

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LAS CURVAS DE
FLUORESCENCIA INDUCIDA DE CLOROFILA *a* EN HOJAS DE
ESPINACA

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE FÍSICA

STEPHANY ROCÍO VILLAGÓMEZ CORREA
stephany.villagomez@outlook.com

Director: MARCO VINICIO BAYAS REA
marco.bayas@epn.edu.ec

QUITO, MAYO 2016

DECLARACIÓN

Yo, STEPHANY ROCÍO VILLAGÓMEZ CORREA, declaro bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual, correspondientes a este trabajo, a la Escuela Politécnica Nacional, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Stephany Rocío Villagómez Correa

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por STEPHANY ROCÍO VILLAGÓMEZ CORREA, bajo mi supervisión

Marco Vinicio Bayas Rea
Director del Proyecto

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a quienes con su mano sostuvieron la mía mientras enfrentaba este reto, también a los que la distancia no se los permitió pero que siempre fueron una voz de aliento para culminar este proyecto. A los que creyeron en mí a pesar de que caí, se quedaron para verme levantar y supieron hacerme notar que debo amar lo que hago y que eso necesariamente me traerá paz.

DEDICATORIA

Este trabajo espero sea una semilla para investigaciones más avanzadas, que mi aporte enriquezca el bagaje intelectual de la humanidad. Esta investigación se realizó como un aporte a la comunidad científica y como un símbolo de progreso al romper la barrera de lo desconocido.

Índice de contenido

Índice de Figuras	x
Índice de Tablas	xii
Abstract	1
Resumen	2
1. Fundamentos biofísicos	1
1.1. Membrana fotosintética	2
1.2. El proceso fotosintético	3
1.2.1. Cadena de transferencia de electrones	3
1.3. Fluorescencia Inducida	4
1.4. Modelos para la Fluorescencia Inducida	6
2. Métodos	8
2.1. Modelo teórico	8
2.1.1. Modelo de Paillotin	8
2.1.2. Modelo Propuesto	11
2.2. Experimentos	13
2.2.1. Preparación de muestras	13
2.2.2. Medidor de fluorescencia	14
2.2.3. Control de Temperatura	15
2.2.4. Mediciones	16
2.3. Análisis de las curvas experimentales	18
2.3.1. Cálculo de $q(t)$	18
2.3.2. Algoritmo para la búsqueda de parámetros	19
3. Resultados	21
3.1. Primera serie de experimentos	21
3.1.1. Resultados del Ajuste	25

3.2. Segunda serie de experimentos	31
3.2.1. Resultados del ajuste	34
3.3. Comparación entre series de experimentos	40
3.3.1. Experimento 1	40
3.3.2. Experimento 3	40
3.4. Comparación entre el experimento 1 y el experimento 3	42
4. Conclusiones y Discusión	43
Referencias	46
Anexos	51
4.1. Programa para el ajuste de Curvas	51

Índice de figuras

1.1.	Cloroplastos en las células vegetales. Figura adaptada de [4].	1
1.2.	Esquema del proceso fotosintético en la membrana tilacoidal. Figura Adaptada de [9].	2
1.3.	Vista esquemática del transporte de energía desde los complejos antena hasta el centro de reacción (CR) [6].	3
1.4.	Figura esquemática de los complejos antena del fotosistema II y las clorofilas de centro de reacción. La energía va desde el complejo antena hacia el centro de reacción lo que permite obtener una molécula Q_B reducida con dos electrones [5].	4
1.5.	Evolución temporal de Fluorescencia inducida $F(t)$. F_0 es el valor inicial de fluorescencia y F_m el máximo. Figura adaptada de Lazar et al. [18] .	5
1.6.	Evolución temporal de Fluorescencia inducida $F(t)$ solo debido a la reducción de Q_A bajo el efecto de DCMU. Figura adaptada de [18]. . . .	6
2.1.	Curvas obtenidas de la ecuación 2.17 para los parámetros mostrados en la tabla 2.1. El tiempo está en escala logarítmica	11
2.2.	Relación entre los dominios propuestos y las regiones de la curva Kautsky.	12
2.3.	Montaje experimental: 1: MC-PAM, 2: Variador de voltaje, 3: Detector, 4: Emisor y 5: Resistencia de potencia	14
2.4.	Hoja de espinaca en el porta muestras para el registro de fluorescencia.	15
2.5.	Circuito utilizado para controlar la temperatura. Se hace uso de la radiación térmica que emite la resistencia de potencia.	15
2.6.	Control del temperatura acoplado al sistema para inducir fluorescencia. Montaje experimental: 1: Termocupla, 2: Disipador y 3: Resistencia de potencia	16
2.7.	Esquema del proceso utilizado para simular $q_\alpha(t)$ mediante el uso de un algoritmo estilo Gillespie, y $\mathbf{\Pi}_{0\beta}$ para realizar el cálculo el $F(t)$ óptimo usando el criterio de χ^2	20
3.1.	Curvas correspondientes al experimento 1 para 20, 30 y 40 °C en hojas de espinaca con barras de error representativas	22

3.2. Curvas correspondientes al experimento 2 para 20, 30 y 40 °C en hojas de espinaca con barras de error representativas	22
3.3. Curvas correspondientes al experimento 3 para 20, 30 y 40 °C en hojas de espinaca con barras de error representativas	23
3.4. Curvas correspondientes al experimento 1 y al experimento 3 para 20 °C, en hojas de espinaca con barras de error representativas	23
3.5. Curvas correspondientes al experimento 1 y al experimento 3 para 30 °C, en hojas de espinaca con barras de error representativas	24
3.6. Curvas correspondientes al experimento 1 y al experimento 3 para 40 °C, en hojas de espinaca con barras de error representativas	24
3.7. Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.2	25
3.8. Comparación entre curva experimental para 30 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.3	26
3.9. Comparación entre curva experimental para 40 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.4	27
3.10. Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.6	29
3.11. Comparación entre curva experimental para 30 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.7	30
3.12. Comparación entre curva experimental para 40 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.8	31
3.13. Experimento 1 de la serie 2	32
3.14. Experimento 2 de la serie 2	32
3.15. Experimento 3 de la serie 2	32
3.16. Comparación entre el experimento 1 y el experimento 3 para 20 °C de la serie 2.	33
3.17. Comparación entre el experimento 1 y el experimento 3 para 30 °C de la serie 2.	34
3.18. Comparación entre el experimento 1 y el experimento 3 para 40 °C de la serie 2.	34
3.19. Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.10	35
3.20. Comparación entre curva experimental para 30 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.11	36
3.21. Comparación entre curva experimental para 40 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.12	37

3.22. Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.14	38
3.23. Comparación entre curva experimental para 30 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.15	39
3.24. Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.16	40

Índice de tablas

2.1. Parámetros con los que se calculó las diferentes evoluciones temporales de $F(t)$, presentados en la Figura 2.1.	11
3.1. Tabla de pesos de las hojas para los 3 experimentos.	21
3.2. Resultado del ajuste de curvas de 20 °C. del experimento 1	25
3.3. Resultado del ajuste de curvas de 30 °C. del experimento 1	26
3.4. Resultado del ajuste de curvas de 40 °C. del experimento 1	27
3.5. Resultado del ajuste de curvas de en el experimento 1.	28
3.6. Resultado del ajuste de curvas de 20 °C de la serie 1 para el experimento 3.	28
3.7. Resultado del ajuste de curvas de 30 °C de la serie 1 para el experimento 3	29
3.8. Resultado del ajuste de curvas de 40 °C de la serie 1 para el experimento 3	30
3.9. Tabla de pesos de las hojas para los 3 experimentos de la segunda serie	31
3.10. Resultado del ajuste de curvas de 20 °C de la serie 2 para el experimento 1.	35
3.11. Resultado del ajuste de curvas de 30 °C de la serie 2 para el experimento 1.	35
3.12. Resultado del ajuste de curvas de 40 °C de la serie 2 para el experimento 1.	36
3.13. Resultado del ajuste de curvas de 20, 30 y 40 °C para la serie 2 del experimento 1.	37
3.14. Valores con los que se calculó el ajuste de curvas de 20 °C para el experimento 3 de la serie 2.	38
3.15. Resultado del ajuste de curvas de 30 °C de la serie 2 para el experimento 3.	39
3.16. Resultado del ajuste de curvas de 40 °C de la serie 2 para el experimento 3.	39

3.17. Parámetros con los que se realizó el ajuste para las curvas de 20, 30 y 40 °C del experimento 3 de la serie 2.	41
3.18. Valores con los que se calculó el ajuste de curvas de 20, 30 y 40 °C en el experimento 3 de la serie 1.	41

Abstract

In this study the chlorophyll *a* fluorescence induction curves, Kautsky curves, of spinach leaves at 20, 30 and 40 °C were obtained and analyzed using a theoretical model that directly includes the presence of different sections within the curves. The model proposes the existence of three types of photosynthetic domains that host specific types of reaction centers; which undergo the transitions responsible for the corresponding emission of fluorescence of each of the three regions of Kautsky (OJ-JI-IP) curve. Considering the kinetic characteristics of transitions the temporal evolution of the concentration of each type of reaction center was found in the closed state. The model provides a functional relationship between these concentrations and fluorescence which includes eleven parameters, they were found by fitting the model to the experimental curves. For 20 °C the values of the kinetic constants corresponding to the OJ-JI-IP sections are: 2.66576 $[\frac{1}{ms}]$, 0.14612 $[\frac{1}{ms}]$ and 0.0099 $[\frac{1}{ms}]$. With the temperature change it was found that the first section of the curves (OJ) increased corresponding to its kinetic constant, in the third or last section (IP) the corresponding rate constant does not show significant changes. However, the second section (JI) shows an abnormal evolution with the presence of a local maximum at 40 °C, this suggests the existence of reverse transitions to those considered in the model, and the inhibition of fluorescence processes.

Resumen

En este estudio se obtuvieron curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a*, curvas Kaustky, de hojas de espinaca a 20, 30 y 40 °C y se las analizó con ayuda de un modelo teórico que incluye directamente la presencia de diferentes secciones dentro de las curvas. El modelo utilizado propone la existencia de tres tipos de dominios fotosintéticos que albergan tipos específicos de centros de reacción; los cuales experimentan las transiciones responsables de la emisión de la fluorescencia correspondiente a cada una de las tres regiones de una curva Kautsky (OJ-JI-IP). Considerando las características cinéticas de las transiciones se encontró la evolución temporal de la concentración de cada tipo de centro de reacción en estado cerrado. El modelo establece una relación funcional entre la fluorescencia y estas concentraciones que incluye once parámetros, éstos se encontraron mediante el ajuste del modelo a las curvas experimentales. Para 20 °C los valores de las constante cinéticas correspondientes a las secciones OJ-JI-IP son: $2.66576 \left[\frac{1}{ms} \right]$, $0.14612 \left[\frac{1}{ms} \right]$ y $0.0099 \left[\frac{1}{ms} \right]$. Con el cambio de temperatura se encontró que la primera sección de las curvas (OJ) presenta un incremento de la constante cinética correspondiente, en la tercera o última sección (IP) se aprecia que la constante cinética correspondiente no muestra cambios significativos. Sin embargo, la segunda sección (JI) muestra una evolución anómala con la presencia de un máximo local a 40 °C, esto sugiere la existencia de transiciones inversas a las consideradas en el modelo, así como de procesos de inhibición de fluorescencia.

Capítulo 1

Fundamentos biofísicos

La fotosíntesis es un proceso físico-químico que realizan las plantas, mediante el cual utilizan energía de la luz solar para realizar la síntesis de compuestos orgánicos. La ecuación general del proceso fotosintético es:



La fotosíntesis ocurre en los cloroplastos de las células vegetales (Figura 1.1) [2]. Estos organelos, están delimitados por dos membranas. La membrana interior actúa como barrera, controlando el flujo de moléculas orgánicas cargadas dentro y fuera de los cloroplastos [3], mientras que la membrana exterior es permeable a la mayoría de iones. Estas dos membranas están separadas por un espacio de 10–20 nm. [1].

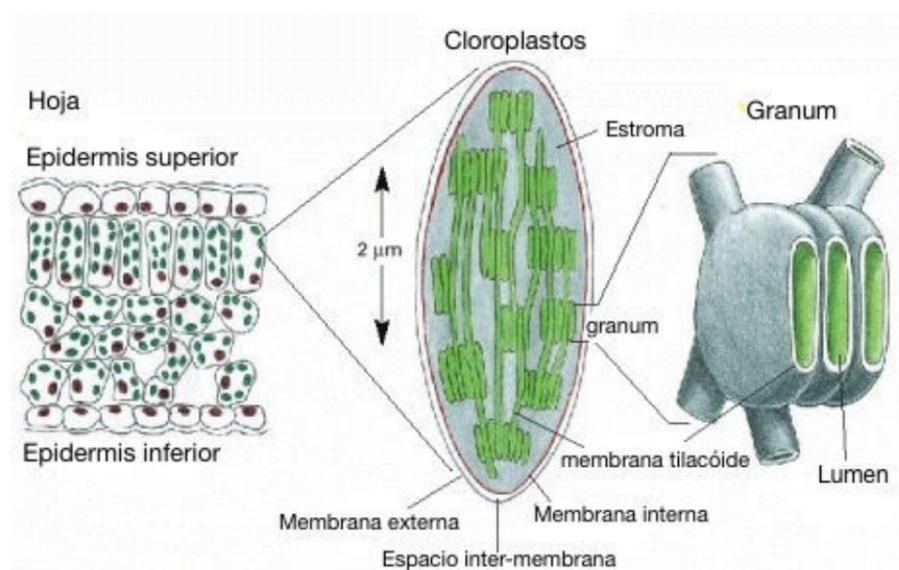


Figura 1.1: Cloroplastos en las células vegetales. Figura adaptada de [4].

Dentro de los cloroplastos se encuentra la “membrana fotosintética” la cual contiene pigmentos fotosintéticos como la clorofila (un pigmento es una molécula que absorbe determinadas longitudes de onda de la luz solar), los carotenoides, además de diversos lípidos, proteínas y enzimas necesarios para la fotosíntesis [1].

1.1. Membrana fotosintética

La membrana fotosintética es una estructura cerrada, con un exterior acuoso llamado estroma, y un interior igualmente acuoso conocido como lumen; su organización se puede describir como un grupo de sacos membranosos apilados e interconectados [1].

Existen 5 tipos principales de complejos proteínicos en la membrana tilacoidal: Un complejo antena (LHC), el fotosistema II (PSII), el fotosistema I (PSI), el complejo citocromo b_6/f y el complejo ATP sintasa (Figura 1.2) [2]. La absorción de la luz se da mediante de los complejos antena (LHC) y por micro-antenas dentro de cada fotosistema. Cada fotosistema posee un centro de reacción en donde se encuentra un grupo de clorofilas que óptimamente absorben a cierta longitud de onda. Bajo condiciones normales el flujo de electrones va desde el fotosistema II a través del complejo citocromo b_6/f hacia el fotosistema I [10].

Un complejo antena contiene entre 250-400 pigmentos que absorben la energía y la

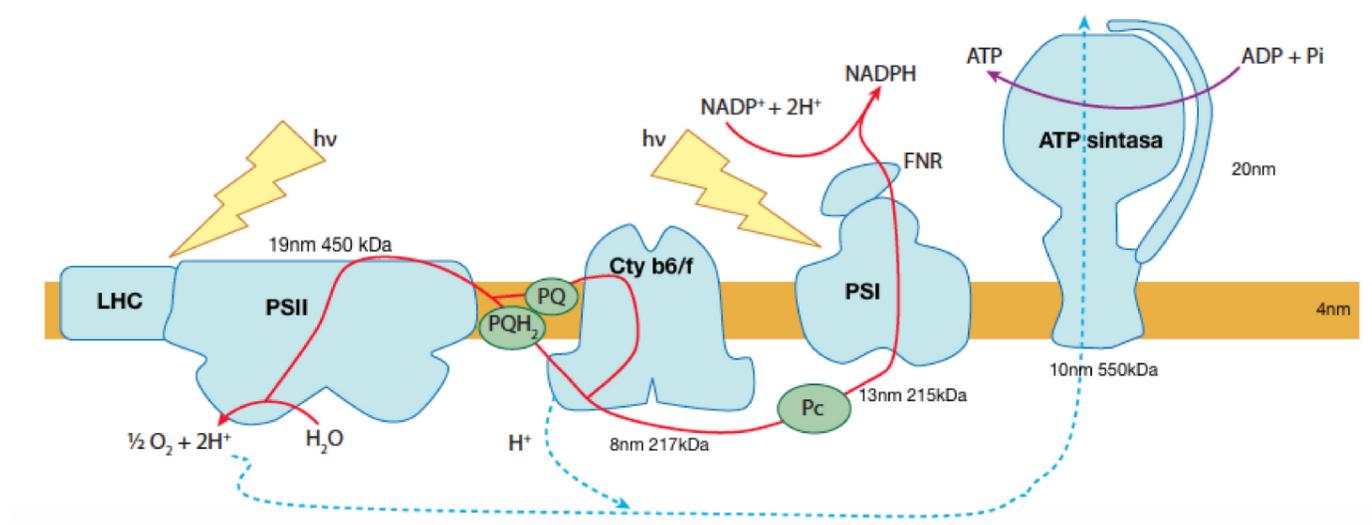


Figura 1.2: Esquema del proceso fotosintético en la membrana tilacoidal. Figura Adaptada de [9].

transfieren mediante resonancia a una clorofila a en el centro de reacción del fotosistema II (Figura 1.3) [6]. Los pigmentos que predominan en este complejo son las clorofilas b y los carotenoides. En conjunto se define una unidad fotosintética (PSU) como el conglomerado molecular que incluye alrededor de 300 clorofilas asociadas a un centro de reacción donde se inician las reacciones que producen la fotosíntesis [13, 14]. Las clorofilas son las encargadas de absorber fotones, mientras que los carotenoides tienen un rol de fotoprotección en caso de exceso de luz.

El fotosistema II utiliza los fotones para oxidar dos moléculas de agua y así obtener una molécula de oxígeno molecular. Los cuatro electrones removidos del agua intervienen en varias reacciones REDOX, para finalmente reducir $NADP^+$ a $NADPH$. Como

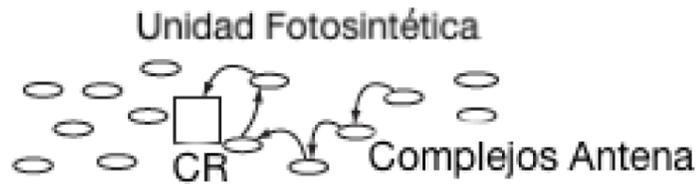


Figura 1.3: Vista esquemática del transporte de energía desde los complejos antena hasta el centro de reacción (CR) [6].

consecuencia del transporte de protones se genera un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal. Este gradiente genera una fuerza motriz protónica usada para sintetizar ATP por el complejo ATP sintasa [10].

1.2. El proceso fotosintético

La fotosíntesis comienza con la absorción de fotones por parte de los complejos antena, la energía se transfiere entre los complejos antena en forma de excitones hacia los centros de reacción gracias a la interacción de los momentos dipolares de las moléculas. En el fotosistema II (PSII), la energía de los fotones es utilizada para dos reacciones químicas: la oxidación del agua y la reducción de la plastoquinona con la ayuda de más de quince polipéptidos y nueve diferentes componentes REDOX como por ejemplo: clorofila, feofitina, plastoquinona, etc [1]. A esta secuencia de reacciones REDOX se la conoce como cadena de transferencia de electrones.

1.2.1. Cadena de transferencia de electrones

Una vez que la energía del fotón absorbido se transmite al centro de reacción del fotosistema II mediante excitones se induce la excitación del conjunto P_{680} , entonces se tiene:



Posteriormente, P_{680}^* transfiere el electrón a la molécula feofitina (Pheo) y se carga positivamente. P_{680}^+ es el agente encargado de oxidar al agua, mientras que la feofitina transfiere el electrón que reduce a la molécula Q_A , ésta es una plastoquinona que acepta solamente un electrón a la vez [3, 1].

En general, los centros de reacción pueden estar en dos estados, abiertos o cerrados. Se define un centro de reacción cerrado cuando posee la siguiente configuración [7]:



Cuando Q_A ya esta reducida puede transferir un electrón a la molécula Q_B dejando al sistema abierto como en la configuración 1.4.



