

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS

SIMULACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
FLUORESCENCIA INDUCIDA DE CLOROFILA *a* MEDIANTE
UN MODELO ESTOCÁSTICO

TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE FÍSICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

ERIKA JOSELYN LUDEÑA MAZA

`erika.ludena@epn.edu.ec`

Director: MARCO VINICIO BAYAS REA, Ph.D.

`marco.bayas@epn.edu.ec`

QUITO, DICIEMBRE 2019

DECLARACIÓN

Yo, ERIKA JOSELYN LUDEÑA MAZA, 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.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Erika Joselyn Ludeña Maza

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por ERIKA JOSELYN LUDEÑA MAZA, bajo mi supervisión.

Marco Vinicio Bayas Rea, Ph. D.
Director del Proyecto

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme las fuerzas necesarias para no rendirme y seguir luchando día a día, con paciencia y dedicación.

A mi director, el Dr. Marco Bayas, por su infinita paciencia, sus consejos y conocimientos que fueron imprescindibles para poder culminar con éxito este trabajo.

A mis padres, Mariana y Baldomero por sus sabios consejos y apoyo incondicional, lo cual me ha permitido alcanzar todas mis metas.

A mis hermanos, Verónica, Jessy y Bryan, quienes son un pilar fundamental en mi vida pues se han mantenido a mi lado en todo momento, bueno y malo.

A mi sobrinito, Joel, por contagiarme su alegría cada día y ser mi principal motivación para jamás desistir en mis objetivos.

A Michel, por haber creído en mí cuando ni siquiera yo lo hacía y por inspirarme a ser mejor persona cada día.

Y finalmente a mis amigos más cercanos: Fernando, Gaby, Albita, Andrés M., Andrés F., Diego y Jimmy, con quienes he contado desde que los conocí, gracias por los grandes recuerdos y momentos que hemos compartido durante toda esa travesía que fue mi carrera universitaria.

DEDICATORIA

“A mis padres, Mariana y Baldomero.

A mis hermanos Verónica, Jessy y Bryan.

A Joel, Kitty y Castiel.

À mon petit copain, Michel Sébastien.”

Índice general

Declaración de Autoría	I
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tablas	XI
Resumen	XIII
Abstract	XIV
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	4
2.1. Fundamentos Biofísicos	4
2.1.1. Cadena de Transporte de electrones	5
2.1.2. Fluorescencia Inducida de Clorofila <i>a</i>	6
2.1.3. Modelo Q_A y sus limitaciones	7
2.2. Modelo Estocástico para la Fluorescencia Inducida	8
2.2.1. Cálculo de las concentraciones $q(t)$	9
2.3. Efecto de la temperatura en la cinética de transición	11
3. Metodología	13
3.1. Curvas experimentales F^{exp}	13
3.1.1. Preparación de muestras	13
3.1.2. Medidor de Fluorescencia	14
3.1.3. Experimentos	15
3.1.3.1. Esquema experimental 1	15
3.1.3.2. Esquema experimental 2	16
3.2. Ajuste de las curvas experimentales	17
3.2.1. Curvas teóricas $F(t)$	17
3.2.2. Algoritmo Genético	18
3.2.2.1. Función objetivo (\mathfrak{F}_{obj})	19
3.2.2.2. Operadores Básicos del AG	20
Generación de la población inicial	20
Codificación y decodificación	20

Selección	22
Entrecruzamiento cromosómico	23
Mutación	24
3.2.2.3. Criterios de selección de parámetros del AG	25
3.3. Simulación del efecto de la temperatura	25
3.4. Validación de las simulaciones	26
4. Validación del código para el ajuste de curvas de fluorescencia	28
4.1. Experimento de referencia	28
4.2. Búsqueda de parámetros	29
4.2.1. Método 1	29
4.2.2. Método 2	30
4.2.3. Método 3	31
5. Resultados	35
5.1. Validación de las simulaciones a diferentes temperaturas	35
5.1.1. Parámetros derivados de las curvas de referencia	36
5.1.1.1. Curva a T=20°C	36
i) Estrategia de ajuste 1	36
5.1.1.2. Curva a T=30°C	38
i) Estrategia de ajuste 1	38
ii) Estrategia de ajuste 2	40
iii) Estrategia de ajuste 3	40
5.1.1.3. Curva a T=40°C	41
i) Estrategia de ajuste 1	41
ii) Estrategia de ajuste 2	43
iii) Estrategia de ajuste 3	43
5.1.2. Simulación del efecto de la temperatura	45
5.2. Simulación con los parámetros obtenidos del esquema experimental 1	46
5.2.1. Parámetros derivados de la curva a 25°C	47
5.2.2. Curvas de fluorescencia a diferentes temperaturas	49
5.2.2.1. Simulaciones con $E_{A1} = 0.05 eV$	49
5.2.2.2. Simulaciones con $E_{A1} = 0.1 eV$	51
5.2.2.3. Simulaciones con $E_{A1} = 0.15 eV$	53
5.3. Simulación con los parámetros obtenidos del esquema experimental 2	56
5.3.1. Parámetros derivados de la curva a 25°C	56
5.3.2. Curvas de fluorescencia a diferentes temperaturas	58
5.3.2.1. Simulaciones con $E_{A1} = 0.05 eV$	58
5.3.2.2. Simulaciones con $E_{A1} = 0.1 eV$	60
5.3.2.3. Simulaciones con $E_{A1} = 0.15 eV$	62
6. Conclusiones	65
Anexos	73

A. Códigos de simulación	74
A.1. Código para el ajuste de las curvas experimentales	74
A.2. Código para la simulación a diferentes temperaturas	81
B. Operadores Complementarios del Algoritmo Genético	84
B.1. Mezcla (Shuffle) y Ordenamiento	84
C. Cálculos adicionales	86
C.1. Simulaciones con diferentes energías de activación E_{A1}	86
C.1.1. Curvas a $T= 30^{\circ}\text{C}$	86
C.1.2. Curvas a $T= 40^{\circ}\text{C}$	87
C.2. Resumen de los parámetros encontrados	88

Índice de figuras

2.1.	Estructura de un cloroplasto y su localización en una hoja.	4
2.2.	Esquema del flujo de electrones en la membrana tilacoide.	5
2.3.	Regiones de la curva de fluorescencia inducida de clorofila <i>a</i> . La curva fue obtenida de una hoja de espinaca a 25°C.	7
2.4.	Perfil de energía potencial para la transición de estados del FSII.	12
3.1.	Preparación de muestras: 1) Hidratación de las hojas. 2) Secado en la cabina de flujo laminar. 3) Adaptación de las hojas a la oscuridad.	14
3.2.	Esquema experimental de las mediciones de fluorescencia.	15
3.3.	Montaje experimental del esquema 1: 1) Unidad de Control del MC-PAM, 2) Emisor, 3) Detector, 4) Hoja de espinaca, 5) Computador portátil.	15
3.4.	Montaje experimental del esquema 2: (a) 1) Incubadora, 2) Unidad de Control de MC-PAM, 3) Computador, 4) Termómetro. (b) Interior de la incubadora: 5) Detector, 6) Hoja de espinaca, 7) Soporte móvil.	16
3.5.	Esquema para generar $F_i(t)$ usando el Modelo Estocástico.	17
3.6.	Estructura del algoritmo genético simple aplicado en este trabajo.	18
3.7.	Esquema utilizado para generar la población inicial (izquierda) y seleccionar a los progenitores (derecha)	21
3.8.	Esquema para codificar y decodificar de forma binaria.	22
3.9.	Esquema utilizado para generar la descendencia (izquierda) y reorganizar los individuos de la población actual (derecha).	23
3.10.	Esquema utilizado para mutar los individuos de la población.	24
4.1.	Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} para (a) $pm = 1\%, 2\%, 3\%$. y (b) $ng = 8, 16, 24, 32, 64$	29
4.2.	Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} para $g_{max} = 100, 200, 300$	30
4.3.	Curva de fluorescencia experimental, teórica según el estudio previo y actual de la región (a) OJ, (b) JI y (c) IP a 20°C.	31
4.4.	Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} para $ng = 16, 24, 32, 64$ (a) usando 100 generaciones y 200 generaciones.	32
4.5.	(a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} para $ng = 16, 24, 32$ usando 100 generaciones y $pm = 0.8\%$ y para (b) $ng = 16$ usando 100 generaciones y $pm = 0.5\%, 0.8\%$	33
4.6.	Curva de fluorescencia inducida teórica y experimental a 20°C.	33

5.1. Curvas de fluorescencia inducida del experimento 2 de Villagómez a 20°C, 30°C y 40°C.	36
5.2. Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP a 20°C.	36
5.3. (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental de Villagómez a 20°C usando la estrategia de ajuste 1.	37
5.4. Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP a 30°C.	38
5.5. (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental de Villagómez a 30°C usando la estrategia de ajuste 1.	39
5.6. Curvas experimentales y simuladas a 30°C usando la estrategia de ajuste 2.	40
5.7. Curvas experimentales y simuladas a 30°C usando la estrategia de ajuste 3.	41
5.8. Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP a 40°C.	41
5.9. (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental de Villagómez a 40°C, usando la estrategia de ajuste 1.	42
5.10. Curvas experimentales y simuladas a 40°C, usando la estrategia de ajuste 2.	43
5.11. Curvas experimentales y simuladas a 40°C, usando la estrategia de ajuste 3.	44
5.12. Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius para 20° C, 30° C, 40° C.	45
5.13. Comparación entre las curvas experimentales y simuladas mediante la estrategia de ajuste 1 y la ecuación de Arrhenius para (a) 30° C y (b) 40° C.	46
5.14. (a) Curvas medidas a 25°C y (b) curva promedio con su región de error usando el esquema experimental 1.	46
5.15. Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP para el esquema experimental 1.	47
5.16. (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental a 25°C usando el esquema experimental 1 y la estrategia de ajuste 1.	48
5.17. Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.05 eV$. Las barras verticales representan el error experimental.	49
5.18. Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.05 eV$ tomando como referencia una temperatura de 25°C.	50
5.19. Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.1 eV$. Las barras verticales representan el error experimental.	52
5.20. Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.10 eV$ y tomando como referencia una temperatura de 25°C.	52

5.21. Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.15 \text{ eV}$. Las barras verticales representan el error experimental.	54
5.22. Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.15 \text{ eV}$ y tomando como referencia una temperatura de 25°C.	55
5.23. (a) Curvas medidas a 25°C y (b) curva promedio con su región de error usando el esquema experimental 2.	56
5.24. Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP para para el esquema experimental 2.	56
5.25. (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental a 25°C usando el esquema experimental 2.	57
5.26. Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$. Las barras verticales representan el error experimental.	59
5.27. Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$ y tomando como referencia una temperatura de 25°C.	59
5.28. Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.10 \text{ eV}$. Las barras verticales representan el error experimental.	61
5.29. Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.10 \text{ eV}$ y tomando como referencia una temperatura de 25°C.	62
5.30. Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 2. Las barras verticales representan el error experimental.	63
5.31. Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.15 \text{ eV}$ y tomando como referencia una temperatura de 25°C.	64
B.1. Esquema para mezclar (izquierda) y ordenar (derecha) los elementos de un vector.	84
C.1. Curvas experimentales y simuladas usando las k_α determinadas por Arrhenius para 30°C.	86
C.2. Curvas experimentales y simuladas usando las k_α determinadas por Arrhenius para 40°C.	87

Índice de tablas

4.1. Parámetros reportados por Villagómez [22] para las curvas a 20°C del experimento 1.	29
4.2. Ajustes según el estudio anterior y actual de la región OJ, JI e IP. . .	31
4.3. Primer conjunto de parámetros encontrados con el Método 3 para la curva medida por Villagomez.	32
4.4. Segundo conjunto de parámetros hallados con el Método 3 para la curva medida por Villagomez.	33
5.1. Ajuste preliminar de las curvas medidas a 20°C por Villagómez. . .	36
5.2. Ajuste de la curva medida por Villagómez a 20°C, usando la estrategia 1.	37
5.3. Ajuste preliminar de las curvas medidas a 30°C por Villagómez. . .	38
5.4. Ajuste de la curva medida por Villagómez a 30°C, usando la estrategia 1.	39
5.5. Ajuste de la curva medida por Villagómez a 30°C usando la estrategia 2.	40
5.6. Ajuste de la curva medida por Villagómez a 30°C usando la estrategia 3.	41
5.7. Ajuste preliminar de las curvas medidas a 40°C por Villagómez. . .	41
5.8. Ajuste de la curva medida por Villagómez a 40°C, usando la estrategia 1.	42
5.9. Ajuste de la curva medida por Villagómez a 40°C usando la estrategia 2.	43
5.10. Ajuste de la curva medida por Villagómez a 40°C usando la estrategia 3.	44
5.11. Constantes cinéticas determinadas según la ecuación de Arrhenius y el según la estrategia de ajuste 1 para las curvas a 30°C y 40°C. . .	45
5.12. Resultado del ajuste preliminar para las curvas medidas a 25°C para el esquema 1.	47
5.13. Ajuste de la curva medida bajo el esquema experimental 1 a 25°C, usando la estrategia 1.	48
5.14. Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.05 eV$	49
5.15. Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.1 eV$	51

5.16. Constantes cinéticas encontradas entre 10°C y 40°C con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.15 \text{ eV}$	54
5.17. Resultado del ajuste preliminar para las curvas medidas a 25°C para el esquema experimental 2.	57
5.18. Resultado del ajuste global de la curva obtenida usando el esquema experimental 2.	57
5.19. Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$	58
5.20. Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.10 \text{ eV}$	60
5.21. Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.15 \text{ eV}$	63
C.1. Constantes cinéticas determinadas mediante la ecuación de Arrhenius para diferentes energías de activación E_{A1} a 30°C	86
C.2. Constantes cinéticas determinadas mediante la ecuación de Arrhenius para diferentes energías de activación E_{A1} a 40°C	87
C.3. Constantes cinéticas encontradas con diferentes métodos: <i>a)</i> Ajuste global de las curvas, <i>b)</i> Ajuste parcial usando parámetros constantes y <i>c)</i> Ecuación de Arrhenius.	88
C.4. Parámetros de conectividad encontrados con diferentes métodos: <i>a)</i> Ajuste global de las curvas, <i>b)</i> Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros variables; y <i>c)</i> Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros constantes.	88
C.5. Pesos estadísticos encontrados con diferentes métodos: <i>a)</i> Ajuste global de las curvas, <i>b)</i> Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros variables; y <i>c)</i> Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros constantes.	89
C.6. Concentraciones q_{OJ} y q_{JI} encontrados con diferentes métodos: <i>a)</i> Ajuste global de las curvas, <i>b)</i> Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros variables; y <i>c)</i> Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros constantes.	89

Resumen

En este trabajo, se simuló la emisión de fluorescencia inducida de clorofila *a* para hojas de espinaca entre 10°C y 40°C. El modelo utilizado considera que las transiciones asociadas a cambios conformacionales dentro del fotosistema II ocurren estocásticamente con constantes cinéticas que obedecen a la ecuación de Arrhenius. Los parámetros del modelo, necesarios para la simulación, se encontraron mediante el ajuste de la curva predicha por el modelo con las curvas experimentales obtenidas a 25°C con hojas de espinaca. A la mencionada temperatura, los valores encontrados para las constantes cinéticas en las regiones OJ, JI e IP fueron $1.748 \left[\frac{1}{ms} \right]$, $0.104 \left[\frac{1}{ms} \right]$, $0.013 \left[\frac{1}{ms} \right]$ respectivamente. El ajuste se realizó utilizando el algoritmo genético obteniendo un error de 2.5%. En general, se encontró que el modelo no se ajusta completamente en la región OJ de la curva Kautsky; sin embargo, el comportamiento de las curvas de fluorescencia predichas por la ecuación de Arrhenius es consistente con los resultados experimentales disponibles. La emisión de fluorescencia por efecto de la temperatura fue más prominente en las regiones JI e IP (fase térmica) ya que en la región OJ el aumento de fluorescencia representa únicamente el 10% del incremento en la región IP. Finalmente, la información obtenida de las simulaciones permite definir los requerimientos mínimos para la preparación de los experimentos, de forma que las variaciones asociadas a la temperatura no se confundan con las variaciones propias de los errores en las medidas. Se recomienda realizar experimentos con intervalos de 5°C, diseñados de tal forma que el error asociado a la medición sea menor al 0.34% de la fluorescencia máxima en la región OJ, al 1.02% en la región JI y al 1.38% en la región IP.

Abstract

In this work, the induced fluorescence emission of chlorophyll *a* for spinach leaves between 10°C and 40°C was simulated. The model used considers that the transitions associated with the conformational changes within photosystem II occur stochastically with kinetic constants that follow the Arrhenius equation. The parameters necessary for the simulation were found by fitting the curve predicted by the model with the experimental curves obtained at 25°C with spinach leaves. At this temperature, the values found for the kinetic constants in the OJ, JI and IP regions were $1.748[\frac{1}{ms}]$, $0.104[\frac{1}{ms}]$, $0.013[\frac{1}{ms}]$, respectively. The fitting was made using the genetic algorithm obtaining an error equal to 2.5%. In general, it was found that the model does not fit completely the OJ region of the Kautsky curve; however, the behavior of the fluorescence curves predicted by the Arrhenius equation is consistent with the available experimental results. Fluorescence emission due to temperature was more prominent in the JI and IP regions (thermal phase), since in the OJ region the increase in fluorescence represents only 10% of the increase in the IP region. Finally, the information obtained from the simulations allows knowing the minimum requirements for the preparation of the experiments and thus avoid that the simulated curves are confused with the experimental error. We recommend perform experiments with 5°C intervals, designed in such a way that the error associated with the measurement is less than 0.34% of the maximum fluorescence in the OJ region, less than 1.02% in the JI region and less than 1.38% in the IP region.

Capítulo 1

Introducción

La medición de fluorescencia inducida de clorofila a es una técnica no invasiva, rápida y altamente sensible que se emplea para evaluar la eficiencia del aparato fotosintético y el estado fisiológico de plantas superiores [1–4], permitiendo realizar estudios agrícolas, ambientales y ecológicos [5–9]. Esta técnica se enfoca en analizar la evolución temporal de la fluorescencia de la clorofila a relacionada con la actividad del llamado fotosistema II (FSII), presente en las plantas superiores [2].

La fluorescencia es un mecanismo de desexcitación de los fotosistemas de las hojas [11, 18, 19]; en condiciones normales, su rendimiento es bajo debido a que toda la energía absorbida se emplea en los procesos de oxido-reducción asociados a la fotosíntesis [8, 11]. La fluorescencia inducida es máxima cuando una hoja adaptada a la oscuridad se ilumina simultáneamente con luz visible y con un pulso de luz que excita a todos los centros de reacción y los cierra [1, 8].

Hasta el momento no se cuenta con un modelo que pueda explicar satisfactoriamente todas las características de las curvas de fluorescencia inducida de clorofila a . El modelo más aceptado es el llamado modelo Q_A , propuesto por Duysens y Sweers, el cual manifiesta que el aumento de fluorescencia desde un valor mínimo F_0 a un valor máximo F_M se debe a la reducción de la llamada Quinona A (Q_A) [4, 20]. Este modelo constituye la base de casi todos los tratamientos teóricos de

las mediciones de fluorescencia. A pesar de que el modelo Q_A describe satisfactoriamente la actividad fotoquímica del FSII, se ha identificado que no explica algunos aspectos relacionadas con la dependencia temporal y con el efecto de la temperatura en el comportamiento de la fluorescencia [4].

La mayoría de modelos de fluorescencia inducida consideran una población homogénea del FSII, como resultado las curvas simuladas son diferentes de aquellas medidas en el experimento [4]; por ello, este estudio partió de una extensión del modelo de Paillotin [21] que fue planteado en el trabajo de Villagómez [22] (estudio anterior). Este modelo considera la heterogeneidad de los dominios fotosintéticos y la presencia de transiciones estocásticas asociadas a cambios conformacionales. El estudio realizado por Villagómez [22] incluyó curvas experimentales que fueron realizadas con este modelo.

Las curvas medidas en el estudio mencionado anteriormente presentaban un comportamiento anómalo a 30°C y 40°C y adicionalmente, mostraban inconsistencias en los parámetros del modelo obteniendo valores negativos en algunos casos [22]. Dichos parámetros se determinaron mediante una búsqueda bastante dirigida basada en la identificación de un vector que genere una disminución en el valor del estadístico χ^2 para buscar el siguiente punto en la dirección del gradiente. Aunque este procedimiento era relativamente rápido, no existe total certeza de que la dirección encontrada aleatoriamente sea la mejor de todas las posibles.

Frente a estos problemas, este trabajo surge con el fin de analizar el alcance del modelo estocástico así como también solventar las deficiencias y limitaciones presentes en el método experimental y en el algoritmo de ajuste utilizado en el trabajo de Villagómez [22] (estudio anterior); para así explicar los mecanismos que aparecen durante la emisión de fluorescencia inducida de clorofila *a* en cada región de la curva Kautsky a diferentes temperaturas.

Los 11 parámetros del modelo que permiten un ajuste óptimo de las curvas experimentales se encontraron mediante el algoritmo genético simple, el cual ha sido demostrado útil en problemas de búsqueda y optimización de sistemas complejos [23, 25]. Su ventaja radica en que este procedimiento de búsqueda aleatorio es

multidireccional y así se puede encontrar una solución con un nivel aceptable y en un tiempo competitivo en relación a otros algoritmos [23–26].

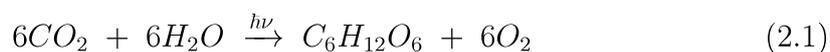
Los resultados de las simulaciones representan un avance en el entendimiento del efecto de la temperatura en la emisión de fluorescencia inducida de clorofila *a* y proporcionan información referencial para desarrollar los experimentos y realizar las mediciones sin el riesgo de confundir las curvas a diferentes temperaturas con los errores experimentales.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Fundamentos Biofísicos

La fotosíntesis es un proceso físico-químico que tiene lugar en los organismos fotosintéticos y resulta en la síntesis de compuestos orgánicos mediante la absorción de luz [14, 17]. En términos generales, la fotosíntesis se describe con la siguiente fórmula:



Este proceso tiene lugar en los cloroplastos, los cuales son orgánulos celulares limitados por una doble membrana (externa e interna) que contienen sacos en forma de disco conocidos como tilacoides apilados en estructuras llamadas granas (Figura 2.1) [1].



Figura 2.1: Estructura de un cloroplasto y su localización en una hoja.

La membrana tilacoide contiene principalmente los siguientes complejos proteínicos: complejo antena (LHC), complejo ATP sintasa, fotosistema I (FSI), fotosistema II (FSII) y citocromo b_6/f ; los cuales son indispensables para la llamada fase luminosa de la fotosíntesis [14, 16].

2.1.1. Cadena de Transporte de electrones

Cuando un fotón incide sobre una molécula de clorofila (Chl) del complejo antena del FSII, uno de sus electrones pasa a un estado excitado y cuando este electrón regresa a su estado fundamental, el electrón de una molécula de Chl cercana se excita; esto continúa hasta llegar al centro de reacción donde se encuentra un par de moléculas de Chl llamado P_{680} [14, 16].

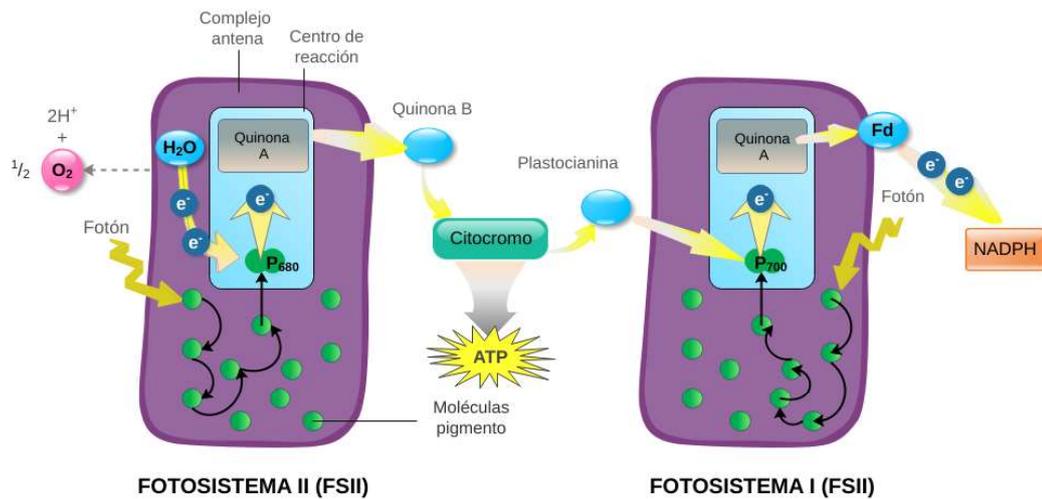


Figura 2.2: Esquema del flujo de electrones en la membrana tilacoide.

En la reacción fotoquímica primaria, el electrón se transfiere desde P_{680} , en el primer estado singlete excitado (P_{680}^*), a la feofitina (Pheo) y desde allí al aceptor primario llamado quinona Q_A [14]. La separación de carga crea un oxidante altamente activo (P_{680}^+) [16].

Los centros de reacción pueden estar en un estado abierto o cerrado. La configuración para un estado cerrado es [16]:



A su vez, se requieren cuatro reacciones fotoquímicas para extraer cuatro electrones de dos moléculas de agua, produciendo una molécula de oxígeno y liberando los protones en el lumen de la membrana tilacoidal [15]. Estos electrones se transfieren al P_{680}^+ para reemplazar aquellos transferidos a la quinona Q_A [14, 15].

Al quedar reducida Q_A , el electrón fotoexcitado pasa del FSII a un nivel más bajo de energía en el FSI a través de la quinona Q_B , dando lugar a un centro de reacción abierto con la siguiente configuración [16, 18]:



Esto se repite hasta que Q_B reciba dos electrones (Q_B^{2-}), luego se protoniza usando protones del estroma para generar el plastoquinol PQH_2 . Los productos se transfieren al citocromo b_6/f [11, 16].

Esta serie de reacciones redox-oxidativas se conoce como *cadena de transporte de electrones fotosintética* (Fig. 2.2) cuyo producto final es la regeneración de los portadores de electrones y la creación de un gradiente de protones para obtener adenosín trifosfato (ATP) [1, 15].

2.1.2. Fluorescencia Inducida de Clorofila *a*

La fluorescencia de clorofila *a* está asociada a la energía emitida por las moléculas de Chl *a* desexcitadas pertenecientes al FSII y se induce cuando un organismo fotosintético se mantiene en la oscuridad y luego se lo ilumina con luz visible mientras un pulso de luz cierra los centros de reacción. En ese momento, se produce un aumento repentino de la fluorescencia de clorofila, seguido por una disminución lenta de la misma. Este fenómeno se conoce como *efecto Kautsky* [1, 3, 16].

La curva Kautsky describe la evolución temporal de la fluorescencia inducida y está constituida por tres regiones principales con tiempos característicos de duración: O-J de 0 hasta ~ 3 ms, J-I de ~ 3 hasta ~ 30 ms e I-P de ~ 30 hasta ~ 300 ms (ver Fig.2.3); el tiempo $t = 0$ comienza al inicio de la exposición a la luz [1, 10].

Es decir, los anchos característicos de las regiones OJ, JI e IP son del orden de 10^0 ms, de 10^1 ms y 10^2 ms, respectivamente.

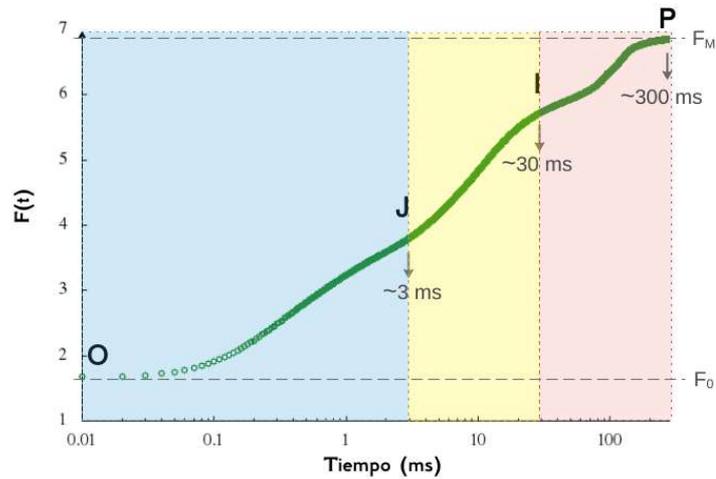


Figura 2.3: Regiones de la curva de fluorescencia inducida de clorofila *a*. La curva fue obtenida de una hoja de espinaca a 25°C.

