

**ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**

FACULTAD DE CIENCIAS

FLUORESCENCIA INDUCIDA EN HOJAS DE  
ESPINACA SUJETAS A DESHIDRATACIÓN

TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE FÍSICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

ERIKA TATIANA QUILCA POTOSÍ

`erika.quilca@epn.edu.ec`

Director: MARCO VINICIO BAYAS REA

`marco.bayas@epn.edu.ec`

QUITO, NOVIEMBRE 2021

## DECLARACIÓN

Yo, ERIKA TATIANA QUILCA POTOSÍ, declaro bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de mi autoría, 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 normativa institucional vigente.

---

Erika Tatiana Quilca Potosí

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por ERIKA TATIANA  
QUILCA POTOSÍ, bajo mi supervisión.

---

Marco Vinicio Bayas Rea, Ph D.

Director del Proyecto

## AGRADECIMIENTO

A mi tutor Dr. Marco Bayas, por su interminable paciencia, sus sabios consejos y los conocimientos compartidos durante la realización de este trabajo.

Por su infinito amor y la confianza brindada quiero agradecer principalmente a mis padres, Ilda y Luis, quienes con su sacrificio y trabajo agotador me brindaron toda la ayuda necesaria durante estos años creyendo en mí, incluso en las ocasiones que yo no lo hice. Siendo ellos quienes han permanecido a mi lado en todo momento especialmente en una de las épocas más difíciles de mi vida, por haberme cuidado y alentado a continuar con mi carrera universitaria hasta finalizarla. Les estoy infinitamente agradecida.

A mis hermanos Nataly y Luis Felipe a quienes amo; por todas las alegrías y tristezas compartidas, quienes en ocasiones han soportado mi mal carácter y sin embargo se han mantenido a mi lado brindandome su ayuda, apoyo y todo su amor. Sé que al igual que yo ustedes también lograrán cumplir sus sueños y anhelos.

A mis tíos, María, Franklin y Blanca por sus muestras de cariño y apoyo incondicional. A mis primas y amigas: Katherin, Joselyn, Paola y Victoria por todas la aventuras, las largas pláticas y por la ayuda brindada en todo momento.

Finalmente, a mi amiga Criss con quien he contado desde que la conocí por todos los momentos compartidos; de igual manera a su familia por su apoyo en incontables ocasiones.

## DEDICATORIA

*A mis padres y hermanos, a quienes amo más que a nadie.*

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>4</b>
2.1. Fundamentos Biofísicos . . . . .	4
2.1.1. Cadena de Transporte de Electrones . . . . .	5
2.1.2. Fluorescencia Inducida de Clorofila <i>a</i> . . . . .	7
2.1.3. Modelo $Q_A$ y sus limitaciones . . . . .	8
2.2. Modelo Estocástico para la Fluorescencia Inducida . . . . .	9
2.2.1. Evolución de $q(t)$ . . . . .	11
<b>3. Metodología</b>	<b>14</b>
3.1. Curvas Experimentales . . . . .	14
3.1.1. Preparación y elección de hojas . . . . .	14
3.1.2. Medidor de Fluorescencia . . . . .	15
3.2. Experimentos . . . . .	16
3.2.1. Ajustes de las Curvas Experimentales . . . . .	18
3.2.2. Chi-Cuadrado . . . . .	20
3.2.3. Desviación Cuadrática entre Curvas Experimentales . . . . .	22
<b>4. Resultados</b>	<b>23</b>
4.1. Experimento 1 . . . . .	23
4.2. Experimento 2 . . . . .	27
4.3. Experimento 3 . . . . .	31
4.4. Comparación entre Experimentos . . . . .	34
4.4.1. Constantes Cinéticas . . . . .	34

4.4.2. Parámetros de Conectividad . . . . .	36
4.4.3. Pérdida de masa . . . . .	37
<b>5. Conclusiones</b>	<b>38</b>
<b>A. Curvas Experimentales</b>	<b>47</b>
<b>B. Código de Simulación</b>	<b>49</b>
<b>C. Tablas Ajustes por Regiones</b>	<b>57</b>
C.1. Experimento 1 . . . . .	57
C.1.1. Día 1 . . . . .	57
C.1.2. Día 2 . . . . .	57
C.2. Experimento 2 . . . . .	58
C.2.1. Día 1 . . . . .	58
C.2.2. Día 2 . . . . .	58
C.2.3. Día 3 . . . . .	58
C.3. Experimento 3 . . . . .	59
C.3.1. Día 1 . . . . .	59
C.3.2. Día 2 . . . . .	59
C.3.3. Día 3 . . . . .	59
C.3.4. Día 4 . . . . .	60
<b>D. Tablas Ajustes Completos</b>	<b>61</b>
D.1. Experimento 1 . . . . .	62
D.1.1. Día 1 . . . . .	62
D.1.2. Día 2 . . . . .	63
D.2. Experimento 2 . . . . .	64
D.2.1. Día 1 . . . . .	64
D.2.2. Día 2 . . . . .	65
D.2.3. Día 3 . . . . .	66
D.3. Experimento 3 . . . . .	67
D.3.1. Día 1 . . . . .	67
D.3.2. Día 2 . . . . .	68

D.3.3. Día 3 . . . . .	69
D.3.4. Día 4 . . . . .	70



# Índice de figuras

2.1. Estructura de un cloroplasto . . . . .	4
2.2. Esquema del flujo de electrones en la membrana tilacoide. . . . .	5
2.3. Regiones de la curva de fluorescencia inducida de clorofia <i>a</i> . La curva fue obtenida de una hoja de espinaca en condiciones fisiológicas normales en el laboratorio de Biofísica del departamento de Física. . . . .	7
3.1. Secado en la cámara de flujo. . . . .	14
3.2. Esquema Experimental . . . . .	16
3.3. Montaje experimental: (a) 1. Unidad de Control del MCPAM, 2. Emisor, 3. Detector, 4. Hoja 1, 5. Hoja 2, 6. Placa Metálica con Resistencias de Potencia, 7. Termómetro. (b) Adaptación a la oscuridad. . . . .	16
3.4. Curvas de Fluorescencia Experimentales . . . . .	17
3.5. Esquema para generar $F(t)$ siguiendo el modelo estocástico. . . . .	19
4.1. (a) Curvas de fluorescencia experimentales, primeras y últimas mediciones de cada día. (b) Evolución en el tiempo de la separación entre las curvas experimentales. Experimento 1. . . . .	23
4.2. Curvas de Fluorescencia Experimentales y Simuladas, Experimento 1. . . . .	24
4.3. Evolución en el tiempo de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de las curvas completas, Experimento 1. . . . .	25
4.4. Evolución en el tiempo de la pérdida de masa en la hoja, Experimento 1. . . . .	26

4.5. (a) Curvas de fluorescencia experimentales, primeras y últimas mediciones de cada día. (b) Evolución en el tiempo de la separación entre las curvas experimentales. Experimento 2.	27
4.6. Curvas de Fluorescencia Experimentales y Simuladas, Experimento 2. . . . .	28
4.7. Evolución en el tiempo de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de las curvas, Experimento 2. La ausencia de puntos en las figuras c, f e i son debido a la pérdida de agua en la hoja. . . . .	29
4.8. Evolución en el tiempo de la pérdida de masa en la hoja, Experimento 2. . . . .	30
4.9. (a) Curvas de fluorescencia experimentales, primeras y últimas mediciones de cada día. (b) Evolución en el tiempo de la separación entre las curvas experimentales. Experimento 3.	31
4.10. Curvas de Fluorescencia Experimentales y Simuladas, Experimento 3. . . . .	32
4.11. Evolución en el tiempo de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de las curvas completas, Experimento 3. La ausencia de puntos en las figuras c, f e i son debido a la pérdida de agua en la hoja. . . . .	33
4.12. Evolución en el tiempo de la pérdida de masa en la hoja, Experimento 3. . . . .	34
4.13. Evolución en el tiempo de las constantes cinéticas, Experimentos: 1, 2 y 3. La ausencia de puntos es debido a la pérdida de agua. . . . .	35
4.14. Evolución en el tiempo de los parámetros de conectividad, Experimentos: 1, 2 y 3. La ausencia de puntos es debido a la pérdida de agua. . . . .	36
4.15. Comparación Pérdida Masa. Experimentos: 1, 2 y 3. . . . .	37
A.1. Todas las curvas obtenidas en el Experimento 1. . . . .	47
A.2. Todas las curvas obtenidas en el Experimento 2. . . . .	47

A.3. Todas las curvas obtenidas en el Experimento 3. . . . . 48

# Índice de tablas

C.1. Ajustes por Regiones, Experimento 1: medida 1 día 1. . . . .	57
C.2. Ajustes por Regiones, Experimento 1: medida 1 día 2. . . . .	57
C.3. Ajustes por Regiones, Experimento 2: medida 1 día 1. . . . .	58
C.4. Ajustes por Regiones, Experimento 2: medida 1 día 2. . . . .	58
C.5. Ajustes por Regiones, Experimento 2: medida 1 día 3. La ausencia de puntos en la región IP es debido a la pérdida de agua. . . . .	58
C.6. Ajustes por Regiones, Experimento 3: medida 1 día 1. . . . .	59
C.7. Ajustes por Regiones, Experimento 3: medida 1 día 2. La ausencia de puntos en la región IP es debido a la pérdida de agua. . . . .	59
C.8. Ajustes por Regiones, Experimento 3: medida 1 día 3. La ausencia de puntos en la región IP es debido a la pérdida de agua. . . . .	59
C.9. Ajustes por Regiones, Experimento 3: medida 1 día 4. La ausencia de puntos en la región IP es debido a la pérdida de agua. . . . .	60
D.1. Ajustes Curvas Completas, Experimento 1, día 1. . . . .	62
D.2. Ajustes Curvas Completas, Experimento 1, día 2. . . . .	63
D.3. Ajustes Curvas Completas, Experimento 2, día 1. . . . .	64
D.4. Ajustes Curvas Completas, Experimento 2, día 2. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua. . . . .	65
D.5. Ajustes Curvas Completas, Experimento 2, día 3. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua. . . . .	66

