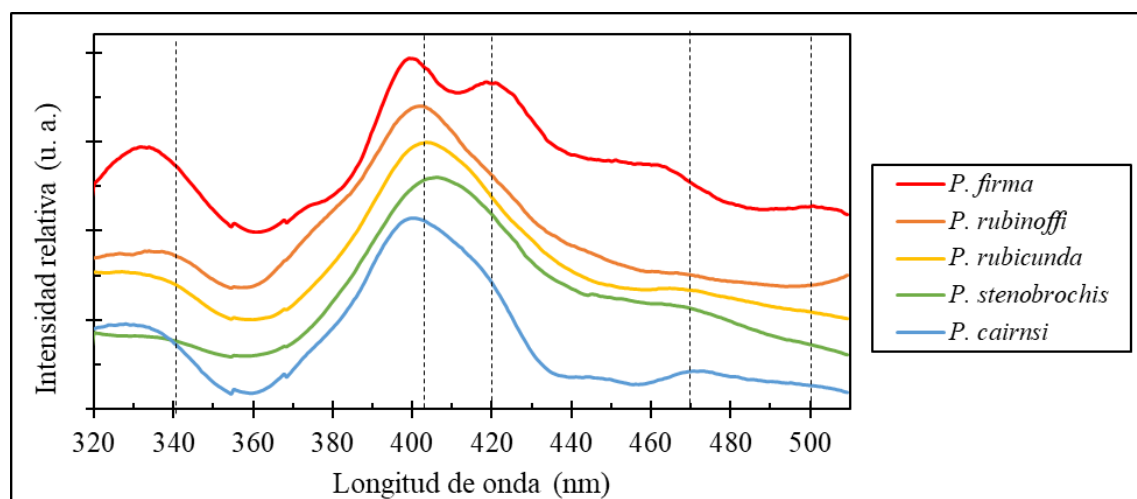
En el caso de una esclerita, compuesta de calcita y de proteínas acídicas, ambos componentes polares, se podría tener un sistema similar al de los pigmentos disueltos en disolventes polares. Por lo cual, en un medio como este, el aumento en la polaridad debería generar un desplazamiento hipsocrómico y su disminución en uno batocrómico. Además de esto, para esta hipótesis se tienen que tomar en cuenta las propiedades de los polienales. En primer lugar, estos conforman cadenas largas de muy baja polaridad; y en segundo, la intensidad del color que generan en una esclerita corresponde a la concentración de estos, como se observó en los espectros Raman de escleritas bicolor en la *Figura 3. 31 b*).

Con esto en mente se plantea la siguiente hipótesis: a medida que la concentración de los pigmentos aumenta, las moléculas individuales comienzan a percibir el efecto de las moléculas adyacentes. De esta manera, a medida que la concentración (y el color) aumenta, el ambiente químico de las moléculas individuales de pigmento se torna menos polar, lo que resulta en bandas que aparecen a menor energía (desplazamiento batocrómico). Por su parte, las moléculas individuales de pigmento en escleritas con bajas concentraciones de polienales, se encuentran en ambientes más polares y por tanto experimentan un desplazamiento hipsocrómico.<sup>140,141</sup> Este razonamiento tiene congruencia con lo observado en las escleritas de *P. firma* y *P. rubinoffi* y puede explicar algunos desplazamientos que ocurren en escleritas con pigmentos con el mismo largo de cadena, que deberían de aparecer a la misma energía.

### **Microespectroscopía de fluorescencia**

Los estudios de emisión de fluorescencia en esta investigación se hicieron en varios puntos sobre la superficie de las escleritas y a partir de ellos, se promediaron los espectros para construir las gráficas mostradas en la *Figura 3. 35*. A diferencia de los estudios de fluorescencia realizados por otros autores, la longitud de onda de excitación utilizada en este caso fue de 275 nm, con el objetivo de lograr la excitación no sólo del pigmento, sino de los otros componentes en la esclerita (proteínas y calcita). En general, los espectros mostraron bandas en 3 regiones en específico. Primero, se encuentra la banda I, de intensidad media alrededor de 335 nm; la segunda es la banda II, de intensidad alta y con un máximo cercano

entre los 400 y 405 nm. En tercer lugar, se encuentran una serie de bandas de baja intensidad (banda III), y de posición muy variable con máximos entre 470 y 510 nm.



**Figura 3. 35** Espectros de emisión de fluorescencia por excitación de radiación de sincrotrón a 275 nm de las escleritas de los octocorales del género *Pacificorgia*. Cada especie representa un promedio de los espectros de varias escleritas de todos los especímenes. Las señales están normalizadas en su máximo a ~400 nm.

La banda I, por su posición, se atribuye a la excitación de aquellos residuos aromáticos presentes en las proteínas ácidas encontradas en la matriz de la esclerita, es decir, triptófano, tirosina o fenilalanina. Estos presentan autofluorescencia y sus máximos de emisión el UV-cercano corresponden a 350, 300 y 280 nm, respectivamente.<sup>147</sup> Si bien es cierto las proteínas extracelulares encontradas en las escleritas de otros octocorales están compuestas principalmente de residuos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico), también tienen alrededor de un 2% de tirosina y fenilalanina.<sup>65</sup>

A menor energía (~350 nm) no se detecta la presencia de ninguna banda u hombro que sugiera la presencia de triptófano, lo cual, confirma que este residuo no está presente en la secuencia de las proteínas que suelen estar presentes en las escleritas.<sup>65</sup> Por otro lado, a mayor energía, la banda de la fenilalanina observada de 255 a 300 nm, no se puede observar en el espectro puesto que cae fuera del rango de adquisición, por tanto, su presencia no se afirma ni se descarta.<sup>147</sup> Por su parte, la banda de fluorescencia de la tirosina va de 270 a 340 nm, con un máximo en 300 nm, lo cual coincide con la banda I observada. De acuerdo con

esto, la banda I se trata probablemente de parte de la banda de emisión de la tirosina que se encuentra cortada por el rango espectral de la adquisición del espectrofotómetro.<sup>147</sup>

A pesar de que esta banda parece estar resuelta en *P. firma* y tener un máximo en 330 nm, este es un artefacto generado por el tratamiento de datos y se trata, en realidad, de un hombro que se puede interpretar como la cola de menor energía de la banda de fluorescencia de la tirosina. Como el detector de fluorescencia tiene un perfil de adquisición curvo a lo largo del rango de 300 a 600 nm, la línea base de los espectros originales se debe corregir con una función cuadrática o cúbica para mitigar este efecto y poder distinguir las bandas. Según la ecuación utilizada, en los extremos se suele reducir la intensidad de la señal, dando un efecto de banda resuelta a los hombros ubicados en los extremos del rango espectral.

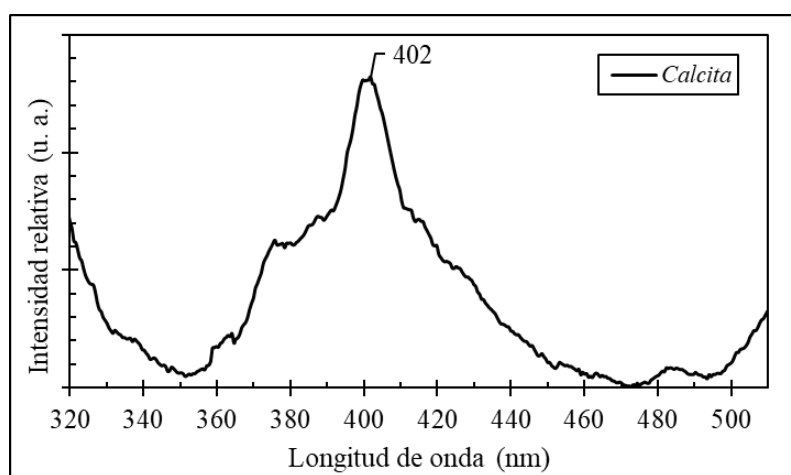
En lo referente a la banda II, esta se conserva relativamente constante a lo largo de todas las especies, desde 399 hasta 406 nm. No obstante, en algunos casos su forma cambia y puede observarse un pico como en *P. firma* o un hombro, como en *P. cairnsi*, alrededor de 420 nm, sin embargo, esta señal no se considerará como parte de la banda II puesto que se cree que dichas bandas están relacionadas al pigmento. En este punto, es necesario tomar en cuenta que los pigmentos tienen máximos de absorción alrededor de 415, 435, 465, 490 y 525 nm, por lo tanto, parte de la luz emitida por fluorescencia en este rango podría estar siendo absorbida nuevamente por los pigmentos y el espectro observado es una resultante de los dos efectos combinados.

Con esto en mente, la banda II es asignada a la fluorescencia de la calcita. Este mismo tipo de fluorescencia en el violeta ha sido reportado en calcita naturales de tipo Terlingua (originarias de Terlingua, Texas, EUA) que han sido excitadas con luz UV de onda corta (250-275 nm). En estas calcitas se observa una banda a 412 nm, con un rango de 45 nm a mitad del pico que se asemeja en gran medida a la banda observada a 405 nm con un ancho de 40 nm a mitad de pico.<sup>148</sup> En ellas, la presencia de iones como  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$  o  $\text{Ce}^{3+}$  y los centros fluorescentes inducidos por radiación, se catalogan como las dos posibles causas de esta luminiscencia, no obstante, la segunda es la más probable.<sup>148,149</sup>

En las calcitas de Terlingua, la concentración de estos iones es muy baja como para producir tal fluorescencia (en  $\mu\text{g/g}$ ,  $\text{Pb} = 0.07$ ,  $\text{Sn} = <0.05$ ,  $\text{U} = 1.3$ ,  $\text{Ce} = 3.27$ ). No obstante,

aunque U y Ce se suelen encontrar en cantidades aún más bajas en las escleritas de los octocorales (en  $\mu\text{g/g}$ , U = <0.2, Ce = 0.06), el contenido de Pb y Sn es mucho mayor.<sup>150-152</sup> Por ejemplo, se ha determinado por medio de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente que en escleritas del coral rojo *C. rubrum* se puede encontrar entre 0.20 y 1.00  $\mu\text{g/g}$  de Pb y hasta 0.33  $\mu\text{g/g}$  de Sn.<sup>150,151</sup> Por otra parte, en escleritas de *Sinularia vrijmoethi* se han reportado concentraciones de Pb de hasta 0.29  $\mu\text{g/g}$ .<sup>152</sup>

Ante esto, aunque no se han cuantificado los metales traza en esta investigación, las observaciones en escleritas de otros octocorales otorgan una buena pista acerca del origen de esta señal. De acuerdo con esto, es probable que la fluorescencia en el violeta esté relacionada a centros inducidos por radiación, pero que también tenga un aporte significativo de fluorescencia provocada por la presencia de estos iones. Una prueba que refuerza este hecho es la presencia del hombro a  $\sim 375$  nm, que rompe con la simetría gaussiana de la banda II al situarse a su izquierda, lo cual es más visible en *P. firma* y *P. rubinoffi*. Se cree que esta señal corresponde con el máximo provocado específicamente por  $\text{Pb}^{2+}$ , a 370 nm.<sup>148</sup> Además de esto, al hacer mediciones a un monocristal de calcita de origen geológico también se puede observar la misma banda a  $\sim 400$  nm, como se muestra en la *Figura 3. 36*. Aunque la pureza de esta calcita es mucho mayor a la de las escleritas de *Pacifigorgia*, es claro que existe una emisión de baja intensidad en la misma zona, lo que puede indicar la presencia de trazas de estos metales o de centros fluorescentes en esta muestra.



**Figura 3. 36** Espectros de emisión de fluorescencia por excitación de radiación de sincrotrón a 275 nm de un monocristal de calcita pura de origen geológico.

Por último, como banda III se catalogó a todas aquellas señales ubicadas a más de 420 nm, y fueron asociadas a los pigmentos. Así como se observó en los espectros de absorción, las componentes vibracionales también aparecen en la fluorescencia. La fotoemisión de los polienales con distintos largos de cadena ha sido reportada en varias oportunidades, sin embargo, las longitudes de onda de excitación están entre 370 y 435 nm, lejos de la longitud de onda de excitación utilizada en esta investigación. Por ejemplo, Adamec (2016) hizo un estudio por fluorescencia al octadecaoctoanal (18 carbonos, 8 enlaces dobles) disuelto en metanol. En estos se identificaron señales a 570, 620 y 660 nm, por lo cual se sabe que estos pigmentos fluorescentes en el amarillo bajo una excitación de 435 nm, no obstante, esto no es posible contrastarlo con ningún espectro medido puesto su límite está en 510 nm.<sup>146</sup>

Por su parte, Becker (1979), hizo estudios al dodecapentaenal (12 carbonos, 5 enlaces dobles), en dónde encontró señales de emisión desde los 435 hasta los 625 nm, con una excitación de 370 nm.<sup>145</sup> Se cree que las bandas de mayor energía se originan en transiciones  $\pi^* \leftarrow n$  en el carbonilo, mientras que a menor energía se encuentran las transiciones  $\pi^* \leftarrow \pi$  de la cadena poliénica.<sup>142-145</sup> Las bandas observadas, a 420, 465 y 500 nm correlacionan en gran medida con los componentes vibracionales de la banda de fluorescencia del dodecapentaenal, ubicadas a 440, 480 y 520 nm. A pesar de esto, hay que tener en cuenta que, al tener pigmentos de mayor tamaño en las escleritas, la posición de la banda de excitación varía.<sup>145</sup>

Es importante recalcar que se vuelve muy complejo obtener información clara acerca de la fluorescencia entre los 400 y 510 nm puesto que la absorción de los pigmentos es fuerte y se traslapa en este mismo rango. De esta manera, estas bandas son una combinación de la emisión de fluorescencia provocada por las transiciones de mayor energía y la absorción de las bandas de menor energía de los polienales. Dado a que la intensidad de la absorción es más intensa que la emisión por fluorescencia, esta sección del espectro se puede interpretar como una fluorescencia residual o un inverso de la absorbancia de los pigmentos (a mayor absorción menor señal de fluorescencia y viceversa). A partir de esto, es evidente que se pueden generar problemas en este rango si se quiere hacer la distinción entre varios pigmentos. Por esto, se propone el uso de longitudes de onda de excitación de menor energía para estudiar específicamente el pigmento en futuras investigaciones.

## Microscopía de fluorescencia

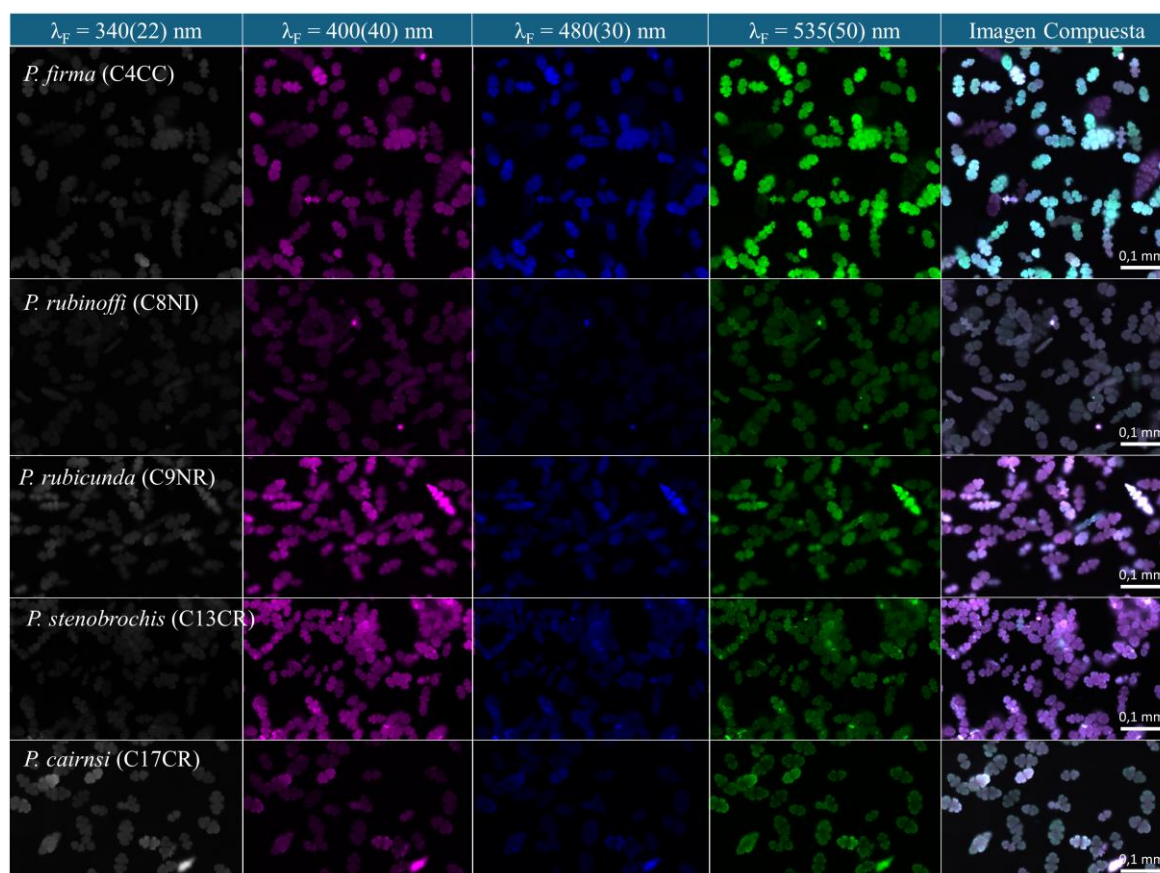
A pesar de que la espectroscopía de fluorescencia ofrece una gran cantidad de información útil acerca de los componentes de las escleritas, la microscopía de fluorescencia permite hacer un análisis a mayor profundidad. De esta manera, mediante la conjunción de ambas técnicas es posible entender la distribución de estos componentes en el contexto morfológico de las escleritas.

De acuerdo con esto, aunque se utilizaron una serie de filtros distintos, en la *Figura 3. 37* se presentan solamente los más relevantes, es decir, aquellos que permiten distinguir por separado los componentes principales de las escleritas. Consecuentemente, bajo una misma longitud de onda de excitación (275 nm), se muestran las imágenes capturadas con filtros a 340(22), 400(40) y 480(30). Estas longitudes de onda correlacionan con las bandas I, II y III asociadas a las proteínas, la calcita y los pigmentos, respectivamente. Por su parte, el filtro a 535(50) nm se posiciona para observar la fluorescencia de los pigmentos en los rangos reportados por otros autores.<sup>145,146</sup>

Cabe destacar que, luego de pasar por cada filtro, la fluorescencia en cada imagen es adquirida por una cámara de tipo CCD sin filtros RGB en sus fotodiodos. Esto quiere decir que, en realidad, no es posible registrar ningún color relacionado a la longitud de onda de la radiación emitida, solamente las señales eléctricas producidas por los fotones de luz en un rango de longitudes de onda determinado por cada filtro.<sup>91,92</sup> Ante esto, las imágenes resultantes sólo representan una reconstrucción digital de la intensidad de la luz según cada filtro y se grafican utilizando escalas de color, que en inglés son llamadas *Look-up tables* (LUT). Los LUTs más comunes son la escala de grises o las escalas de 16 o 32 colores, para imágenes térmicas, por ejemplo.<sup>153</sup>

A pesar de esto, en este trabajo se tuvo la intención de asociar el color del LUT con el color que podría ser observado por el ojo humano en el espectro visible. Por esto, al filtro a 400 nm se le asigna un LUT magenta (violeta), a 480 uno azul y a 535 uno verde. Al filtro de 340 nm (en UV), se etiqueta con una escala de grises, puesto que el ojo humano no percibe colores en este rango. Todo esto se hizo con el fin de emular la percepción del color de la fluorescencia de las escleritas que sería captado por el ojo humano al combinar las imágenes

de cada canal y así facilitar la comprensión de los resultados al tener un dar una idea más tangible de dicho fenómeno. Sumado a esto, todas las imágenes fueron normalizadas para que, entre los distintos filtros y distintas especies, los valores de intensidad de fluorescencia fueran comparables. A partir de aquí, se pueden describir los primeros patrones observados.



**Figura 3. 37** Fotomicrografías de fluorescencia de las escleritas del género *Pacifigorgia* según especie, código de espécimen y longitud de onda del filtro de emisión ( $\lambda_F$ ). La longitud de onda de excitación utilizada fue de 275 nm. Se cambió el LUT de cada imagen para asociar la  $\lambda_F$  de cada canal con su color en el espectro visible. Así, en la última columna, al obtener la imagen compuesta de los 4 canales medidos por fluorescencia, se aproxima la coloración real que tendrían las escleritas bajo excitación con luz UV. Nota: los valores de  $\lambda$  entre paréntesis corresponden al tamaño de la ventana en nanómetros de cada filtro.

Por ejemplo, a nivel general, la intensidad de la fluorescencia entre los filtros dentro de una especie está correlacionada, es decir, si la intensidad es alta en uno de los filtros para

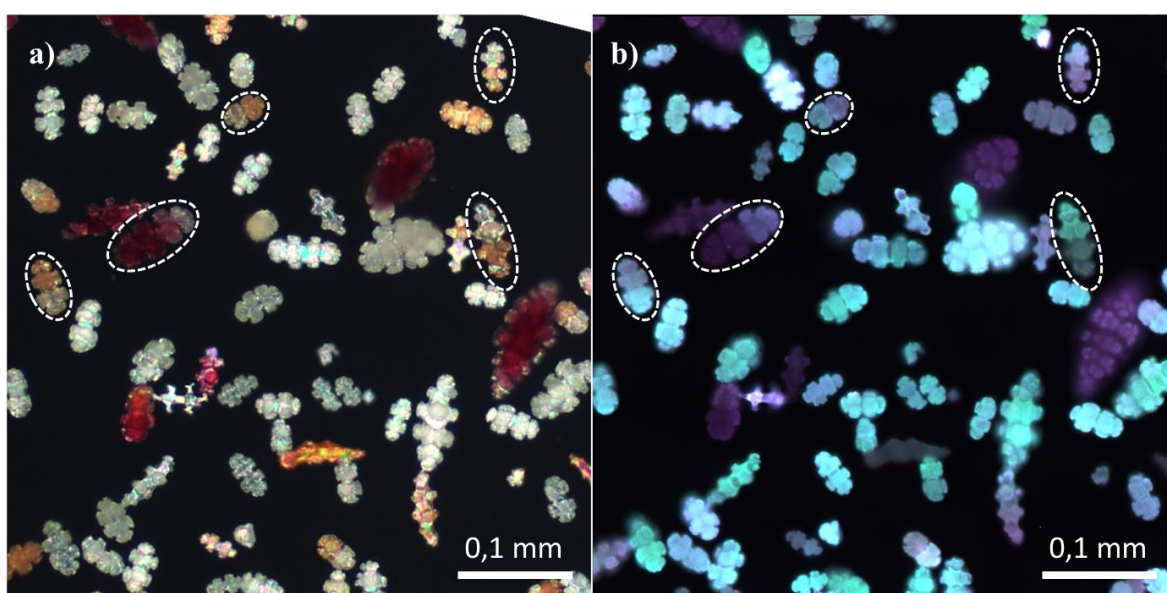
una especie, también lo es en los otros. Esto se ve de manera clara para *P. firma*, pero también en *P. rubicunda* y *P. stenobrochis*. Mientras tanto, si en otra especie la intensidad es baja para un filtro, es común encontrar bajas intensidades en todos los demás filtros, como en *P. rubinoffi* y *P. cairnsi*. Esto podría estar relacionado con las propiedades ópticas de las escleritas según cada especie, principalmente en cuanto al tamaño de la esclerita y a la rugosidad de su superficie. Superficies más rugosas podrían estar provocando mayor dispersión de la luz, impidiendo así que la luz emitida llegue de manera efectiva al detector.

La fluorescencia en el rango de las proteínas a 340 nm es de baja intensidad en todos los casos y se mantiene relativamente constante a lo largo de todas las especies. Esto refleja la baja concentración de proteínas en el coral y el contenido aún más bajo de residuos autofluorescentes en sus secuencias.<sup>65</sup> Por su parte, la fluorescencia a 400 nm, relacionada a la calcita, se muestra con una intensidad mucho mayor, lo cual tiene sentido gracias a la proporción altamente mayoritaria de este componente en las escleritas.<sup>108</sup> Finalmente, la intensidad de la fluorescencia de los pigmentos a 480 y 535 nm es alta y balanceada entre ambos filtros, sin embargo, sólo en *P. firma* su intensidad supera a la de la fluorescencia de la calcita, lo que sugiere concentraciones más bajas de pigmento y menor autoabsorción.

La combinación de la emisión en estos 4 rangos en las imágenes compuestas de la *Figura 3. 37*, resulta en una emisión por fluorescencia de colores grises, violetas y cian. A mayor fluorescencia en los 4 filtros, la saturación y el brillo de los colores será mayor, pudiendo alcanzar el blanco, que supone la combinación de todos los canales en alta intensidad. De lo contrario, con bajas intensidades la imagen se torna grisácea. Colores más violetas indican una baja fluorescencia de los pigmentos respecto a la calcita, mientras que colores de tonalidades cian (resultante del verde + azul) indican una mayor intensidad en los pigmentos. De acuerdo con esto, *P. firma* destaca por la presencia de una gran emisión relacionada a pigmentos, mientras que *P. rubicunda* y *P. stenobrochis* por una gran emisión de la calcita. Aparte, ni *P. rubinoffi* ni *P. cairnsi* destacan por su fluorescencia en ninguno de los ámbitos, adquiriendo una coloración gris muy tenue.

Como se mencionó anteriormente, la banda III y, por tanto, las señales capturadas por los filtros a 480 y 535 nm son difíciles de interpretar gracias a la fuerte absorción causada

por el pigmento. Para reforzar este hecho y comprender este fenómeno se presenta en la *Figura 3. 38* una fotomicrografía de luz visible de las escleritas de *P. firma* junto a la imagen compuesta extraída de la *Figura 3. 37*. En la comparación entre estas dos imágenes se puede ver cómo las escleritas rojas muestran una coloración tenue en tonos morados, lo que indica que, en general, las señales de fluorescencia son bajas en todos los ámbitos y que, entre ellos destacan aquellos a mayor energía, es decir, la proteína y la calcita. Esto demuestra cómo la alta concentración de pigmentos en estas escleritas (demostrado por medio de microespectroscopía Raman) causa una atenuación de la señal de emisión fluorescente.



**Figura 3. 38** Fotografías de las escleritas de *P. firma*, espécimen C4CC, capturadas con a) microscopio de luz visible de laboratorio en modo de campo oscuro, con un objetivo 20x y en el b) microscopio de fluorescencia con radiación de sincrotrón TELEMOS, con un objetivo 50x. En b) se presenta la imagen compuesta de los filtros de emisión con  $\lambda_F = 340(22)$ ,  $400(40)$ ,  $480(30)$  y  $353(50)$  nm. Las escleritas de color están demarcadas en una elipse punteada.

Aparte, todas las escleritas de coloración blanca en luz visible presentan un color cian intenso y brillante en las imágenes de fluorescencia, demostrando cómo la baja concentración de pigmentos en la matriz permite observar la fluorescencia a 480 y 535 nm. En un caso intermedio se encuentran las escleritas color naranja, que presentan colores ligeramente más

saturados y brillantes que en escleritas rojas, pero con un mayor balance entre el violeta y el cian. No obstante, es en las escleritas bicolor (naranja-blanco o rojo-blanco) en dónde se aprecia de forma ideal esta tendencia, como se destaca en la *Figura 3. 38*. En ellas, no sólo la tonalidad, sino la saturación y el brillo de la fluorescencia cambian para una misma esclerita de acuerdo con la concentración variable de los pigmentos en la matriz.

### **Microscopía óptica no lineal: SHG y 2PEF**

Al acoplar la microscopía óptica no lineal con la espectroscopía y las imágenes de fluorescencia, se tiene el paquete completo necesario para entender al pigmento dentro de las escleritas y, además, es útil para dar luz sobre el contexto de las escleritas en las ramas de los octocorales. De acuerdo con esto, en la *Figura 3. 39-40* se muestran imágenes por generación de armónicos secundarios (SHG) y de fluorescencia de excitación de dos fotones (2PEF) de una sección transversal de rama de C4CC (*P. firma*) a distintos aumentos y de una esclerita aislada de C8NI (*P. rubinoffi*).

En general, las imágenes se construyen a partir de 3 filtros. Para facilitar la interpretación de los resultados, en este caso se utiliza la convención de rojo-verde-azul para la elección de los LUTs de cada canal para la generación de las imágenes compuestas. Como la señal de SHG no corresponde a un fenómeno físico que genere un color observable, aquí no se busca emular ninguna coloración determinada como se hizo en la microscopía de fluorescencia. Aun así, la visualización de los resultados a través de los colores generados por la combinación de los tres canales es sencilla y permite observar las tendencias que se discutirán a continuación.

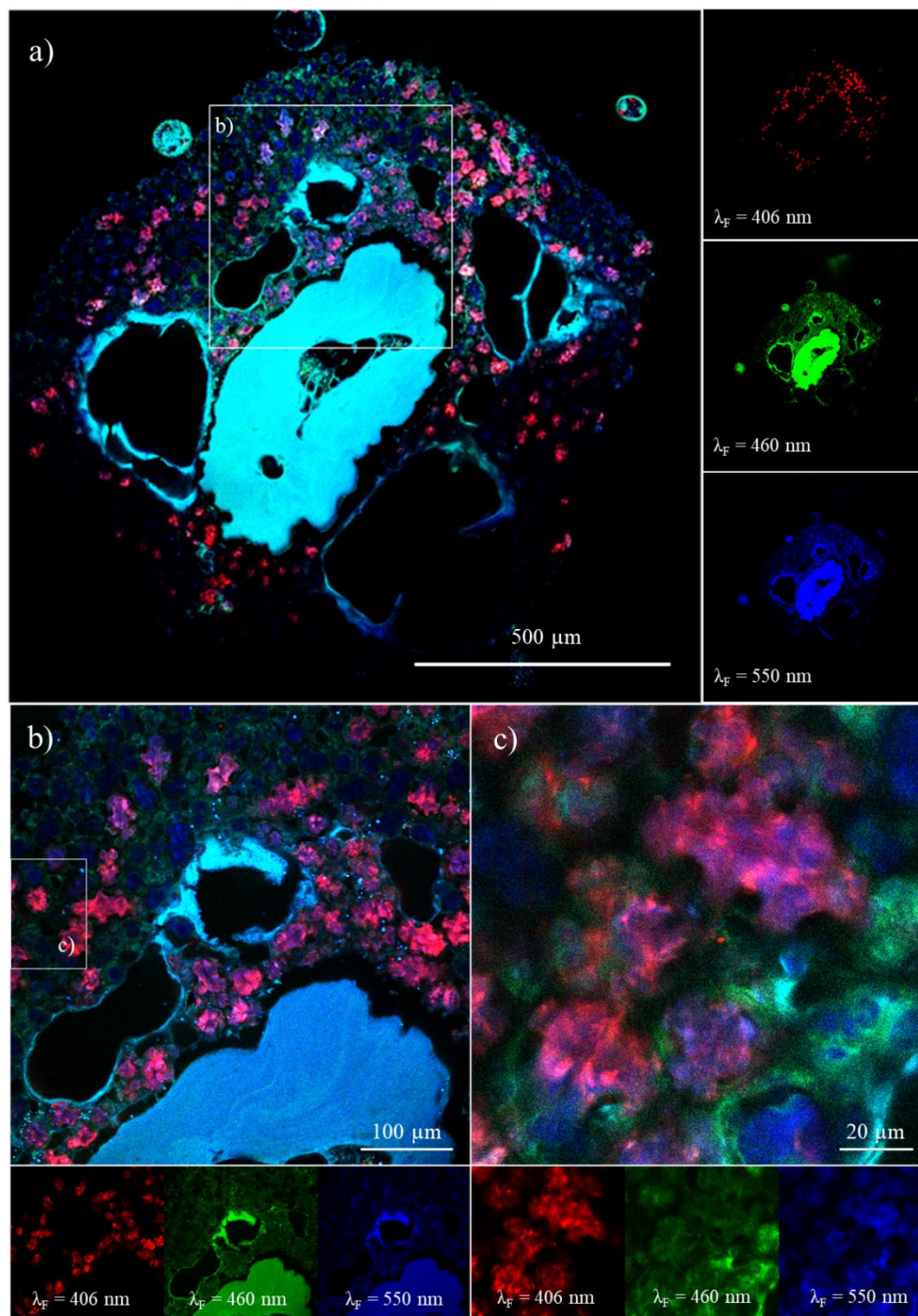
En todas las figuras de SHG y 2PEF, el filtro a 406 nm corresponde a la señal de SHG y los filtros a 460 y 550 nm a las señales de 2PEF. En este punto, es necesario recordar que la señal de SHG es producida solamente por aquellas moléculas no centrosimétricas que poseen un alto grado de organización intermolecular, orientadas de forma regular y coherente.<sup>154,155</sup> Cuando estos requisitos se cumplen, se generan señales que interfieren de manera constructiva y generan la señal SHG, como ocurre en cristales anisotrópicos o en proteínas estructurales, como el colágeno. Por otra parte, como ambos se tratan de procesos de emisión por fluorescencia, las señales de 2PEF se comportan de forma muy similar a las

imágenes capturadas a 480 y 535 nm en microscopía de fluorescencia relacionadas a los pigmentos.<sup>78</sup>

Si bien es cierto se capturaron imágenes en modos de transmisión y reflexión, gracias al bajo grosor de la muestra (~100  $\mu\text{m}$ ), las imágenes mostradas corresponden solamente al modo de transmisión. Esto se debe a que, en muestras delgadas, la señal transmitida o “hacia adelante” conserva su intensidad y resulta en imágenes de alta calidad. No obstante, cuando la muestra es considerablemente gruesa, esto no sucede y se debe utilizar el modo de reflexión.<sup>155</sup> Para obtener esta señal hacia atrás se debe lograr la dispersión de los fotones en dirección contraria a la del láser incidente. Esto implica varios problemas, entre ellos, una reducción significativa de la señal SHG, una pérdida de la coherencia a lo largo del paso óptico de la señal y altos niveles de absorción, gracias a fenómenos de retrodispersión contra los componentes de la muestra.<sup>155</sup> Por esta razón, para utilizar las señales SHG hacia adelante, se puso tanto empeño en la preparación de láminas delgadas de cada muestra.