El proceso debe repetirse de manera que Q_B tenga dos electrones [7, 17]. Posteriormente, cuando Q_B se reduce a la forma Q_B^{2-} se protoniza, tomando protones del estroma produciéndose PQH_2 llamado plastoquinol [17, 23] Como se indica en la Figura 1.4. Finalmente los productos pasan al complejo citocromo b_6/f .

La oxidación del agua requiere dos moléculas de agua y cuatro procesos secuenciales

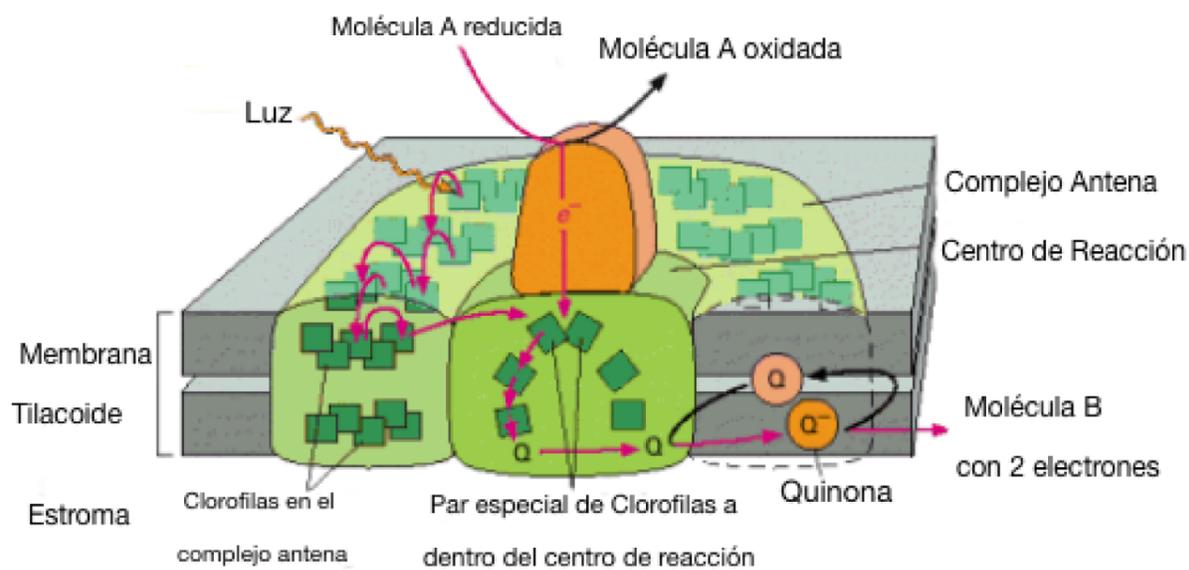


Figura 1.4: Figura esquemática de los complejos antena del fotosistema II y las clorofilas de centro de reacción. La energía va desde el complejo antena hacia el centro de reacción lo que permite obtener una molécula Q_B reducida con dos electrones [5].

en el centro de reacción. Cada reacción fotoquímica crea un agente oxidante [17].

La reacción neta resulta en la creación de una molécula de O_2 , además del depósito de cuatro protones en el estroma, y la transferencia de cuatro electrones al sitio de Q_B (produciendo dos plastoquinonas reducidas). La transferencia de protones genera un gradiente δH que permite la creación de la ATP [17, 23].

1.3. Fluorescencia Inducida

La fluorescencia inducida de clorofila a se obtiene cuando hojas adaptadas a la obscuridad se iluminan con luz que promueve la fotosíntesis (luz actínica) al mismo tiempo que se aplica un pulso intenso de luz (pulso saturado) capaz de excitar a todos

los centros de reacción. El pulso saturado tiene como objetivo excitar a todos los centros de reacción de modo que estos se cierran. Al estar todos cerrados se permite que en estas condiciones la fluorescencia sea máxima [27].

La energía absorbida por las clorofilas de las hojas puede disiparse mediante la fotosíntesis, la emisión de fluorescencia y emisión de calor [2]. La fotosíntesis requiere que Q_B este doblemente reducida, por lo que para analizar la fluorescencia es necesario impedir que esto ocurra. La fluorescencia se origina principalmente por la desexcitación de las clorofilas a del centro de reacción del fotosistema II [7].

La evolución temporal de la fluorescencia inducida $F(t)$, se conoce como curva Kautsky o curva OJIP ya que posee tres regiones (OJ-JI-IP) según se muestra en la Figura 1.5 [18, 17].

Cada una de estas regiones poseen tiempos característicos de duración los cuales

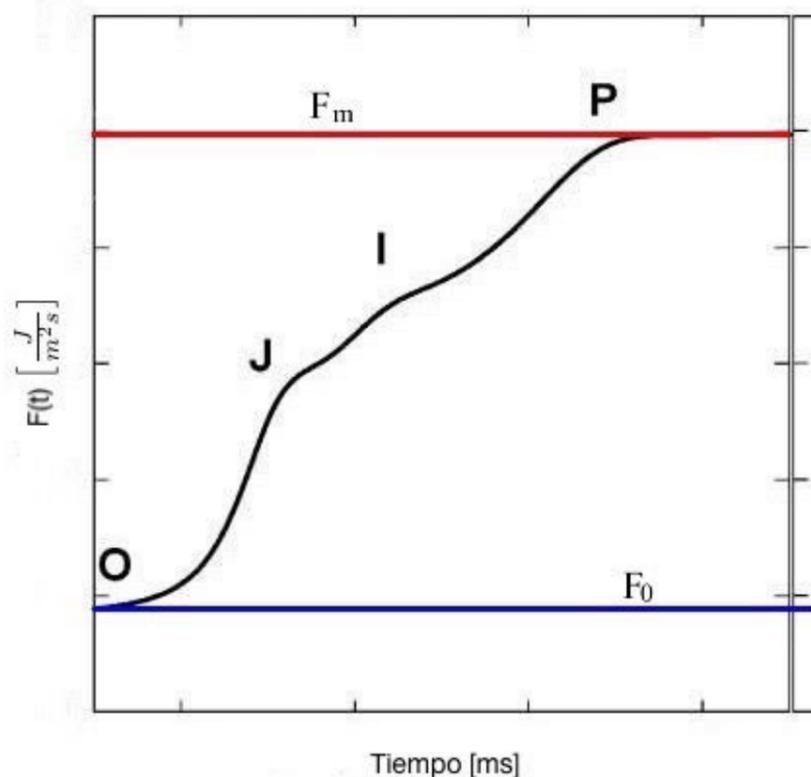


Figura 1.5: Evolución temporal de Fluorescencia inducida $F(t)$. F_0 es el valor inicial de fluorescencia y F_m el máximo. Figura adaptada de Lazar et al. [18]

son: OJ [0-3]ms, JI [3-30]ms e IP [30-200]ms. La primera etapa (OJ) se conoce como la fase fotoquímica ya que en esta fase el proceso principal es el aumento de la concentración de la especie Q_A^- [18], mientras que (JIP) se conoce como la fase térmica por su sensibilidad a las variaciones de temperatura [18]. Varios estudios han demostrado que las curvas Kautsky son sensibles a la temperatura [19, 17, 18].

1.4. Modelos para la Fluorescencia Inducida

No existe un modelo que logre explicar satisfactoriamente todas las características de las curvas de la fluorescencia inducida de clorofila *a*. El modelo base con el que se trabaja es el denominado “Modelo Q_A ”, este modelo afirma que la emisión de la fluorescencia se debe enteramente a la reducción de Q_A [29, 17, 27].

El “Modelo Q_A ”, explica adecuadamente la forma de la curva de fluorescencia inducida en presencia del herbicida DCMU ($C_9H_{10}Cl_2N_2O$, 3 – (3,4 – *diclorofenil*) – 1,1 – *dimetilurea*) (Figura 1.6). El DCMU es un herbicida que es capaz de bloquear el paso de electrones entre Q_A y Q_B lo que permite alcanzar un máximo de fluorescencia [29].

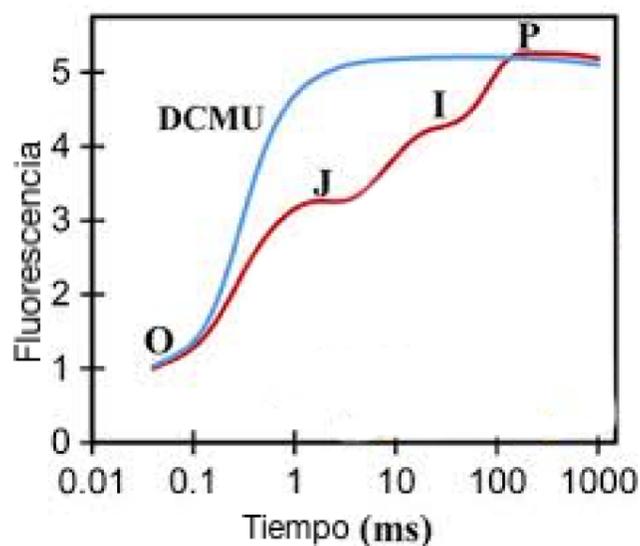


Figura 1.6: Evolución temporal de Fluorescencia inducida $F(t)$ solo debido a la reducción de Q_A bajo el efecto de DCMU. Figura adaptada de [18].

Se han identificado varias inconsistencias entre este modelo y los datos experimentales [29] son:

- Un pulso saturado, el cual debería inducir toda la fluorescencia, induce apenas un 60 – 65 % de la misma.
- F_m es alcanzado solamente tras la exposición a varios haces saturados.
- En presencia del DCMU se logra excitar con un pulso saturado apenas el 70 – 75 % de la fluorescencia inducida

Debido a estos argumentos se ha planteado la necesidad de alternativas para el Modelo Q_A , las inconsistencias sugieren la existencia de procesos adicionales involucrados en la emisión de fluorescencia [18].

Varias ideas se han propuesto para conciliar las inconsistencias del modelo Q_A que según [29] son:

- En la cadena de transferencia de electrones existen más reacciones REDOX, que provocan que la fase térmica se deba a la reducción de Q_B , más no está acorde a observaciones experimentales.
- Los centros de reacción del fotosistema II son heterogéneos $\alpha - \beta - \gamma - \delta$, de esta manera se explicarían las dos fases de la inducción de fluorescencia en presencia de DCMU.
- Existe un campo eléctrico transmembranal, el cual es encargado de inducir la separación de carga, se propone que el campo aumenta en las fases OJIP, sin embargo, se ha observado que el campo eléctrico disminuye en la fase IP.

Particularmente, se ha propuesto que cambios conformacionales en los complejos proteínicos, los cuales son variaciones en la estructura espacial de las proteínas que forman parte de las unidades fotosintéticas, como el denominado *CP47*, están también involucrados en la generación de las curvas Kautsky [29]. Sin embargo, hasta el momento no se ha planteado un modelo que incluya la noción de los cambios conformacionales para el análisis de la fluorescencia inducida [29, 17].

En este trabajo se obtuvieron curvas experimentales de fluorescencia inducida de clorofila *a* bajo las temperaturas de 20, 30 y 40 °C. Además se desarrolló un modelo que describe los procesos que dan origen a la curva Kautsky, el cual es una extensión del modelo propuesto por Paillotin [13, 7, 18]. El modelo planteado propone que cada región de la curva Kautsky, tiene asociado un tipo de dominio específico que es responsable de la emisión de fluorescencia de cada una de las regiones.

Capítulo 2

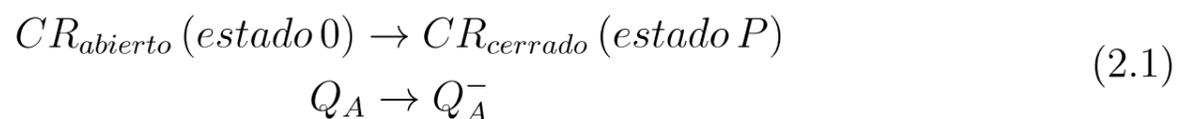
Métodos

2.1. Modelo teórico

2.1.1. Modelo de Paillotin

Este modelo plantea la existencia de unidades fotosintéticas asociadas a cada centro de reacción, las cuales a su vez se agrupan en dominios fotosintéticos con al menos cuatro centros de reacción [13]. Un centro de reacción puede estar abierto o cerrado dependiendo del estado de oxidación de Q_A .

El proceso de transición entre estos dos estados se representa de la siguiente manera:



Considerando N dominios fotosintéticos idénticos con r centros de reacción, el rendimiento de fluorescencia $V(t)$ macroscópico viene dado por:

$$V(t) = \sum_{i=0}^r \frac{\bar{n}_i}{N} \varphi_i = \left\langle \varphi \left(\frac{i}{r} \right) \right\rangle \tag{2.2}$$

Donde \bar{n}_i es el número promedio de dominios con i centros de reacción cerrados y φ_i es el rendimiento correspondiente [13].

La concentración de centros de reacción cerrados, q se define como [13]:

$$q = \sum_{i=0}^r \frac{\bar{n}_i}{N} \frac{i}{r} = \left\langle \frac{i}{r} \right\rangle \tag{2.3}$$

Es de interés relacionar $V(t)$ con q

Desarrollando $\varphi\left(\frac{i}{r}\right)$ en series de Taylor alrededor de q se obtiene:

$$\varphi\left(\frac{i}{r}\right) = \varphi(q) + \frac{\varphi'(q)}{1!} \left(\frac{i}{r} - q\right) + \frac{\varphi''(q)}{2!} \left(\frac{i}{r} - q\right)^2 + \dots \quad (2.4)$$

Hallando el promedio de 2.4 se tiene que:

$$\left\langle \varphi\left(\frac{i}{r}\right) \right\rangle = \langle \varphi(q) \rangle + \left\langle \frac{\varphi'(q)}{1!} \left(\frac{i}{r} - q\right) \right\rangle + \left\langle \frac{\varphi''(q)}{2!} \left(\frac{i}{r} - q\right)^2 \right\rangle + \dots \quad (2.5)$$

Entonces,

$$V(t) = \left\langle \varphi\left(\frac{i}{r}\right) \right\rangle = \varphi(q) + \frac{1}{2r^2} \langle (i - \langle i \rangle)^2 \rangle \varphi(q)'' + \dots \quad (2.6)$$

De esta relación se puede concluir que, $\frac{1}{r^2} \ll 1$ $V(t) \approx \varphi(q)$ Entonces:

$$\begin{aligned} V(q=0) &= \varphi_0 = \psi_0 \\ & y \\ V(q=1) &= \varphi_r = \psi_P \end{aligned} \quad (2.7)$$

Al inicio del proceso fotoquímico descrito en 2.1 todos los centros de reacción están en el estado abierto ($i = 0$) y asumiendo que el rendimiento de la fluorescencia depende esencialmente de i , se puede afirmar que el rendimiento de fluorescencia de un solo dominio (φ_0) es igual al rendimiento de fluorescencia de una unidad fotosintética aislada (ψ_0) cuyo centro de reacción esta en el estado 0; Análogamente para $i = r$, es decir:

$$\varphi_0 = \psi_0 \quad (2.8)$$

$$\varphi_r = \psi_P \quad (2.9)$$

ψ_P es el rendimiento de fluorescencia de una unidad fotosintética cuyo centro de reacción está en el estado P [13].

El rendimiento de un dominio φ_i , correspondiente a i centros de reacción cerrados, puede escribirse en función del rendimiento cuando $i = 0$ si se considera que las excitaciones migran mediante saltos sucesivos entre unidades fotosintéticas y se utilizan las probabilidades de que los centros de reacción capturen o pierdan las excitaciones de modo que; las expresión encontrada es [13] :

$$\varphi_i \approx \frac{R_P}{R_P - \frac{i}{r}(R_P - 1)} \varphi_0 \quad (2.10)$$

Donde R_P es:

$$R_P \equiv \frac{\varphi_r}{\varphi_0} \equiv \frac{\psi_P}{\psi_0} \quad (2.11)$$

Recordando la ecuación 2.6 se tiene que:

$$V(t) = \langle \varphi_i \rangle = \frac{R_P \varphi_0}{R_P - q(R_P - 1)} \quad (2.12)$$

La variación del rendimiento de fluorescencia se define como:

$$\Delta V(t) = \frac{V(q(t)) - V(q=0)}{V(q=1) - V(q=0)} = \frac{\frac{R_P \varphi_0}{R_P - q(R_P - 1)} - \varphi_0}{\varphi_r - \varphi_0} = \frac{q}{R_P(1 - q(1 - \frac{1}{R_P}))} \quad (2.13)$$

Definiendo a $p = 1 - \frac{1}{R_P}$ tenemos que:

$$\Delta V(t) = \frac{(1-p)q(t)}{1-pq(t)} \quad (2.14)$$

p se conoce como el parámetro de conectividad entre dominios. Experimentalmente:

$$\Delta V(t) = \frac{F(t) - F_0}{F_m - F_0} \quad (2.15)$$

Entonces, igualando 2.14 con 2.15 se tiene que:

$$\Delta V(t) = \frac{F(t) - F_0}{F_m - F_0} = \frac{(1-p)q(t)}{1-pq(t)} \quad (2.16)$$

A partir de 2.16 se puede afirmar que:

$$F(t) = F_0 + (F_m - F_0) \frac{(1-p)q(t)}{1-pq(t)} = F_0 + a \frac{q(t)}{1-pq(t)} \quad (2.17)$$

Donde $a = (F_m - F_0)(1-p)$.

A continuación se presentan las gráficas de la evolución de $F(t)$ según la ecuación 2.17. A medida que el tiempo avanza, tras una transición dada, la concentración de Q_A^- aumenta llegando a un punto de saturación, es decir cuando todos los centros de reacción están cerrados. Como se observa en la Figura 2.1, este modelo también depende de una constante cinética que marca la velocidad a la cual se da la transición, además de poseer la forma sigmoideal.

Las curvas fueron construidas con los valores mostrados en la tabla 2.1. Donde k es la constante cinética, F_0 es el valor de la fluorescencia inicial y N es el número de partículas.

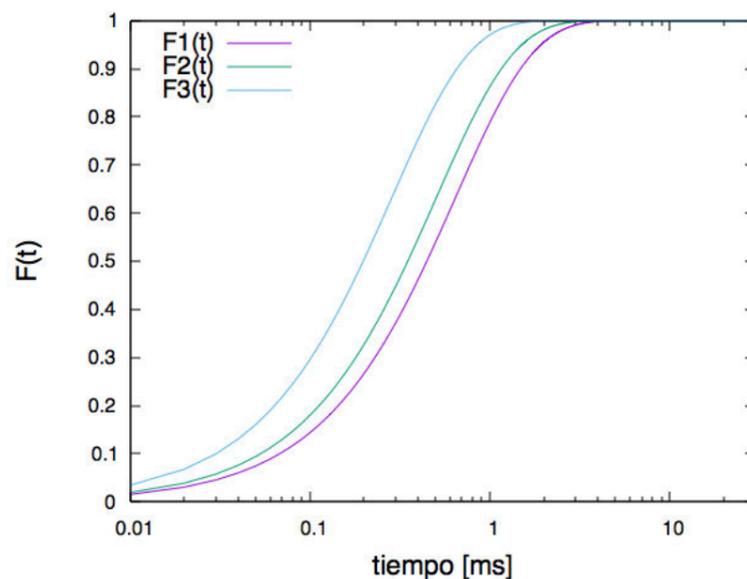


Figura 2.1: Curvas obtenidas de la ecuación 2.17 para los parámetros mostrados en la tabla 2.1. El tiempo está en escala logarítmica

Parámetro	$F_1(t)$	$F_2(t)$	$F_3(t)$
p	0.1	0.1	0.1
$k \left[\frac{1}{ms} \right]$	1.55	1.98	3.5
F_0	1.702	1.832	3.95
N	500000000	500000000	500000000

Tabla 2.1: Parámetros con los que se calculó las diferentes evoluciones temporales de $F(t)$, presentados en la Figura 2.1.

2.1.2. Modelo Propuesto

La suposición principal en este estudio es la de considerar que el modelo de Paillotin describe el comportamiento de la fluorescencia en una región aislada (OJ, JI o JP) de la curva Kautsky. Considerando que existen tres regiones en una curva Kautsky (Figura 1.5) se propone la existencia de tres dominios cada uno asociado a un proceso de transición y a una de las tres regiones de la curva de emisión de fluorescencia inducida de clorofila a . En analogía con la ecuación 2.17 ahora se tiene que:

$$F(t) = F_0 + \sum_{\alpha=1}^3 a_{\alpha} \frac{q_{\alpha}(t)}{1 - p_{\alpha} q_{\alpha}(t)} \quad (2.18)$$

Donde:

F_0 son los valores iniciales de fluorescencia

a_{α} son los pesos estadísticos de cada término

p_{α} son términos característicos del complejo y los parámetros de conectividad

q_{α} es la fracción de centros de reacción cerrados de cada tipo de dominio

Estos dominios se diferencian entre si debido al estado en los que se hallen como se muestra en la figura 2.2. Cada tipo de dominio influye en una región específica de la curva Kautsky, además los procesos están ligados, de tal forma que tras llegar a cierto

valor umbral temporal se desencadena el siguiente proceso.