D.6. Ajustes Curvas Completas, Experimento 3, día 1. . . . .	67
D.7. Ajustes Curvas Completas, Experimento 3, día 2. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua.	68
D.8. Ajustes Curvas Completas, Experimento 3, día 3. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua.	69
D.9. Ajustes Curvas Completas, Experimento 3, día 4. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua.	70

# Resumen

En este trabajo se obtuvieron curvas de fluorescencia inducida de clorofila  $a$  de hojas de espinaca sujetas a deshidratación a  $25^{\circ}\text{C}$ . Los resultados experimentales encontrados mostraron que, debido a la pérdida de agua en las hojas, las curvas de fluorescencia se desplazaron hacia valores superiores de fluorescencia. Además, se encontró que existe un umbral en la pérdida de masa asociada a la deshidratación sobre el cual los efectos de la deshidratación son significativos ya que, si la hoja pierde más del 20% de su masa, la región IP no está presente en las curvas de fluorescencia inducida. Adicionalmente, se realizó el ajuste de las curvas experimentales usando una variante del modelo estocástico propuesto en trabajos anteriores. Para este estudio se consideró directamente la contribución de los parámetros de conectividad ( $p_{\alpha}$ ) y no como parte de los pesos estadísticos. Con el cambio realizado se obtiene que si  $p_{\alpha}$  es igual a 1, entonces la región asociada a un dominio específico estará ausente. De hecho, en este trabajo se encontró, con valores de  $\overline{\chi^2}$  menores a 4, que el parámetro de conectividad asociado a la región IP ( $p_3$ ) tomó valores cercanos a 1 ( $0.94 \pm 0.051$ ), lo cual es consistente con las curvas experimentales obtenidas, en donde la región IP no está presente, incluso este parámetro únicamente aumentó a medida que la hoja perdió agua.

# Abstract

In this work, chlorophyll *a* fluorescence induction curves were obtained from spinach leaves subjected to dehydration at 25 ° C. The experimental results found showed that due to the loss of water in the leaves, the fluorescence curves shifted towards higher fluorescence values. In addition, it was found that there is a threshold in the loss of mass above which the effects of dehydration are significant. If the leaf loses more than 20 % of its mass, the IP region is not present in induced fluorescence curves. Additionally, the fitting of the experimental curves was carried out using a variant of the stochastic model proposed in previous works. For this study, the contribution of the connectivity parameters ( $p_\alpha$ ) was considered directly and not as part of the statistical weights. With the change made, it was obtained that if  $p_\alpha$  is equal to 1 then the region associated with a specific domain is absent. In fact, in this work it was found with values of  $\overline{\chi^2}$  less than 4 that the connectivity parameter associated with the IP region ( $p_3$ ) took values close to 1 ( $0.94 \pm 0.051$ ) which is consistent with the experimental curves obtained, where the IP region is not present. Importantly, this parameter only increased as the leaf loses water.

# Capítulo 1

## Introducción

La fluorescencia inducida de clorofila  $a$  en hojas vegetales provee información sobre el aparato fotosintético y el estado fisiológico de las plantas. Esta se obtiene al mantener una hoja en la oscuridad durante varios minutos y después es expuesto a la luz entonces se produce un aumento repentino de la fluorescencia de clorofila seguido de una disminución lenta de la misma [1, 2, 4]. Numerosos estudios han demostrado que tal fluorescencia está relacionada con la actividad del llamado fotosistema II (PSII) [1 - 4]. La curva que describe la evolución en el tiempo de la fluorescencia inducida presenta tres regiones características denominadas: OJ, JI e IP, por tal razón se la conoce como curva OJIP [3, 5]. También se la conoce como curva Kautsky quien la describió por primera vez en 1931.

Es conveniente agregar que la fluorescencia es uno de los mecanismos de desexcitación de las hojas. En condiciones normales la mayor parte de la energía absorbida se usa en los procesos asociados a la fotosíntesis, por lo cual, el rendimiento de la fluorescencia es bajo; pero cuando una hoja adaptada a la oscuridad se ilumina simultáneamente con luz visible y con un pulso de luz saturado provocando que todos los centros de reacción del PSII se cierren este rendimiento es máximo [2, 3, 9, 10].

Varios modelos para la fluorescencia inducida han sido propuestos, sin em-



bargo, ninguno logra explicar satisfactoriamente todas las características de las curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a* [2, 11]. El modelo con mayor aceptación es el propuesto por Duysens y Sweers, denominado modelo  $Q_A$ , mismo que sostiene que el aumento de la fluorescencia desde un valor mínimo ( $F_0$ ) hasta un valor máximo ( $F_M$ ) se debe únicamente a la reducción de la llamada Quinona A ( $Q_A$ ) [1, 2, 11]. A pesar de que este modelo explica de forma apropiada la actividad fotoquímica del PSII, se han encontrado algunas inconsistencias entre este modelo y las curvas experimentales [11]. Además, el modelo  $Q_A$  no explica el comportamiento de la fluorescencia inducida asociados a cambios en la temperatura o en el contenido de agua [2, 11].

Debido a estas inconsistencias en trabajos anteriores: [12,13] se ha utilizado un modelo estocástico, para analizar el comportamiento de las curvas de fluorescencia. Este modelo propone que cada región de la curva Kautsky está asociada a la actividad de dominios fotosintéticos específicos. Además, considera la existencia de cambios conformacionales que determinan la actividad de estos dominios. A pesar de que, se ha podido demostrar la utilidad de este modelo para explicar el comportamiento de la fluorescencia inducida con la temperatura [12, 13], no se han estudiado los cambios provocados en la fluorescencia debido a la deshidratación y si dichos cambios pueden ser explicados mediante este modelo.

Este estudio surge de la necesidad de analizar la capacidad del modelo estocástico planteado para describir la emisión de fluorescencia inducida bajo diversas condiciones experimentales, considerando que el aparato fotosintético es el primer objetivo de tensiones tales como: exceso de energía, temperaturas altas, deficiencia de nutrientes, enfermedades foliares, resistencia al frío, sequia, etc. La medición de fluorescencia inducida de clorofila *a* es una herramienta valiosa para evaluar cómo estas limitaciones afectan los diferentes mecanismos fisiológicos y el rendimiento del aparato fotosintético

[6-8]; por lo que, el efecto de la deshidratación en hojas de espinaca puede cuantificarse con ayuda de las curvas de fluorescencia inducida.

En este trabajo se analizaron curvas de fluorescencia inducida de clorofila  $a$  obtenidas de hojas de espinaca con diferentes grados de deshidratación a 25°C. Para esto se utilizó una variante del modelo estocástico utilizado en los trabajos de Villagomez [12] y Ludeña [13]. Los resultados del análisis corroboran la validez del modelo estocástico para explicar el origen de las curvas de fluorescencia.

# Capítulo 2

## Marco Teórico

### 2.1. Fundamentos Biofísicos

La fotosíntesis es un proceso físico-químico que ocurre en plantas, algas y algunas bacterias, y convierte la energía solar absorbida en compuestos orgánicos complejos. Este proceso ocurre en los cloroplastos, los cuales son orgánulos celulares delimitados por una doble membrana (membrana externa e interna). Además, contienen estructuras denominadas granas formadas por sacos en forma de discos apilados conocidos como tilacoides (Figura 2.1) [3, 15, 16].

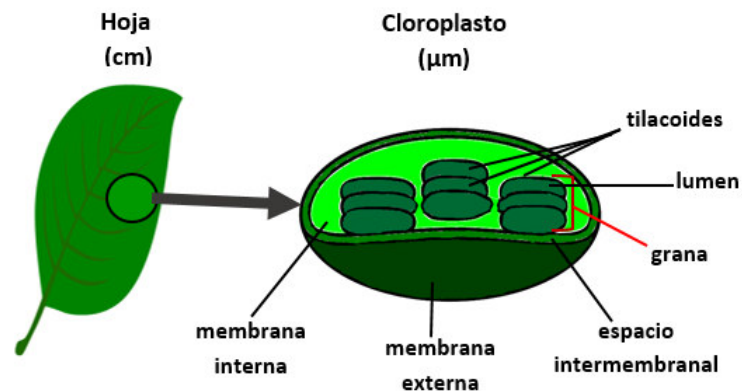


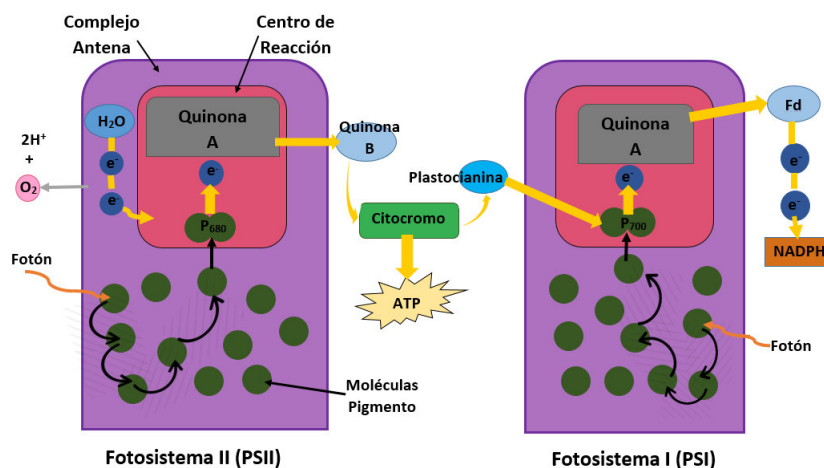
Figura 2.1: Estructura de un cloroplasto

Los tilacoides son estructuras membranales cerradas que contienen los siguientes complejos proteínicos: complejo antena (LHC), complejo ATP

sintasa, fotosistema I (PSI), fotosistema II (PSII) y citocromo  $b_6/f$ , los cuales son fundamentales en la llamada fase luminosa de la fotosíntesis [3, 15]. Los fotosistemas PSI y PSII contienen centros de reacción en donde se encuentran los pigmentos (clorofila  $a$ , clorofila  $b$ , etc) y numerosas proteínas. Además, estos dos fotosistemas junto con el citocromo  $b_6/f$  son los componentes principales necesarios para la cadena de transporte de electrones desde el agua hasta el elemento oxidante  $NADP^+$  "Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate" [3, 15, 17].