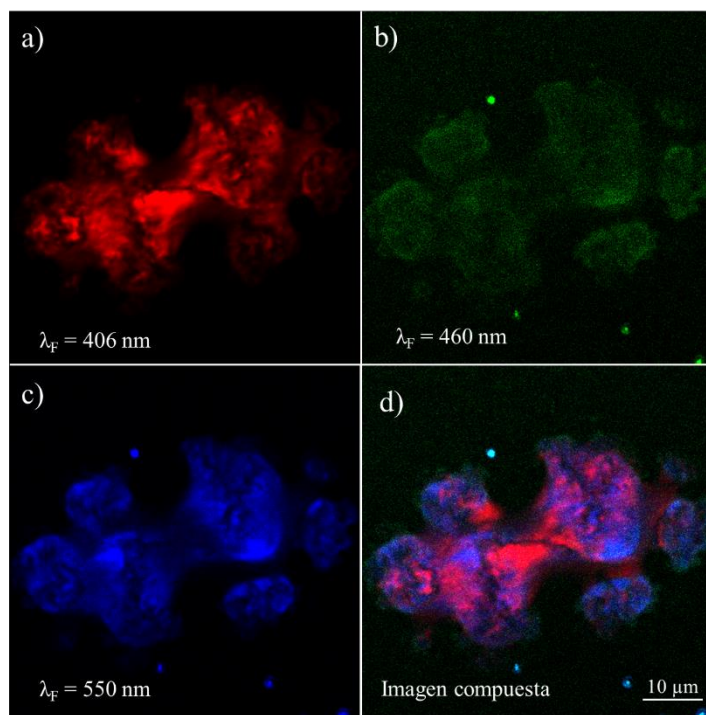
Habiendo establecido esto, se puede fijar la atención en la *Figura 3. 39*, que corresponde al corte transversal de una rama de un espécimen de *P. firma*. En los recuadros *a*) y *b*) se presenta una vista general de la rama en donde se identifican el eje con su respectivo núcleo en la parte central, las escleritas dentro del cenénquime y el tejido seco de los pólipos dentro del cáliz (vacío) alrededor del eje, acompañado de algunas cavidades gastrovasculares de menor tamaño.<sup>1,38</sup>

Como se puede apreciar, tanto el eje como los pólipos y las paredes de la cavidad gastrovascular fluorescen intensamente en el azul y en el verde. Aunque esta fluorescencia se encuentra en el rango de los pigmentos, como no se realizaron mediciones de Raman ni de espectroscopía de fluorescencia en estas zonas, no se puede asegurar que esta fluorescencia provenga específicamente de polienales. Sumado a esto, las señales a 460 nm son muy intensas, lo cual contradice la tendencia observada anteriormente, en la que grandes concentraciones de pigmentos absorben fuertemente las emisiones entre los 420 y 530 nm. Por esta razón, se cree que dichas señales podrían venir de carotenoides provenientes de la dieta u otro tipo de compuestos autofluorescentes con máximos de absorción fuera de este rango de energía.<sup>58</sup>



**Figura 3. 39** Microfotografías SHG y de fluorescencia bajo diferentes aumentos de secciones delgadas de una rama de C4CC (*P. firma*). Para cada aumento, se muestra arriba la imagen compuesta construida a partir de los 3 canales ubicados en el inferior. El canal rojo contiene la señal SHG a 406 nm y el canal verde y azul las señales de fluorescencia a 460 y 550 nm, respectivamente. La longitud de onda de excitación fue de 810 nm (405 nm en 2PEF).

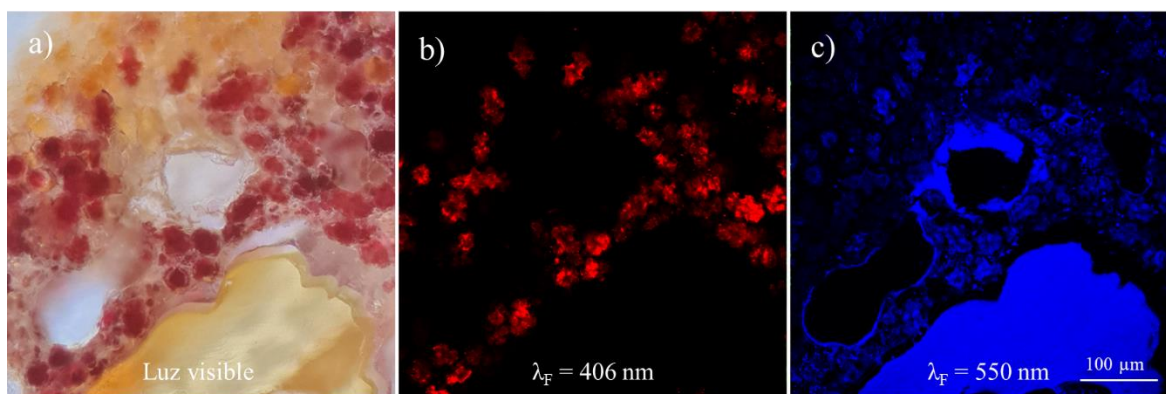
A mayores magnificaciones, la *Figura 3. 39 c)* refleja de manera perfecta cómo las escleritas se encuentran embebidas en la mesoglea para conformar el cenénquime en *Pacifigorgia*. Es posible ver cómo la mesoglea verde interconecta a las escleritas entre sí, y sirve de relleno en los espacios intersticiales. En este punto, surge un hallazgo muy interesante y es una diferencia marcada entre la fluorescencia de las escleritas y de la mesoglea. La mesoglea fluoresce a 460 nm con intensidad, sin embargo, posee una muy baja fluorescencia a 550 nm. Al contrario, y en relación con lo que se había reportado anteriormente, alrededor de los 460 nm las señales asociadas a los pigmentos fluorescentes en las escleritas son débiles (*Figura 3. 40*). Aquí, la fluorescencia de los pigmentos es de nuevo obscurecida por la absorción de ellos mismos. No obstante, a 550 nm la señal se vuelve mucho más intensa, al encontrarse un poco más alejada del máximo la absorción para las escleritas de *P. firma*.



**Figura 3. 40** Microfotografías SHG y de fluorescencia de una esclerita ubicada en una sección delgada de una rama de C8NI (*P. rubinoffi*). En a) se muestra el canal rojo contiene la señal SHG a 406 nm, en b y c) los canales verde y azul con las señales de fluorescencia a 460 y 550 nm, respectivamente y en d) la imagen compuesta de los 3 canales. La longitud de onda de excitación fue de 810 nm (405 nm en 2PEF).

Aunque no se conoce de manera específica la composición de la mesoglea en estas muestras, esta diferencia permite establecer cómo posee una composición significativamente distinta a la de las escleritas en cuanto a cromóforos. De acuerdo con esto, en las escleritas es clara la presencia de pigmentos en altas concentraciones, que fluorescen de manera intensa alrededor de los 550 nm y que absorben las señales a 460 nm. Mientras tanto, la mesoglea posee una baja concentración de estos pigmentos y, al mismo tiempo, posee una alta concentración de cromóforos que fluorescen en el rango de los 460 nm. Dicha tendencia se hace más evidente en la esclerita mostrada en la *Figura 3. 40*, dónde, si bien es cierto existe señal a 460 nm, es muy débil y contrasta con la gran intensidad a 550 nm.

Aparte de las señales de fluorescencia en 2PEF, la novedad de la microscopía no lineal en el microscopio multifotónico la ofrece la señal del SHG. En la *Figura 3. 39* la señal de SHG para las escleritas es tan fuerte que opaca las señales débiles del eje, pólipos y mesoglea. En específico, las fibrillas de colágeno de la mesoglea y la gorgonina del eje (similar al colágeno) son las causantes de esta ligera emisión en estas estructuras, no obstante, al ser estructuras poco organizadas no llegan a tener la intensidad de señal que emiten las escleritas.<sup>79,127,156</sup> Al contrario, en las escleritas la señal es muy intensa, no obstante, existen escleritas con señales más intensas que otras, incluso en la misma muestra. Esto se hace más evidente en *P. firma*, ya caracterizada por su heterogeneidad de color en sus escleritas. Como es posible observar en la *Figura 3. 41*, la tendencia es clara, a mayor cantidad de pigmento, como en el caso de las escleritas rojas, mayor es la intensidad de la señal de SHG.



**Figura 3. 41** a) Fotomicrográficas de la sección delgada de C4CC (*P. firma*) capturadas en los modos a) Luz Visible, b) SHG a 406 nm y c) 2PEF a 550 nm.

A partir de esto y del entendimiento del origen de la señal SHG, se puede concluir que el pigmento dentro de las escleritas no está presente en la calcita como una inclusión de materia orgánica amorfa, sino que más bien tiene un elevado grado de orientación intermolecular coherente.<sup>154,155</sup> Esto quiere decir que, a nivel general, los polienales se encuentran dispuestos en una sola dirección a lo largo y ancho del volumen de una esclerita. Por su estructura molecular, con una cabeza con un grupo aldehído y una cola poliénica, los polienales son no centrosimétricos y por ello, si orientan sus colas en una sola dirección, deberían de generar una señal SHG.

Las implicaciones de este ordenamiento requieren de estudios que se salen de los objetivos de esta investigación. No obstante, se pueden proponer distintas explicaciones para este fenómeno. Por ejemplo, si se tiene en cuenta que las escleritas están conformadas en un 98% por calcita, es posible que el grupo aldehído interaccione de manera específica con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en alguna cara específica del cristal, generando así una especie de monocapa autoensamblada de pigmento.<sup>108,110</sup> De esta manera, las moléculas del pigmento no sólo estarían ordenadas entre ellas, sino que tendrían un segundo grado de ordenamiento, dado por su interacción con las caras periódicas del mesocristal de calcita.

Otra opción, es la interacción con las proteínas de la matriz, en dónde un andamio proteico puede servir como sitio de unión para las moléculas de pigmento y generar así una estructura ordenada.<sup>130</sup> En las escleritas de los octocorales es común encontrar fibras de colágeno, que en sí mismas ya tienen señal SHG. Por esta razón, si se forma un complejo pigmento-proteína en una conformación específica, si la proteína está ordenada, también lo estará el pigmento. Aparte, la última posibilidad involucra la interacción entre las mismas moléculas de pigmento. Si generan una estructura supramolecular como una monocapa en una micela, podría generar una señal SHG (en las bicapas, como las moléculas se orientan de forma antiparalela, las señales de SHG se cancelarían mutuamente al experimentar interferencia negativa).<sup>154,155</sup>

En la *Figura 3. 40 a*) se observa cómo la señal SHG no tiene la misma intensidad en cada parte de la esclerita, lo cual podría explicarse por tres motivos. En primer lugar, podría ser una variación de la concentración del pigmento. A menor concentración menor señal. En

segundo lugar, podría haber variaciones en el grado de organización del pigmento en la matriz y, por tanto, la señal de SHG decrecería.<sup>80</sup> Por último, la ausencia de señal podría deberse a arreglos muy ordenados pero que, al tener los dipolos orientados de forma contraria, se cancelarían las señales de SHG en ambas direcciones por interacción destructiva.<sup>154,155</sup> De esta manera, la ubicación del pigmento y su ordenamiento es heterogénea dentro de las escleritas, creando un sistema tripe complejo y organizado calcita-proteínas-pigmentos.

## **Perspectivas finales**

En este capítulo se realizó una descripción detallada de los octocorales desde una perspectiva fisicoquímica, abordando aspectos macroscópicos y moleculares. En cuanto al análisis estructural y cromático la fotografía digital (RGB) fue empleada para obtener información cuantitativa y cualitativa sobre el color y la estructura de las muestras. Se utilizó la descomposición del color en el espacio RGB para entender cómo se combinaban los canales rojo, verde y azul para generar los tonos observados en las imágenes digitales. Se demostró que, en general, los colores en los octocorales tienen alta intensidad en los canales rojo y verde, resultando en tonalidades anaranjadas. Además, se analizaron los histogramas de cada canal para estudiar la distribución total de los valores de intensidad de los canales R, G y B en la superficie de cada octocoral. Se determinó que existen diferencias entre el cálculo de moda y promedio de intensidad, donde el uso de moda parece representar el color de una manera más fiel.

La microtomografía computarizada de rayos X proporcionó una perspectiva más estructural de los octocorales, permitiendo distinguir diversas estructuras como el eje del coral, las cámaras con paredes mineralizadas, los canales longitudinales y las escleritas. Se realizó una segmentación en 3D para agrupar estas estructuras y definir las como regiones de interés (ROIs). Esto permitió comprender la distribución espacial de las escleritas en la rama.

Por medio de la microscopía de luz visible, se confirmó que el color de un octocoral seco o con los pólipos retraídos está determinado por el color de la capa más externa de las

escleritas en su superficie. Además de esto, se hicieron notar las diferencias entre especies y se observa que hay especies que utilizan una estrategia de color para lograr coloraciones específicas en su superficie. Esta consiste en el uso de escleritas de diferentes colores distribuidas de forma similar a cómo los píxeles generan una imagen en una pantalla digital. Además, se observó que, aunque no existe una norma en la coloración según la estructura de las escleritas, se pueden encontrar ciertas tendencias en los diferentes tipos de escleritas. Así mismo, se determinaron los tamaños del área promedio de las escleritas para cada especie estudiada, con valores entre los 300 y los 750  $\mu\text{m}^2$ .

Finalmente, mediante la microscopía electrónica de barrido, se observaron detalles superficiales con muy alta resolución, destacando la topología de la superficie de las escleritas. Se identificaron columnas de calcita de tamaño nanométrico, conformadas, a su vez, por granos de tamaño nanométrico organizados en una estructura tridimensional mesocristalina. Se evidenció que la morfología de las subunidades submicrométricas determinaba la morfología de la pieza macroscópica, lo que sugiere una posible relación entre la morfología de las escleritas y su formación cristalina.

Aparte, el análisis de la composición de las escleritas de octocorales del género *Pacifigorgia* reveló una interesante combinación de componentes inorgánicos y orgánicos. El análisis mediante difracción de rayos X permitió identificar las fases cristalinas presentes, con la calcita magnésica como la fase dominante y una pequeña proporción de vaterita en algunas muestras. La sustitución de Mg en la calcita le confiere al biomineral resistencia al estrés y al desgaste, crucial para soportar las corrientes marinas. Los parámetros de celda para la calcita magnésica mostraron una reducción significativa del tamaño de la celda debido a la sustitución de Ca por Mg. Este cambio se utilizó para calcular el porcentaje molar aproximado de Mg en las calcitas magnésicas respecto al calcio, dando como resultado un porcentaje ente 14.40 y 18.80% de Mg.

La espectroscopía de infrarrojo (IR) proporcionó información sobre la composición orgánica e inorgánica de las escleritas. Se identificaron señales características de la calcita magnésica, así como de grupos funcionales orgánicos relacionados a las proteínas y a los carbohidratos que son comunes encontrar en escleritas de otros octocorales. A pesar de ello,

no se encontraron señales específicas que pudieran asegurar la presencia de los pigmentos por medio de los espectros IR. Al contrario, la microespectroscopía Raman permitió estudiar de manera específica a los pigmentos presentes en las escleritas. Se observaron señales consistentes con la presencia de polienales parcialmente metilados, con cadenas poliénicas de entre 10 y 11 enlaces dobles conjugados. Estos son los responsables de dar el color a las escleritas. La intensidad y posición de estas señales variaron según el color de las escleritas, lo que sugiere que las diferencias en la concentración y en la estructura de los pigmentos generan coloraciones distintas.

La microespectroscopía UV-Visible-NIR y la microscopía de fluorescencia se posicionaron como herramientas valiosas para estudiar la composición y la distribución de componentes en los organismos pigmentados, como los octocorales del género *Pacifigorgia*. Estas técnicas permitieron profundizar en la comprensión de la estructura y las propiedades de estos sistemas biológicos. La espectroscopía de reflectancia proporcionó información detallada sobre los fenómenos de absorción y reflexión de luz de los pigmentos presentes en las escleritas. Por ejemplo, se observa que los polienales exhiben bandas de absorción en entre los 400 y los 550 nm, lo que corresponde violetas, azules y verdes de la región visible en el espectro electromagnético. Además, se destaca que la intensidad y la posición de estas bandas pueden variar según la concentración y el entorno químico de los pigmentos.

Por otro lado, la microespectroscopía de fluorescencia revela la emisión de luz fluorescente en diferentes regiones del espectro. Se observan tres bandas principales: una asociada a residuos aromáticos de proteínas, otra relacionada con la fluorescencia de la calcita, y una tercera atribuida a los pigmentos presentes en las escleritas. La intensidad y la distribución de estas bandas varían entre las especies de *Pacifigorgia*, lo que sugiere diferencias en la composición y la estructura de las escleritas, principalmente a nivel de pigmentos. La combinación de esta técnica con la microscopía de fluorescencia permitió una caracterización más completa de las escleritas, al proporcionar información tanto de la composición química como de la distribución espacial de sus componentes. Por ejemplo, se observó que las escleritas rojas muestran una emisión de fluorescencia tenue en tonos morados, indicando una alta concentración de pigmentos que puede atenuar la señal de

emisión fluorescente. En contraste, las escleritas blancas muestran una fluorescencia más brillante y saturada, lo que sugiere una menor concentración de pigmentos en la matriz.

Por su parte, la microscopía óptica no lineal combina las señales SHG y las imágenes de fluorescencia para estudiar el pigmento dentro de las escleritas, lo que proporcionó una comprensión aún más completa de estas estructuras en los octocorales. Por medio de fluorescencia, se observa cómo las escleritas están embebidas en la mesoglea para formar el cenénquime en *Pacifigorgia*. La mesoglea fluoresce intensamente a 550 nm, pero tiene una baja fluorescencia a 460 nm, mientras que las escleritas muestran lo contrario. Esto sugiere diferencias significativas en la composición de los cromóforos entre las escleritas y la mesoglea. La señal de SHG es especialmente intensa en las escleritas, lo que indica un alto grado de organización intermolecular coherente en el pigmento presente en ellas. No obstante, esta señal es heterogénea en diferentes partes de la esclerita, lo que puede atribuirse a variaciones en la concentración y el grado de organización del pigmento en la matriz.

## **CAPÍTULO IV**

### **ANÁLISIS TAXONÓMICO**

A partir de las técnicas de caracterización fisicoquímica presentadas en el capítulo anterior, en esta sección se evalúan cuáles de ellas pueden servir como un nuevo carácter de clasificación taxonómica. Para esto, se hace una distinción entre el tipo y la calidad de información que se puede obtener a partir de ellas en cuanto a su función como carácter. De acuerdo con esto, cada una se clasifica como una técnica de análisis cualitativo o como una técnica de análisis cuantitativo y se especifica si puede ser utilizado como un parámetro de distinción entre las especies. Junto a esto, se hace énfasis en las técnicas de análisis cuantitativo y se describen los métodos estadísticos que fueron utilizados para dar confianza a los resultados reportados.

#### **Técnicas de análisis cualitativo**

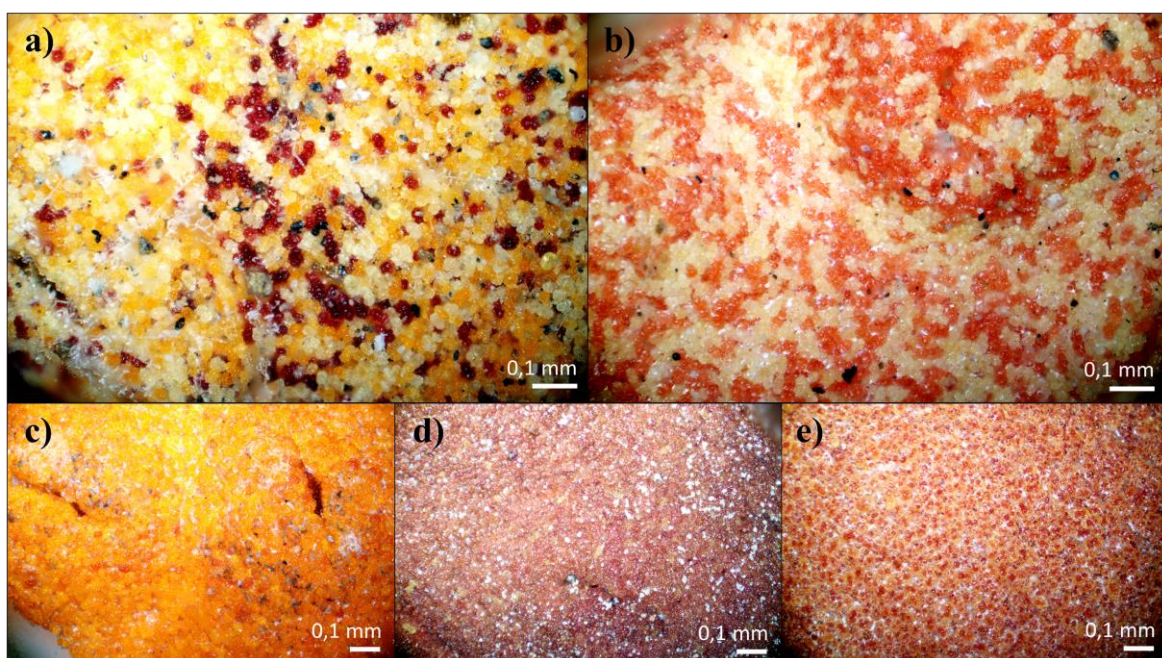
En el caso de este proyecto, las técnicas de análisis cuantitativo fueron definidas como aquellas técnicas de caracterización a partir de las cuales se pudo obtener información acerca del color, la forma, o el tamaño de las escleritas de octocorales que, dada la naturaleza de los resultados recuperados, no fue posible obtener información cuantitativa a partir de ellos. Dentro de esta categoría caen las microscopías de luz visible, fluorescencia, 2SHG y 2PEF. Cabe destacar que, a pesar de que en su mayoría las técnicas de análisis cualitativo fueron inefectivas como caracteres de clasificación, estas poseen una importancia considerable en la caracterización fisicoquímica de las muestras, como ya fue demostrado en el capítulo anterior.

#### **Microscopía de luz visible**

La microscopía de luz visible tiene el potencial de distinguir las variaciones de color entre las escleritas de diferentes especies. No obstante, al no existir un patrón de calibración para color como en el caso de la fotografía digital, no es posible extraer las coordenadas de color con certeza para obtener medidas cuantitativas. Además, si se quisieran realizar análisis de color en distintos laboratorios, no es posible emular las mismas condiciones de adquisición

de microfotografías al existir una innumerable gama de modelos de microscopios ópticos, provistos con diferente óptica, fuentes de iluminación y cámaras para la captura de imágenes.

A pesar de ello, por medio de microscopía óptica una evaluación cualitativa del color de las escleritas es posible, como ya ha sido reportado en previas investigaciones y mostrado de la *Figura 1. 3* a la *Figura 1. 7* de la sección de antecedentes.<sup>16,18</sup> Más allá de esto, la microscopía óptica puede ser útil para determinar la distribución de escleritas de diferentes colores en la superficie de la rama. Por ejemplo, *P. firma* y *P. rubicunda* poseen una notable heterogeneidad en la coloración de sus escleritas, con colores rojos (sólo en *P. firma*), naranjas y pálidos (de coloración tenue o no percibida). Mientras tanto, *P. rubinoffi*, *P. stenobrochis* y *P. cairnsi* poseen escleritas de coloraciones homogéneas en la superficie, como se observa en la *Figura 4. 1*.



**Figura 4. 1** Fotomicrografías de luz visible de las escleritas sobre la superficie de una rama de las especies a) *P. firma*, b) *P. rubicunda*, c) *P. rubinoffi*, d) *P. stenobrochis*, y e) *P. cairnsi*. Se utilizó un objetivo 10x en modo de luz reflejada.

La determinación de la proporción de escleritas de distintos colores en la superficie de los corales fue descrita en el capítulo anterior. La muestra analizada de *P. firma* tiene 16(7)% de escleritas rojas, 38(6)% de color naranja y 46(11)% de color blanco. Para *P.*

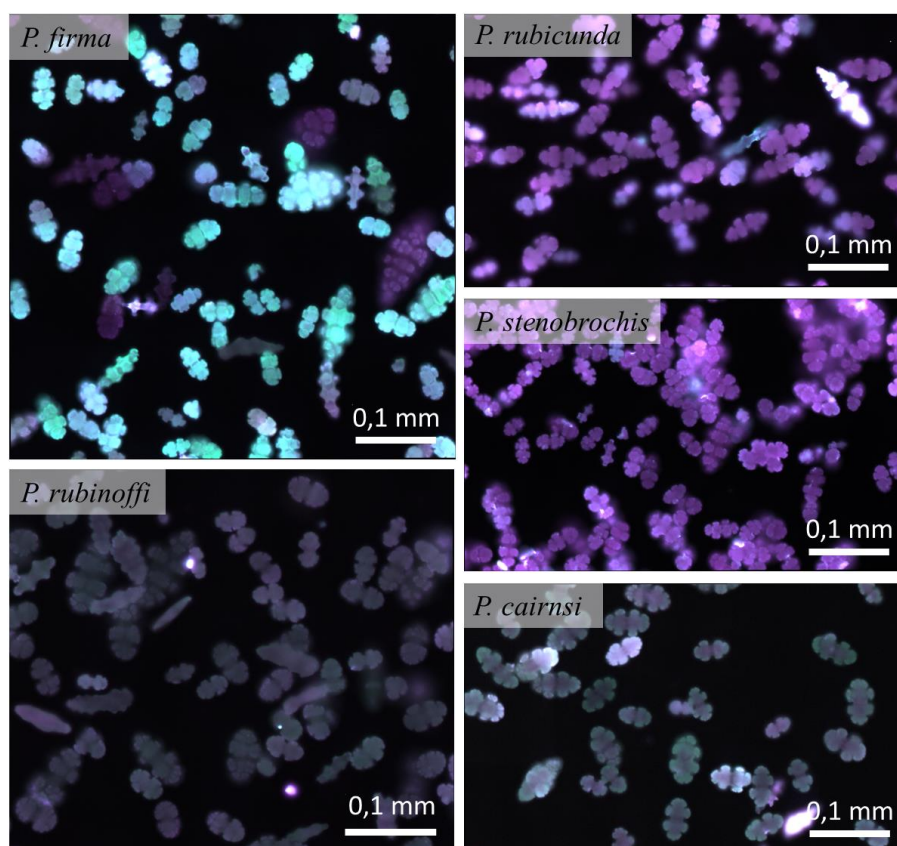
*rubicunda* hay 46% de escleritas naranjas y 54% de color blanco o amarillo pálido. No obstante, como había sido discutido previamente, existe una gran variabilidad en los resultados, que depende de la recolección y el tratamiento de datos utilizado. La presencia de sombras y brillos que actúan como colores más o menos saturados en las imágenes a blanco y negro no se puede corregir. Aunque para contrarrestar dicho efecto, se muestrean zonas sin presencia excesiva de brillos o sombras, esta técnica debería ser utilizada solamente para dar estimaciones gruesas de la distribución los colores reportados de las escleritas. Por esta razón, la microscopía de luz mantiene su clasificación dentro de técnicas de análisis cualitativo dentro del marco de esta investigación.

### **Microscopía de fluorescencia**

Al igual que la microscopía de luz visible, la microscopía de fluorescencia podría ser útil para distinguir diferencias cualitativas a través del análisis de microfotografías basándose, en este caso, en las emisiones por fluorescencia de las escleritas. No obstante, debido al volumen de muestras y duración de cada medición, durante el turno de tiempo de haz (*beamtime*) que fue proporcionado por la línea de luz DISCO en Synchrotron SOLEIL, se les dio mayor prioridad a las mediciones espectrofotométricas que a la recopilación de imágenes de fluorescencia. De esta manera, se recuperó solamente una imagen de un conjunto de escleritas por especie.

El reducido tamaño del set de datos hace imposible el establecimiento de tendencias intraespecíficas que pudieran ofrecer la rigurosidad necesaria para realizar una comparación interespecífica confiable. A pesar de ello, en las muestras analizadas existen ciertas diferencias que podrían ser exploradas en futuros proyectos. Tal y como se mostró en la *Figura 3. 37* cada muestra presenta una distribución de intensidades de fluorescencia distinta a partir de la combinación de los filtros utilizados, como se resume en la *Figura 4. 2*. Por ejemplo, *P. firma* se presenta como la muestra con tonos más cian, con presencia de sólo algunas escleritas fluorescentes en tonos morados. Estas tonalidades responden a la fluorescencia intensa en los filtros azul y verde, a 480(30) nm y 535(50) nm. Estos se combinan para dar un color cian más intenso que la fluorescencia en los filtros gris y magenta, a 340(22) y 400(40) nm, respectivamente.

La intensidad de la fluorescencia de *P. rubicunda* y *P. stenobrochis* es comparable en intensidad a la de *P. firma*, no obstante, en este caso el filtro magenta es predominante, lo que resulta en una fluorescencia con tonalidades violeta. A pesar de su similitud respecto a *P. stenobrochis*, en *P. rubicunda* es posible detectar la presencia de dos grupos de escleritas con brillos diferentes que surgen, probablemente, de las dos tonalidades de escleritas apreciables por microscopía de luz visible (naranjas y amarillas/pálidas). Por su parte, las escleritas de *P. rubinoffi* fluorescen de manera homogénea y tenue en el magenta y en el verde, pero de forma casi inapreciable en el gris y en el azul, aparentando una tonalidad violeta/grisácea. Las escleritas de *P. cairnsi* tienen un aspecto similar a las de *P. rubinoffi*, pero fluorescen de forma ligeramente más intensa y, además, presentan mayor intensidad en los filtros gris y azul, lo cual resulta en un color gris claro, con tintes cian y violeta.



**Figura 4. 2** Fotomicrografías de fluorescencia de las escleritas del género *Pacifigorgia* según especie obtenida a partir de la imagen compuesta de 4 canales: gris, magenta, azul y verde, capturados con filtros a 340, 400, 480 y 535 nm, respectivamente ( $\lambda_{\text{Excitación}} = 275 \text{ nm}$ ).

Aunque, a partir de las diferencias apreciables entre especies es posible proponer un análisis similar para futuros proyectos, es necesario tener en cuenta que estos resultados fueron recuperados por medio de excitación con radiación de sincrotrón a 275 nm. De esta manera, se vuelve necesario evaluar si una técnica de microscopía de fluorescencia de laboratorio es capaz de ofrecer la misma información que en una técnica con radiación de sincrotrón. Ante esto, si el uso de una técnica de laboratorio ofrece buenos resultados, valdría la pena utilizar la emisión de fluorescencia de las escleritas como un nuevo carácter taxonómico. Por el contrario, si se requiere de un sincrotrón para obtener una buena calidad de resultados, esta no representaría una solución práctica para identificaciones de rutina, dado el costo operativo y la logística que involucran dichas mediciones.

### **Microscopía óptica no lineal: SHG y 2PEF**

La microscopía de generación de armónicos secundarios acoplada a la fluorescencia por excitación con dos fotones fue utilizada con el único fin de caracterizar estructuralmente la distribución de los pigmentos y otros cromóforos dentro de las estructuras biológicas de los octocorales, como fue discutido en el Capítulo III. Por esta razón, no se analizan dichos resultados dentro de este capítulo, que busca identificar nuevos caracteres taxonómicos.

### **Técnicas de análisis cuantitativo evaluadas**

En este apartado se presentan aquellas técnicas cuyos resultados fueron evaluados mediante diferentes métodos estadísticos, independientemente de su potencial para convertirse en un nuevo carácter taxonómico. De esta manera, por cada técnica se describirá brevemente el método estadístico utilizado y los resultados obtenidos a partir de él, así como el potencial para diferenciar entre las especies estudiadas del género *Pacificorgia*.

### **Fotografía digital (RGB)**

En primer lugar, a pesar de su simplicidad y practicidad, la captura de fotografías digitales resultó ser una excelente opción para distinguir entre las diferentes especies estudiadas. Como anteriormente se mencionó, el análisis de color involucró la extracción de las coordenadas de color en el sistema RGB a partir del análisis de los histogramas de intensidad de los canales rojo, verde y azul. A partir de los resultados obtenidos, se

determinaron los valores promedio y moda de intensidad en los canales R, G y B para cada espécimen, como se reporta en el *Cuadro A. 1 del Anexo 4. 1*.

Este fue el set de datos que se utilizó en el análisis estadístico, compuesto por 4 réplicas para cada especie, cada una con sus respectivos valores de intensidad moda y promedio en cada canal RGB. Para efectos de este análisis se requiere el uso de las medias de los datos, por ello se tomaron en cuenta únicamente los resultados obtenidos a partir de los promedios de intensidad. En el caso de *P. rubinoffi*, como se tiene un solo espécimen, esta especie no se toma en cuenta en el análisis estadístico. De esta manera sus resultados se comparan al final del análisis, como si se tratara de una muestra incógnita para determinar si es similar o distinta a las otras especies estudiadas.

Para el análisis se propone un método estadístico de Análisis de Varianza Multivariable (prueba MANOVA), que se utiliza para analizar los efectos de una o más variables independientes sobre dos o más variables dependientes de forma simultánea.<sup>157</sup> En este caso, las variables independientes corresponden a cada especie de coral (4 grupos) mientras que las variables dependientes son los promedios de intensidad en cada canal, R, G o B y una cuarta variable obtenida de la suma de estas 3 variables, llamada R+G+B. A estas cuatro variables dependientes, se les llama características. De esta manera, la MANOVA permite analizar de manera simultánea cómo las especies de coral se diferencian en cuanto a los valores de intensidad en R, G, B y R+G+B, en vez de hacerlo por separado, como si se hiciera una prueba ANOVA por cada variable dependiente.

Lo anterior, reduce la aparición de falsos positivos producto de la mayor probabilidad de obtener diferencias aleatorias por casualidad al realizar ANOVAs univariantes. Asimismo, la MANOVA tiene la ventaja de poder identificar las interacciones entre las variables dependientes.<sup>157</sup> Esto quiere decir que, para una especie en particular, el efecto de una variable, por ejemplo, la intensidad media en R depende de los valores de otra variable, como la intensidad media en B. De esta manera, se presentará el proceso para aplicar el método estadístico seleccionado. Para ello, se utilizó el software OriginPro 2024, de OriginLab Corporation, bajo una licencia de aprendizaje, por medio de la aplicación MANOVA de una vía, creada por OriginLab Technical Support (2021) y el software R.<sup>158,159</sup>

Para evaluar si existen diferencias significativas entre las medias de las variables independientes de las diferentes especies de coral, en primer lugar, se definen la hipótesis nula ( $H_0$ ) y la hipótesis alternativa ( $H_1$ ). En este caso,  $H_0$  indica que las cuatro especies de coral no muestran diferencias significativas en ninguna de las medias de las cuatro características analizadas; es decir, que las medias multivariadas de las características de todas las especies de coral son iguales. Por su parte, la  $H_1$  indica que al menos una de las cuatro especies de coral muestra diferencias significativas en las medias de una o más de las características analizadas, es decir, hay diferencias en las medias multivariadas de las características entre al menos dos especies de coral.

Posterior a esto, es necesario verificar las tres suposiciones que se requieren para hacer una prueba MANOVA. Estas son verificar la normalidad, verificar la homogeneidad de las covarianzas y la independencia de las observaciones. En el caso de la normalidad, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para cada una de las variables.<sup>160</sup> Así se demostró que, en todos los casos, los valores de intensidad en cada canal poseen una distribución normal a un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$ ), como se muestra en la Tabla 4. 1. A partir de esto, la normalidad multivariable se estudió para todo el conjunto de datos.

**Tabla 4. 1** Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para el análisis de normalidad en las intensidades medias para cada canal del sistema RGB a un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ).