La evolución de la fluorescencia en las regiones de la curva Kaustky depende del desempeño adecuado de los aceptadores y donadores en el transporte de electrones dentro del FSII y en la comunicación efectiva entre los centros de reacción [1]. La región O-J está asociada a la reducción gradual de quinona Q_A y se conoce como «fase fotoquímica» mientras que la región J-I-P se conoce como «fase térmica» por su sensibilidad con la temperatura y refleja principalmente una reducción secuencial de las quinonas B (en la región JI) y se relaciona con el flujo de electrones posterior hacia la quinona A del PSI (en la región IP) [28]. Bajo situaciones de estrés como alta temperatura, se inhibe el proceso de difusión de agua, y aparece un nuevo pico (Punto K) en la curva de fluorescencia [29, 30].

2.1.3. Modelo Q_A y sus limitaciones

El modelo Q_A fue propuesto por Duysens y Sweers en 1963 [20] y propone que el aumento de fluorescencia desde un valor mínimo F_0 a un valor máximo F_M se debe a la reducción de la quinona A (Q_A). Sin embargo, se ha identificado la existencia de limitaciones relacionadas con la variación de fluorescencia a causa

de la temperatura, lo cual no se puede explicar dentro del marco de este modelo [4, 20].

Otra inconsistencia experimental del modelo Q_A se relaciona con el valor máximo de la fluorescencia inducida [4]. Un pulso saturado induce, en el mejor de los casos, solo el 65 % de la fluorescencia máxima y en presencia de DCMU (inhibidor de transporte de electrones), solo induce alrededor del 75 % de la fluorescencia máxima [4].

Para tomar en cuenta las limitaciones del modelo Q_A se ha sugerido [4] que el rendimiento de la fluorescencia no solo depende de la reducción de Q_A sino que también está determinado por procesos adicionales como:

- Cambios conformacionales, inducidos por la luz, en las proteínas de las unidades fotosintéticas [31].
- Existencia del campo eléctrico uniforme transmembranal que induce la separación de carga. Los campos locales del FSII podrían relacionarse con el aumento de fluorescencia [4].
- La heterogeneidad de los centros de reacción del FSII [4].

2.2. Modelo Estocástico para la Fluorescencia Inducida

El modelo propuesto por Paillotin [21] describe el movimiento de excitación entre las diferentes unidades del FSII mediante el parámetro de conectividad p considerando que éstas no están aisladas sino agrupadas en dominios que contienen cuatro centros de reacción, los cuales pueden estar abiertos o cerrados según el estado de oxidación de Q_A .

Por un lado, el valor experimental del rendimiento macroscópico de la fluorescencia ($V(t)$) se encuentra conociendo el valor máximo F_m y mínimo de fluorescencia F_0 :

$$\Delta V(t) = \frac{F(t) - F_0}{F_m - F_0}. \quad (2.4)$$

Por otro lado, mediante el modelo de Paillotin, se establece una relación entre $V(t)$, la concentración de centros de reacción cerrados $q(t)$ y el parámetro de conectividad p [21]:

$$\Delta V(t) = \frac{(1-p)q(t)}{1-pq(t)}, \quad (2.5)$$

De las ecuaciones 2.4 y 2.5 se obtiene la expresión matemática que describe la evolución temporal de la fluorescencia inducida:

$$F(t) = F_0 + a \frac{q(t)}{1-pq(t)}, \quad (2.6)$$

donde a está definida como $(F_m - F_0)(1-p)$.

La extensión del modelo de Paillotin utilizada en este trabajo, permite modelar la fluorescencia inducida de clorofila a teniendo en cuenta la existencia de tres dominios fotosintéticos asociados a una transición y a una región específica de la curva Kautsky [22]. De forma análoga a 2.6, se establece:

$$F(t) = F_0 + \sum_{\alpha=1}^3 a_{\alpha} \frac{q_{\alpha}(t)}{1-p_{\alpha}q_{\alpha}(t)} \quad (2.7)$$

Donde F_0 es la fluorescencia inicial, a_{α} son los pesos estadísticos, p_{α} son los parámetros de conectividad y $q_{\alpha}(t)$ son las fracciones de los centros de reacción cerrados para cada dominio α ($\alpha = 1, 2, 3$).

2.2.1. Cálculo de las concentraciones $q(t)$

Suponiendo que inicialmente no se han efectuado transiciones, se establecen las siguientes condiciones iniciales para los centros de reacción abiertos A_{α} y cerrados B_{α} :

$$A_1 = A_2 = A_3 = N \quad B_1 = B_2 = B_3 = 0$$

Siendo N el número total de centros de reacción.

Para A_α y B_α se cumple que:



Como consecuencia de esto, A_α disminuye mientras B_α aumenta, siendo k_α la constante cinética de la transición del dominio tipo α . Las transiciones del tipo 2.8 son consideradas como cambios conformacionales [4]. Existen dos posibles configuraciones de las conformaciones: inactiva cuando el centro de reacción del FSII está abierto y activa cuando el centro de reacción está cerrado. La primera transición está asociada a la región O-J y es:



La segunda transición ocurre cuando el tiempo es mayor al valor umbral T_1 :



Cuya constante cinética está dada por:

$$k_2 = \begin{cases} 0 & \text{si } t < T_1 \\ k_2 & \text{si } t \geq T_1 \end{cases} \quad (2.11)$$

La tercera transición inicia en el valor umbral T_2 :



Con su respectiva constante cinética dada por:

$$k_3 = \begin{cases} 0 & \text{si } t < T_2 \\ k_3 & \text{si } t \geq T_2 \end{cases} \quad (2.13)$$

Los tiempos umbrales T_1 y T_2 delimitan las regiones de la curva Kautsky.

Para simular la dinámica de las transiciones descritas y determinar los tiempos

de ocurrencia se utilizó el algoritmo de Gillespie [32, 37]. Según este algoritmo el tiempo en el que se generará una transición tipo 2.9 está dado por:

$$\tau_\alpha = \frac{1}{k_\alpha A_\alpha} \cdot \ln \left(\frac{1}{r_\alpha} \right). \quad (2.14)$$

Siendo $r_\alpha \in [0, 1]$ un valor aleatorio.

Una vez alcanzado cada tiempo umbral, se comparan los tiempos τ_i y τ_j en los que ocurrirían las transiciones i o j , respectivamente para decidir la transición que tendrá lugar, la misma que será aquella con el menor valor de τ_α .

Con los valores determinados de A_α y B_α se puede encontrar las concentraciones de los centros de reacción cerrados $q(t)$ que están definidas como:

$$q_\alpha(t) = \frac{B_\alpha}{A_\alpha + B_\alpha} \quad (2.15)$$

2.3. Efecto de la temperatura en la cinética de transición

La ecuación de Arrhenius fue planteada originalmente para estudiar la cinética de las reacciones químicas y establece que:

$$k = A \cdot \exp \left(-\frac{E_A}{k_B \cdot T} \right) \quad (2.16)$$

Donde, k es la constante cinética, E_A es la energía de activación, A es el factor de frecuencia de colisiones, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. La energía de activación involucrada hace referencia a la barrera energética que debe superar el sistema para formar los productos. [38, 39].

Si bien la ecuación de Arrhenius fue desarrollada para reacciones químicas, estudios anteriores han demostrado que se la puede aplicar para predecir los cambios de las constantes cinéticas con la temperatura [40–43]. Por esta razón, se adaptó

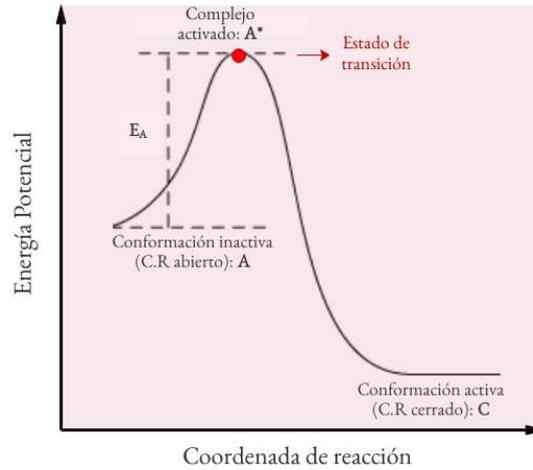


Figura 2.4: Perfil de energía potencial para la transición de estados del FSII.

la ecuación de Arrhenius a las transiciones del fotosistemas II del tipo 2.8. Se consideró dos configuraciones posibles: una conformación inicial inactiva con centros de reacción abiertos (A) y una conformación final activa con centros de reacción cerrados (C) (Ver Figura 2.4).

En nuestro caso, el sistema será una proteína la cual para llegar a su configuración final debe pasar por un configuración intermedia de máxima energía en donde se forma su complejo activado. La energía entregada para llegar al complejo activado A^* se produce por los choques entre la proteína (macromolécula) y las moléculas de su entorno.

Suponemos que este proceso sigue una ley probabilística descrita por la ecuación de Arrhenius y no hay razón para que esto no se cumpla para los FSII, pues constituye un sistema físico con muchas moléculas sujeto a fluctuaciones energéticas. Consecuentemente, la cinética de transición asociada al α -ésimo dominio es:

$$k_{\alpha} = A \cdot \exp\left(-\frac{E_{A_{\alpha}}}{k_B \cdot T}\right) \quad \text{con } \alpha = 1, 2, 3 \quad (2.17)$$

La expresión 2.17 es una aproximación de los efectos de temperatura en las actividades del FSII, ya que se usa normalmente para reacciones químicas con reactivos que se mueven libremente, pero los donantes y aceptores de electrones en el FSII pueden no moverse con total libertad [41].

Capítulo 3

Metodología

Para modelizar la emisión de fluorescencia inducida de clorofila a se consideró esencialmente el modelo estocástico descrito en la sección 2.2 y la expresión 2.7. Se implementó un programa basado en el algoritmo genético simple para encontrar los parámetros que permiten un ajuste óptimo entre las curvas de fluorescencia teóricas y las curvas experimentales a 25°C. Estos parámetros fueron utilizados para simular las curvas a diferentes temperaturas.

3.1. Curvas experimentales F^{exp}

3.1.1. Preparación de muestras

Se trabajó con hojas frescas de espinaca que fueron lavadas y posteriormente hidratadas durante 30 minutos con el fin de tener muestras con un contenido similar de agua. Luego, se secaron con ayuda de una cabina de flujo laminar, de esta forma se redujo la posibilidad de que se contaminen. La preparación de las muestras culminó con la adaptación a la oscuridad por 10 minutos.



Figura 3.1: Preparación de muestras: 1) Hidratación de las hojas. 2) Secado en la cabina de flujo laminar. 3) Adaptación de las hojas a la oscuridad.

3.1.2. Medidor de Fluorescencia

Las curvas de fluorescencia se obtuvieron usando un analizador de fluorescencia "Multiple Excitation Wavelength Chlorophyll Fluorescence" (MC-PAM, Heinz Waltz GmbH, Effeltrich, Germany). Se usó el software PAMWIN, en un computador portátil Acer i5. En este tipo de estudios interesan los cambios relativos en la fluorescencia por lo que el equipo no presenta las mediciones en unidades específicas; razón por la cual para el tratamiento de datos se consideró «unidades arbitrarias» (u.a). El medidor de fluorescencia registra los datos de interés hasta que la señal se sature, obteniendo un valor constante cuando esto sucede; entonces el límite superior del tiempo en el cual se registra la curva de fluorescencia varía y depende de la hoja utilizada.

Para inducir fluorescencia en hojas *in vivo* se utilizó la configuración del equipo empleada en el trabajo anterior [22]. Se trabajó con luz visible de 400 nm, un pulso de luz de 440 nm y con una intensidad de $4626 \mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, estudiando la banda azul de absorción de haces de fluorescencia (440 nm). Para evitar detecciones de longitudes de onda mayores a 650 nm se colocó un filtro.

3.1.3. Experimentos

A continuación, se muestra el esquema experimental de las mediciones de fluorescencia realizadas para diferentes condiciones. La línea entrecortada representa las condiciones de control de temperatura y oscuridad para los esquema 1 y 2 que se explicaran mas adelante.

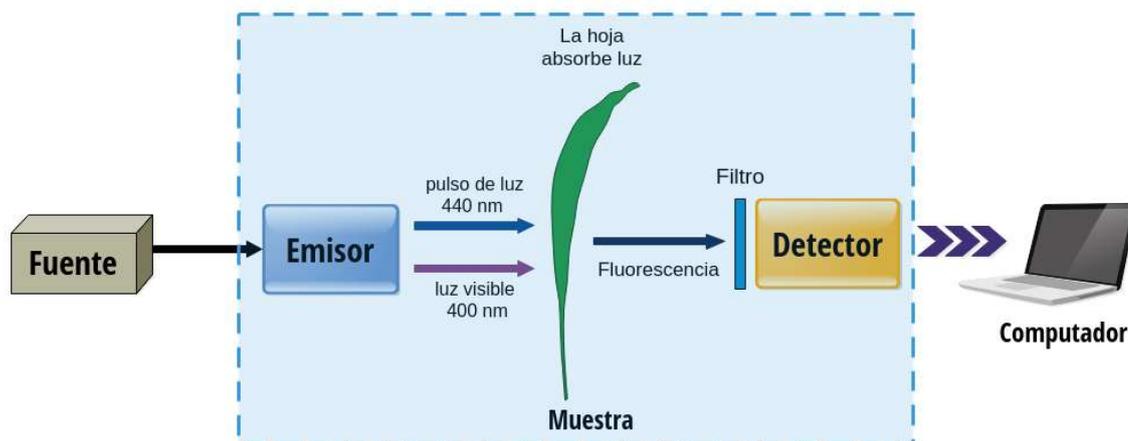


Figura 3.2: Esquema experimental de las mediciones de fluorescencia.

3.1.3.1. Esquema experimental 1

Una vez preparadas las muestras, se configuró correctamente el equipo de medición y se esperó que la temperatura del laboratorio llegue a 25°C.

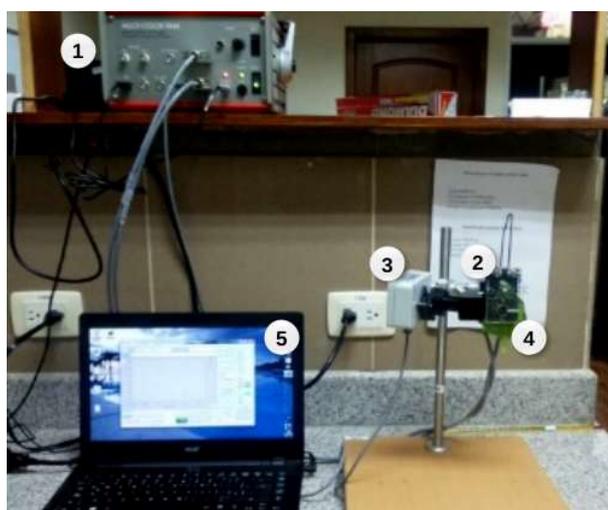


Figura 3.3: Montaje experimental del esquema 1: 1) Unidad de Control del MC-PAM, 2) Emisor, 3) Detector, 4) Hoja de espinaca, 5) Computador portátil.

Se tomaron 4 mediciones correspondientes a diferentes hojas de espinaca y terminada cada medición se adaptaba las hojas nuevamente a la oscuridad durante 10 minutos. Se eliminó el background de luminosidad causado por la luz de la habitación obteniendo una curva Kautsky desplazada al origen y se calculó una curva experimental promedio. El montaje del experimento se muestra en la figura 3.3.

3.1.3.2. Esquema experimental 2

Frente al deficiente control de temperatura y oscuridad que se tuvo en el esquema anterior, se controló estos aspectos con ayuda de una incubadora Memmert refrigerada con tecnología Peltier IPP55plus; la cual nos garantizaba tener una distribución óptima y homogénea de temperatura.

Una vez preparadas las muestras, se configuró correctamente el equipo de medición de fluorescencia y se colocó el detector en el interior de la incubadora, el emisor y la hoja de espinaca. Posteriormente, para un menor deterioro de la hoja se colocó también una caja Petri con agua para la hidratación continua de la muestra durante las mediciones. Luego, se ajustó la temperatura de la incubadora a 25°C y se efectuaron 4 medidas de fluorescencia cada 10 minutos.

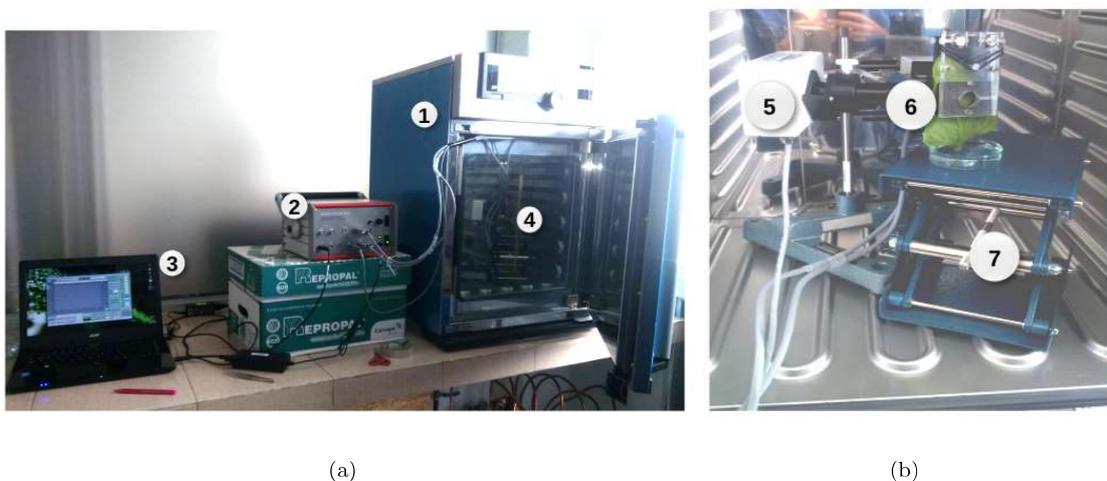


Figura 3.4: Montaje experimental del esquema 2: (a) 1) Incubadora, 2) Unidad de Control de MC-PAM, 3) Computador, 4) Termómetro. (b) Interior de la incubadora: 5) Detector, 6) Hoja de espinaca, 7) Soporte móvil.

Las curvas obtenidas correspondían a la misma sección y hoja de espinaca. El montaje del experimento se muestra en la Figura 3.4.

3.2. Ajuste de las curvas experimentales

3.2.1. Curvas teóricas $F(t)$

Dado un conjunto específico de parámetros del modelo estocástico, la ecuación 2.7 permite obtener una curva teórica una vez que se hayan calculado las concentraciones de los centros de reacción cerrados $q_\alpha(t)$ mediante la expresión 2.15 y con ayuda del algoritmo de Gillespie.

El procedimiento empleado para la generación de la curva teórica $F(t)$ se muestra en la figura 3.5.

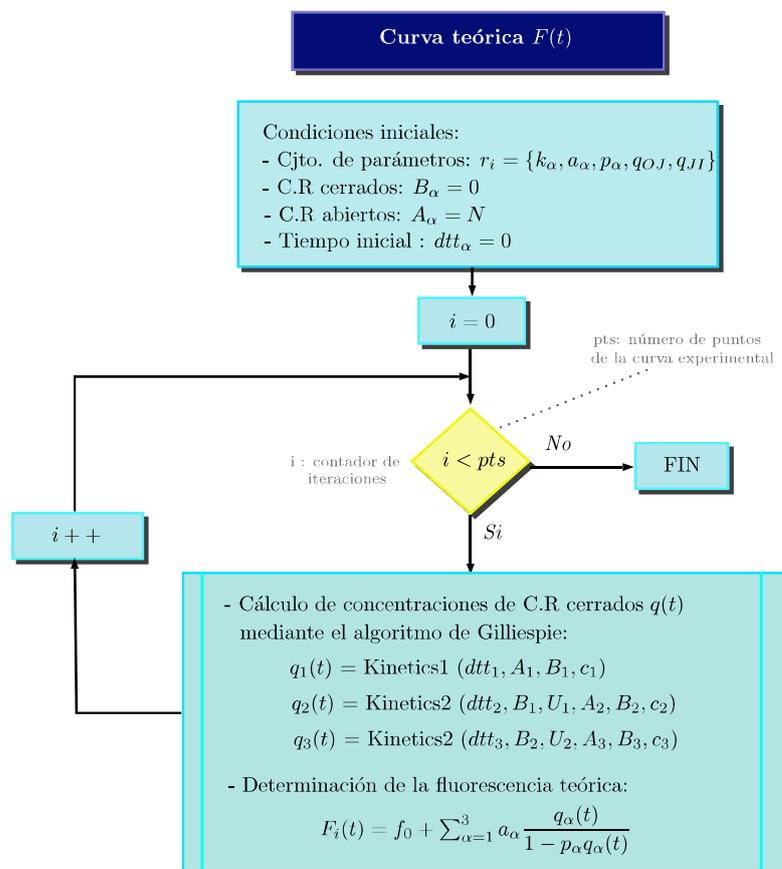


Figura 3.5: Esquema para generar $F_i(t)$ usando el Modelo Estocástico.

Los valores de fluorescencia de la curva teórica se generaron para los mismos tiempos considerados en las curvas experimentales ($dt = 0.01$).

3.2.2. Algoritmo Genético

Dado que la curva teórica $F(t)$ es una función multivariante no analítica, se determinó el conjunto de parámetros que permiten un ajuste óptimo de las curvas experimentales utilizando el algoritmo genético simple (AG) [33].

El algoritmo genético simple es un método basado en los principios de evolución enunciados por Charles Darwin y se emplea para resolver problemas de búsqueda y optimización de un sistema complejo dado; su objetivo es encontrar los extremos de una función multivariante [33, 34]. No tiene limitaciones con respecto a la continuidad, existencia de derivadas y número de extremos de la función [34]. A continuación se muestra un esquema de un AG simple:

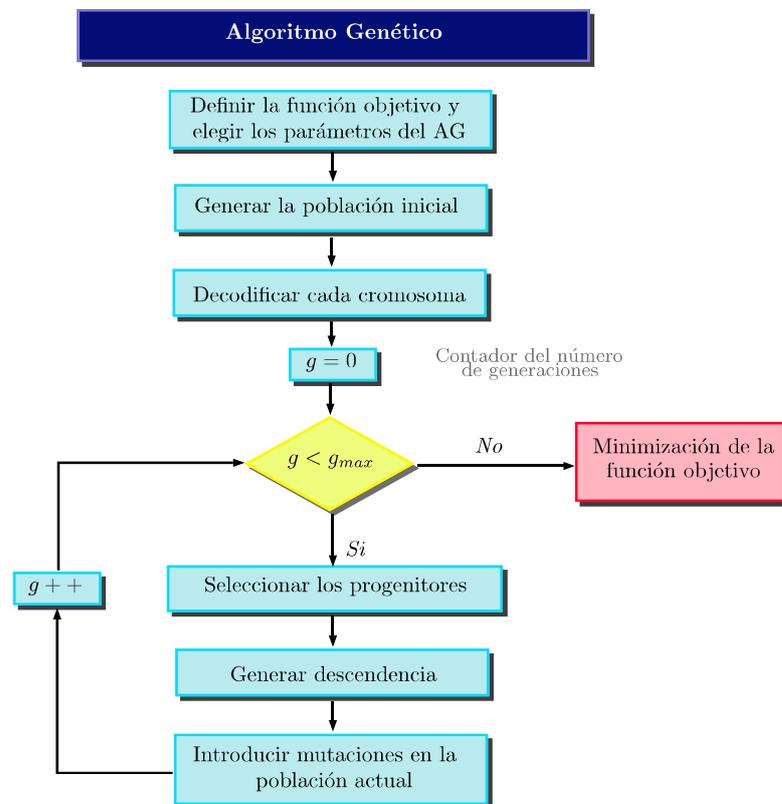


Figura 3.6: Estructura del algoritmo genético simple aplicado en este trabajo.

El código de búsqueda de parámetros se desarrolló en el lenguaje de programación C++ (Anexo A). El esquema general para minimizar \mathfrak{F}_{Obj} se muestra en la figura 3.6, cuyos procedimientos se detallan más adelante.

Dada la naturaleza estocástica del problema estudiado, se consideró un generador de números pseudo-aleatorios que permita obtener valores distribuidos uniformemente y que a su vez, posea un ciclo de repetición largo; por ello se usó un generador *Mersenne Twister* cuyo ciclo es $2^{19937} - 1$ [36]. Las variables globales empleadas en este código fueron el número total de centros de reacción $N = 5 \times 10^8$, el paso de tiempo de simulación (igual al paso del tiempo experimental) $dte = 0.01$.

3.2.2.1. Función objetivo (\mathfrak{F}_{Obj})

La expresión matemática que se desea optimizar se denomina función objetivo (\mathfrak{F}_{Obj}). Dependiendo de su valor, se determina si una solución es un potencial candidato para ser o no extremo de la función [23, 35]. En el algoritmo genético simple, a cada conjunto de parámetros $\{r_i\}$ se conoce como *cromosoma* y cada uno de los parámetros se denomina *gen* [23]. Con cada cromosoma $\{r_i\}$ se obtiene un valor para la función objetivo:

$$\mathfrak{F}_{Obj} = f(\text{cromosoma}) = f(\{r_i\}) \quad (3.1)$$

Partiendo del hecho de que se tiene una curva experimental de fluorescencia inducida F^{exp} y de que a su vez, se puede obtener una curva teórica $F(t)$, se definió en el presente trabajo la función objetivo \mathfrak{F}_{Obj} como la desviación cuadrática media de estos valores:

$$\mathfrak{F}_{Obj} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p} |F_i - F_i^{\text{exp}}|^2}{n_p}}. \quad (3.2)$$

Siendo n_p el número de puntos experimentales. El mejor ajuste posible entre la curva teórica y experimental se encontró mediante el conjunto de parámetros que permitieron que \mathfrak{F}_{Obj} sea mínima (idealmente cero).

3.2.2.2. Operadores Básicos del AG

Generación de la población inicial

La población inicial está constituida por un conjunto de cromosomas generados de forma aleatoria y clasificados según su función objetivo. El tamaño de la población (n_g) es determinante para optimizar la convergencia de la simulación. Si la población es demasiado pequeña, se necesitará más tiempo para muestrear todo el espacio de configuraciones posibles; pero si la población es demasiado grande, toma más tiempo crear una nueva generación cada vez [33].

La población inicial se construyó a partir de un conjunto inicial de parámetros específicos y siguiendo lo indicado en la figura 3.7 (izquierda). Se colocó un valor umbral para tener únicamente una población con individuos cuya función objetivo sea menor a 2 ($\mathfrak{F}_{Obj_{umbral}} < 2$).

Codificación y decodificación

El mecanismo de codificación más usado es la codificación binaria [34, 35]. Para ejemplificarlo, suponemos que existe una población inicial de n individuos dada por (r_1, r_2, \dots, r_n) siendo $r_i \in [0, 1]$. Consiste en representar r_i mediante una cadena binaria y_{ij} de m bits para $j = 1, 2, \dots, m$, que se establecen como verdadero (1) o falso (0) [33]. Está definido mediante la siguiente expresión:

$$y_{ij} = \text{int} \left[2^{j-1} r_i - \sum_{k=1}^{j-1} (2^{j-k-1} y_{ik}) \right] \quad (3.3)$$

Donde $i = 1, 2, \dots, n$ y la operación *int* permite redondear el valor dentro de los corchetes al entero decimal más cercano, sea éste 1 o 0.