El PSII contiene un complejo antena captador de luz (LHCII), el cual no está expuesto al estroma (parte exterior acuosa de la membrana fotosintética), mientras que, el PSI, el citocromo  $b_6/f$  y el complejo ATP sintasa están en contacto con el estroma [3]; bajo condiciones normales el flujo de electrones va desde el fotosistema II a través del complejo citocromo  $b_6/f$  hacia el fotosistema I [3, 15-17].

### 2.1.1. Cadena de Transporte de Electrones



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

Cuando una molécula de clorofila (Chl) del complejo antena absorbe un fotón, se excita, es así que, la energía se transfiere entre los complejos antena en forma de excitones. Este proceso se prolonga hasta llegar al centro

de reacción fotosintético donde se encuentra un par de moléculas de Chl conocidas como  $P_{680}$ . Cabe señalar que  $P_{680}$  es una molécula de clorofila *a* con absorción máxima en 680 nm, de ahí su nombre [3, 8, 15]. A su vez, el electrón se transfiere desde  $P_{680}^*$  (primer estado singlete excitado de  $P_{680}$ ) hasta un aceptor intermedio, la feofitina (Pheo), luego se transfiere rápidamente al aceptor primario llamado quinona  $Q_A$ . Por ello, se crea un oxidante altamente activo,  $P_{680}^+$  [3, 8, 15].

Simultáneamente, dos moléculas de agua se oxidan para extraer cuatro electrones, los cuales se transfieren al  $P_{680}^+$  reemplazando los transferidos a la quinona  $Q_A$ , mientras tanto se produce una molécula de oxígeno y se liberan protones en el lumen de la membrana tilacoidal [16]. La plastoquinona  $Q_A$  se reduce, el electrón fotoexcitado a través de la quinona  $Q_B$  pasa desde el PSII a un nivel más bajo de energía en el PSI, obteniendo así, un centro de reacción abierto cuya configuración se define más adelante [15].

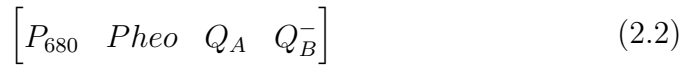
El proceso anterior se realiza hasta que  $Q_B$  tenga dos electrones, posteriormente, cuando  $Q_B$  se reduce a la forma  $Q_B^{2-}$  se protoniza, tomando protones del estroma generando el plastoquinol  $PQH_2$ , luego los productos se transfieren al citocromo  $b_6/f$  [3, 15].

La serie de reacciones redox (oxidación y reducción) anteriores da lugar a la cadena de transporte de electrones fotosintética (Figura 2.2), la misma que provoca la regeneración de los portadores de electrones y la creación de un gradiente de protones para obtener adenosín trifosfato (ATP) [3, 16].

Existen dos estados en los que los centros de reacción pueden estar: abierto o cerrado. Un centro de reacción cerrado posee la siguiente configuración [15]:

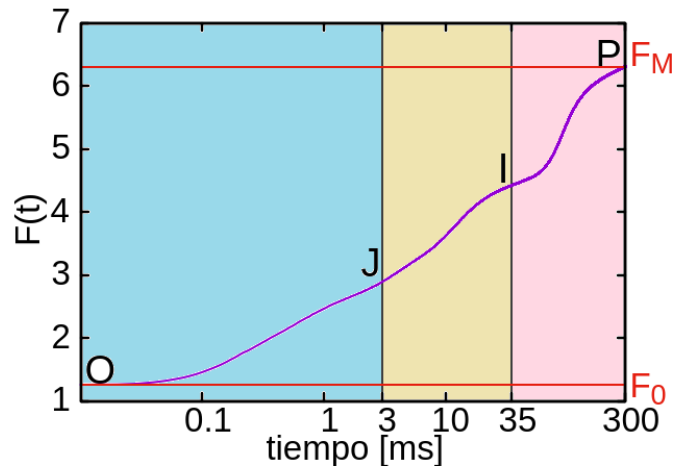
$$\left[ P_{680} \quad Pheo \quad Q_A^- \quad Q_B \right] \quad (2.1)$$

Por otro lado, un centro de reacción abierto presenta la siguiente configuración [15]:



### 2.1.2. Fluorescencia Inducida de Clorofila $a$

La emisión de fluorescencia inducida proviene principalmente de la desexcitación de las moléculas de clorofila  $a$  del centro de reacción del fotosistema II. Se obtiene cuando un organismo fotosintético se mantiene en oscuridad alrededor de 30 minutos y después se expone a luz visible mientras un pulso de luz cierra los centros de reacción, en ese momento, se produce un aumento repentino de la fluorescencia de la clorofila, seguido de una disminución lenta de la misma; a este fenómeno se lo conoce como *Efecto de Kautsky* [3, 9, 15, 17].



**Figura 2.3:** Regiones de la curva de fluorescencia inducida de clorofila  $a$ . La curva fue obtenida de una hoja de espinaca en condiciones fisiológicas normales en el laboratorio de Biofísica del departamento de Física.

Un aumento en la emisión fluorescente de clorofila en el tiempo pasa por varias etapas, depende del desempeño adecuado de los aceptores y donantes en el transporte de electrones y de una eficiente comunicación entre los centros de reacción del PSII [3]. La Figura 2.3 muestra las tres regiones principales de la curva de fluorescencia, cada región tiene una duración característica: O-J de 0 hasta  $\sim 3$  ms, J-I de  $\sim 3$  a  $\sim 30$  ms e I-P de  $\sim 30$  a

$\sim 300$  ms. Al inicio de la exposición de la luz comienza el tiempo  $t = 0$  [3, 18-20, 23]. Es decir, los anchos característicos de las regiones OJ, JI e IP son del orden  $10^0$ ms,  $10^1$ ms y  $10^2$ ms, respectivamente.

La región O-J también se conoce como fase fotoquímica, debido a que, está asociada a la reducción gradual de quinona  $Q_A$ . Por otra parte, la región J-I-P se conoce como fase térmica por su sensibilidad a los cambios de temperatura, refleja principalmente una reducción secuencial de las quinonas B (en la región JI) y se enlaza con el flujo de electrones hacia la quinona A del PSI (en la región IP) [8, 9, 11].

### **Efecto de la Deshidratación**

Varios factores estresantes abióticos pueden afectar directa o indirectamente la actividad fotosintética de las hojas y cambiar la cinética de la clorofila  $a$  [3, 36]. El PSII es bastante resistente al estrés hídrico pero su influencia en las reacciones fotoquímicas se manifiesta solo bajo estrés severo [3, 27]. El umbral de déficit de agua estimado es del 30% en una hoja, por encima del cual los procesos bioquímicos se verán afectados significativamente [3, 38].

El estrés por sequía conduce a una reducción del número de centros de reacción funcionales, así como una disminución en el transporte de electrones [3, 22-27]. Estos efectos provocan una restricción en el lado aceptor del PSI, el cual está directamente relacionado con la región IP, por ello, esta región tiende a desaparecer bajo este tipo de estrés. Sin embargo, el grado de pérdida de la región IP depende de la variedad de la planta y su tolerancia a la sequía [3, 26, 32-38].

### **2.1.3. Modelo $Q_A$ y sus limitaciones**

El modelo  $Q_A$  fue propuesto por Duysens y Sweeres en 1963 [2, 28], este modelo y sus variantes explican la mayoría de las características de la

curva Kautsky. La suposición principal del modelo  $Q_A$  es 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  $Q_A$  y a la transferencia de energía de excitación entre las unidades fotosintéticas dentro de los fotosistemas [2, 11].

Una de las limitaciones del modelo  $Q_A$  es que no permite explicar la variación de fluorescencia ocasionada por la temperatura [11, 28]. Las limitaciones encontradas en el modelo  $Q_A$  sugieren [17] que el rendimiento de la fluorescencia no solo está asociada únicamente a la reducción de  $Q_A$  sino también por procesos adicionales como: cambios conformacionales en las proteínas de las unidades fotosintéticas, inducidos por la luz [29] y la heterogeneidad de los centros de reacción del PSII [17].

## 2.2. Modelo Estocástico para la Fluorescencia Inducida

El modelo utilizado para describir la evolución temporal de la fluorescencia inducida es una extensión del modelo propuesto originalmente por Paillotin [1, 30]. Este último, caracteriza mediante el parámetro de conectividad  $p$  el movimiento de excitación entre las diferentes unidades del PSII, considerando que no están aisladas sino agrupadas en dominios con cuatro centros de reacción, los cuales dependiendo del estado de oxidación de  $Q_A$  pueden estar abiertos o cerrados. En el modelo de Paillotin el rendimiento de la fluorescencia  $r$  y la concentración de centros de reacción cerrados  $q(t)$  están relacionados de la siguiente manera [1, 30]:

$$r = \frac{(1-p)q(t)}{1-pq(t)} \quad (2.3)$$

Por otro lado, el valor del rendimiento macroscópico experimental de la fluorescencia se obtiene conociendo los valores mínimo y máximo de fluo-



rescencia,  $F_0$  y  $F_M$  respectivamente, así [12, 13]:

$$r = \frac{F(t) - F_0}{F_m - F_0} \quad (2.4)$$

Igualando las ecuaciones 2.3 y 2.4 se tiene que:

$$\frac{(1-p)q(t)}{1-pq(t)} = \frac{F(t) - F_0}{F_m - F_0} \quad (2.5)$$

Entonces, de la ecuación 2.5 se obtiene la expresión que describe la evolución temporal de la fluorescencia inducida, en el modelo de Paillotin.

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

donde  $\Delta F = (F_m - F_0)$ .

Considerando que existen tres regiones en una curva Kautsky se plantea la existencia de tres tipos de dominios fotosintéticos asociados a una transición y a una región específica de la curva [12, 13]. Entonces, considerando 2.6, se obtiene:

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

Donde  $p_{\alpha}$  es el parámetro de conectividad del dominio  $\alpha$  y  $q_{\alpha}$  es la fracción de centros de reacción cerrados en el dominio  $\alpha$ .  $\Delta F_{\alpha}$  es el rango de fluorescencia asociado a la actividad del dominio  $\alpha$ .