Color	Especie	Valor p	Decisión al 95% de confianza
R	<i>P. firma</i>	0.4505	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubinoffi</i>	--	No hay suficientes datos
	<i>P. rubicunda</i>	0.4422	No se rechaza la normalidad
	<i>P. stenobrochis</i>	0.2238	No se rechaza la normalidad
	<i>P. cairnsi</i>	0.9895	No se rechaza la normalidad
G	<i>P. firma</i>	0.1778	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubinoffi</i>	--	No hay suficientes datos
	<i>P. rubicunda</i>	0.7583	No se rechaza la normalidad
	<i>P. stenobrochis</i>	0.7402	No se rechaza la normalidad
	<i>P. cairnsi</i>	0.5946	No se rechaza la normalidad
B	<i>P. firma</i>	0.6303	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubinoffi</i>	--	No hay suficientes datos
	<i>P. rubicunda</i>	0.4948	No se rechaza la normalidad
	<i>P. stenobrochis</i>	0.8013	No se rechaza la normalidad
	<i>P. cairnsi</i>	0.5037	No se rechaza la normalidad

Mediante la prueba de Mardia, se evaluó la asimetría (*skewness*) y la curtosis (*kurtosis*) de cada variable independiente por separado en términos de las variables dependientes (R, G, B, R+G+B) utilizando la librería de R *mvnormalTest* en el programa *RStudio*.<sup>159,161–163</sup> Estos parámetros describen la asimetría de la distribución de los datos respecto a la media y qué tan concentrados están en la media o en las colas.<sup>157,163</sup> Así se observó como para la mayoría de las especies, no se observaron valores significativos de asimetría o curtosis (valores  $p > 0.05$ ), como se muestra en la *Tabla 4. 2*.

**Tabla 4. 2** Resultados de la prueba de Mardia para el análisis de normalidad multivariable de las variables dependientes del set de datos completo y por especie de la fotografía digital (RGB) a un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ). Colores verde, amarillo y rojo se asocian resultados positivos, no concluyentes y negativos, respectivamente.

Set de datos	Asimetría ( <i>skewness</i> )		Curtosis ( <i>kurtosis</i> )		Normalidad multivariable
	Valor p	Decisión	Valor p	Decisión	
<i>P. firma</i>	0.7548	Distribución simétrica	0.5584	Distribución normal	Sí la hay
<i>P. rubicunda</i>	1.0000	Distribución simétrica	0.0000	Distribución con curtosis positiva	No se puede asegurar
<i>P. stenobrochis</i>	0.9958	Distribución simétrica	0.3264	Distribución normal	Sí la hay
<i>P. cairnsi</i>	1.0000	Distribución simétrica	0.2251	Distribución normal	Sí la hay

Para *P. rubicunda*, el poco número de muestras y la poca dispersión de los datos en cada variable provocó una curtosis positiva. Esto indica que los datos en todas las variables están muy cercanos a su respectiva media estadística, por lo cual, aunque se trate de una distribución simétrica no se puede asegurar la normalidad multivariable.<sup>157</sup> Aunque esto podría afectar la validez de la MANOVA, tomando en cuenta la validez de 7 de 8 pruebas y la normalidad univariante en cada especie, se asumirá que todo el set de datos presenta normalidad multivariante.

Para probar la homogeneidad de las covarianzas se aplicó una prueba de Box de M, que determina si las matrices de covarianza son iguales entre las diferentes variables independientes. Para este caso, se evaluaron las covarianzas de R, G y B por medio de la

herramienta BoxM del paquete de R llamado *biotools*, con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ).<sup>159,164,165</sup> Se obtuvo un valor p de 0.2027, mayor que el nivel de significancia de 0.05. A partir de esto, se pudo determinar que no hay evidencia suficiente para concluir que las matrices de covarianza son diferentes entre las especies de coral. Por ello, se asume que las matrices de covarianza son homogéneas y se puede continuar con la MANOVA.<sup>157,165</sup> Por último, la independencia de las observaciones se asume, basada en el uso de los especímenes de museo que fueron recolectados en el campo de manera aleatoria. Junto a esto, la recolección de datos se hizo con fotografías completas de porciones individuales de ramas de especímenes distintos, descartando posibles influencias entre las muestras.

Cumplidas las 3 suposiciones se realizó la prueba MANOVA y a partir de esta se obtuvieron varios resultados. En primer lugar, se calcularon las matrices de Suma de Cuadrados y Productos Cruzados (SSCP) por factor y por error (*Cuadro A. 2*, en el *Anexo 4. I*). Estas nos describen la variabilidad de las R, G, B o R+G+B al compararlas entre especies y la variabilidad de estas características dentro de cada especie, respectivamente. Así, a partir de la SSCP por factor se determinó que las intensidades de color en R, G, B y R+G+B pueden presentar medias más o menos variables al comparar entre especies, y sigue la tendencia  $B < G < R \ll R+G+B$ . Ante esto, por ejemplo, la característica R+G+B podría ser más útil para distinguir entre especies que B, debido a que las medias de B difieren en menor medida.<sup>157</sup>

No obstante, la matriz SSCP por error indica que, aunque R+G+B presenta la mayor variabilidad interespecífica, como se determinó anteriormente, esta también presenta la mayor variabilidad intraespecífica. En este caso, la variabilidad de cada característica dentro de las especies sigue la tendencia  $G < B \approx R \ll R+G+B$ . Esto implica que los valores de R+G+B serán más distantes entre sí para mediciones dentro de una misma especie, por lo cual, podría ser más difícil incluir a un espécimen dentro de un grupo en específico. No obstante, es necesario entender cómo la variabilidad inter e intraespecífica se compensan para disminuir la posibilidad de incurrir en un error.<sup>157</sup>

Si se establece una razón entre la variabilidad inter e intraespecífica se obtiene un valor que puede reflejar qué tan efectiva podría ser una característica para distinguir entre especies según mayor sea su magnitud. Ante esto, se obtuvieron los siguientes resultados: R

(10.4), G (9.7), B (5.9) y R+G+B(16.3). Así se demuestra que, si bien es cierto R+G+B tiene la mayor variabilidad intraespecífica, se compensa de buena manera gracias a su muy superior variabilidad interespecífica y se mantiene como una mejor opción para distinguir entre las especies de coral, seguida por R, G y B.

Como parte de las matrices SSCP, también se presenta la correlación parcial entre las diferencias intraespecíficas en el *Cuadro A. 2*, en el *Anexo 4. 1*. Esta matriz refleja las correlaciones entre las características dentro de cada especie, y permite distinguir relaciones entre dos o más variables.<sup>157</sup> Como es esperado, R, G y B correlacionan positivamente con R+G+B, puesto que se trata de una suma de las 3 intensidades. No obstante, B y G poseen mayor relación que R (0.91, 0.77 y 0.49, respectivamente). Por su parte, B y G tienen una correlación fuerte (0.85) mientras que entre B y R es mucho más débil (0.15).<sup>157</sup>

Es interesante destacar que R y G interaccionan de manera inversa, con una débil correlación de -0.14. Esto puede ser el resultado de la interpretación de los colores naranjas-marrones de los corales, que son principalmente detectados mediante la combinación de los canales R y G de la cámara digital. Como se discutió en el Capítulo III, para colores más amarillentos (naranjas), la intensidad del verde debe ser mayor que la del rojo, mientras que, en tonalidades más rojizas, la intensidad del canal rojo debe predominar. De esta manera, la relación inversa entre R y G tiene sentido.<sup>157</sup>

Con base en lo observado anteriormente, se rescata la importancia de un análisis multivariable. El análisis de las variables dependientes por separado para distinguir entre especies presenta una serie de ventajas y desventajas que dependen del comportamiento estadístico de cada variable. Este enfoque univariable podría inducir a un error si se quiere identificar una muestra dentro de un grupo específico. De acuerdo con esto, se presenta el segundo bloque de resultados de la prueba MANOVA, es decir, los análisis multivariados. Estas son pruebas estadísticas que permiten identificar si las medias vectoriales de las variables independientes (R, G, B y R+G+B) son iguales entre las especies de coral.<sup>157</sup> En este caso las medias vectoriales son aquellos vectores que contienen las medias de cada variable dependiente estudiada en las especies. Por esta razón, como en este caso se manejan 4 características (R, G, B y R+G+B), este es un vector tetradimensional.

Aprovechando las posibilidades de la aplicación MANOVA de OriginLab, para los análisis multivariantes se aplicaron las pruebas de Wilk's Lambda (WL), Hotelling-Lawley's Trace (HLT) y Roy's Largest Root (RLR).<sup>157</sup> La prueba de WL es una de las más utilizadas y por su robustez se ha empleado en diversas aplicaciones.<sup>166</sup> Para distinguir entre especies, esta determina la proporción de la varianza total en las variables dependientes que no es explicada por las diferencias entre las especies. Por su parte, la prueba de HLT es sensible a la cantidad de variables dependientes y cuando las diferencias entre las especies son pequeñas. Por último, la prueba de RLR es muy sensible a grandes diferencias en las combinaciones lineales de las variables dependientes. De esta manera, la combinación de las 3 pruebas puede ayudar a comprender de manera completa las diferencias entre las especies y a aumentar la confianza en los resultados reportados.<sup>157</sup>

Todas las pruebas se utilizaron para determinar si las medias vectoriales de las variables dependientes son iguales o distintas entre las especies.<sup>157</sup> De esta manera, en ambos casos, la hipótesis nula ( $H_0$ ) sostiene que las medias vectoriales de las variables dependientes son iguales entre los grupos, mientras que la hipótesis alternativa, sostiene que son diferentes a un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ). De esta manera valores p pequeños indican diferencias significativas entre las especies y es lo que se busca en esta investigación. Los resultados de ambas pruebas se resumen en la *Tabla 4. 3*. En los 3 casos estudiados se rechaza la  $H_0$  debido a que las diferencias encontradas son significativas con valores p muy bajos. Por esta razón, se concluye que existe una influencia muy significativa de las especies sobre las medias vectoriales de las características medidas.<sup>157</sup>

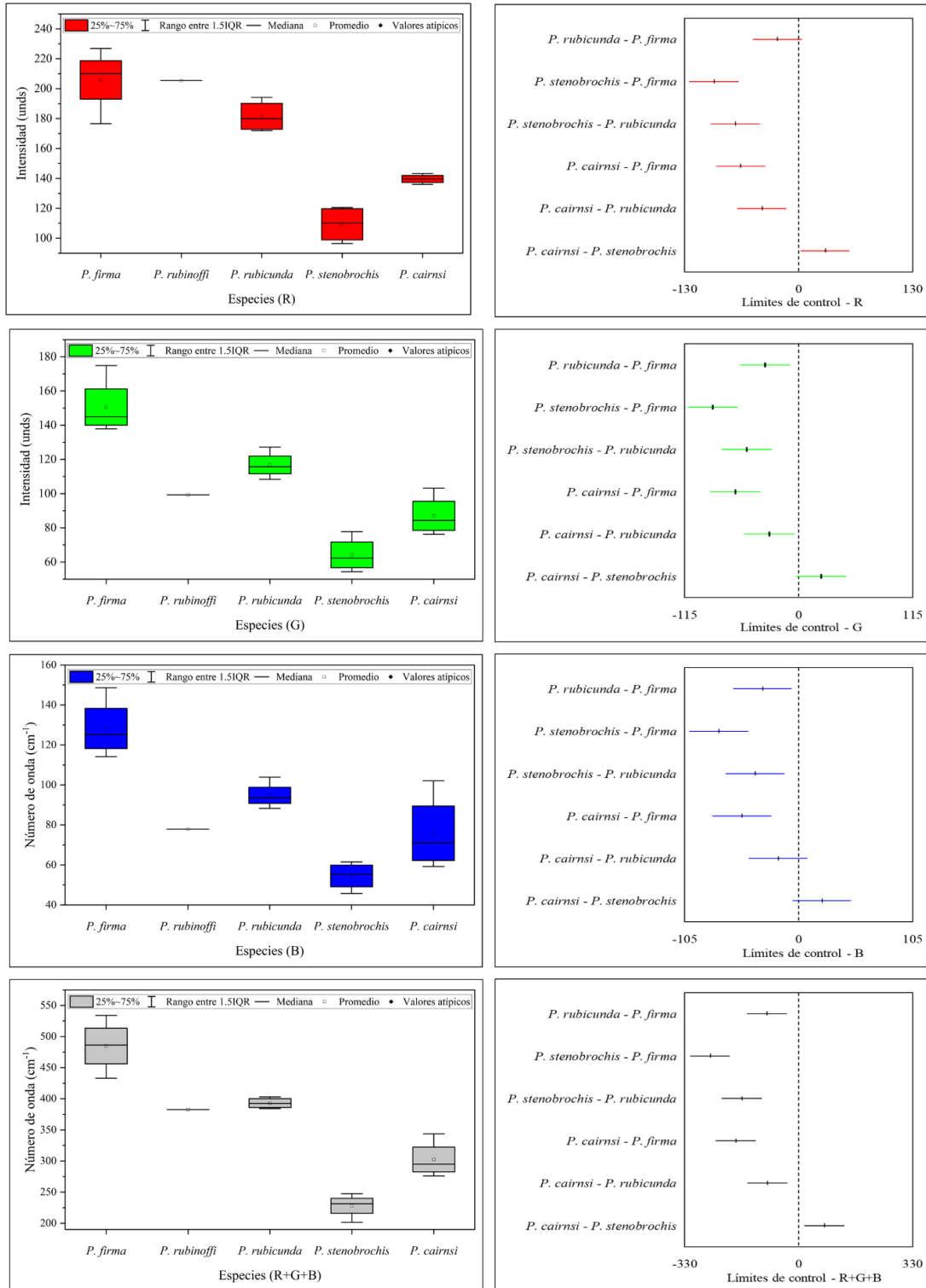
**Tabla 4. 3** Resultados del análisis multivariable con las pruebas de Wilk's Lambda, Hotelling-Lawley's Trace y Roy's Largest Root con un nivel de confianza del 95% para el análisis cromático con fotografía digital (RGB).

Análisis multivariable	Valor de prueba	Valor F	Valor P	Decisión
Wilk's Lambda	0.073	3.396	0.00522	Sí hay diferencias significativas
Hotelling-Lawley Trace	29.25	18.69	4.59E-09	Sí hay diferencias significativas
Roy's Largest Root	30.46	83.77	3.66E-08	Sí hay diferencias significativas

Para la prueba de WL, entre más pequeño es el valor de prueba respecto al valor F, las diferencias son más significativas. Por ello, esta prueba indica que la proporción de las varianzas es muy distinta entre las especies. Por su parte, para la prueba de HLT, los valores de prueba más altos respecto a F indican mayores diferencias entre las especies. Sumado a esto, la prueba de RLR sugiere que no sólo existen diferencias basadas en las medias vectoriales de las variables dependientes, sino que hay grandes diferencias en la combinación lineal de las mismas.<sup>157</sup> No obstante, aunque todas estas pruebas indican resultados convenientes, no se sabe qué especies son diferentes entre sí y cuáles variables dependientes son más eficaces en esta diferenciación. Por esto, fue necesario aplicar pruebas “*post Hoc*”, que permiten destacar estas diferencias a escala univariante y entre pares de especies.<sup>167</sup>

Para tal fin se utilizaron diagramas de cajas y bigotes y se aplicó la prueba de diferencia honesta significativa de Tukey (Tukey HSD), cuyos resultados se presentan en el Cuadro A. 3 en el Anexo 4. 1 y se resumen en la Figura 4. 1.<sup>167</sup> De esta manera, a través de los diagramas de cajas es posible observar cómo se distribuyen los diferentes valores de intensidad según la variable dependiente para cada especie de coral estudiada. Es importante notar como, a nivel general, existe un comportamiento similar entre la posición de las medias de intensidad en cada canal. Asimismo, es posible evaluar el posicionamiento de la muestra incógnita de *P. rubinoffi* respecto a las otras especies. A nivel cualitativo, se observa cómo los valores de intensidad de *P. rubinoffi* se encuentran en el mismo rango que *P. firma* para el canal R, que *P. cairnsi* en los canales V y A y que *P. rubicunda* en la suma de los 3 canales.

Por otra parte, *P. firma* y *P. rubicunda* presentan cierto traslape en los rangos de intensidad para el canal R. Lo mismo sucede entre *P. rubicunda* y *P. cairnsi* en el canal B y con *P. stenobrochis* y *P. cairnsi* en los canales G y B. Para el caso de la suma de canales (R+G+B), los diagramas aparentan una división clara entre los rangos de cada especie estudiada. Por su parte, a nivel cuantitativo, se utilizan los intervalos de confianza de la prueba de Tukey HSD para confirmar lo observado en los diagramas de cajas.<sup>167</sup> De esta manera, la interpretación de estos gráficos implica que, si el intervalo de confianza no cruza la línea de cero en los límites de control, existen diferencias significativas entre las dos especies de octocorales para una variable independiente dada. Así, se demuestra cómo la variable R+G+B es más útil a nivel taxonómico, al distinguir entre todas las especies.



**Figura 4. 3** Diagramas de cajas e intervalos de confianza de la prueba de Tukey para el estudio de las diferencias entre las intensidades en los canales RGB de fotografías digitales de las especies de *Pacifigorgia*.

En el estudio cuantitativo de la muestra incógnita, se realizaron pruebas t de Student para determinar si la magnitud medida de cada variable en *P. rubinoffi* se distingue de manera significativa de las medias de cada variable de las otras especies de coral. Para ello se utilizó la herramienta t.test del paquete de R *stats*, utilizando un análisis de dos colas a un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ), con 3 grados de libertad.<sup>159</sup> De esta forma, los resultados de los valores t calculados se compararon contra un valor t crítico de  $\pm 3.182$ . Así, si  $|t_{\text{calculado}}| > |t_{\text{crítico}}|$  y el valor  $p < 0.05$ , fue posible determinar que existen diferencias significativas entre *P. rubinoffi* y las otras especies en cada variable estudiada.<sup>168</sup> Estos resultados se resumen en la *Tabla 4. 1.*, dónde se observa cómo es posible utilizar el análisis de color para distinguir a *P. rubinoffi* de cualquier otra especie estudiada con, al menos, dos de las variables colorimétricas evaluadas.

**Tabla 4. 4** Resultados de la prueba t de Student para la distinción de las medias de R, G, B y R+G+B en *P. rubinoffi*, en comparación a las demás especies al 95% de confianza.

Especie	Variable	Valor $t_{\text{calculado}}$ ( $t_{\text{crítico}} = \pm 3.182$ )	Valor p	Existen diferencias significativas
<i>P. firma</i>	R	0.0456	0.9665	No
	G	6.1796	0.0085	Sí
	B	6.8533	0.0064	Sí
	R+G+B	4.9089	0.0162	Sí
<i>P. rubicunda</i>	R	-4.5432	0.0200	Sí
	G	4.4750	0.0208	Sí
	B	5.1779	0.0140	Sí
	R+G+B	2.4358	0.0929	No
<i>P. stenobrochis</i>	R	-15.7654	0.0006	Sí
	G	-6.9079	0.0062	Sí
	B	-6.7396	0.0067	Sí
	R+G+B	-16.0202	0.0005	Sí
<i>P. cairnsi</i>	R	-42.8645	0.0000	Sí
	G	-2.0793	0.1291	No
	B	-0.2146	0.8438	No
	R+G+B	-5.4624	0.0121	Sí

A partir de los resultados estadísticos obtenidos anteriormente, es posible afirmar que un análisis de color por medio de fotografía digital (RGB) es un método muy promisorio para ser utilizado como un nuevo carácter taxonómico y es útil para distinguir entre las especies estudiadas. Si bien es cierto las determinaciones de color realizadas por los taxónomos son

un excelente punto de partida, esta técnica se postula como un refuerzo a estos métodos de caracterización. Asimismo, al depender de parámetros cuantitativos, se reduce la subjetividad en la apreciación del color que aquellos ojos inexpertos puedan tener a la hora de estudiar nuevos especímenes.

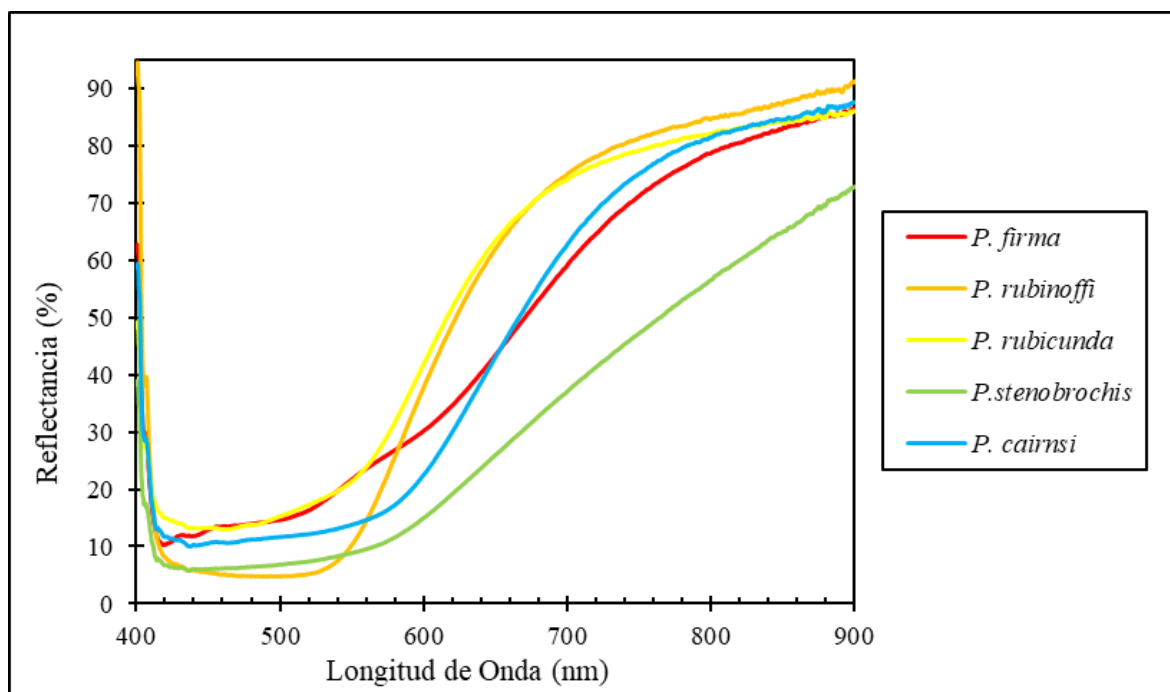
Sumado a esto, una de las principales cualidades de esta metodología es que es una técnica simple y sencilla de replicar, pudiéndose aplicar en cualquier laboratorio fotográfico improvisado e incluso en el campo. Para ello, se necesita cumplir solamente con 4 elementos básicos: una fuente de luz, una cámara fotográfica digital, un patrón de calibración y un fondo blanco. Es el tratamiento posterior el que permite calibrar las imágenes independientemente de las condiciones en las cuales fueron tomadas. Sumado a esto, tanto el análisis de color sobre las fotografías calibradas como el análisis estadístico de estos datos son sencillos de realizar por medio de softwares de libre acceso, como Image J y R, respectivamente.

### **Microespectroscopía Visible-NIR**

Como parte de los análisis de color, junto a la fotografía digital se encuentra la microespectroscopía Visible-NIR. Esta técnica se postula como la segunda mejor opción a la hora de establecer nuevos caracteres de diferenciación entre las especies de coral estudiadas. Es necesario aclarar que en este caso se hizo un análisis de las muestras distinto al presentado en el Capítulo III. Así, partiendo de la alta variabilidad observada en la forma de los espectros de las escleritas individuales de distintos colores, se optó por un enfoque más general. Por lo tanto, para reducir la complejidad de los datos de entrada en el modelo estadístico y facilitar el análisis, se estudiaron los espectros de reflectancia de áreas grandes de la superficie de los corales. Los espectros se midieron con un tiempo de escaneo de 900 ms y una apertura de 1 con un objetivo de 5x, que cubre un área de 200x200  $\mu\text{m}$ .

Estas regiones fueron seleccionadas de forma aleatoria y se procuró que existieran escleritas de varias formas, tamaños y colores en el área muestreada. De esta manera, se logró que la reflectancia conjunta de cada esclerita en esa zona contribuyera en la generación de un solo espectro y así obtener un resultado más representativo de ese espécimen. Bajo las mismas condiciones se tomaron espectros de 5 zonas de cada espécimen estudiado en cada especie, resultados que se muestran de forma ponderada en la *Figura 4. 4*. Posteriormente,

estos espectros fueron estudiados de forma exploratoria y sin ningún tipo de normalización en el rango de 420 a 900 nm, mediante un Análisis de Componentes Principales, llamado PCA, por sus siglas en inglés, mediante la herramienta “Principal Component Analysis for Spectroscopy” de OriginLab.<sup>158</sup>



**Figura 4. 4** Promedio de los espectros de reflectancia Visible-NIR de la superficie de los corales de las especies estudiadas del género *Pacifigorgia* utilizados para el PCA.

Un PCA es una técnica de análisis estadístico multivariable que cuyo fin es reducir la dimensionalidad de un conjunto de variables usualmente interdependientes entre sí, procurando conservar la variabilidad de cada una de ellas.<sup>169</sup> De esta manera, el método busca extraer solamente la información más importante del set de datos al transformarlo en un nuevo sistema de variables llamadas componentes principales, que surgen de combinaciones lineales de las variables originales. Estas servirán como coordenadas que se dispondrán en ejes ortogonales entre sí y describirán la variabilidad de los datos, lo que permite visualizar y agrupar aquellas muestras con características similares entre sí. El componente principal 1 (PCA1) es la que tiene la mayor varianza posible, seguida por el componente principal 2 (PCA2); patrón que se repite sucesivamente.<sup>169</sup>

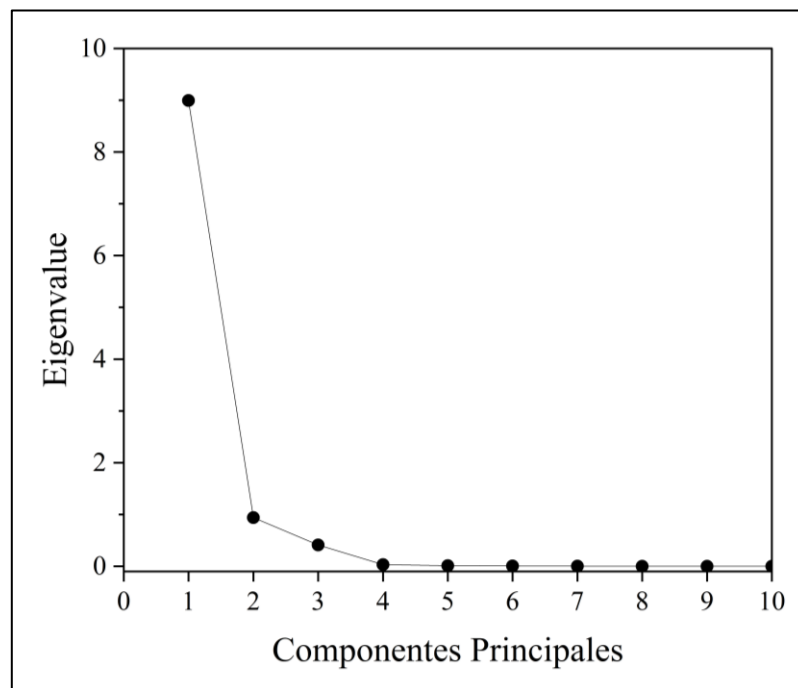
En este caso, como se puede ver en la *Figura A. 2* (en *Anexo 4. 2*), resumida en la *Figura 4. 4*), el set de datos espectrales es complejo de interpretar y por esto, distinguir entre las diferentes especies de forma estadística, no es una tarea sencilla. En resultados como los recuperados, con bandas anchas y cortadas por el rango espectral del equipo, los algoritmos de deconvolución fallan al determinar la posición de los máximos de las bandas observadas, impidiendo usar este parámetro para caracterización. No obstante, un PCA permite interpretar cada longitud de onda del espectro como una variable distinta (1138, en total) y hacer una reducción de dimensionalidad que permite extraer los componentes principales que ayudan a distinguir entre cada especie de coral.

Como en todo PCA, se establece una matriz “X” con “J” variables (longitud de onda,  $\lambda$ ) e “I” observaciones (muestras), en dónde cada elemento se denota como “ $x_{i,j}$ ” (% Reflectancia de cada muestra a una  $\lambda$  dada). Luego, el método centra a cada variable  $J$  de forma que sus medias sean igual a cero y cada elemento  $x_{i,j}$  es dividido entre la raíz de las observaciones  $I$  ( $\sqrt{I}$  o  $\sqrt{I-1}$ , según la magnitud de  $I$ ) para construir una matriz de covarianza denotada como  $X^T X$  al aplicar una operación de transposición. Como en este caso todas las variables  $J$  poseen la misma escala y con las mismas unidades de reflectancia, no fue necesario hacer un análisis de correlación al estandarizar cada variable por su norma. Por esta razón, en el tratamiento de datos en OriginLab se optó por un PCA de covarianza y no un PCA de correlación.

Luego de la elaboración de la matriz  $X^T X$ , se calcularon las combinaciones lineales de las variables originales que generaron nuevas variables ortogonales entre sí que maximizaran la varianza, es decir, los componentes principales (PC’s). Posterior a esto, para cada PC se calcularon los valores y los vectores propios, comúnmente llamados *eigenvalues* y *eigenvectors*, respectivamente.<sup>169</sup> Los valores propios indican la varianza explicada por cada PC, mientras que los vectores propios definen la dirección de cada PC. Con base en los *eigenvalues* se hizo una selección de los componentes principales, que corresponde a aquellos que expliquen la mayor parte de la varianza total de los datos.<sup>169</sup>

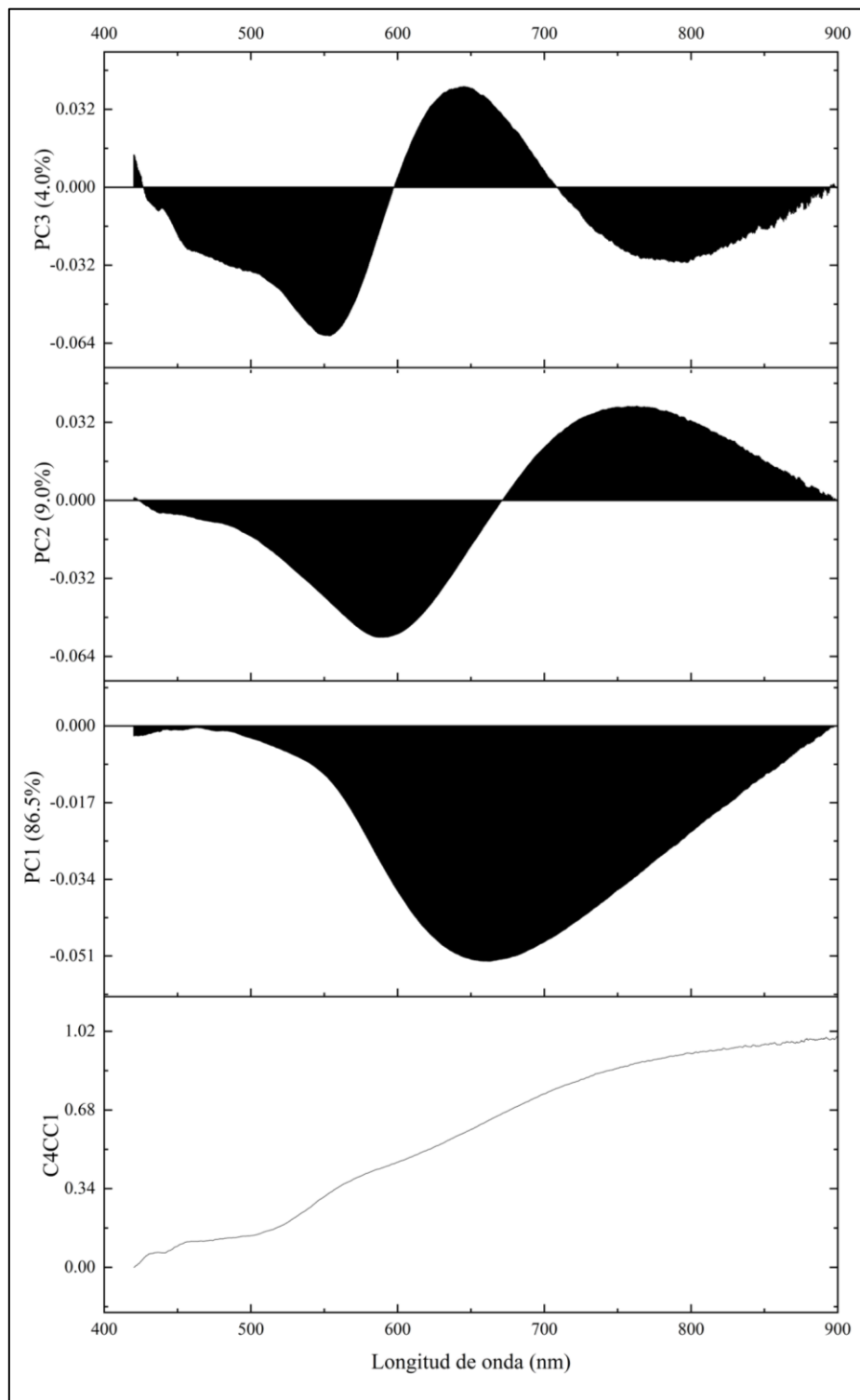
Esta evaluación se hizo mediante el análisis directo de los valores de varianza explicada por cada PC (*Cuadro A. 4*, en el *Anexo 4. 2*) y de gráficos de sedimentación, en los

que se muestran los valores propios de cada componente principal, como se muestra en la *Figura 4. 5*.<sup>169</sup> De esta manera, se seleccionaron para análisis solamente los primeros tres componentes principales, puesto que describen un 86.5, 9.0 y 4.0% de la varianza observada en el set de datos de los datos, respectivamente. Esto quiere decir que con base en PC1, PC2 y PC3 se representa un 99.5% de los datos espectrales. De la misma manera, en la *Figura 4. 5* se ve cómo luego de PC3, los *eigenvalues* decaen con valores cercanos a cero.



**Figura 4. 5** Gráfico de sedimentación con el valor de los *eigenvalues* para las componentes principales 1 a 10 obtenidos a partir del PCA para Microespectroscopía Visible-NIR.

Para entender qué información contiene cada componente principal seleccionado en función de las variables originales (longitudes de onda), se emplean los coeficientes de los *eigenvectors*, llamados *loadings* o cargas. Estos describen el grado de contribución de cada variable original para la conformación de un componente principal determinado.<sup>169</sup> De esta manera, al graficar las cargas en función de las longitudes de onda, fue posible determinar de forma cualitativa cuáles valores de longitud de onda tienen mayor influencia en cada componente principal.<sup>169</sup> En la *Figura 4. 6* se presenta dicha información a junto a un espectro de referencia. Con base en este gráfico, se puede observar cómo para PC1, los valores de  $\lambda$  entre 550 y 800 nm fueron los que presentaron mayor variabilidad entre especies.