El proceso inverso a la codificación es la decodificación y se realiza empleando la ecuación 3.4. Siendo y_{ij} elementos que toman valores únicamente de 0 o 1.

$$r_i = \frac{y_{i1}}{2} + \frac{y_{i2}}{4} + \frac{y_{i3}}{8} + \dots = \sum_{j=1}^{\infty} \frac{y_{ij}}{2^j} \approx \sum_{j=1}^m \frac{y_{ij}}{2^j} \quad (3.4)$$

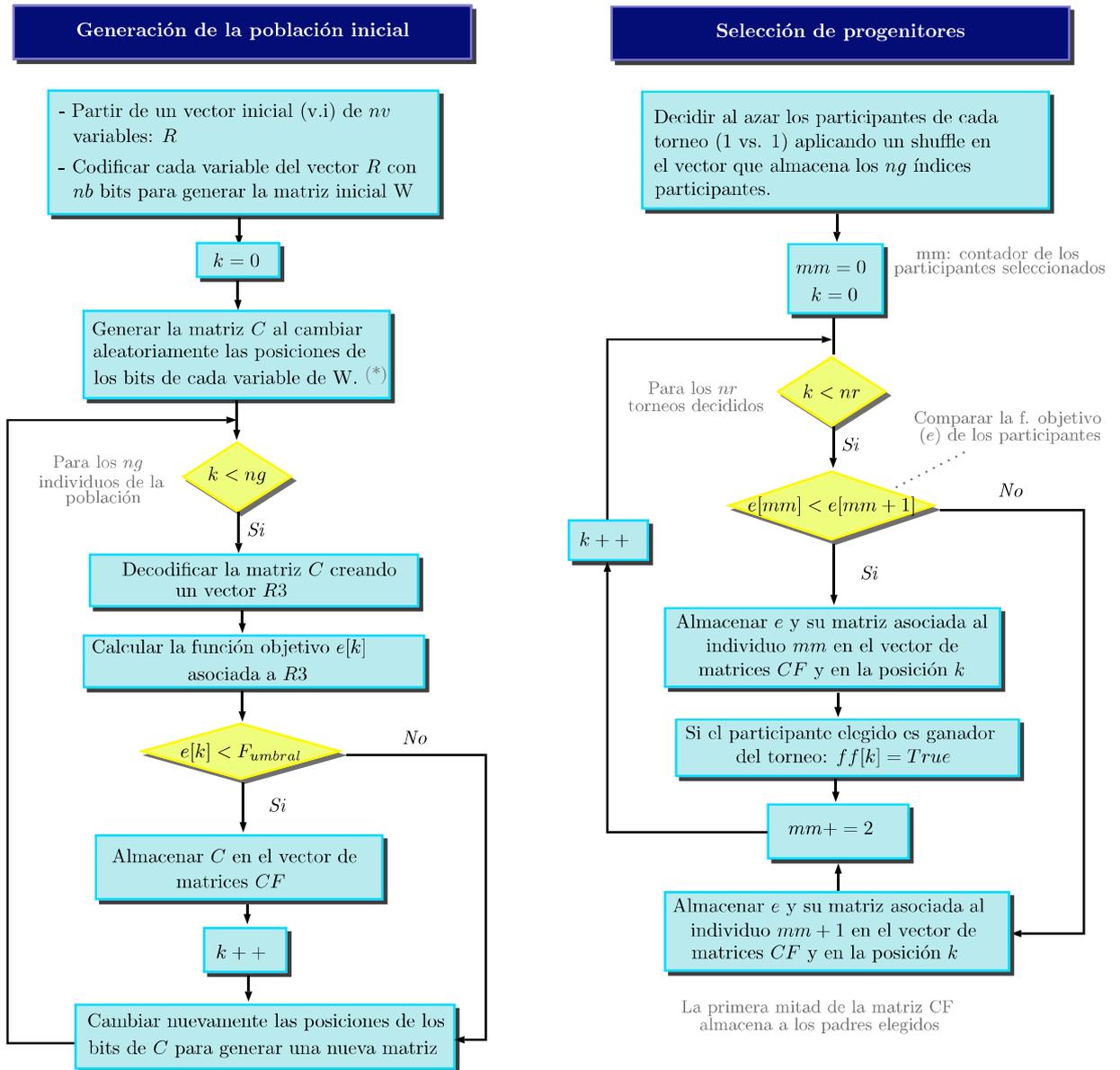


Figura 3.7: Esquema utilizado para generar la población inicial (izquierda) y seleccionar a los progenitores (derecha)

La cadena binaria se puede truncar en un número específico m del que dependerá la precisión para codificar r_i [33].

La codificación y decodificación se realizó siguiendo lo indicado en la figura 3.8. Algunos de los parámetros del vector inicial r_i eran mayores que 1 por lo que fue necesario realizar un escalamiento para obtener un número entre 0 y 1.

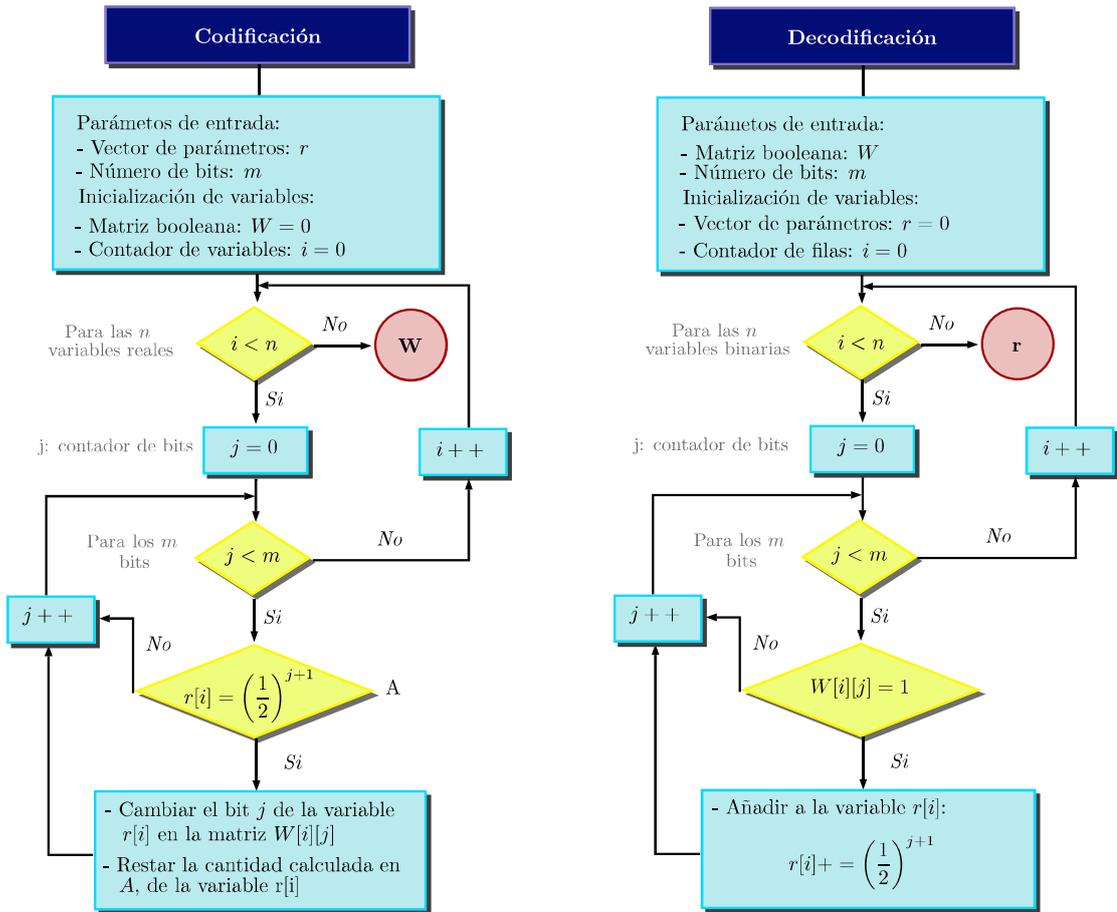


Figura 3.8: Esquema para codificar y decodificar de forma binaria.

Selección

Consiste en escoger a los individuos con mejor función objetivo, los cuales actuarán como progenitores de la siguiente generación [33, 34]. El método utilizado para la selección fue por torneo, el cual consiste en elegir al azar mediante un operador shuffle (Anexo B) un par de cromosomas de la población, el ganador es el participante con la menor función objetivo (ver figura 3.7 (derecha)). El torneo se realizó con $\frac{n_g}{2}$ padres disponibles que dieron lugar a $\frac{n_g}{2}$ hijos (dos hijos por pareja). Este operador se aplica en cada generación del AG.

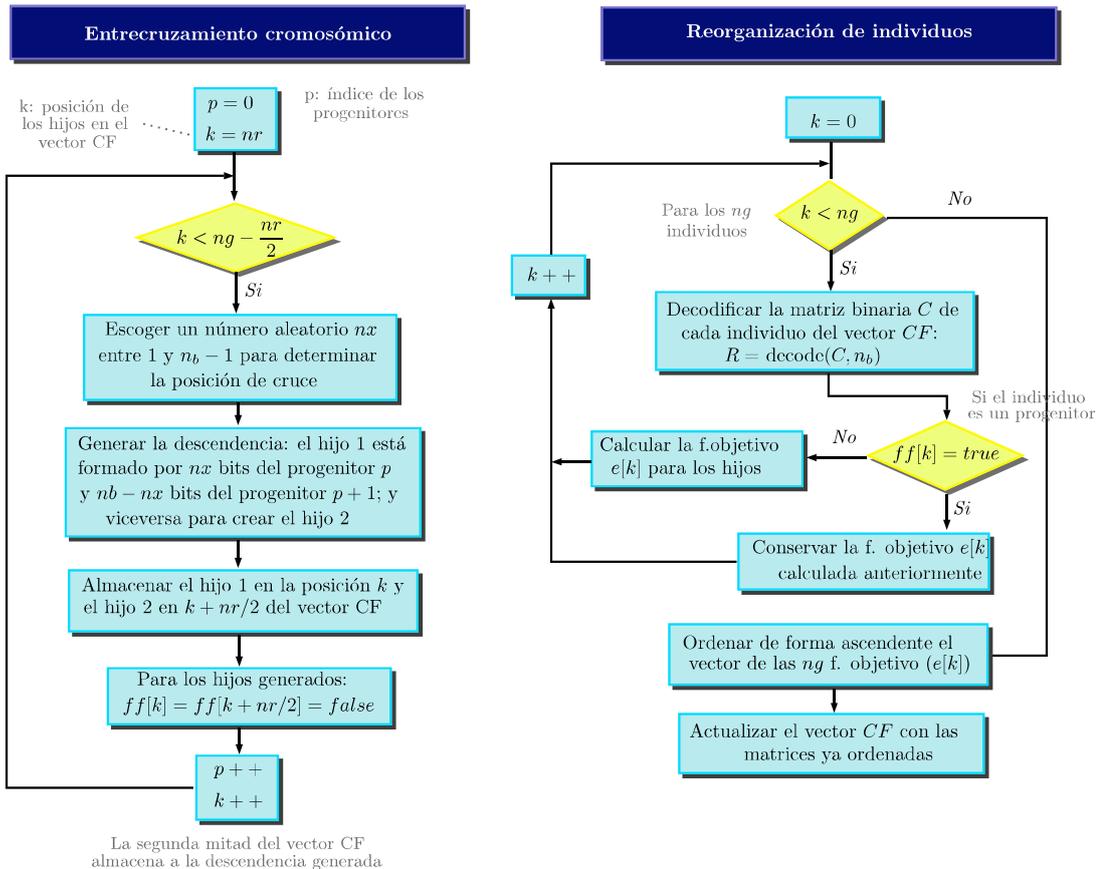


Figura 3.9: Esquema utilizado para generar la descendencia (izquierda) y reorganizar los individuos de la población actual (derecha).

Entrecruzamiento cromosómico

Este operador imita los procesos de reproducción y explora la superficie de costos de las configuraciones posibles. Uno de los métodos más utilizados consiste en cruzar a partir de un punto fijo elegido de forma aleatoria entre el primero y el último bit de cada cromosoma progenitor [33].

Se corta cada uno de los cromosomas padres en el punto determinado y se une el segmento izquierdo de un padre con el derecho del otro y viceversa, obteniendo así nuevos cromosomas [23, 33].

Luego de completar la reproducción, todos los cromosomas se reorganizan en orden creciente de acuerdo a su función objetivo. Este procedimiento se desarrolló siguiendo lo descrito por la figura 3.10.

Mutación

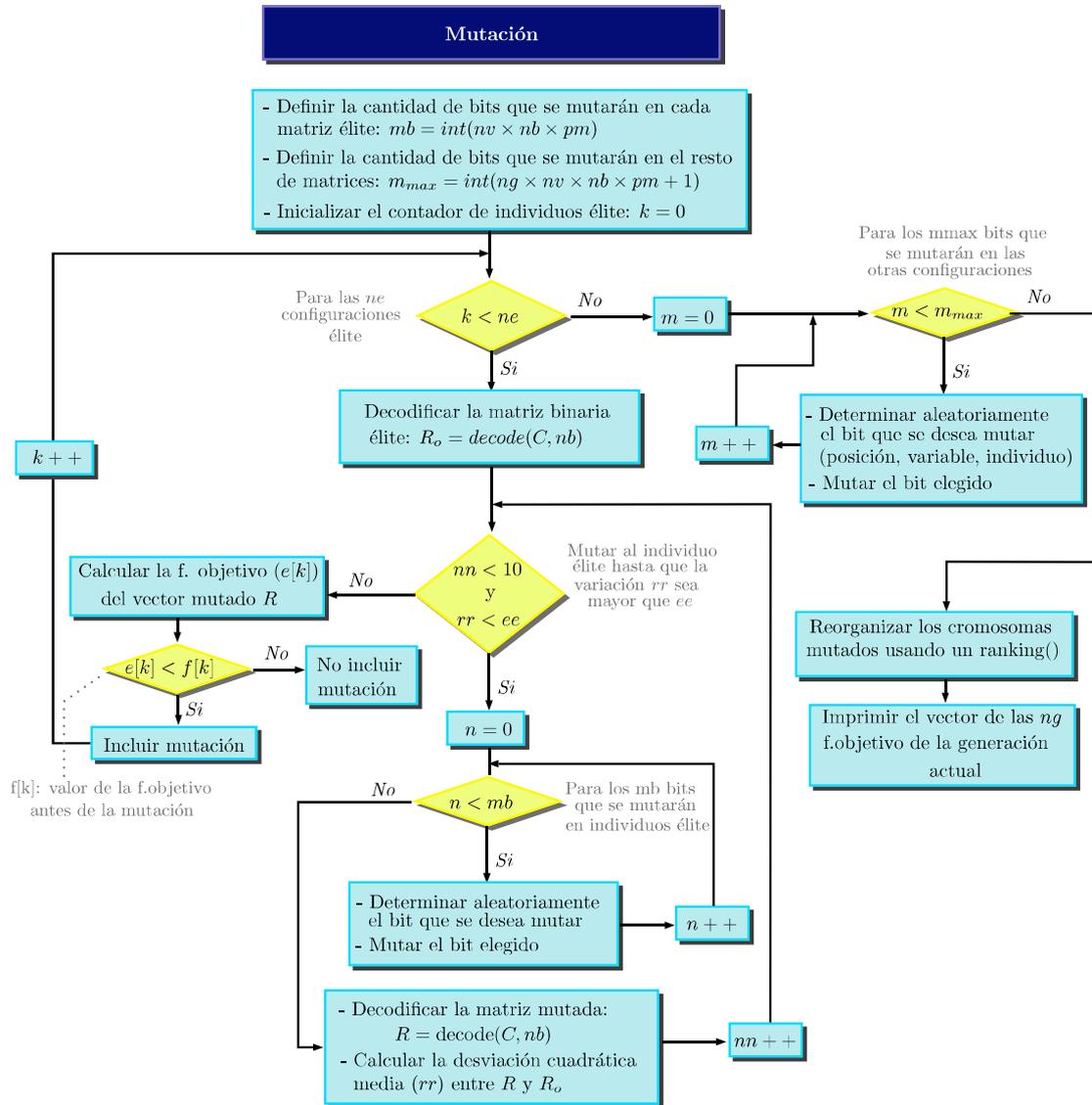


Figura 3.10: Esquema utilizado para mutar los individuos de la población.

Es otra forma efectiva de explorar la superficie de la función objetivo al invertir aleatoriamente los bits en los cromosomas seleccionados al azar. Se recomienda mutar el 1% de los bits [23, 33]. El mejor cromosoma nunca se muta pero en caso de hacerlo, se incluye en la población solo si se mejora el valor de \mathfrak{F}_{obj} .

En la práctica, es necesario experimentar para encontrar el porcentaje de mutación adecuado que permita explorar la superficie de configuraciones lo suficientemente rápido sin perder la mejor configuración [33].

Luego, se reorganizan los cromosomas de acuerdo a su \mathfrak{F}_{obj} . Finalmente, se debe repetir los pasos de selección, cruce y mutación el número de generaciones que considere necesarias, para así encontrar el cromosoma con el menor valor de \mathfrak{F}_{obj} .

3.2.2.3. Criterios de selección de parámetros del AG

El número de bits (n_b) usados para la codificación de los cromosomas depende de la precisión con la que se desee trabajar. Basados en los resultados reportados por Villagómez [22], se tiene que los parámetros poseen una alta sensibilidad en su sexta cifra decimal. Variaciones de este orden necesitan al menos $n_b = 24$ (2×10^{-6} se codifica con 24 bits). Se tendría mayor precisión con mayor cantidad de bits pero una cantidad exagerada podría significar un gasto computacional innecesario. En este caso se trabajó con $n_b = 32$.

El número de variables (n_v) consideradas corresponde al número de parámetros empleados en el modelo estocástico; es decir, $n_v = 11$.

Se trabajó con diferentes tamaños de población inicial ($n_g = 8, 16, 24, 32, 64$), porcentajes de mutación ($pm = 1\%, 2\%, 3\%, 4\%$) y número de generaciones ($g_{max} = 100, 200, 300$) con el fin de determinar las condiciones adecuadas que permiten alcanzar el mejor ajuste en el menor tiempo posible.

3.3. Simulación del efecto de la temperatura

Suponemos que las constantes cinéticas k_a , obedecen la teoría del estado de transición descrita en la sección 2.3, lo que nos permitirá predecir el comportamiento de la fluorescencia a diferentes temperaturas. El código de simulación se implementó en C++ (Anexo A.2) y se describe a continuación:

1. Partir del conjunto de parámetros obtenido al minimizar \mathfrak{F}_{Obj} y que está asociado a una temperatura T_1 (en el caso del trabajo de Villagómez $T_1 = 20^\circ C$ y para los esquemas 1 y 2 $T_1 = 25^\circ C$).

2. Considerar que solo las constantes cinéticas dependen de la temperatura por lo que para T_2 se usarán los parámetros a_α y p_α encontrados a T_1 .
3. Determinar el factor de frecuencia de colisiones A para cada región α :

$$A = \frac{k_{0,\alpha}}{\exp\left(\frac{-E_{A_\alpha}}{k_B \cdot T_1}\right)} \quad (3.5)$$

Siendo $k_{0,\alpha}$ la constante cinética a T_1 y E_{A_α} la energía de activación.

4. Hallar la constante cinética a diferente temperatura (T_2) usando la ec. 2.16:

$$k_{1,\alpha} = A \cdot \exp\left(\frac{-E_{A_\alpha}}{k_B \cdot T_2}\right) \quad (3.6)$$

5. Simular la curva $F(t)$ asociada a $k_{1,\alpha}$ siguiendo lo descrito en la sección 3.2.1.

Se tomó como referencia las energías de activación reportadas por Boisvert [40], cuyos valores fueron: $E_{A1} = 0.10$ eV, $E_{A2} = 0.14$ eV, $E_{A3} = 0.27$ eV. Suponemos que las energías están en ese orden de magnitud y que las relaciones entre ellas son las mismas que las establecidas por Boisvert [40], es decir $E_{A2} = 1.4E_{A1}$, $E_{A3} = 2.7E_{A1}$.

Para determinar la sensibilidad de las simulaciones con respecto a la energía de activación se utilizó $E_{A1} = 0.05$ eV, 0.10 eV, 0.15 eV.

3.4. Validación de las simulaciones

El correcto funcionamiento del algoritmo de ajuste y la aplicación de la ecuación de Arrhenius se validó mediante el ajuste de las curvas medidas en el experimento 2 del trabajo de Villagómez [22] a 20°C , 30°C y 40°C . Se eligieron estas curvas porque fueron las más consistentes reportadas. Se emplearon tres estrategias de ajuste: la primera consistía en hacer un ajuste global buscando todos los parámetros del modelo ($k_\alpha, a_\alpha, p_\alpha$), la segunda era un ajuste parcial en donde k_α se determinaba mediante la ecuación de Arrhenius y solo se buscaba los parámetros a_α y p_α ; y la

tercera estrategia usaba los parámetros a_α y p_α encontrados en el ajuste global de la curva a 20°C y solo se buscaba los valores de k_α .

Las curvas simuladas a 30°C y 40°C se realizaron según lo descrito en la sección 3.3; las mismas que luego se compararon con las curvas experimentales del trabajo anterior para verificar la consistencia de nuestra simulación con el experimento.

Adicionalmente, la variación de fluorescencia causada por efecto de la temperatura se caracterizó mediante la desviación cuadrática media (σ) de las curvas simuladas con respecto a la curva de referencia (curva experimental medida a 25°C); con el fin de obtener información que permita definir los requerimientos mínimos para la preparación de los experimentos a diferentes temperaturas. Se definió σ como:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p} |F_i - F_{i,\text{ref}}|^2}{n_p}}. \quad (3.7)$$

Donde, F_i es la curva medida a la temperatura T_i , $F_{i,\text{ref}}$ la curva medida a la temperatura de referencia T_{ref} , n_p el número de puntos experimentales.

Tanto para el experimento 1 y 2, se analizó el comportamiento de σ en función de la temperatura en intervalos de 5°C a 0.1 ms, 1 ms, 10 ms y 100 ms. Para garantizar que las curvas simuladas no se confundan con el error experimental, se consideró válidas solo aquellas que lograron superar el error experimental (umbral de referencia μ_σ) a 0.1 ms, 1 ms, 10 ms y 100 ms.

Capítulo 4

Validación del código para el ajuste de curvas de fluorescencia

Para evaluar el correcto funcionamiento del algoritmo de ajuste descrito en la sección 3.2, se lo aplicó a una curva de fluorescencia inducida obtenida y analizada en el trabajo de Villagómez [22]. Se emplearon tres métodos para determinar las mejores condiciones que permitían minimizar \mathfrak{F}_{Obj} al variar el número de individuos de la población, porcentaje de mutación y número de generaciones. Una vez definidas las condiciones adecuadas de simulación se pudo observar una mejoría en el ajuste de la curva de fluorescencia inducida con respecto al resultado de Villagómez [22].

4.1. Experimento de referencia

Los resultados obtenidos en el trabajo de Villagómez [22] se tomaron como referencia, los mismos que estaban asociados al ajuste de la curva de fluorescencia de una hoja de espinaca medida a 20°C en el experimento 1 de su trabajo y cuyos parámetros reportados fueron:

Región	Parámetros	Valor	Parámetros	Valor	Parámetros	Valor	
OJ	p_1	0.4677	k_1	$\frac{1}{ms}$	2.7493	a_1	0.9811
JI	p_2	0.5208	k_2	$\frac{1}{ms}$	0.1455	a_2	0.9205
IP	p_3	0.6985	k_3	$\frac{1}{ms}$	0.00936	a_3	0.6929
	$T_1 [ms]$	0.94	$T_2 [ms]$		20.4		
	F_0	1.7					
	χ^2	34310.3					
	Error	0.0239131					

Tabla 4.1: Parámetros reportados por Villagómez [22] para las curvas a 20°C del experimento 1.

4.2. Búsqueda de parámetros

4.2.1. Método 1

$F_i(t)$ se obtuvo partiendo de un conjunto de parámetros iniciales escogido aleatoriamente, usando 32 bits, la ecuación 2.7 y siguiendo lo descrito en la sección 3.2.1 y 3.2. Al variar la tasa de mutación (pm) para una población $ng = 8$ y 100 generaciones, el menor valor de \mathfrak{F}_{Obj} se obtiene con el 1% de mutación como se observa en la figura 4.1(a).

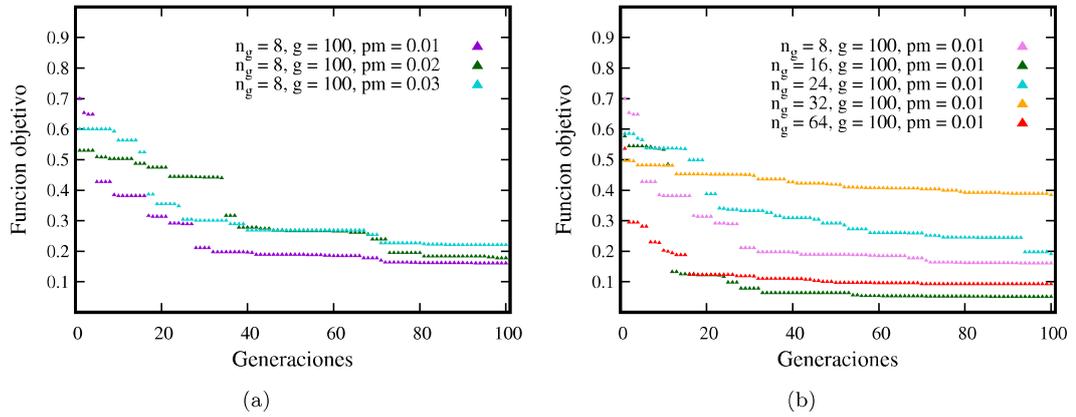


Figura 4.1: Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} para (a) $pm = 1\%, 2\%, 3\%$. y (b) $ng = 8, 16, 24, 32, 64$.

La figura 4.1(b) muestra que en el caso de cambiar el número de individuos de la población aplicando el 1% de mutación y para 100 generaciones el valor más pequeño de \mathfrak{F}_{Obj} se generaba para una población de 16 individuos.

Al variar el número de generaciones para una población de 8 individuos con el 1% de mutación, se determinó que el menor valor de \mathfrak{F}_{Obj} se daba para la población con el mayor número de generaciones ($g_{\max} = 300$):

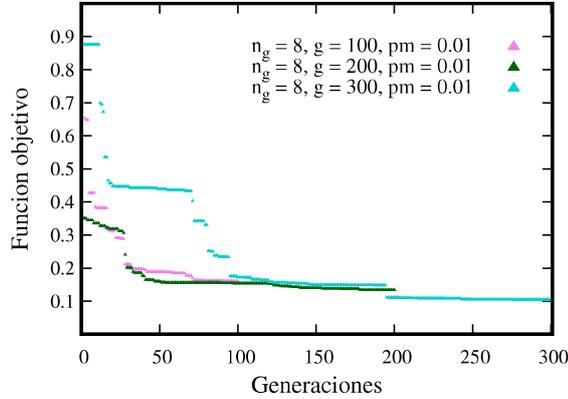


Figura 4.2: Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} para $g_{\max} = 100, 200, 300$.

En resumen, al partir de un vector inicial de parámetros aleatorio, el mejor resultado se obtuvo con 16 individuos, el 1% de mutación y 300 generaciones; sin embargo, difícilmente se pudo superar a los resultados reportados en la tabla 4.1.

4.2.2. Método 2

Para cada región de la curva Kautsky se usó un conjunto aleatorio de parámetros iniciales que permitieron un ajuste preliminar, una población de 8 individuos, el 5% de mutación, 32 bits y 100 generaciones. Adicionalmente, la fluorescencia inicial considerada corresponde a F_0 para la región OJ y para el caso de las regiones JI e IP, es el valor de saturación de OJ y JI respectivamente, el mismo que se estableció por observación de la curva experimental.

Mediante el algoritmo de minimización de \mathfrak{F}_{Obj} se encontró un nuevo conjunto de parámetros que dieron lugar a un mejor ajuste en cada región como se muestra en la figura 4.3. Dichos parámetros difieren con los encontrados en el trabajo de Villagómez especialmente los de la región JI e IP. El cambio más significativo se dio en los valores de los pesos estadísticos a_1 y a_2 que en nuestra simulación son mayores que 1.

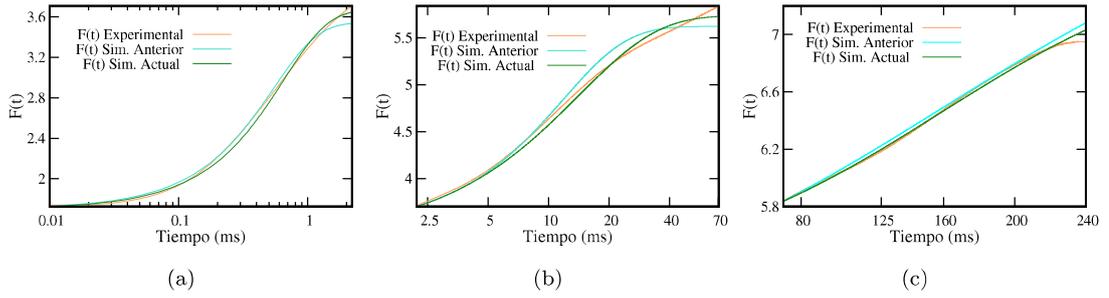


Figura 4.3: Curva de fluorescencia experimental, teórica según el estudio previo y actual de la región (a) OJ, (b) JI y (c) IP a 20°C.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$		a_α		p_α		$F_{0,\alpha}$	<i>Error</i>	
	Anterior	Actual	Anterior	Actual	Anterior	Actual		Ambos	Anterior
OJ	2.7493	2.2645	0.9811	1.0737	0.4678	0.4553	1.7	0.07231	0.03682
JI	0.1455	0.08373	0.9205	1.6524	0.5209	0.1879	3.7	0.1086	0.0530
IP	0.0094	0.0136	0.6929	0.3826	0.6985	0.7511	5.84	0.03478	0.01838

Tabla 4.2: Ajustes según el estudio anterior y actual de la región OJ, JI e IP.