La expresión (2.7) para  $F(t)$  difiere de aquella utilizada en los trabajos de Villagómez [12] y Ludeña [13], en los cuales la ecuación empleada para determinar la evolución de la fluorescencia en función del tiempo es:

$$F(t) = F_0 + \sum_{\alpha=1}^3 a_{\alpha} \frac{q_{\alpha}(t)}{1-p_{\alpha}q_{\alpha}(t)} \quad (2.8)$$

En (2.8) se considera al parámetro  $p_{\alpha}$  como parte de los pesos estadísticos según la relación  $a_{\alpha} = (F_m - F_0)(1 - p_{\alpha})$ .

La ventaja de utilizar la expresión (2.7) es la posibilidad de modelar la

desaparición de una o más regiones en la curva de fluorescencia. Esto ocurre cuando  $p_\alpha$  es igual a 1. La evolución de la fluorescencia descrita por las ecuaciones 2.7 y 2.8 está determinada por la evolución de  $q(t)$ . Esta última se encuentra simulando la ocurrencia estocástica de las transiciones de los centros de reacción en cada dominio. Por esta razón, el modelo se lo ha denominado estocástico.

### 2.2.1. Evolución de $q(t)$

Para cada dominio fotosintético, los centros de reacción pueden estar en los estados abiertos ( $N_{A\alpha}$ ) o cerrados ( $N_{B\alpha}$ ) los cuales se relacionan según:



Las transiciones del tipo 2.9 son consideradas como cambios conformacionales [12], siendo  $k_\alpha$  la constante cinética asociada a la transición en un dominio tipo  $\alpha$  ( $\alpha = 1, 2, 3$ ). Además, en el tiempo  $dt$  la probabilidad de que la transición ocurra viene dada por  $k_\alpha dt$ . Por otro lado, las configuraciones de las conformaciones pueden ser de dos tipos: inactiva si el centro de reacción está abierto y activa si el centro de reacción está cerrado.

Si consideramos que inicialmente todos los centros de reacción ( $N$ ) están abiertos, entonces:

$$N_{A1} = N_{A2} = N_{A3} = N$$

$$N_{B1} = N_{B2} = N_{B3} = 0$$

La primera transición está asociada a la región OJ y está dada como:



La segunda transición tiene lugar cuando el tiempo es mayor a un valor umbral  $T_1$ :



La constante cinética asociada a esta transición está dada por:

$$k_2 = \begin{cases} 0 & \text{si } t < T_1 \\ k_2 & \text{si } t \geq T_1 \end{cases} \quad (2.12)$$

Por otro lado, la tercera transición ocurre cuando el tiempo es mayor al valor umbral  $T_2$ ; siendo  $T_1 < T_2$ :



La constante cinética está dada por:

$$k_3 = \begin{cases} 0 & \text{si } t < T_2 \\ k_3 & \text{si } t \geq T_2 \end{cases} \quad (2.14)$$

Los tiempos umbrales  $T_1$  y  $T_2$  delimitan la primera y segunda región de la curva Kautsky respectivamente.

Considerando la cinética propuesta para los dominios fotosintéticos, la evolución temporal del número de dominios abiertos  $N_{A\alpha}$  puede simularse con ayuda del algoritmo de Gillespie [31, 32]. En este algoritmo, el tiempo en el que se produce una transición tipo 2.9 está dada por:

$$\tau_\alpha = \frac{1}{k_\alpha N_{A\alpha}} \cdot \ln \left( \frac{1}{r_\alpha} \right) \quad (2.15)$$

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

Después de alcanzar cada tiempo umbral, se comparan los tiempos  $\tau_i$  y  $\tau_j$ , en los que ocurrirían las transiciones  $i$  o  $j$  respectivamente. Para determinar la transición que tendrá lugar, se escoge aquella con el menor valor de  $\tau_\alpha$ .

Una vez que los valores de  $N_{A\alpha}$  y  $N_{B\alpha}$  están determinados se pueden en-

contrar las fracciones de centros de reacción cerrados  $q(t)$ , las mismas que están definidas como:

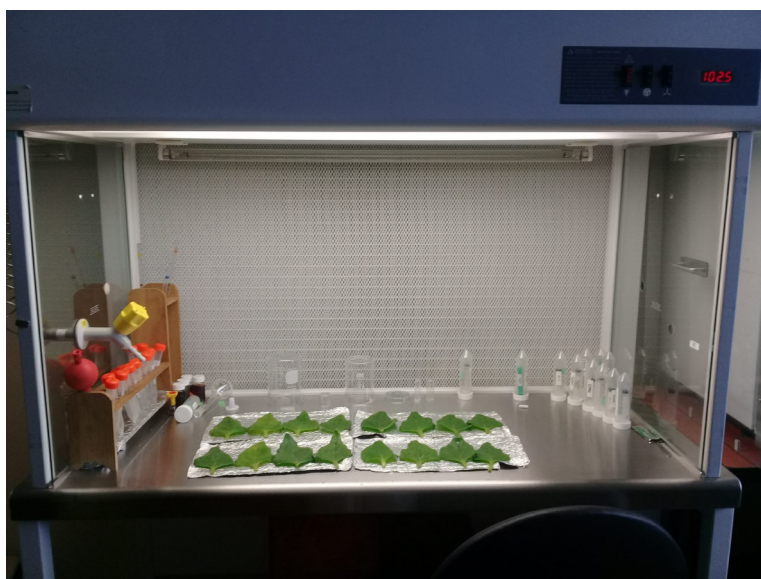
$$q_{\alpha}(t) = \frac{N_{B\alpha}}{N_{A\alpha} + N_{B\alpha}} \quad (2.16)$$

# Capítulo 3

## Metodología

### 3.1. Curvas Experimentales

#### 3.1.1. Preparación y elección de hojas



**Figura 3.1:** Secado en la cámara de flujo.

Se usaron hojas frescas de espinaca cultivadas orgánicamente sin fertilizantes en un huerto familiar. Al momento de cortar las hojas se escogieron las más verdes y aplanadas; en el laboratorio se las lavó y luego se las secó dentro de una cabina de flujo laminar alrededor de 45 minutos (Figura 3.1). Luego, se pesó las hojas y posteriormente se adaptaron a la oscuridad por 10

minutos envolviéndolas con papel aluminio. Después se obtuvo una primera medida de la curva de fluorescencia inducida, la misma que sirvió como criterio para la selección de las hojas.

En caso de que en la curva se observaran las tres regiones principales OJ, JI e IP, que caracterizan a la curva Kautsky como se muestra en la Figura 2.3, la hoja fue seleccionada, caso contrario fue desechada. Finalmente, se seleccionó otra hoja con peso similar a la ya escogida; la primera sirvió para realizar las mediciones de las curvas de fluorescencia; mientras que la segunda hoja sirvió como control de la pérdida de agua asociado a la pérdida de masa.

### **3.1.2. Medidor de Fluorescencia**

Se utilizó un analizador de fluorescencia 'Multiple Excitation Wavelength Chlorophyll Fluorescence' (MC-PAM, Heinz Waltz GmbH, Germany), conjuntamente con el software PAMWIN en un computador Dell con Windows Professional. El equipo nos muestra los cambios relativos de fluorescencia, por lo que las mediciones no tienen unidades específicas, razón por la cual en el tratamiento de los datos se usó unidades arbitrarias (u.a.).

Para inducir la fluorescencia en hojas in vivo se trabajó con luz actínica de 400nm. Es decir, con radiación dentro del rango de longitudes de onda capaces de producir actividad fotosintética. Adicionalmente, se usó un pulso intenso de luz capaz de excitar todos los centros de reacción ocasionando que estos se cierren (pulso saturado de 440nm) y con una intensidad de  $4626 \mu\text{moles}$  de fotones  $m^{-2}s^{-2}$ , estudiando la banda azul de absorción de haces de fluorescencia (440nm). Además se colocó un filtro para evitar la detección de longitudes de onda mayores a 650 nm, como se sugiere en trabajos anteriores [12, 13].

## 3.2. Experimentos

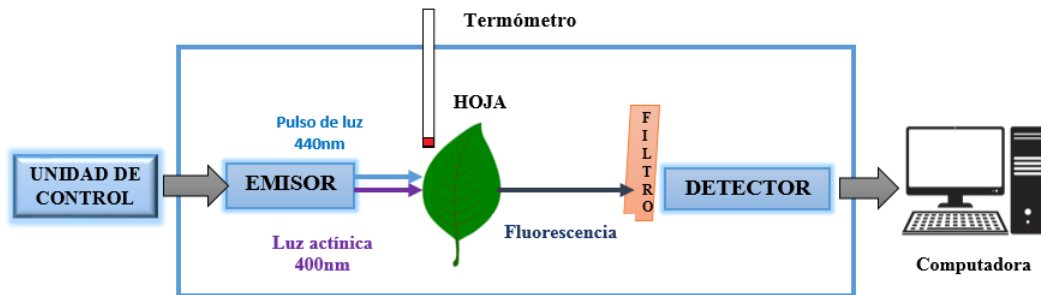
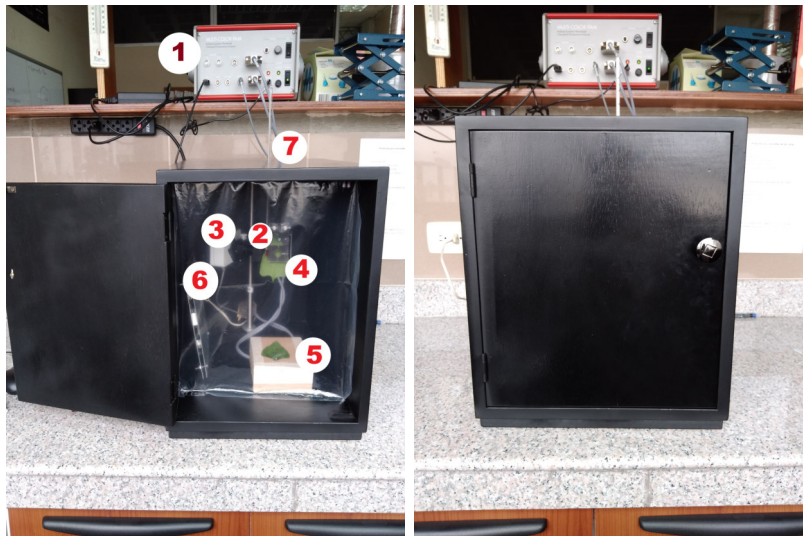


Figura 3.2: Esquema Experimental

La Figura 3.2 muestra el esquema experimental en las mediciones. El recuadro azul representa la caja en donde se colocaron: el emisor, las hojas seleccionadas, el detector y el termómetro. La caja se utilizó para facilitar el control de la temperatura, así como la iluminación de la muestra.