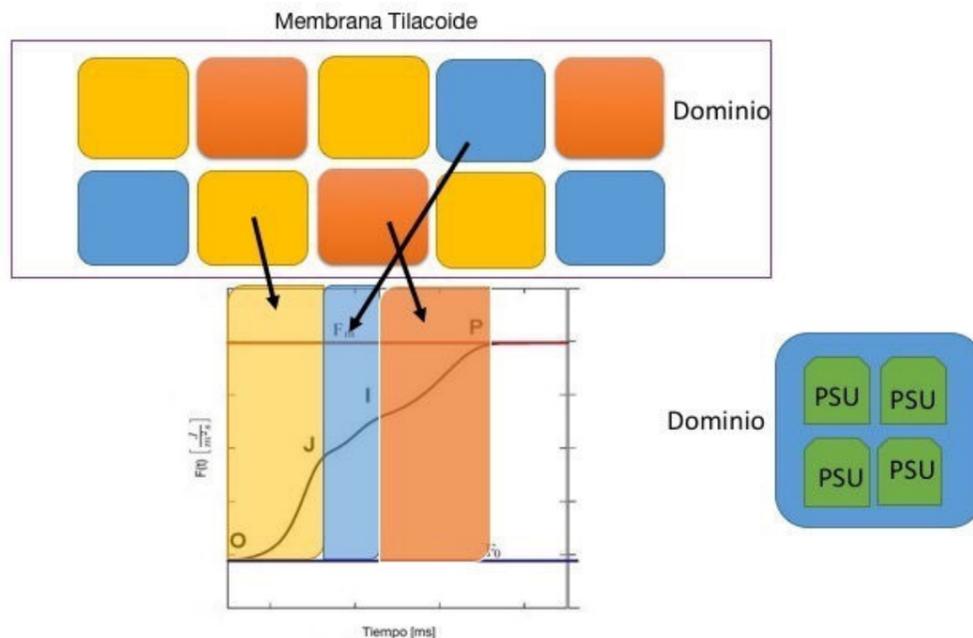


Figura 2.2: Relación entre los dominios propuestos y las regiones de la curva Kautsky.

2.1.2.1. Cinética de las transiciones

La evolución temporal de la concentración de los centros de reacción en determinado estado (abierto o cerrado) de los tres tipos de dominios de la curva Kautsky esta asociada a las transiciones:



Donde:

A_{α} es la concentración de centros de reacción abiertos en un dominio tipo α

B_{α} es la concentración de centros de reacción cerrados en un dominio tipo α

k_{α} constante cinética de la transición.

Las transiciones de la forma 2.19 podrían ser consideradas cambios conformacionales. Dichos cambios son capaces de provocar procesos como la reducción de Q_A , que es fundamental para la emisión de fluorescencia [17].

Existe una conformación inactiva I (centros de reacción abierto) y otra activa II (centros de reacción cerrados). Estas transiciones promueven la emisión de fluorescencia.

El primer proceso, ligado a la región OJ, es:



Después de este proceso, cuando el tiempo llega a cierto valor umbral, la siguiente transición comienza, entonces:



$$k_2 = \begin{cases} 0 & t < T_1 \\ k_2 & t \geq T_1 \end{cases} \quad (2.22)$$

Mientras que para el tercer proceso:

$$A_3 \xrightarrow{k_3} B_3 \quad (2.23)$$

$$k_3 = \begin{cases} 0 & t < T_2 \\ k_3 & t \geq T_2 \end{cases} \quad (2.24)$$

donde T_1 y T_2 son valores de umbrales temporales que define el inicio de la segunda y tercera transición respectivamente.

2.2. Experimentos

2.2.1. Preparación de muestras

Los experimentos se realizaron con secciones de hojas frescas de espinaca con un área de 4 cm^2 . Estas fueron lavadas y pesadas al iniciar el experimento con esto se obtiene el valor (m_i). Posteriormente se colocó las muestras en agua para hidratarlas durante 30 minutos para nuevamente ser pesadas obteniéndose el valor (m_h). El proceso de hidratación permite trabajar con muestras con un contenido de agua similar. Finalmente las hojas se adaptaron a la oscuridad durante diez minutos según se indica en la sección 1.3. [28]. Es importante evaluar la pérdida de agua por parte de la hoja. Si la pérdida es de alrededor del 20 % las curvas se distorsionan [36].

Después de terminado cada experimento se pesó la hoja obteniéndose el valor (m_f). Con los valores obtenidos se calculó la densidad de la hoja según:

$$\delta_h = \frac{m_h}{A_T} \quad (2.25)$$

donde A_T es el área total de la hoja y δ_h es la densidad inicial con hidratación de la misma,

$$\delta_f = \frac{m_f}{A_x} \quad (2.26)$$

donde A_x es el área de 4 cm^2 de la hoja y δ_f es la densidad final de la muestra.

2.2.2. Medidor de fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia se realizaron con el analizador de fluorescencia “Multiple Excitation Wavelength Chlorophyll Fluorescence Analyzer” (MC-PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). El equipo utiliza plataforma Windows con el software llamado PAMWIN, para los experimentos se utilizó un computador portátil Acer i5. En la figura 2.3 se muestra el equipo usado. En la figura 2.4 se presenta la hoja acoplada al equipo.

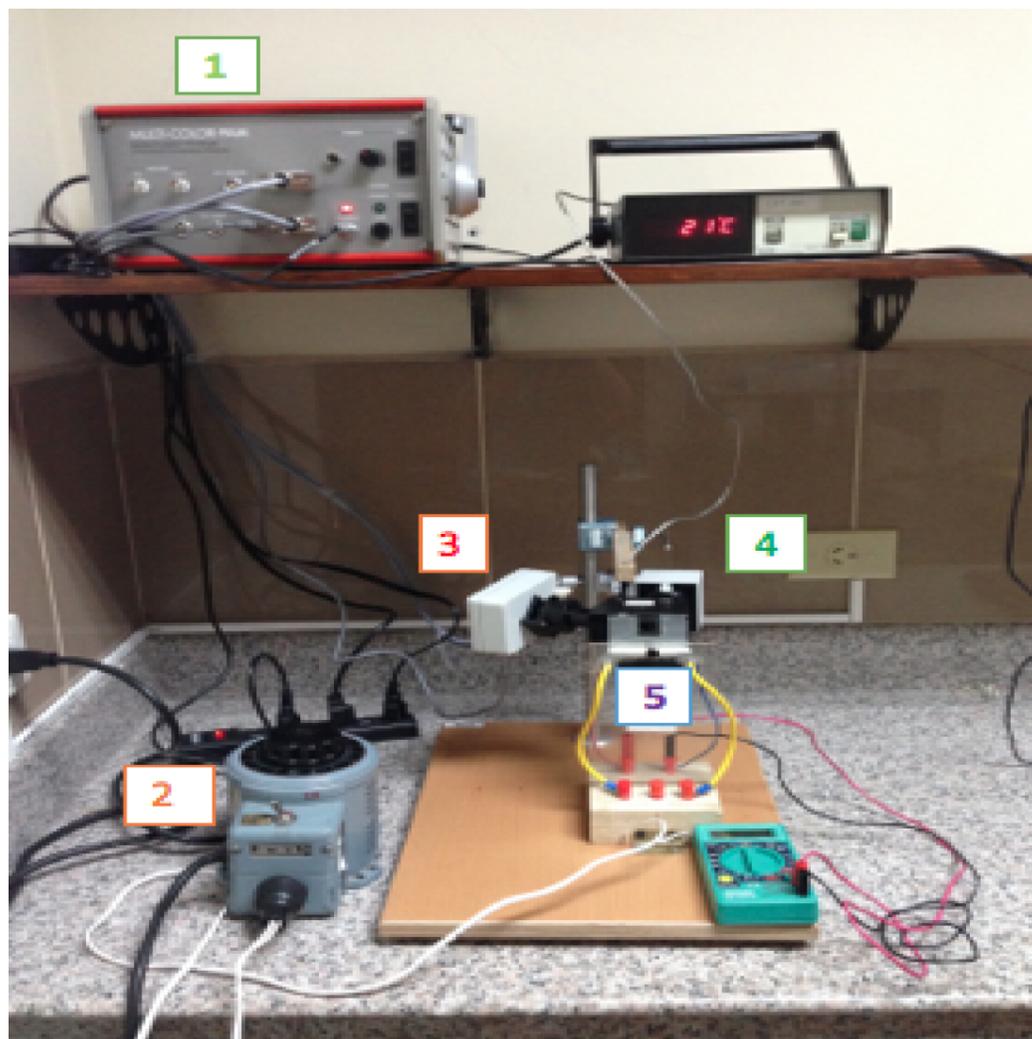


Figura 2.3: Montaje experimental: 1: MC-PAM, 2: Variador de voltaje, 3: Detector, 4: Emisor y 5: Resistencia de potencia

Se configuró el equipo con una longitud de onda de 400 nm para la luz actínica. Además se trabajó con una intensidad de $4626 \frac{\mu\text{mol fotones}}{\text{m}^2\text{s}}$ y 440 nm para el pulso saturado. De esta manera se indujo la fluorescencia según se recomienda para mediciones con hojas *in vivo* [26]; además se utilizó un filtro que impide la detección de longitudes de onda mayores a 650 nm para evitar que se exciten otros procesos. Existen tres bandas de absorción de haces de la fluorescencia, 440 nm , 680 nm y 700 nm [35]. En este trabajo se realizó el estudio de la banda azul (440 nm) de fluorescencia, banda importante para el estudio de los mecanismos que muestra la fluorescencia en respuesta a su entorno como por ejemplo el estrés térmico [35]. Además la medición se la realizó en un rango de alrededor de 200 ms como se recomienda en [38, 39, 26].



Figura 2.4: Hoja de espinaca en el porta muestras para el registro de fluorescencia.

2.2.3. Control de Temperatura

El control de temperatura se realizó con un montaje adicional ensamblado para propósito de este estudio. Se usó una resistencia eléctrica de $330\ \Omega$ y potencia de disipación de $25\ W$ para emitir radiación térmica según el voltaje que se le aplique de acuerdo al circuito de la figura 2.5. La temperatura se midió mediante el uso de una termocupla. En la figura 2.6 se presenta el montaje final del MC-PAM.

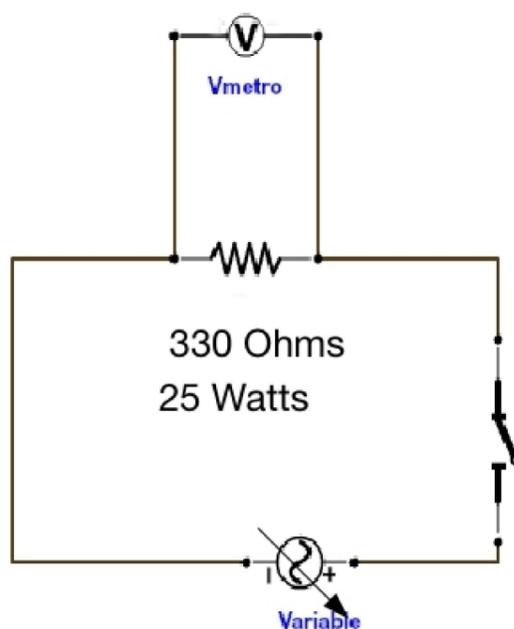


Figura 2.5: Circuito utilizado para controlar la temperatura. Se hace uso de la radiación térmica que emite la resistencia de potencia.

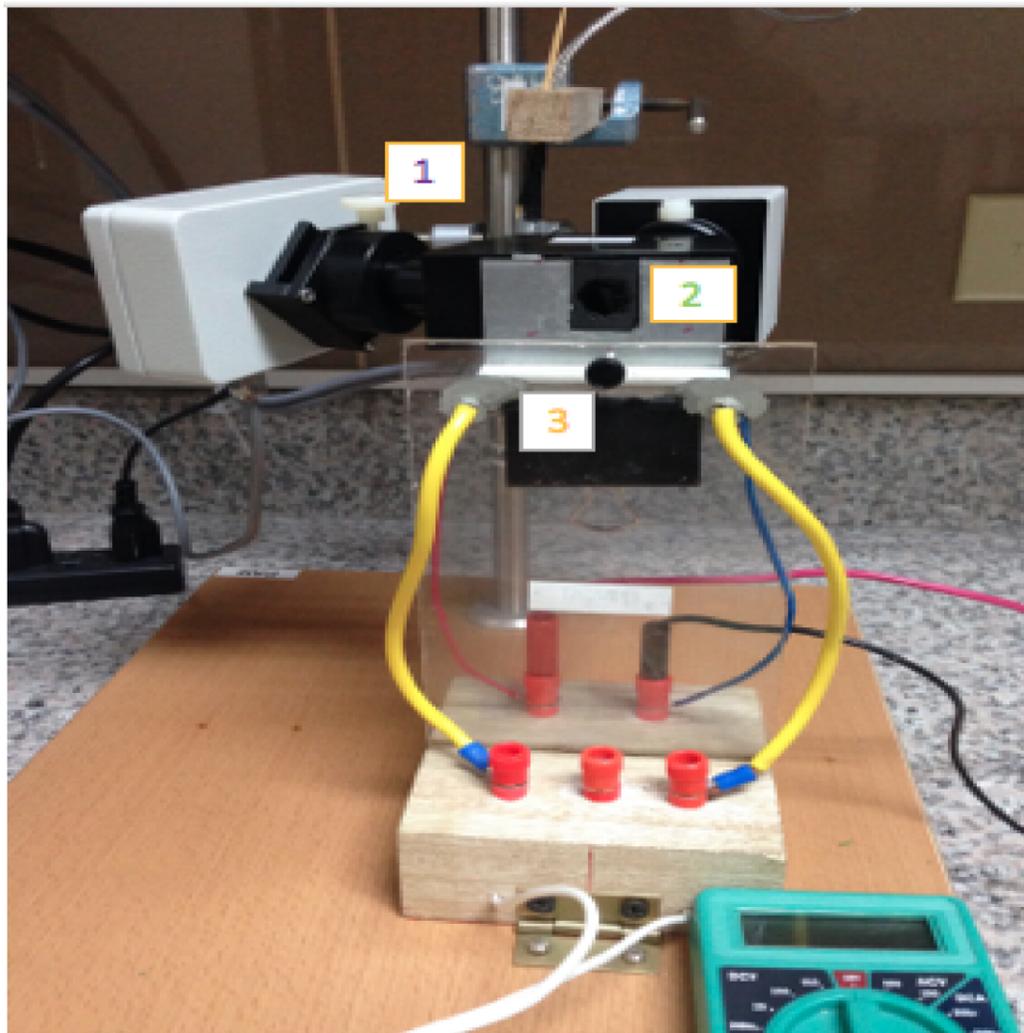


Figura 2.6: Control del temperatura acoplado al sistema para inducir fluorescencia. Montaje experimental: 1: Termocupla, 2: Disipador y 3: Resistencia de potencia

2.2.4. Mediciones

Después de preparar las muestras y configurar el equipo se procedió a tomar las medidas de la evolución temporal de la fluorescencia inducida $F(t)$. Se realizaron tres tipos de experimentos. Cada tipo de experimento se repitió dos veces. Se tomaron curvas a 20, 30 y 40 °C debido a que las curvas a temperaturas intermedias como por ejemplo 25 °C es muy poca la variación de la curva de 20 °C, incluso está dentro de las barras de error de la misma, haciéndola estadísticamente la misma curva. Se partió desde la temperatura ambiente hasta que se halló una temperatura límite que provoca cambio importantes en las curvas Kautsky

EXPERIMENTO 1

En este experimento se tomaron medidas de $F(t)$ para tres temperaturas: 20, 30 y 40 °C
Los pasos de este experimento se detallan a continuación:

1. Se pesó la hoja (m_i)
2. Se hidrató la hoja durante treinta minutos
3. Se pesó la hoja (m_h)

4. Se adaptó la hoja a la oscuridad durante diez minutos
5. Cuando la hoja llegó a 20 °C y se estabilizó en este valor durante cinco minutos, se tomó 10 curvas $F(t)$, con un intervalo de un minuto entre cada toma de medidas [3] para que se reoxide la plastoquinona y los fotosistemas no se saturen, provocando una distorsión en las medidas.
6. Se aumentó el voltaje, de manera que la temperatura llegó a 30 °C
7. Idem paso 5 para 30 °C
8. Se realizó una pausa para hidratar la hoja durante de diez minutos[36]
9. Se aumentó el voltaje, de manera que la temperatura llegó a 40 °C
10. Idem paso 5 para 40 °C
11. Se pesó la hoja (m_f)

EXPERIMENTO 2

En este experimento se tomaron medidas de $F(t)$ sin variar la temperatura, se tomaron las medidas a los tiempos en los que se llegó a 20, 30 y 40 °C en el experimento 1. Los pasos de este experimento se detallan a continuación:

1. Se pesó la hoja (m_i)
2. Se hidrató la hoja durante treinta minutos
3. Se pesó la hoja (m_h)
4. Se adaptó la hoja a la oscuridad durante diez minutos
5. Cuando la hoja llegó a 20 °C y se estabilizó en este valor durante cinco minutos, se tomó 10 curvas $F(t)$, con un intervalo de un minuto entre cada toma de medidas.
6. Se espero el tiempo que tomó llegar a 30 °C en el experimento 1
7. Idem paso 5 para 30 °C
8. Se espero el tiempo que tomó llegar a 40 °C en el experimento 1
9. Idem paso 5 40 °C
10. Se pesó la hoja (m_f)

EXPERIMENTO 3

En este experimento se tomaron medidas de $F(t)$ para tres temperaturas: 40, 30 y 20 °C. Este experimento es un experimento de control, ya que es el inverso del experimento

1. Los pasos de este experimento se detallan a continuación:

1. Se pesó la hoja (m_i)
2. Se hidrató la hoja durante treinta minutos
3. Se pesó la hoja (m_h)
4. Se adaptó la hoja a la oscuridad durante diez minutos
5. Se aumentó el voltaje, de manera que la temperatura llegó a 40 °C
6. Cuando la hoja llegó a 40 °C y se estabilizó en este valor durante cinco minutos, se tomó 10 curvas $F(t)$, con un intervalo de un minuto entre cada toma de medidas.
7. Se disminuyó el voltaje, de manera que la temperatura llegó a 30 °C
8. Idem paso 6 para 30 °C
9. Se disminuyó el voltaje, de manera que la temperatura llegó a 20 °C
10. Idem paso 6 20 °C
11. Se pesó la hoja (m_f)

2.3. Análisis de las curvas experimentales

El análisis de las curvas experimentales incluyó el ajuste de las curvas de fluorescencia con la función $F(t)$ definida en la sección 2.1.2. Como resultado se obtuvieron los valores de los parámetros k_α , a_α , p_α con $\alpha = 1, 2, 3$, T_1 y T_2 . Estos valores corresponden al valor mínimo de χ^2 entre la curva teórica y experimental.

El ajuste de curvas se realizó con un programa escrito en C++, compilado usando GNU G++ en un computador portátil MacBook Pro i5. El programa se presenta en Anexos.

2.3.1. Cálculo de $q(t)$

Para el cálculo de las fracciones q_α se obtiene B_α usando las ecuaciones 2.20:2.24, recordando que:

$$q_\alpha(t) = \frac{B_\alpha}{B_\alpha + A_\alpha} \quad (2.27)$$

Para decidir que transición de las tres planteada ocurre se utiliza el cálculo de un desarrollo al estilo del algoritmo de Gillespie que valida el algoritmo utilizado [40]. Este algoritmo como resultado proporciona tiempos estimados en los cuales se produciría una reacción tipo 2.19. Según [40]:

$$\tau_\alpha = \frac{1}{A_\alpha k_\alpha} \cdot \ln \left(\frac{1}{r_\alpha} \right) \quad (2.28)$$

Donde r_α es un número aleatorio entre 0 y 1.