Al aplicar este método, se puede tener una idea de cuales serán 9 de los 11 parámetros buscados y en menor tiempo ya que se examina una cantidad menor de puntos que en el primer método. Además, se asume que la mayoría de centros de reacción se activa ($q_{OJ} = q_{OJ} = 0.9$); de esta forma se obtuvo que \mathfrak{F}_{Obj} es 0.08804.

Partiendo de este vector inicial, cuyo valor de \mathfrak{F}_{Obj} es menor que el encontrado mediante el primer método, es más probable que se alcance el mínimo de \mathfrak{F}_{Obj} en un menor número de generaciones reduciendo así el tiempo de cálculo computacional.

4.2.3. Método 3

Se consideró como vector inicial al mejor individuo encontrado mediante el Método 2, es decir el individuo cuyo conjunto de parámetros genere el menor valor de \mathfrak{F}_{Obj} .

Se trabajó con 32 bits para todos los casos. Al simular para diferentes tamaños de población, usando el 1% de mutación y para 100 generaciones; se encontró que el valor más pequeño de \mathfrak{F}_{Obj} se generaba para una población de 24 individuos.

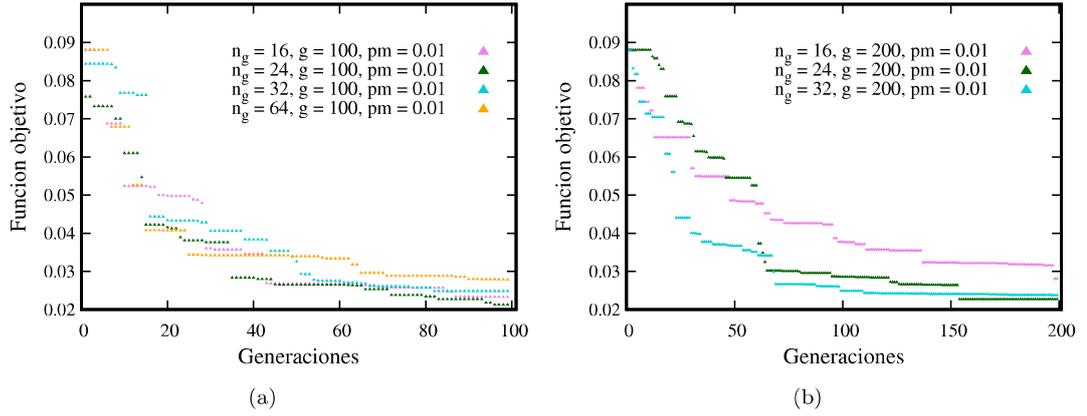


Figura 4.4: Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} para $ng = 16, 24, 32, 64$ (a) usando 100 generaciones y 200 generaciones.

Al aumentar el número de generaciones a 200 y variar el tamaño de las poblaciones, el mejor resultado se generó con 24 individuos cuya tasa de mutación era el 1%.

Se pudo observar que a pesar de haber aumentado el número de generaciones a 200 el mejor resultado se obtuvo con 100 generaciones, una población de 24 individuos y una tasa de mutación del 1% (Figura 4.4). El conjunto de parámetros encontrado bajo estas condiciones se detalla en la tabla 4.3.

Dada la sensibilidad de los parámetros, para disminuir aún más el valor de \mathfrak{F}_{Obj} se partió nuevamente del mejor individuo generado hasta el momento (Tabla 4.3).

Las condiciones adecuadas de simulación se determinaron usando porcentajes de mutación más pequeños ($pm = 0.5\%, 0.8\%$) y diferentes tamaños de población.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$
OJ	2.24570	1.0635	0.4379	1.70
JI	0.08439	1.6659	0.1875	3.70
IP	0.01230	0.3801	0.8099	5.84
	q_{OJ}	0.7750	q_{JI}	0.9371
	Error	0.02098		

Tabla 4.3: Primer conjunto de parámetros encontrados con el Método 3 para la curva medida por Villagomez.

El valor más pequeño de \mathfrak{F}_{Obj} se determinó con una población de 16 individuos y un porcentaje de mutación del 0.8% como muestran las figuras 4.5(a) y 4.5(b).

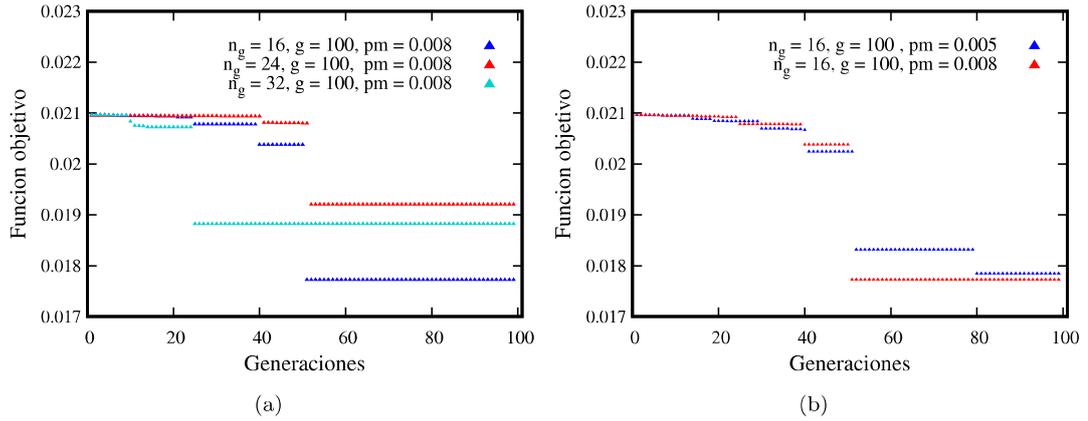


Figura 4.5: (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} para $ng = 16, 24, 32$ usando 100 generaciones y $pm = 0.8\%$ y para (b) $ng = 16$ usando 100 generaciones y $pm = 0.5\%, 0.8\%$.

Finalmente, se obtuvo el vector de parámetros detallado en la tabla 4.4 cuyo valor de \mathfrak{F}_{Obj} fue igual a 0.017727 y es menor que el encontrado mediante el estudio realizado por Villagómez (Tabla 4.1).

La figura 4.6 muestra que existe una ligera diferencia entre la curva experimental y la simulada durante el intervalo de $[0.2 - 8]$ ms.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$
OJ	2.2005	1.1029	0.4379	1.70
JI	0.08931	1.6749	0.13083	3.70
IP	0.01269	0.3751	0.8125	5.84
	q_{OJ}	0.93554	q_{JI}	0.91592
	Error	0.01772		

Tabla 4.4: Segundo conjunto de parámetros hallados con el Método 3 para la curva medida por Villagomez.

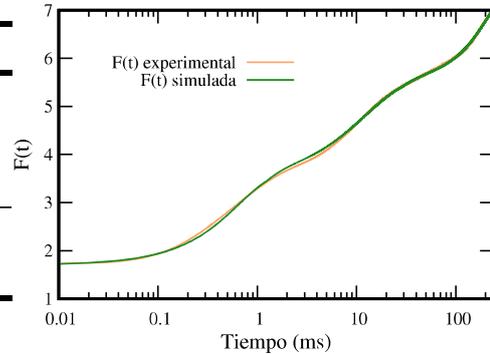


Figura 4.6: Curva de fluorescencia inducida teórica y experimental a 20°C .

Consecuentemente, se define la siguiente estrategia para hallar el mínimo de \mathfrak{F}_{Obj} :

1. Establecer los intervalos entre los cuales estarán las variables buscadas (constantes cinéticas entre 0 y 5, pesos estadísticos entre 0 y 2 y parámetros de conectividad entre 0 y 1).

2. Realizar el análisis por regiones y encontrar los parámetros con condiciones de ajuste previamente establecidas (método 2).
3. Efectuar el ajuste con el mejor conjunto de parámetros encontrados en el paso 2 y considerando una población de 16 individuos, 200 generaciones y una tasa de mutación del 1% (método 3).
4. Repetir el paso anterior con el mejor conjunto de parámetros encontrados en el paso 3 y una tasa de mutación del 0.8% (método 3).

Capítulo 5

Resultados

El ajuste de curvas descrito en la sección 3.2 fue aplicado tanto a las curvas de fluorescencia medidas por Villagómez como a las obtenidas en este trabajo. Se simuló el efecto de la temperatura y se lo caracterizó mediante la desviación cuadrática media como se describe en la sección 3.4. También se compararon las curvas resultantes del ajuste con las simuladas según la ecuación de Arrhenius.

5.1. Validación de las simulaciones a diferentes temperaturas

El algoritmo de ajuste fue aplicado a las curvas medidas en el experimento 2 del trabajo de Villagómez de acuerdo a lo descrito en la sección 3.2 y 3.3. La figura 5.1 muestra que estas curvas son muy parecidas en su forma sigmoideal; no obstante, al aumentar la temperatura su fluorescencia aumenta especialmente en la región II e IP (fase térmica). Los ajustes de las curvas a 30°C y 40°C se realizaron considerando las tres estrategias descritas en la sección 3.4. La curva a 20°C se ajustó únicamente con la estrategia 1.

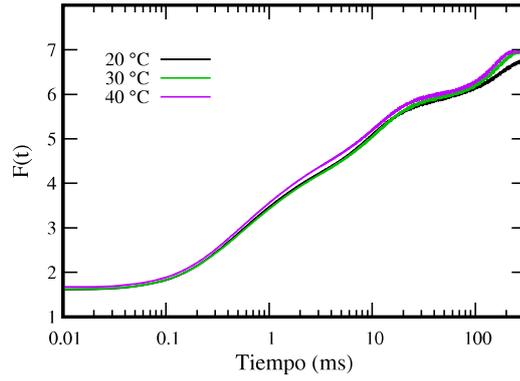


Figura 5.1: Curvas de fluorescencia inducida del experimento 2 de Villagómez a 20°C, 30°C y 40°C.

5.1.1. Parámetros derivados de las curvas de referencia

5.1.1.1. Curva a T=20°C

i) Estrategia de ajuste 1

a) *Ajuste por regiones:*

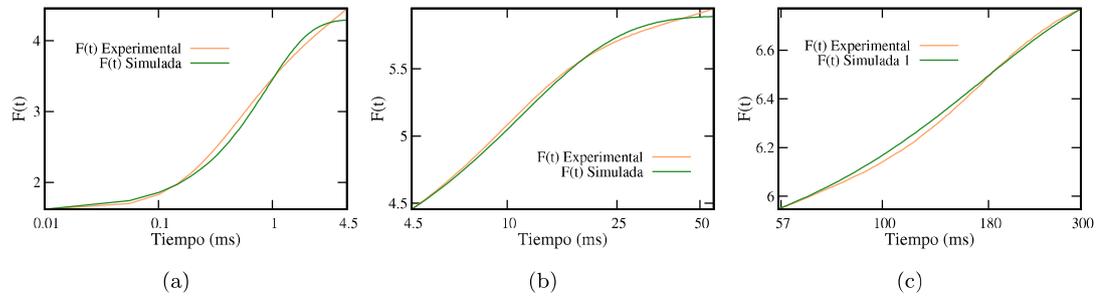


Figura 5.2: Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP a 20°C.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$	Error
OJ	1.4064	1.9290	0.2806	1.6180	0.0855
JI	0.1210	1.0666	0.2579	4.550	0.0273
IP	0.00976	0.5322	0.4528	5.9480	0.0171

Tabla 5.1: Ajuste preliminar de las curvas medidas a 20°C por Villagómez.

El valor de \mathfrak{F}_{Obj} asociado a los parámetros descritos en la tabla 5.1 fue 0.10395.

b) Ajuste global utilizando el Método 3:

\mathfrak{F}_{Obj} decreció rápidamente durante las primeras 20 generaciones y luego disminuyó lentamente hasta 0.01713 como se muestra en la figura 5.3(a). Al comparar la curva simulada y experimental se observó que el modelo no se ajusta completamente en la región OJ; es decir, en el intervalo de [0.2 – 3] ms (figura 5.3(b)).

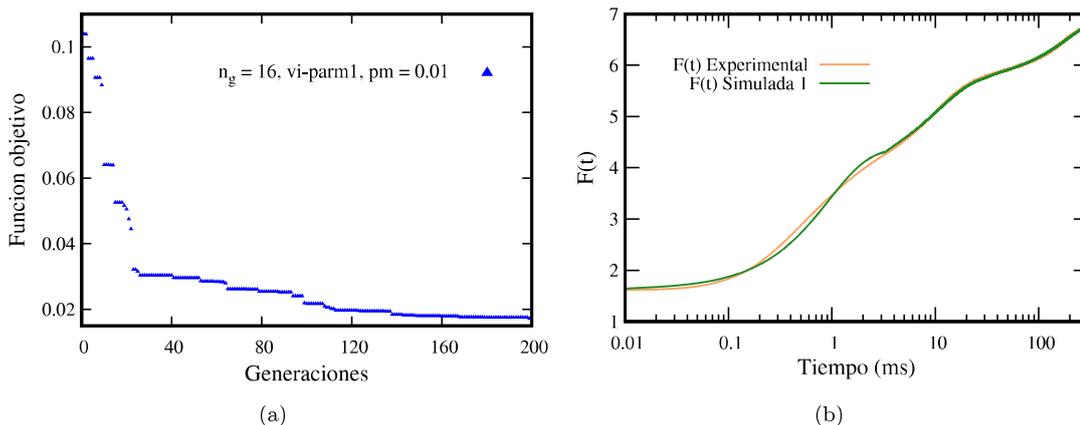


Figura 5.3: (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental de Villagómez a 20°C usando la estrategia de ajuste 1.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$
OJ	1.31682	1.98810	0.27467	1.618
JI	0.12499	1.07030	0.26510	4.550
IP	0.00817	0.61373	0.49604	5.948
	q_{OJ}	0.98698	q_{JI}	0.96474
	Error	0.0166		

Tabla 5.2: Ajuste de la curva medida por Villagómez a 20°C, usando la estrategia 1.

Los parámetros asociados al mejor ajuste se detallan en la tabla 5.2 y muestran que las constantes cinéticas decrecen conforme se avanza por las regiones de la curva Kautsky; el mayor valor está asociado a OJ; es decir, en esta región las transiciones de los centros de reacción del estado abierto al cerrado suceden más rápido. Lo contrario ocurre en IP.

Las concentraciones de centros de reacción activados, q_{OJ} y q_{JI} , son muy cercanas a 1 pero hay una mayor concentración en la transición OJ-JI. Los parámetros de conectividad son menores que la unidad y están dentro del intervalo [0.25 – 0.5];

el mayor valor está asociado a IP y al menor peso estadístico (a_3). Los pesos a_1 y a_2 son mayores que 1; sin embargo, no todos los términos tienen el mismo aporte en el resultado. La mayor contribución la tiene el término relacionado con OJ.

5.1.1.2. Curva a $T=30^\circ\text{C}$

i) Estrategia de ajuste 1

a) *Ajuste por regiones:*

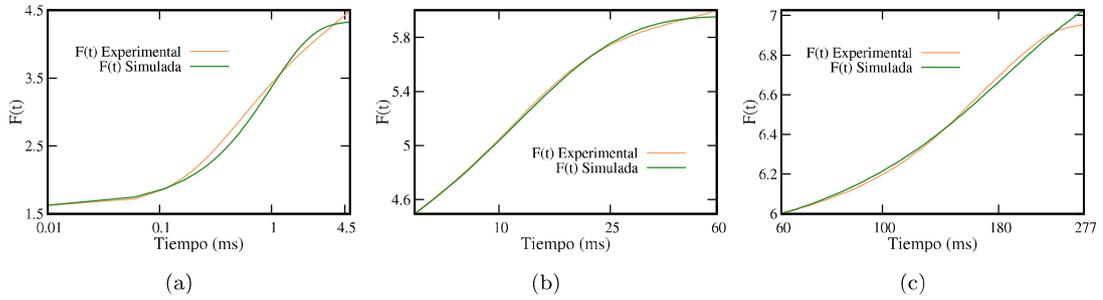


Figura 5.4: Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP a 30°C .

El valor de \mathfrak{F}_{Obj} asociado a los parámetros preliminares descritos en la tabla 5.3 fue 0.06678.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$	Error
OJ	1.2589	1.9843	0.2667	1.625	0.0941
JI	0.1069	1.2141	0.1702	4.495	0.0186
IP	0.0131	0.3753	0.6954	6.001	0.0243

Tabla 5.3: Ajuste preliminar de las curvas medidas a 30°C por Villagómez.

b) *Ajuste global utilizando el Método 3:*

\mathfrak{F}_{Obj} decreció rápidamente durante las primeras 80 generaciones y luego disminuyó lentamente hasta 0.02727 como se muestra en la figura 5.5(a). Al comparar la curva simulada y experimental se observó que el modelo no se ajusta completamente en la región OJ; es decir, en el intervalo de $[0.2 - 3]$ ms (figura 5.5(b))

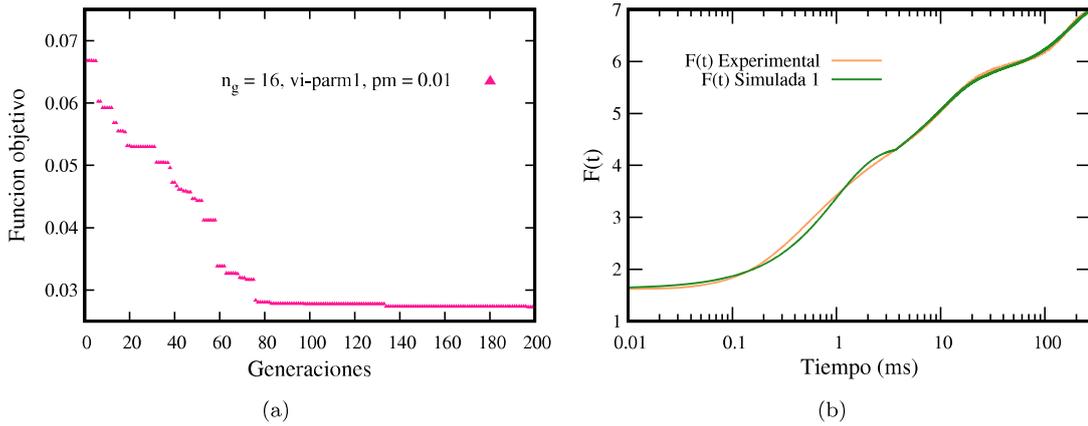


Figura 5.5: (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental de Villagómez a 30°C usando la estrategia de ajuste 1.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms}\right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$
OJ	1.25153	1.98430	0.26726	1.625
JI	0.12498	1.21087	0.18727	4.495
IP	0.01293	0.38020	0.71630	6.001
	q_{OJ}	0.99035	q_{JI}	0.94978
	Error	0.02694		

Tabla 5.4: Ajuste de la curva medida por Villagómez a 30°C , usando la estrategia 1.

Los parámetros asociados al mejor ajuste se detallan en la tabla 5.4 y muestran que las constantes cinéticas disminuyen conforme se avanza por las regiones de la curva Kautsky; sus valores son mayores a los encontrados para 20°C a excepción del relacionado con OJ, el cual disminuyó en $0.06\left[\frac{1}{ms}\right]$. Las concentraciones de centros de reacción activados, q_{OJ} y q_{JI} , son muy cercanas a 1 pero se evidencia una mayor concentración en la transición OJ-JI.

Los parámetros de conectividad son menores que la unidad y están dentro del intervalo $[0.18 - 0.72]$ el cual es mayor al intervalo encontrado para 20°C . El mayor parámetro de conectividad está asociado a IP y al menor peso estadístico (a_3). Los pesos a_1 y a_2 son mayores que 1 y el peso correspondiente a la región OJ es muy similar al encontrado para 20°C y tiene mayor aporte en el resultado final.

ii) Estrategia de ajuste 2

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms}\right]$	a_α	p_α
OJ	1.50051	1.86810	0.27658
JI	0.15006	1.20111	0.26496
IP	0.01161	0.62472	0.49926
q_{OJ}	0.99733	q_{JI}	0.99687
	Error	0.04118	

Tabla 5.5: Ajuste de la curva medida por Villagómez a 30°C usando la estrategia 2.

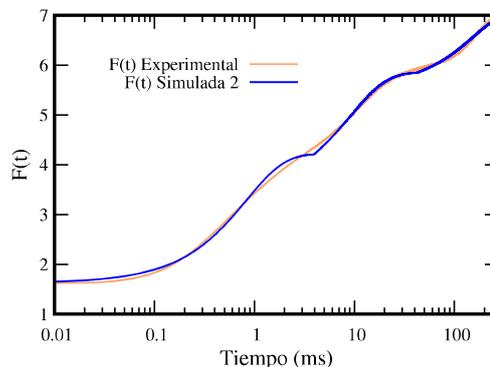


Figura 5.6: Curvas experimentales y simuladas a 30°C usando la estrategia de ajuste 2.

Los resultados del mejor ajuste se describen en la tabla 5.5 cuyo valor de la función objetivo fue 0.041181, el cual es 1.5 veces mayor que el obtenido mediante la estrategia 1. Los parámetros encontrados varían significativamente con respecto a los reportados en la tabla 5.4. El intervalo de los parámetros de conectividad se redujo a [0.27-0.5]. Las concentraciones de los centros de reacción activados q_{OJ} y q_{JI} son aproximadamente 1 mostrando que casi la totalidad de centros de reacción se activan tanto en la transición OJ-JI como en la JI-IP.

El aporte del término de IP (a_3) en el resultado final fue del doble con respecto al obtenido en la tabla 5.4. La figura 5.9 muestra que existe una diferencia entre la curva experimental y la simulada durante el intervalo de [0.7 – 4] ms.

iii) Estrategia de ajuste 3

Los resultados del mejor ajuste se describen en la tabla 5.6 cuyo valor de la función objetivo fue 0.059531. A pesar de que constantes cinéticas encontradas son similares a las reportadas en la tabla 5.4, el valor de la función objetivo incrementó en un factor de 2.2 con respecto al obtenido mediante la estrategia 1. La figura 5.7 muestra que existe una diferencia relativamente significativa entre la curva experimental y la simulada durante el intervalo de [0.1 – 8] ms.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms}\right]$	a_α	p_α
OJ	1.22002	1.98810	0.27467
JI	0.12512	1.07030	0.26510
IP	0.01148	0.61373	0.49604
q_{OJ}	0.98698	q_{JI}	0.96474
Error		0.059531	

Tabla 5.6: Ajuste de la curva medida por Villagómez a 30°C usando la estrategia 3.

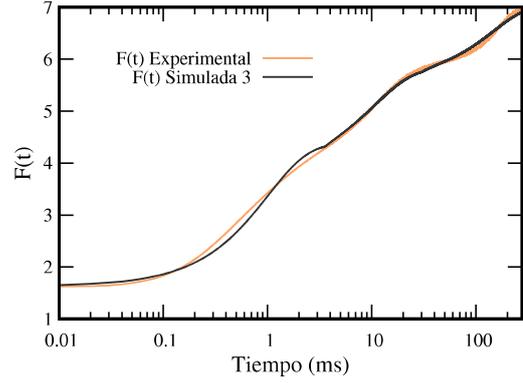


Figura 5.7: Curvas experimentales y simuladas a 30°C usando la estrategia de ajuste 3.

5.1.1.3. Curva a T=40°C

i) Estrategia de ajuste 1

a) *Ajuste por regiones:*

El valor de \mathfrak{F}_{Obj} asociado a los parámetros preliminares descritos en la tabla 5.7 fue 0.077084.

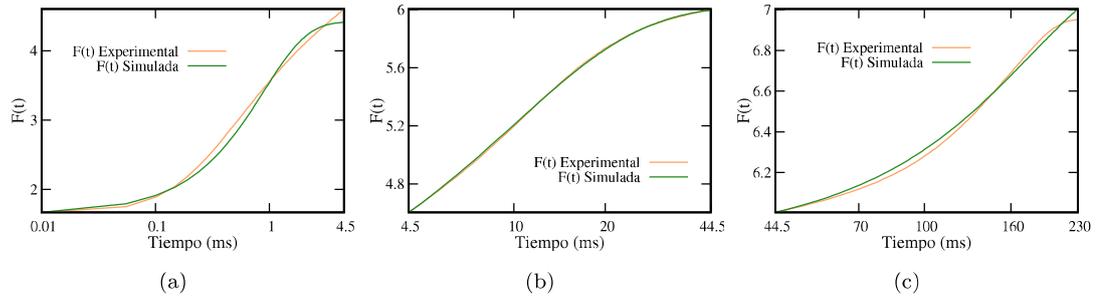


Figura 5.8: Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP a 40°C.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms}\right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$	Error
OJ	1.4070	1.9558	0.2878	1.670	0.0915
JI	0.1017	1.4024	0.0105	4.603	0.00627
IP	0.01416	0.3381	0.7394	6.004	0.0201

Tabla 5.7: Ajuste preliminar de las curvas medidas a 40°C por Villagómez.

b) Ajuste global utilizando el Método 3:

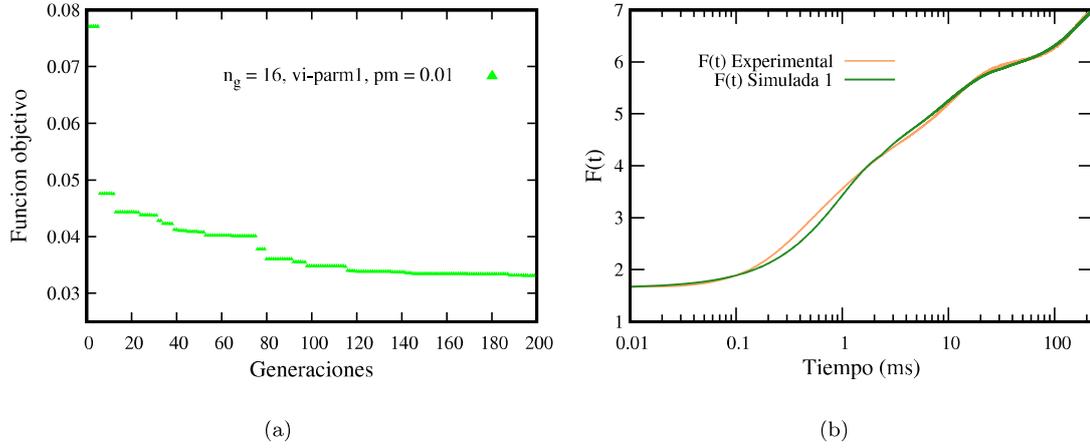


Figura 5.9: (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental de Villagómez a 40°C , usando la estrategia de ajuste 1.

\mathfrak{F}_{Obj} decreció considerablemente durante las primeras 10 generaciones y luego disminuyó lentamente hasta 0.03312 como se muestra en la figura 5.9(a). Al comparar la curva simulada y experimental se observó que el modelo no se ajusta completamente durante la región transición OJ-JI ($[0.15 - 1]$ ms). (figura 5.9(b)).

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms}\right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$
OJ	1.27726	1.95959	0.28156	1.670
JI	0.11100	1.43706	0.06236	4.603
IP	0.01367	0.34143	0.74997	6.004
	q_{OJ}	0.94906	q_{JI}	0.96237
	Error	0.0309		

Tabla 5.8: Ajuste de la curva medida por Villagómez a 40°C , usando la estrategia 1.

Los parámetros asociados al mejor ajuste se detallan en la tabla 5.8 y muestran que las constantes cinéticas decrecen conforme se avanza por las regiones de la curva Kautsky; sus valores son mayores a los reportados para 30°C a excepción del correspondiente a JI, el cual disminuyó en $0.014 \left[\frac{1}{ms}\right]$. Las concentraciones q_{OJ} y q_{JI} son mayores a 0.9 pero existe una mayor concentración de centros de reacción activos asociada a la transición de JI-IP.