(a) Adaptación luz natural.

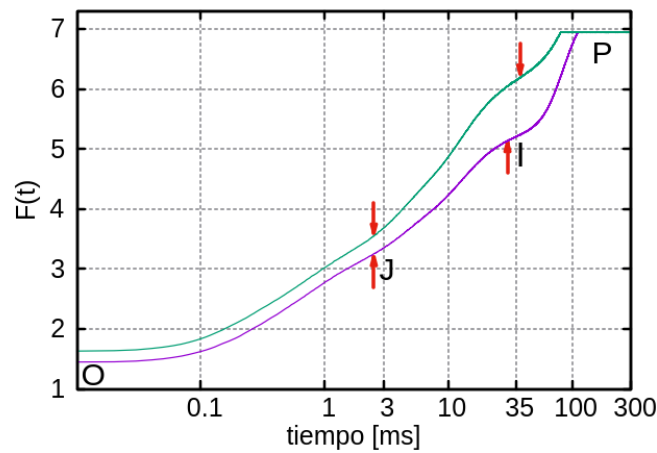
(b) Adaptación a la oscuridad.

Figura 3.3: Montaje experimental: (a) 1. Unidad de Control del MC-PAM, 2. Emisor, 3. Detector, 4. Hoja 1, 5. Hoja 2, 6. Placa Metálica con Resistencias de Potencia, 7. Termómetro. (b) Adaptación a la oscuridad.

Una vez seleccionadas las hojas y configurado el equipo de medición se procedió a pesar las hojas, luego se las colocó dentro de la caja con iluminación natural durante 30 minutos (Figura 3.3a), después al cerrar la caja se adaptaron las hojas a la oscuridad por 30 minutos (Figura 3.3b). Poste-

riormente, en la hoja 1 se realizó la medición de las curvas de fluorescencia, mientras que, en la hoja 2 se realizó el control del peso. Las hojas se mantuvieron en la caja hasta obtener alrededor de 8 mediciones por día, es decir, secuencialmente las hojas se adaptaron: a iluminación natural (30 minutos), a la oscuridad (30 minutos), se tomó la medida de la curva de fluorescencia (hoja 1) y se realizó el control del peso (hoja 2). Por lo tanto, entre cada medida tomada secuencialmente hubo 1 hora de diferencia. Las hojas permanecieron dentro de la caja con la puerta cerrada hasta el siguiente día.

Durante los días posteriores se tomaron medidas con las mismas hojas, siguiendo el mismo procedimiento. Durante el experimento se verificó que la temperatura permaneciera en  $25^{\circ}\text{C}$ , para ello se colocó dentro de la caja un circuito formado de 12 resistencias de potencia conectadas en serie colocadas en medio de dos placas metálicas. Adicionalmente, se colocó un termómetro en la parte superior de la caja, el cual permitió verificar que la temperatura se mantuviera en  $25^{\circ}\text{C}$  como se observa en la Figura 3.3.



**Figura 3.4:** Curvas de Fluorescencia Experimentales

El equipo de medición está configurado para detectar fluorescencia hasta los 300 ms. Sin embargo, durante los experimentos realizados se obtuvieron curvas que presentaron valores constantes después de alcanzar un valor de  $F_M \sim 7$  como en la Figura 3.4, figura representativa de las curvas experi-



mentales, en donde se observa que las curvas se saturan desde  $\sim 80ms$ . Por está razón, al momento de obtener las curvas de fluorescencia teóricas no se consideró los valores de fluorescencia constantes.

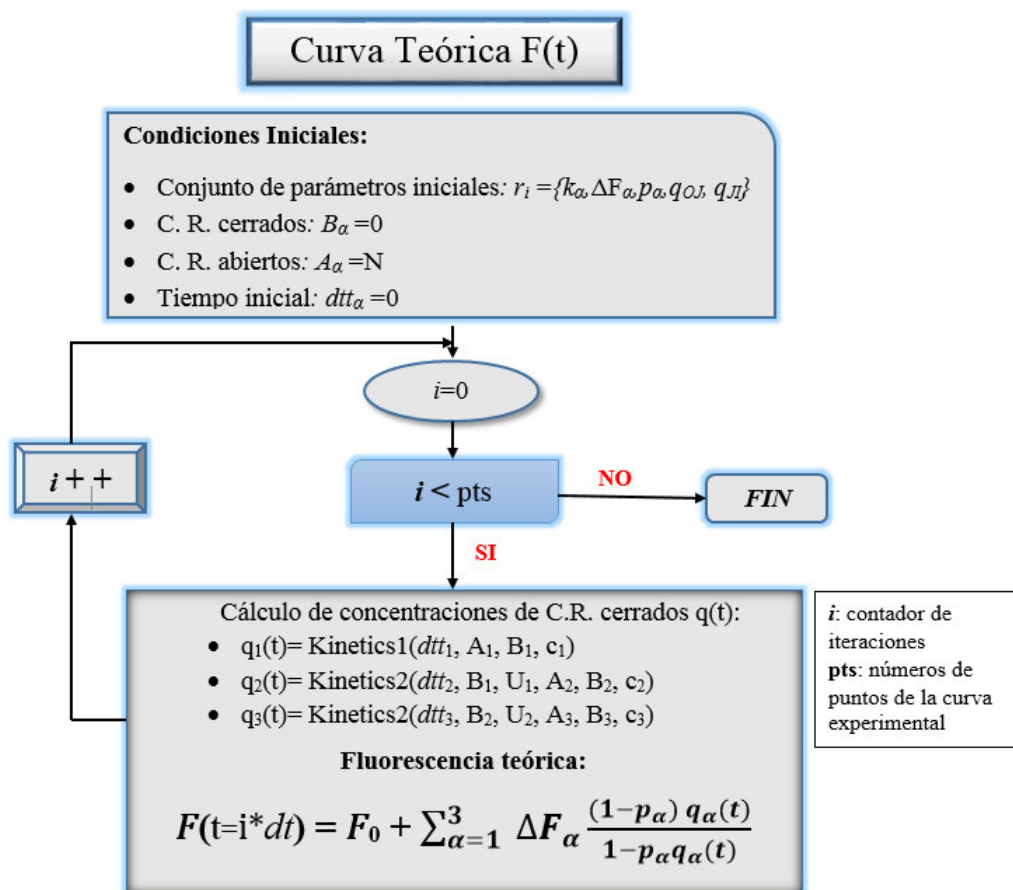
### 3.2.1. Ajustes de las Curvas Experimentales

El ajuste de las curvas de fluorescencia se realizó considerando que éstas se generan según el mecanismo propuesto en el modelo estocástico descrito en el capítulo 2. Para esto se implementó un programa en lenguaje C++ (el código se presenta en la sección Anexos B), el cual permite simular la evolución en el tiempo de la fluorescencia inducida dado un conjunto de parámetros específicos de entrada. Inicialmente, se escoge un conjunto de parámetros iniciales los cuales permiten realizar un ajuste preliminar, al finalizar dicho ajuste se obtiene un nuevo conjunto de parámetros con los cuales se reemplaza el grupo inicial. Este proceso se repite hasta obtener un ajuste aceptable, es decir, cuando los valores predichos con el modelo difieran de los valores experimentales en una cantidad comparable con el error experimental.

La diferencia entre los valores medidos ( $F_i^{exp}$ ) y simulados ( $F_i^{sim}$ ) se cuantifica con la función objetivo ( $F_{obj}$ ) definida de la siguiente manera:

$$F_{obj} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n |F_i^{sim} - F_i^{exp}|^2}{n}} \quad (3.1)$$

donde  $n$  es el número de puntos experimentales. El programa desarrollado busca aleatoriamente el conjunto de parámetros que minimiza  $F_{obj}$ . Adicionalmente,  $F_{obj}$  está relacionada con el estadístico  $\chi^2$  que mide la bondad del ajuste de la función  $F$  generada con el método estocástico mismo que se lo describe más adelante en la sección 3.2.2.



**Figura 3.5:** Esquema para generar  $F(t)$  siguiendo el modelo estocástico.

El diagrama de flujo del programa para obtener las curvas teóricas siguiendo una variante del modelo estocástico se muestra en la Figura 3.5.

Como una primera parte para cada experimento se realizó el ajuste por regiones de la primera curva obtenida en el primer día de medición, es decir, se separaron las tres regiones para luego realizar el ajuste respectivo. Para cada región se usó un conjunto inicial de 3 parámetros aleatorios ( $k_{\alpha}$ ,  $a_{\alpha}$ ,  $p_{\alpha}$ ,  $\alpha = 1, 2, 3$ ) con los cuales se realizó un ajuste preliminar, luego mediante la minimización de  $F_{obj}$  se encontró un nuevo conjunto de parámetros, los cuales permitieron un mejor ajuste en cada región. El valor de  $F_0$  considerado como la fluorescencia inicial corresponde a la región OJ mientras que, para las regiones JI e IP, dicho valor se obtuvo de la curva experimental observando los lugares en donde las regiones OJ y JI llegan respectivamente a un valor de saturación; de esta forma se obtuvo 9 de los 11 parámetros

que describen la curva de fluorescencia.

Una vez obtenidos los nueve parámetros para la medida 1 del día 1 se procedió a realizar el ajuste completo de esta curva, es decir, se trabajó simultáneamente con las tres regiones, OJ, JI e IP, usando los parámetros obtenidos previamente (ajuste por regiones) como parte de los valores preliminares. Se usó un conjunto inicial de 11 parámetros ( $k_\alpha, a_\alpha, p_\alpha, q_{OJ}, q_{JI}, \alpha = 1, 2, 3$ ) de los cuales 9 fueron conocidos (obtenidos mediante el ajuste por regiones) y dos de ellos ( $q_{OJ}, q_{JI}$ ) fueron valores aleatorios. Una vez encontrado un ajuste aceptable para la medida 1 del día 1 se procedió a realizar el ajuste completo de la medida 2 del día 1 considerando los valores encontrados previamente (medida 1) como conjunto inicial de parámetros. Este proceso se lo repitió hasta realizar el ajuste completo de todas las curvas obtenidas en el primer día. Posteriormente, se realizó todo el procedimiento anterior para las curvas experimentales de los siguientes días de medición empezando por el ajuste por regiones de la primera medida obtenida en cada día.