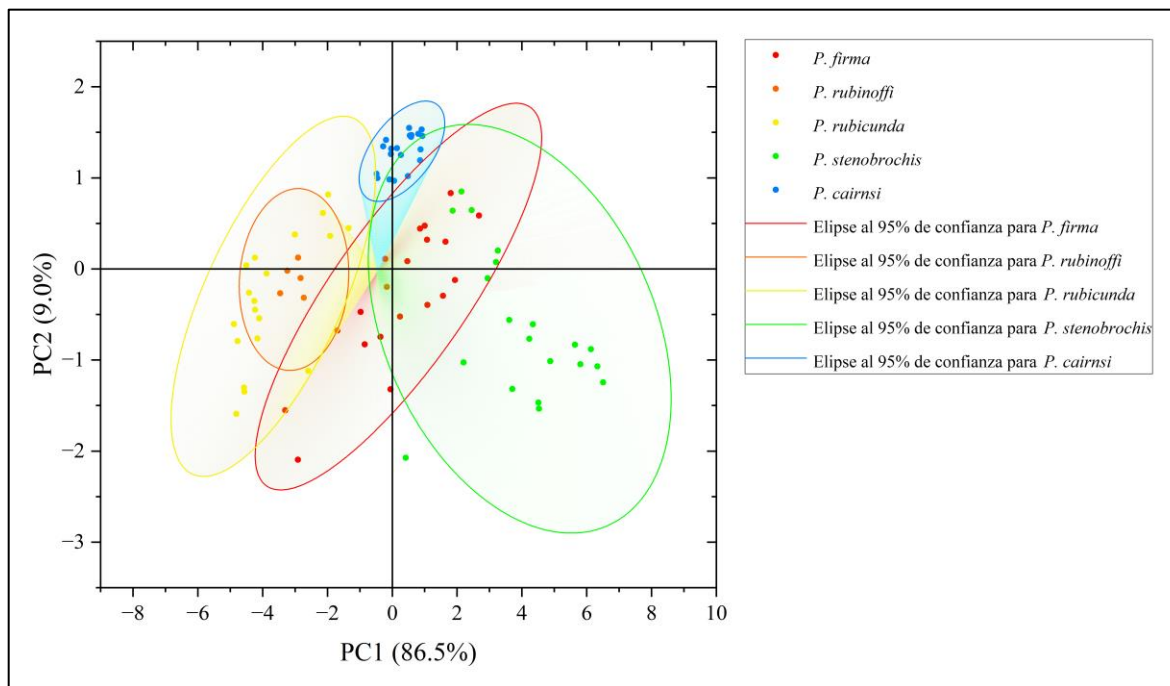


**Figura 4. 6** Gráficos de cargas según la longitud de onda obtenidos a partir del PCA para los componentes principales 1, 2 y 3, respecto a un espectro de reflectancia normalizado de la primera muestra del espécimen C4CC de *P. firma*.

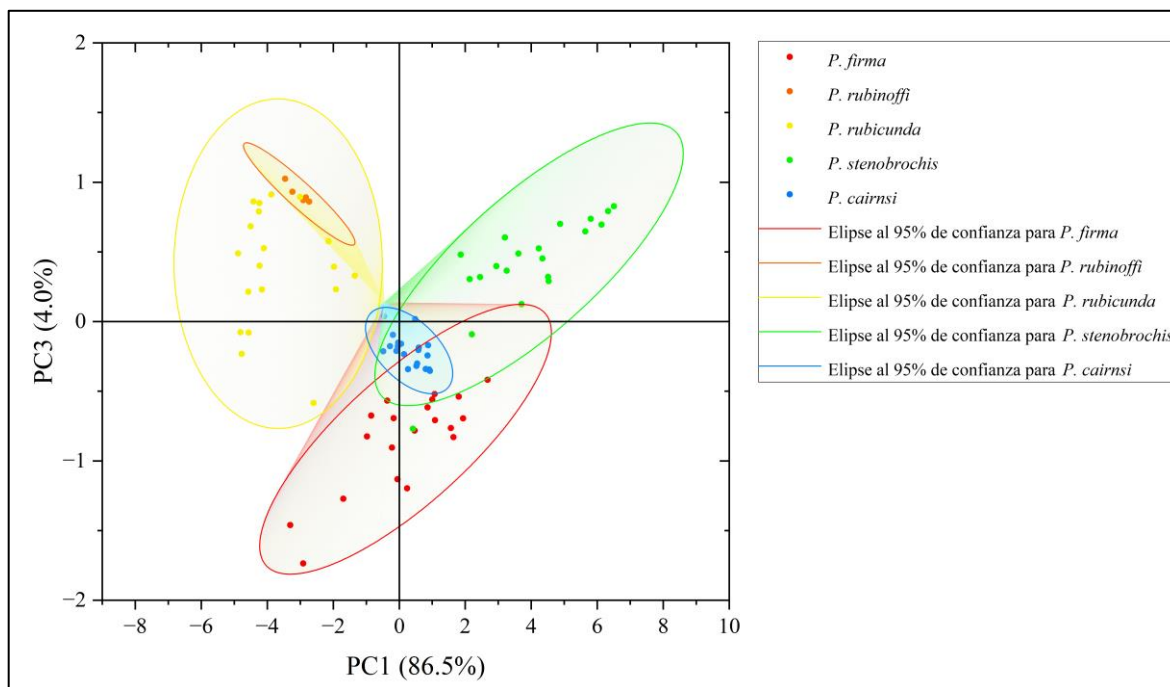
La varianza en PC1 alcanza su máximo alrededor de 650 nm y tiene un carácter negativo, lo cual quiere decir que, entre las distintas especies, la reflectancia es más variable en esta zona del espectro y que esta variación se proyecta hacia valores negativos de la nueva variable PC1. Si se aplica el mismo análisis para PC2 y PC3, se puede determinar que en PC2, los valores más variables de  $\lambda$  son los que se encuentran adyacentes a la  $\lambda$  más variable en PC1, es decir, a 600 y a 750 nm, con contribuciones negativas y positivas, respectivamente. Este comportamiento refleja que la variabilidad de los espectros está relacionada con la forma de la pendiente que se genera entre las zonas con baja y alta reflectancia, es decir, de 400-600 nm y 700-900 nm. Asimismo, la PC3 también se alimenta de la variación entre los 600 y 850 nm, sin embargo, las mayores contribuyentes se encuentran en las regiones con reflectancia variable y baja a 550 nm.

Para cada observación existen valores que describen su relación con cada componente principal, que se llaman comúnmente *factor scores* o puntuaciones factoriales.<sup>169</sup> Al proyectar estas puntuaciones factoriales para cada observación en el espacio de coordenadas de los componentes principales se reduce la dimensionalidad de la información obtenida y se resaltan las diferencias entre los grupos de muestras.<sup>169</sup> Esto se realizó para PC1, PC2 y PC3 en forma de 3 gráficos bidimensionales (*biplots*, PC1-PC2, PC1-PC3 y PC2-PC3), como se muestra en la *Figura 4. 7*, *Figura 4. 8* y *Figura 4. 9*. Por medio de este método se visualizan las agrupaciones según cada especie y es posible distinguir entre ellas. Sumado a esto, se generaron elipses que describen la distribución de los datos a un 95% de confianza, lo cual otorga un parámetro de certeza a las distinciones que se hacen.

En la *Figura 4. 7* al graficar PC1 vs. PC2 se puede observar cómo la mayor parte de las especies se distinguen entre sí. Si bien es cierto las agrupaciones poseen distribuciones heterogéneas y en algunos casos se traslapan, existe una distinción apreciable entre las especies. La excepción a lo observado se encuentra entre las especies *P. rubicunda* y *P. rubinoffi*, que no son distinguibles entre sí. Asimismo, en *P. stenobrochis* se detecta la presencia de una observación anómala, salida de la elipse. Lo mismo se observa en la *Figura 4. 8*, obtenida al graficar PC1 vs. PC3, sin embargo, en este caso se observa que el traslape entre *P. stenobrochis* y *P. firma* es menor. En este caso, tampoco es posible diferenciar entre *P. rubicunda* y *P. rubinoffi*.

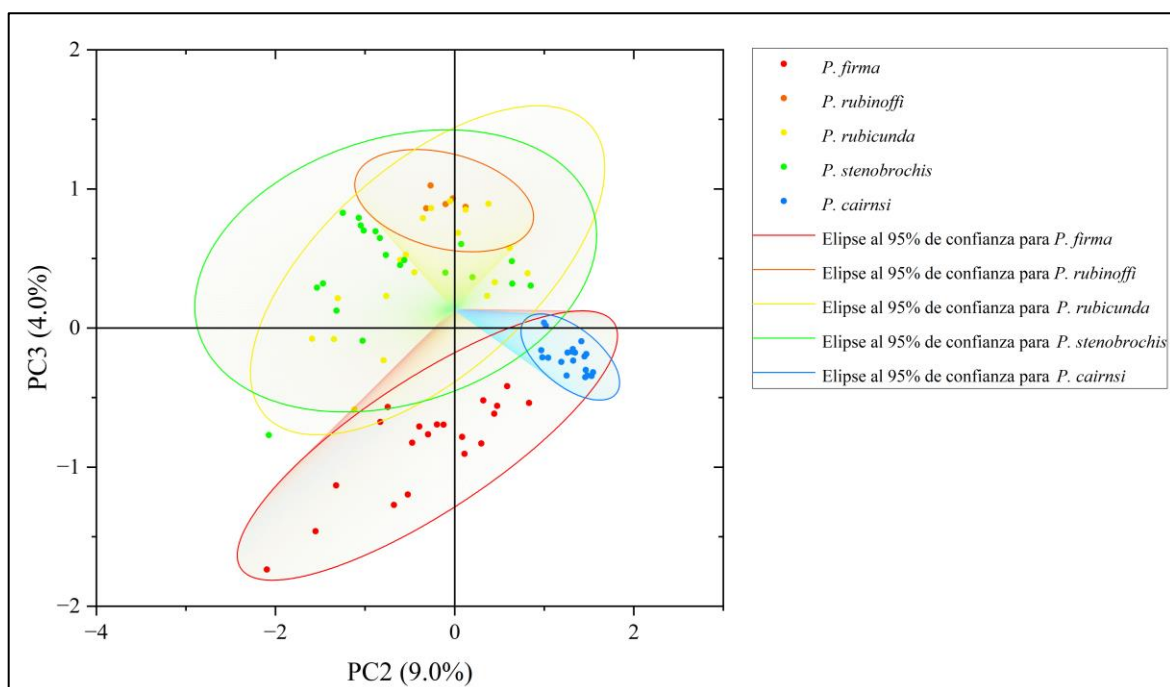


**Figura 4. 7** Biplot de PC1 y PC2 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de reflectancia en el rango Visible-NIR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.



**Figura 4. 8** Biplot de PC1 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de reflectancia en el rango Visible-NIR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.

Por último, en el biplot de PC2-PC3, al representar sólo un 4.0% de la varianza observada presenta más problemas a la hora de separar entre las especies. En este caso el traslape entre *P. rubinoffi*, *P. rubicunda* y *P. stenobrochis* es tal que no es posible distinguir entre las 3, sin embargo, sus diferencias respecto a *P. firma* y *P. cairnsi* están bien marcadas. Sumado a esto y teniendo en cuenta lo observado en PC1 y PC2, es claro que entre especies la variabilidad espectral puede ser alta. No obstante, cabe destacar casos como el de *P. cairnsi* que, a pesar de tener especímenes de tonos mucho menos saturados como C20LL, sus puntuaciones factoriales aparecen muy cercanos al resto de datos. De forma contraria, especies de coloraciones marcadamente diferentes, como *P. rubicunda* y *P. rubinoffi*, parecen idénticas a nivel espectral.



**Figura 4. 9** Biplot de PC2 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de reflectancia en el rango Visible-NIR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.

Lo anterior demuestra que a pesar de que puede haber diferencias de color, estas no implican una diferencia a nivel de composición química detectables por medio de PCA. Asimismo, diferencias a nivel espectroscópico pueden no verse reflejadas en cambios de color apreciables. A pesar de sus limitaciones, con base en estos resultados se concluye que la Microespectroscopía Visible-NIR puede ser una herramienta útil a la hora de distinguir

entre especies. Así, esta técnica se puede sumar como una nueva técnica de caracterización para que, en conjunto con otros caracteres, sea de utilidad taxonómica. Por último, se destaca que, si bien es cierto este tipo de análisis es efectivo, pueden existir otras técnicas de análisis que permitan establecer diferencias más palpables entre los resultados. No obstante, el PCA se postula como una técnica útil, conocida, ampliamente utilizada y aceptada por la comunidad científica, que cumple con el objetivo principal de esta investigación.<sup>169</sup>

### **Microespectroscopía de Fluorescencia**

La microespectroscopía de fluorescencia se postula como una buena técnica de caracterización para los pigmentos presentes en las escleritas de los octocorales, como se demostró en el Capítulo III. No obstante, a partir de los resultados estadísticos no es una técnica tan efectiva para hacer clasificación taxonómica. Para llegar a dicha conclusión, se llevó a cabo un tratamiento de datos similar al utilizado en Microespectroscopía Visible-NIR, sin embargo, en este caso sí fue necesario tratar los datos previo al análisis estadístico.

En general, para cada set de datos se hizo un pretratamiento en el software LabSpec6, que consistió en la remoción de las bandas producidas por radiación cósmica mediante un algoritmo de CRR (*Cosmic Ray Removal*). Posterior a esto, se aplicó una corrección de la línea base de tipo polinomial de segundo grado (cuadrática), para contrarrestar la curvatura de respuesta del detector a lo largo de su rango espectral. Posterior a esto, se continuó con el tratamiento de datos en el software OriginLab.<sup>158</sup> La normalización de los datos se efectuó, sin embargo, devino en resultados muy pobres y por ello se descartó este tratamiento para realizar el análisis que se presentará a continuación.

Como se pudo observar en los espectros de la *Figura 3. 35* del capítulo anterior, a nivel cualitativo sí parecen existir diferencias espectrales entre las especies, tanto en el número como en la posición de las bandas. Por ello, en primera instancia, se hizo una identificación de bandas con la herramienta *Peak Analyzer*.<sup>158</sup> Esto tuvo como meta encontrar la posición de las bandas presentes en cada especie y para ello se utilizó la función *Find Peaks*. Esta se aplicó sobre el promedio de todos los espectros medidos en los puntos del mapa microespectroscópico de cada esclerita medida. Los parámetros para identificación se optimizaron para los espectros de fluorescencia de la siguiente manera: se ajustó una línea

base constante en un punto mínimo, se utilizó un método de identificación de tipo *Fourier Self-Deconvolution (Pro)*, con una ventana de suavizado de tamaño 10 para picos positivos, y con un factor de suavizado de 0.7 con dos puntos locales. Los picos fueron filtrados por altura, y se descartaron aquellos menores al 2% del máximo.

De esta manera se obtuvo la posición del conjunto de bandas para todos los espectros de cada esclerita estudiada en cada especie, a partir de la cual se construyó el *Cuadro 4. 1*. En este cuadro se resume la posición promedio de cada banda de emisión ( $\lambda$ ), su desviación estándar ( $\sigma$ ) y el número (n) de veces que se identificó esa banda dentro de las muestras analizadas por especie ( $n_T$ ). En este caso, se resaltan con distintos colores las diferentes bandas siempre y cuando estas hayan aparecido, al menos, en la mitad de las muestras analizadas para cada especie. A partir de este cuadro se puede observar que cada especie de coral posee un set de bandas distinto entre sí. No obstante, existen bandas que están presentes en cada muestra estudiada, como aquellas a ~400, ~445 y ~465 nm. Dichas bandas no son distintivas. Se hace evidente su poca utilidad para distinguir entre especies al observar cómo sus desviaciones estándar intraespecíficas son mayores a la variabilidad interespecífica.

**Cuadro 4. 1** Posición promedio de cada banda de emisión ( $\lambda$ ) junto a su desviación estándar ( $\sigma$ ) y el número (n) de veces que se identificó cada banda dentro de las muestras analizadas ( $n_T$ ) para cada especie estudiada del género *Pacifigorgia* por medio de microespectroscopía de fluorescencia. Si  $n \geq 0.5n_T$ , la banda se colorea para esa especie, de acuerdo con un color diferenciado según cada banda.

<i>P. firma</i> ( $n_T=9$ )			<i>P. rubinoffi</i> ( $n_T=2$ )			<i>P. rubicunda</i> ( $n_T=7$ )			<i>P. stenobrochis</i> ( $n_T=6$ )			<i>P. cairnsi</i> ( $n_T=7$ )		
$\lambda$ (nm)	$\sigma$ (nm)	n	$\lambda$ (nm)	$\sigma$ (nm)	n	$\lambda$ (nm)	$\sigma$ (nm)	n	$\lambda$ (nm)	$\sigma$ (nm)	n	$\lambda$ (nm)	$\sigma$ (nm)	n
-	-	0	327	4	2	323	1.5	3	-	-	0	325	2.0	6
333	1.8	9	339	2	2	336	2.6	6	337	2.1	6	338	0.8	2
375	1.6	7	378	1	2	-	-	0	-	-	0	374	9.7	3
399	1.6	9	401	1	2	401	1.0	7	403	2.1	6	399	3.7	7
421	1.5	9	-	-	0	-	-	0	-	-	1	417	9.3	6
445	3.0	9	442	0	2	440	8.3	4	444	5.9	4	446	3.8	5
463	4.2	9	468	1	2	467	4.3	7	467	1.8	6	471	1.9	7
496	5.1	8	-	-	0	494	1.1	2	498	2.1	5	500	2.4	5

En resumen, es posible identificar las diferencias que se enumeran a continuación. *P. firma* presenta bandas distintivas a 333, 375 y 420 nm; *P. rubinoffi* a 327, 339 y 378 nm; y *P. rubicunda* presenta su única banda distintiva a 366 nm, con ausencia de aquellas que representan a las especies antes mencionadas. Por su parte, *P. stenobrochis* se asemeja a *P. rubicunda*, sin embargo, se destaca por la banda a 498 nm; y *P. cairnsi* se distingue por sus máximos a 325, 417 y 500 nm. Lo anterior demuestra que a nivel semicuantitativo es posible distinguir entre las especies estudiadas, no obstante, este enfoque requiere de un análisis manual que es tedioso y poco robusto. Por esto se optó por explorar los resultados con PCA, un método que resulta más práctico y que permitió analizar la totalidad de la información espectral.

A pesar de evaluar la totalidad de la información espectroscópica, no se obtuvieron resultados concluyentes. De la misma manera que en Microespectroscopía Visible-NIR, para Fluorescencia se destacaron los componentes principales y se determinó que solamente PC1, PC2 y PC3, eran importantes para el análisis del set de datos. Estos componentes representan un 76.7, 16.0 y 5.8%, respectivamente, lo cual explica un 98.5% de la varianza total de la muestra, tal y como se representa en el *Cuadro A. 5* y en el gráfico de sedimentación de la *Figura A. 3*, mostrados en el *Anexo 4. 3*. En los gráficos de PC1-PC2-PC3 de la *Figura A. 5* a la *Figura A. 7* del *Anexo 4. 3* se muestra cómo a pesar de que se detectan diferencias en el comportamiento de los datos en las coordenadas de los componentes principales, no es posible distinguir entre los grupos.

Sumado a esto, dentro de una misma especie la dispersión de los datos es amplia y la presencia de observaciones anómalas es prominente. Ante estos resultados poco favorables se determina que un enfoque discreto en la selección de las muestras podría no ser beneficioso. Las mediciones microespectroscópicas se hicieron sobre puntos del área superficial de escleritas con un haz micrométrico proveniente de una fuente de sincrotrón muy sensible al grosor y morfología de las muestras. Esto hace que por efecto de la topografía de estas estructuras la interacción del haz con la muestra sea muy distinta, dependiendo de la zona irradiada. Estas diferencias pudieron haber originado la presencia de tal número de anomalías en el set de datos incluso para espectros tomados en una misma esclerita o en escleritas de octocorales de la misma especie.

A partir de lo anterior, se ha determinado que las técnicas de fluorescencia podrían tener el potencial para distinguir entre especies, no obstante, se proponen ciertas consideraciones metodológicas capaces de mitigar las problemáticas recién puntualizadas. Por ello se propone aplicar un enfoque similar al desarrollado en la microespectroscopía Visible-NIR en el caso de utilizar técnicas de espectroscopía de fluorescencia en el futuro. Esto requiere de la captura de espectros sobre la superficie del coral o sobre pequeños lotes de escleritas aisladas. Así, se ponderarían las anomalías por variaciones en la composición de las escleritas y la presencia de efectos ópticos como la dispersión de la luz dependiente de la morfología y tamaño de estas. De esta manera se espera que se recuperen espectros que representen la contribución de varias morfologías, colores y tamaños de esclerita de cada espécimen para que esto permita utilizarlos como un nuevo carácter taxonómico.

### **Microespectroscopía Raman**

La capacidad para utilizar la microespectroscopía Raman como un carácter taxonómico fue previamente estudiado por otros autores. No obstante, análisis basados tanto en la posición como en la intensidad de las bandas fueron inadecuados para distinguir entre corales con colores similares que tenían distintos orígenes.<sup>133</sup> Ante esto, se quiso determinar si en el caso de las especies estudiadas, dotadas de distintos colores y un mismo origen, existían diferencias espectroscópicas significativas en cuanto a las bandas producidas por la dispersión Raman del pigmento. De esta manera se determinó, al igual que lo reportado en la literatura, que la espectroscopía Raman no es una técnica suficiente para distinguir entre especies de coral. A continuación, se describirá el análisis realizado para obtener dicho resultado.

En primer lugar, por medio de la función *Peak Analyzer* del programa OriginLab se realizó una deconvolución espectros Raman de escleritas aisladas en el rango de 500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>158</sup> Los parámetros utilizados se optimizaron dependieron de la calidad de cada espectro. En perfiles con buena relación de señal ruido y señales definidas, se utilizó el modo manual de *Fit Peaks (Pro)*. Para definir la línea base se utilizó el modo *Asymmetric Least Squares Smoothing*, con un factor de asimetría de 0.001, un umbral de 0.002, un factor de suavizado de 5 y con 10 iteraciones. Para encontrar los picos, se utilizó un método con

primera derivada, con un suavizado de 10 puntos para picos positivos junto a un suavizado por el método Savitzky-Golay de orden 3 con 25 puntos de ventana. Se filtraron aquellos picos menores a un 5% de la intensidad máxima. En la ventana de *Fit Control* se utilizó un ajuste de Lorentz, optimizado para la forma característica de las bandas en espectroscopía Raman y la curva de mejor ajuste se obtuvo por un proceso iterativo.<sup>170</sup>

Así se obtuvo información acerca de la posición e intensidad de las bandas 1, 2 y 3 a  $\sim 1030$ ,  $\sim 1125$  y  $\sim 1510$   $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a los modos vibracionales  $\nu_4(\text{C-CH}_3)$ ,  $\nu_2(\text{C-C})$  y  $\nu_1(\text{C=C})$  del pigmento, respectivamente. Como la recuperación de un buen espectro Raman depende en gran medida de la superficie de la muestra, la topografía irregular de las escleritas tuvo una gran influencia sobre los valores de intensidad medidos y por ello sólo se continuó con el análisis basado en la posición de las bandas.<sup>85</sup> Los resultados para la posición de las bandas 1, 2 y 3 en cada espécimen se muestra en el *Cuadro A. 6 del Anexo 4. 4*. Estas variables fueron estudiadas mediante los análisis multivariados antes utilizados, el MANOVA y el PCA.

Al igual que con los análisis de Microespectroscopía de Fluorescencia, para el caso de Microespectroscopía Raman, se tomaron espectros sobre escleritas individuales. Esto hizo que no se pudiera extraer información confiable acerca de la posición e intensidad de las bandas de los espectros tomados en escleritas muy pálidas, como en el caso de *P. firma* y *P. rubicunda*. La baja concentración de pigmento en estas muestras provocó una disminución en la razón señal-ruido y por ello muchos de estos datos no fueron tomados en cuenta dentro de los análisis estadísticos.

Para el método estadístico MANOVA se siguió el mismo protocolo utilizado en el caso del análisis de Fotografía Digital (R+G+B), sólo que en este caso las variables dependientes correspondieron a la posición de las bandas 1, 2 y 3 en  $\text{cm}^{-1}$ . Asimismo, se comprueban las tres suposiciones para realizar una MANOVA. Para evaluar la normalidad para cada variable por especie, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk.<sup>160</sup> En la mayoría de los casos, la distribución de las posiciones en cada banda tiene una distribución normal a un nivel de confianza del 95% ( $p > 0.05$ ), sin embargo, esto se incumple para *P. cairnsi* en las bandas

1 y 3, para *P. rubicunda*-blanca en la banda 2, y para *P. stenobrochis* en bandas 2 y 3, como se muestra en la *Tabla A. 1* del *Anexo 4. 4*.

A pesar de estos resultados, la normalidad multivariable se estudió para todo el conjunto de datos mediante la prueba de Mardia. De igual forma, se evaluaron la asimetría (*skewness*) y la curtosis (*kurtosis*) de cada especie por separado en términos de las variables dependientes (Bandas 1, 2 y 3) utilizando la librería de R *mvnornalTest* en el programa *RStudio*.<sup>159,161–163</sup> Así se observó cómo para la mayoría de las especies en al menos una prueba se observaron valores significativos de asimetría o curtosis (valores  $p < 0.05$ ), como se muestra en la *Tabla A. 2* del *Anexo 4. 4*. Por esta razón no se puede asegurar la normalidad multivariable, no obstante, aunque esto podría afectar su validez, se continuará con la MANOVA de manera exploratoria.<sup>157</sup>

Por su parte, para probar la homogeneidad de las covarianzas se utilizó la prueba de Box de M, que determina si las matrices de covarianza son iguales entre las variables independientes. Así se evaluaron las covarianzas de la posición de las bandas 1, 2 y 3 por medio de la herramienta BoxM del paquete de R *biotools*, con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ).<sup>159,164,165</sup> Se obtuvo un valor p de  $2.77 \times 10^{-5}$ , menor que el nivel de significancia fijado. A partir de esto, se determinó que existe evidencia suficiente para probar que las matrices de covarianza son diferentes. Al igual que el resultado de la prueba de Mardia, esto podría representar problemas para la MANOVA, sin embargo, se decidió seguir adelante con el método.<sup>157,165</sup> Por último, se asume la independencia de las de las observaciones con base en el método de recolección de datos, que implicó la toma de espectros sobre escleritas elegidas de manera aleatoria sobre la superficie de cada espécimen.

Los resultados del análisis multivariable se encuentran resumidos en el Cuadro A. 7 y en la *Tabla A. 3* del *Anexo 4. 4*. En las matrices SSCP por factor y por error describen la variabilidad de las Bandas 1, 2 y 3 al compararlas entre especies y la variabilidad de estas características dentro de cada especie, respectivamente. Así, a partir de la SSCP por factor se determinó que la posición entre las bandas 2 y 3 pueden presentar medias mucho más variables que la banda 1, al comparar entre especies. Ante esto, se determina que la banda 3 podría ser más útil para distinguir entre especies que la banda 1.<sup>157</sup> Por su parte, la matriz

SSCP por error indica que, las bandas 1 y 3 presentan la mayor variabilidad intraespecífica, mientras que la banda 2 se mantiene mucho menos variable. Esto quiere decir que los valores de la banda 2 son más cercanos entre sí para mediciones dentro de una misma especie.<sup>157</sup>

En todos los casos la posición de las bandas varía en mayor medida dentro de una especie respecto a la variación entre especies e hizo evidente cómo la variabilidad intraespecífica tuvo valores muy importantes respecto a la variabilidad interespecífica.<sup>157</sup> Al dividir la SSCP por error entre la SSCP por factor se obtuvieron los siguientes resultados: banda 1 (35.3), banda 2 (2.6) y banda 3 (3.2). Así, el valor elevado del cociente demuestra que la banda 1 tiene la mayor variabilidad intraespecífica y que no es compensada por su variabilidad interespecífica. Esto hace que un análisis basado en la banda 1 probablemente resulte infructuoso a la hora de distinguir entre especies. Por su parte, bandas 2 y 3 que son mayormente compensadas podrían representar una mejor opción para un análisis taxonómico, tal y como era esperado.<sup>50,54</sup>

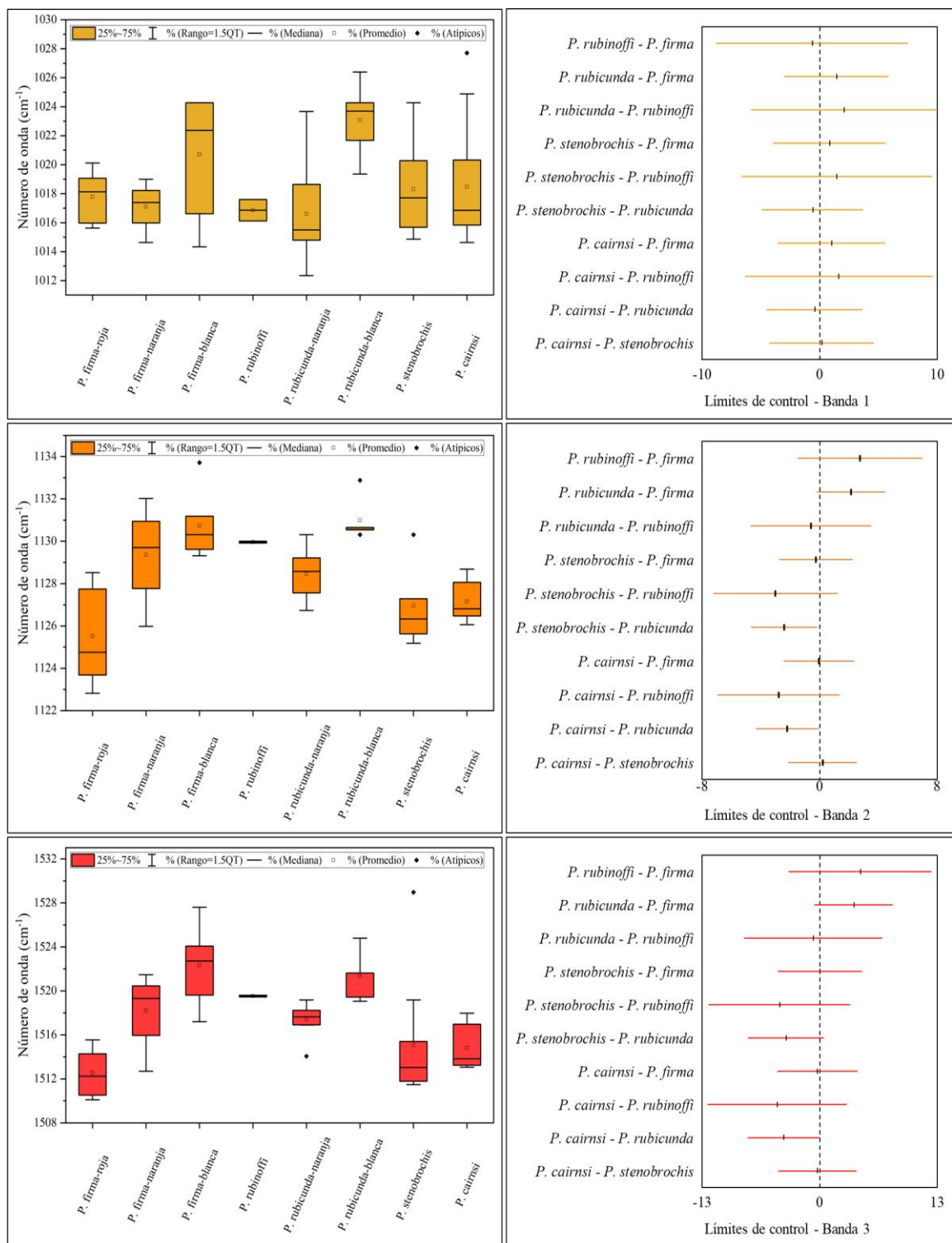
Por último, la correlación parcial entre las diferencias intraespecíficas también mostrada en el Cuadro A. 7 del *Anexo 4. 4* reflejó las correlaciones entre las características dentro de cada especie.<sup>157</sup> De esta forma se observó que todas las bandas correlacionan positivamente, sin embargo, la correlación entre las bandas 2 y 3 es mucho mayor que la correlación entre estas dos y la banda 1. Esto tiene sentido puesto que ambas bandas (2 y 3) se muestran a mayores energías en pigmentos de cadenas más largas, y lo contrario en cadenas cortas, mientras que la banda 1 es dependiente solamente de la presencia de metilaciones.<sup>136,137</sup>

Aparte, como se mostró en la *Tabla A. 3* del *Anexo 4. 4*, por medio de las pruebas de análisis multivariable de Wilk's Lambda y de Hotelling-Lawley Trace, no se encuentra evidencia de diferencias significativas entre las medias vectoriales de cada especie a un 95% de confianza. Por el contrario, la prueba de Roy's Largest Root arroja evidencias sobre la presencia de diferencias en la combinación lineal de las medias vectoriales de las variables dependientes.<sup>157</sup> Ante esto, se realizaron pruebas "*post Hoc*" para determinar la razón de la discrepancia entre dichas pruebas e identificar si existían diferencias significativas entre especies desde una perspectiva univariante.<sup>167</sup>

Mediante un enfoque gráfico, para determinar las diferencias entre especies por cada banda se utilizaron diagramas de cajas y bigotes y se aplicó la prueba de diferencia honesta significativa de Tukey (Tukey HSD). Estos resultados se presentan en el *Cuadro A. 8* del *Anexo 4. 4* y se resumen en la *Figura 4. 10*.<sup>167</sup> A través de los diagramas de cajas presentados del lado izquierdo es posible observar cómo la posición de las bandas en cada especie de coral es muy similar a las demás y en muchos de los casos el traslape es muy significativo. También es necesario destacar cómo las escleritas de diferente color en una misma especie presentan distribuciones muy distintas entre sí, como ocurre en *P. firma*. No obstante, en *P. rubicunda* sí es más fácil distinguir entre ambos colores.

Por esta razón, tanto en los análisis multivariantes como en la prueba de Tuckey HSD se utilizaron solamente los espectros de aquellas escleritas con colores saturados (rojos y naranjas). Aun así, como se observa en el lado derecho de la *Figura 4. 10* mediante esta prueba no fue posible diferenciar entre las especies de coral estudiadas. Para los únicos casos en donde esto fue posible están: *P. rubicunda* y *P. cairnsi* diferenciadas por la posición de sus bandas 2 y 3; y en *P. rubicunda* y *P. stenobrochis*, separadas solamente en la posición de su banda 3. Ante estos resultados, es que se determinó que un enfoque multivariante no es efectivo para distinguir entre las especies de coral. Asimismo, un enfoque univariante sólo es capaz de distinguir de manera efectiva entre dos parejas de especies.