Los parámetros de conectividad son menores que la unidad y están dentro del intervalo $[0.06 - 0.75]$, el cual es mayor al intervalo encontrado para 30°C . El mayor parámetro de conectividad está asociado a IP y al menor peso estadístico (a_3). Los pesos a_1 y a_2 son mayores que 1 y el peso correspondiente a la región OJ es muy similar al encontrado para 20°C y 30°C , y es el que tiene mayor aporte en el resultado final.

ii) Estrategia de ajuste 2

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms}\right]$	a_α	p_α
OJ	1.69561	1.84872	0.26860
JI	0.17807	1.02899	0.41324
IP	0.01615	0.55464	0.49521
q_{OJ}	0.98754	q_{JI}	0.99993
Error	0.051002		

Tabla 5.9: Ajuste de la curva medida por Villagómez a 40°C usando la estrategia 2.

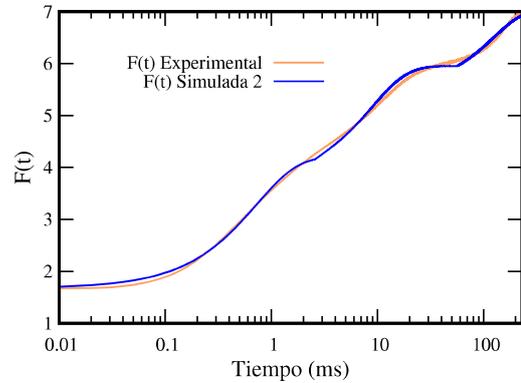


Figura 5.10: Curvas experimentales y simuladas a 40°C , usando la estrategia de ajuste 2.

Los resultados del mejor ajuste se describen en la tabla 5.9. El valor de la función objetivo asociado fue 0.051002, el cual es 1.65 veces mayor que el obtenido mediante la estrategia 1. Los parámetros encontrados varían significativamente con respecto a los reportados en la tabla 5.8: el intervalo de los parámetros de conectividad se redujo a $[0.26-0.5]$, el aporte del término de IP (a_3) en el resultado final aumentó a 0.554 y las concentraciones de los centros de reacción activados aumentaron tanto para q_{OJ} como para q_{JI} .

La figura 5.10 muestra que existe una diferencia entre la curva experimental y la simulada, específicamente en el intervalo de $[0.01 - 3]$ ms.

iii) Estrategia de ajuste 3

Los resultados del mejor ajuste se describen en la tabla 5.10. El valor de la función objetivo asociado fue 0.063933, el cual es aproximadamente el doble del obtenido mediante la estrategia 1. Las constantes cinéticas encontradas están en el orden de magnitud de las reportadas en la tabla 5.8 a excepción de la relacionada a la región OJ cuya diferencia es de $0.22 \left[\frac{1}{ms} \right]$.

La figura 5.11 muestra que existe una diferencia entre la curva experimental y la simulada con el nuevo ajuste, lo que se refleja en el valor de la función objetivo y durante el intervalo de $[1 - 40]$ ms.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α
OJ	1.49982	1.98810	0.27467
JI	0.12496	1.07030	0.26510
IP	0.01220	0.61373	0.49604
q_{OJ}	0.98698	q_{JI}	0.96474
Error		0.063933	

Tabla 5.10: Ajuste de la curva medida por Villagómez a 40°C usando la estrategia 3.

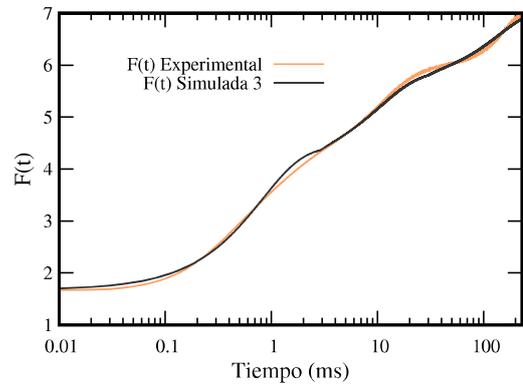


Figura 5.11: Curvas experimentales y simuladas a 40°C , usando la estrategia de ajuste 3.

Los resultados obtenidos mediante las diferentes estrategias de ajuste muestran que tanto para las curvas a 30°C como a 40°C , el mejor ajuste se realizó utilizando la estrategia 1 ya que presentó los menores valores de la función objetivo. Al comparar los parámetros a_α y p_α determinados para las curvas a diferentes temperaturas se observa que no son iguales lo cual sugiere que son dependientes de la temperatura.

A pesar de que los ajustes realizados con la estrategia 2 generaron un mayor valor en la función objetivo en relación a la estrategia 1, la curva teórica no se aleja demasiado de la experimental lo que indica que el comportamiento de las constantes cinéticas es consistente con el predicho mediante la ecuación de Arrhenius. Por lo tanto, es factible usar la ecuación de Arrhenius para simular el efecto de la temperatura.

5.1.2. Simulación del efecto de la temperatura

Usando lo descrito en la sección 3.3 se simuló el comportamiento de la fluorescencia en función de la temperatura. Las constantes cinéticas encontradas se detallan a continuación:

k_α [$\frac{1}{ms}$]	ECUACIÓN DE ARRHENIUS		ESTRATEGIA DE AJUSTE 1	
	T=30°C	T=40°C	T=30°C	T=40°C
k_1	1.50051	1.69561	1.25153	1.27726
k_2	0.15006	0.17807	0.12498	0.11100
k_3	0.01161	0.01615	0.01293	0.01370

Tabla 5.11: Constantes cinéticas determinadas según la ecuación de Arrhenius y el según la estrategia de ajuste 1 para las curvas a 30°C y 40°C.

Según lo predicho por la ecuación de Arrhenius las constantes cinéticas aumentaron con la temperatura en cada región; no obstante, este comportamiento solo ocurrió en la región IP para el caso de las k_α determinadas mediante la estrategia de ajuste 1. Adicionalmente, las constantes cinéticas encontradas mediante la ecuación de Arrhenius y el ajuste de curvas difieren considerablemente entre sí y solo se asemejan en la región IP como se observa en la tabla 5.11.

En la figura 5.12 se muestra según la ecuación de Arrhenius, como la fluorescencia aumenta en función de la temperatura conservando la forma sigmoideal.

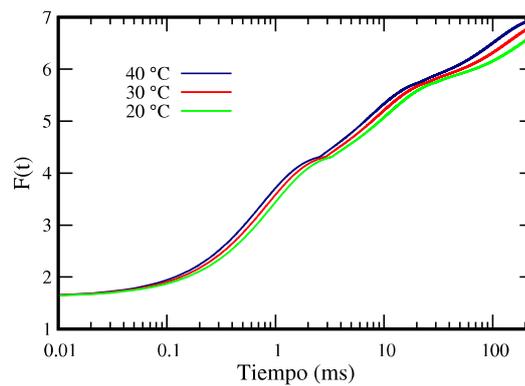


Figura 5.12: Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius para 20° C, 30° C, 40° C.

Las curvas simuladas mediante la ecuación de Arrhenius consideraron una energía de activación E_{A1} de 0.10eV y tuvieron asociados valores de funciones objetivo de

0.0804 y 0.1737 para 30°C y 40°C, respectivamente. También se simuló el efecto de la temperatura en la fluorescencia usando energías de activación E_{A1} de 0.05eV y 0.15eV, obteniendo valores de \mathfrak{F}_{Obj} mayores a los encontrados con 0.10eV (Anexo C.1).

Al comparar la curva experimental con las simuladas se observó que el mejor ajuste corresponde al realizado mediante la estrategia 1 pues se obtuvieron valores de funciones objetivo de 0.0269 y 0.0309 para 30°C y 40°C, respectivamente.

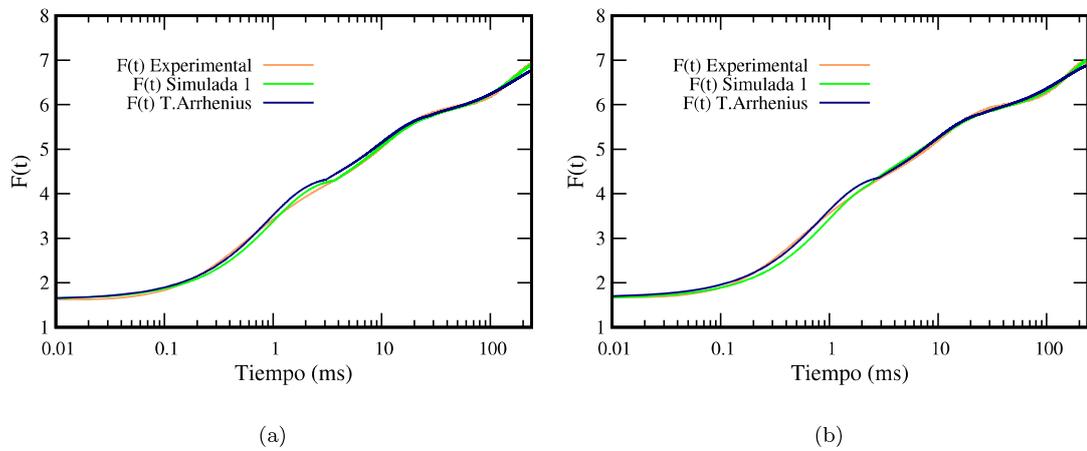


Figura 5.13: Comparación entre las curvas experimentales y simuladas mediante la estrategia de ajuste 1 y la ecuación de Arrhenius para (a) 30° C y (b) 40° C.

5.2. Simulación con los parámetros obtenidos del esquema experimental 1

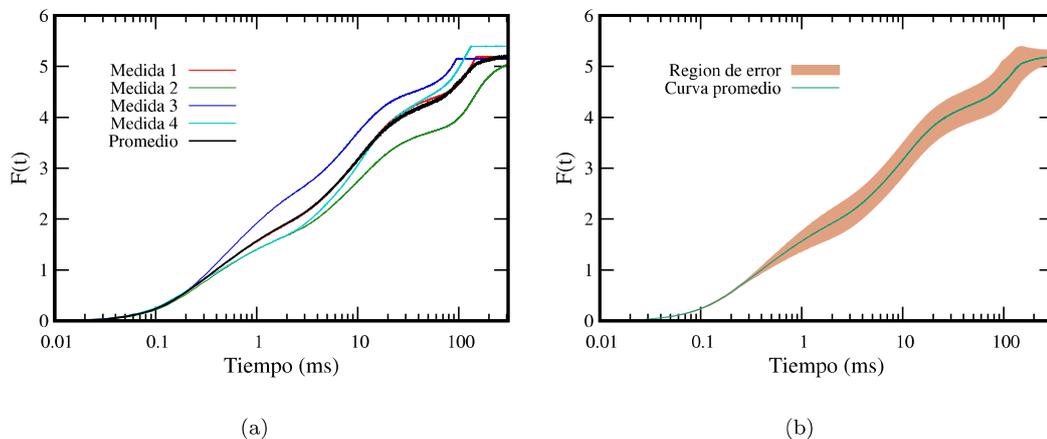


Figura 5.14: (a) Curvas medidas a 25°C y (b) curva promedio con su región de error usando el esquema experimental 1.

La figura 5.14(a) muestra que existe una gran dispersión entre las curvas medidas bajo el esquema experimental 1 debido a que corresponden a diferentes hojas de espinaca y a pesar de haber sido medidas a la misma temperatura (25°C). La máxima desviación se reflejó en la región IP con una desviación cuadrática media de 0.453 a 100 ms. El ajuste de la curva experimental promedio se realizó usando la estrategia 1.

5.2.1. Parámetros derivados de la curva a 25°C

a) *Ajuste por regiones:*

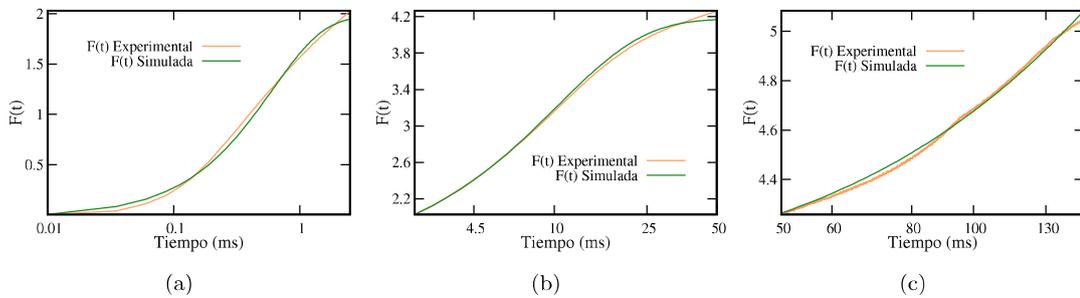


Figura 5.15: Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP para el esquema experimental 1.

El valor de \mathfrak{F}_{Obj} asociado al conjunto preliminar de parámetros descritos en la tabla 5.12 fue 0.09652.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms}\right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$	Error
OJ	1.8228	1.7056	0.1309	0.0065	0.04199
JI	0.1250	1.6186	0.2458	2.0281	0.04002
IP	0.00963	0.8203	0.6236	4.26376	0.0139

Tabla 5.12: Resultado del ajuste preliminar para las curvas medidas a 25°C para el esquema 1.

b) *Ajuste global utilizando el Método 3:*

\mathfrak{F}_{Obj} decreció considerablemente durante las primeras 10 generaciones y luego disminuyó lentamente hasta 0.01835 como se muestra en la figura 5.16(a). Al comparar la curva simulada y experimental se observó que el modelo no se ajusta completamente en la región OJ ([0.01 – 2] ms) (figura 5.16(b)).

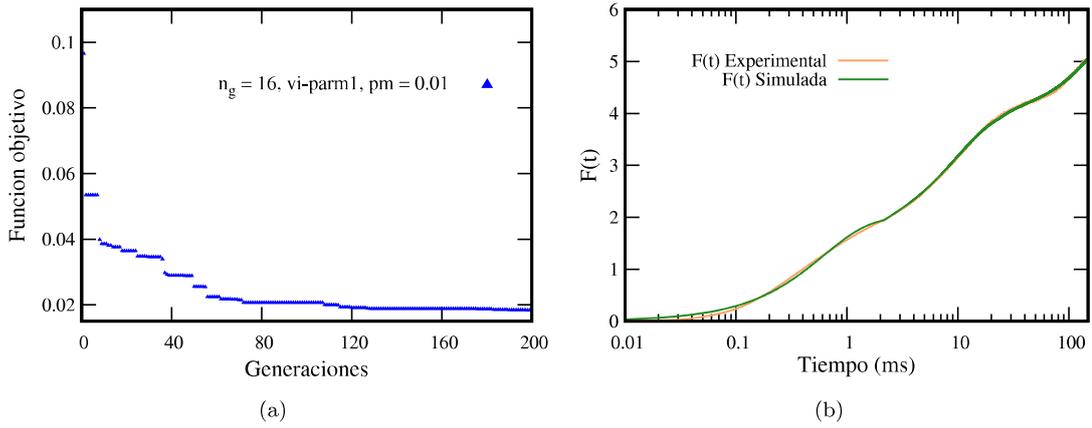


Figura 5.16: (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental a 25°C usando el esquema experimental 1 y la estrategia de ajuste 1.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$
OJ	1.78508	1.71300	0.13672	0.0065
JI	0.13066	1.56452	0.24497	2.0281
IP	0.00963	0.79651	0.62480	4.2637
	q_{OJ}	0.97889	q_{JI}	0.93673
	Error	0.01835		

Tabla 5.13: Ajuste de la curva medida bajo el esquema experimental 1 a 25°C, usando la estrategia 1.

Los parámetros asociados al mejor ajuste se detallan en la tabla 5.13 y muestran que las constantes cinéticas decrecen conforme se avanza por las regiones de la curva Kautsky; sus valores son mayores a los reportados para 20°C con las condiciones experimentales de Villagomez. Las concentraciones de centros de reacción activados, q_{OJ} y q_{JI} , son mayores a 0.9 pero predomina el valor q_{OJ} .

Los parámetros de conectividad son menores que la unidad y están dentro del intervalo $[0.13 - 0.63]$, el cual es mayor a los encontrados para 20°C en la sección 5.1.1. El mayor p corresponde a IP y se asocia al menor peso estadístico (a_3). Los pesos a_1 y a_2 son mayores que 1 siendo el peso correspondiente a la región JI el que tiene mayor aporte en el resultado final, aunque no se asemeja a los valores encontrados anteriormente.

5.2.2. Curvas de fluorescencia a diferentes temperaturas

5.2.2.1. Simulaciones con $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$

Las constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el intervalo de 10°C a 40°C se presentan en la tabla 5.14. Para cada temperatura, las relaciones $\frac{k_1}{k_3}$ y $\frac{k_2}{k_3}$ mantienen el orden de magnitud observado en la curva experimental a 25°C ; es decir, $\frac{k_1}{k_3}$ está en el orden de 10^2 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ está en el orden de 10.

$k_\alpha \left[\frac{1}{\text{ms}}\right]$	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
k_1	1.61022	1.66850	1.72680	1.78508	1.84331	1.90145	1.9594
k_2	0.11310	0.11887	0.12472	0.13066	0.13666	0.14274	0.14887
k_3	0.00729	0.00803	0.00881	0.00963	0.01050	0.01142	0.01239

Tabla 5.14: Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$.

Aunque el orden de magnitud se conserve y sea independiente de la temperatura, la relación $\frac{k_1}{k_3}$ varía desde 220.9 hasta 158.1 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ presenta valores entre 16 y 12 para el intervalo de 10°C a 40°C .

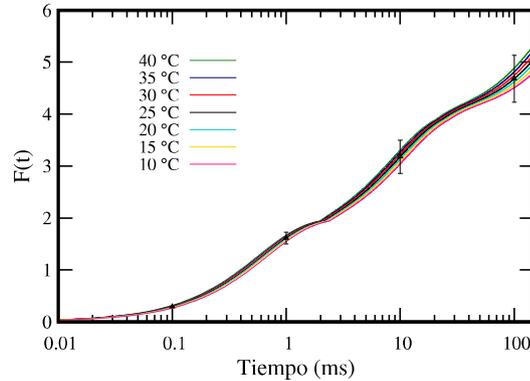


Figura 5.17: Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$. Las barras verticales representan el error experimental.

En la figura 5.17 se muestra como la fluorescencia aumenta con la temperatura conservando la forma sigmoidal; sin embargo, las curvas simuladas en intervalos de 5°C no varían significativamente entre ellas. Las barras de error indican que la

variación esperada por el efecto de la temperatura está dentro del margen de error experimental de la curva de referencia medida a 25°C.

Para que las curvas simuladas a diferentes temperaturas sean válidas deben superar su respectivo umbral de referencia μ_σ en cada región de la curva Kautsky; es decir, superar al menos el 2.48% de la fluorescencia máxima para 1 ms, 6.84% para 10 ms y 9.69% para 100 ms. Las desviaciones calculadas a diferentes tiempos y temperaturas no superan la desviación asociada al experimento (figura 5.18 (b),(c) y (d)), excepto en la región OJ a 0.1 ms y para temperaturas que difieren con al menos 10°C de la curva de referencia (figura 5.18 (a)).

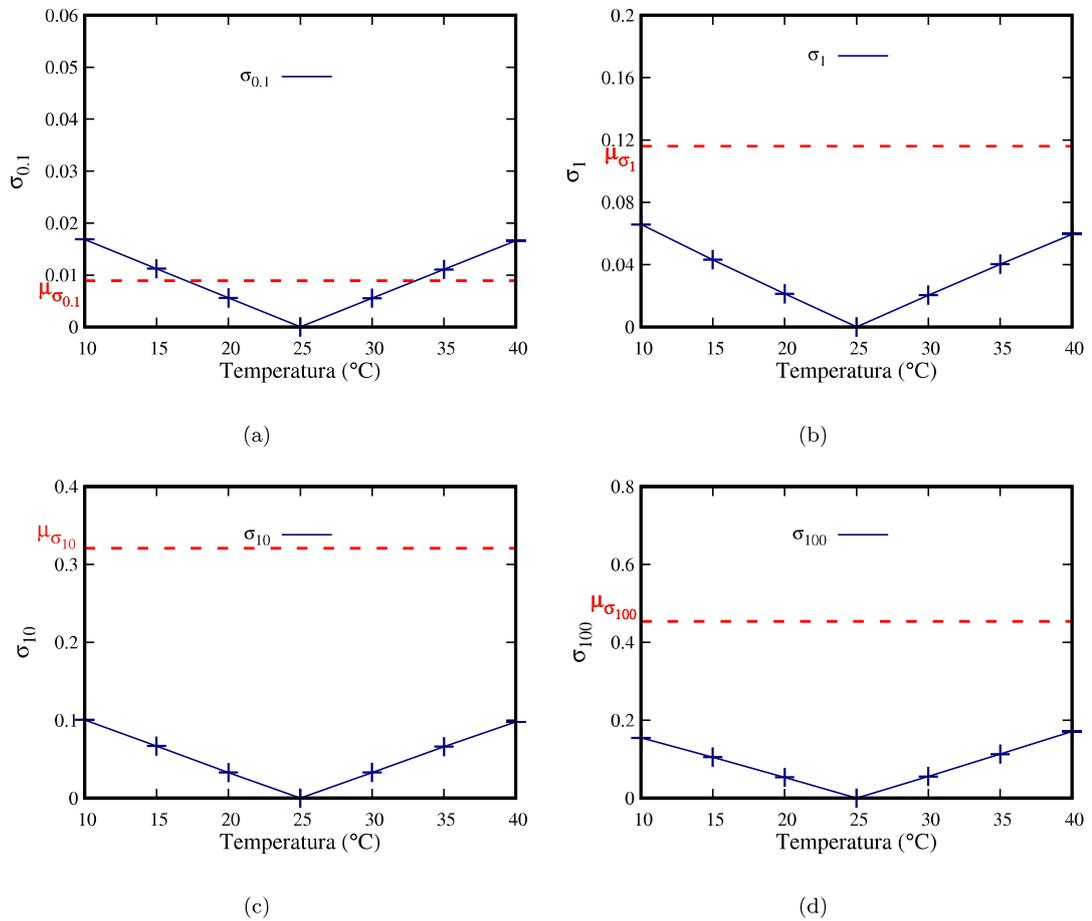


Figura 5.18: Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.05$ eV tomando como referencia una temperatura de 25°C.

Inclusive en la región IP, donde existe una mayor variación de fluorescencia por efecto de la temperatura, las desviaciones de las curvas simuladas a la temperatura máxima y mínima no superan el valor de la desviación de la curva experimental.

De acuerdo a estas simulaciones, las desviaciones de fluorescencia esperadas por el efecto de la temperatura no se apreciarán si se mantienen estas condiciones experimentales; por lo tanto, no se recomienda realizar el experimento bajo estas condiciones.

5.2.2.2. Simulaciones con $E_{A1} = 0.1 \text{ eV}$

Las constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el intervalo de 10°C a 40°C se presentan en la tabla 5.15. El rango en el que se encuentran las constantes cinéticas es mayor que el mostrado para la energía de activación $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$ (Tabla 5.14). Al igual que en el caso anterior, para cada temperatura las relaciones $\frac{k_1}{k_3}$ y $\frac{k_2}{k_3}$ mantienen el orden de magnitud observado en la curva experimental a 25°C ; es decir, $\frac{k_1}{k_3}$ está en el orden de 10^2 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ está en el orden de 10.

$k_\alpha \left[\frac{1}{\text{ms}}\right]$	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
k_1	1.45248	1.55954	1.67043	1.78508	1.90343	2.02541	2.15093
k_2	0.09789	0.10814	0.11906	0.13066	0.14294	0.15593	0.16963
k_3	0.00552	0.00669	0.00805	0.00963	0.01146	0.01355	0.01594

Tabla 5.15: Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.1 \text{ eV}$

Aunque el orden de magnitud se conserve y sea independiente de la temperatura, la relación $\frac{k_1}{k_3}$ varía desde 263 hasta 135 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ presenta valores entre 18 y 11 para el intervalo de 10°C a 40°C .

En la figura 5.19 se muestra como la fluorescencia aumenta con la temperatura conservando la forma sigmoideal. Los cambios entre las curvas simuladas son más prominentes que los asociados a una menor energía de activación (0.05 eV). Las barras de error indican que la variación esperada por el efecto de la temperatura es comparable con el margen de error experimental de la curva de referencia medida a 25°C .

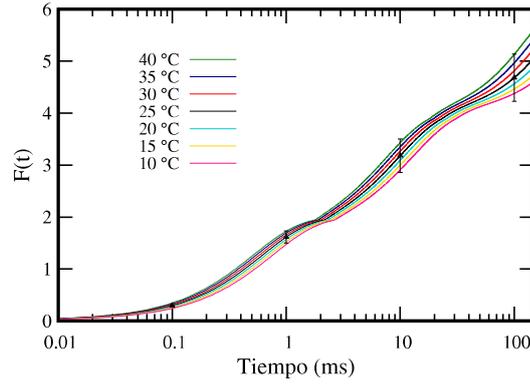


Figura 5.19: Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.1$ eV. Las barras verticales representan el error experimental.

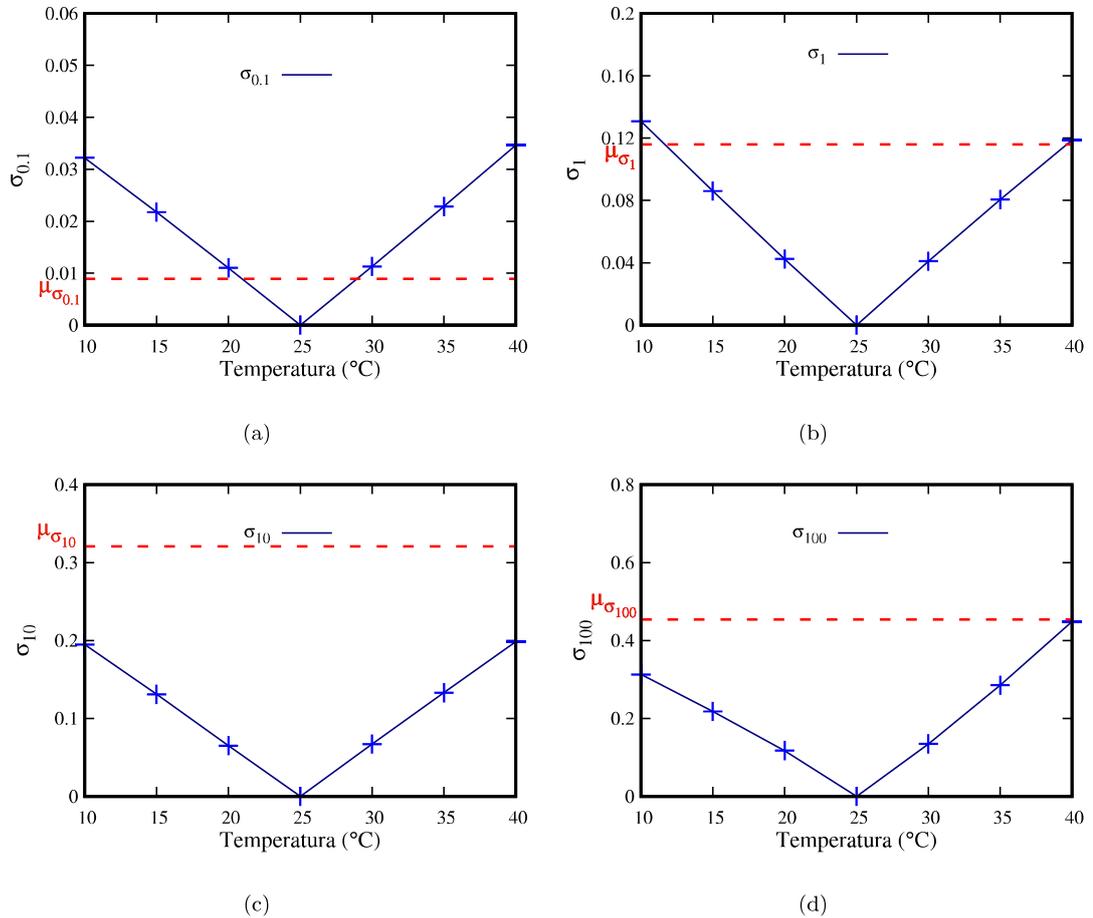


Figura 5.20: Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.10$ eV y tomando como referencia una temperatura de 25°C.