Para cada experimento se realizó el ajuste de las curvas experimentales hasta obtener errores menores a 0.04. Finalmente, se analizó la evolución en el tiempo de los parámetros obtenidos en el ajuste de las curvas. Es decir, se estudió si dichos parámetros aumentan, disminuyen o presentan algún comportamiento similar como consecuencia de la deshidratación.

### 3.2.2. Chi-Cuadrado

El estadístico  $\chi^2$  está definido por:

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n |F_i^{sim} - F_i^{exp}|^2}{\sigma^2} \quad (3.2)$$

donde  $n$  es el número de puntos experimentales,  $\sigma^2$  es la desviación cuadrática media [39-41].

En [13] se recomienda realizar experimentos tales que el error asociado a la medición sea menor al 0.34 % de la fluorescencia máxima. En este trabajo para el primer experimento se obtuvo  $\sigma_{exp} = 0.014$  que representa el 0.2 % de la fluorescencia máxima. El  $\sigma_{exp}$  fue obtenido entre las primera y segunda curvas de fluorescencia ya que entre estas curvas no existen cambios importantes debido a la deshidratación en la hoja. Al valor de la diferencia obtenida entre dichas curvas se lo considero como una medida ocasionada únicamente por el error experimental. Por lo que, en este estudio para obtener  $\chi^2$  se considero para todos los ajustes de las curvas un  $\sigma = 0.02$  siguiendo la sugerencia propuestas en [13].

Asimismo, se considero el chi-cuadrado reducido ( $\overline{\chi^2}$ ) mismo que está definido como [39]:

$$\overline{\chi^2} = \frac{\chi^2}{\nu} \quad (3.3)$$

donde  $\nu$  son los grados de libertad definidos de la siguiente forma:

$$\nu = n - l \quad (3.4)$$

siendo  $n$  el numero de puntos experimentales y  $l$  las ligaduras. En este caso  $l$  es igual a 12 considerando los 11 parámetros del modelo más uno. Entonces, 3.4 será igual a:

$$\nu = 30000 - 12 = 29988 \quad (3.5)$$

por lo que podemos considerar que  $\nu \sim n$ . Por lo mencionado anteriormente, el ajuste de las curvas fue aceptado cuando  $\overline{\chi^2} < 4$  ya que, si  $\overline{\chi^2} \gg 1$  las curvas teóricas no concordarían con las curvas experimentales.

Adicionalmente,  $\overline{\chi^2}$  y  $F_{obj}$  están relacionadas de la siguiente forma:

$$\overline{\chi^2} = \frac{nF_{obj}^2}{\sigma^2} \quad (3.6)$$

pero en este caso  $n$  y  $\sigma^2$  son valores constantes, entonces de 3.6 obtenemos:

$$\overline{\chi^2} = CF_{obj}^2 \quad (3.7)$$

donde  $C = \frac{n}{\sigma^2}$  es una constante. De la ecuación 3.7 podemos decir que si obtenemos un valor de  $\overline{\chi^2}$  aceptable en el ajuste lo mismo ocurriría con el valor de  $F_{obj}^2$ .

### 3.2.3. Desviación Cuadrática entre Curvas Experimentales

La separación entre las curvas experimentales se cuantificó mediante la desviación cuadrática media ( $\sigma_{jk,1}$ ) con respecto a una curva de referencia; se definió  $\sigma_{jk,1}$  de la siguiente forma:

$$\sigma_{jk,1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p=200} |F_{i,jk} - F_{i,1}|^2}{n_p}} \quad (3.8)$$

donde,  $F_{i,jk}$  es la última curva experimental ( $j$ ) obtenida en cada día ( $k$ ),  $F_{i,1}$  es la primera curva del primer día de medición (curva de referencia),  $n_p = 200$  es el número de puntos experimentales.

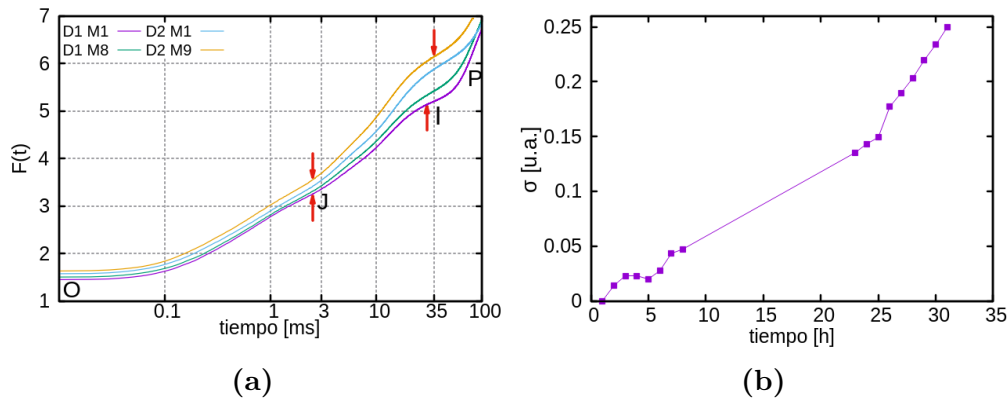
Se consideró 200 puntos que en su mayoría corresponden a la región OJ, es decir, la separación entre las curvas experimentales para la región OJ sirvió como un estimador de cuán separadas están las demás regiones de la curva Kautsky (JI e IP).

# Capítulo 4

## Resultados

Se realizaron 3 experimentos siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2. El ajuste de las curvas obtenidas experimentalmente durante los días de medición se realizó siguiendo el procedimiento detallado en la sección 3.2.1. Cabe mencionar que se utilizó una variante del modelo estocástico el cual nos permite modelar la desaparición de una o más regiones de la curva de fluorescencia inducida. Ya que, durante el segundo día de medición se observó que las curvas se saturaban  $\sim 30$  ms, por lo que, la región IP no estaba presente consistentemente con lo reportado en la literatura [4, 38].

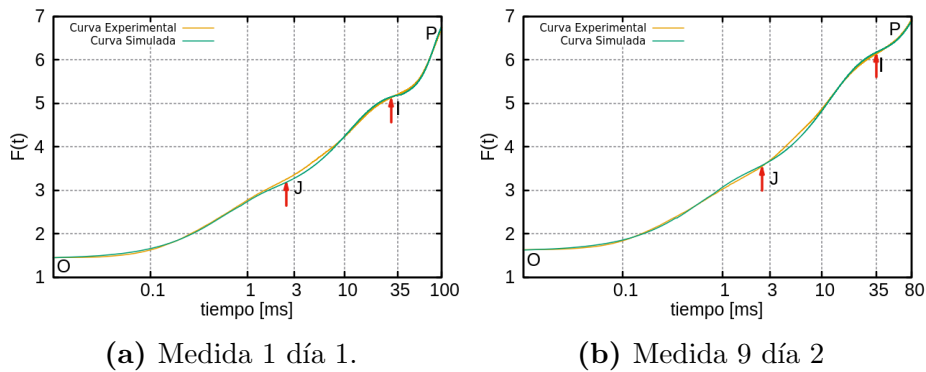
### 4.1. Experimento 1



**Figura 4.1:** (a) Curvas de fluorescencia experimentales, primeras y últimas mediciones de cada día. (b) Evolución en el tiempo de la separación entre las curvas experimentales. Experimento 1.

Este experimento se realizó durante 2 días, se usaron 2 hojas de peso similar, se trabajó con la misma sección de hoja. En la primera hoja se realizaron las mediciones de fluorescencia sin cambiarla de lugar hasta finalizar el experimento, mientras que, la segunda hoja se pesó después de realizar cada medición, es decir, sirvió para el control de pérdida de agua asociado al peso de la hoja como se indica en la sección 3.2. Al finalizar se obtuvieron 17 curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a*. La Figura 4.1a muestra las primeras y últimas curvas experimentales obtenidas en cada día durante este experimento. En esta figura se observa que, parte de la región IP no está presente debido a la pérdida de agua en la hoja (todas las curvas experimentales se encuentran en la sección Anexos A, Figura A.1).

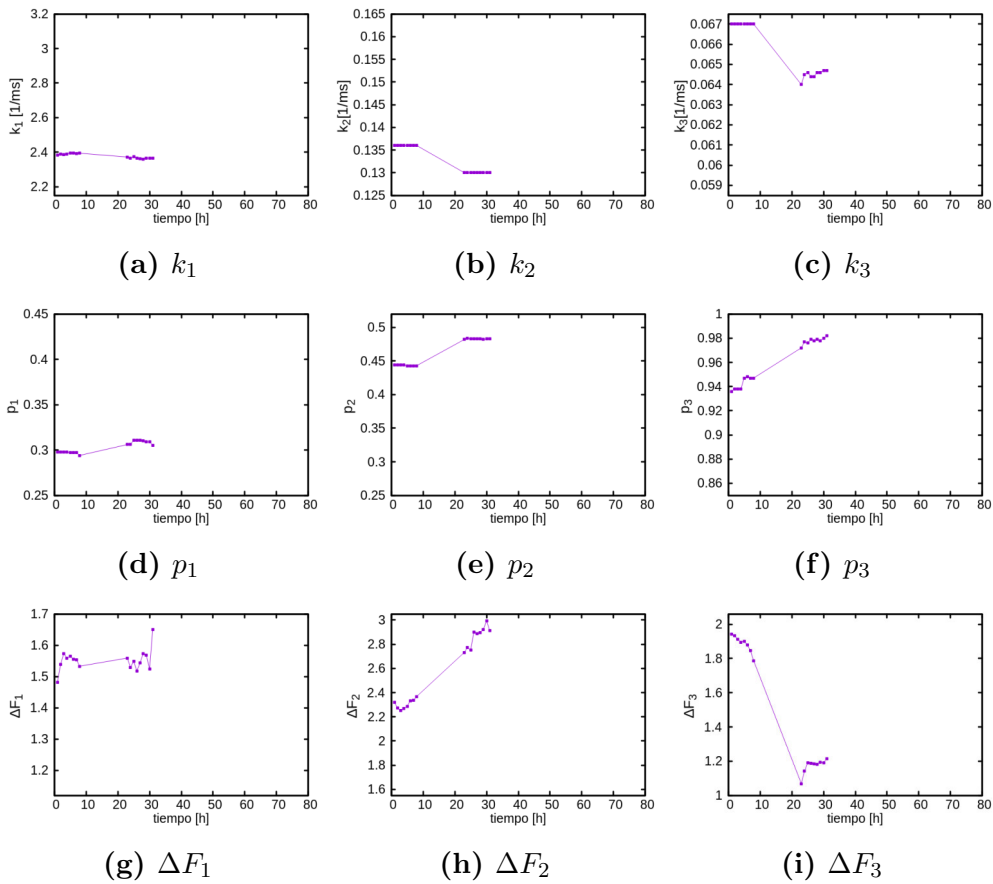
Como consecuencia de la deshidratación en la hoja de espinaca las curvas se desplazaron hacia valores superiores de fluorescencia. Se encontró  $\sigma_{81,1} = 0.0472$  [u.a.],  $\sigma_{92,1} = 0.2500$  [u.a.] siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.3. En la Figura 4.1b se presenta la evolución en el tiempo de  $\sigma$  en donde se aprecia un comportamiento ascendente, es decir, a medida que la hoja pierde agua las curvas presentan una mayor separación. Se debe aclarar que, el  $\sigma$  presentado representa únicamente la separación de las regiones OJ debido a que las curvas presentan valores constantes  $\sim 7$  para tiempos mayores a 50 ms (Figura 4.1a).