Como se explicó anteriormente, después de transcurrido cierto tiempo (T_1) se desencadena un segundo proceso, entonces para decidir si se da o no una transición se compara τ_1 con τ_2 , se producirá la reacción con el menor τ_α . Se llega a un segundo umbral temporal (T_2) lo que permite un tercer proceso, de igual manera, se compara los τ_α entre sí, y el de menor valor es el que corresponde a la transición que ocurre. De esta manera si ocurre la transición A_α disminuye mientras B_α aumenta. Las constantes cinéticas k_α y los valores umbrales T_α son definidas para cada curva Kautsky.

2.3.2. Algoritmo para la búsqueda de parámetros

1. Se escoge de un grupo de valores $\mathbf{\Pi}_0$, donde $\mathbf{\Pi}_{0\beta} = \mathbf{\Pi}_0 = (k_1^0, p_1^0, a_1^0, k_2^0, p_2^0, a_2^0, k_2^0, p_2^0, a_2^0, T_1^0, T_2^0)$, que permiten un ajuste inicial aceptable.
2. Posteriormente se escogieron aleatoriamente nuevos valores para estos parámetros ($\mathbf{\Pi}_{i\beta}$) dentro del intervalo $\mathbf{\Pi}_{0\beta} \pm 0,01\mathbf{\Pi}_{0\beta}$
3. Después se calcula χ^2 para cada t , si $\chi_i^2 < \chi_{i-1}^2$ se reemplaza $\mathbf{\Pi}_{0\beta}$ con $\mathbf{\Pi}_{i\beta}$

Se repite el algoritmo 100 veces y se seleccionan los parámetros para los cuales χ_i^2 es mínimo. A su vez este proceso se repitió varias veces usando como $\mathbf{\Pi}_{0\beta}$ a $\mathbf{\Pi}_{i\beta}$ hasta que el valor de χ_i^2 no varié sensiblemente.

Para el cálculo de $F(t)$ se inicia con los valores de $B_1 = B_2 = B_3 = 0$, asumiendo que no se ha dado ninguna transición. El tiempo experimental proporcionado por el equipo es de: $\Delta t_{exp} = 0,01$, por lo que para la simulación se considera el mismo tiempo. Los parámetros $\mathbf{\Pi}_{0\beta}$ se determinaron para realizar el ajuste a la curva experimental calculando $F(t)$ usando el modelo propuesto en la sección 2.1.2.

Para el cálculo del error se utiliza:

$$error = \sqrt{\frac{\sum (F(t)_{exp} - F(t)_{modelo})^2}{N_e}} \quad (2.29)$$

donde N_e es el número de puntos experimentales.

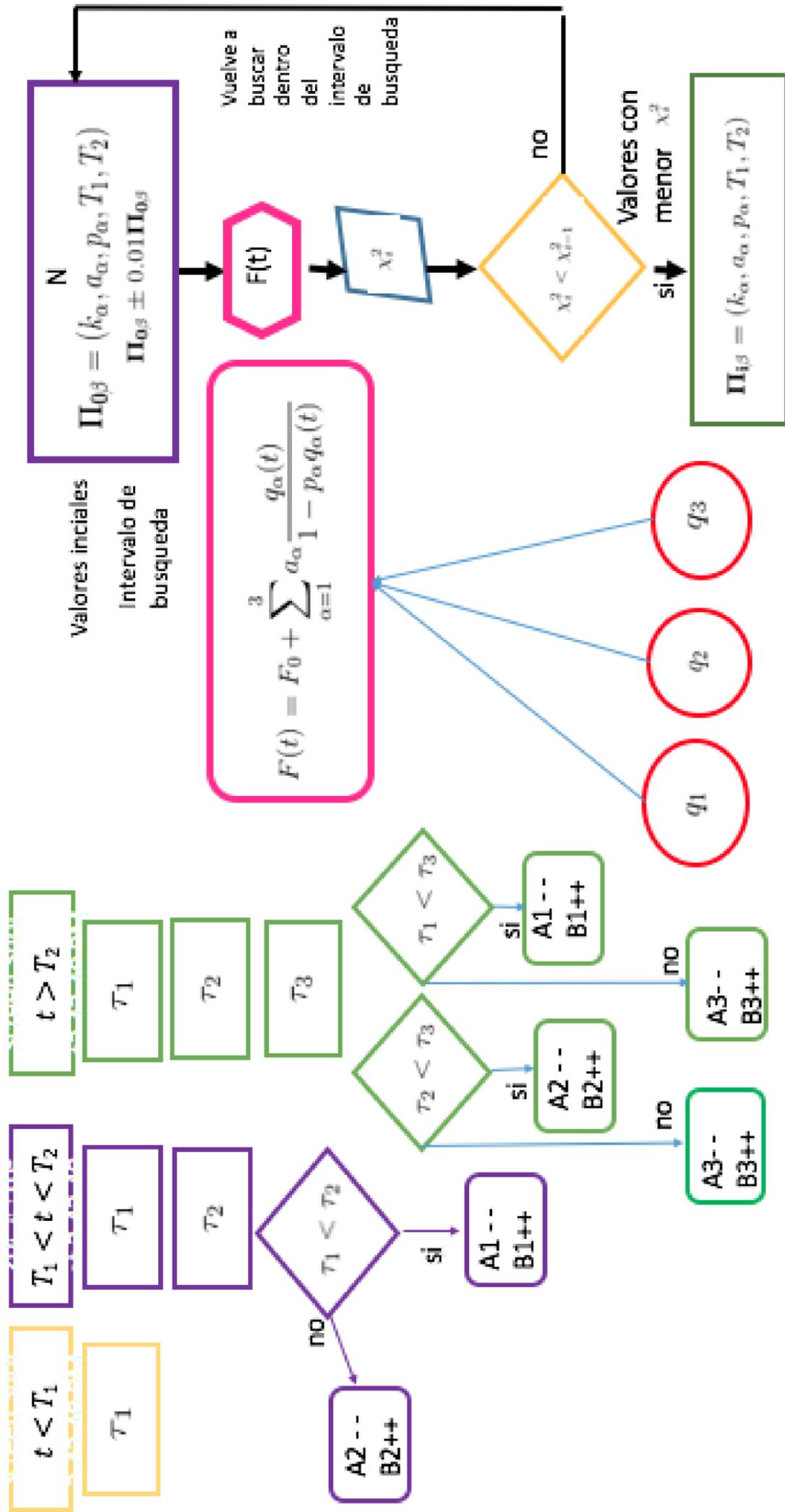


Figura 2.7: Esquema del proceso utilizado para simular $q_\alpha(t)$ mediante el uso de un algoritmo estilo Gillespie, y $\Pi_{0\beta}$ para realizar el cálculo el $F(t)$ óptimo usando el criterio de χ^2 .

Capítulo 3

Resultados

En este capítulo se presentan los resultados de las dos series de experimentos realizados. Éstos se realizaron bajo las mismas condiciones de temperatura, en diferentes hojas y en diferentes días.

Para cada experimento se registraron los pesos, tanto iniciales como finales, para saber si el porcentaje de agua perdido supera el 25 %; de ser así, las curvas estarían distorsionadas debido a la deshidratación extrema de la muestra. En el cuadro 3.1 se observa que para los tres experimentos se mantiene el rango adecuado de hidratación haciendo válidas las curvas tomadas.

Experimento	Peso Inicial [g]	Peso Hidratado [g]	Peso Final [g]	Peso area 2x2 [g]	Tiempo [min]	Ganacia %	Perdida %	densidad 2x2 [^g /cm ²]
1	3.55	3.66	3.1	0.19	72	3.10	18.06	0.05
2	2.91	2.99	2.7	0.2	70	2.75	10.74	0.05
3	3.83	3.98	3.37	0.35	130	3.92	18.10	0.09

Tabla 3.1: Tabla de pesos de las hojas para los 3 experimentos.

3.1. Primera serie de experimentos

En las Figuras 3.1, 3.2 y 3.3 se presenta el promedio de diez curvas por cada experimento. Todas las curvas presentan varias barras de error en color azul, no se grafican todas, sin embargo se presenta una muestra para poder tenerlas como referencia .

Estadísticamente, en el experimento 1, las curvas para 20 °C y 30 °C son apenas diferentes, mientras que la diferencia de forma con la curva de 40 °C es mayor. Cualitativamente se observa que las regiones O-J-I-P son diferentes para las tres curvas.

El experimento 2 muestra que el tiempo no es un factor que afecte a las curvas de fluorescencia inducida. Se tomaron las medidas a los mismos tiempos en los que

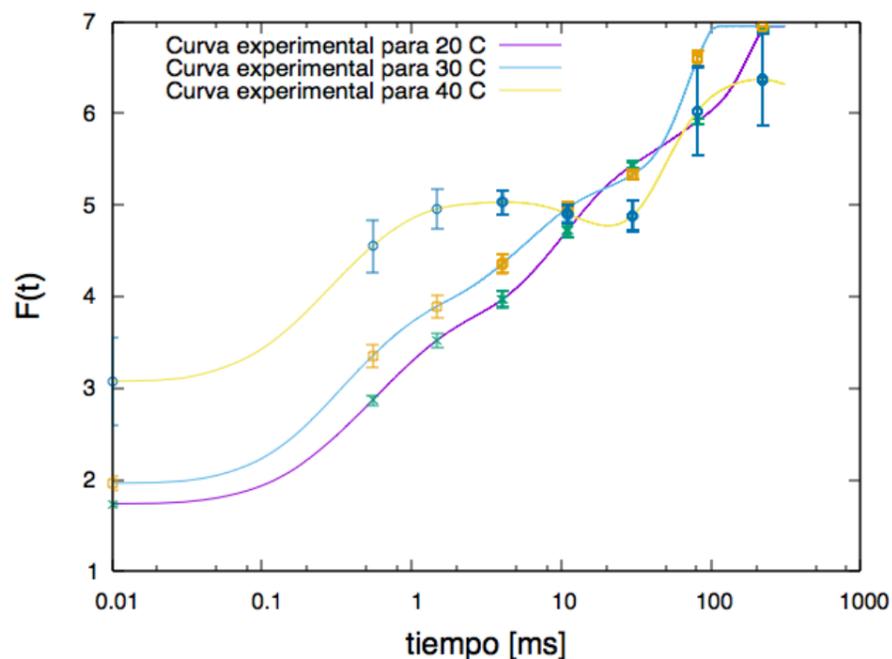


Figura 3.1: Curvas correspondientes al experimento 1 para 20, 30 y 40 °C en hojas de espinaca con barras de error representativas

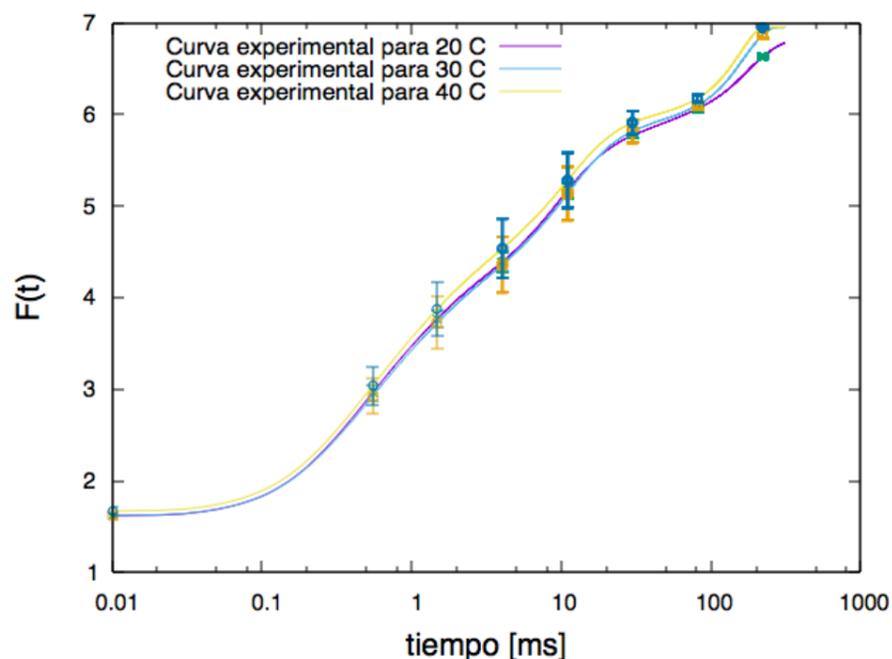


Figura 3.2: Curvas correspondientes al experimento 2 para 20, 30 y 40 °C en hojas de espinaca con barras de error representativas

se tomaron en el experimento 1. Se comprobó que las tres curvas obtenidas son las mismas. Lo que quiere decir que bajo tiempos de alrededor de dos horas el estado de las muestras no varía.

El experimento 3 muestra un comportamiento diferente al experimento uno, el proceso en este experimento fue de enfriamiento, es decir la temperatura partió de 40 °C a 20 °C. La diferencia del proceso realizado llevó a curvas diferentes a las del experimento uno. 40 °C es la temperatura más alta en la cual se obtuvieron las curvas, por ello, la forma es significativamente diferente a las demás, sin embargo se ve una tendencia hacia la forma de 40 °C en la curva de 30 °C. Para llegar a 40 °C se rehidrató la hoja, lo que significa que podría ser una temperatura límite, es decir que a esta temperatura

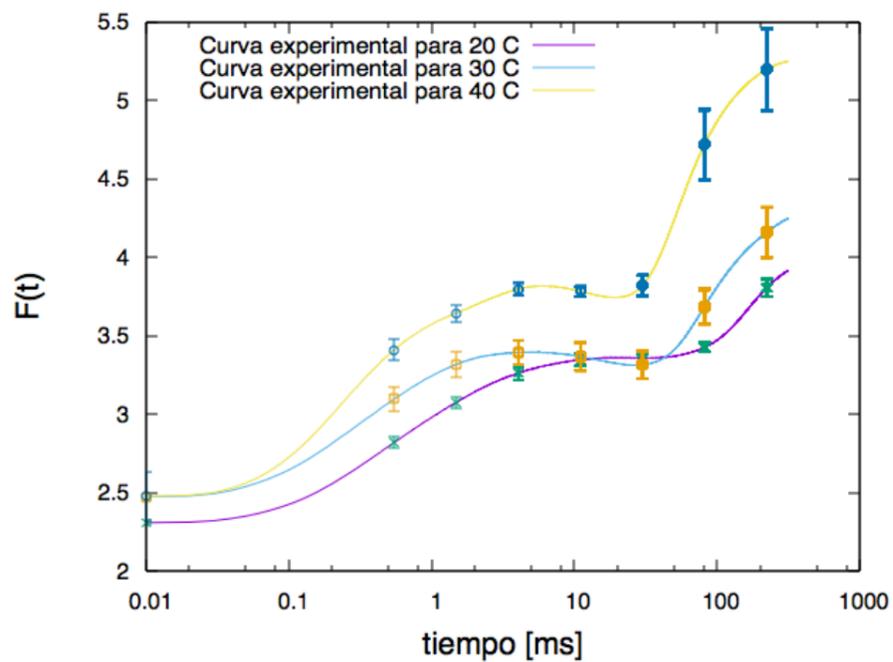


Figura 3.3: Curvas correspondientes al experimento 3 para 20, 30 y 40 °C en hojas de espinaca con barras de error representativas

pueden existir daños en los fotosistemas.

En relación con las curvas en todos los experimentos, se puede observar que salvo el valor inicial de Fluorescencia F_0 , las curvas son similares durante los primeros 3ms (la fase O-J).

Debido a la gran diferencia entre las curvas experimentales del experimento uno y el experimento 3, se presenta a continuación las Figuras que muestran más detalladamente las diferencias.

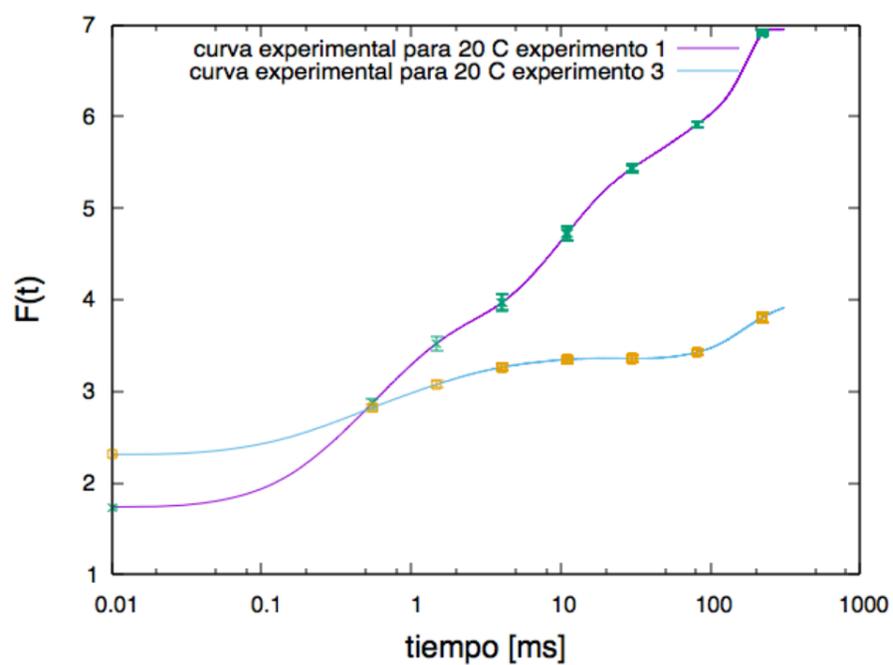


Figura 3.4: Curvas correspondientes al experimento 1 y al experimento 3 para 20 °C, en hojas de espinaca con barras de error representativas

Para 20 °C la curva tiene diferente inclinación, no tiene el mismo valor de F_0 . Sola-

mente se intersecan en un punto como se observa en la Figura 3.4.

Para 30 °C la curva tiene diferente inclinación de igual manera, además F_0 es diferente. Se intersecan en un punto sin embargo mantienen la misma forma como se observa en la Figura 3.5.

Para 40 °C la curva no se interseca en ningún punto, el valor de F_0 es diferente pero la forma se mantiene como se observa en la Figura 3.6.