Las desviaciones calculadas en la región OJ para temperaturas que difieren con al menos 5°C a 0.1ms (figura 5.20(a)) y con al menos 15°C a 1ms superan la

desviación asociada al experimento (figura 5.20(b)). Esto no se cumple para las desviaciones correspondientes a las otras regiones de la curva Kautsky (figura 5.20 (c) y (d)).

A pesar de haber incrementado la energía de activación E_{A1} , las desviaciones de las curvas simuladas a la temperatura máxima y mínima no superan el valor de la máxima desviación de la curva experimental, la cual es 9.68 % de la fluorescencia a 100 ms. Las desviaciones de las curvas simuladas serían aceptables si superaran al menos el valor de las desviaciones de la curva experimental, las cuales representan el 2.48 % de la fluorescencia máxima para 1 ms, 6.84 % para 10 ms y 9.69 % para 100 ms.

En el caso de la curva a 40°C su desviación es 9.58 % de la fluorescencia a 100 ms, dicho valor es comparable con la desviación máxima de la curva experimental pero no es mayor por lo cual no se recomienda realizar el experimento bajo estas condiciones ya que las curvas simuladas no superan el umbral experimental de referencia μ_σ . Es necesario mejorar las condiciones bajo las cuales se realiza el experimento para poder apreciar la desviación en la fluorescencia por efecto de la temperatura.

5.2.2.3. Simulaciones con $E_{A1} = 0.15\text{eV}$

Las constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el intervalo de 10°C a 40°C se presentan en la tabla 5.16. El rango en el que se encuentran las constantes cinéticas es mayor que el mostrado para la energía de activación $E_{A1} = 0.05\text{eV}$ (Tabla 5.14).

Al igual que en el caso anterior, para cada temperatura las relaciones $\frac{k_1}{k_3}$ y $\frac{k_2}{k_3}$ mantienen el orden de magnitud observado en la curva experimental a 25°C; es decir, $\frac{k_1}{k_3}$ está en el orden de 10^2 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ está en el orden de 10.

k_α [$\frac{1}{ms}$]	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
k_1	1.31020	1.45769	1.61589	1.78508	1.96552	2.15745	2.36108
k_2	0.08474	0.09839	0.11365	0.13066	0.14951	0.17035	0.19327
k_3	0.00418	0.00557	0.00736	0.00963	0.01249	0.01607	0.02050

Tabla 5.16: Constantes cinéticas encontradas entre 10°C y 40°C con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.15 eV$

Aunque el orden de magnitud se conserve y sea independiente de la temperatura, la relación $\frac{k_1}{k_3}$ varía desde 313 hasta 115 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ presenta valores entre 20 y 9 para el intervalo de 10°C a 40°C.

En la figura 5.21 se muestra como la fluorescencia aumenta significativamente con la temperatura conservando la forma sigmoideal. Los cambios entre las curvas simuladas son más prominentes que los asociados a una energía de activación de 0.05eV y 0.10eV.

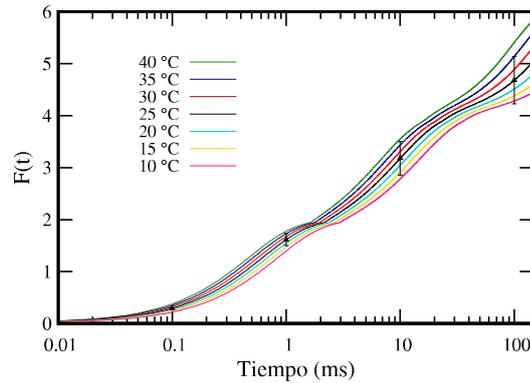


Figura 5.21: Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.15 eV$. Las barras verticales representan el error experimental.

Las barras de error indican que no todas las variaciones esperadas por el efecto de la temperatura son comparables con el margen de error experimental de la curva de referencia medida a 25°C. La mayor emisión de fluorescencia por efecto de la temperatura tuvo lugar en la región JI e IP.

Las desviaciones de las curvas simuladas para las diferentes regiones de la curva Kautsky superan los umbrales de referencia μ_σ de la curva experimental, los cuales representan el 2.48 % de la fluorescencia máxima para 1 ms, 6.84 % para 10 ms y

9.69% para 100 ms. Sin embargo, en la región OJ solo superan para temperaturas que difieren con al menos 5°C a 0.1ms (figura 5.22(a)) y con al menos 10°C a 1ms (figura 5.22(b)) de la curva de referencia, mientras que en la región JI a 10 ms y en la región IP a 100 ms, también se supera la desviación de la curva experimental pero únicamente para las curvas simuladas que difieren de la curva de referencia con 15 °C (figura 5.22(c) y (d)).

Por lo dicho anteriormente y a pesar de haber incrementado la energía de activación E_{A1} , no se recomienda realizar el experimento bajo estas condiciones ya que la literatura reporta que la energía de activación para los FSII de las hojas de espinaca están en el orden de 0.10eV [45].

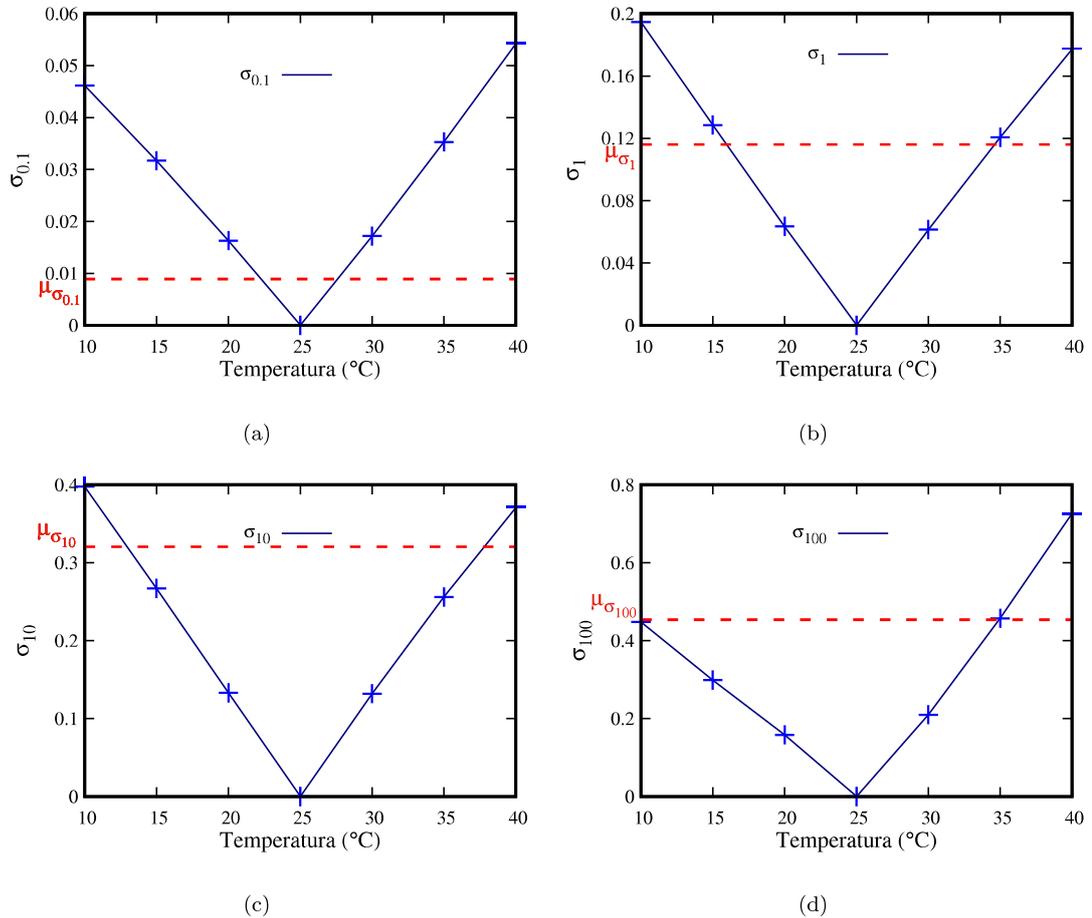


Figura 5.22: Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 1 usando $E_{A1} = 0.15$ eV y tomando como referencia una temperatura de 25°C.

5.3. Simulación con los parámetros obtenidos del esquema experimental 2

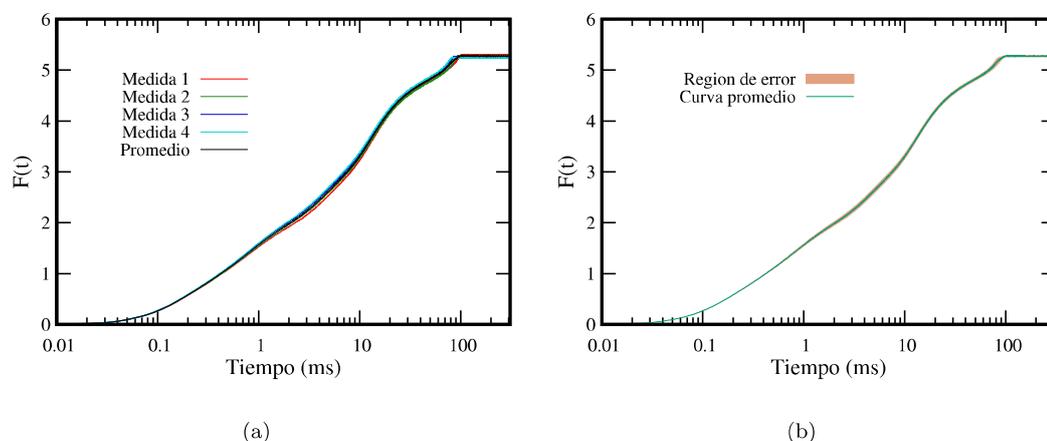


Figura 5.23: (a) Curvas medidas a 25°C y (b) curva promedio con su región de error usando el esquema experimental 2.

La figura 5.23(a) muestra que no existe una gran dispersión entre las mediciones realizadas, siendo así que conservan su forma sigmoideal. Se trabajó con la curva promedio de las medidas obtenidas a 25°C. La máxima desviación se reflejó en la región IP con un valor de 0.0724 a 100 ms. La región de error es menor que la presentada en el esquema experimental 1. El ajuste de la curva experimental promedio se realizó usando la estrategia 1.

5.3.1. Parámetros derivados de la curva a 25°C

a) *Ajuste por regiones:*

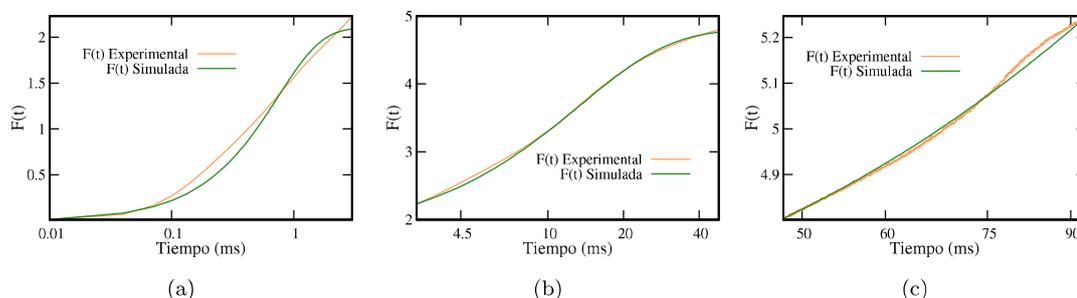


Figura 5.24: Curvas de fluorescencia experimental y teórica de las regiones (a) OJ, (b) JI y (c) IP para para el esquema experimental 2.

El valor de \mathfrak{F}_{Obj} asociado a los parámetros descritos en la tabla 5.17 fue 0.079658.

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$	Error
OJ	1.8703	1.2654	0.3957	0.00961	0.07690
JI	0.1027	1.7407	0.3224	2.23141	0.02293
IP	0.0142	0.7043	0.5169	4.80429	0.01006

Tabla 5.17: Resultado del ajuste preliminar para las curvas medidas a 25°C para el esquema experimental 2.

b) *Ajuste global utilizando el Método 3:*

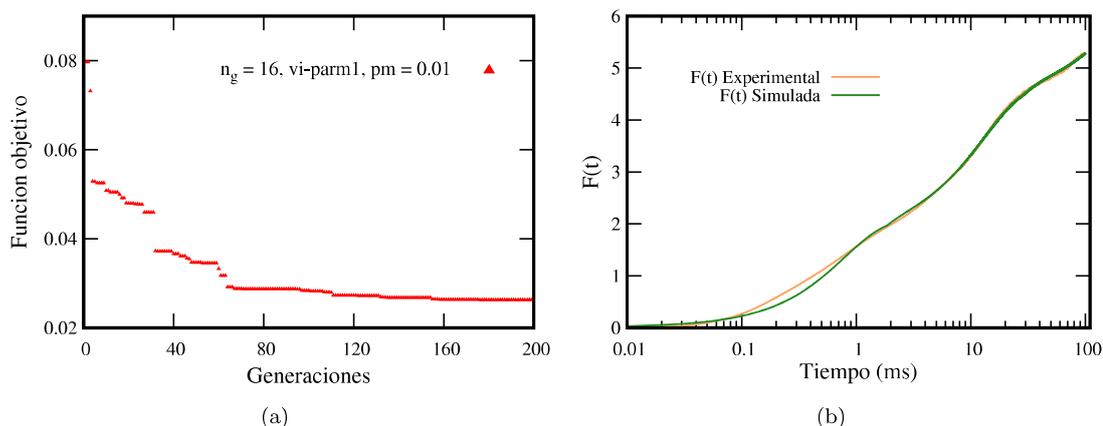


Figura 5.25: (a) Evolución de \mathfrak{F}_{Obj} y (b) curva de fluorescencia teórica y experimental a 25°C usando el esquema experimental 2.

\mathfrak{F}_{Obj} decreció considerablemente durante las primeras 60 generaciones y luego disminuyó lentamente hasta 0.0257 como se muestra en la figura 5.25(a). Se simuló la curva de fluorescencia con los parámetros del mejor ajuste detallados en la tabla 5.18 obteniendo un error de 2.5%. Aunque el error de ajuste es relativamente bajo, el modelo no se ajustó completamente en la región OJ ($[0.01 - 3]$ ms).

Región	$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	a_α	p_α	$F_{0,\alpha}$
OJ	1.7480	1.2640	0.3951	0.00961
JI	0.1047	1.7176	0.3420	2.23141
IP	0.01374	0.5648	0.6233	4.80429
	q_{OJ}	0.9610	q_{JI}	0.9434
Error		0.025731		

Tabla 5.18: Resultado del ajuste global de la curva obtenida usando el esquema experimental 2.

Los parámetros encontrados muestran que las constantes cinéticas decrecen conforme se avanza por las regiones de la curva Kautsky; sus valores son diferentes

a los encontrados para la curva de 25°C del esquema experimental 1. Las concentraciones de centros de reacción activados, q_{OJ} y q_{JI} , son mayores a 0.9 pero la mayor concentración de centros de reacción activados corresponde a la transición OJ-JI.

Los parámetros de conectividad son menores que 1 y están dentro del intervalo $[0.34 - 0.63]$, el cual es menor al encontrado para el esquema experimental 1. El mayor valor de p corresponde a IP y se asocia al menor peso estadístico (a_3). Los pesos a_1 y a_2 son mayores que 1 siendo el peso correspondiente a la región OJ el que tiene mayor aporte en el resultado final, aunque no se asemeja a los valores encontrados anteriormente.

5.3.2. Curvas de fluorescencia a diferentes temperaturas

5.3.2.1. Simulaciones con $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$

Las constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el intervalo de 10°C a 40°C se presentan en la tabla 5.19. Para cada temperatura las relaciones $\frac{k_1}{k_3}$ y $\frac{k_2}{k_3}$ mantienen el orden de magnitud observado en la curva experimental a 25°C; es decir, $\frac{k_1}{k_3}$ está en el orden de 10^2 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ está en el orden de 10.

$k_\alpha \left[\frac{1}{ms} \right]$	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
k_1	1.57678	1.63386	1.69094	1.7480	1.80503	1.86197	1.9188
k_2	0.09071	0.09534	0.10003	0.1047	0.10961	0.11448	0.11940
k_3	0.01040	0.01145	0.01256	0.0137	0.01498	0.01629	0.01767

Tabla 5.19: Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$.

Aunque el orden de magnitud se conserve y sea independiente de la temperatura, la relación $\frac{k_1}{k_3}$ varía desde 152 hasta 109 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ presenta valores entre 9 y 7 para el intervalo de 10°C a 40°C.

En la figura 5.26 se muestra como la fluorescencia aumenta con la temperatura conservando la forma sigmoidal; sin embargo, las curvas simuladas en intervalos

de 5°C no varían significativamente entre ellas. Las barras de error indican que no todas las variaciones esperadas por el efecto de la temperatura están dentro del margen de error experimental de la curva de referencia medida a 25°C .

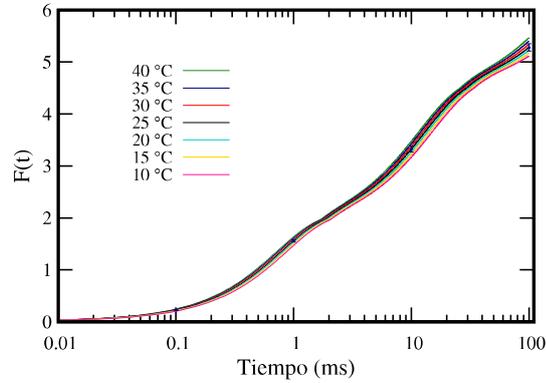


Figura 5.26: Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$. Las barras verticales representan el error experimental.

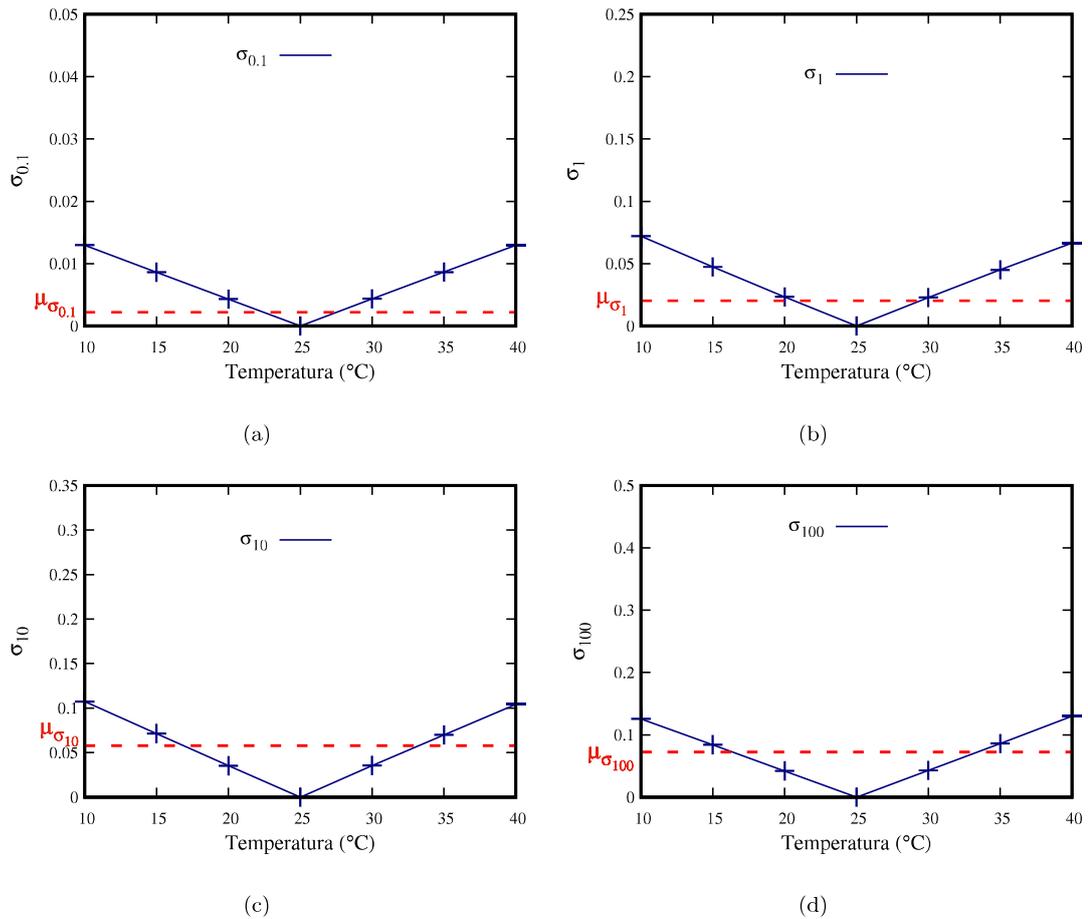


Figura 5.27: Evolución de σ a (a) 0.1 ms , (b) 1 ms , (c) 10 ms y (d) 100 ms en función temperatura para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.05 \text{ eV}$ y tomando como referencia una temperatura de 25°C .

Para que las curvas simuladas a diferentes temperaturas sean válidas deben superar su respectivo umbral de referencia μ_σ en cada región de la curva Kautsky; es decir, superar al menos el 0.34 % de la fluorescencia máxima para 1 ms, 1.02 % para 10 ms y 1.38 % para 100 ms. En la región OJ tanto a 0.1ms como a 1ms (figura 5.27(a) y (b)), todas las desviaciones correspondientes a las curvas simuladas superan la desviación asociada a la curva experimental. En el caso de la región JI a 10 ms e IP a 100ms, solo las curvas simuladas que difieren en al menos 10 °C de la curva de referencia lograron estar fuera de la región asociada al error experimental (figura 5.27(c) y (d)).

Bajo este esquema experimental, la máxima desviación asociada a la región IP de la curva experimental fue superada por las desviaciones de las curvas simuladas que diferían en al menos 10 °C de la curva de referencia, dichas desviaciones eran del 2.3 %. A pesar de que se podría realizar el experimento bajo estas condiciones en intervalos de temperatura de al menos 10 °C, no se recomienda hacerlo ya que la literatura reporta que la energía de activación para los FSII de las hojas de espinaca están en el orden de 0.10eV [45].

5.3.2.2. Simulaciones con $E_{A1} = 0.1 eV$

Las constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el intervalo de 10°C a 40°C se presentan en la tabla 5.20. El rango en el que se encuentran las constantes cinéticas es mayor que el mostrado para la energía de activación $E_{A1} = 0.05eV$ (Tabla 5.19).

k_α [$\frac{1}{ms}$]	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
k_1	1.42232	1.52715	1.63574	1.7480	1.86391	1.98335	2.10627
k_2	0.07851	0.08673	0.09549	0.1047	0.11465	0.12506	0.13605
k_3	0.00787	0.009527	0.01148	0.0137	0.01634	0.01932	0.02273

Tabla 5.20: Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.10 eV$.

Al igual que en el caso anterior, para cada temperatura las relaciones $\frac{k_1}{k_3}$ y $\frac{k_2}{k_3}$ mantienen el orden de magnitud observado en la curva experimental a 25°C; es decir, $\frac{k_1}{k_3}$ está en el orden de 10^2 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ está en el orden de 10.

Aunque el orden de magnitud se conserve y sea independiente de la temperatura, la relación $\frac{k_1}{k_3}$ varía desde 181 hasta 93 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ presenta valores entre 10 y 6 para el intervalo de 10°C a 40°C. Estos valores difieren de los determinados para el esquema experimental 1.

En la figura 5.28 se muestra como la fluorescencia aumenta con la temperatura conservando la forma sigmoideal; sin embargo, los cambios entre las curvas simuladas en intervalos de 5°C son más prominentes que los asociados a una menor energía de activación (0.05eV). Las barras de error indican que todas las variaciones esperadas por el efecto de la temperatura están fuera del margen de error experimental de la curva de referencia medida a 25°C.

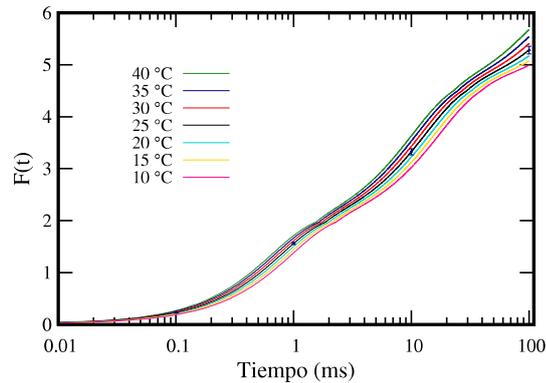


Figura 5.28: Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.10$ eV. Las barras verticales representan el error experimental.

Las desviaciones correspondientes a las curvas simuladas superan el umbral de referencia μ_σ ; en todas las regiones de la curva Kautsky y para todas las temperaturas analizadas (figura 5.29). En la región IP existe una mayor variación de fluorescencia por efecto de la temperatura.

Bajo este esquema experimental, la máxima desviación de la curva medida representa el 1.38% de la fluorescencia a 100ms; este valor es ligeramente menor que las desviaciones de las curvas que difieren en al menos 5°C de la curva de referencia,

las cuales representan el 1.57%, por lo cual se recomienda realizar el experimento bajo estas condiciones pero en intervalos de temperatura de al menos 10 °C.

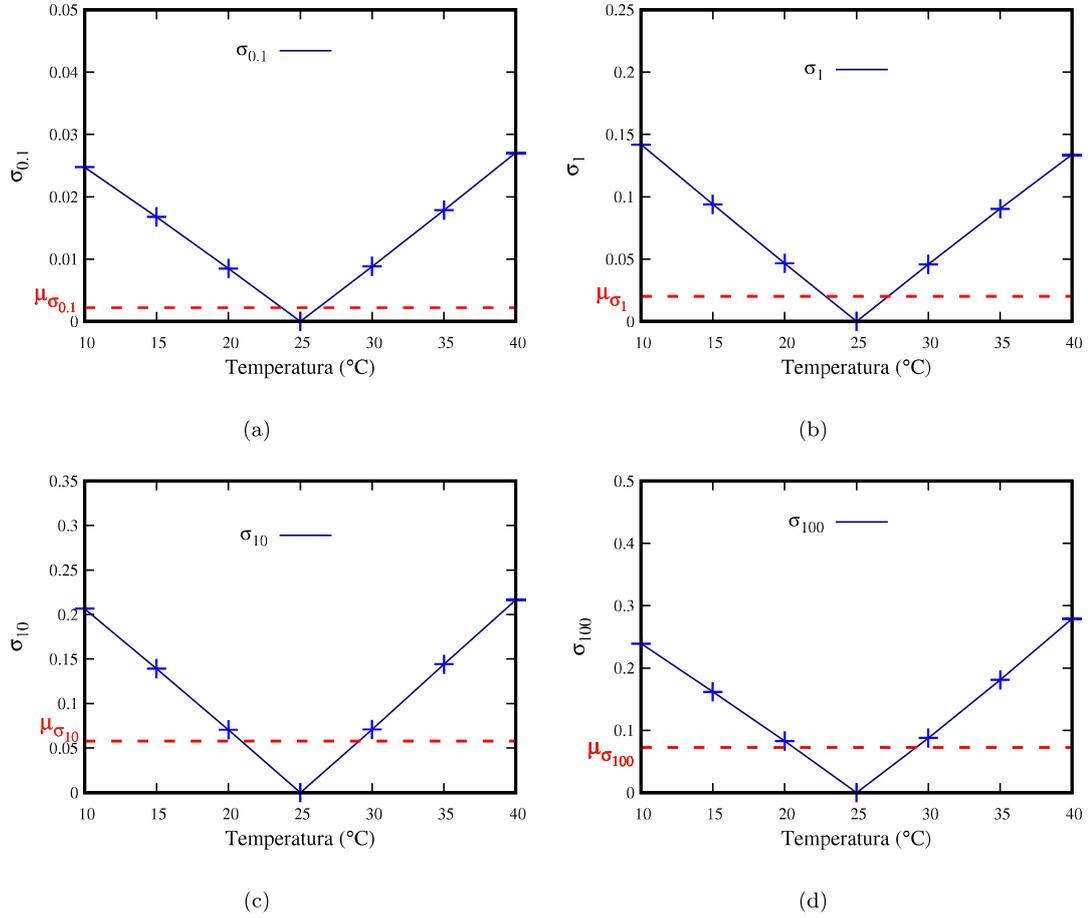


Figura 5.29: Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.10 eV$ y tomando como referencia una temperatura de 25°C.

5.3.2.3. Simulaciones con $E_{A1} = 0.15 eV$

Las constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el intervalo de 10°C a 40°C se presentan en la tabla 5.21. El rango en el que se encuentran las constantes cinéticas es mayor que el mostrado para la energía de activación $E_{A1} = 0.05eV$ (Tabla 5.19).