Ante los resultados obtenidos mediante la prueba de Roy's Largest Root se quiso evaluar si, en efecto, mediante las combinaciones lineales de las tres variables (bandas 1, 2 y 3) era posible distinguir entre especies. Para ello se utilizó nuevamente un análisis de PCA, que, precisamente, establece dichas relaciones lineales entre la posición de las tres bandas para agrupar las muestras según su relación con los componentes principales.<sup>169</sup> El análisis se hizo de la misma forma que para la Microespectroscopía Visible-NIR y de Fluorescencia utilizando la herramienta *Principal Component Analysis* de OriginLab.<sup>158</sup> En este caso tomaron solamente 3 variables, la posición de las bandas 1, 2 y 3 y, por esta razón, sólo se pudieron determinar 3 componentes principales, mostrados en el *Cuadro A. 9* y en el diagrama de sedimentación de la *Figura A. 8* del *Anexo 4. 4*. Estos componentes explican un 73.6, 22.8 y 3.6% de los datos, respectivamente, lo que corresponde a un 100% de la variabilidad total del set de datos.



**Figura 4. 10** Diagramas de cajas e intervalos de confianza de la prueba de Tukey para el estudio de las diferencias entre la posición de las bandas 1, 2 y 3 en Microespectroscopía Raman para las especies de *Pacifigorgia*.

En la *Figura A. 9*, *Figura A. 10* y *Figura A. 11* del *Anexo 4. 4* se compararon las puntuaciones de las observaciones en los espacios coordenados PC1-PC2, PC1-PC3 y PC2-PC3, así como las cargas (*loadings*) de cada variable. Las 3 bandas poseen contribuciones positivas importantes en el PC1.<sup>169</sup> La banda 1 parece determinar la mayor variabilidad en el PC2, lo cual tiene sentido respecto a lo observado en las matrices SSCP obtenidas en el MANOVA. Sin embargo, mayor variabilidad no implica mejor separación entre especies. El PC3, en cambio, está dominado por contribuciones positiva y negativa de las bandas 2 y 3, respectivamente. A pesar de ello, al analizar estos gráficos de tipo *biplot* no es posible observar ningún tipo de distinción entre los grupos de muestras. La dispersión de los valores es alta y no permite separar por especies los datos.<sup>169</sup>

### **Microespectroscopía Infrarroja**

Para la Microespectroscopía Infrarroja se siguió el mismo esquema de análisis que para las técnicas de reflectancia en el visible-NIR y de fluorescencia, mediante un enfoque multivariable con un PCA. Los resultados no fueron favorables y no fue posible distinguir entre las distintas agrupaciones de corales. Para determinar esto, se manejaron distintos tipos de pretratamiento de datos seguidos del mismo análisis estadístico, en búsqueda de la mejor manera de tratar los resultados obtenidos.

En primer lugar, se utilizó el espectro IR completo (de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), con una normalización basada en el punto mínimo, cuyo set de datos es mostrado en la *Figura A. 12 a)* del *Anexo 4. 5*. Ante los resultados desfavorables del análisis estadístico, se determinó que este tratamiento no era ideal. Por ello, se buscó normalizar los datos respecto a una banda asignada a uno de los componentes principales de la esclerita que sirviera como punto de partida para el análisis de las posibles señales producidas por el pigmento u otros componentes orgánicos. De acuerdo con esto, se eligió la banda del carbonato a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la calcita, el componente mayoritario de la esclerita (~98%).

Como se puede verificar en la *Figura A. 12 b)* del *Anexo 4. 5*, a nivel espectroscópico se pueden observar diferencias importantes a ~1500  $\text{cm}^{-1}$  y a 3300  $\text{cm}^{-1}$ , no obstante, no se aprecia ninguna tendencia determinada por la especie en estas zonas de variación. Como la señal a mayor número de onda está relacionada con la presencia de moléculas con grupos

-OH, incluida el agua, se infiere que el contenido de agua en la muestra podría estar generando dicha variación.<sup>84</sup> Por lo tanto, se desestimó la importancia de esta zona en el espectro y se decidió continuar con el análisis en la zona de 900 a 1900  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente con la “huella digital” de las muestras.<sup>84</sup> El set de datos correspondiente a este rango normalizado a 1800  $\text{cm}^{-1}$  se puede encontrar en la *Figura A. 13* del *Anexo 4. 5*.

A partir de esta información se realizó el análisis estadístico mediante PCA. Se calcularon los componentes principales (*Cuadro A. 10* del *Anexo 4. 5*). Mediante el gráfico de sedimentación (*Figura A. 14* del *Anexo 4. 5*) se determinó que los componentes 1, 2, 3 y 4 son los que tenían mayor peso en la variabilidad de los resultados. Mediante los gráficos de cargas de los cuatro componentes se puede observar aquellas regiones espectrales con mayor o menor influencia en cada componente. En el PC1, la región de 1800-1900  $\text{cm}^{-1}$  presenta la mayor fuente de variabilidad.

PC2 y PC4 poseen el mayor peso alrededor de los 1550-1650  $\text{cm}^{-1}$  con contribuciones positiva y negativa, respectivamente. Mientras tanto, el PC3 toma en cuenta la transmitancia de forma homogénea de los 900 a los 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Las variaciones del PC2 y PC4 probablemente están dadas por variaciones en el contenido proteico de la zona analizada en cada esclerita, al correlacionar con la posición de la banda de la amida I, presente en los aminoácidos.<sup>65,122</sup> En los otros casos no se encuentran razones individuales para el origen de la variabilidad observada.

A pesar de los análisis realizados, mediante ninguno de los componentes principales o la combinación de ellos es posible distinguir entre las diferentes especies de coral estudiadas (*Figura A. 16-21*, del *Anexo 4. 5*). Este resultado no es de extrañar puesto que, como se había descrito en el capítulo anterior, en la espectroscopía IR no se destacaba ninguna banda característica para el pigmento. Por esta razón, si se parte de la hipótesis que las diferentes especies de coral se distinguen por sus pigmentos, no sería posible observar ninguna diferencia por medio de una técnica que no es sensible a los mismos. En el caso de la espectroscopía IR, esta técnica es adecuada para el estudio del pigmento, sin embargo, la presencia de una matriz con cantidades muy superiores de calcita y materia orgánica hacen que las bandas de los pigmentos se vean ensombrecidas por las de la matriz.

## **Técnicas de análisis cuantitativo no evaluadas**

Por último, se presentan las técnicas de análisis que arrojan resultados cuantitativos pero que por su naturaleza no son útiles para distinguir entre especies y por tanto no fueron evaluadas mediante análisis estadísticos. Dentro de ellas se encuentran la microscopía electrónica de barrido, la difracción de rayos X en polvos y la microtomografía computarizada de rayos X.

### **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

A partir de las micrografías SEM es posible obtener información acerca de la morfología y el tamaño de las escleritas en cada muestra. A pesar de ello, este enfoque ya fue ampliamente utilizado por otros autores en el pasado y no aporta información nueva en cuanto a caracteres taxonómicos en *Pacifigorgia*.<sup>16,18</sup> Por esta razón, no se siguió un enfoque cuantitativo en el análisis de resultados de SEM y esta técnica se utilizó solamente para cumplir con el primer objetivo del proyecto y completar la caracterización estructural de las escleritas a pequeña escala y con altas magnificaciones, como se presentó en el Capítulo III.

La microscopía electrónica de barrido se puede acoplar a otras técnicas de caracterización cuantitativas o semicuantitativas, como la espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDX).<sup>171,172</sup> No obstante, dado el gran volumen de muestras y el corto tiempo de medición disponible en las facilidades del CINaM durante la pasantía, se priorizó la caracterización estructural sobre la caracterización elemental. Además, basado en la baja resolución de un SEM-EDS y en los resultados previos de p-XRD y espectroscopía IR que indicaron composiciones químicas muy similares entre especies, se desestimó la importancia de una caracterización elemental de las muestras por medio de EDX.

Para hacer un análisis de calidad que podría ser utilizado como carácter taxonómico, se requiere de un análisis elemental mucho más avanzado por medio técnicas más sensibles como Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS). Esta técnica ya ha sido utilizada para distinguir diferentes proporciones de elementos traza entre distintas las especies de coral y corales de la misma especie provenientes de diferentes lugares del mundo.<sup>150</sup>

### **Difracción de rayos X en polvos**

Como se describió anteriormente, la difracción de rayos X en polvos ofrece información sobre la matriz mineral de las escleritas y no ofrece ningún tipo de información sobre el pigmento. Como las fases cristalinas presentes en las diferentes especies son las mismas, es inefectivo el uso de esta información para hacer distinciones interespecíficas. La única diferencia significativa que se pudo observar fue la proporción relativa de vaterita respecto a la calcita. Como se mostró en la *Figura 3. 22.*, esta fue mucho mayor para *P. stenobrochis* y *P. cairnsi* (3-5%), mientras que, para las demás especies la proporción de vaterita es tan pequeña que no fue posible determinar su valor.

Por su parte, los resultados obtenidos a partir del cálculo del volumen de celda de la calcita magnésica podrían arrojar diferencias interespecíficas engañosas. Esto se debe a que los parámetros de la celdilla unidad en este tipo de minerales de origen biológico suelen ser muy variables debido a una serie de factores que actúan en conjunto. Ejemplos de ello pueden ser la proporción de Mg o  $\text{SO}_4^{2-}$  que sustituyen al  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{CO}_3^{2-}$  en la celda, a la sustitución por otros metales de mayor radio atómico u otros aniones, o a la cantidad de materia orgánica intracristalina presente o de fases amorfas.<sup>43,150,173</sup> El análisis del conjunto de estas variables estudiadas por medio de difractogramas resultarían en un análisis taxonómico innecesariamente complejo y probablemente infructífero.

### **Microtomografía computarizada de rayos X**

La microtomografía computarizada de rayos X es una herramienta con excelente desempeño para el estudio morfológico de las especies de coral, con capacidad de ofrecer medidas tridimensionales precisas de diferentes estructuras en los especímenes. A pesar de esto, la parametrización de la morfología de los octocorales estudiados ya ha sido reportada y no representa un nuevo carácter taxonómico.<sup>16,18</sup> Asimismo, se debe tener clara la relación inversa que existe entre el tamaño muestral y los detalles que se pueden observar. A mayores resoluciones, el volumen de muestra estudiado debe ser más pequeño, los tiempos de medición se incrementan y el volumen de muestras que se pueden estudiar por jornada de trabajo es menor.<sup>100</sup> Además, el costo, la logística involucrada, la complejidad del análisis de

resultados y las facilidades necesarias para el uso de esta técnica no justifican su implementación en identificaciones de rutina.

De acuerdo con esto, en el contexto de esta investigación, esta técnica fue utilizada de manera exploratoria aprovechando las facilidades disponibles durante mi pasantía en Synchrotron SOLEIL. Por esta razón, no se aplicó ningún análisis estadístico con fines taxonómicos a los resultados obtenidos. Así, el análisis de los resultados de esta técnica se limitó al estudio estructural de las escleritas en las ramas de los especímenes, llenando la brecha entre la nano y la microescala en tres dimensiones.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Mediante el estudio de las escleritas de octocoral con diversas técnicas fue posible caracterizar tanto la matriz orgánica como la matriz inorgánica que las compone, desde la escala molecular hasta una escala macroscópica. De esta forma, se exploraron a fondo aquellas características fisicoquímicas asociadas a las escleritas de los octocorales del género *Pacifigorgia*, con el potencial de postularse como base para una posible clasificación taxonómica.

De acuerdo con esto, se determinó que las escleritas del género *Pacifigorgia* están conformadas principalmente por una matriz inorgánica a base de calcita magnésica ( $\text{Ca}_{0.84}\text{Mg}_{0.16}\text{CO}_3$ ), con la presencia de una pequeña fracción de la fase vaterita, principalmente en *P. stenobrochis* y *P. cairnsi*. En menor proporción, se encuentra la matriz orgánica, para la cual se comprobó su composición a base de pigmentos orgánicos, oligosacáridos y proteínas ácidas con residuos como ácido glutámico y aspártico.

El análisis estructural de las escleritas refleja su composición mesocristalina. Se identificaron columnas de calcita de tamaño micrométrico ( $0.2 \times 2 \mu\text{m}$ ), construidas a base de gránulos de calcita cristalina de tamaño nanométrico organizados en una estructura tridimensional mesocristalina. Asimismo, se pudo observar cómo la morfología de las unidades submicrométricas determina la morfología de la pieza microscópica, lo cual sugiere una posible relación entre la morfología de las escleritas y su formación cristalina. A mayor escala, la microtomografía computarizada de rayos-X con radiación de sincrotrón se destaca como una técnica ideal para el estudio morfológico de las ramas de coral. Mediante esta, es posible distinguir entre las estructuras mineralizadas y los tejidos de los octocorales con un alto nivel de resolución.

El análisis cromático de las fotografías digitales en el espacio de color RGB fue útil para obtener información cuantitativa y cualitativa sobre el color y la estructura de las muestras. Los colores en los octocorales tienen alta intensidad en los canales rojo y verde, resultando en tonalidades anaranjadas. Además, por medio del análisis de los histogramas de

color, se pudieron determinar los valores de intensidad media y moda de los canales R, G y B. Así, se pudo establecer una paleta de colores basada en las modas de intensidad que parece representar el color de una manera fiel a lo observado a simple vista.

El color de un octocoral seco con sus pólipos retraídos está determinado por la tonalidad y la distribución de las escleritas en la capa más externa del cenénquime. Si bien es cierto existen especies con escleritas de colores homogéneos como *P. rubinoffi*, *P. cairnsi* y *P. stenobrochis*, especies como *P. firma* y *P. rubicunda* utilizan una estrategia de color que asemeja a los píxeles de una pantalla digital. En estas especies, la combinación de escleritas de diferente tonalidad (rojas, naranjas o pálidas/blancas), es la que determina el color de la superficie del coral.

Mediante técnicas como Microespectroscopía Visible-NIR y de Fluorescencia se estudió el comportamiento de los pigmentos incluidos en la calcita bajo la luz desde los 275 hasta los 1025 nm. Así se determina que las escleritas son estructuras coloreadas que reflejan de un 60 a un 70% de la radiación electromagnética a partir de los 650 nm hasta los 1025 nm, mientras que pueden absorber hasta un 90% de la luz alrededor de los 500 nm.

Por su parte, las escleritas excitadas en el rango del UV fluorescen en tres rangos principales dependiendo de su coloración, concentración y el entorno químico de los pigmentos. La banda de emisión a 330 nm corresponde a la autofluorescencia de los residuos aromáticos presentes en las proteínas de las escleritas. La banda a 400 nm corresponde a la presencia de centros fluorescentes generados en la calcita, mientras que las bandas de 420 a 500 nm están relacionadas con la presencia del pigmento. No obstante, en muchos de los casos, el mismo pigmento absorbe gran parte de la fluorescencia que produce a menores energías.

Se concluye que los pigmentos que dan color a las escleritas pertenecen a la familia de los polienales parcialmente metilados, como fue demostrado por medio de la Microespectroscopía Raman. A pesar de ello, no fue posible determinar la estructura molecular exacta de dichos pigmentos. Se calculó que los polienales podrían tener cadenas poliénicas con 10 u 11 enlaces dobles conjugados, cuyo color aparente depende de la longitud

de la cadena. De esta forma cadenas más largas adquieren tonos más rojizos mientras que cadenas más cortas, colores más anaranjados.

Con base en los resultados obtenidos se cree que la combinación de pigmentos muy similares con sutiles diferencias estructurales es la que genera la tonalidad específica de cada esclerita. Sumado a esto, la concentración de dichos pigmentos en la matriz mineral del coral es la que determina la saturación del color observado. Aparte, el acoplamiento de técnicas como la microscopía SGH y la 2PEF, permitió demostrar que las moléculas de pigmento presentan un alto grado de ordenamiento intermolecular, dispuestas a lo largo de dominios en lo que siguen una sola dirección dentro de la esclerita. Por esta razón, se sugieren que las proteínas o los iones  $\text{Ca}^{2+}$  de la calcita podrían estar interactuando con los pigmentos y determinar así su orientación a medida que son incorporados en la estructura.

Desde una perspectiva de análisis cualitativo, la microscopía de luz visible ha demostrado ser una técnica útil para caracterizar la forma y coloración de las escleritas de los octocorales. Además, permite estudiar la proporción y distribución aproximada de las escleritas de distintos colores sobre la superficie de las ramas de corales como *P. firma* y *P. rubicunda*, lo cual se suma como un carácter con utilidad taxonómica. A pesar de esto, a falta de un método de calibración para la captura de las microfotografías es difícil obtener información cuantitativa acerca del color observado, como se hizo en el análisis cromático de las fotografías digitales.

Al igual que con la microscopía de luz visible, la microscopía de fluorescencia es útil para distinguir diferencias cualitativas entre las especies de coral. Con base en la combinación de los 4 canales con intensidades y LUTs distintos, se obtienen imágenes compuestas con tonalidades características según la especie de coral. De esta manera, tanto el color como la homogeneidad de tonos dentro de las imágenes de fluorescencia de cada muestra son lo que distingue a una especie de otra.

A partir de los análisis estadísticos multivariable realizados (MANOVA) se determinó que el análisis cromático de fotografías digitales en el espacio de color RGB es una técnica capaz de diferenciar las especies estudiadas entre sí. Asimismo, los resultados obtenidos a partir del PCA, la Microespectroscopía Visible-NIR se postula como la segunda

mejor técnica de diferenciación dentro de las metodologías estudiadas. Por su parte, aunque la Microespectroscopía de Fluorescencia no fue efectiva para distinguir entre las especies de octocorales, con base en los resultados obtenidos se cree que las técnicas de fluorescencia tienen el potencial de ser utilizados como un carácter taxonómico. Por esta razón, se propone que estas técnicas podrían ser utilizadas como nuevos caracteres taxonómicos, con el fin de que se usen al lado de las caracterizaciones ya implementadas.

A pesar de haber sido analizadas a profundidad, las técnicas de Microespectroscopía Raman e Infrarrojo fueron inefectivas a la hora de diferenciar entre las especies del género *Pacifigorgia*. Por otra parte, se determinó que las técnicas por medio de las cuales se obtienen resultados cuantitativos como SEM y difracción de rayos-X en polvos, por su naturaleza no son útiles para distinguir entre especies de coral y no fueron evaluadas mediante análisis estadísticos. No obstante, con base en la caracterización sistemática de las escleritas de los octocorales mediante cada técnica utilizada, fue posible elaborar un catálogo que contiene la información fisicoquímica de las especies de octocorales del género *Pacifigorgia* que fueron estudiadas.

Más allá de los objetivos planteados, a partir de esta investigación surgen tres ideas de corte más reflexivo que parten de lo observado a lo largo de toda la investigación. En primer lugar, la conceptualización del color cambia según la escala con la que se lo mire y puede tener significados muy distintos según la pregunta que el investigador se hace. A una escala molecular, el color se puede entender como una combinación de polienales de distinta estructura que, a partir de su interacción con la luz, producen color. Al irse a la escala nanoscópica, el color puede provenir del ordenamiento congruente de estas moléculas de pigmento, por interacción con ellas mismas o la matriz orgánica o inorgánica. A una escala microscópica, este color se puede ver como variaciones en la concentración de pigmentos en una esclerita o bien como la distribución de escleritas de distintos colores en la superficie de las ramas. A escala macroscópica, el color es ese que puede ser observado por nosotros y los demás organismos que viven junto a estas colonias. El color puede ser percibido de muchas maneras y por varios agentes, arrojando aún más preguntas sobre su razón de ser en estos ecosistemas.

En segundo lugar, este es un proyecto interdisciplinar, razón por la cual es posible alcanzar distintos niveles de comprensión según el interés del investigador y la profundidad a la que este quiera llegar. Partiendo de la escala más básica, composición e interacciones fisicoquímicas, estos sistemas nos plantean innumerables preguntas que, desde la química y la física, son de gran importancia responder. El origen, la interacción y el balance entre los componentes de esta matriz tan compleja han sido parámetros ampliamente optimizados a través de millones de años de evolución. Desde una perspectiva más biológica, el origen y la función de estas estructuras pigmentadas en los octocorales sigue siendo motivo de debate. Investigaciones como esta permiten plantear algunas hipótesis que buscan dar respuesta a dichas interrogantes.

Por último, durante el planteamiento de este proyecto y desde mi formación como químico, esperaba que aquellas técnicas más complejas fueran las más útiles para identificar diferencias ocultas a la vista que se pudieran presentar como nuevos caracteres taxonómicos. No obstante, lo resultante fue muy distinto a las hipótesis planteadas inicialmente. Las muestras están dotadas de una complejidad tal que, a pesar de tener una composición química muy similar, son capaces de mostrar una gama de colores muy variada entre especies, entre especímenes de una misma especie y hasta en escleritas de una misma colonia. A partir de esto, técnicas más complejas resultaron ser poco efectivas para captar estas diferencias, mientras que las técnicas más sencillas como un análisis de fotografías digitales fueron mucho más capaces de captar estos detalles.

## Recomendaciones

La fotografía digital permitió extraer información del color de cada especie que podría ser utilizada para elaborar materiales de referencia y apoyar al proceso de identificación de una especie. Sin embargo, para el estudio de nuevas especies se sugiere llevar a cabo los análisis de color sobre fotografías de muestras individuales, lo cual simplifica el tratamiento de datos. Asimismo, es importante tener en cuenta la variabilidad intraespecífica del color en *Pacifigorgia* y, por ello, se recomienda el uso de una paleta de colores de referencia con rangos tonales y no utilizar un solo tono como referencia. De tal manera, para representar el color de una especie se pueden utilizar los valores de intensidad moda y media. Aparte de esto, también sería meritorio explorar el uso de los análisis cromáticos de fotografías tomadas bajo el agua (en el campo) y determinar si la calibración del color en las imágenes es capaz de corregir las condiciones de iluminación cerca del fondo marino.

Obtener información acerca de los espectros de fluorescencia entre los 400 y 510 nm es complejo gracias a que la absorción de los pigmentos es fuerte en este rango. Ante esto se propone el uso de longitudes de onda de excitación de menor energía para estudiar específicamente el pigmento en futuras investigaciones y realizar las mediciones sobre aquellas escleritas cuyo color sea apreciable mas no intenso, o bien, en zonas de la esclerita con baja pigmentación.

A partir de las diferencias observadas entre las especies por medio de microscopía de fluorescencia se propone realizar un análisis similar para futuros proyectos con un set de datos mayor. Para esto se deberá tomar en cuenta que estos resultados fueron recuperados por medio de excitación con radiación de sincrotrón a 275 nm. Por esta razón, será necesario evaluar si una técnica de microscopía de fluorescencia de laboratorio es capaz de ofrecer información similar a la recuperada con una técnica con radiación de sincrotrón. De esta forma, si el uso de una técnica de laboratorio ofrece buenos resultados, valdría la pena utilizar la emisión de fluorescencia de las escleritas como un nuevo carácter taxonómico. Por el contrario, si se requiere de un sincrotrón para obtener una buena calidad de resultados, esta no representaría una solución práctica para identificaciones de rutina.

Si bien es cierto, la caracterización fisicoquímica de escleritas individuales conlleva a resultados con mejor calidad, para el análisis estadístico de mediciones espectroscópicas con carácter taxonómico, se sugiere un enfoque similar al utilizado en la microespectroscopía Visible-NIR. Esto implica capturar espectros en la superficie del coral o en pequeños grupos de escleritas aisladas. De este modo, se ponderarían las anomalías causadas por variaciones en la composición de las escleritas y la presencia de efectos ópticos como la dispersión de la luz, que dependen de la morfología y el tamaño. Así, se espera recuperar espectros que representen la contribución de diversas morfologías, colores y tamaños de esclerita de cada espécimen, permitiendo su uso como un nuevo carácter taxonómico.

Si se desea hacer un análisis elemental de calidad que podría ser utilizado como carácter taxonómico, se requiere de técnicas mucho más avanzadas y de mayor sensibilidad, como es el caso de la Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS). Por otra parte, si se quieren identificar y cuantificar las especies orgánicas o los pigmentos presentes dentro de la esclerita es posible utilizar técnicas cromatográficas acopladas a espectroscopía de masas. No obstante, se sugiere evitar aquellas metodologías que involucren pasos previos de extracción, puesto que se requiere de un gran volumen de muestra que implicaría la destrucción de grandes porciones de los especímenes. Por esta razón, se recomienda el uso de equipos que permitan un muestreo *in situ*, por ejemplo, mediante el uso de técnicas como la ablación láser.

Por último, los resultados obtenidos a través de esta investigación demuestran que la caracterización fisicoquímica de las escleritas de octocorales puede ser efectiva como método de clasificación taxonómica. Ante esto, se recomienda ampliar los alcances de esta investigación a otras especies de *Pacifigorgia* y a otros géneros, para que se expanda el catálogo de caracteres fisicoquímicos en octocorales.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Grasshoff; Bargibant; Georges. *Coral Reef Gorgonians of New Caledonia*; IRD: Paris, 2001.
- (2) Bayer, F. M. A Revision of the Nomenclature of the Gorgoniidae (Coelenterata: Octocorallia), with an Illustrated Key to the Genera. *Journal of the Washington Academy of Sciences* **1951**, *41*, 91–102.
- (3) El-Bawab, F. Phylum Cnidaria. In *Invertebrate Embryology and Reproduction*; Elsevier, 2020; pp 172–306. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814114-4.00005-9>.
- (4) Conci, N. Molecular Biomineralization of Octocoral Skeletons: Calcite versus Aragonite, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2020.
- (5) Alderslade, P. Six New Genera and Six New Species of Soft Coral, and Some Proposed Familial and Subfamilial Changes within the Alcyonacea (Coelenterata: Octocorallia). *Bulletin of the Biological Society of Washington*. 2001, pp 15–65.
- (6) Tentori, E.; Van Ofwegen, L. P. Patterns of Distribution of Calcite Crystals in Soft Corals Sclerites. *J Morphol* **2011**, *272* (5), 614–628. <https://doi.org/10.1002/jmor.10942>.
- (7) Aharonovich, D.; Benayahu, Y. Microstructure of Octocoral Sclerites for Diagnosis of Taxonomic Features. *Marine Biodiversity* **2012**, *42* (2), 173–177. <https://doi.org/10.1007/s12526-011-0102-3>.
- (8) Alderslade, P. Four New Genera of Soft Corals ( Coelenterata : Octocorallia ), with Notes on the Classification of Some Established Taxa. *Zoologische Mededelingen* **2000**, *74* (January 2000), 237–244.

- (9) Cuif, J.-P. The Cnidaria, Past, Present and Future; Goffredo, S., Dubinsky, Z., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 163–179. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4>.
- (10) Bayer, F. M. Key to the Genera of Octocorallia Exclusive of Pennatulacea (Coelenterata: Anthozoa), with Diagnoses of New Taxa. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 1981, pp 902–947.
- (11) Breedy, O.; Guzmán, H. M. A Revision Of The Genus *Pacifigorgia* (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* **2002**, *115* (4), 782–839.
- (12) Bayer, F. M. *The Shallow-Water Octocorallia of the West Indian Region*; Smithsonian Institution: Washington, 1961.
- (13) Breedy, O.; Cortés, J. Gorgonias (Octocorallia: Gorgoniidae) de Las Aguas Someras Del Pacífico Norte de Costa Rica. *Rev Biol Trop* **2015**, *62* (4), 43. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i4.20032>.
- (14) Vargas, S.; Breedy, O.; Guzman, H. M. The Phylogeny of *Pacifigorgia* (Coelenterata, Octocorallia, Gorgoniidae): A Case Study of the Use of Continuous Characters in the Systematics of the Octocorallia. *Zoosystema* **2010**, *32* (1), 5–18. <https://doi.org/10.5252/z2010n1a1>.
- (15) Soler-Hurtado, M. del M.; Machordom, A.; Muñoz, J.; López-González, P. J. New Records of the Genera *Leptogorgia*, *Pacifigorgia* and *Eugorgia* (Octocorallia: Gorgoniidae) from Ecuador, with a Description of a New Species. *Sci Mar* **2016**, *80* (3), 369–394. <https://doi.org/10.3989/scimar.04392.14A>.
- (16) BREEDY, O.; GUZMAN, H. M. *Octocorals from Costa Rica: The Genus Pacifigorgia (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae)*; 2003; Vol. 281. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.281.1.1>.

- (17) Wehrtmann, I. S. *Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America*; 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8278-8>.
- (18) Breedy, O.; Guzmán, H. M. A New Species of *Pacifigorgia* (Coelenterata: Octocorallia: Gorgo-Niidae) from Panamá. *Zootaxa* **2003**, *128*, 1–10.
- (19) Vargas, S.; Guzman, H. M.; Breedy, O. Distribution Patterns of the Genus *Pacifigorgia* (Octocorallia: Gorgoniidae): Track Compatibility Analysis and Parsimony Analysis of Endemicity. *J Biogeogr* **2008**, *35* (2), 241–247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01810.x>.
- (20) Guzman, H. M.; Guevara, C. A.; Breedy, O. Distribution, Diversity, and Conservation of Coral Reefs and Coral Communities in the Largest Marine Protected Area of Pacific Panama (Coiba Island). *Environ Conserv* **2004**, *31* (2), 111–121. <https://doi.org/10.1017/S0376892904001250>.
- (21) Williams, G. C.; Breedy, O. The Panamic Gorgonian Genus *Pacifigorgia* (Octocorallia: Gorgoniidae) in the Galápagos Archipelago, with Descriptions of Three New Species. *Proceedings of the California Academy of Sciences* **2004**, *55* (3), 55–88.
- (22) BREEDY, O.; GUZMAN, H. M. New Species of the Gorgonian Genus *Pacifigorgia* (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae) from Pacific Panama. *Zootaxa* **2004**, *541* (1), 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.541.1.1>.
- (23) Breedy, O. A New Species of *Pacifigorgia* from the Eastern Pacific (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae). *Bull Biol Soc Wash* **2001**, *10*, 181–187.
- (24) Guzman, H. M.; Breedy, O. *Pacifigorgia* *Marviva* (Anthozoa: Octocorallia) a New Species from Coiba National Park, Pacific Panama. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **2012**, *92* (4), 693–698. <https://doi.org/10.1017/S0025315411000373>.

- (25) Breedy, O.; Cortés, J. Octocorals (Coelenterata: Anthozoa: Octocorallia) of Isla Del Coco, Costa Rica. *Rev Biol Trop* **2008**, *56* (Suppl. 2), 71–77.
- (26) Breedy, O.; Williams, G. C.; Guzman, H. M. Two New Species of Gorgonian Octocorals from the Tropical Eastern Pacific Biogeographic Region (Cnidaria, Anthozoa, Gorgoniidae). *Zookeys* **2013**, *350*, 75–90. <https://doi.org/10.3897/zookeys.350.6117>.
- (27) Breedy, O.; Guzman, H. M. A New Species of Leptogorgia (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae) from the Shallow Waters of the Eastern Pacific. *Zootaxa* **2005**, *899* (1), 1–11. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.899.1.1>.
- (28) BREEDY, O.; GUZMAN, H. M. A Revision of the Genus Leptogorgia Milne Edwards & Haime, 1857 (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae) in the Eastern Pacific. *Zootaxa* **2007**, *1419* (1), 1–90. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1419.1.1>.
- (29) Guzman, H. M.; Breedy, O. Leptogorgia Christiae (Octocorallia: Gorgoniidae) a New Shallow Water Gorgonian from Pacific Panama. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **2008**, *88* (4), 719–722. <https://doi.org/10.1017/S0025315408001240>.
- (30) Breedy, O.; Guzman, H. M. Leptogorgia Ignita, a New Shallow-Water Coral Species (Octocorallia: Gorgoniidae) from the Tropical Eastern Pacific. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **2008**, *88* (5), 893–899. <https://doi.org/10.1017/S0025315408001902>.
- (31) Breedy, O.; Cortés, J. Morphology and Taxonomy of a New Species of Leptogorgia (Cnidaria: Octocorallia: Gorgoniidae) in Cocos Island National Park, Pacific Costa Rica. *Proceedings of the Biological Society of Washington* **2011**, *124* (2), 62–69. <https://doi.org/10.2988/10-18.1>.

- (32) Breedy, O.; Guzman, H. M. A New Species of *Leptogorgia* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia) from Golfo Dulce, Pacific, Costa Rica. *Zootaxa* **2012**, *3182*, 65–68.
- (33) Breedy, O.; Abeytia, R.; Guzman, H. M. A New Species of *Leptogorgia* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia) from the Mexican Pacific Coast. *Bull Mar Sci* **2012**, *88* (2), 319–325. <https://doi.org/10.5343/bms.2011.1103>.
- (34) Breedy, O.; Guzman, H. M.; Vargas, S. A Revision of the Genus *Eugorgia* Verrill, 1868 (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae). *Zootaxa* **2009**, *1868* (2151), 1–46. <https://doi.org/10.5281/zenodo.188707>.
- (35) Breedy, O.; Guzman, H. M. A New Species of the Genus *Eugorgia* (Cnidaria: Octocorallia: Gorgoniidae) from Mesophotic Reefs in the Eastern Pacific. *Bull Mar Sci* **2013**, *89* (3), 735–743. <https://doi.org/10.5343/bms.2013.1014>.
- (36) Vargas, S.; Breedy, O.; Siles, F.; Guzman, H. M. How Many Kinds of Sclerite? Towards a Morphometric Classification of Gorgoniid Microskeletal Components. *Micron* **2010**, *41* (2), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.08.009>.
- (37) Floquet, N.; Vielzeuf, D. Ordered Misorientations and Preferential Directions of Growth in Mesocrystalline Red Coral Sclerites. *Cryst Growth Des* **2012**, *12* (10), 4805–4820. <https://doi.org/10.1021/cg300528h>.
- (38) Calvo Shadid, A.; Breedy Shadid, O. Glosario Tetralingüe de Términos Aplicados a La Morfología y Anatomía de Octocorallia (Coelenterata: Anthozoa). *Revista de Filología y Lingüística de la Universidad de Costa Rica* **2002**, *28* (2), 139. <https://doi.org/10.15517/rfl.v28i2.4493>.
- (39) Martins, D. L.; Epifanio, R. D. A. A New Germacrane Sesquiterpene from the Brazilian Endemic Gorgonian *Phyllogorgia Dilatata* Esper. *J Braz Chem Soc* **1998**, *9* (6), 586–590. <https://doi.org/10.1590/S0103-50531998000600012>.