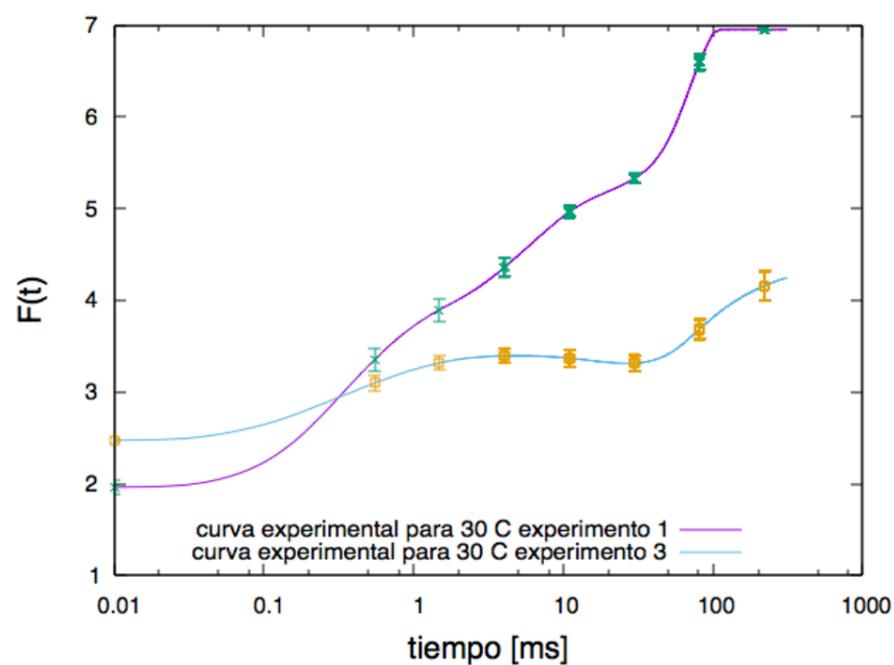


Figura 3.5: Curvas correspondientes al experimento 1 y al experimento 3 para 30 °C, en hojas de espinaca con barras de error representativas

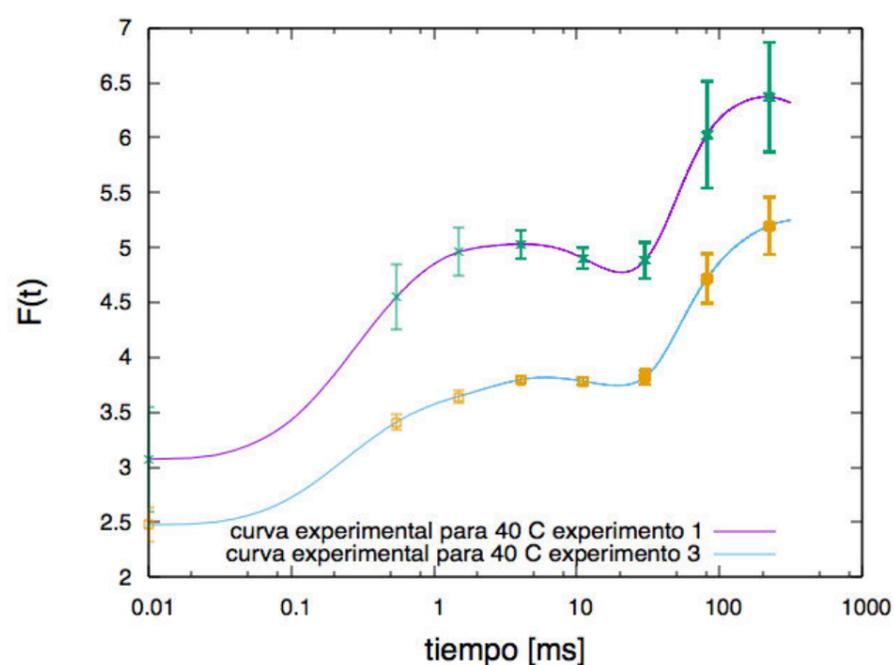


Figura 3.6: Curvas correspondientes al experimento 1 y al experimento 3 para 40 °C, en hojas de espinaca con barras de error representativas

3.1.1. Resultados del Ajuste

3.1.1.1. Experimento 1

3.1.1.1.1 Curvas para 20 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.46959	k_1	$\frac{1}{ms}$ 2.66576	a_1	0.96638
JI	p_2	0.513721	k_2	$\frac{1}{ms}$ 0.14612	a_2	0.94119
IP	p_3	0.62768	k_3	$\frac{1}{ms}$ 0.0099	a_3	0.71143
	$T_1 [ms]$	0.97	$T_2 [ms]$	20.4		
	F_0	1.7				
	χ^2	171583				
	error	0.0534763				

Tabla 3.2: Resultado del ajuste de curvas de 20 °C. del experimento 1

Los parámetros de conectividad para las tres regiones están dentro del rango $[0,4 - 0,6]$. Las constantes cinéticas disminuyen para todas las regiones, lo que indica que los procesos JI y IP se vuelven más lentos, o que las transiciones se demoran más en suceder, principalmente IP con un valor de $0,0099 \frac{1}{ms}$. Los valores de los pesos estadísticos son cercanos a la unidad, y no tan distintos entre sí, lo que implica que los tres términos tienen un peso similar. El primer tiempo umbral es de cerca de 1ms mientras que el segundo cerca de los 20ms.

El ajuste da un error porcentual de 5%. La curva obtenida está dentro de las barras de error, obteniendo un ajuste correcto.

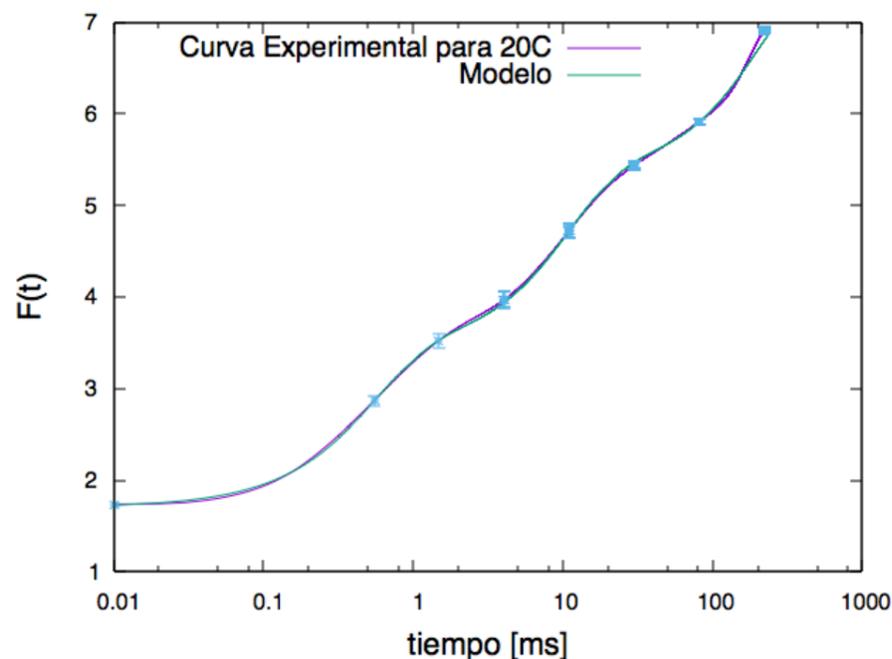


Figura 3.7: Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.2

3.1.1.1.2 Curvas para 30 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.52522	k_1	$\frac{1}{ms}$ 3.94255	a_1	0.89441
JI	p_2	0.58761	k_2	$\frac{1}{ms}$ 0.32179	a_2	0.52922
IP	p_3	0.81985	k_3	$\frac{1}{ms}$ 0.025797	a_3	0.57525
	$T_1 [ms]$	0.715	$T_2 [ms]$	13.497		
	F_0	1.9				
	χ^2	33957.5				
	error	0.0368551				

Tabla 3.3: Resultado del ajuste de curvas de 30 °C. del experimento 1

Los valores de conectividad están entre $[0,5 - 0,8]$, valores mayores a los de 20 °C. Las constantes cinéticas mantienen la tendencia de disminuir para cada región. Los pesos estadísticos para JI e IP son similares mientras que el término de OJ se impone a los demás. T_1 es 1.9 ms, un valor mayor al de 20 °C, T_2 es 13.497 ms, en este caso menor. El valor de F_0 aumentó con respecto al valor de 20 °C .

El error para este ajuste es del 3% y de igual manera se encuentra dentro de las barras de error.

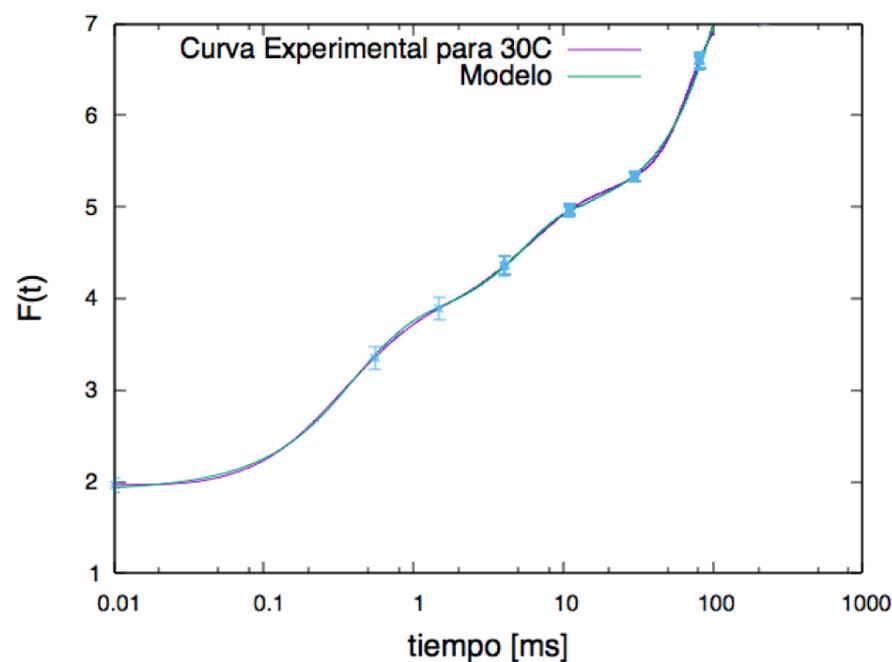


Figura 3.8: Comparación entre curva experimental para 30 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.3

3.1.1.1.3 Curvas para 40 °C

Los valores de conectividad disminuyen a un promedio de 0.4. Como en el resto de las curvas, se mantiene la tendencia de las constantes cinéticas al disminuir para cada región. En cuanto a los pesos estadísticos, OJ es el término predominante. El

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	
OJ	p_1	0.340885	k_1	$\frac{1}{ms}$	3.25151	a_1	1.31613
JI	p_2	0.356932	k_2	$\frac{1}{ms}$	0.146454	a_2	-0.185193
IP	p_3	0.599145	k_3	$\frac{1}{ms}$	0.0416378	a_3	0.653396
	$T_1 [ms]$	6	$T_2 [ms]$		23		
	F_0	3					
	χ^2	9455.35					
	error	0.0194477					

Tabla 3.4: Resultado del ajuste de curvas de 40 °C. del experimento 1

término de $JI(a_2)$ es negativo, lo que sugiere la existencia de algún proceso alterno de desexcitación que inhibe la emisión en esa región de la curva. T_1 es de 6 ms, un valor mayor al de 30 °C, de igual manera T_2 con un valor de de 23 ms. El valor de F_0 aumentó con respecto a las dos previas temperaturas.

El error de este ajuste es 1 %.

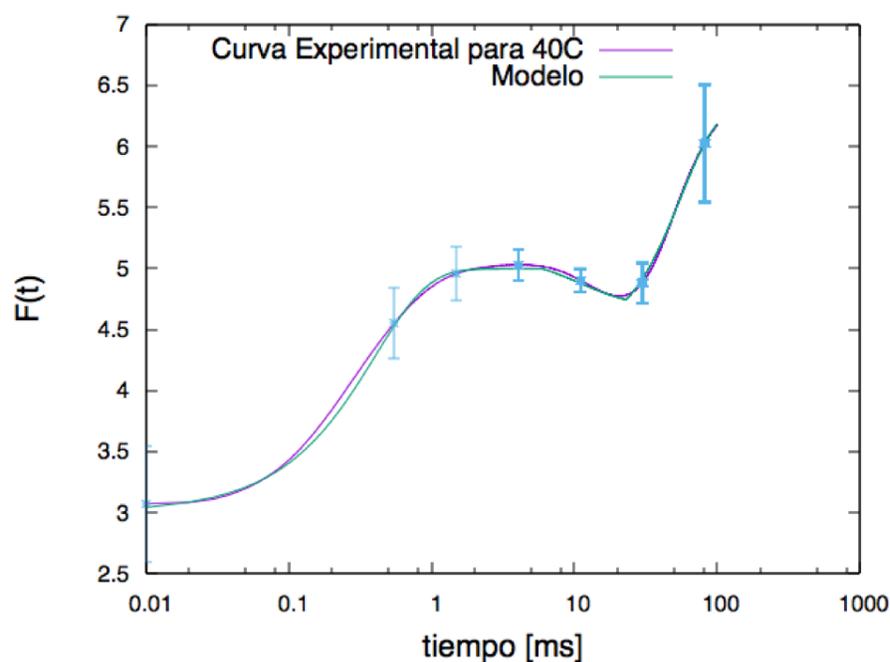


Figura 3.9: Comparación entre curva experimental para 40 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.4

Los valores de las tres temperaturas son:

En cuanto a los valores de conectividad p_i : p_1 se mantiene constante en un valor alrededor de $[0,3 - 0,5]$; p_2 a 20 °C y 30 °C se mantienen constante, mientras que para 40 °C disminuye; la tendencia de p_2 se mantiene para p_3 .

Las constantes cinéticas para la región OJ es siempre de mayor valor que las demás, mientras que para la región IP son las de menor valor.

El valor de a_1 se mantiene alrededor de $[0,9 - 1]$ para todas las temperaturas, mientras que el valor de a_2 disminuye con la temperatura hasta obtener un valor negativo para

Región	Parámetro	$Valor_{20}$	$Valor_{30}$	$Valor_{40}$
OJ	p_1	0.46959	0.52522	0.340885
OJ	$k_1 \left[\frac{1}{ms} \right]$	2.66576	3.94255	3.25151
OJ	a_1	0.96638	0.89441	1.31613
JI	p_2	0.513721	0.58761	0.356932
JI	$k_2 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.14612	0.32179	0.146454
JI	a_2	0.94119	0.52922	-0.185193
IP	p_3	0.62768	0.81985	0.599145
IP	$k_3 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.0099	0.025797	0.0416378
IP	a_3	0.71143	0.57525	0.653396
	F_0	1.7	1.9	3.0
	F_{max}	6.95074	6.95207	6.32676
	$T_1 [ms]$	0.97	0.715	6
	$T_2 [ms]$	20.4	13.497	23
	χ^2	171583	33957.5	9455.35
	error	0.0534763	0.0368551	0.0194477

Tabla 3.5: Resultado del ajuste de curvas de en el experimento 1.

40 °C . El valor de a_3 disminuye entre 20 °C y 30 °C mientras que para 40 °C aumenta. El valor T_1 disminuye entre 20 °C y 30 °C, y aumenta para 40 °C El T_2 disminuye solo para 30 °C, para el resto se mantiene alrededor de los 20 ms.

El valor inicial F_0 aumenta a medida que aumenta la temperatura.

3.1.1.2. Experimento 3

3.1.1.2.1 Curvas de 20 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.34	$k_1 \left[\frac{1}{ms} \right]$	2.6	a_1	0.51
JI	p_2	0.46	$k_2 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.9	a_2	0.145
IP	p_3	0.5	$k_3 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.01	a_3	0.4
	$T_1 [ms]$	1	$T_2 [ms]$	71		
	F_0	2.3				
	χ^2	56472.9				
	error	0.0306792				

Tabla 3.6: Resultado del ajuste de curvas de 20 °C de la serie 1 para el experimento 3.

En comparación a la curva de 20 °C del experimento 1, los parámetros de conectividad se mantienen casi constantes, los pesos estadísticos disminuyen y los tiempos umbrales aumentaron. k_1 se mantuvo constante, mientras que F_0 aumentó. El ajuste

de esta curva da un error del 3%.

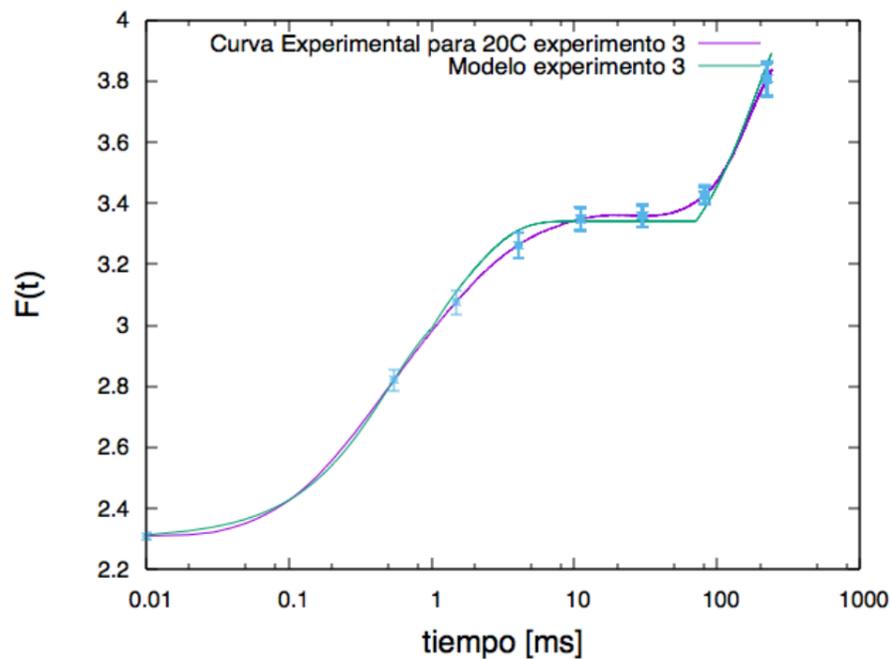


Figura 3.10: Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.6

3.1.1.2.2 Curvas para 30 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.338661	k_1	$\frac{1}{ms}$ 3.61454	a_1	0.621317
JI	p_2	0.35164	k_2	$\frac{1}{ms}$ 0.010001	a_2	-0.180332
IP	p_3	0.599579	k_3	$\frac{1}{ms}$ 0.0200959	a_3	0.479608
	$T_1 [ms]$	5	$T_2 [ms]$	40		
	F_0	2.45				
	χ^2	10388.8				
	error	0.0203851				

Tabla 3.7: Resultado del ajuste de curvas de 30 °C de la serie 1 para el experimento 3

En comparación a la curva de 30 °C del experimento 1, los parámetros de conectividad disminuyen, de igual manera los pesos estadísticos disminuyen, incluyendo un término negativo, como se observó para 40 °C en el experimento 1. Los tiempos umbrales aumentaron. k_1 disminuyó, pero F_0 aumentó con respecto al experimento 1. El ajuste de esta curva da un error del 2%.

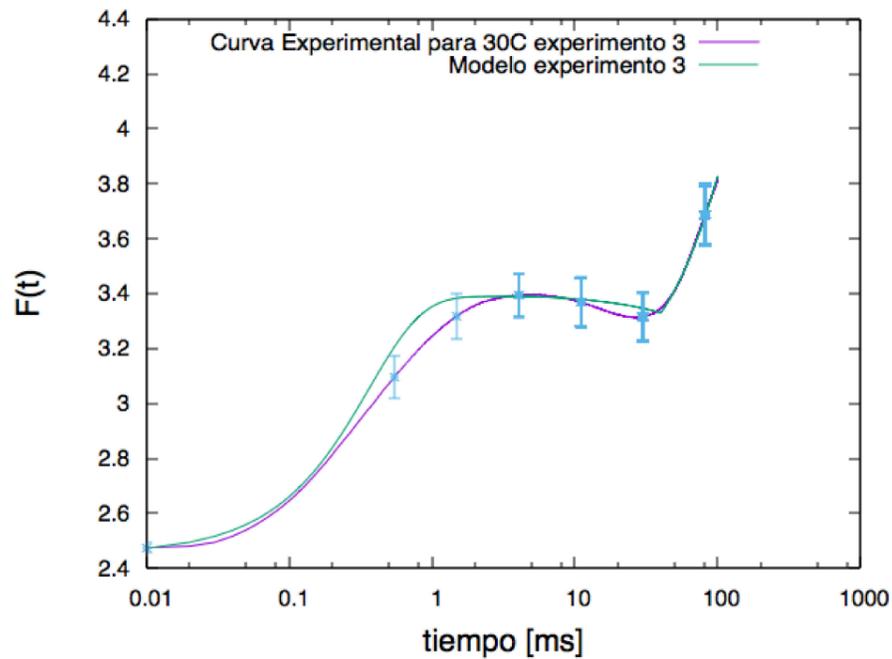


Figura 3.11: Comparación entre curva experimental para 30 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.7

3.1.1.2.3 Curvas para 40 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	
OJ	p_1	0.52	k_1	$\frac{1}{ms}$	3.5	a_1	3.5
JI	p_2	0.03	k_2	$\frac{1}{ms}$	0.03	a_2	-0.18
IP	p_3	0.05	k_3	$\frac{1}{ms}$	0.05	a_3	0.48
	$T_1 [ms]$	4	$T_2 [ms]$		25		
	F_0	2.45					
	χ^2	158375					
	error	0.0795927					

Tabla 3.8: Resultado del ajuste de curvas de 40 °C de la serie 1 para el experimento 3

En comparación a la curva de 40 °C del experimento 1, los parámetros de conectividad disminuyeron, de igual manera los pesos estadísticos, presentando un valor negativo ya reportado. F_0 disminuyó. El ajuste de esta curva da un error del 7%.