Al igual que en el caso anterior, para cada temperatura las relaciones $\frac{k_1}{k_3}$ y $\frac{k_2}{k_3}$ mantienen el orden de magnitud observado en la curva experimental a 25°C; es decir, $\frac{k_1}{k_3}$ está en el orden de 10^2 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ está en el orden de 10.

k_α [$\frac{1}{ms}$]	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
k_1	1.28299	1.42742	1.58234	1.7480	1.92471	2.11265	2.31205
k_2	0.06796	0.07891	0.09115	0.1047	0.11992	0.13662	0.15501
k_3	0.00596	0.00795	0.01050	0.0137	0.01782	0.02292	0.02924

Tabla 5.21: Constantes cinéticas encontradas con la ecuación de Arrhenius para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.15$ eV.

Aunque el orden de magnitud se conserve y sea independiente de la temperatura, la relación $\frac{k_1}{k_3}$ varía desde 215 hasta 79 mientras que $\frac{k_2}{k_3}$ presenta valores entre 11 y 5 para el intervalo de 10°C a 40°C. Estos valores difieren de los determinados para el esquema experimental 1.

En la figura 5.30 se muestra como la fluorescencia aumenta con la temperatura conservando la forma sigmoideal; sin embargo, los cambios entre las curvas simuladas en intervalos de 5°C son más prominentes que los asociados a una menor energía de activación (0.05eV y 0.10eV). Las barras de error indican que todas las variaciones esperadas por el efecto de la temperatura están fuera del margen de error experimental de la curva de referencia medida a 25°C.

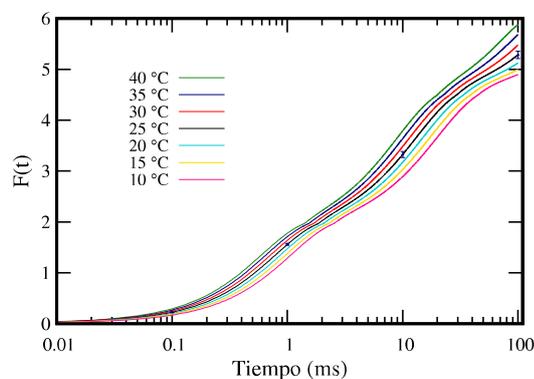


Figura 5.30: Curvas de fluorescencia simuladas según la ecuación de Arrhenius entre 10°C y 40°C para el esquema experimental 2. Las barras verticales representan el error experimental.

Las desviaciones correspondientes a las curvas simuladas superan el umbral de referencia μ_σ en todas las regiones de la curva Kautsky y para todas las temperaturas analizadas (figura 5.31); es decir son mayores al 0.34% de la fluorescencia máxima para 1 ms, a 1.02% para 10 ms y a 1.38% para 100 ms. En la región IP existe una mayor variación de fluorescencia por efecto de la temperatura.

Por lo dicho anteriormente y a pesar de haber incrementado la energía de activación E_{A1} , no se recomienda realizar el experimento bajo estas condiciones ya que la literatura reporta que la energía de activación para los FSII de las hojas de espinaca están en el orden de 0.10eV [45].

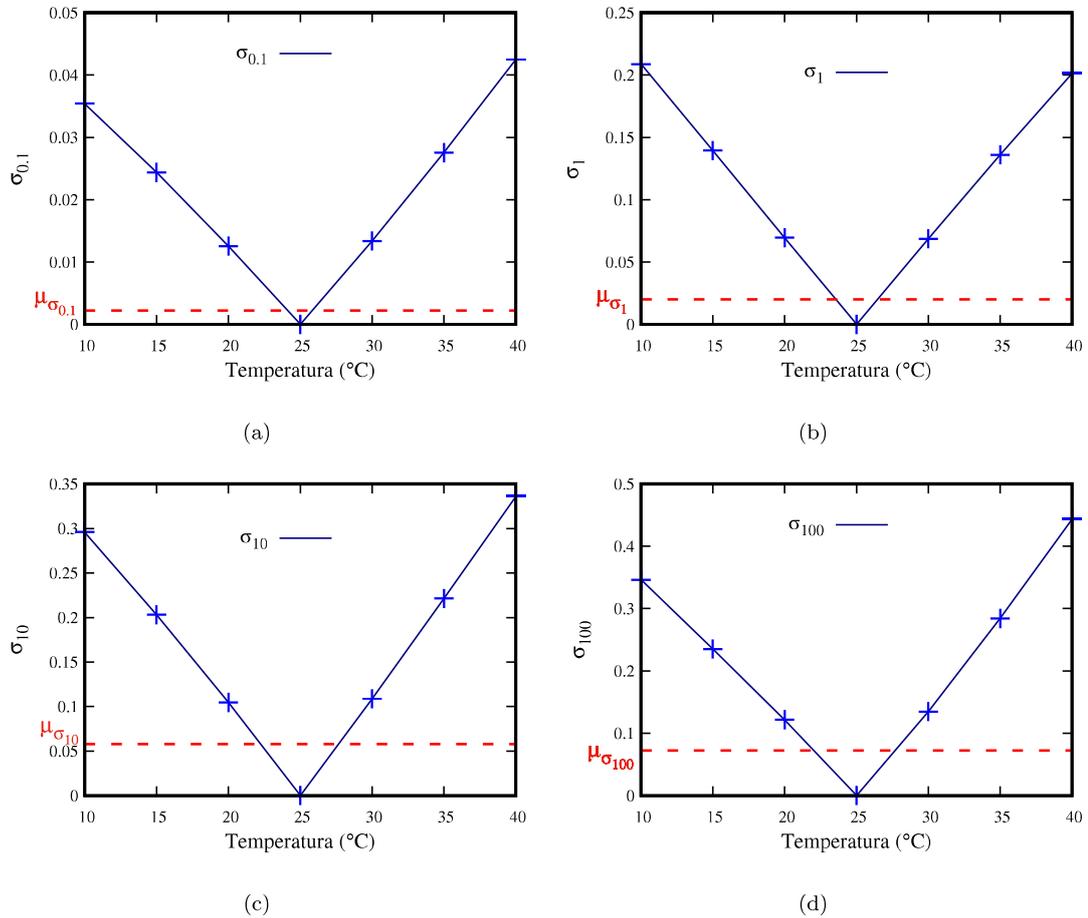


Figura 5.31: Evolución de σ a (a)0.1 ms, (b)1 ms, (c)10 ms y (d)100 ms en función temperatura para el esquema experimental 2 usando $E_{A1} = 0.15$ eV y tomando como referencia una temperatura de 25°C.

Capítulo 6

Conclusiones

Mediante un modelo estocástico y con ayuda de la ecuación de Arrhenius se simuló el efecto de la temperatura en la fluorescencia inducida para hojas de espinaca en el rango de 10°C a 40°C. Las simulaciones determinaron que el comportamiento predicho es consistente con los resultados experimentales disponibles. Adicionalmente, los experimentos desarrollados en este trabajo mostraron que las curvas de fluorescencia son muy sensibles a las condiciones experimentales y de no ser realizados adecuadamente, las variaciones de la fluorescencia por efecto de la temperatura pueden confundirse con el error experimental. Los resultados obtenidos permiten definir las mejores condiciones para realizar el experimento y aportan con información cuantitativa que caracteriza la cinética de las transiciones asociada a las diferentes regiones de las curvas Kautsky.

El modelo estocástico conjuntamente con el algoritmo genético simple permitieron mejorar el algoritmo de ajuste y búsqueda de parámetros. Los errores de ajuste de las curvas experimentales fueron cercanos al 3% y usando únicamente 11 parámetros a diferencia de otros modelos que utilizan hasta 30 parámetros [28]. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de Schansker [4] que manifiesta que las características de las curvas de fluorescencia no están determinadas únicamente por la reducción de Q_A sino también por cambios conformacionales y por la heterogeneidad de los dominios fotosintéticos. No obstante, este modelo no se ajusta

completamente en la región OJ lo que sugiere la existencia de otros procesos que deben considerarse para describir mejor la cinética de la fluorescencia inducida.

El comportamiento de las curvas experimentales obtenidas por Villagómez [22] a 30°C y 40°C difiere de las curvas simuladas mediante la ecuación de Arrhenius en $\sim 8\%$ y $\sim 17\%$, respectivamente. Estos porcentajes relativamente altos se encontraron al simular el efecto de la temperatura con una energía de activación E_{A1} igual a 0.1eV . Sin embargo, la diferencia entre las curvas simuladas y experimentales fue mucho mayor al considerar otras energías de activación E_{A1} , como 0.05eV y 0.15eV ; dejando en evidencia que el cambio en las curvas de fluorescencia por efecto de la temperatura está directamente relacionado con la energía de activación que necesitan los FSII para pasar de un estado abierto a un estado cerrado.

La influencia de la energía de activación en las simulaciones también se reflejó en las curvas simuladas bajo las condiciones experimentales de este trabajo (esquema 1 y 2), usando energías de activación E_{A1} de 0.05eV , 0.1eV y 0.15eV . El mayor cambio en la fluorescencia se dio con 0.15eV ; sin embargo, no se recomienda realizar experimentos considerando este valor ya que algunos artículos reportan que la energía de activación para los FSII de las hojas de espinaca están en el orden de $\sim 0.1\text{eV/mol}$ [45, 46].

Los cambios de fluorescencia se caracterizaron mediante la desviación cuadrática media de la curva medida a 25°C y de la curva simulada para determinar bajo qué condiciones la variación esperada por el efecto de la temperatura no se confunde con la desviación de la curva experimental. Bajo este criterio y basados en los resultados encontrados en este trabajo, quedó en evidencia que la tolerancia del error experimental depende del tiempo que limita cada región de la curva Kautsky. Por lo que se sugiere diseñar experimentos tales que el error asociado a la medición sea menor al 0.34% de la fluorescencia máxima (F_m) para la región OJ (1 ms), al 1.02% para la región JI (10 ms) y al 1.38% para la región IP (100 ms). Aunque es recomendable utilizar estas tolerancias para cada región, se podría solo usar una condición ideal fuerte de tal forma que sea suficiente con ser mucho menor que la tolerancia de la región OJ. Las condiciones del esquema 2 son las más

favorables para realizar mediciones distinguibles a diferentes temperaturas ya que solo en este caso las curvas simuladas lograron superar las desviaciones asociada a la curva experimental.

Adicionalmente, las variaciones de fluorescencia causadas por acción de la temperatura son más prominentes en las regiones JI e IP (fase térmica), presentando diferencias significativas en la curva Kautsky pero conservando su forma sigmoidal. Esto se verificó al analizar el comportamiento de σ en función de la temperatura a 0.1 ms y 100 ms tomando como referencia la curva simulada a 10°C.

La sensibilidad de las mediciones de fluorescencia dificulta la obtención de curvas que presenten claramente las tres regiones típicas de una curva Kautsky (OJ, JI, IP). Un factor relevante es la calidad de la hoja, ya que si está sometida a algún tipo de estrés las regiones no se evidencian. Además, las condiciones experimentales son críticas para obtener una medida aceptable ya que se debe tener un control óptimo de la temperatura, adaptación a la oscuridad, humedad, etc. Con ayuda de los esquemas experimentales empleados en este trabajo se obtuvo una mejor calidad en las curvas medidas en comparación con las curvas anómalas reportadas por Villagómez. Los mejores resultados experimentales se obtuvieron con el esquema 2, logrando una menor dispersión asociada a las medidas realizadas sobre una misma hoja y manifestando un alto grado de reproducibilidad.

Con la metodología desarrollada en este trabajo se logró simular el comportamiento de la fluorescencia inducida entre 10°C y 40°C. El método fue validado preliminarmente con resultados experimentales anteriores; sin embargo, experimentos adicionales son necesarios. Los resultados de las simulaciones proveen de información referencial para la preparación de los experimentos correspondientes. Debido a que el modelo estocástico no se ajusta completamente a la región OJ es necesario incluir procesos adicionales relacionados con esta región, como el transporte de electrones a través de la rama inactiva en el FSII o la recombinación entre aceptores de electrones del FSII y donadores, sugeridos por Schansker [4].

Referencias

- [1] Kalaji, M. H., Goltsev, V. N., Żuk-Golaszewska, K., Zivcak, M., Brestic, M. (2017). Chlorophyll fluorescence: understanding crop performance—basics and applications. CRC Press.
- [2] Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferri, L., ... Losciale, P. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research*, 132(1), 13-66.
- [3] Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., ... Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta physiologiae plantarum*, 38(4), 102.
- [4] Schansker, G., Tóth, S. Z., Holzwarth, A. R., Garab, G. (2014). Chlorophyll a fluorescence: beyond the limits of the Q_A model. *Photosynthesis research*, 120(1-2), 43-58.
- [5] Baldassarre, V., Cabassi, G., Ferrante, A. (2011). Use of chlorophyll a fluorescence for evaluating the quality of leafy vegetables. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 735.
- [6] Roháček, K., Soukupová, J., Barták, M. (2008). Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. *Plant Cell Compartments-Selected Topics. Research Signpost, Kerala, India*, 41-104.
- [7] Ralph PJ, Gademann R (2005) Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat Bot* 82:222–237

- [8] Ritchie, G., y Landis, T. D. (2005). Seedling quality tests: chlorophyll fluorescence. In: Dumroese, R. Kasten; Landis, Tom D.; Steinfeld, David; Watson, Rae, eds. Forest Nursery Notes. R6-CP-TP-11-04, Portland OR: USDA Forest Service, Pacific Northwest Region, Stand and Private Forestry, Cooperative Programs: 12-16.
- [9] Popovic, R., Dewez, D., Juneau, P. (2003). Applications of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: heavy metals, herbicides, and air pollutants. In Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology (pp. 151-184). Springer, Boston, MA.
- [10] Papageorgiou, G. C., Tsimilli-Michael, M., Stamatakis, K. (2007). The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. *Photosynthesis research*, 94(2-3), 275-290.
- [11] Stirbet, A. (2013). Excitonic connectivity between photosystem II units: what is it, and how to measure it?. *Photosynthesis research*, 116(2-3), 189-214.
- [12] Blankenship, R.E. (2014). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 2nd ed. Chichester, UK:Wiley.
- [13] Xin, C. P., Yang, J., Zhu, X. G. (2013). A model of chlorophyll a fluorescence induction kinetics with explicit description of structural constraints of individual photosystem II units. *Photosynthesis research*, 117(1-3), 339-354.
- [14] Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B. (2014). *Campbell biology* (No. s 1309). Boston: Pearson.
- [15] Govindjee, K. J., Messinger, J., Whitmarsh, J. (2010). Photosystem II. *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. Wiley, Chichester.
- [16] Krause, G. H., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual review of plant biology*, 42(1), 313-349.
- [17] Golbeck, J., van der Est, A. (Eds.). (2014). *The biophysics of photosynthesis* (Vol. 11). New York: Springer.

- [18] Zhu, X. G., Baker, N. R., Ort, D. R., Long, S. P. (2005). 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(1), 114-133.
- [19] Lazár, D. (2003). Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *Journal of Theoretical Biology*, 220(4), 469-503.
- [20] Duysens LMN, Sweers HT (1963) Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: Japanese Society of Plant Physiologists (ed) *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*, University of Tokyo Press, Tokyo, pp 353–372.
- [21] Paillotin, G. (1976). Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystem II. *Journal of theoretical biology*, 58(1), 237-252.
- [22] Villagómez Correa, S. R. (2016). Efecto de la temperatura en las curvas de fluorescencia inducida de clorofila a en hojas de espinaca. 72 hojas. Quito : EPN.
- [23] Haupt, R. L., Haupt, S. E. (2004). *Practical genetic algorithms*, 2da. ed., John Wiley Sons, New Yersey.
- [24] Adrian, A. M., Utamima, A., Wang, K. J. (2015). A comparative study of GA, PSO and ACO for solving construction site layout optimization. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 19(3), 520-527.
- [25] Liang, J. J., Qin, A. K., Suganthan, P. N., Baskar, S. (2006). Comprehensive learning particle swarm optimizer for global optimization of multimodal functions. *IEEE transactions on evolutionary computation*, 10(3), 281-295.
- [26] Chelouah, R., Siarry, P. (2000). A continuous genetic algorithm designed for the global optimization of multimodal functions. *Journal of Heuristics*, 6(2), 191-213.

- [27] Hall, D.O. and K.K. Rao. (1999). *Photosynthesis*. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- [28] Stirbet, A. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1-2), 236-257.
- [29] Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In *Chlorophyll a fluorescence* (pp. 321-362). Springer, Dordrecht.
- [30] Brestic, M., Zivcak, M. (2013). PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In *Molecular stress physiology of plants* (pp. 87-131). Springer, India.
- [31] Moise N, Moya I (2004) Correlation between lifetime heterogeneity and kinetics heterogeneity during chlorophyll fluorescence induction in leaves: 2. Multi-frequency phase and modulation analysis evidences a loosely connected PSII pigment-protein complex. *Biochim Biophys Acta* 1657:47–60.
- [32] Gillespie, D. T. (1976). A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of computational physics*, 22(4), 403-434.
- [33] Pang, T. (1999). *An introduction to computational physics*, 2da. ed., Cambridge University Press, New York.
- [34] Goldberg, D. E. (1989). *Genetic algorithms in search. Optimization, and Machine Learning*, Addison Wesley Publishing Company Inc., Canadá.
- [35] Michalewicz, Z. (2013). *Genetic algorithms + data structures = Evolution programs*, 3ra ed., Springer Science Business Media, USA.
- [36] C Documentation (2019). Pseudo-random number generation. Recuperado de <https://en.cppreference.com/w/cpp/numeric/random>

- [37] Vestergaard, C. L., Génois, M. (2015). Temporal gillespie algorithm: Fast simulation of contagion processes on time-varying networks. *PLoS computational biology*, 11(10), e1004579.
- [38] Connors, K. A. (1990). *Chemical kinetics: the study of reaction rates in solution*. John Wiley Sons.
- [39] Chang, R. (2005). *Physical chemistry for the biosciences*. University Science Books.
- [40] Boisvert, S., Joly, D., Carpentier, R. (2006). Quantitative analysis of the experimental O–J–I–P chlorophyll fluorescence induction kinetics. *The FEBS journal*, 273(20), 4770-4777.
- [41] Xia, Q., Tan, J., Ji, X., Jiang, Y., Guo, Y. (2018). Modelling and simulation of chlorophyll fluorescence from photosystem II as affected by temperature. *IET systems biology*, 12(6), 304-310.
- [42] Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K. (1998). Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process. *Photosynthesis Research*, 57(1), 51-59.
- [43] Janssen, L. H., van Hasselt, P. R. (1994). Temperature effects on chlorophyll fluorescence induction in tomato. *Journal of plant physiology*, 144(2), 129-135.
- [44] Stirbet, A. (2012). Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise. *Photosynthesis research*, 113(1-3), 15-61.
- [45] Magyar, M., Sipka, G., Kovács, L., Ughy, B., Zhu, Q., Han, G., ... Garab, G. (2018). Rate-limiting steps in the dark-to-light transition of Photosystem II-revealed by chlorophyll-a fluorescence induction. *Scientific reports*, 8(1), 2755.

- [46] Schansker, G., Tóth, S. Z., Kovács, L., Holzwarth, A. R., Garab, G. (2011). Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyll a fluorescence rise. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(9), 1032-1043.
- [47] Frydenvang, J., van Maarschalkerweerd, M., Carstensen, A., Mundus, S., Schmidt, S. B., Pedas, P. R., ... Husted, S. (2015). Sensitive detection of phosphorus deficiency in plants using chlorophyll a fluorescence. *Plant physiology*, 169(1), 353-361.
- [48] Sharkey, T. D., Zhang, R. (2010). High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(8), 712-722.

Anexo A

Códigos de simulación

A.1. Código para el ajuste de las curvas experimentales

Este código genera un archivo de texto que muestra como evolucionan los parámetros del modelo estocástico y la función objetivo para cada una de las generaciones establecidas. A continuación, para ejemplificar, se muestra el código empleado para el ajuste de la hoja de espinaca a 20°C correspondiente al experimento de Villagómez. Se utilizó en este caso una población $n_g = 16$, con un porcentaje de mutación $pm = 0.01$, 32 bits, 200 generaciones y un archivo de entrada de datos experimentales *20exp.dat*.

```
#include <iostream>
#include <fstream>
#include <math.h>
#include <cstdlib>
#include <time.h>
#include <cmath>
#include <vector>
#include <list>
#include <random>
#include <iomanip>
using namespace std;

//*****
//  ALGORITMO GENETICO
//
// Este programa permite encontrar los parametros optimos asociados al modelo
// extendido de la fluorescencia inducida de clorofila:
//  $F = f_0 + a_1*b_1/(1-p_1*b_1) + a_2*b_2/(1-p_2*b_2) + a_3*b_3/(1-p_3*b_3)$ 
// Con ayuda del algoritmo genetico:
// ni: numero de config. aleatorias que se van a obtener
// nu: numero de variables 1
// nb: numero de bits
// nd: todos los bits de todas las variables
// ng=ni/2  numero de config. con las que se va a trabajar
// ne=ng/25 numero de config. elite
```

```

// nc=nv    numero de variables
// nr=ng/2  numero de padres
// pm=0.01  porcentaje de mutacion
//*****

//Constantes F:
const double dte = 0.01, sigm = 0.02;
const int N = 50000000;
//Constantes AG:
const int ng = 16, nv = 11, nb =32;
const int nr = ng/2;
const int ne = 2;
const int nc = nv;
const double pm = 0.01;//0.008

double myrandom(double min, double max)
{
    // use thread_local to make this function thread safe
    thread_local static mt19937 mt{random_device{}}();
    thread_local static uniform_real_distribution<double> dist;
    using pick = uniform_real_distribution<double>::param_type;

    return dist(mt, pick(min, max));
}

//***** FUNCIONES: FLUORESCENCIA *****

//Reaction time; r=numero aleatorio de 0 a 1;
//c=cte cinetica de transicion
//A=concentracion de centros de reaccion abiertos
//B=concentracion de centros de reaccion cerrados
double rtime (double A, double c)
{
    double r, t;
    //r = (double) myrandom(0.0, 1.0);
    r = (double) rand()/RAND_MAX;
    t = log(1.0/r);
    t /= (A*c);
    return t;
}

// Total fluorescence [Eq(2.18)], b=q(t)
double Fluo (double fo, double a1, double a2, double a3, double b1, double b2,
             double b3, double p1, double p2, double p3)
{
    double FT = fo;
    double ftd0 = 1.0, ftd1 = 1.0, ftd2 = 1.0;
    double ft0 = a1, ft1 = a2, ft2 = a3;

    ftd0 -= p1*b1, ftd1 -= p2*b2, ftd2 -= p3*b3;
    ft0 *= b1, ft1 *= b2, ft2 *= b3;
    ft0 /= ftd0, ft1 /= ftd1, ft2 /= ftd2;

    FT += ft0, FT += ft1, FT += ft2;

    //FT = fo + a1*b1/(1-p1*b1) + a2*b2/(1-p2*b2) + a3*b3/(1-p3*b3);
    return FT;
}

//***** FUNCIONES: CONSTANTES CINETICAS *****

double Kinetics1 (double& dtt, double& A1, double& B1, double c1)
{
    double t = dtt, tao = 0.0, x = B1; //dtt es inicial
    while( t < dte)
    {
        tao = rtime(A1,c1);
        A1--; //disminuye un c.r abierto
        B1++; //aumenta un c.r.cerrado
        //en conjunto se cerro un c.r
        t += tao;
        //sale cuando la suma de taos supera a dte
        if (A1 < 0.0)
        {
            t = dte;
        }
    }
    dtt = t-dte; //actualizando dtt con el primer t que supero
    //dtt porcion en que sobrepasa el t al dte
    x /= N; //concentracion de centros cerrados
    return x;
}

double Kinetics2 (double& dtt, double B1, double U1, double& A2, double& B2,
                 double c2)
{
    double t = dtt, tao = 0.0, x = B2;

```

```

        while(t < dte)
        {
            if (A2>0.0 && B1>U1)
            {
                tao = rtime(A2,c2);
                A2--;
                B2++;
                t += tao;
            }
            else
            {
                t = dte;
            }
        }
        dtt = t - dte;
        x /= N;
        return x;
    }

//*****
vector<double> f; // Vector de errores
vector<bool> ff; // funcion objetivo
vector<vector<bool>> C; // Matriz de bits para las config de R
vector<vector<double>> C1; // Matriz que almacena los R de las config
bool CF[11][32][16]; // Matriz que almacena los R de las config en bin
ordenados
bool C2[11][32][16]; // Matriz de matrices que almacena los bits R de
todas ng config
void sort(vector<double>& x, vector<int>& index);
vector<vector<bool>> encode(vector<double> R, int m);
vector<double> decode(vector<vector<bool>> W, int m);

double initial_vector[] = {0.234410353, 0.964533733, 0.280619493, 0.121030832,
0.533347503, 0.257971477, 0.00976645853, 0.532251354, 0.452868561, 0.0, 0.0};
void initiate();
void select();
void shuffle(vector<int>& index);
void cross();
void rankin();
void mutate();
double cost(vector<double> r, int puntos, double f0);

ifstream experimento ("20exp2.txt");
ofstream results ("resultsf_ng16_parm_pm001_g200_T20.dat");

int main()
{
    int pts = 30000, n, cn, gmax=200;
    double ff0 = 1.61871, er = 0.025;

    results << "Corrida " << "Error " << "k1 " << "
    << "a1 " << "p1 " << "k2 " << "
    << "a2 " << "p2 " << "k3 " << "
    << "a3 " << "p3 " << endl;

    f.resize(ng); //cost function
    ff.resize(ng);
    C1.resize(ng); //chromosomes-double
    for(int i=0;i<ng;i++) {C1[i].resize(nv);}

    initiate();
    int g = 1;
    bool contd = true;
    while (contd && g<gmax)
    {
        cout << endl;
        cout << "Corrida: " << g << endl;
        results << g << " ";
        select();
        cross();
        rankin();
        mutate();
        results << f[0] << " ";
        for (int j=0;j<nv;j++) {results << setprecision(15) << C1[0][j] << " "};
        results << endl;
        g++;
    }
    cout << "Done" << endl;
    return 0;
}

//***** FUNCIONES: ALGORITMO GENETICO *****

// Metodo para la creacion de la poblacion inicial de
// la reserva genetica, creda aleatoriamente
// Sort se usa para clasificar los cromosomas de acuerdo

```

```

// a su aptitud
void initiate()
{
double ff0=1.61871, er = 0.025, emax=2;
int pts = 30000;
vector<double> e(ng,0.0), R3(nv,0.0), R4(nv,0.0), R(nv,0.0); //
vector<int> vector1(length, 0);
vector<int> indexE(ng,0), index(nb,0);

vector<vector<bool>> W(nv, vector<bool>(nb)), C(nv, vector<bool>(nb)); //
matriz copia de W
vector<vector<double>> d(ng, vector<double>(nv)); //
matriz de poblaciones

// Sacar una copia de r y trabajar con esa copia en la codificacion.
for (int j=0; j<nv; j++) {R[j] = initial_vector[j];}

// imprimir vector inicial

W = encode(R,nb);

for(int j=0;j<nb;j++) {index[j] = j;}

//shuffle(index);
int k=0;
do
{
for (int i = 0; i<nv; i++)
for(int j = 0; j<nb; j++) {C[i][j]=W[i][index[j]];}
R3 = decode(C,nb); //Decodificando binario
e[k] = cost(R3, pts, ff0);
if (e[k] < emax)
{
for (int i = 0; i<nv; i++)
for(int j = 0; j<nb; j++) {CF[i][j][k]=C[i][j];}
for(int j=0;j<nv;j++)
{
d[k][j] = R3[j]; //MATRIZ DE CANDIDATOS R
}
indexE[k] = k;
f[k] = e[k];
cout <<"F(" << k+1 << "): " << e[k] <<endl;
k++;
}
shuffle(index);
}
while (k<ng);

cout<<endl;
cout<<"Initial population selected"<<endl;
}

// Metodo para ordenar el arreglo X[i] en orden creciente
//con respecto al orden original almacenado en index
// Tambien se usa para ordenar los cromosomas
// Index : indice de clasificacion

void sort(vector<double>& x, vector<int>& index)
{
int m = x.size(), itmp;
double xtmp;
for (int i = 0; i<m; i++)
{
for (int j = i+1; j<m; j++)
{
if (x[i] > x[j])
{
xtmp = x[i];
x[i] = x[j];
x[j] = xtmp;
itmp = index[i];
index[i] = index[j];
index[j] = itmp;
}
}
}
}

//Metodo para codificar un arreglo de n numeros r[i] entre
// 0 y 1 en una representacion binario (w[j])
//Se representa r[i] en un arreglo binario
//m numero donde se truncan la codificacion --precision

vector<vector<bool>> encode(vector<double> r, int m)
{
int n = r.size();
vector<vector<bool>> W(n, vector<bool>(m)); // se llena de ceros

```

```

for (int i = 0; i<n; i++)
{
    for(int j = 0; j<m; j++)
    {
        if(r[i]>=pow(0.5,j+1.0))
        {
            W[i][j] = true;
            r[i] -= pow(0.5,j+1.0);
        }
    }
}
return W;
}

//Metodo para decodificar un arreglo de n*m numeros w[j]
// en un arreglo de numeros reales r[i]
//la incertidumbre que se tendra estara relacionada con m
//podemos utilizar el esquema de codificacion para crear
//una poblacion inicial que se clasifica con la funcion
//de costo.

vector<double> decode(vector<vector<bool> >W, int m)
{
    int n = W.size();
    vector<double> r(n,0.0);

    for (int i = 0; i<n; i++)
    {
        for(int j = 0; j<m; j++)
        {
            if(W[i][j]==true)
            {
                r[i] += pow(0.5,j+1.0);
            }
        }
    }
    return r;
}

// Torneos de seleccion de padres
// Competencia 1-1
// En cada torneo los dos o mas participantes son
// seleccionados al azar, el ganador de cada torneo es
// el participante con la mejor funcion de costo
void select()
{
    vector<int> index(ng, 0);
    bool C3[11][32][16];
    vector<double> e(ng, 0.0);

    for (int k=0; k<ng; k++)
    {
        for (int i = 0; i<nv; i++)
            for(int j = 0; j<nb; j++) {C3[i][j][k] = CF[i][j][k];}
        e[k] = f[k],    index[k] = k;
    }

    shuffle(index);    // decidir torneos
    int mm = 0;
    for (int k=0; k<nr; k++)
    {
        ff[k]=true;
        if (e[index[mm]] < e[index[mm+1]])
        {
            for (int i = 0; i<nv; i++)
                for(int j = 0; j<nb; j++)
                {
                    CF[i][j][k] = C3[i][j][index[mm]];
                }
            f[k] = e[index[mm]];
        }
        else
        {
            for (int i = 0; i<nv; i++)
                for(int j = 0; j<nb; j++)
                {
                    CF[i][j][k] = C3[i][j][index[mm+1]];
                }
            f[k] = e[index[mm+1]];
        }
        mm += 2;
    }
    cout<<"Progenitores seleccionados"<<endl;
}

// mezclar los indices para que los participantes sean
// sorteados al azar con misma probabilidad.