**Figura 4.2:** Curvas de Fluorescencia Experimentales y Simuladas, Experimento 1.

Por otro lado, en la Figura 4.2 se presentan los ajustes realizados a la

medida 1 del día 1 ( $\overline{\chi^2}=1.6$ ) y a la medida 9 del día 2 ( $\overline{\chi^2}=3.06$ ), como figuras representativas de los ajustes realizados. Los parámetros obtenidos para el mejor ajuste de las curvas se detallan en las Tablas D.1 y D.2 (Anexo D.1), los cuales muestran que, los valores de  $\overline{\chi^2}$  son menores a 3.1. Se obtuvieron algunos valores cercanos a 1 lo cual nos indica que las curvas teóricas obtenidas son cercanas a las curvas experimentales. Sin embargo, también se obtuvieron valores  $\sim 3$  para los cuales el ajuste de las curvas es aceptable.



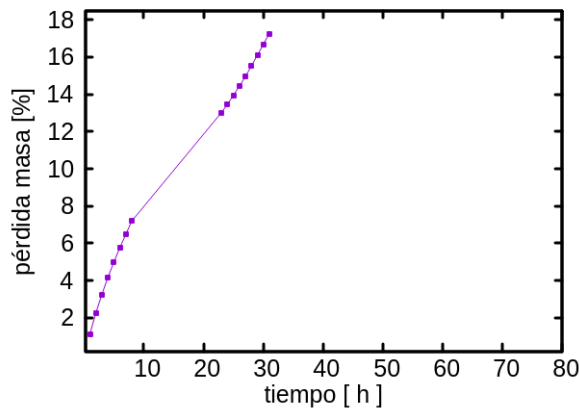
**Figura 4.3:** Evolución en el tiempo de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de las curvas completas, Experimento 1.

Adicionalmente, los valores de  $f_0$  aumentaron con el paso de los días; es decir, las curvas se separaron hacia valores superiores de fluorescencia. Las concentraciones de centros de reacción activados,  $q_{OJ}$  y  $q_{JI}$ , disminuyeron, sin embargo, son mayores a 0.7 pero hay una mayor concentración en la transición JI-IP. Las constantes cinéticas tendieron a disminuir,  $k_1$  tomó



valores de  $2.389 \pm 0.007 \left[\frac{1}{ms}\right]$  durante el primer día y  $2.3685 \pm 0.0065 \left[\frac{1}{ms}\right]$  durante el segundo día (Figura 4.3a). Por otro lado,  $k_2$  adquirió valores constantes iguales a  $0.136 \left[\frac{1}{ms}\right]$  y a  $0.13 \left[\frac{1}{ms}\right]$  para el primer y segundo día respectivamente (Figura 4.3b). Mientras que  $k_3$  durante el primer día tomó un valor constante igual a  $0.067 \left[\frac{1}{ms}\right]$ , y disminuyó a valores  $0.06435 \pm 0.00035 \left[\frac{1}{ms}\right]$  en el segundo día (Figura 4.3c).

Los valores de  $\Delta F_1$  y  $\Delta F_2$  aumentaron mientras que,  $\Delta F_3$  disminuyó (Figuras 4.3: g, h, i). Los parámetros de conectividad aumentaron,  $p_1$  tomó valores de  $\sim 0.30$ ,  $p_2$  presentó valores  $\sim 0.445$  en el primer día y  $\sim 0.485$  durante el segundo día (Figuras 4.3: d, e). Adicionalmente,  $p_3$  inicialmente adquirió valores  $\sim 0.945$  y al finalizar alcanzó valores de  $\sim 0.98$  (Figura 4.3f), es decir, según la ecuación 2.7, parte de la región IP no debería estar presente en las curvas. De acuerdo con los resultados experimentales presentados en la Figura 4.1a era de esperarse que  $p_3$  tome estos valores.



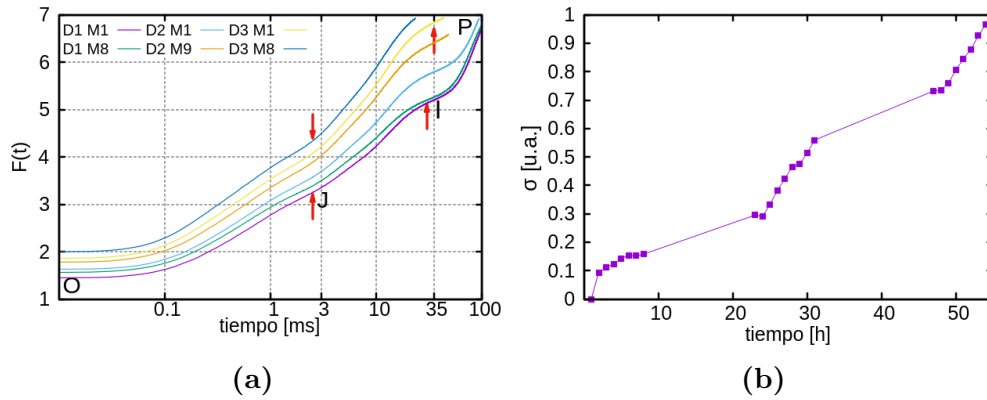
**Figura 4.4:** Evolución en el tiempo de la pérdida de masa en la hoja, Experimento 1.

La hoja 2 sirvió como control de la pérdida de masa asociado a la pérdida de agua en la hoja de espinaca. Durante las 31 horas de medición la hoja perdió el 17% de su masa (Figura 4.4). Como resultado, las regiones OJ y JI de las curvas de fluorescencia estaban presentes por completo, mientras que, al finalizar el experimento sólo parte de la región IP estuvo presente en

las curvas de fluorescencia. Es decir, en el transcurso del tiempo esta región se fue perdiendo paulatinamente debido a la deshidratación de la hoja. Ya que,  $p_3$  adquiere valores cercanos a 1 y según la ecuación 2.7 debería existir una ausencia de fluorescencia en la región IP (Figura 4.1a).

## 4.2. Experimento 2

Este experimento es similar al anterior ya que también se usaron 2 hojas sin embargo se lo realizó durante 3 días. Al finalizar se obtuvieron 25 curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a*.

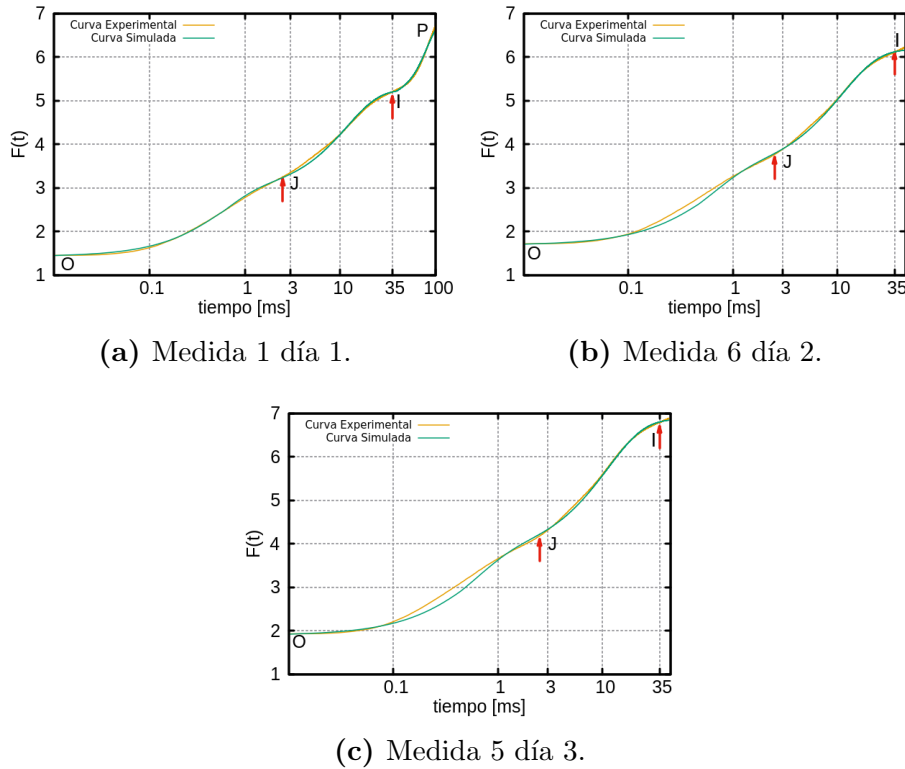


**Figura 4.5:** (a) Curvas de fluorescencia experimentales, primeras y últimas mediciones de cada día. (b) Evolución en el tiempo de la separación entre las curvas experimentales. Experimento 2.