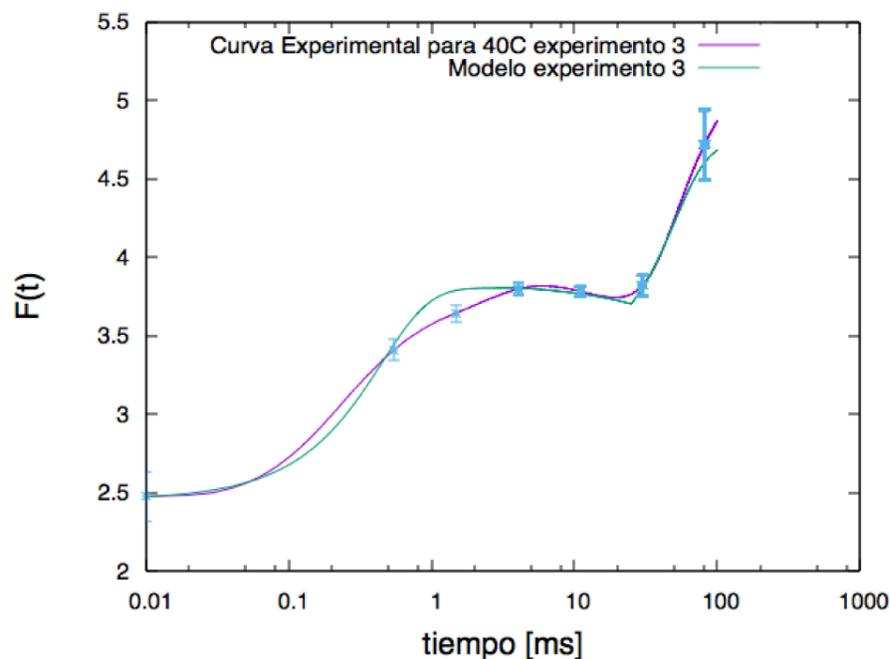


Figura 3.12: Comparación entre curva experimental para 40 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.8

3.2. Segunda serie de experimentos

En las Figuras 3.13, 3.14 y 3.15 se presenta el promedio de diez curvas por cada experimento. En el cuadro 3.9 se observa que para los 3 experimentos se mantiene el rango adecuado de hidratación haciendo validas las curvas tomadas.

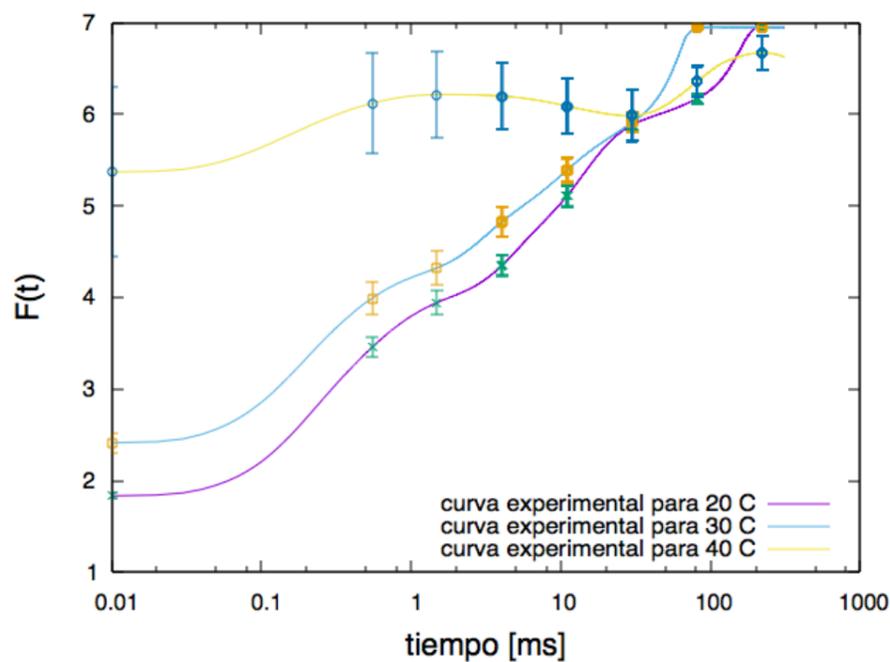


Tabla 3.9: Tabla de pesos de las hojas para los 3 experimentos de la segunda serie

Cualitativamente, en el experimento 1, se observa que los valores de F_0 son diferentes a los de de la serie 1 a pesar de que mantienen la misma forma.

En el experimento 2 se comprobó que las curvas obtenidas son similares. Sin embargo, en relación a las curvas de la serie 1 están más dispersas, pero aún dentro de las barras de error.

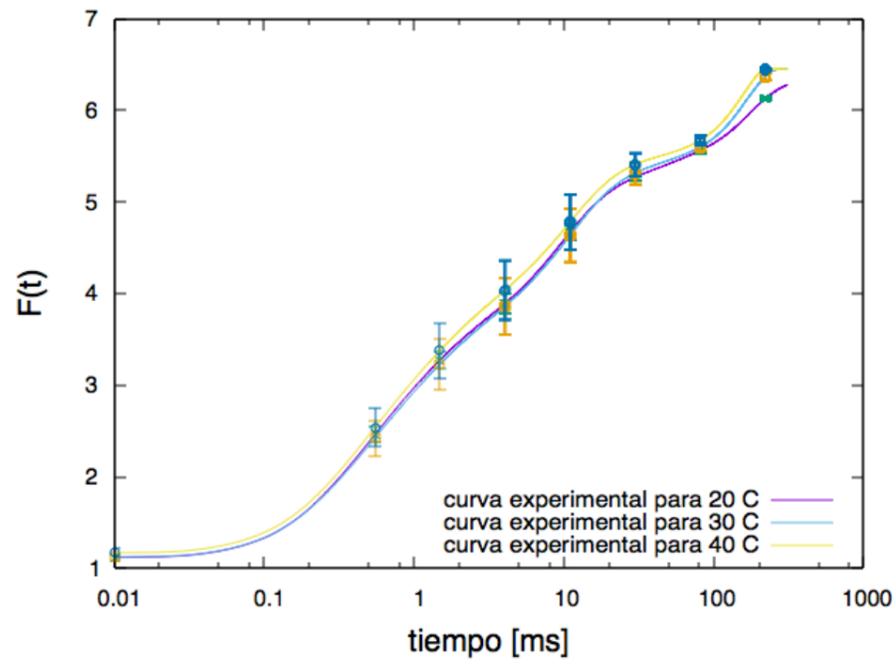


Figura 3.13: Experimento 1 de la serie 2

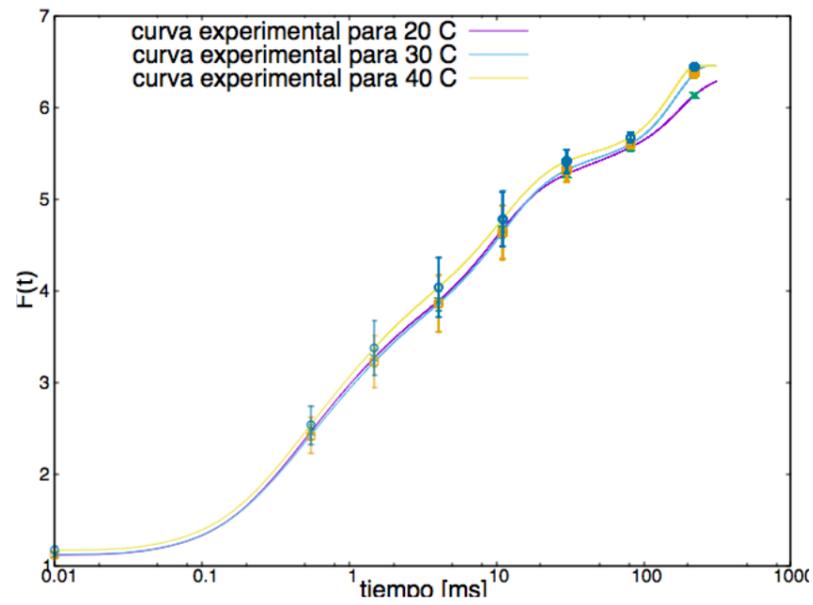


Figura 3.14: Experimento 2 de la serie 2

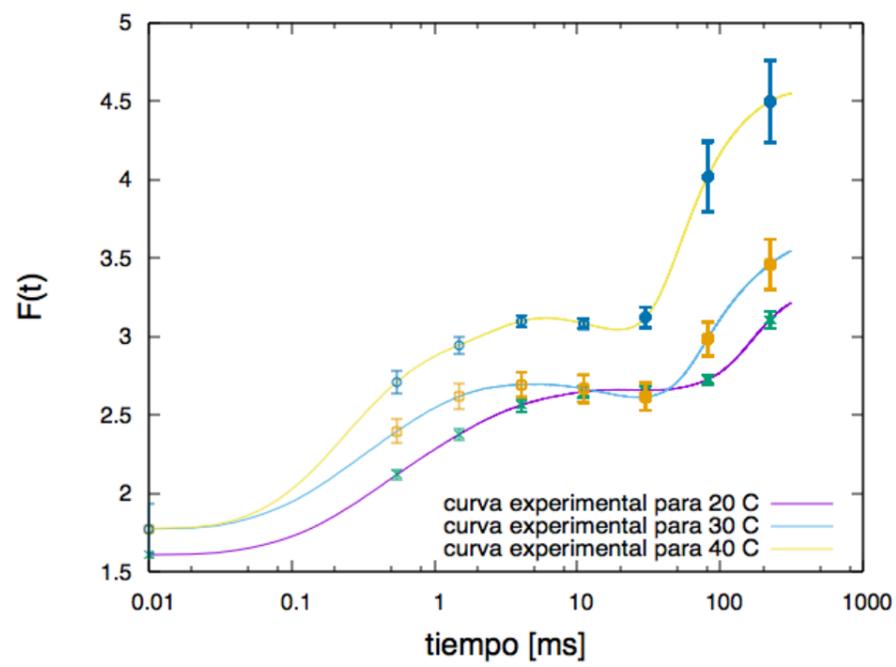


Figura 3.15: Experimento 3 de la serie 2

El experimento 3 de esta serie es muy similar el experimento 3 de la serie 1, salvo que los valores de F_0 cambiaron.

Debido a la gran diferencia entre las curvas experimentales del experimento 1 y el experimento 2, se presenta a continuación las Figuras que muestran más detalladamente las diferencias.

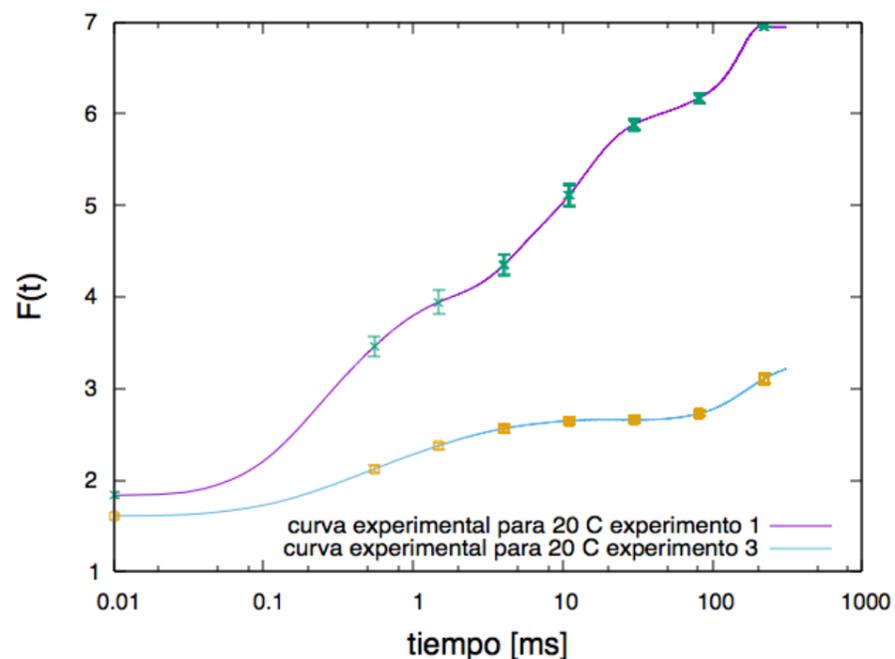


Figura 3.16: Comparación entre el experimento 1 y el experimento 3 para 20 °C de la serie 2.

Para 20 °C la curva tiene diferente inclinación, no tiene el mismo valor de F_0 . Ni se intersecan como se observa en la Figura 3.16.

Para 30 °C la curva tiene diferente inclinación de igual manera, además F_0 es diferente. No intersecan sin embargo mantienen una forma similar como se observa en la Figura 3.17.

Para 40 °C la curva no se interseca en ningún punto, el valor de F_0 es diferente pero se mantiene la forma como se observa en la Figura 3.18.

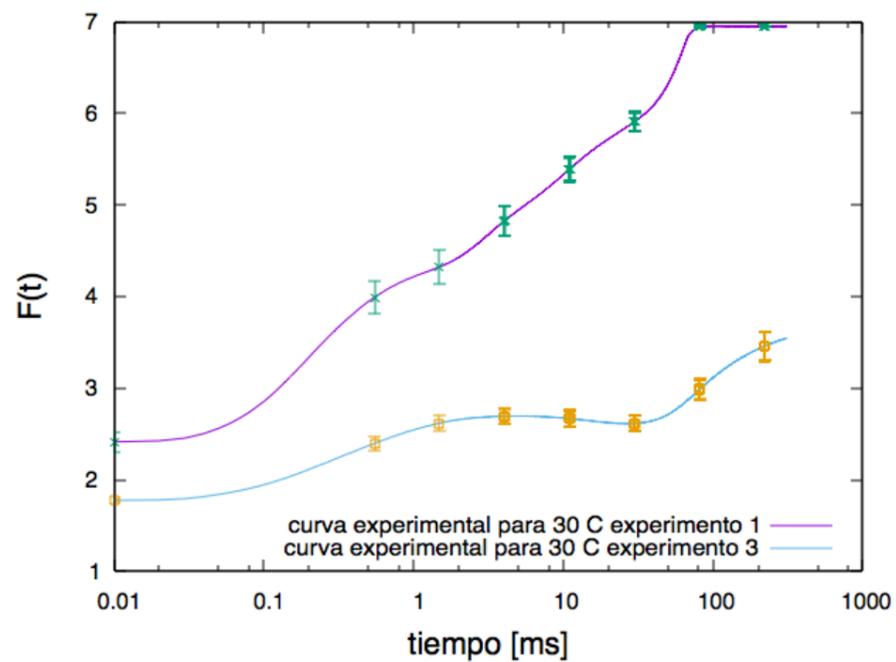


Figura 3.17: Comparación entre el experimento 1 y el experimento 3 para 30 °C de la serie 2.

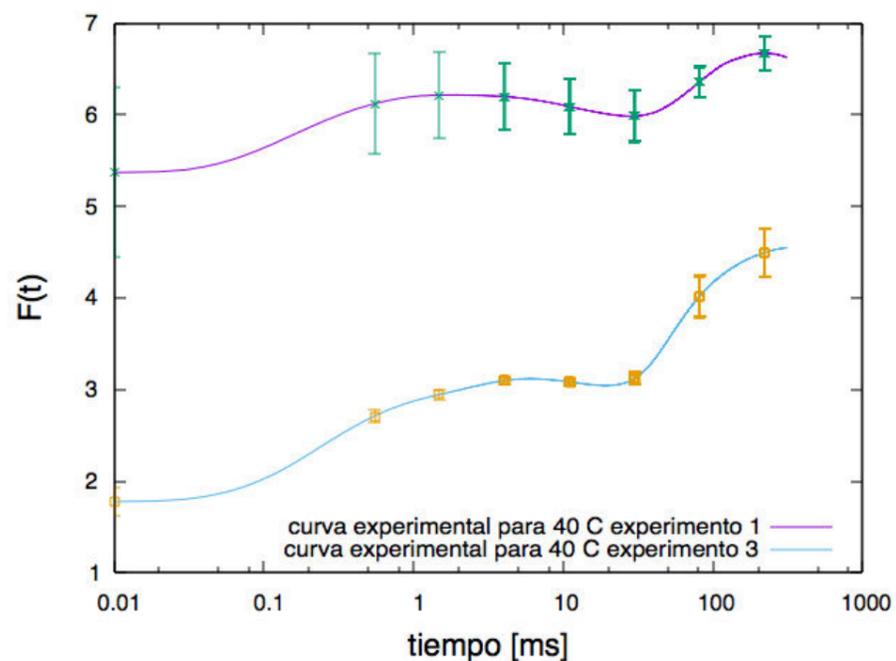


Figura 3.18: Comparación entre el experimento 1 y el experimento 3 para 40 °C de la serie 2.

3.2.1. Resultados del ajuste

3.2.1.1. Experimento 1

3.2.1.1.1 Curvas para 20 °C

En comparación a la curva de 20 °C de la serie 1, los parámetros de conectividad se mantienen casi constantes, de igual manera los pesos estadísticos y los tiempos umbrales. k_1 aumentó, al igual que F_0 . El ajuste de esta curva da un error del 6 %.

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.46959	k_1 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	3.9	a_1	1.1
JI	p_2	0.513721	k_2 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	0.14612	a_2	0.97
IP	p_3	0.52768	k_3 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	0.0099	a_3	0.71143
	T_1 [ms]	0.97	T_2 [ms]	20.4		
	F_0	1.8				
	χ^2	238951				
	error	0.0631072				

Tabla 3.10: Resultado del ajuste de curvas de 20 °C de la serie 2 para el experimento 1.

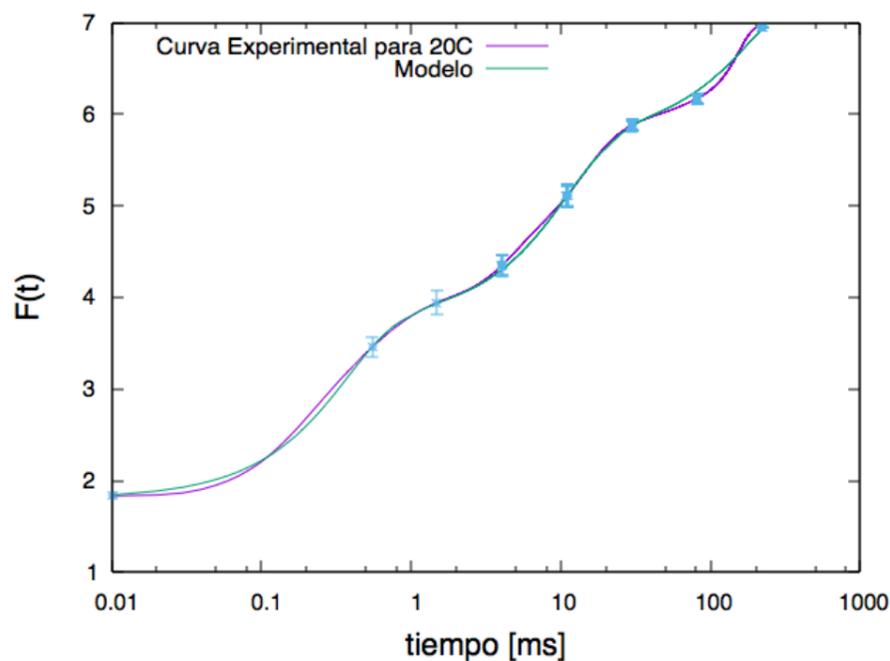


Figura 3.19: Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.10

3.2.1.1.2 Curvas para 30 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.46	k_1 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	5.8	a_1	0.96
JI	p_2	0.33	k_2 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	0.75	a_2	0.38
IP	p_3	0.51	k_3 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	0.034	a_3	0.96
	T_1 [ms]	0.715	T_2 [ms]	8.24		
	F_0	2.38				
	χ^2	170176				
	error	0.0825047				

Tabla 3.11: Resultado del ajuste de curvas de 30 °C de la serie 2 para el experimento 1.

En comparación con los valores de la serie 1 para esta curva, todos los parámetros de conectividad disminuyeron, mientras que las constantes cinéticas aumentaron. Todos los pesos estadísticos aumentaron excepto a_2 . T_1 se mantiene constante, mientras que T_2 disminuyó; F_0 aumentó de igual manera. Sin embargo el error de este ajuste es del

8 %, pero siguen dentro de la barras de error.