```

```

void shuffle(vector<int>& index)
{
    int k = index.size();
    for (int i = 0; i<k; i++)
    {
        int j = (int)(k*((double) myrandom(0.0, 1.0)));
        if (j!=i)
        {
            int itmp = index[i];
            index[i] = index[j];
            index[j] = itmp;
        }
    }
}

// Entrecruzamiento cromosomico a partir de un punto fijo
void cross()
{
    int p = 0;

    for (int k=nr; k<ng-nr/2; k++)
    {
        double alea = (double) myrandom(0.0, 1.0);
        int nx = 1 + (int)((nb-2)*alea);
        for (int i=0; i<nv; i++)
        {
            for (int j=0; j<nx; j++)
            {
                CF[i][j][k] = CF[i][j][p];
                CF[i][j][k+nr/2] = CF[i][j][p+1];
            }
            for (int j=nx; j<nb; j++)
            {
                CF[i][j][k] = CF[i][j][p+1];
                CF[i][j][k+nr/2] = CF[i][j][p];
            }
        }
        ff[k] = ff[k+nr/2] = false;
        p += 2;
    }
    cout<<"Descendants generated"<<endl;
}

// Metodo de reorganizacion de los cromosomas antes de la mutacion
void rankin()
{
    double ff0 = 1.61871, er = 0.025;
    int pts = 30000;
    vector<double> R(nv,0.0), e(ng,0.0);
    vector<int> index(ng,0);
    vector<vector<bool>> C(nv, vector<bool>(nb));
    vector<vector<double>> C1t(ng, vector<double>(nv));

    for (int k=0; k<ng; k++)
    {
        for (int i=0; i<nv; i++)
        {
            for (int j=0; j<nb; j++) {C[i][j]=CF[i][j][k];}
            for (int j=0; j<nb; j++) {C2[i][j][k]=C[i][j];}
        }
        //Decodificando binario
        R = decode(C,nb);
        //imprimir vector decodificado
        for(int j = 0; j<nv; j++)
        {
            C1t[k][j] = R[j];
        }
        if (ff[k]==true) {e[k]=f[k];}
        else {e[k] = cost(R, pts, ff0);}
        index[k] = k;
    }
    sort(e,index); //Ordenar los mejores R

    //matriz binaria ordenada CF
    for (int k = 0; k<ng; k++)
    {
        f[k] = e[k];
        for (int i = 0; i<nv; i++)
        {
            for(int j=0; j<nb; j++)
            {
                CF[i][j][k] = C2[i][j][index[k]];
            }
            C1[k][i]=C1t[index[k]][i];
        }
    }
}
//imprimir CF ordenada

```

```

    cout << "Matrices ordenadas : " << endl << endl;
}

//*****
//Mutacion de un porcentaje de bits en los cromosomas
//seleccionados excepto el mejor
// Invierte al azar los bits en los cromosomas
// seleccionados al azar.

void mutate()
{
double ff0 = 1.61871, er = 0.025, ee = 0.0001, rr;
int pts = 30000;

int nn, mmax = (int)(ng*nv*nb*pm+1);
vector<double> R(nv,0.0), Ro(nv,0.0);
vector<vector<bool>> C(nv, vector<bool>(nb));

// Mutacion en las mejores configuracion (ELITE)
int mb = (int)(nv*nb*pm);
for (int k=0; k<ne; k++)
{
ff[k]=true;
for (int i=0; i<nv; i++)
for (int j=0; j<nb; j++) {C[i][j]=CF[i][j][k];}
Ro = decode(C,nb);

nn=0;
do
{
for (int n=0; n<mb; n++)
{
double ale = (double) myrandom(0.0, 1.0);
int bm = (int)(nv*nb*ale);
int i = bm/nb;
int ib = bm%nb;
C[i][ib]=!C[i][ib];
}
R = decode(C,nb);
rr=0;
for(int j=0;j<nv;j++) {rr=rr+(R[j]-Ro[j])*(R[j]-Ro[j]);}
rr=sqrt(rr)/nv;
nn=nn+1;
}
while (nn<10 && rr<ee);

double e = cost(R, pts, ff0);

//Solo si mejora se acepta la configuracion mutada
if (e<f[k])
{
for (int i=0; i<nv; i++)
for (int j=0; j<nb; j++) {CF[i][j][k] = C[i][j];}
f[k] = e;
cout<<"F: "<<e<<" mutation included in the population"<<endl;
} else {cout<<"F: "<<e<<" mutation no included"<<endl;}
}

// Mutacion en otras configuraciones
for (int k=0; k<mmax; k++)
{
double ale1 = (double) myrandom(0.0, 1.0);
int ig = (int)((ng-ne)*ale1+ne);
double ale2 = (double) myrandom(0.0, 1.0);
int bm = (int)(nv*nb*ale2);
int i = bm/nb;
int ib = bm%nb;
CF[i][ib][ig]=!CF[i][ib][ig];
ff[ig]=false;
}

// Clasificacion de los cromosomas en la poblacion
cout<<endl;
cout<<"**Comenzando Ranking final de la corrida "<<endl;
rankin();

//imprimir vector decodificado
cout<<"Vector costo luego de la mutacion "<<endl;
for(int i=0; i<ng; i++)
{
cout<<f[i]<<" ";
}
cout<<endl;
}

//*****

```

```

// Evaluacion la funcion a optimizar (su costo).
// Dependiendo del vector decodificado R3

double cost(vector<double> r, int puntos, double f0)
{
    double c1 = 6*r[0], c2 = r[3], c3 = r[6];
    double aa1 = 2*r[1], aa2 = 2*r[4], aa3 = r[7];
    double pp1 = r[2], pp2 = r[5], pp3 = r[8];
    double v1 = 0.9+(0.1*r[9]), v2 = 0.9+(0.1*r[10]), U1 = v1*N, U2=v2*N;
    double dtt1 = 0.0, dtt2 = 0.0, dtt3 = 0.0;
    double A1 = N, A2 = N, A3 = N, B1 = 0, B2 = 0, B3 = 0;
    double b1, b2, b3;
    double dif, F, sq = 0.0, erx, t, FF;

    for( int i = 0; i < puntos; i++ )
    {
        b1 = Kinetics1 (dtt1, A1, B1, c1);
        b2 = Kinetics2 (dtt2, B1, U1, A2, B2, c2);
        b3 = Kinetics2 (dtt3, B2, U2, A3, B3, c3);
        experimento >> t >> FF;
        F = Fluo (f0, aa1, aa2, aa3, b1, b2, b3, pp1, pp2, pp3);
        dif = FF-F;
        sq += dif*dif;
    }
    erx = sqrt(sq/puntos);

    experimento.clear();
    experimento.seekg(0, ios::beg);

return erx;
}
}

```

A.2. Código para la simulación a diferentes temperaturas

Este código genera un archivo de texto con la evolución temporal de la fluorescencia inducida para la temperatura a la cual se desea simular. A continuación, para ejemplificar, se muestra el código empleado para la simulación de la hoja de espinaca a 35°C. Se utilizó en este caso las constantes cinéticas determinadas por la ecuación de Arrhenius y un archivo de entrada de datos experimentales *15exp.dat*.

```

#include <iostream>
#include <fstream>
#include <math.h>
#include <cstdlib>
#include <time.h>
#include <cmath>
#include <vector>
#include <list>
#include <random>
#include <boost/random/linear_congruential.hpp>
#include <boost/random/uniform_int.hpp>
#include <boost/random/uniform_real.hpp>
#include <boost/random/variante_generator.hpp>
#include <boost/generator_iterator.hpp>
using namespace std;

//*****
// Calculo de F dependiente de la temperatura
//
// Este programa permite encontrar los parametros optimos asociados al modelo
// extendido de la fluorescencia F inducida de clorofila :
//

```

```

// F = fo + a1*b1/(1-p1*b1) + a2*b2/(1-p2*b2) + a3*b3/(1-p3*b3);
//*****

//Constantes F:
const double dte = 0.01, sigm = 0.02, chi = 24.725;
const int N = 500000000;
const double kB = 8.6173324E-5;

double myrandom(double min, double max)
{
    // use thread_local to make this function thread safe
    thread_local static std::mt19937 mt{std::random_device{}()};
    thread_local static std::uniform_real_distribution<double> dist;
    using pick = std::uniform_real_distribution<double>::param_type;

    return dist(mt, pick(min, max));
}

//***** FUNCIONES: FLUORESCENCIA *****

//Reaction time; r=numero aleatorio de 0 a 1;
//c=cte cinetica de transicion
//A=concentracion de centros de reaccion abiertos
//B=concentracion de centros de reaccion cerrados
double rtime (double A, double c)
{
    double r, t;
    //r = (double) rand()/RAND_MAX;
    r = (double) myrandom(0.0, 1.0);
    t = (1/(A*c))*log(1/r);
    return t;
}

// Total fluorescence [Eq(2.18)], b=q(t)
double Fluo (double fo, double a1, double a2, double a3, double b1, double b2,
             double b3, double p1, double p2, double p3)
{
    double FT;
    FT = fo + a1*b1/(1-p1*b1) + a2*b2/(1-p2*b2) + a3*b3/(1-p3*b3);
    return FT;
}

//***** FUNCIONES: CONSTANTES CINETICAS *****

double Kinetics1 (double& dtt, double& A1, double& B1, double c1)
{
    double t,tao,x;
    t = dtt; //dtt es inicial
    while( t < dte)
    {
        if (A1>0)
        {
            tao = rtime(A1,c1);
            A1--; //disminuye un c.r abierto
            B1++; //aumenta un c.r.cerrado
            //en conjunto se cerro un c.r
            t = t+tao;
        }
        //sale cuando la suma de taos supera a dte
        else
        {
            t = dte;
        }
    }
    dtt = t-dte; //actualizando dtt con el primer t que supero
    //dtt porcion en que sobrepasa el t al dte
    x = B1/N; //concentracion de centros cerrados
    return x;
}

double Kinetics2 (double& dtt, double B1, double U1, double& A2, double& B2,
                 double c2)
{
    double t,tao,x;
    t = dtt;
    while(t < dte)
    {
        if (A2>0 && B1>U1) //B1>U1
        {
            tao = rtime(A2,c2);
            A2--;
            B2++;
            t = t+tao;
        }
        else
        {

```

```

        }
        t = dte;
    }
    dtt = t-dte;
    x = B2/N;
    return x;
}

//***** FUNCIONES: TEMPERATURA *****/

double Kconst (double k1, double T1, double T2, double Ea)
{
    double A, k2;
    A = k1/(exp(-Ea/(kB*T1)));
    k2 = A*exp(-Ea/(kB*T2));
    return k2;
}

//*****/
double r[] = {0.31257686810568, 0.845524302916601, 0.12529669329524,
0.0663990965113044, 0.84112452971749, 0.144199598347768, 0.00470246118493378,
0.973302494036034, 0.497920314781368, 0.498201205627993, 0.490745907183737};
double cost(vector<double> r, int puntos, double f0, double error);
ifstream experimento ("15exp2.txt");
ofstream experimento2 ("15exp2_Tsb.txt");
ifstream experimento3 ("15exp2_Tsb.txt");
ofstream simulation2 ("fluo_C15_308K.dat");

int main()
{
    int puntos, n, cn;
    double erx, ff0, er, c1, c2, c3, aa1, aa2, aa3, pp1, pp2, pp3, v1, v2, U1, U2
, dtt1, dtt2, dtt3, A1, B1, A2, B2, A3, B3, b1, b2, b3, dif, F, t, FF, k1, k2
, k3, a1, a2, a3, u1, u2, nllm, p1, p2, p3, Ea1, Ea2, Ea3, T1, T2, k21, k22,
k23, sq;

    srand(time(NULL));
    er = 0.025, ff0=1.2177, puntos = 26000;

    double Fprom=1.209486, Fm=0.0, tt, FFF;

    for( int i = 0; i < puntos; i++ )
    {
        experimento>>tt>>FFF;
        Fm=FFF-Fprom;
        experimento2 << tt << " " << Fm <<endl;
    }
    experimento2.close();

    dtt1 = 0, dtt2 = 0, dtt3 = 0;
    A1 = N, A2 = N, A3 = N;
    B1 = 0, B2 = 0, B3 = 0;

    k1 = 5*r[0], k2 = r[3], k3 = r[6];
    Ea1 = 0.10, Ea2 = 0.14, Ea3 = 0.27; //eV
    T1 = 288.15, T2= 308.15;

    k21 = Kconst (k1, T1, T2, Ea1);
    k22 = Kconst (k2, T1, T2, Ea2);
    k23 = Kconst (k3, T1, T2, Ea3);
    cout<<k21<< " " <<k22<< " " <<k23<<endl;

    c1 = k21, aa1 = 2*r[1], pp1 = r[2];
    c2 = k22, aa2 = 2*r[4], pp2 = r[5];
    c3 = k23, aa3 = r[7], pp3 = r[8];
    v1 = 0.9+(0.1*r[9]), v2 = 0.9+(0.1*r[10]);
    U1 = v1*N, U2 = v2*N;

    for( int i = 0; i < puntos; i++ )
    {
        b1 = Kinetics1 (dtt1, A1, B1, c1);
        b2 = Kinetics2 (dtt2, B1, U1, A2, B2, c2);
        b3 = Kinetics2 (dtt3, B2, U2, A3, B3, c3);
        experimento3>>t>>FF;
        F = Fluo (ff0, aa1, aa2, aa3, b1, b2, b3, pp1, pp2, pp3)-Fprom;
        dif = FF-F;
        sq += dif*dif;
        simulation2<<t<<" " <<FF<<" " <<F<<endl;
    }
    erx = sqrt(sq/puntos);
    experimento3.clear();
    experimento3.seekg(0, ios::beg);

    cout<<"Error: " <<erx<<endl;
    return 0;
}

```

Anexo B

Operadores Complementarios del Algoritmo Genético

B.1. Mezcla (Shuffle) y Ordenamiento

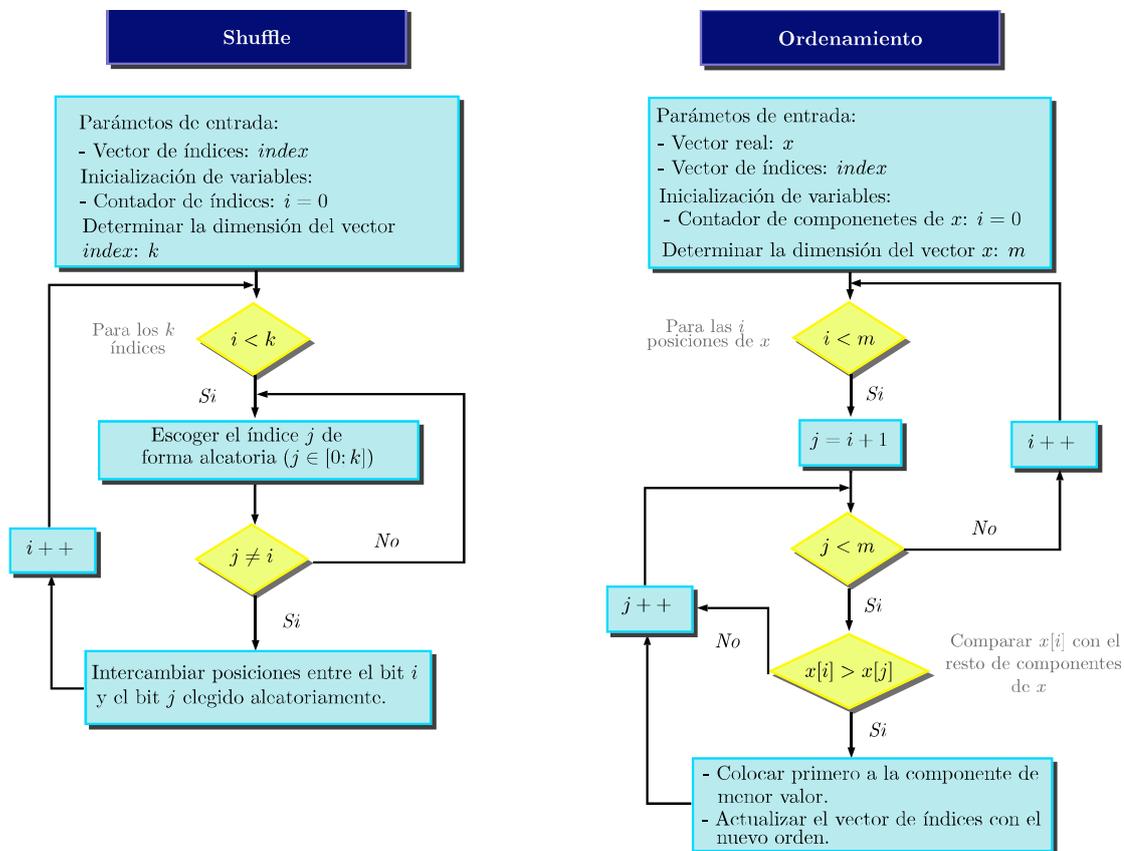


Figura B.1: Esquema para mezclar (izquierda) y ordenar (derecha) los elementos de un vector.

El operador mezcla se utilizó para intercambiar las posiciones de los elementos de un vector determinado ayudándose de un vector que almacena los índices de las posiciones iniciales. La figura B.1 (izquierda) ilustra su implementación. Esto facilita la permutación de las posiciones de los bits existentes en el cromosoma inicial para obtener nuevos cromosomas o también se emplea para decir los torneos en el proceso de selección de progenitores.

Adicionalmente, el ordenamiento permitió organizar de forma ascendente los elementos de un vector, en este caso se uso para ordenar los valores de la función objetivo para los cromosomas que conformas la población. Su implementación se muestra en la figura B.1 (derecha).

Anexo C

Cálculos adicionales

C.1. Simulaciones con diferentes energías de activación E_{A1}

La validación de las simulaciones del efecto de la temperatura en la fluorescencia de clorofila *a* se complementó realizando simulaciones que consideraban diferentes energías de activación como 0.05eV, 0.10eV y 0.15eV. Las curvas simuladas fueron comparadas con las curvas medidas en el experimento 2 de Villagómez a 30°C y 40°C.

C.1.1. Curvas a T= 30°C

E_{A1}	k_1 [$\frac{1}{ms}$]	k_2 [$\frac{1}{ms}$]	k_3 [$\frac{1}{ms}$]	\mathfrak{F}_{Obj}
0.05 eV	1.40567	0.13695	0.00973	0.08946
0.10 eV	1.50058	0.15006	0.01161	0.08039
0.15 eV	1.60174	0.16442	0.01385	0.13960

Tabla C.1: Constantes cinéticas determinadas mediante la ecuación de Arrhenius para diferentes energías de activación E_{A1} a 30°C

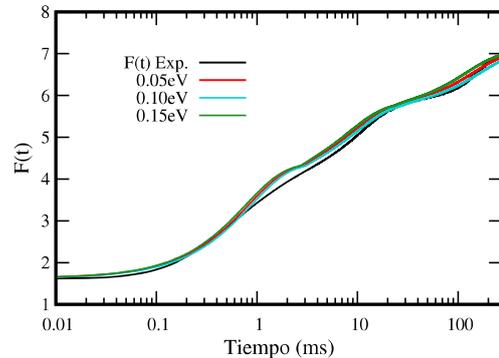


Figura C.1: Curvas experimentales y simuladas usando las k_α determinadas por Arrhenius para 30°C.

Como se observa las constantes cinéticas son mayores que las encontradas para 30°C y aumentaron al incrementar la energía de activación E_{A1} . El menor valor de \mathfrak{F}_{Obj} para 30°C fue 0.08039 y está asociado a una energía de activación de 0.10eV como se muestra en la Tabla C.1.

En la figura C.1 se observa que la curva simulada con una energía de activación de 0.10eV difiere en menor cantidad de la curva experimental, lo contrario ocurre con la curva simulada con $E_{A1} = 0.15\text{eV}$ cuyo error es de $\sim 14\%$.

C.1.2. Curvas a $T= 40^{\circ}\text{C}$

E_{A1} [eV]	k_1 [$\frac{1}{ms}$]	k_2 [$\frac{1}{ms}$]	k_3 [$\frac{1}{ms}$]	\mathfrak{F}_{Obj}
0.05	1.49426	0.14918	0.01148	0.26463
0.10	1.69561	0.17807	0.01615	0.17366
0.15	1.92409	0.21254	0.02273	0.31940

Tabla C.2: Constantes cinéticas determinadas mediante la ecuación de Arrhenius para diferentes energías de activación E_{A1} a 40°C

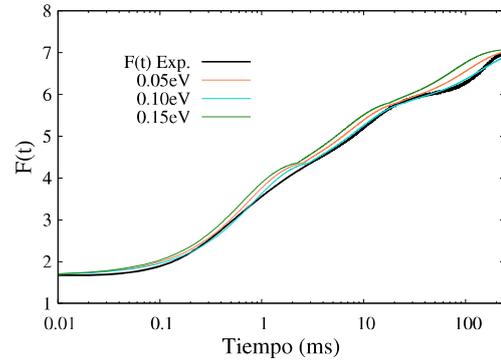


Figura C.2: Curvas experimentales y simuladas usando las k_{α} determinadas por Arrhenius para 40°C .

Como se observa las constantes cinéticas aumentaron al incrementar la energía de activación E_{A1} . El menor valor de \mathfrak{F}_{Obj} para 40°C fue 0.17366 y está asociado a una energía de activación de 0.10eV como se muestra en la Tabla C.2.

En la figura C.2 se observa que la curva simulada con una energía de activación de 0.10eV difiere en menor cantidad de la curva experimental, lo contrario ocurre con la curva simulada con $E_{A1} = 0.15\text{eV}$ cuyo error es de $\sim 32\%$.

C.2. Resumen de los parámetros encontrados

Temperatura		$k_1 \left[\frac{1}{ms} \right]$			$k_2 \left[\frac{1}{ms} \right]$			$k_3 \left[\frac{1}{ms} \right]$			Observación
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	
20[°C]	Valor	1.31682			0.12499			0.00817			Validación
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.01660									
25[°C]	Valor	1.78508			0.13066			0.00963			Esquema 1
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.01835									
25[°C]	Valor	1.7480			0.1047			0.0137			Esquema 2
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.025731									
30[°C]	Valor	1.25153	1.22002	1.50051	0.12498	0.12512	0.15006	0.01293	0.01148	0.01161	Validación
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.02694	0.05953	0.08040	0.02694	0.05953	0.08040	0.02694	0.05953	0.08040	
40[°C]	Valor	1.27726	1.49982	1.69561	0.11100	0.12496	0.17807	0.01367	0.01220	0.01615	Validación
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.03090	0.06393	0.17371	0.03090	0.06393	0.17371	0.03090	0.06393	0.17371	

Tabla C.3: Constantes cinéticas encontradas con diferentes métodos: *a)* Ajuste global de las curvas, *b)* Ajuste parcial usando parámetros constantes y *c)* Ecuación de Arrhenius.

Temperatura		p_1			p_2			p_3			Observación
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	
20[°C]	Valor	0.27467			0.26510			0.49604			Validación
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.01660									
25[°C]	Valor	0.13672			0.24497			0.62480			Esquema 1
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.01835									
25[°C]	Valor	0.3951			0.3420			0.6233			Esquema 2
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.025731									
30[°C]	Valor	0.26726	0.27658	0.27467	0.18727	0.26496	0.26510	0.71630	0.49926	0.49604	Validación
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.02694	0.04118	0.08040	0.02694	0.04118	0.08040	0.02694	0.04118	0.08040	
40[°C]	Valor	0.28156	0.26860	0.27467	0.06236	0.41324	0.26510	0.74997	0.49521	0.49604	Validación
	$\tilde{\mathfrak{F}}_{Obj}$	0.03090	0.05100	0.17371	0.03090	0.05100	0.17371	0.03090	0.05100	0.17371	

Tabla C.4: Parámetros de conectividad encontrados con diferentes métodos: *a)* Ajuste global de las curvas, *b)* Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros variables; y *c)* Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros constantes.

Temperatura		a_1			a_2			a_3			Obs.
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	
20[°C]	Valor	1.98810			1.07030			0.61373			Validación
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.01660									
25[°C]	Valor	1.71300			1.56452			0.79651			Esquema 1
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.01835									
25[°C]	Valor	1.2640			1.7176			0.5648			Esquema 2
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.025731									
30[°C]	Valor	1.98430	1.86810	1.98810	1.21087	1.20111	1.07030	0.38020	0.62472	0.61373	Validación
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.02694	0.04118	0.08040	0.02694	0.04118	0.08040	0.02694	0.04118	0.08040	
40[°C]	Valor	1.95959	1.84872	1.98810	1.43706	1.02899	1.07030	0.34143	0.55464	0.61373	Validación
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.03090	0.05100	0.17371	0.03090	0.05100	0.17371	0.03090	0.05100	0.17371	

Tabla C.5: Pesos estadísticos encontrados con diferentes métodos: *a)* Ajuste global de las curvas, *b)* Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros variables; y *c)* Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros constantes.

Temperatura		q_{OJ}			q_{JI}			Observación
		a	b	c	a	b	c	
20[°C]	Valor	0.98698			0.96474			Validación
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.01660						
25[°C]	Valor	0.97889			0.93673			Esquema 1
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.01835						
25[°C]	Valor	0.9610			0.9434			Esquema 2
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.025731						
30[°C]	Valor	0.99035	0.99733	0.98698	0.94978	0.99687	0.96474	Validación
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.02694	0.04118	0.08040	0.02694	0.04118	0.08040	
40[°C]	Valor	0.94906	0.98754	0.98698	0.96237	0.99993	0.96474	Validación
	\mathfrak{F}_{Obj}	0.03090	0.05100	0.17371	0.03090	0.05100	0.17371	

Tabla C.6: Concentraciones q_{OJ} y q_{JI} encontrados con diferentes métodos: *a)* Ajuste global de las curvas, *b)* Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros variables; y *c)* Ajuste parcial usando constantes cinéticas de Arrhenius y parámetros constantes.