- (40) Bandurraga, M. M.; Fenical, W. Isolation of the Muricins. Evidence of a Chemical Adaptation against Fouling in the Marine Octocoral *Muricea Fruticosa* (Gorgonacea). *Tetrahedron* **1985**, *41* (6), 1057–1065. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96473-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96473-7).
- (41) Rho, J. R.; Seo, Y.; Cho, K. W.; Song, J. I.; Shin, J. Isolation of a New Carotenoid Pigment from an Undescribed Gorgonian of the Genus *Muricella*. *Bull Korean Chem Soc* **1996**, *17* (6), 529–531.
- (42) Xu, M. W.; Hao, Y. T. A New Sesquiterpene from the South China Sea Gorgonian Coral *Subergorgia Suberosa*. *Nat Prod Res* **2016**, *30* (21), 2402–2406. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1190720>.
- (43) Floquet, N.; Vielzeuf, D.; Ferry, D.; Ricolleau, A.; Heresanu, V.; Perrin, J.; Laporte, D.; Fitch, A. N. Thermally Induced Modifications and Phase Transformations of Red Coral Mg-Calcite Skeletons from Infrared Spectroscopy and High Resolution Synchrotron Powder Diffraction Analyses. *Cryst Growth Des* **2015**, *15* (8), 3690–3706. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00291>.
- (44) Born, R.; Ehrlich, H.; Bazhenov, V.; Shapkin, N. P. Investigation of Nanoorganized Biomaterials of Marine Origin. *Arabian Journal of Chemistry* **2010**, *3* (1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.005>.
- (45) Kupka, T.; Lin, H. M.; Stobiński, L.; Chen, C. H.; Liou, W. J.; Wrzalik, R.; Flisak, Z. Experimental and Theoretical Studies on Corals. I. Toward Understanding the Origin of Color in Precious Red Corals from Raman and IR Spectroscopies and DFT Calculations. *Journal of Raman Spectroscopy* **2010**, *41* (6), 651–658. <https://doi.org/10.1002/jrs.2502>.
- (46) Chen, M.; Han, L.; Zhang, X. L.; Wang, C. Y. Cytotoxic 19-Oxygenated Steroids from the South China Sea Gorgonian, *Pacifigorgia Senta*. *Nat Prod Res* **2016**, *30* (12), 1431–1435. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1063055>.

- (47) Izac, R. R.; Poet, S. E.; Fenical, W.; Van Engen, D.; Clardy, J. The Structure of Pacifigorgiol, an Ichthyotoxic Sesquiterpenoid from the Pacific Gorgonian Coral. *Tetrahedron Lett* **1982**, *23* (37), 3743–3746. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)87695-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)87695-9).
- (48) Huynh, T. H.; Neoh, C. A.; Tsai, Y. C.; Yao, Z. K.; Zheng, L. G.; Huang, P. C.; Wen, Z. H.; Chen, J. J.; Wu, Y. J.; Sung, P. J. Briarane-Related Diterpenoids from Octocoral Briareum Stechei. *Molecules* **2021**, *26* (22). <https://doi.org/10.3390/molecules26226861>.
- (49) Maia, L. F.; Fleury, B. G.; Lages, B. G.; Creed, J. C.; De Oliveira, L. F. C. *New Strategies for Identifying Natural Products of Ecological Significance from Corals: Nondestructive Raman Spectroscopy Analysis*; Elsevier B.V., 2014; Vol. 43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00010-2>.
- (50) Maia, L. F.; De Oliveira, V. E.; Edwards, H. G. M.; De Oliveira, L. F. C. The Diversity of Linear Conjugated Polyenes and Colours in Nature: Raman Spectroscopy as a Diagnostic Tool. *ChemPhysChem* **2021**, *22* (3), 231–249. <https://doi.org/10.1002/cphc.202000818>.
- (51) Thomas, D. B.; McGoverin, C. M. The Analytical Niche for Raman Spectroscopy in Biological Pigment Research. *Spectroscopy Europe* **2016**, *28* (1), 6–9.
- (52) Maia, L. F.; Fleury, B. G.; Lages, B. G.; Barbosa, J. P.; Pinto, À. C.; Castro, H. V.; De Oliveira, V. E.; Edwards, H. G. M.; De Oliveira, L. F. C. Identification of Reddish Pigments in Octocorals by Raman Spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42* (4), 653–658. <https://doi.org/10.1002/jrs.2758>.
- (53) Fritsch, E.; Karampelas, S. Comment on: Determination of Canthaxanthin in the Red Coral (*Corallium Rubrum*) from Marseille by HPLC Combined with UV and MS Detection (Cvejic et al. *Mar Biol* 152:855-862, 2007). *Mar Biol* **2008**, *154* (5), 929–930. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-0964-5>.

- (54) Fernandes, R. F.; Maia, L. F.; Couri, M. R. C.; Costa, L. A. S.; De Oliveira, L. F. C. Raman Spectroscopy as a Tool in Differentiating Conjugated Polyenes from Synthetic and Natural Sources. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2015**, *134*, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.022>.
- (55) Maia, L. F.; De Oliveira, V. E.; Oliveira, M. E. R.; Reis, F. D.; Fleury, B. G.; Edwards, H. G. M.; De Oliveira, L. F. C. Colour Diversification in Octocorals Based on Conjugated Polyenes: A Raman Spectroscopic View. *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, *44* (4), 560–566. <https://doi.org/10.1002/jrs.4226>.
- (56) Bergamonti, L.; Bersani, D.; Csermely, D.; Lottici, P. P. The Nature of the Pigments in Corals and Pearls: A Contribution from Raman Spectroscopy. *Spectroscopy Letters* **2011**, *44* (7–8), 453–458. <https://doi.org/10.1080/00387010.2011.610399>.
- (57) Almeida, M. T. R.; Moritz, M. I. G.; Capel, K. C. C.; Pérez, C. D.; Schenkel, E. P. Chemical and Biological Aspects of Octocorals from the Brazilian Coast. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2014**, *24* (4), 446–467. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.05.002>.
- (58) Maia, L. F.; Fernandes, R. F.; Almeida, M. R.; de Oliveira, L. F. C. Rapid Assessment of Chemical Compounds from *Phyllogorgia Dilatata* Using Raman Spectroscopy. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2015**, *25* (6), 619–626. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.002>.
- (59) Leverette, C. L.; Warren, M.; Smith, M. A.; Smith, G. W. Determination of Carotenoid as the Purple Pigment in *Gorgonia Ventalina Sclerites* Using Raman Microscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2008**, *69* (3), 1058–1061. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.07.018>.
- (60) Rahman, M. A.; Halfar, J.; Shinjo, R. X-Ray Diffraction Is a Promising Tool to Characterize Coral Skeletons. *Advances in Materials Physics and Chemistry* **2013**, *03* (01), 120–125. <https://doi.org/10.4236/ampc.2013.31a015>.

- (61) Conci, N.; Vargas, S.; Wörheide, G. The Biology and Evolution of Calcite and Aragonite Mineralization in Octocorallia. *Front Ecol Evol* **2021**, *9* (February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.623774>.
- (62) Sethmann, I.; Helbig, U.; Wörheide, G. Octocoral Sclerite Ultrastructures and Experimental Approach to Underlying Biomineralisation Principles. *CrystEngComm* **2007**, *9* (12), 1262. <https://doi.org/10.1039/b711068e>.
- (63) Vielzeuf, D.; Floquet, N.; Perrin, J.; Tambutté, E.; Ricolleau, A. Crystallography of Complex Forms: The Case of Octocoral Sclerites. *Cryst Growth Des* **2017**, *17* (10), 5080–5097. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00087>.
- (64) Rahman, M. A.; Oomori, T. Structure, Crystallization and Mineral Composition of Sclerites in the Alcyonarian Coral. *J Cryst Growth* **2008**, *310* (15), 3528–3534. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2008.04.056>.
- (65) Rahman, M. A.; Oomori, T.; Wörheide, G. Calcite Formation in Soft Coral Sclerites Is Determined by a Single Reactive Extracellular Protein. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (36), 31638–31649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070185>.
- (66) Teague, J.; Megson-Smith, D. A.; Allen, M. J.; Day, J. C. C.; Scott, T. B. A Review of Current and New Optical Techniques for Coral Monitoring. *Oceans* **2022**, *3* (1), 30–45. <https://doi.org/10.3390/oceans3010003>.
- (67) Winters, G.; Holzman, R.; Blekhman, A.; Beer, S.; Loya, Y. Photographic Assessment of Coral Chlorophyll Contents: Implications for Ecophysiological Studies and Coral Monitoring. *J Exp Mar Biol Ecol* **2009**, *380* (1–2), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.09.004>.
- (68) Siebeck, U. E.; Marshall, N. J.; Klüter, A.; Hoegh-Guldberg, O. Monitoring Coral Bleaching Using a Colour Reference Card. *Coral Reefs* **2006**, *25* (3), 453–460. <https://doi.org/10.1007/s00338-006-0123-8>.

- (69) Song, H.; Mehdi, S. R.; Zhang, Y.; Shentu, Y.; Wan, Q.; Wang, W.; Raza, K.; Huang, H. Development of Coral Investigation System Based on Semantic Segmentation of Single-Channel Images. *Sensors* **2021**, *21* (5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/s21051848>.
- (70) Gleason, A. C. R.; Reid, R. P.; Voss, K. J. Automated Classification of Underwater Multispectral Imagery for Coral Reef Monitoring. In *OCEANS 2007*; IEEE, 2007; pp 1–8. <https://doi.org/10.1109/OCEANS.2007.4449394>.
- (71) Hunt, R. W. G.; Pointer, M. R. *Measuring Colour*; Wiley, 2011. <https://doi.org/10.1002/9781119975595>.
- (72) Kozminskii, E. V.; Lezin, P. A. Method of Color Measurements of the Elements of Color in Gastropods Shell. *Russ J Mar Biol* **2006**, *32* (5), 316–318. <https://doi.org/10.1134/S1063074006050105>.
- (73) ARAKI, T. The History of Optical Microscope. *Mechanical Engineering Reviews* **2017**, *4* (1), 16-00242-16–00242. <https://doi.org/10.1299/mer.16-00242>.
- (74) Masters, B. R. History of the Optical Microscope in Cell Biology and Medicine. In *Encyclopedia of Life Sciences*; Wiley, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003082>.
- (75) Madigan, M.; Bender, K.; Buckley, D.; Sttaley, M.; Stahl, D. *Brock Biology of Microorganisms*, 14th ed.; Boston, 2015; Vol. 16.
- (76) Schmidt, S. T. *Transmitted Light Microscopy of Rock-Forming Minerals*; Springer Textbooks in Earth Sciences, Geography and Environment; Springer International Publishing: Cham, 2023. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-19612-6>.
- (77) Zhou, W.; Wang, Z. L. *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*; Springer Science and Business Media LLC: New York, 2006.

- (78) Swofford, R. L.; Albrecht, A. C. Nonlinear Spectroscopy. *Annu Rev Phys Chem* **1978**, *29* (1), 421–440. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.29.100178.002225>.
- (79) Chen, X.; Nadiarynk, O.; Plotnikov, S.; Campagnola, P. J. Second Harmonic Generation Microscopy for Quantitative Analysis of Collagen Fibrillar Structure. *Nat Protoc* **2012**, *7* (4), 654–669. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.009>.
- (80) Aghigh, A.; Bancelin, S.; Rivard, M.; Pinsard, M.; Ibrahim, H.; Légaré, F. Second Harmonic Generation Microscopy: A Powerful Tool for Bio-Imaging. *Biophys Rev* **2023**, *15* (1), 43–70. <https://doi.org/10.1007/s12551-022-01041-6>.
- (81) Obeidy, P.; Tong, P. L.; Weninger, W. Research Techniques Made Simple: Two-Photon Intravital Imaging of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2018**, *138* (4), 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.01.017>.
- (82) Tissue, B. M. Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy. In *Characterization of Materials*; Wiley, 2012; pp 1–13. <https://doi.org/10.1002/0471266965.com059.pub2>.
- (83) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*, 7th ed.; Cengage Learning, 2017.
- (84) Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Analytical Techniques in the Sciences; Wiley, 2004; Vol. 8. <https://doi.org/10.1002/0470011149>.
- (85) McCreery, R. L. Raman Spectroscopy for Chemical Analysis. *Meas Sci Technol* **2001**, *12* (5), 653–654. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/12/5/704>.
- (86) Rossi, B.; Bottari, C.; Catalini, S.; D'Amico, F.; Gessini, A.; Masciovecchio, C. Synchrotron-Based Ultraviolet Resonance Raman Scattering for Material Science. In *Molecular and Laser Spectroscopy*; Elsevier, 2020; pp 447–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818870-5.00013-7>.

- (87) Tilley, R. Diffraction and Crystal Structures. In *Crystals and Crystal Structures*; John Wiley & Sons, Ltd: Sussex, 2006; pp 113–154.
- (88) Ladd, M.; Palmer, R. *Structure Determination by X-Ray Crystallography*; Springer US: Boston, MA, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3954-7>.
- (89) Waseda, Y.; Matsubara, E.; Shinoda, K. *X-Ray Diffraction Crystallography*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16635-8>.
- (90) Goñi, S. M.; Salvadori, V. O. Medición De Color De Alimentos En El Espacio Cielab a Partir De Imágenes. *3ras Jornadas ITE - 2015 -Facultad de Ingeniería - UNLP 2015*, 526–531.
- (91) Rudolf, P. Principles and Evolution of Digital Cameras. In *Digital Heritage: Applying digital imaging to cultural heritage*; MacDonald, L., Ed.; Butterworth-Heinemann, Elsevier: London, 2006; pp 177–210.
- (92) Meyer, J.; Summersby, A. *Image sensors explained*. Canon-Europe.com. <https://www.canon-europe.com/pro/infobank/image-sensors-explained/> (accessed 2024-03-06).
- (93) Banic, N.; Koscevic, K.; Subasic, M.; Loncaric, S. The Past and the Present of the Color Checker Dataset Misuse. *International Symposium on Image and Signal Processing and Analysis, ISPA 2019, 2019-Septe*, 366–371. <https://doi.org/10.1109/ISPA.2019.8868882>.
- (94) Liñero, O.; Ciudad, M.; Arana, G.; Nguyen, C.; de Diego, A. The Use of a Standard Digital Camera as an Inexpensive, Portable, Fast and Non-Destructive Analytical Tool to Measure Colour: Estimation of the Ripening Stage of Tomatoes (*Solanum Lycopersicum*) as a Case Study. *Microchemical Journal* **2017**, *134*, 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.017>.

- (95) Synchrotron SOLEIL. *SOLEIL en 3 questions*. [synchrotron-soleil.fr. https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/propos-de-soleil/nous-connaître/quest-ce-que-soleil/soleil-en-3-questions](https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/propos-de-soleil/nous-connaître/quest-ce-que-soleil/soleil-en-3-questions) (accessed 2024-03-06).
- (96) Level, M. P.; Loulergue, A.; Pottin, B.; Tordeux, M. A. Synchrotron SOLEIL: The Electrons, and Soon the Photons. *Synchrotron Radiat News* **2006**, *19* (1), 35–40. <https://doi.org/10.1080/08940880500525119>.
- (97) Giuliani, A.; Jamme, F.; Rouam, V.; Wien, F.; Giorgetta, J. L.; Lagarde, B.; Chubar, O.; Bac, S.; Yao, I.; Rey, S.; Herbeaux, C.; Marlats, J. L.; Zerbib, D.; Polack, F.; Réfrégiers, M. DISCO: A Low-Energy Multipurpose Beamline at Synchrotron SOLEIL. *J Synchrotron Radiat* **2009**, *16* (6), 835–841. <https://doi.org/10.1107/S0909049509034049>.
- (98) Lichtman, J. W.; Conchello, J. A. Fluorescence Microscopy. *Nat Methods* **2005**, *2* (12), 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>.
- (99) Sanderson, M. J.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M. D. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* **2014**, *2014* (10), 1042–1065. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>.
- (100) Weitkamp, T.; Scheel, M.; Perrin, J.; Daniel, G.; King, A.; Le Roux, V.; Giorgetta, J. L.; Carcy, A.; Langlois, F.; Desjardins, K.; Meneglier, C.; Cerato, M.; Engblom, C.; Cauchon, G.; Moreno, T.; Rivard, C.; Gohon, Y.; Polack, F. Microtomography on the ANATOMIX Beamline at Synchrotron SOLEIL. *J Phys Conf Ser* **2022**, *2380* (1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2380/1/012122>.
- (101) Landis, E. N.; Keane, D. T. X-Ray Microtomography. *Mater Charact* **2010**, *61* (12), 1305–1316. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2010.09.012>.
- (102) Mizutani, R.; Suzuki, Y. X-Ray Microtomography in Biology. *Micron* **2012**, *43* (2–3), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.10.002>.

- (103) Mirone, A.; Brun, E.; Gouillart, E.; Tafforeau, P.; Kieffer, J. The PyHST2 Hybrid Distributed Code for High Speed Tomographic Reconstruction with Iterative Reconstruction and a Priori Knowledge Capabilities. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **2014**, *324*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2013.09.030>.
- (104) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat Methods* **2012**, *9* (7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- (105) Khoo, H. K.; Ong, H. C. Generalization of Hue in the RGB Cube Space. In *2014 12th International Conference on Signal Processing (ICSP)*; IEEE, 2014; pp 631–636. <https://doi.org/10.1109/ICOSP.2014.7015080>.
- (106) García-Lamont, F.; Cervantes, J.; López-Chau, A.; Ruiz-Castilla, S. Color Image Segmentation Using Saturated RGB Colors and Decoupling the Intensity from the Hue. *Multimed Tools Appl* **2020**, *79* (1–2), 1555–1584. <https://doi.org/10.1007/s11042-019-08278-6>.
- (107) Vielzeuf, D.; Garrabou, J.; Baronnet, A.; Grauby, O.; Marschal, C. Nano to Macroscale Biomineral Architecture of Red Coral (*Corallium Rubrum*). *American Mineralogist* **2008**, *93* (11–12), 1799–1815. <https://doi.org/10.2138/am.2008.2923>.
- (108) Vielzeuf, D.; Floquet, N.; Perrin, J.; Tambutté, E.; Ricolleau, A. Crystallography of Complex Forms: The Case of Octocoral Sclerites. *Cryst Growth Des* **2017**, *17* (10), 5080–5097. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00087>.
- (109) Cölfen, H.; Antonietti, M. Mesocrystals: Inorganic Superstructures Made by Highly Parallel Crystallization and Controlled Alignment. *Angewandte Chemie*

*International Edition* **2005**, *44* (35), 5576–5591.  
<https://doi.org/10.1002/anie.200500496>.

- (110) Cölfen, H.; Mann, S. Higher-Order Organization by Mesoscale Self-Assembly and Transformation of Hybrid Nanostructures. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (21), 2350–2365.  
<https://doi.org/10.1002/anie.200200562>.
- (111) Chen, P. Y.; McKittrick, J.; Meyers, M. A.; André, M.; Meyers, M. A.; Chen, Y.; Feng, Y.; Deveaux, J. G.; Masoud, M. A.; Chandra, F. S.; Chen, H.; Zhang, D.; Feng, L. Biological Materials: Functional Adaptations and Bioinspired Designs. *Prog Mater Sci* **2012**, *57* (8), 1492–1704.  
<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.03.001>.
- (112) Skinner, H. C. W.; Jahren, A. H. Biomineralization. In *Treatise on Geochemistry*; Elsevier, 2007; pp 1–69. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/08128-7>.
- (113) Aparicio, C.; Ginebra, M.-P. *Biomineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications*, I.; Aparicio, C., Ginebra, M.-P., Eds.; Woodhead Publishig: Cambridge, UK, 2016. <https://doi.org/10.1016/c2014-0-02825-0>.
- (114) Cockcroft, J. K.; Barnes, P.; Attfield, M. P. *Bravais Lattices: Rhombohedral*. Birkbeck College, University of London.  
<http://pd.chem.ucl.ac.uk/pdnn/symm1/rhomb.htm> (accessed 2024-03-09).
- (115) Holland, T. J. B.; Redfern, S. A. T. Unit Cell Refinement from Powder Diffraction Data: The Use of Regression Diagnostics. *Mineral Mag* **1997**, *61* (404), 65–77. <https://doi.org/10.1180/minmag.1997.061.404.07>.
- (116) Stanienda, K. J. Carbonate Phases Rich in Magnesium in the Triassic Limestones of the Eastern Part of the Germanic Basin. *Carbonates Evaporites* **2016**, *31* (4), 387–405. <https://doi.org/10.1007/s13146-016-0297-2>.

- (117) Titschack, J.; Goetz-Neunhoeffler, F.; Neubauer, J. Magnesium Quantification in Calcites [(Ca, Mg)CO<sub>3</sub>] by Rietveld-Based XRD Analysis: Revisiting a Well-Established Method. *American Mineralogist* **2011**, *96* (7), 1028–1038. <https://doi.org/10.2138/am.2011.3665>.
- (118) Fahad, M.; Saeed, S. Determination and Estimation of Magnesium Content in the Single Phase Magnesium-Calcite [Ca(1-x)MgxCO<sub>3</sub>(s)] Using Electron Probe Micro-Analysis (EPMA) and X-Ray Diffraction (XRD). *Geosciences Journal* **2018**, *22* (2), 303–312. <https://doi.org/10.1007/s12303-017-0059-8>.
- (119) Pokroy, B.; Fitch, A. N.; Marin, F.; Kapon, M.; Adir, N.; Zolotoyabko, E. Anisotropic Lattice Distortions in Biogenic Calcite Induced by Intra-Crystalline Organic Molecules. *J Struct Biol* **2006**, *155* (1), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.03.008>.
- (120) Loste, E.; Wilson, R. M.; Seshadri, R.; Meldrum, F. C. The Role of Magnesium in Stabilising Amorphous Calcium Carbonate and Controlling Calcite Morphologies. *J Cryst Growth* **2003**, *254* (1–2), 206–218. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(03\)01153-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(03)01153-9).
- (121) Weir, C. E.; Lippincott, E. R. Infrared Studies of Aragonite, Calcite, and Vaterite Type Structures in the Borates, Carbonates, and Nitrates. *J Res Natl Bur Stand A Phys Chem* **1961**, *65A* (3), 173. <https://doi.org/10.6028/jres.065A.021>.
- (122) Robert M. Silverstein; Francis X. Webster; David J. Kiemle; David L. Bryce. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 8th ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2015.
- (123) Xu, B.; Hirsch, A.; Kronik, L.; Poduska, K. M. Vibrational Properties of Isotopically Enriched Materials: The Case of Calcite. *RSC Adv* **2018**, *8* (59), 33985–33992. <https://doi.org/10.1039/C8RA06608F>.

- (124) Franguelli, F. P.; Barta-Holló, B.; Petruševski, V. M.; Sajó, I. E.; Klébert, S.; Farkas, A.; Bódis, E.; Szilágyi, I. M.; Pawar, R. P.; Kótai, L. Thermal Decomposition and Spectral Characterization of Di[Carbonatotetraamminecobalt(III)] Sulfate Trihydrate and the Nature of Its Thermal Decomposition Products. *J Therm Anal Calorim* **2021**, *145* (6), 2907–2923. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09991-3>.
- (125) Effenberger, H. *Hanatshefle Lot Cbeade Kristallstruktur Und Infrarot-Absorptionsspektrum Yon Synthetischem Monohydrocalcit, CaCO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O*; 1981; Vol. 112.
- (126) Rahman, M. A.; Oomori, T.; Wörheide, G. Calcite Formation in Soft Coral Sclerites Is Determined by a Single Reactive Extracellular Protein. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (36), 31638–31649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070185>.
- (127) Watabe, N.; Kingsley, R. J. Calcification in Octocorals. In *Hard Tissue Mineralization and Demineralization*; Springer Japan: Tokyo, 1992; pp 127–147. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-68183-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-4-431-68183-0_9).
- (128) Schoberer, J.; Shin, Y.-J.; Vavra, U.; Veit, C.; Strasser, R. Analysis of Protein Glycosylation in the ER; 2018; pp 205–222. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7389-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7389-7_16).
- (129) Merlin, J. C.; Delé-Dubois, M. L. Resonance Raman Characterization of Polyacetylenic Pigments in the Calcareous Skeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **1986**, *84* (1), 97–103. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(86\)90277-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90277-4).
- (130) Barnsley, J. E.; Tay, E. J.; Gordon, K. C.; Thomas, D. B. Frequency Dispersion Reveals Chromophore Diversity and Colour-Tuning Mechanism in Parrot Feathers. *R Soc Open Sci* **2018**, *5* (7). <https://doi.org/10.1098/rsos.172010>.

- (131) Brambilla, L.; Tommasini, M.; Zerbi, G.; Stradi, R. Raman Spectroscopy of Polyconjugated Molecules with Electronic and Mechanical Confinement: The Spectrum of *Corallium Rubrum*. *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, *43* (10), 1449–1458. <https://doi.org/10.1002/jrs.4057>.
- (132) Maia, L. F.; Fernandes, R. F.; Lobo-Hajdu, G.; De Oliveira, L. F. C. Conjugated Polyenes as Chemical Probes of Life Signature: Use of Raman Spectroscopy to Differentiate Polyenic Pigments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2014**, *372* (2030). <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0200>.
- (133) Macchia, M.; Resta, V.; Quarta, G.; Calcagnile, L. Precious Coral Non-Destructive Characterization by Raman and XRF Spectroscopy. *X-Ray Spectrometry* **2016**, *45* (5), 281–287. <https://doi.org/10.1002/xrs.2703>.
- (134) McGraw, K. J.; Nogare, M. C. Distribution of Unique Red Feather Pigments in Parrots. *Biol Lett* **2005**, *1* (1), 38–43. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2004.0269>.
- (135) Stradi, R.; Pini, E.; Celentano, G. *The Chemical Structure of the Pigments in Ara Macao Plumage*; 2001; Vol. 130.
- (136) Schaffer, H. E.; Chance, R. R.; Silbey, R. J.; Knoll, K.; Schrock, R. R. Conjugation Length Dependence of Raman Scattering in a Series of Linear Polyenes: Implications for Polyacetylene. *J Chem Phys* **1991**, *94* (6), 4161–4170. <https://doi.org/10.1063/1.460649>.
- (137) HEDEGAARD, C.; BARDEAU, J.-F.; CHATEIGNER, D. MOLLUSCAN SHELL PIGMENTS: AN IN SITU RESONANCE RAMAN STUDY. *Journal of Molluscan Studies* **2006**, *72* (2), 157–162. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyi062>.
- (138) Masello, J. F.; Luján Pagnossin, M.; Lubjuhn, T.; Quillfeldt, P. *Ornamental Non-Carotenoid Red Feathers of Wild Burrowing Parrots*; 2004; Vol. 19.

- (139) Cvejic, J.; Tambutté, S.; Lotto, S.; Mikov, M.; Slacanin, I.; Allemand, D. Determination of Canthaxanthin in the Red Coral (*Corallium Rubrum*) from Marseille by HPLC Combined with UV and MS Detection. *Mar Biol* **2007**, *152* (4), 855–862. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0738-5>.
- (140) Domagalska, B. W.; Wilk, K. A.; Wysocki, S. Experimental and Theoretical Studies on Solvent Effects of Amphiphilic Conjugated Polyenals. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, *5* (4), 696–702. <https://doi.org/10.1039/b208125c>.
- (141) Domagalska, B. W.; Wilk, K. A.; Zieliński, R. Spectroscopic and Electrochemical Properties of New Amphiphilic Donor-Acceptor Conjugated Polyenes. *J Photochem Photobiol A Chem* **2006**, *184* (1–2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.04.015>.
- (142) Ros, M.; Hogenboom, M. A.; Kok, P.; Groenen, E. J. J. *Electronic Structure of Retinal and Related Polyenals in the Lowest Triplet State: An Electron Spin Echo Study*; 1992; Vol. 96.
- (143) Ros, M.; Groenen, E. J. J.; Van Hemert, M. C. The Ab Initio Calculations on the Lower Excited States of Short-Chain Polyenals. *J Am Chem Soc* **1992**, *114* (17), 6820–6827. <https://doi.org/10.1021/ja00043a030>.
- (144) Ros, M.; Groenen, E. J. J. The Triplet State of Dodecapentaenal: Electron Spin Echo Spectroscopy of a Polyenal. *Chem Phys Lett* **1989**, *154* (1), 29–33. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(89\)87432-9](https://doi.org/10.1016/0009-2614(89)87432-9).
- (145) Becker, R. S.; Das, P. K.; Kogan, G. Spectral and Photophysical Behavior of 2,4,6,8,10-Dodecapentaenal and Schiff Base: Evidence for a Low-Lying Singlet Excited State of Forbidden Character. *Chem Phys Lett* **1979**, *67* (2–3), 463–466. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(79\)85205-7](https://doi.org/10.1016/0009-2614(79)85205-7).
- (146) Adamec, F.; Greco, J. A.; Lafountain, A. M.; Magdaong, N. M.; Fuciman, M.; Birge, R. R.; Polívka, T.; Frank, H. A. Spectroscopic Investigation of a Brightly

Colored Psittacofulvin Pigment from Parrot Feathers. *Chem Phys Lett* **2016**, *648*, 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.02.029>.

- (147) Du, R.; Yang, D.; Jiang, G.; Song, Y.; Yin, X. An Approach for in Situ Rapid Detection of Deep-Sea Aromatic Amino Acids Using Laser-Induced Fluorescence. *Sensors (Switzerland)* **2020**, *20* (5). <https://doi.org/10.3390/s20051330>.
- (148) Gaft, M.; Nagli, L.; Panczer, G.; Waychunas, G.; Porat, N. The Nature of Unusual Luminescence in Natural Calcite CaCO<sub>3</sub>. *American Mineralogist* **2008**, *93* (1), 158–167. <https://doi.org/10.2138/am.2008.2576>.
- (149) Gaft, M.; Reisfeld, R.; Panczer, G. *Modern Luminescence Spectroscopy of Minerals and Materials*; Springer Mineralogy; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24765-6>.
- (150) Vielzeuf, D.; Gagnon, A. C.; Ricolleau, A.; Devidal, J. L.; Balme-Heuze, C.; Yahiaoui, N.; Fonquernie, C.; Perrin, J.; Garrabou, J.; Montel, J. M.; Floquet, N. Growth Kinetics and Distribution of Trace Elements in Precious Corals. *Front Earth Sci (Lausanne)* **2018**, *6*. <https://doi.org/10.3389/feart.2018.00167>.
- (151) Giordano, B.; Bramanti, L.; Perrin, J.; Kahramanoğulları, O.; Vielzeuf, D. Early Stages of Development in Mediterranean Red Coral (*Corallium Rubrum*): The Key Role of Sclerites. *Front Mar Sci* **2023**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1052854>.
- (152) Shoham, E.; Prohaska, T.; Barkay, Z.; Zitek, A.; Benayahu, Y. Soft Corals Form Aragonite-Precipitated Columnar Spiculite in Mesophotic Reefs. *Sci Rep* **2019**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37696-z>.
- (153) Lutz, R. W.; Pun, T.; Pellegrini, C. *COLOUR DISPLAYS AND LOOK-UP TABLES: REAL TIME MODIFICATION OF DIGITAL IMAGES*; 1991; Vol. 15.

- (154) Tran, R. J.; Sly, K. L.; Conboy, J. C. Applications of Surface Second Harmonic Generation in Biological Sensing. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2017**, *10* (1), 387–414. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041453>.
- (155) Dempsey, W. P.; Fraser, S. E.; Pantazis, P. SHG Nanoprobes: Advancing Harmonic Imaging in Biology. *BioEssays* **2012**, *34* (5), 351–360. <https://doi.org/10.1002/bies.201100106>.
- (156) Orgel, J. P. R. O.; Sella, I.; Madhurapantula, R. S.; Antipova, O.; Mandelberg, Y.; Kashman, Y.; Benayahu, D.; Benayahu, Y. Molecular and Ultrastructural Studies of a Fibrillar Collagen from Octocoral (Cnidaria). *Journal of Experimental Biology* **2017**, *220* (18), 3327–3335. <https://doi.org/10.1242/jeb.163824>.
- (157) Rencher, A. C.; Christensen, W. F. *Methods of Multivariate Analysis*; Wiley Series in Probability and Statistics; Wiley, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118391686>.
- (158) OriginLab Corporation. OriginPro. Northampton, MA, USA.
- (159) R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. 2021. <https://www.R-project.org/>.
- (160) Shapiro, S. S.; Wilk, M. B. *Biometrika Trust An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)*; 1965; Vol. 52.
- (161) Zhou, M.; Shao, Y. A Powerful Test for Multivariate Normality. *J Appl Stat* **2014**, *41* (2), 351–363. <https://doi.org/10.1080/02664763.2013.839637>.
- (162) Zhang, Y.; Zhou, M.; Shao, Y. MvnormalTest: Powerful Tests for Multivariate Normality. R package version 4.2 2020.

- (163) Mardia, K. V. *Measures of Multivariate Skewness and Kurtosis with Applications*; 1970; Vol. 57.
- (164) Da Silva, A. R. *Biotoools: Tools for Biometry and Applied Statistics in Agricultural Science*. R package version 4.2 2021. <https://cran.r-project.org/package=biotoools>.
- (165) da Silva, A. R.; Malafaia, G.; Menezes, I. P. P. *Biotoools: An R Function to Predict Spatial Gene Diversity via an Individual-Based Approach*. *Genetics and Molecular Research* **2017**, *16* (2). <https://doi.org/10.4238/gmr16029655>.
- (166) Al-Abdullatif, F. A.; Al-Abdullatif, M. A.; Brooks, G. *MANOVA Post Hoc Techniques Used in Published Articles: A Systematic Review*. *General Linear Model Journal* **2019**, *45* (1).
- (167) Howell, D. C. *Statistical Methods for Psychology*, 7th ed.; Wadsworth, Cengage Learning: Belmont, 2010.
- (168) Bacchini, R. D.; Vázquez, L. V.; Bianco, M. J.; García Fronti, J. I. *Introducción a La Probabilidad y a La Estadística*, 1era ed.; Facultad de Ciencias Económicas, Ed.; Universidad de Buenos Aires: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2018.
- (169) Abdi, H.; Williams, L. J. *Principal Component Analysis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. July 2010, pp 433–459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>.
- (170) Singh, R. K.; Singh, S. N.; Asthana, B. P.; Pathak, C. M. *Deconvolution of Lorentzian Raman Linewidth: Techniques of Polynomial Fitting and Extrapolation*. *Journal of Raman Spectroscopy* **1994**, *25* (6), 423–428. <https://doi.org/10.1002/jrs.1250250608>.
- (171) Abd Mutalib, M.; Rahman, M. A.; Othman, M. H. D.; Ismail, A. F.; Jaafar, J. *Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX)*

Spectroscopy. In *Membrane Characterization*; Elsevier Inc., 2017; pp 161–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7>.

- (172) Scimeca, M.; Bischetti, S.; Lamsira, H. K.; Bonfiglio, R.; Bonanno, E. Energy Dispersive X-Ray (EDX) Microanalysis: A Powerful Tool in Biomedical Research and Diagnosis. *European Journal of Histochemistry* **2018**, *62* (1), 89–99. <https://doi.org/10.4081/EJH.2018.2841>.
- (173) Albéric, M.; Caspi, E. N.; Bennet, M.; Ajili, W.; Nassif, N.; Azaïs, T.; Berner, A.; Fratzl, P.; Zolotoyabko, E.; Bertinetti, L.; Politi, Y. Interplay between Calcite, Amorphous Calcium Carbonate, and Intracrystalline Organics in Sea Urchin Skeletal Elements. *Cryst Growth Des* **2018**, *18* (4), 2189–2201. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01622>.