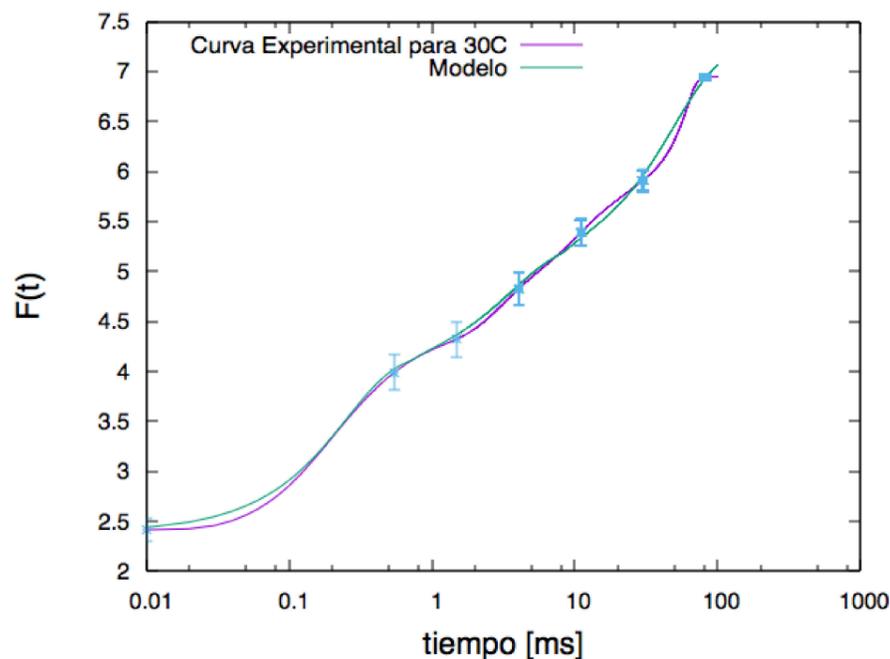


Figura 3.20: Comparación entre curva experimental para 30 °C del experimento 1 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.11

3.2.1.1.3 Curvas para 40 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.27	k_1	$\frac{1}{ms}$ 4.5	a_1	0.6
JI	p_2	0.32	k_2	$\frac{1}{ms}$ 1	a_2	-0.089
IP	p_3	0.101224	k_3	$\frac{1}{ms}$ 0.041609	a_3	0.32
	T_1 [ms]	6.24213	T_2 [ms]	33		
	F_0	5.37				
	χ^2	153470				
	error	0.0783505				

Tabla 3.12: Resultado del ajuste de curvas de 40 °C de la serie 2 para el experimento 1.

Los parámetros de conectividad disminuyen de acuerdo a los valores de la serie 1, las constantes cinéticas aumentan excepto por k_3 , los pesos estadísticos disminuyeron salvo para a_2 . En cuanto a los tiempos umbrales, solamente T_2 aumentó. F_0 aumentó también. Este ajuste reporta un error del 7 %, sin embargo sigue dentro de las barras de error.

Los valores de las tres temperaturas son:

En cuanto a los valores de conectividad p_i : p_1 se mantiene constante en un valor alrededor de $[0,2 - 0,4]$, Varía un poco con respecto a la serie 1, pero no dramáticamente; los valores de p_2 se mantienen en el mismo rango; p_3 disminuye significativamente. Las constantes cinéticas para la región OJ son siempre de mayor valor que las demás,

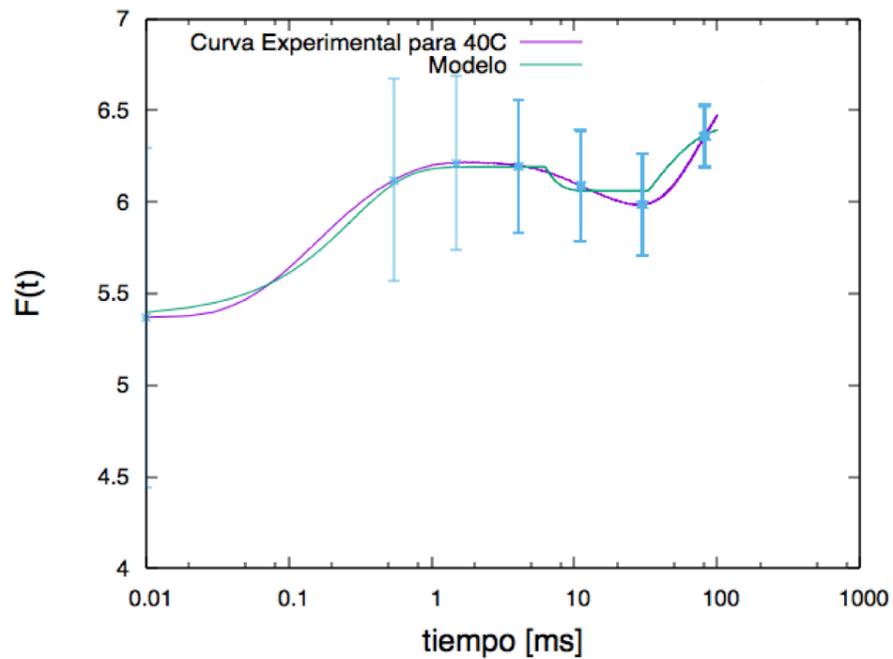


Figura 3.21: Comparación entre curva experimental para 40 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.12

Región	Parámetro	$Valor_{20}$	$Valor_{30}$	$Valor_{40}$
OJ	p_1	0.46959	0.46	0.27
OJ	$k_1 \left[\frac{1}{ms} \right]$	3.9	5.8	4.5
OJ	a_1	1.1	0.96	0.6
JI	p_2	0.513721	0.33	0.32
JI	$k_2 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.14612	0.75	1
JI	a_2	0.97	0.38	-0.089
IP	p_3	0.52768	0.51	0.101224
IP	$k_3 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.0099	0.034	0.041609
IP	a_3	0.71143	0.96	0.32
	F_0	1.8	2.38	5.37
	$T_1 [ms]$	0.97	0.715	6.24213
	$T_2 [ms]$	20.4	8.24	33
	χ^2	238951	170176	123470
	error	0.0631072	0.0825047	0.0783505

Tabla 3.13: Resultado del ajuste de curvas de 20, 30 y 40 °C para la serie 2 del experimento 1.

mientras que para la región IP son las de menor valor de igual manera que la serie 1. El valor de a_1 se mantiene alrededor de $[0,9 - 1]$ para todas las temperaturas. El valor de a_2 disminuye con la temperatura hasta obtener un valor negativo para 40 °C . El valor de a_3 disminuye entre 20 °C y 30 °C mientras que para 40 °C aumenta. El valor T_1 disminuye entre 20 °C y 30 °C, y aumenta para 40 °C El T_2 disminuye solo para 30 °C, para el resto se mantiene alrededor de los 20 ms. El valor inicial F_0 aumenta a medida que aumenta la temperatura.

El error máximo porcentual es de cerca de 8 %

3.2.1.2. Experimento 3

3.2.1.2.1 Curvas para 20 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	
OJ	p_1	0.34	k_1	$\frac{1}{ms}$	2.5	a_1	0.5
JI	p_2	1	k_2	$\frac{1}{ms}$	1	a_2	0.46
IP	p_3	0.01	k_3	$\frac{1}{ms}$	0.01	a_3	0.5
	$T_1 [ms]$	1	$T_2 [ms]$		71		
	F_0	1.6					
	χ^2	57967.1					
	error	0.0310825					

Tabla 3.14: Valores con los que se calculó el ajuste de curvas de 20 °C para el experimento 3 de la serie 2.

En comparación a la curva de 20 °C del experimento 1 de la serie 2, los parámetros de conectividad disminuyeron, de igual manera los pesos estadísticos. F_0 disminuyó. El ajuste de esta curva da un error del 3%.

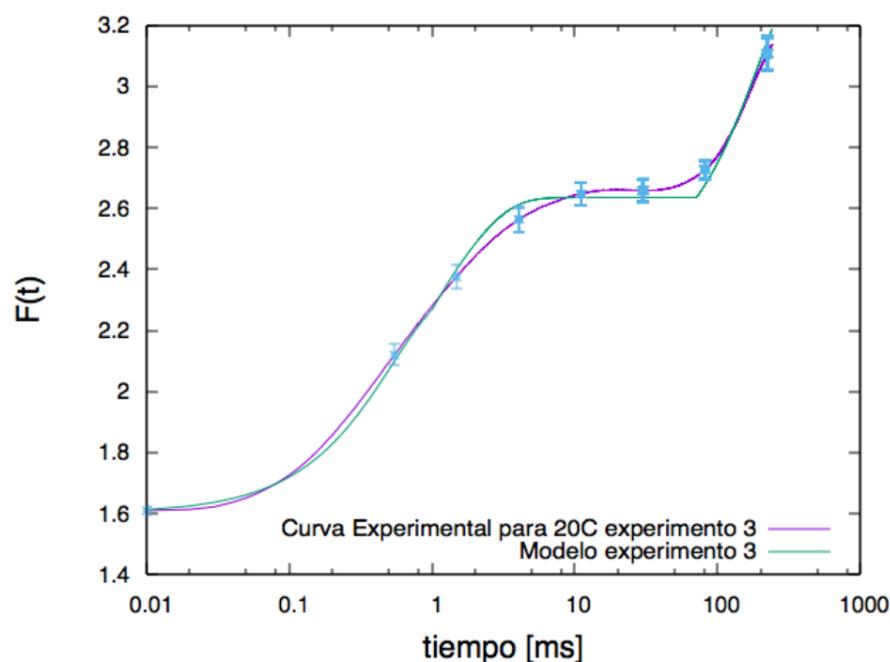


Figura 3.22: Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.14

3.2.1.2.2 Curvas para 30 °C

En comparación con los valores de la serie 2 del experimento 1 para esta curva, todos los parámetros de conectividad se mantuvieron constantes, mientras que las constantes cinéticas disminuyeron. Todos los pesos estadísticos disminuyeron incluyendo un término negativo. F_0 disminuyó. Sin embargo el error de este ajuste es del 1%, pero siguen dentro de la barras de error.

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.34	k_1 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	3.8	a_1	0.60
JI	p_2	0.35	k_2 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	0.01	a_2	-0.18
IP	p_3	0.60	k_3 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	0.02	a_3	0.48
	T_1 [ms]	3	T_2 [ms]	37		
	F_0	1.77				
	χ^2	7737.22				
	error	0.0175923				

Tabla 3.15: Resultado del ajuste de curvas de 30 °C de la serie 2 para el experimento 3.

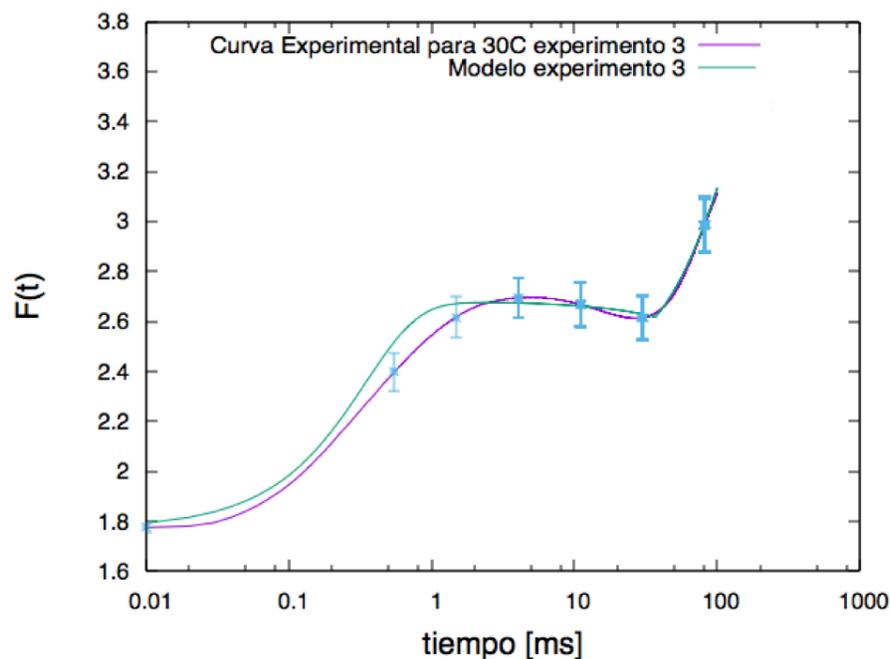


Figura 3.23: Comparación entre curva experimental para 30 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.15

3.2.1.2.3 Curvas para 40 °C

Región	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
OJ	p_1	0.52	k_1 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	3.5	a_1	0.65
JI	p_2	0.35	k_2 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	0.03	a_2	-0.18
IP	p_3	0.60	k_3 $\left[\frac{1}{ms}\right]$	0.05	a_3	0.48
	T_1 [ms]	4	T_2 [ms]	25		
	F_0	1.8				
	χ^2	90580.9				
	error	0.0601933				

Tabla 3.16: Resultado del ajuste de curvas de 40 °C de la serie 2 para el experimento 3.

Los parámetros de conectividad aumentaron de acuerdo a los valores del experimento 1 de la serie 2, las constantes cinéticas disminuyeron, los pesos estadísticos muestran de nuevo un valor negativo para a_2 . Este ajuste reporta un error del 6 %, sin embargo sigue dentro de las barras de error.

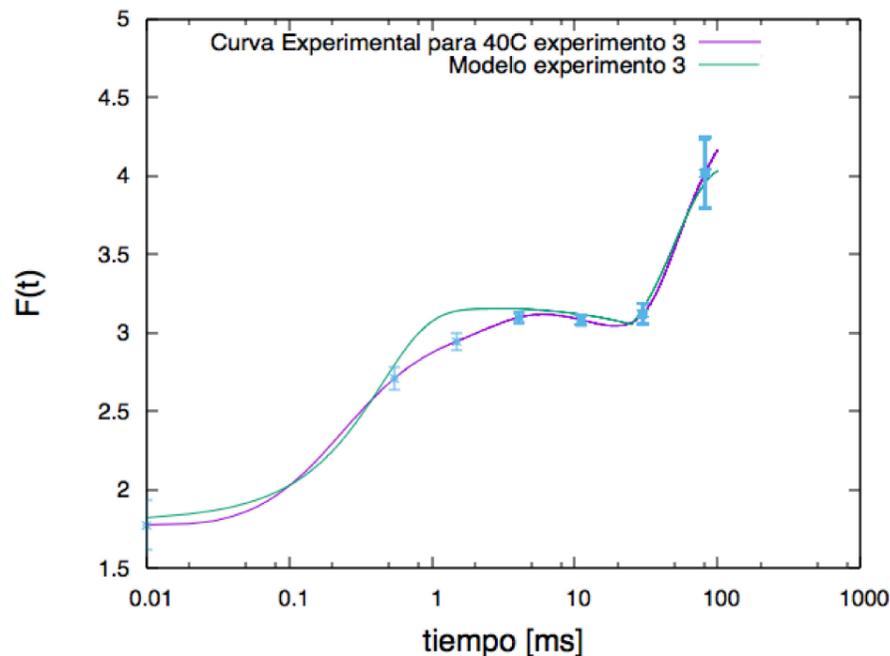


Figura 3.24: Comparación entre curva experimental para 20 °C del experimento 3 y la curva obtenida con los parámetros mostrados en la tabla 3.16

3.3. Comparación entre series de experimentos

3.3.1. Experimento 1

Para 30 °C todos los valores de la serie 2 con respecto a la serie 1 p_α disminuyen. De igual manera para 40 °C Las constantes cinéticas para 20 °C se mantienen constantes salvo k_1 de la serie 2 que aumento considerablemente.

Tanto para 30 °C y 40 °C las constante cinéticas aumentan significativamente con respecto a la serie 1.

El valor de a_α se mantiene alrededor de $[1 - 0,3]$ para todas las temperaturas en ambas series.

El valor T_1 se mantiene constante para todas las temperaturas en ambas series, mientras que T_2 disminuye para 30 °C y aumenta para 40 °C. El valor inicial F_0 aumenta a medida que aumenta la temperatura para ambas series.

3.3.2. Experimento 3

El experimento 3, presentó valores similares de parámetros de conectividad, de constantes cinéticas, de tiempos umbrales y de la gran parte de parámetros, recalcando que a_2 que para 30 °C y 40 °C tienen el valor negativo de $-0,18$. Debido a que este proceso es un proceso de enfriamiento, y parte de 40 °C se evidencia que la tendencia de un valor negativo se mantiene para 30 °C más no para 20 °C. De nuevo sugiriendo que pasado los 40 °C, se debe rehidratar la hoja ya se evidencia que es una temperatura

límite como se observa en las tablas 3.18 y 3.18.

A continuación se presenta la tabla que resume los valores para las curvas de ajuste del experimento 3 de la serie 2.

Región	Parámetro	$Valor_{20}$	$Valor_{30}$	$Valor_{40}$
OJ	p_1	0.34	0.34	0.52
OJ	$k_1 \left[\frac{1}{ms} \right]$	2.5	0.01	3.5
OJ	a_1	0.5	0.6	0.65
JI	p_2	1	0.35	0.35
JI	$k_2 \left[\frac{1}{ms} \right]$	1	0.01	0.03
JI	a_2	0.46	-0.18	-0.18
IP	p_3	0.01	0.6	0.60
IP	$k_3 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.01	0.02	0.05
IP	a_3	0.5	0.48	0.48
	F_0	1.6	1.77	1.8
	$T_1 [ms]$	1	3	4
	$T_2 [ms]$	71	37	25
	χ^2	57967.1	7737.22	90580.9
	error	0.0310825	0.0175923	0.0601933

Tabla 3.17: Parámetros con los que se realizó el ajuste para las curvas de 20, 30 y 40 °C del experimento 3 de la serie 2.

Región	Parámetro	$Valor_{20}$	$Valor_{30}$	$Valor_{40}$
OJ	p_1	0.34	0.338661	0.52
OJ	$k_1 \left[\frac{1}{ms} \right]$	2.6	3.61454	3.5
OJ	a_1	0.51	0.621317	3.5
JI	p_2	0.46	0.35164	0.03
JI	$k_2 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.9	0.010001	0.03
JI	a_2	0.145	-0.180332	-0.18
IP	p_3	0.5	0.599579	0.05
IP	$k_3 \left[\frac{1}{ms} \right]$	0.01	0.0200959	0.05
IP	a_3	0.4	0.479608	0.48
	F_0	2.3	2.45	2.45
	$T_1 [ms]$	1	5	4
	$T_2 [ms]$	71	40	25
	χ^2	56472.9	10388.8	158375
	error	0.0306792	0.0203851	0.0785827

Tabla 3.18: Valores con los que se calculó el ajuste de curvas de 20, 30 y 40 °C en el experimento 3 de la serie 1.

3.4. Comparación entre el experimento 1 y el experimento 3

Para todas las temperaturas el valor de p_1 se mantienen en el rango de $[0,3 - 0,5]$; en cuanto a p_2 para aumentó con respecto al experimento 1 para 20°C , para 30°C disminuye mientras que para 40°C se mantiene constante. Todas las constantes cinéticas para todas las temperaturas disminuyeron de manera significativa con respecto al experimento 1. Mientras que los valores de a_α disminuyen en su mayoría, sin embargo cabe destacar que para 30°C y 40°C se tiene el mismo valor de a_2 que para 40°C del experimento 1. Además los valores de F_0 se mantiene similares en ambos experimentos, también los valores umbrales de T_2 aumentaron de un máximo de 23 a 71 para el experimento 3.

Capítulo 4

Conclusiones y Discusión

En este trabajo se presentó un modelo para el análisis de curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a* a 20, 30 y 40 °C. El modelo busca explicar las características cinéticas asociadas a las curvas Kaustky, a estas temperaturas. El modelo desarrollado es una extensión de aquel propuesto por Paillotin en 1976 [13] de modo que incluye la heterogeneidad de los dominios fotosintéticos y la presencia de cambios conformacionales asociados a la emisión de fluorescencia. Las transiciones propuestas en el modelo se las puede asociar al proceso de reducción de Q_A ($\alpha = 1$), a cambios conformacionales ($\alpha = 2, 3$) de los complejos proteínicos dentro de los fotosistemas, por ejemplo el complejo CP47 [33]. El ajuste del modelo a las curvas experimentales ha permitido obtener los valores de las constantes cinéticas de los procesos asociados a cada región.

Los valores de fluorescencia inicial aumentan a medida que aumenta la temperatura, esto se debe a que cuando existe mayor energía, existen más centros de reacción activos, los cuales permiten que exista fluorescencia al iniciar el proceso. Como se esperaba, la fase térmica, JI-IP presentó importantes cambios en su forma, principalmente JI que presenta valores negativos en los parámetros con el aumento de la temperatura, lo que se evidencia en una meseta en esta región. La fase OJ es considerada poco sensible a la temperatura [29], sin embargo de acuerdo a este trabajo, k_1 , velocidad de la transición en la etapa OJ, varía considerablemente de $2,6 \text{ ms}^{-1}$ a $4,3 \text{ ms}^{-1}$. Además esta región es la que tiene pesos estadísticos más altos que los demás, lo que lleva a concluir que la reducción de Q_A es un proceso de alta importancia. En la fase JI, parte de la llamada fase térmica, la velocidad de transición aumenta cuando la temperatura va de 20 a 30 °C pero disminuye para 40 °C, sugiriendo que a partir de esta temperatura la transición toma más tiempo en producirse. En la fase IP, k_3 disminuye con la temperatura, además, es la fase que tiene las constantes cinéticas de valores más bajos con respecto a las demás. El tiempo umbral T_2 aumenta de manera drástica para el experimento 3,

mientras que T_1 se mantiene dentro de los rangos anteriores.