## ANEXOS

## Anexos - Capítulo I

## Anexo 1.1 - Metodología de muestreo



**Figura A. 1.** Fotografías de los especímenes del género *Pacifigorgia* previo al muestreo junto a imágenes tomadas con estereoscopio a una magnificación de 2x.

## Anexos - Capítulo IV

### Anexo 4. 1 – Análisis estadísticos de la Fotografía Digital (RGB)

**Cuadro A. 1** Intensidad promedio y moda de los canales RGB calculados a partir de los histogramas de color de las fotografías digitales de cada muestra analizada.

<b>PROMEDIO</b>				
<b>Especie (R)</b>	<b>Muestra</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>P. firma</i>	226.865	210.551	209.547	176.576
<i>P. rubicunda</i>	194.17	171.961	186.093	173.786
<i>P. stenobrochis</i>	101.332	118.859	120.533	96.458
<i>P. cairnsi</i>	138.552	143.226	136.029	140.722
<i>P. rubinoffi</i>	205.404	-	-	-
<b>Especie (G)</b>	<b>Muestra</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>P. firma</i>	137.905	174.862	147.587	142.222
<i>P. rubicunda</i>	114.781	127.21	108.403	116.619
<i>P. stenobrochis</i>	54.369	59.078	65.609	77.78
<i>P. cairnsi</i>	103.175	80.75	87.907	76.25
<i>P. rubinoffi</i>	99.279	-	-	-
<b>Especie (B)</b>	<b>Muestra</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>P. firma</i>	128.055	148.595	122.291	114.137
<i>P. rubicunda</i>	88.297	103.903	93.247	93.851
<i>P. stenobrochis</i>	45.732	52.429	61.472	58.341
<i>P. cairnsi</i>	102.077	65.232	76.873	59.213
<i>P. rubinoffi</i>	77.883	-	-	-
<b>MODA</b>				
<b>Especie (R)</b>	<b>Muestra</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>P. firma</i>	255	218	218	155
<i>P. rubicunda</i>	213	177	194	178
<i>P. stenobrochis</i>	99	122	122	91
<i>P. cairnsi</i>	150	147	128	140
<i>P. rubinoffi</i>	228	-	-	-
<b>Especie (G)</b>	<b>Muestra</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>P. firma</i>	176	139	134	109
<i>P. rubicunda</i>	129	96	103	109
<i>P. stenobrochis</i>	48	56	68	42
<i>P. cairnsi</i>	77	74	56	90
<i>P. rubinoffi</i>	94	-	-	-
<b>Especie (B)</b>	<b>Muestra</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<i>P. firma</i>	135	95	99	95
<i>P. rubicunda</i>	97	76	79	79
<i>P. stenobrochis</i>	38	47	45	31
<i>P. cairnsi</i>	56	62	33	89
<i>P. rubinoffi</i>	62	-	-	-

**Cuadro A. 2** Matrices SSCP por factor, por error y correlaciones parciales para la matriz SSCP por error calculadas a partir de la prueba MANOVA para las intensidades de los canales R, G, B y R+G+B en el análisis de color en las especies de *Pacifigorgia*.

<b>Matriz SSCP por Factor (Variabilidad Interespecífica)</b>				
Variables	R	G	B	R+G+B
R	<b>22200.7</b>	19121.2	15769.0	57090.9
G	19121.2	<b>16832.8</b>	14016.0	49970.1
B	15769.0	14016.0	<b>11752.1</b>	41537.1
R+G+B	57090.9	49970.1	41537.1	<b>148598.1</b>
<b>Matriz SSCP por Error (Variabilidad Intraespecífica)</b>				
Variables	R	G	B	R+G+B
R	<b>2140.7</b>	-264.8	304.4	2180.3
G	-264.8	<b>1738.4</b>	1582.5	3056.2
B	304.4	1582.5	<b>2000.1</b>	3887.0
R+G+B	2180.3	3056.2	3887.0	<b>9123.4</b>
<b>Correlaciones parciales de la Matriz SSCP por Error</b>				
Variables	R	G	B	R+G+B
R	1.000	-0.137	0.147	0.493
G	-0.137	1.000	0.849	0.767
B	0.147	0.849	1.000	0.910
R+G+B	0.493	0.767	0.910	1.000

**Cuadro A. 3** Resultados de la prueba Tukey para las diferencias entre pares de especies según cada variable dependiente utilizada (R, G, B y R+G+B).

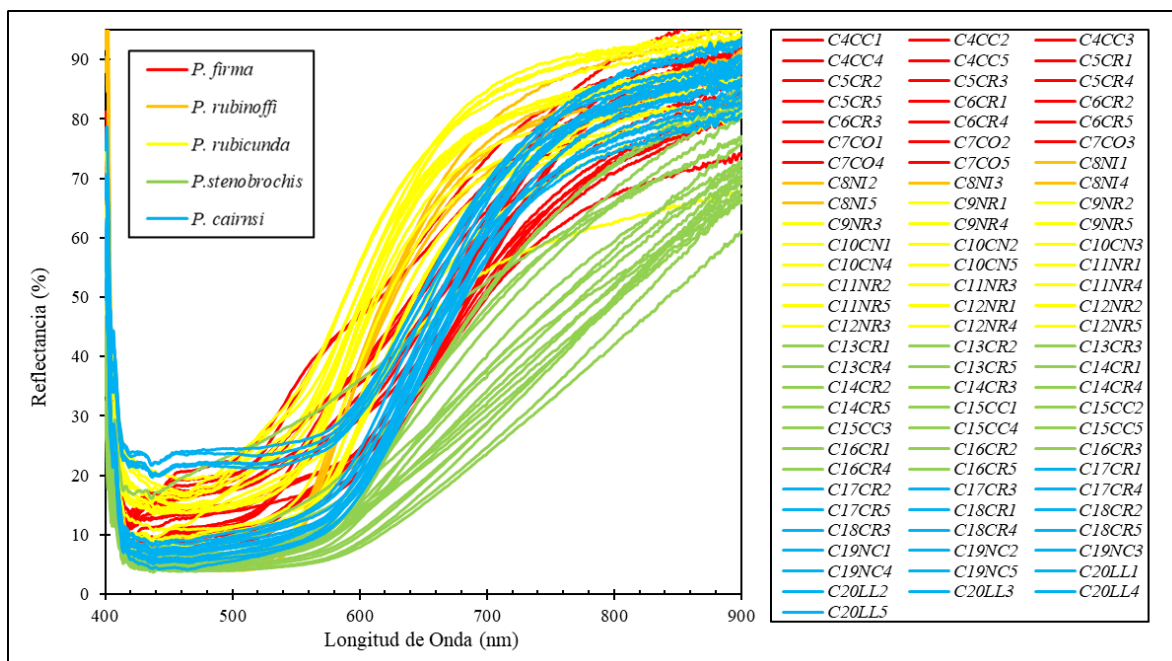
<b>R</b>							
Especie1 - Especie2	Diferencia Promedio	Error estándar	Valor q	Valor p	Sig.	Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
P. rubicunda - P. firma	-24.38	9.44	3.65	0.097	No	-52.42	3.66
P. stenobrochis - P. firma	-96.59	9.44	14.46	1.44E-06	Sí	-124.63	-68.55
P. stenobrochis - P. rubicunda	-72.21	9.44	10.81	3.08E-05	Sí	-100.25	-44.17
P. cairnsi - P. firma	-66.25	9.44	9.92	7.20E-05	Sí	-94.29	-38.21
P. cairnsi - P. rubicunda	-41.87	9.44	6.27	0.004	Sí	-69.91	-13.83
P. cairnsi - P. stenobrochis	30.34	9.44	4.54	0.033	Sí	2.30	58.38
<b>G</b>							
Especie 1 - Especie 2	Diferencia Promedio	Error estándar	Valor q	Valor p	Sig.	Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
P. rubicunda - P. firma	-33.89	8.51	5.63	0.009	Sí	-59.16	-8.62
P. stenobrochis - P. firma	-86.44	8.51	14.36	1.56E-06	Sí	-111.70	-61.17
P. stenobrochis - P. rubicunda	-52.54	8.51	8.73	2.41E-04	Sí	-77.81	-27.28
P. cairnsi - P. firma	-63.62	8.51	10.57	3.85E-05	Sí	-88.89	-38.36
P. cairnsi - P. rubicunda	-29.73	8.51	4.94	0.020	Sí	-55.00	-4.47
P. cairnsi - P. stenobrochis	22.81	8.51	3.79	0.082	No	-2.46	48.08

B							
Especie1 - Especie2	Diferencia Promedio	Error estándar	Valor q	Valor p	Sig.	Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
P. rubicunda - P. firma	-33.45	9.13	5.18	0.015	Sí	-60.55	-6.34
P. stenobrochis - P. firma	-73.78	9.13	11.43	1.80E-05	Sí	-100.88	-46.67
P. stenobrochis - P. rubicunda	-40.33	9.13	6.25	0.004	Sí	-67.43	-13.23
P. cairnsi - P. firma	-52.42	9.13	8.12	4.65E-04	Sí	-79.52	-25.32
P. cairnsi - P. rubicunda	-18.98	9.13	2.94	0.215	No	-46.08	8.13
P. cairnsi - P. stenobrochis	21.36	9.13	3.31	0.143	No	-5.75	48.46

R+G+B							
Especie1 - Especie2	Diferencia Promedio	Error estándar	Valor q	Valor p	Sig.	Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
P. rubicunda - P. firma	-91.72	19.50	6.65	0.002	Sí	-149.60	-33.83
P. stenobrochis - P. firma	-256.80	19.50	18.63	0.00E+00	Sí	-314.69	-198.92
P. stenobrochis - P. rubicunda	-165.08	19.50	11.97	1.13E-05	Sí	-222.97	-107.20
P. cairnsi - P. firma	-182.30	19.50	13.22	3.82E-06	Sí	-240.18	-124.41
P. cairnsi - P. rubicunda	-90.58	19.50	6.57	0.003	Sí	-148.46	-32.69
P. cairnsi - P. stenobrochis	74.50	19.50	5.40	0.011	Sí	16.62	132.39

#### Anexo 4. 2 – Análisis estadísticos de microespectroscopía Visible-NIR



**Figura A. 2** Espectros de reflectancia Visible-NIR de la superficie de los corales de las especies estudiadas del género *Pacifigorgia* utilizados para el PCA.

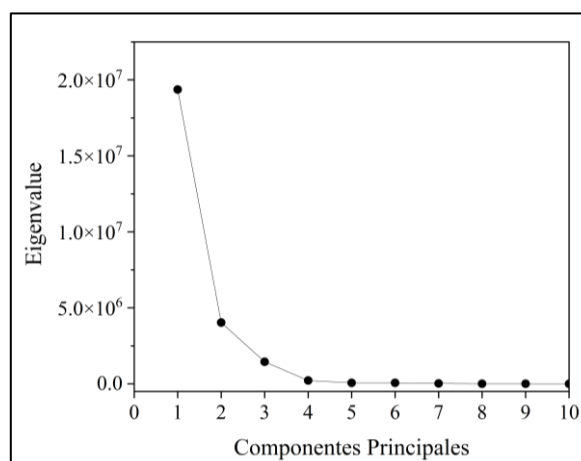
**Cuadro A. 4** Resultados del cálculo de los *eigenvalues*, la varianza total y acumulada para cada componente principal calculado en el PCA realizado sobre los resultados de Microespectroscopía Visible-NIR.

Componente Principal	<i>Eigenvalue</i>	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)
1	8.99	86.47	86.47
2	0.94	9.05	95.51
3	0.41	3.95	99.46
4	0.03	0.31	99.77
5	0.01	0.12	99.89
6	0.00	0.05	99.94
7	0.00	0.02	99.96
8	0.00	0.01	99.97
9	0.00	0.01	99.98
10	0.00	0.00	99.98
11	0.00	0.00	99.98
12	0.00	0.00	99.98
13	0.00	0.00	99.99
14	0.00	0.00	99.99
15	0.00	0.00	99.99
16	0.00	0.00	99.99
17	0.00	0.00	99.99
18	0.00	0.00	99.99
19	0.00	0.00	99.99
20	0.00	0.00	99.99
21	0.00	0.00	99.99
22	0.00	0.00	99.99
23	0.00	0.00	99.99
24	0.00	0.00	99.99
25	0.00	0.00	99.99
26	0.00	0.00	99.99
27	0.00	0.00	99.99
28	0.00	0.00	99.99
29	0.00	0.00	99.99
30	0.00	0.00	99.99
31	0.00	0.00	99.99
32	0.00	0.00	99.99
33	0.00	0.00	99.99
34	0.00	0.00	100.00
35	0.00	0.00	100.00

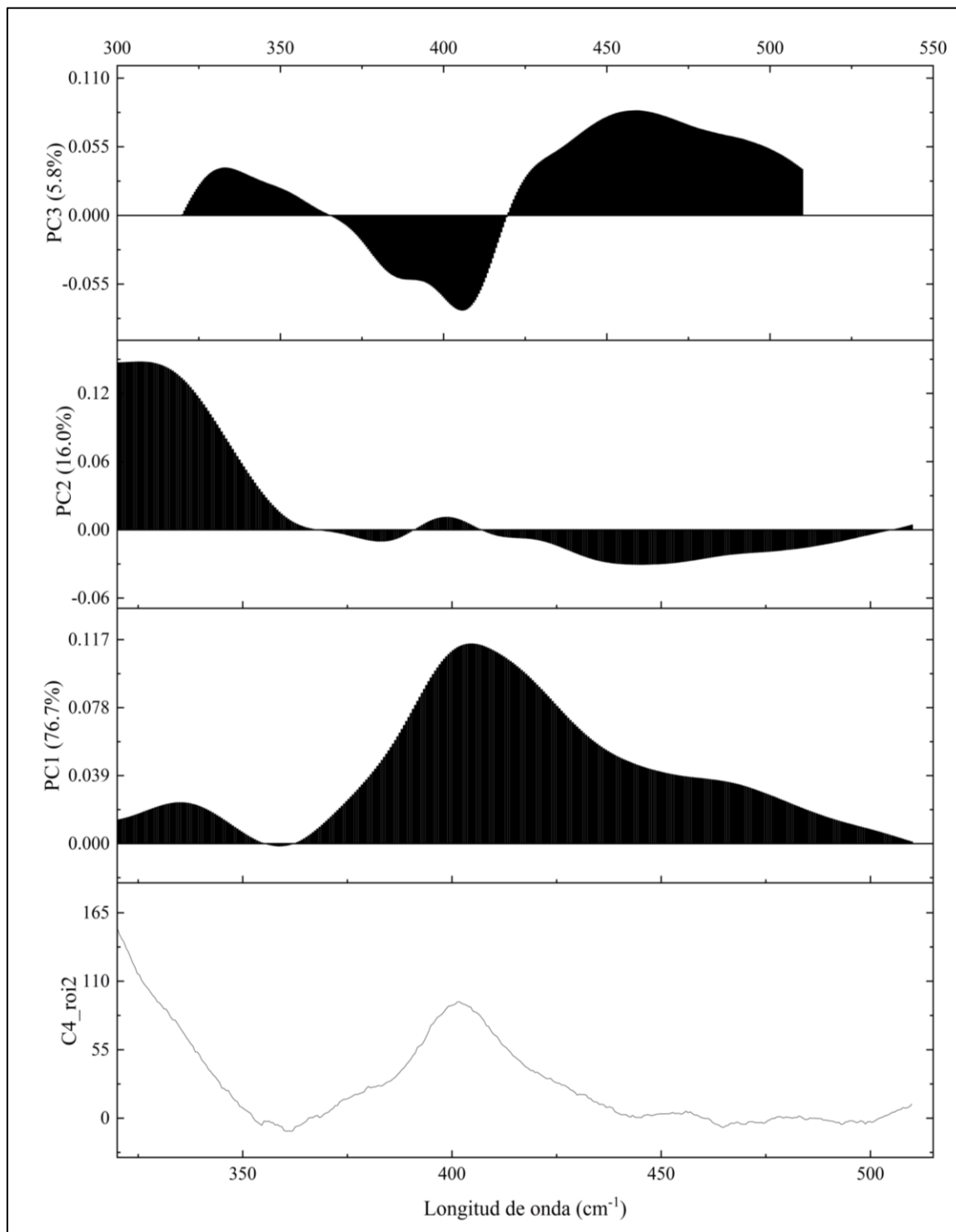
### Anexo 4.3 – Análisis estadísticos de la Microespectroscopía de Fluorescencia

**Cuadro A. 5** Resultados del cálculo de los *eigenvalues*, la varianza total y acumulada para cada componente principal calculado en el PCA realizado sobre los resultados de Microespectroscopía de Fluorescencia.

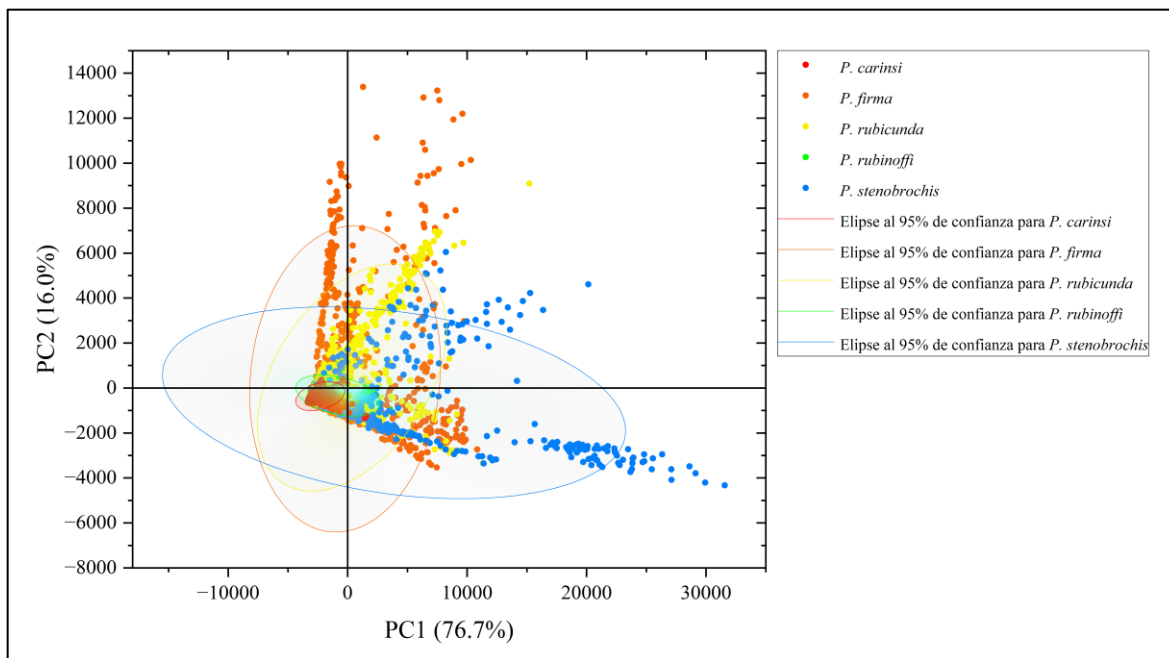
Componente Principal	<i>Eigenvalue</i>	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)
1	1.9E+07	76.68	76.68
2	4.0E+06	15.97	92.65
3	1.5E+06	5.75	98.40
4	2.2E+05	0.88	99.27
5	6.7E+04	0.26	99.53
6	6.5E+04	0.26	99.79
7	2.6E+04	0.10	99.89
8	8.6E+03	0.03	99.93
9	4.4E+03	0.02	99.95
10	3.1E+03	0.01	99.96
11	2.2E+03	0.01	99.97
12	2.1E+03	0.01	99.98
13	1.7E+03	0.01	99.98
14	8.4E+02	0.00	99.99
15	7.0E+02	0.00	99.99
16	4.9E+02	0.00	99.99
17	3.8E+02	0.00	99.99
18	3.4E+02	0.00	99.99
19	2.2E+02	0.00	99.99
20	1.7E+02	0.00	99.99



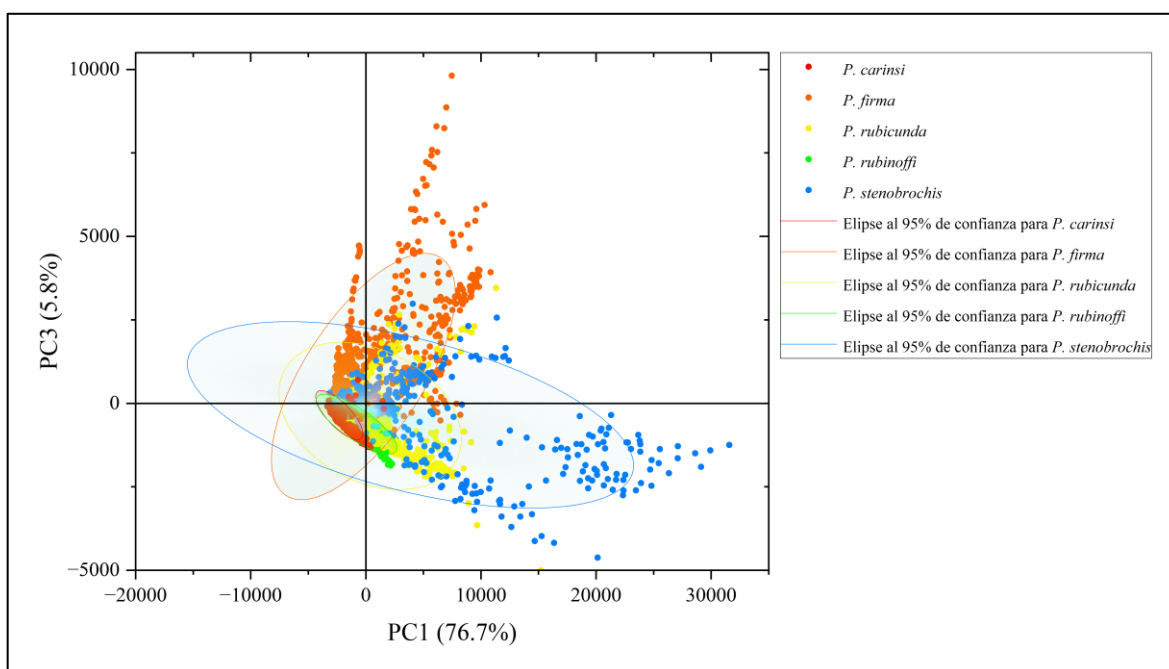
**Figura A. 3** Gráfico de sedimentación con el valor de los *eigenvalues* para las componentes principales 1 a 10 obtenidos a partir del PCA para Microespectroscopía de Fluorescencia.



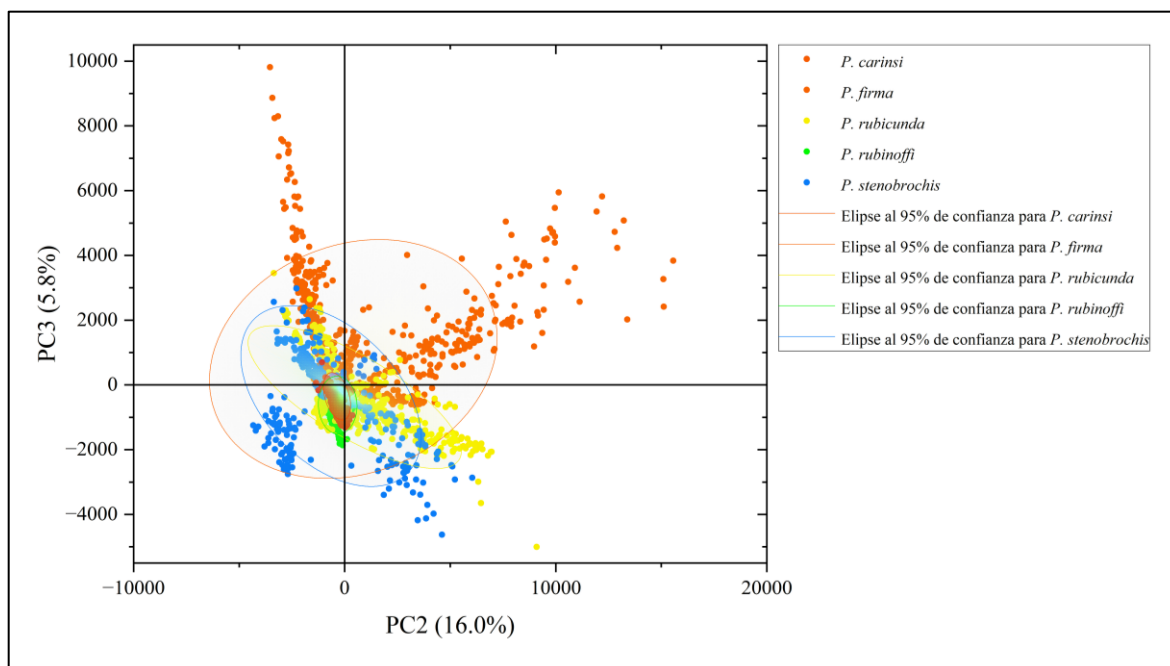
**Figura A. 4** Gráficos de cargas según la longitud de onda obtenidos a partir del PCA para los componentes principales 1, 2 y 3, respecto a un espectro de fluorescencia normalizado de la primera muestra del espécimen C4CC de *P. firma*.



**Figura A. 5** Biplot de PC1 y PC2 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las cuentas de emisión por fluorescencia de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.



**Figura A. 6** Biplot de PC1 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las cuentas de emisión por fluorescencia de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.



**Figura A. 7** Biplot de PC2 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las cuentas de emisión por fluorescencia de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.

#### Anexo 4. 4 – Análisis estadísticos de la Microespectroscopía Raman

**Cuadro A. 6** Posición de las bandas 1, 2 y 3 obtenidas a partir de la deconvolución de los espectros de dispersión Raman de los pigmentos presentes en las escleritas de las especies de *Pacifigorgia*.

Especie	Muestra	Banda 1	Banda 2	Banda 3
<i>P. firma</i>	C4CC1	1014.6	1126.0	1512.7
	C4CC2	1017.3	1129.5	1519.2
	C5CR1	1017.4	1129.9	1519.4
	C5CR2	1019.0	1132.0	1521.5
	C5CR3	1015.6	1124.8	1512.2
	C6CR1	1019.1	1127.7	1514.3
	C6CR2	1018.1	1122.8	1510.1
	C7CO1	1016.0	1123.7	1510.5
	C7CO2	1020.1	1128.5	1515.6
<i>P. rubinoffi</i>	C8NI1	1016.1	1129.9	1519.4
	C8NI2	1017.6	1130.0	1519.6
<i>P. rubicunda</i>	C9NR1	1024.3	1132.9	1519.4
	C9NR2	1019.4	1130.5	1521.6

	C9NR3	1023.7	1130.7	1519.1
	C10CN1	1021.7	1130.3	1521.6
	C10CN2	1026.4	1130.6	1524.8
	C10CN3	1018.6	1128.2	1517.6
	C10CN4	1023.7	1127.6	1518.3
	C11NR1	1014.8	1129.3	1518.2
	C11NR2	1016.3	1126.7	1514.1
	C11NR3	1013.8	1128.7	1517.5
	C11NR4	1019.1	1130.3	1519.2
	C12NC1	1012.3	1127.6	1516.9
	C12NC2	1015.5	1128.6	1516.9
	C12NC3	1015.4	1129.2	1518.0
<i>P. stenobrochis</i>	C13CR1	1020.3	1125.9	1511.5
	C13CR2	1019.2	1127.3	1515.4
	C13CR3	1015.5	1125.2	1511.6
	C14CR1	1019.7	1125.9	1512.3
	C14CR2	1014.9	1125.3	1511.8
	C15CC1	1024.3	1130.3	1529.0
	C15CC2	1016.3	1125.6	1512.1
	C15CC3	1021.7	1130.3	1519.2
	C16CR1	1015.7	1126.7	1513.8
	C16CR2	1015.7	1127.0	1514.1
<i>P. cairnsi</i>	C17CR1	1016.0	1126.8	1513.7
	C17CR2	1016.1	1126.5	1513.3
	C18CR1	1017.3	1128.7	1516.6
	C18CR2	1019.3	1128.6	1517.5
	C18CR3	1017.5	1126.7	1513.9
	C19NC1	1016.4	1126.4	1513.1
	C19NC2	1021.4	1127.9	1518.0
	C19NC3	1014.9	1126.9	1514.3
	C20LL1	1015.7	1126.2	1513.1
	C20LL2	1024.9	1128.3	1517.3
	C20LL3	1014.6	1126.1	1513.1
	C20LL4	1027.7	1126.9	1513.7

**Tabla A. 1** Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para el análisis de normalidad en las intensidades medias para cada canal del sistema RGB a un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ).

Banda	Especie	Valor p	Decisión al 95% de confianza
1	<i>P. firma-roja</i>	0.5229	No se rechaza la normalidad
	<i>P. firma-naranja</i>	0.56003	No se rechaza la normalidad
	<i>P. firma-blanca</i>	0.1162	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubinoffi</i>	--	No hay suficientes datos
	<i>P. rubicunda-naranja</i>	0.42722	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubicunda-blanca</i>	0.95054	No se rechaza la normalidad
	<i>P. stenobrochis</i>	0.18992	No se rechaza la normalidad
	<i>P. cairnsi</i>	0.01858	Se rechaza la normalidad
2	<i>P. firma-roja</i>	0.42494	No se rechaza la normalidad
	<i>P. firma-naranja</i>	0.66069	No se rechaza la normalidad
	<i>P. firma-blanca</i>	0.13084	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubinoffi</i>	--	No hay suficientes datos
	<i>P. rubicunda-naranja</i>	0.97513	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubicunda-blanca</i>	0.00383	Se rechaza la normalidad
	<i>P. stenobrochis</i>	0.0165	Se rechaza la normalidad
	<i>P. cairnsi</i>	0.05439	No se rechaza la normalidad
3	<i>P. firma-roja</i>	0.55756	No se rechaza la normalidad
	<i>P. firma-naranja</i>	0.21815	No se rechaza la normalidad
	<i>P. firma-blanca</i>	0.93603	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubinoffi</i>	--	No hay suficientes datos
	<i>P. rubicunda-naranja</i>	0.07921	No se rechaza la normalidad
	<i>P. rubicunda-blanca</i>	0.41558	No se rechaza la normalidad
	<i>P. stenobrochis</i>	8.40485E-4	Se rechaza la normalidad
	<i>P. cairnsi</i>	0.00746	Se rechaza la normalidad

**Tabla A. 2** Resultados de la prueba de Mardia para el análisis de normalidad multivariable de las variables dependientes del set de datos completo y por especie de la Microespectroscopía Raman a un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ). Colores verde, amarillo y rojo se asocian resultados positivos, no concluyentes y negativos, respectivamente.

Set de datos	Asimetría ( <i>skewness</i> )		Curtosis ( <i>kurtosis</i> )		Normalidad multivariable
	Valor p	Decisión	Valor p	Decisión	
<i>P. firma</i>	0.4808	Distribución simétrica	0.7687	Distribución normal	Sí la hay
<i>P. rubicunda</i>	0.0210	Distribución asimétrica	0.3691	Distribución normal	No se puede asegurar
<i>P. stenobrochis</i>	0.0025	Distribución asimétrica	0.2257	Distribución normal	No se puede asegurar
<i>P. cairnsi</i>	0.1899	Distribución simétrica	0.0165	Distribución con curtosis positiva	No se puede asegurar

**Cuadro A. 7** Matrices SSCP por factor, por error y correlaciones parciales para la matriz SSCP por error calculadas a partir de la prueba MANOVA para las intensidades de los canales R, G, B y R+G+B en el análisis de color en las especies de *Pacifigorgia*.

<b>Matriz SSCP por Factor (Variabilidad Interespecífica)</b>			
Variables	Banda 1	Banda 2	Banda 3
Banda 1	<b>15.96</b>	10.14	18.39
Banda 2	10.14	<b>58.17</b>	97.24
Banda 3	18.39	97.24	<b>164.89</b>
<b>Matriz SSCP por Error (Variabilidad Intraespecífica)</b>			
Variables	Banda 1	Banda 2	Banda 3
Banda 1	<b>562.93</b>	136.97	282.27
Banda 2	136.97	<b>153.66</b>	238.13
Banda 3	282.27	238.13	<b>529.01</b>
<b>Correlaciones parciales de la Matriz SSCP por Error</b>			
Variables	Banda 1	Banda 2	Banda 3
Banda 1	1.0000	0.4657	0.5173
Banda 2	0.4657	1.0000	0.8352
Banda 3	0.5173	0.8352	1.0000

**Tabla A. 3** Resultados del análisis multivariable con las pruebas de Wilk's Lambda, Hotelling-Lawley's Trace y Roy's Largest Root con un nivel de confianza del 95% para el análisis de Microespectroscopía Raman.

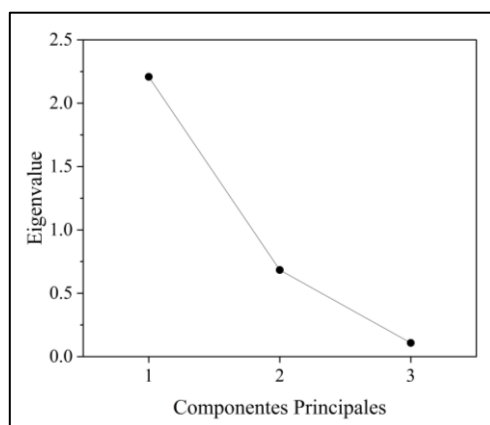
<b>Análisis multivariable</b>	<b>Valor de prueba</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>	<b>Decisión</b>
Wilk's Lambda	0.6513	1.5559	0.1160	No hay diferencias significativas
Hotelling-Lawley Trace	0.5154	1.6606	0.0846	No hay diferencias significativas
Roy's Largest Root	0.4744	4.9807	0.0022	Sí hay diferencias significativas

**Cuadro A. 8** Resultados de la prueba Tukey para las diferencias entre pares de especies según cada variable dependiente utilizada en Microespectroscopía Raman (Bandas 1, 2 y 3).

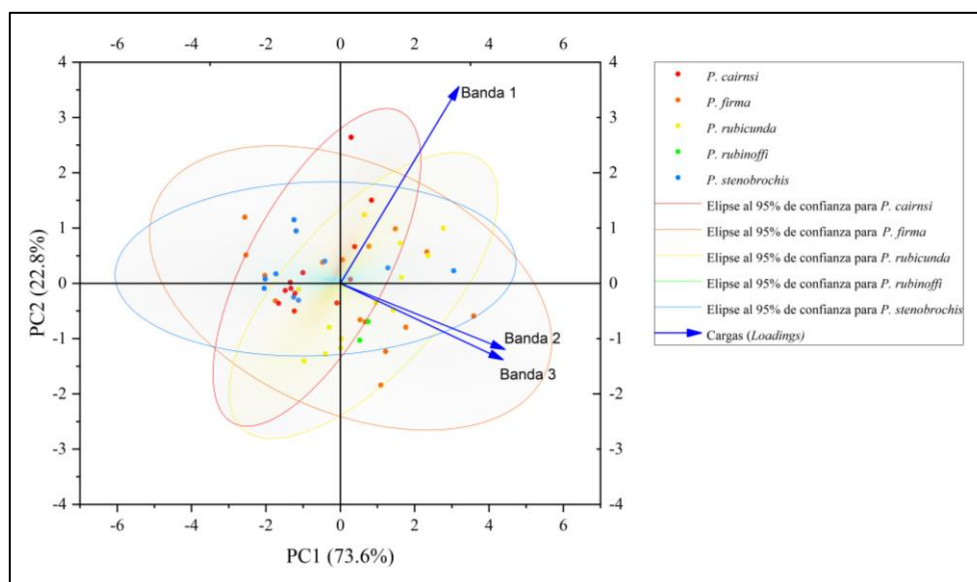
<b>Banda 1</b>							
Especie1 - Especie2	Diferencia Promedio	Error estándar	Valor q	Valor p	Sig.	Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
<i>P. rubinoffi</i> - <i>P. firma</i>	-0.62	2.86	0.31	1.00	No	-8.78	7.53
<i>P. rubicunda</i> - <i>P. firma</i>	1.44	1.56	1.30	0.89	No	-3.02	5.90
<i>P. rubicunda</i> - <i>P. rubinoffi</i>	2.06	2.77	1.05	0.94	No	-5.83	9.95
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. firma</i>	0.83	1.68	0.70	0.99	No	-3.97	5.62
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. rubinoffi</i>	1.45	2.84	0.72	0.99	No	-6.63	9.53
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. rubicunda</i>	-0.61	1.52	0.57	0.99	No	-4.93	3.71
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. firma</i>	1.00	1.61	0.88	0.97	No	-3.60	5.60
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. rubinoffi</i>	1.62	2.80	0.82	0.98	No	-6.35	9.59
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. rubicunda</i>	-0.44	1.44	0.43	1.00	No	-4.55	3.66
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. stenobrochis</i>	0.17	1.57	0.15	1.00	No	-4.30	4.64
<b>Banda 2</b>							
Especie 1 - Especie 2	Diferencia Promedio	Error estándar	Valor q	Valor p	Sig.	Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
<i>P. rubinoffi</i> - <i>P. firma</i>	2.74	1.50	2.60	0.37	No	-1.52	7.01
<i>P. rubicunda</i> - <i>P. firma</i>	2.15	0.82	3.72	0.08	No	-0.18	4.48
<i>P. rubicunda</i> - <i>P. rubinoffi</i>	-0.60	1.45	0.58	0.99	No	-4.72	3.52
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. firma</i>	-0.26	0.88	0.42	1.00	No	-2.77	2.24
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. rubinoffi</i>	-3.01	1.48	2.87	0.27	No	-7.23	1.22
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. rubicunda</i>	-2.41	0.79	4.30	0.03	Sí	-4.67	-0.15
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. firma</i>	-0.05	0.84	0.09	1.00	No	-2.46	2.35
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. rubinoffi</i>	-2.80	1.46	2.71	0.33	No	-6.96	1.36
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. rubicunda</i>	-2.20	0.75	4.14	0.04	Sí	-4.35	-0.06
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. stenobrochis</i>	0.21	0.82	0.36	1.00	No	-2.13	2.54
<b>Banda 3</b>							
Especie1 - Especie2	Diferencia Promedio	Error estándar	Valor q	Valor p	Sig.	Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
<i>P. rubinoffi</i> - <i>P. firma</i>	4.47	2.77	2.28	0.50	No	-3.44	12.37
<i>P. rubicunda</i> - <i>P. firma</i>	3.76	1.52	3.51	0.11	No	-0.56	8.08
<i>P. rubicunda</i> - <i>P. rubinoffi</i>	-0.71	2.68	0.37	1.00	No	-8.35	6.94
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. firma</i>	0.02	1.63	0.02	1.00	No	-4.62	4.67
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. rubinoffi</i>	-4.45	2.75	2.29	0.50	No	-12.28	3.39
<i>P. stenobrochis</i> - <i>P. rubicunda</i>	-3.74	1.47	3.60	0.10	No	-7.92	0.45
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. firma</i>	-0.25	1.56	0.22	1.00	No	-4.71	4.21
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. rubinoffi</i>	-4.72	2.71	2.46	0.42	No	-12.44	3.01
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. rubicunda</i>	-4.01	1.40	4.06	0.05	Sí	-7.99	-0.03
<i>P. cairnsi</i> - <i>P. stenobrochis</i>	-0.27	1.52	0.25	1.00	No	-4.60	4.06

**Cuadro A. 9** Resultados del cálculo de los *eigenvalues*, la varianza total y acumulada para cada componente principal calculado en el PCA realizado sobre los resultados de Microespectroscopía Raman.

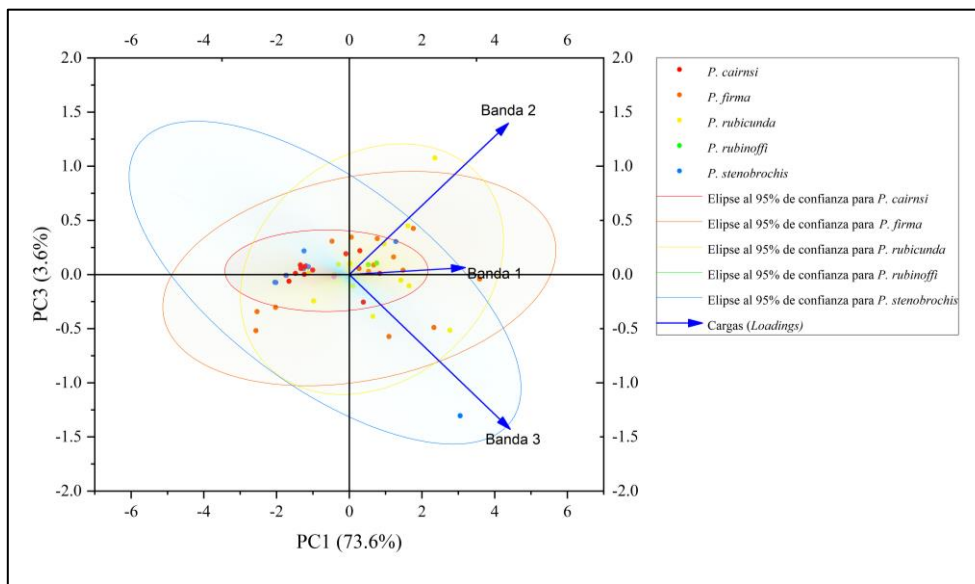
Componente Principal	<i>Eigenvalue</i>	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)
1	2.21	73.61	73.61
2	0.68	22.79	96.40
3	0.11	3.60	100



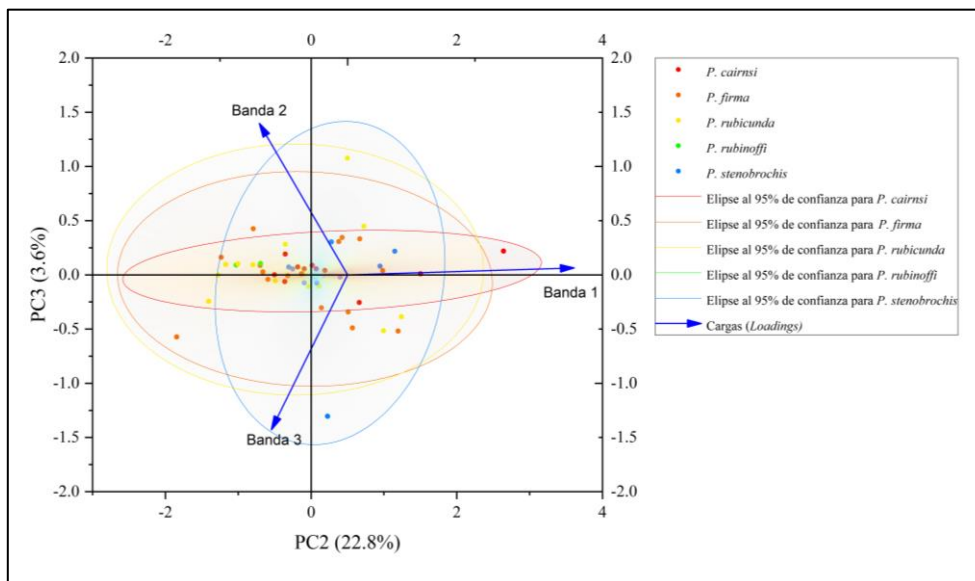
**Figura A. 8** Gráfico de sedimentación con el valor de los *eigenvalues* para las componentes principales 1 a 3 obtenidos a partir del PCA para Microespectroscopía Raman.



**Figura A. 9** Biplot de PC1 y PC2 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de intensidad de dispersión Raman de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.

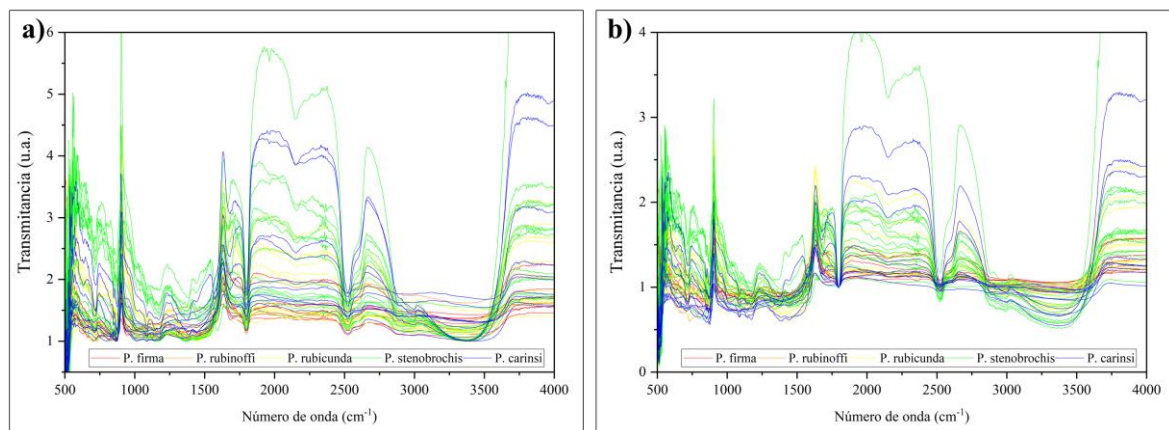


**Figura A. 10** Biplot de PC1 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de intensidad de dispersión Raman de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.

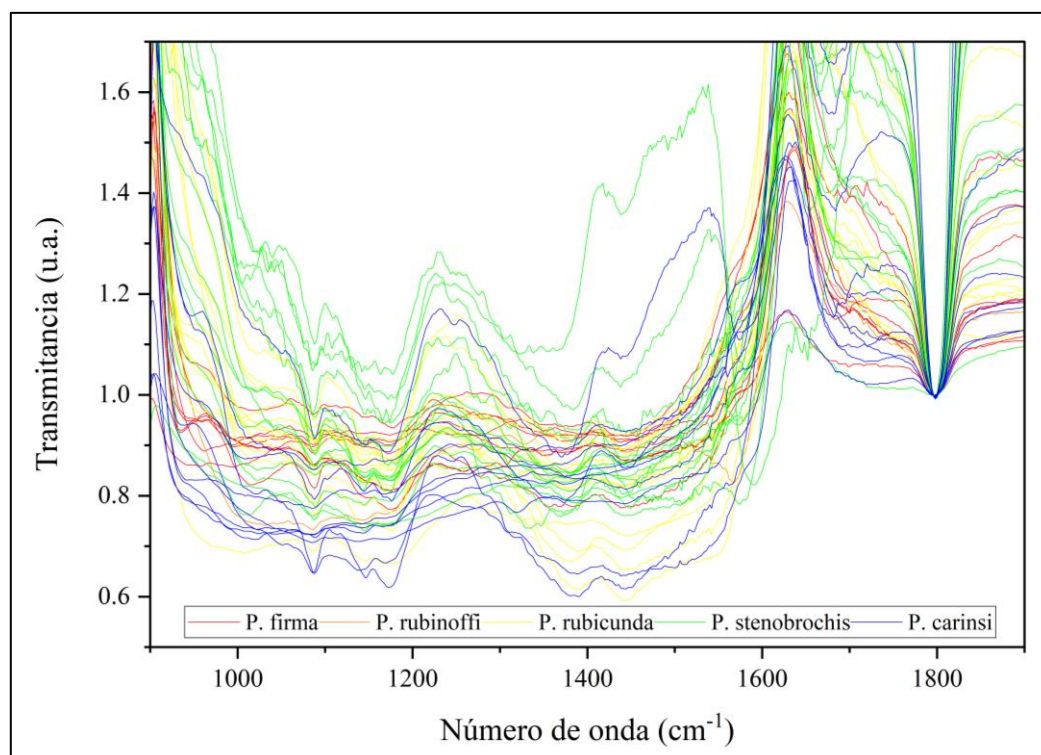


**Figura A. 11** Biplot de PC2 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre las medidas de intensidad de dispersión Raman de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.

#### Anexo 4.5 – Análisis estadísticos de la Microespectroscopía Infrarroja



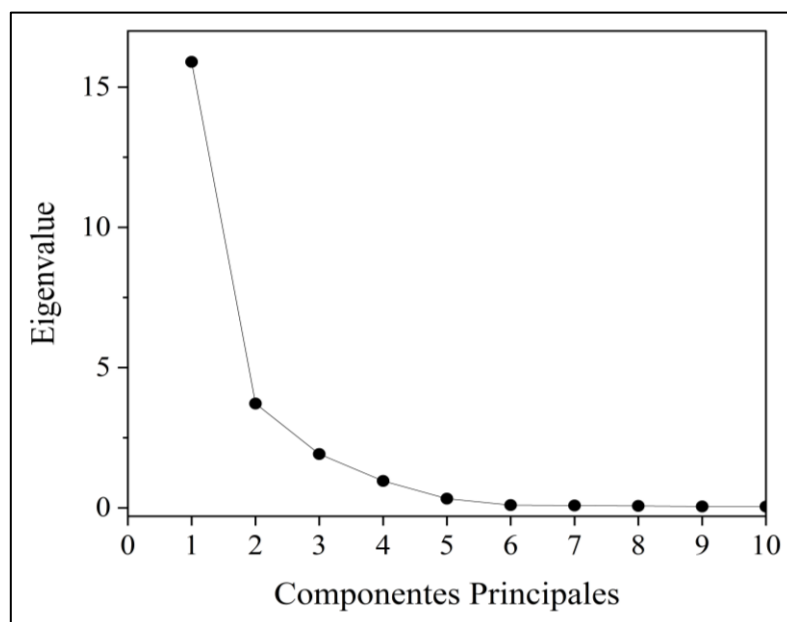
**Figura A. 12** Espectros de Infrarrojo de la superficie de los corales de las especies estudiadas del género *Pacifigorgia* utilizados para el PCA en el rango de 900 a 1900  $\text{cm}^{-1}$ , normalizados a) al valor mínimo y b) a la banda del carbonato a 1800  $\text{cm}^{-1}$ .



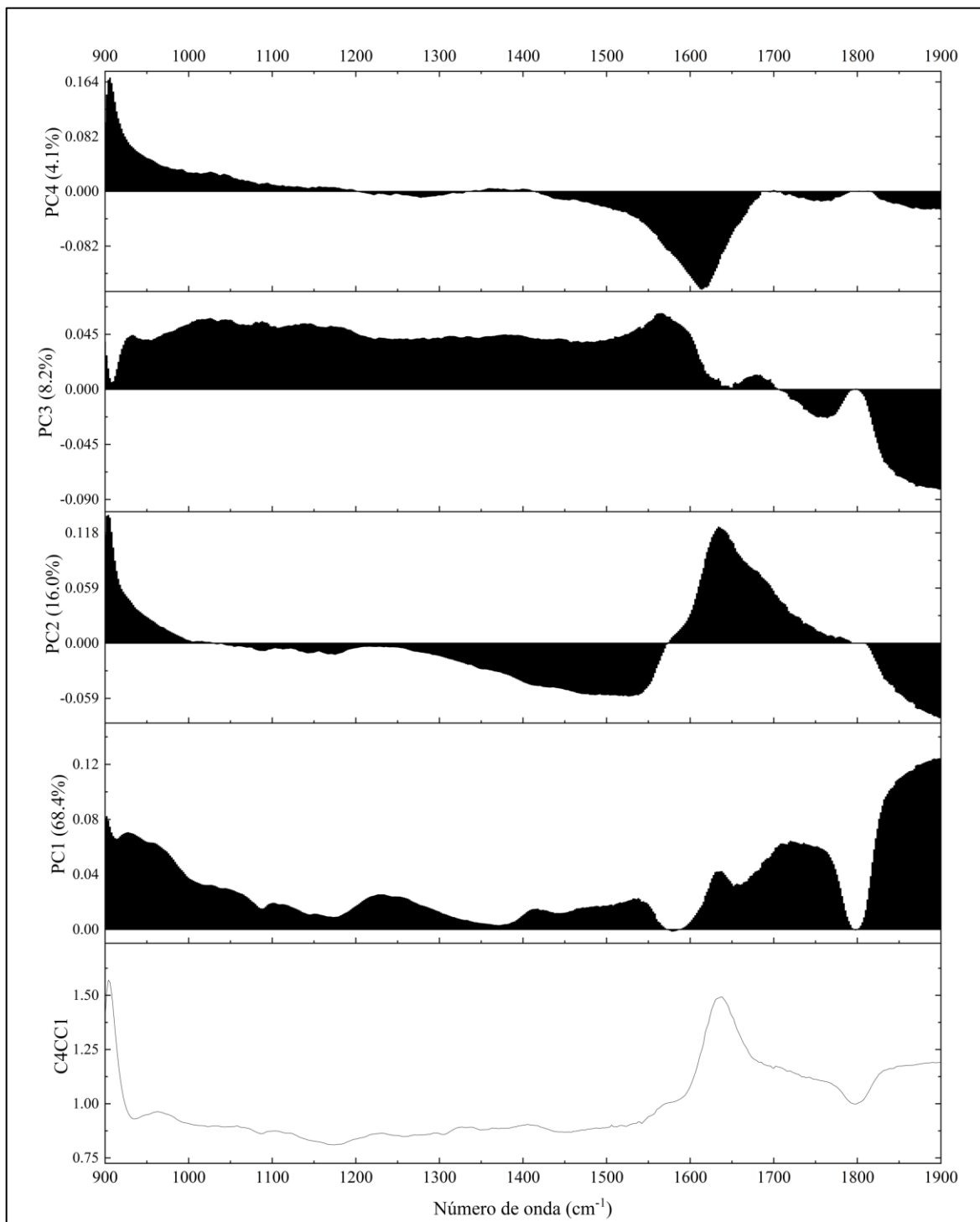
**Figura A. 13** Espectros de Infrarrojo de la superficie de los corales de las especies estudiadas del género *Pacifigorgia* utilizados para el PCA en el rango de 900 a 1900  $\text{cm}^{-1}$ , normalizados a la banda del carbonato a 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

**Cuadro A. 10** Resultados del cálculo de los *eigenvalues*, la varianza total y acumulada para cada componente principal calculado en el PCA realizado sobre los resultados de Microespectroscopía Infrarroja.

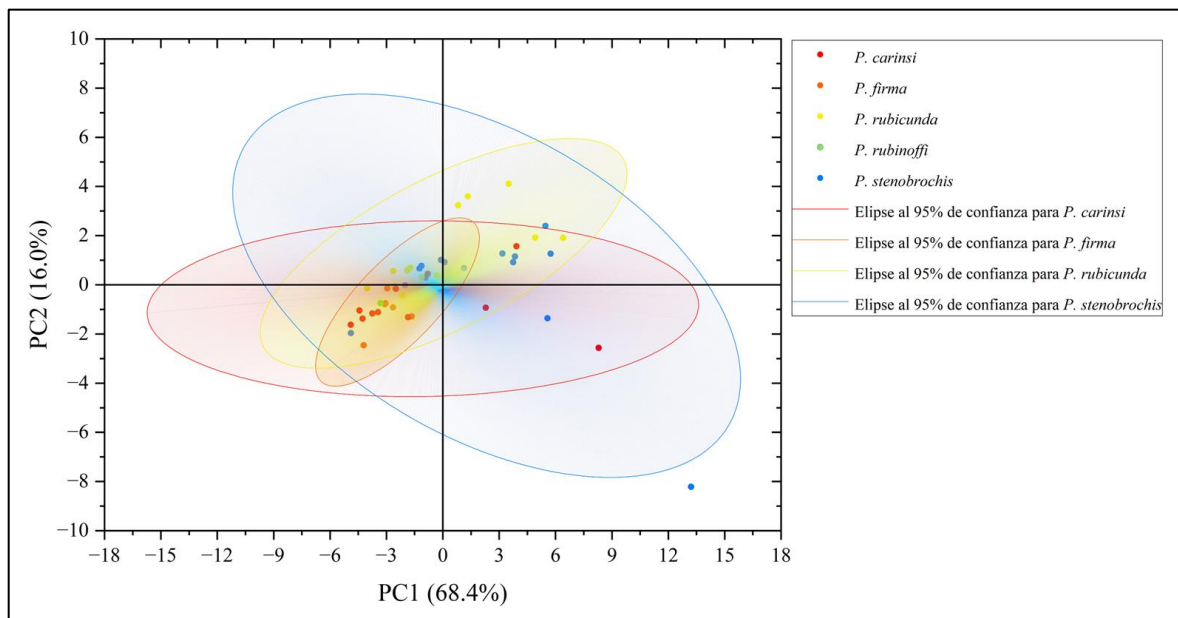
Componente Principal	<i>Eigenvalue</i>	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)
1	15.90	68.35	68.35
2	3.72	15.99	84.34
3	1.92	8.23	92.58
4	0.96	4.11	96.69
5	0.33	1.41	98.10
6	0.10	0.41	98.51
7	0.08	0.35	98.86
8	0.07	0.29	99.15
9	0.05	0.21	99.36
10	0.04	0.18	99.54
11	0.03	0.12	99.66
12	0.02	0.09	99.74
13	0.01	0.06	99.81
14	0.01	0.04	99.85
15	0.01	0.03	99.88
16	0.01	0.03	99.91
17	0.00	0.02	99.92
18	0.00	0.01	99.94
19	0.00	0.01	99.95
20	0.00	0.01	99.96



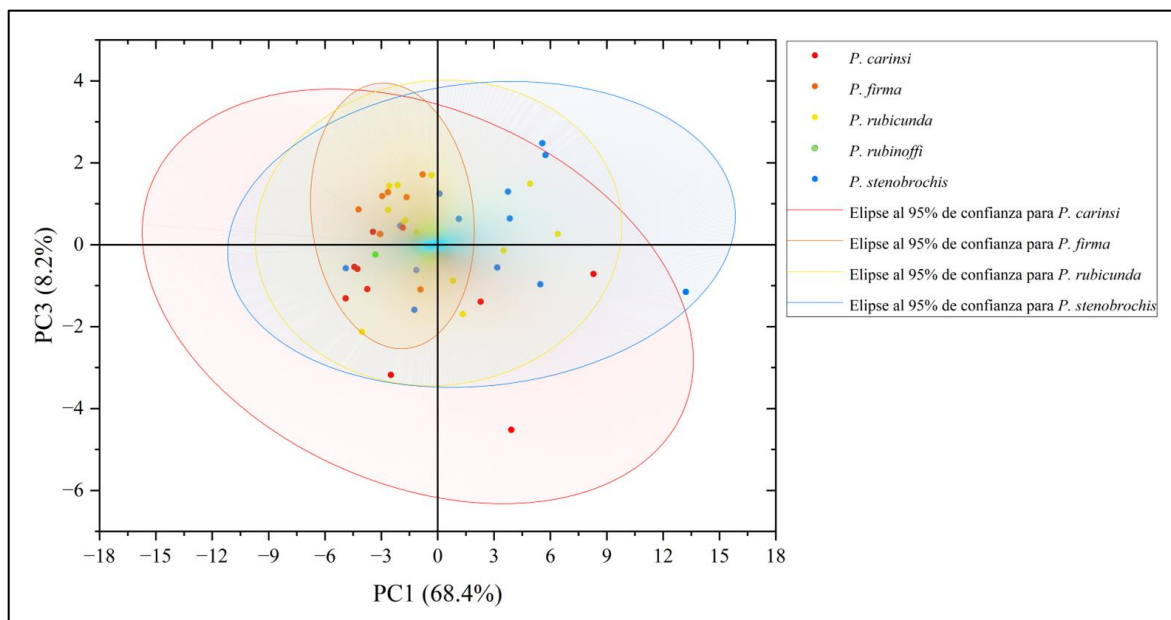
**Figura A. 14** Gráfico de sedimentación con el valor de los *eigenvalues* para las componentes principales 1 a 10 obtenidos a partir del PCA para Microespectroscopía Infrarroja.



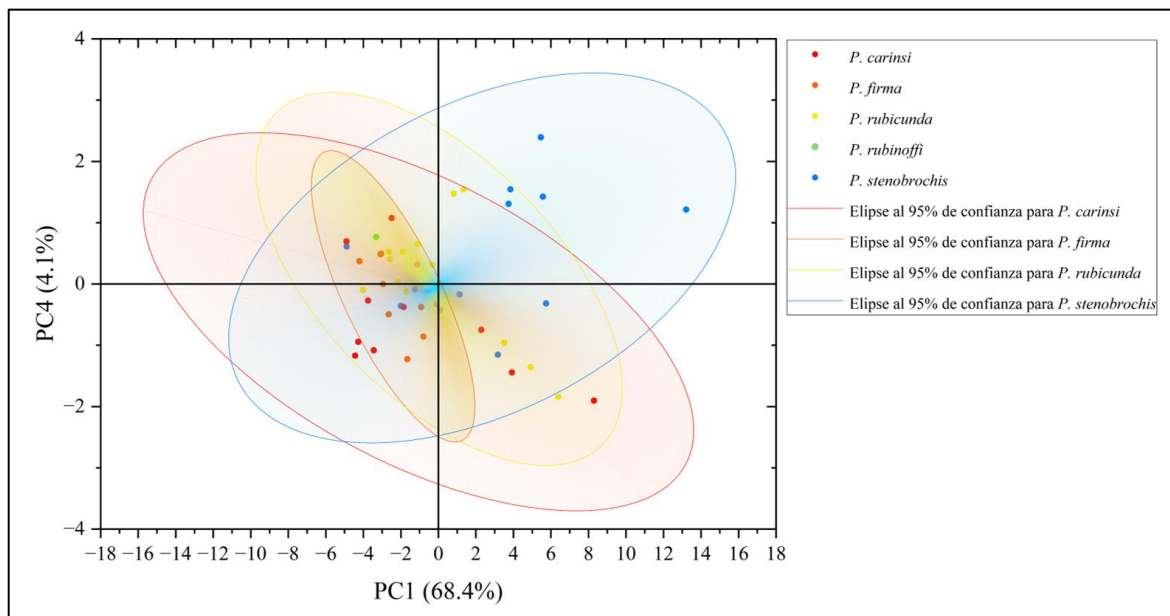
**Figura A. 15** Gráficos de cargas según la longitud de onda obtenidos a partir del PCA para los componentes principales 1, 2, 3 y 4, respecto a un espectro infrarrojo normalizado de la primera muestra del espécimen C4CC de *P. firma*.



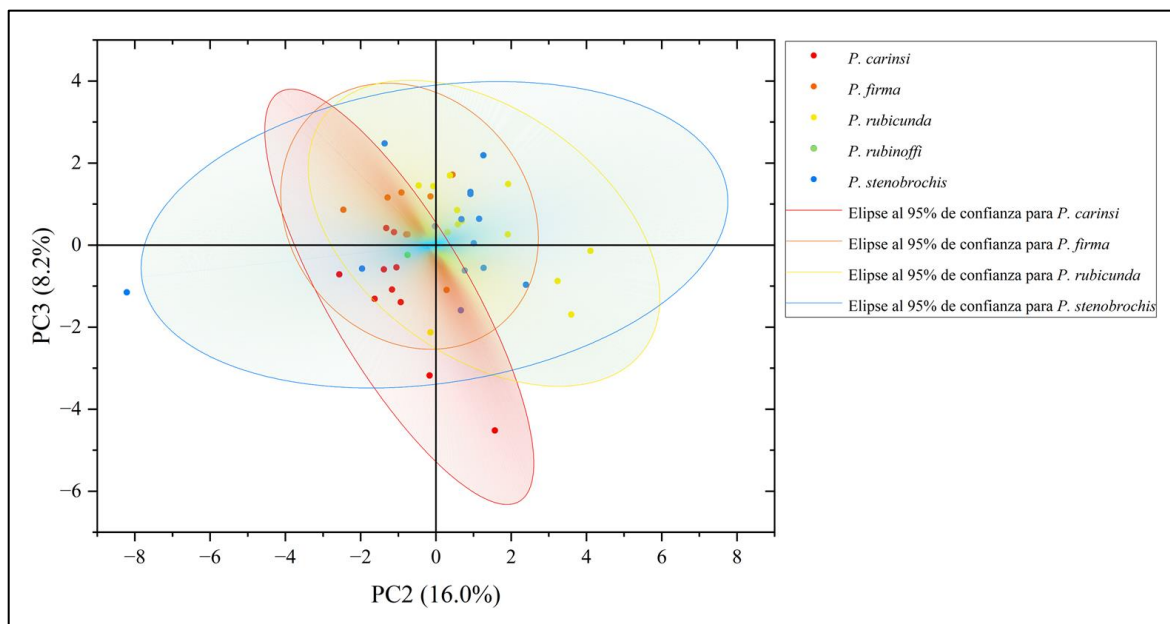
**Figura A. 16** Biplot de PC1 y PC2 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.



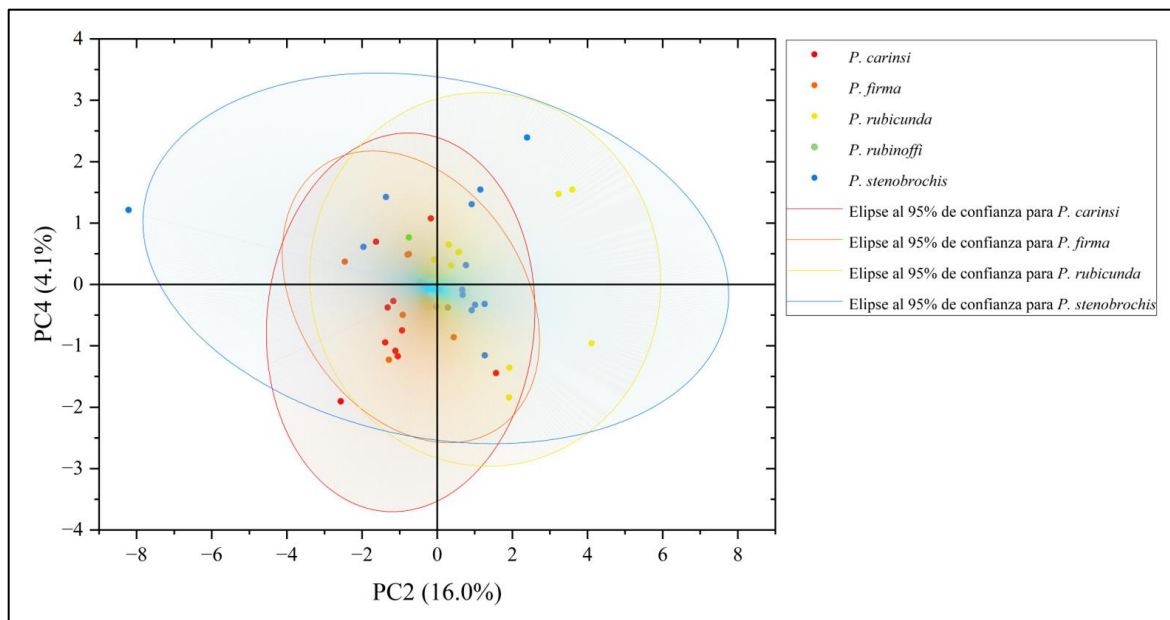
**Figura A. 17** Biplot de PC1 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.



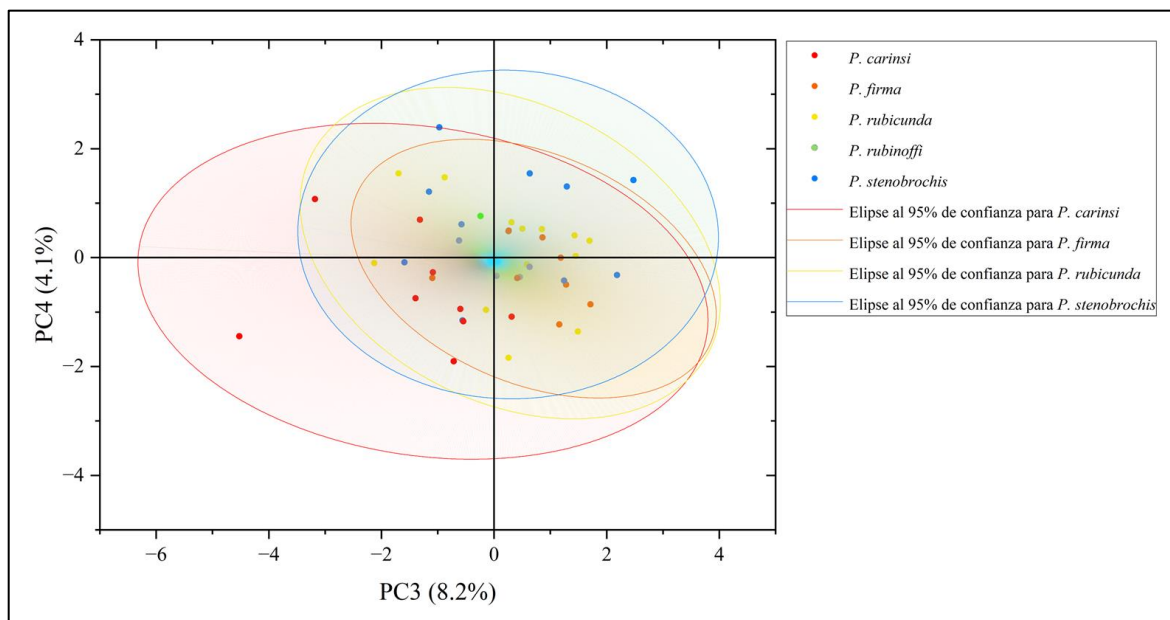
**Figura A. 18** Biplot de PC1 y PC4 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.



**Figura A. 19** Biplot de PC2 y PC3 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.



**Figura A. 20** Biplot de PC2 y PC4 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.



**Figura A. 21** Biplot de PC3 y PC4 obtenidos a partir del PCA aplicado sobre el porcentaje de transmitancia de radiación IR de las 5 especies estudiadas del género *Pacifigorgia*.