Para el Experimento 3 las curvas son distintivamente diferentes como se observa en la Figura 3.1, esto, presumiblemente, se debe a que al iniciar el experimento a 40 °C para posteriormente enfriarlo a 20 °C los complejos moleculares se atrofian de manera que no pueden regresar al estado inicial conocido, sin embargo, la forma OJIP se conserva. La curva para 40 °C en el experimento 1, y las curvas para 30 °C y 40 °C en el experimento 3 presentan un valor negativo de a_2 , lo que podría indicar que en la fase II existen procesos de desexcitación o inhibición de emisión de fluorescencia en esa región.

Strasser y Stirbet encontraron que la velocidad de reducción de Q_A durante la fase OJ para *Pisum Sativum* es de $3,13 \text{ ms}^{-1}$ a temperatura ambiente [49]. El valor correspondiente en el modelo presentado en este trabajo (k_1), para la espinaca fue $2,66 \text{ ms}^{-1}$ para 20 °C. La diferencia se atribuye a la especie utilizada, recordando que las curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a* son distintivas para cada especie, y además el proceso para obtener las curvas fue diferente, Strasser y Stirbet usaron 650 nm para inducir la fluorescencia, a diferencia de los 440 nm usados en este trabajo. El modelo utilizado también está basado en el modelo Paillotin [13], pero solamente se utiliza un proceso en lugar de tres como lo desarrollado en este trabajo.

En este trabajo se ha propuesto la idea de la existencia de tres tipos diferentes de dominios fotosintéticos, cada uno de estos dominios es responsable de una específica región de la curva OJIP. Lazár presenta la idea de la heterogeneidad del fotosistema II ($PSII_\alpha, PSII_\beta, PSII_\gamma$ y $PSII_\delta$), esta heterogeneidad se introdujo para explicar las diferentes fases de la curva de emisión de fluorescencia en presencia de DCMU [29].

El modelo de Paillotin [13] plantea la existencia de una unidad fotosintética, la cual es un complejo molecular asociado a un centro de reacción, por ello podría considerarse al fotosistema II como una unidad fotosintética. Estudios de estructura cristalina de este complejo proteínico en bacterias muestran que posee dos centros de reacción, ya que su estructura general es un dímero [55]. Sin embargo para todo el proceso fotosintético se utiliza solamente un solo centro de reacción. Según Junza la segunda rama del fotosistema II, conocida como D2, solamente se activa cuando el centro de reacción de la rama D1 se cierra debido a la influencia de luz de alta intensidad, por ello la ra-

ma D2 tiene el rol de fotoprotección. Bajo estas condiciones la rama D2, o la segunda unidad fotosintética, realiza los procesos de la rama D1 [55]. Con estas consideraciones el concepto de unidad fotosintética introducida por Paillotin [13] se mantiene.

En este trabajo se ha planteado un modelo que tiene la capacidad de realizar un buen ajuste, con errores menores al 10 %, con tan solo once parámetros, mientras que existen modelos que realizan el mismo trabajo con más de treinta parámetros [50, 27]. Además se realizó una extensión del Modelo de Paillotin incluyendo transiciones estocásticas y la idea de cambios conformacionales en los tres tipos de dominos que se propone. Para un posterior trabajo se debería considerar en el modelo el concepto de transiciones inversas, además de trabajar con temperaturas mayores a 40 °C y menores a 20 °C para completar el estudio. Además es necesaria refinar el algoritmo de ajuste y de búsqueda de parámetros puesto que aquel utilizado no es el más óptimo. Finalmente es necesario identificar los procesos biofísicos asociados a las transiciones correspondientes a $\alpha = 2$ y $\alpha = 3$.

Referencias

- [1] J. WHITMARSH. The photosynthetic process. In Concepts in Photobiology. Springer Netherlands. 11-51. 1999.
- [2] M. PESSARAKLI. Handbook of Photosynthesis. CRC Press. 2005.
- [3] O. LANGE, T. GREEN Y U. HEBER . Hight Adaptation and Senescence of the Photosynthetic Apparatus. Changes in Pigment Composition, Chlorophyll Fluorescence Parameters and Photosynthetic Activity. Chlorophyll a Fluorescence Volume 19 of the series Advances in Photosynthesis and Respiration 713-736.
- [4] B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS Y P. WALTER. Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science. 2002.
- [5] P. ALBERTSSON A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. Trends Plant Sci. 6(8):349-58. 2001.
- [6] W. SMITH, T. VOGELMANN Y C. CRITCHLEY Photosynthetic Adaptation. Chloroplast to Landscape. Springer, 2004.
- [7] G. H. KRAUSE. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:313 19. 1991.
- [8] D. MAUZERALL Y N. GREENBAUM The absolute size of a photosynthetic unit. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 974(2): 119–140. 1989.
- [9] S. EBERHARD, G. FINAZZI Y F. WOLLMAN. The dynamics of photosynthesis. Annu Rev Genet. 42:463-515. 2008.
- [10] B. MILES. Photosystems I and II. Lecture for Texas University. 2003.
- [11] K. FERREIRA, T. IVERSON, K. MAGHLAOU, J. BARBER Y S. IWATA. Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. Science 303, 1831. 2004.
- [12] W. CRAMER, A. MARTINEZ, P FURBACHER, D. HUANG Y J. SMITH. «The cytochrome b6f complex». Curr. Opin. Struct. Biol. 4: 536–544. 1994.

- [13] G. PAILLOTIN. Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystem II. *J Theor Biol.* May 7;58(1):337-52. 1976
- [14] D. MAUZERALL Y N. GREENBAUM The absolute size of a photosynthetic unit. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 974(2): 119–140. 1989.
- [15] D. BANIULIS, E. YAMASHITA, H. ZHANG Y SS. HASAN. Structure–function of the cytochrome b6f complex. *Photochem Photobiol* 84:1349–1358. 2008.mar
- [16] G. DE MARTINO, F. MENCARELLI, J. B. Y GOLDING Preliminary investigation into the uneven ripening of banana peel after 1-MCP treatment. *Advances in Plant Ethylene Research* pp 243-246.
- [17] A.STIRBET Y GOVINDJEE. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth Res* 113:15-61. 2012.
- [18] D. LAZÁR. Chlorophyll *a* fluorescence induction, *Biochimica et Biophysica Acta* 1412 1-28. 1999.
- [19] S. DWYER, O. GHANNOUM, A. NICOTRA Y S. VON CAEMMERER. High temperature acclimation of C4 photosynthesis is linked to changes in photosynthetic biochemistry, *Plant Cell Enviro* Jan 30(1):53-66. 2007.
- [20] P. NOBEL. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology.* Academic Press, Incorporated. 1991.
- [21] E. TYYSTJÄRVI , A. KOSKI , M. KERÄNEN Y O.NEVALAINEN. The Kautsky curve is a built-in barcode. - *Biophysical Journal* 77: 1159-1167. 1999.
- [22] M. G. ROBERTS *Encyclopedia of Biophysics.* Springer. 2013.
- [23] K. GOVINDJEE, J. MESSINGER Y J. WHITMARSH. Photosystem II. In: *Encyclopedia of life sciences (ELS).* Wiley, Chichester. 2010.
- [24] WA. CRAMER, H. ZHANG, J. YAN, G. KURRISU Y JL. SMITH . Transmembrane traffic in the cytochrome b6f complex. *Ann Rev Biochem* 75:769–790. 2006.
- [25] A. STIRBET Y GOVINDJEE..On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol B.* 10:236. 2011.
- [26] U. SCHREIBER Y C KLUGHAMMER. Wavelength-dependent photodamage to *Chlorella* investigated with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.* 114:165-177. 2013.

- [27] X-ZHU, GOVINDJEE Y N. BAKER. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II. *Planta* 223:114-133. 2005.
- [28] G. PAPAGEORIOU Y M. STAMATAKIS. The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria, a viewpoint, *Photosynthesis Res.* 94:275-290, 2007.
- [29] G. SCHANSKER, S. TÓTH Y A. HOLZWARTH. Chlorophyll a fluorescence: beyond the limits of the QA model, *Photosynth Res* 120:43-58. 2014.
- [30] N. NELSON. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:12, 971–982. 2004.
- [31] U. SCHREIBER Y C KLUGHAMMERL. Assessment of wavelength-dependent parameters of photosynthetic electron transport with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer, *Photosynth Res.* 113:127-144. 2012.
- [32] G. TSIOTIS, M. PSYLINAKIS, B. WOPLENSINGER, A. LUSTIG, A. ENGEL Y D. GHANOTAKIS. Investigation of the structure of spinach photosystem II reaction center complex. *Eur J Biochem.* 259(1-2): 320–324. 1999.
- [33] N. MOISE Y I. MOYA. Correlation between lifetime heterogeneity and kinetics heterogeneity during chlorophyll fluorescence induction in leaves:: 1. Mono-frequency phase and modulation analysis reveals a conformational change of a PSII pigment complex during the IP thermal phase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1657 33–46. 2004.
- [34] H. KIRCHHOFF, C. BÜCHEL, C. LIFENG, L. STEVEN Y N. JON. Investigating The Organization Of Photosystem II In Spinach Photosynthetic Membranes By Atomic Force Microscopy, *Photosynthesis. Energy from the Sun.* 779-782. 2008.
- [35] E. CHAPPELLE, J. MCMURTREY III Y M. KIM Identification of the pigment responsible for the blue fluorescence band in the laser induced fluorescence (LIF) spectra of green plants, and the potential use of this band in remotely estimating rates of photosynthesis. *Remote Sensing of Environment.* 36(3): 213–218. 1991.
- [36] H. LICHTENTHALER, F. BABANI . Hydration dependent photosynthetic production of lichens, what do laboratory studies tell us about field performance. *Oxford Journals. Journal of Experimental Botany* 52, 2033-2042. 2001.
- [37] N. NELSON Y CF. YOCUM . Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol.* 57:521-65. 2006.

- [38] G. AGATI. Response of the *in vivo* chlorophyll fluorescence spectrum to environmental factors and laser excitation wavelength, *Pure Appl. Opt.* 7 797–807. 1998.
- [39] A. BARÓCSI, L. KOCSÁNYI, S. VÁRKONYI, P. RICHTER, Z. CSINTALAN Y K. SZENTE. Two-wavelength, multipurpose, truly portable chlorophyll fluorometer and its application in field monitoring of phytoremediation, *Meas. Sci. Technol.* 11:717–729. 2000.
- [40] D. GILLESPIE. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of Computational Physics* 22:4 403-434. 1976.
- [41] L. STAEHELIN. Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supramolecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* 76: 185–196, 2003.
- [42] F. EDWARDS.. Likelihood. Johns Hopkins University Press. Expanded edition. (1992).
- [43] G. DREYFUS, A. GÓMEZ-PUYOU Y M. TUENA. Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as detected by antibodies against the inhibitor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 100, 400-406. 1981
- [44] P. HORTON Y A. RUBAN. Regulation of Photosynthesis under Stress: Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.* 56:411. 365–373. 2005.
- [45] U. SCHREIBER, W. BILGER Y C. NEUBAUER. Chlorophyll Fluorescence as a Nonintrusive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. *Ecophysiology of Photosynthesis.* 100: 49-70.1995.
- [46] H. TRISSL Y J. LAVERGNE. Fluorescence Induction From Photosystem II: Analytical Equations for the Yields of Photochemistry and Fluorescence Derived From Analysis of a Model Including Exciton-Radical Pair Equilibrium and Restricted Energy Transfer Between Photosynthetic Units. *Australian Journal of Plant Physiology* 22:2 183 - 193. 1995.
- [47] R. DELOSME. Etude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au début d'une illumination intense. *Biochim Biophys Acta* 143: 108-128. 1967.

- [48] B. KROON. Variability of Photosystem II quantum yield and related processes in *Chlorella Pyrenoidosa* (Chlorophyta) acclimated to an oscillating light regime simulating a mixed photic zone. *Journal of phycology*, 30:5, 841-852. 1994.
- [49] R. STRASSER Y A. STIRBET . Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise OJIP: Fitting of experimental data to three different PS II models. *Mathematics and Computers in Simulation* 56:4, 451–462. 2001.
- [50] A. STIRBET Y K. GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol B: Biol* 104:236–257. 2011.
- [51] B. DAUM, D. NICASTRO, J. AUSTIN II, J. MCINTOSH Y W. KUHLBRANDTA. Arrangement of Photosystem II and ATP Synthase in Chloroplast Membranes of Spinach and Pea. *The Plant Cell*. 22: 1299–1312. 2010.
- [52] R. ERBAN Y S. CHAPMAN. Stochastic modelling of reaction–diffusion processes: algorithms for bimolecular reactions. *Phys. Biol.* 6:1-18. 2009.
- [53] K MAXWELL Y G. JOHNSON. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51 (341):659-668. 2000.
- [54] B. RUTH. A device for the determination of the microsecond component of the in vivo chlorophyll fluorescence induction kinetics, *Meas. Sci. Technol.* 1:517-521. 1990.
- [55] V. JUNZA, M. SZCZEPANIAK, S. BRASLAVSKY, J. SANDER, M. NOWACZYK Y M. RÖGNER. A photoprotection mechanism involving the D(2) branch in photosystem II cores with closed reaction centers. Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr, Germany. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 7(11):1337-43. 2008.
- [56] D. LAZÁR , P. TOMEK, P. ILÍK Y J. NAUŠ. Determination of the antenna heterogeneity of Photosystem II by direct simultaneous fitting of several fluorescence rise curves measured with DCMU at different light intensities. *Photosynthesis Research*. 68:247. 2001.

Anexos

4.1. Programa para el ajuste de Curvas

```
#include <iostream>
#include <fstream>
#include <stdlib.h> //requerido para usar 'rand()'
#include <math.h>
#include <time.h> // requerido para usar 'srand(time(
    NULL))'

using namespace std;

const double dte=0.01;
const int N=500000000;
const double sigm=0.02; // declaracion de constantes
const double chi=24.725;
double pi=3.1415926535897;

// Funcion que calcula numero aleatorio entre 1-a/2 and 1+a
// /2

double randfactor (double a)
{
    double r;
    r= (double) rand()/((double)RAND_MAX);
    r=1+(r-0.5)*a;
    return r;
}

// Calculo del tiempo de reaccion con Gillespie
```

```

double rtime (double A, double c)
{
    double r, t;

    r=(double) rand()/RAND_MAX;
    t= (1/(A*c))*log(1/r);

    return t;
}

// Calculo de fluorescencia total
double Fluo (double fo, double a, double b, double c,
    double d, double e, double f, double f1, double f2,
    double f3)
{
    double r;
    r=fo+a*f1/(1-b*f1)+c*f2/(1-d*f2)+e*f3/(1-f*f3);
    return r;
}

// Primer umbral
double Kinetics1 (double& dtt, double& A1, double& B1,
    double c1)
{
    double t,tao,x;

    t=dtt;
    while( t < dte)
    {
        if (A1>0)
        {
            tao= rtime(A1,c1);
            A1--;
            B1++;
            t=t+tao;
        }
    }
}

```

```

else
{
    t=dte;
}
}
dtt=t-dte;
x=B1/N;
return x;
}
// Segundo Umbral
double Kinetics2 (double& dtt, double B1, double T1, double
    & A2, double& B2, double c2, double T)
{
    double t,tao,x;

    t=dt;
    while(t < dte)
    {
        if (A2>0 && T>T1)
        {
            tao= rtime(A2,c2);
            A2--;
            B2++;
            t=t+tao;
        }
        else
        {
            t=dte;
        }
    }
    dtt=t-dte;

    x=B2/N;
    return x;
}

```

```

int main()
{
int t1,t2,count,countx,pts,p,n;
double nllm, ff, dtt,mm,x1,x2,x3,A1,B1,A2,B2,A3,B3,b1,b2,
b3,c1,c2,c3,k1,k2,k3,t,tt,tao,tao1,tao2,tao3,test,a1,
aa1,a2,aa2,a3,aa3,p1,pp1,p2,pp2,p3,pp3,F,F1,F2,F3,FF,
dif,sq,er,erx,T1,T2,v1,v2,chi2;

srand(time(NULL)); //requirido for "randomness"
ifstream exp ("experimento120.dat"); // datos
experimentales
ofstream sim;
sim.open ("model.dat"); //datos simulados
ofstream par ("parmle.dat"); // parametros de curva
simulada

pts=24000;

ff=1.7; // F0

k1=2.66576; // region OJ(1/ms)
a1=0.96638;
p1=0.46959;

k2=0.14612; // region JI (1/ms)
a2=0.94119;
p2=0.513721;

k3=0.0099; // region IP (1/ms)
a3=0.71143;
p3=0.62768;

T1=0.97;
T2=20.4; //Tiempos umbrales

double eu,eux,dd,delta;

```

```

par << "k1      " << "a1      " << "p1      " << "k2      " << "a2
      " << "p2      " << "k3      " << "a3      " << "p3      " << "T1
      " << "T2      " << "n11    " << endl;

double dtt1, dtt2, dtt3, ts;
int cn=0;
er=0.025;
dd=0;
count=0;
do
{
  cout << "Iteration: " << count+1 << " ";
  dtt1=0;
  dtt2=0;
  dtt3=0;
  A1=N;
  A2=N;
  A3=N;
  B1=0;
  B2=0;
  B3=0;
  sq=0;

//Rango de busqueda de parametros

  c1=randfactor(0.01)*k1;
  aa1=randfactor(0.01)*a1;
  pp1=randfactor(0.01)*p1;

  c2=randfactor(0.01)*k2;
  aa2=randfactor(0.01)*a2;
  pp2=randfactor(0.01)*p2;

  c3=randfactor(0.01)*k3;
  aa3=randfactor(0.01)*a3;
  pp3=randfactor(0.01)*p3;

```

```

t1=randfactor(0.01)*T1;
t2=randfactor(0.01)*T2;

\\calculo de error

for( int i = 0; i < pts; i++ )
{
    ts=i*dte;
    b1=Kinetics1 (dtt1, A1, B1, c1);
    b2=Kinetics2 (dtt2, B1, t1, A2, B2, c2, ts);
    b3=Kinetics2 (dtt3, B2, t2, A3, B3, c3, ts);
    exp>>t>>FF;
    F=Fluo (ff, aa1, pp1, aa2, pp2, aa3, pp3, b1, b2, b3);
    dif=FF-F;
    sq=sq+dif*dif;
}
chi2=sq/(sigm*sigm);
erx=sqrt(sq/pts);
par<<c1<<" "<<aa1<<" "<<pp1<<" "<<c2<<" "<<aa2<<" "<<pp2
    <<" "<<c3<<" "<<aa3<<" "<<pp3<<" "<<t1<<" "<<t2<<"
    "<<chi2<<" "<<erx<<endl;
cout<<"Error:  "<<erx<<endl;
if (erx<er) {
    k1=c1;
    a1=aa1;
    p1=pp1;

    k2=c2;
    a2=aa2;
    p2=pp2;

    k3=c3;
    a3=aa3;
    p3=pp3;

    T1=t1;
    T2=t2;
    er=erx;
}

```

```

    cout<<"Mejor ajuste"<<endl;
    nllm=chi2;
}
count++;
exp.clear();
exp.seekg(0, ios::beg);
} while (count<100);

//creando el archivo

cout<<"Printing final data"<<endl;
dtt1=0;
dtt2=0;
dtt3=0;
A1=N;
A2=N;
A3=N;
B1=0;
B2=0;
B3=0;
sq=0;
for( int i = 0; i < pts; i++ )
{
    ts=i*dte;
    b1=Kinetics1 (dtt1, A1, B1, k1);
    b2=Kinetics2 (dtt2, B1, T1, A2, B2, k2,ts);
    b3=Kinetics2 (dtt3, B2, T2, A3, B3, k3,ts);
    exp>>t>>FF;
    F=Fluo (ff, a1, p1, a2, p2, a3, p3, b1, b2, b3);
    dif=FF-F;
    sq=sq+dif*dif;
    sim<<t<<" "<<FF<<" "<<F<<endl;
}
chi2=sq/(sigm*sigm);
eu=sqrt(sq/pts);

cout<<"k      " <<"a      " <<"p      " <<endl;
cout<<k1<<" " <<a1<<" " <<p1<<endl;

```

```
cout<<k2<<" "<<a2<<" "<<p2<<" "<<T1<<endl;
cout<<k3<<" "<<a3<<" "<<p3<<" "<<T2<<endl;
cout<<"chi2: "<<chi2<<endl;
cout<<"Error: "<<eu<<endl;

sim.close();
exp.close();
par.close();
return 0;
}
```