En la Figura 4.5a se encuentran las primeras y últimas curvas experimentales obtenidas durante cada día en el experimento 2. En donde se observa que, de forma similar a lo encontrado en el experimento 1 y como consecuencia de la pérdida de agua en la hoja de espinaca, las curvas se separaron hacia valores superiores de fluorescencia. Además, alrededor de las 27 horas de medición durante el segundo día, la región IP no está presente en las curvas de fluorescencia debido a la deshidratación de la hoja (todas las curvas experimentales se encuentran en la sección Anexos A, Figura A.2).

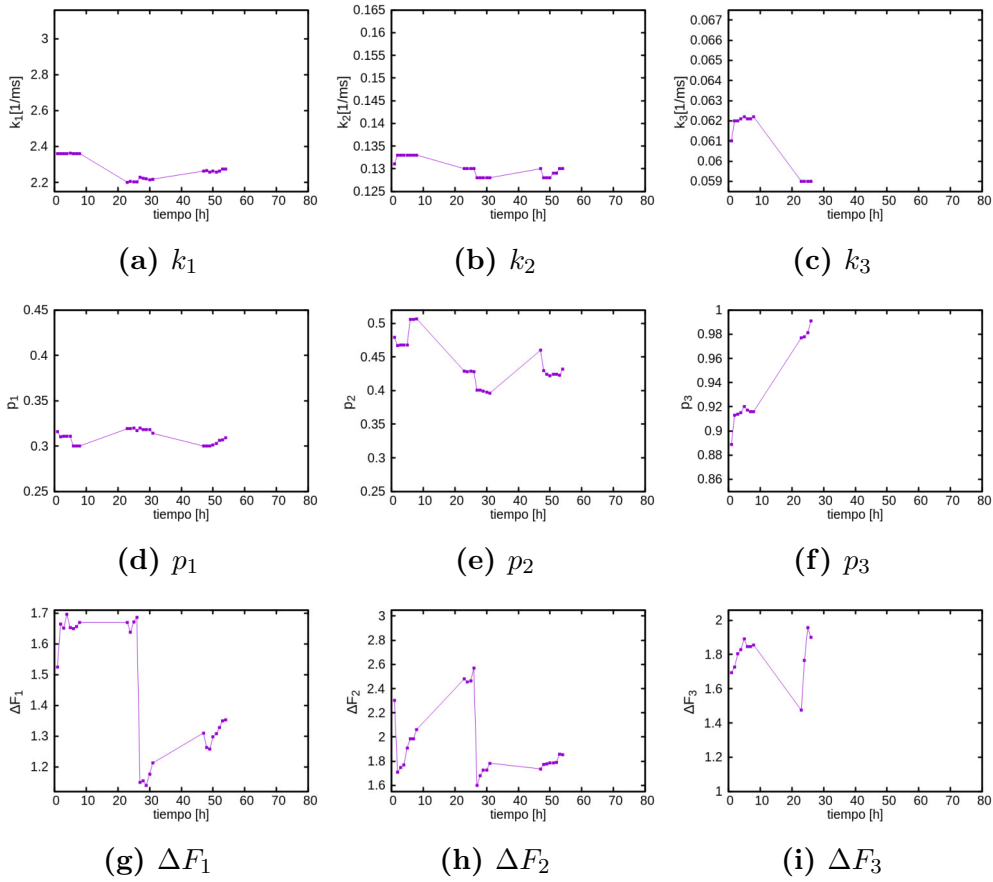
Adicionalmente, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.2. se encontró que  $\sigma_{8,1} = 0.1576$  [u.a.],  $\sigma_{9,2,1} = 0.5590$  [u.a.] y  $\sigma_{8,3,1} = 0.9666$

[u.a.]. En la Figura 4.5b se presenta la evolución en el tiempo de  $\sigma$  en donde se observa un comportamiento ascendente, es decir, a medida que la hoja pierde agua las curvas presentan una mayor separación. Se debe mencionar que, el  $\sigma$  presentado representa únicamente la separación de las regiones OJ debido a que las curvas presentan valores constantes  $\sim 7$  para tiempos mayores a 20 ms (Figura 4.5a).



**Figura 4.6:** Curvas de Fluorescencia Experimentales y Simuladas, Experimento 2.

En la Figura 4.6 se presentan los ajustes realizados a la medida 1 del día 1 ( $\overline{\chi^2}=3.44$ ), a la medida 6 del día 2 ( $\overline{\chi^2}=1.95$ ) y a la medida 5 del día 3 ( $\overline{\chi^2}=0.84$ ), como figuras representativas de los ajustes. Los parámetros obtenidos para el mejor ajuste de las curvas se detallan en las Tablas D.3, D.4 y D.5 (Anexo D.2), las cuales muestran que, los valores de  $\overline{\chi^2}$  son menores a 3.65. Se obtuvieron algunos valores menores a 1 lo cual nos indica que las curvas teóricas obtenidas son muy cercanas a las curvas experimentales. Sin embargo, también se obtuvieron valores mayores a 3 para los cuales el ajuste de las curvas es aceptable.

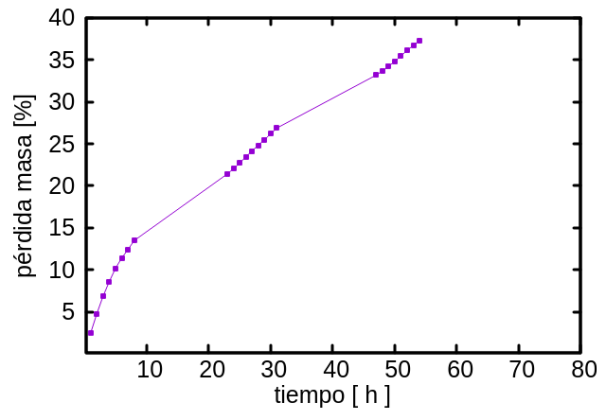


**Figura 4.7:** Evolución en el tiempo de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de las curvas, Experimento 2. La ausencia de puntos en las figuras c, f e i son debido a la pérdida de agua en la hoja.

Los valores de  $f_0$  aumentaron con el paso de los días al igual que en el experimento 1. Además, las concentraciones de centros de reacción activados,  $q_{OJ}$  y  $q_{JI}$ , disminuyeron; sin embargo, son mayores a 0.65 pero hay una mayor concentración en la transición JI-IP. Las constantes cinéticas tendieron a disminuir,  $k_1$  tomó valores de  $2.362 \pm 0.002 \left[ \frac{1}{ms} \right]$  durante el primer día y  $2.2655 \pm 0.0095 \left[ \frac{1}{ms} \right]$  durante el tercer día (Figura 4.7a).  $k_2$  adquirió valores constantes iguales a  $0.133 \left[ \frac{1}{ms} \right]$  en el primer día y de  $0.129 \pm 0.001 \left[ \frac{1}{ms} \right]$  para el segundo y tercer días (Figura 4.7b), mientras que  $k_3$  tomó un valor de  $0.061 \left[ \frac{1}{ms} \right]$  en el ajuste de la primera medida y disminuyó a valores de  $0.059 \left[ \frac{1}{ms} \right]$  en el segundo día (Figura 4.7c). Como se mencionó anteriormente, debido a la pérdida de agua alrededor de las 27 horas de medición las curvas se saturaron en  $\sim 40$  ms, por lo que la región IP no

estuvo presente en las curvas de fluorescencia.

Los valores de  $\Delta F_1$ ,  $\Delta F_2$  y  $\Delta F_3$  durante las primeras horas aumentaron y al finalizar el experimento disminuyeron a valores  $\sim 1.4$ ,  $\sim 2.1$  y  $\sim 1.75$  respectivamente (Figuras 4.7: g, h, i). Los parámetros de conectividad asociados a las regiones OJ y JI tendieron a disminuir en el primer día, a aumentar en el segundo día y a disminuir una vez más en el tercer día pero tomaron valores de  $\sim 0.31$  y  $\sim 0.45$  para  $p_1$  y  $p_2$  respectivamente (Figuras 4.7: d, e). Por otra parte, mientras la región IP estuvo presente en las curvas de fluorescencia  $p_3$  únicamente aumentó desde 0.889 hasta 0.991 (Figura 4.7f). Los valores reportados para  $p_3$ , siguiendo la ecuación 2.7, eran de esperarse debido a los resultados experimentales obtenidos en donde las curvas se saturan desde  $\sim 40$  ms (Figura 4.5a).

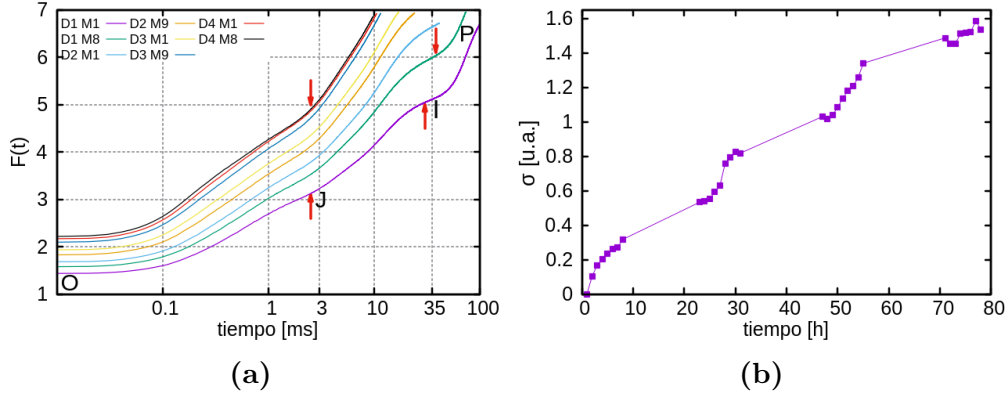


**Figura 4.8:** Evolución en el tiempo de la pérdida de masa en la hoja, Experimento 2.

La hoja 2 sirvió como control de la pérdida de masa asociado a la pérdida de agua en la hoja de espinaca. Durante el segundo día de medición alrededor de las 27 horas la hoja perdió el 25 % de su masa; como resultado las curvas experimentales se saturan en  $\sim 40$  ms. Es decir, la región IP no estuvo presente en las curvas lo cual se corrobora con los valores obtenidos para  $p_3$  siguiendo la variante del modelo estocástico propuesto en este trabajo. Adicionalmente, al finalizar este experimento la hoja perdió 37.3 % de masa (Figura 4.8).

### 4.3. Experimento 3

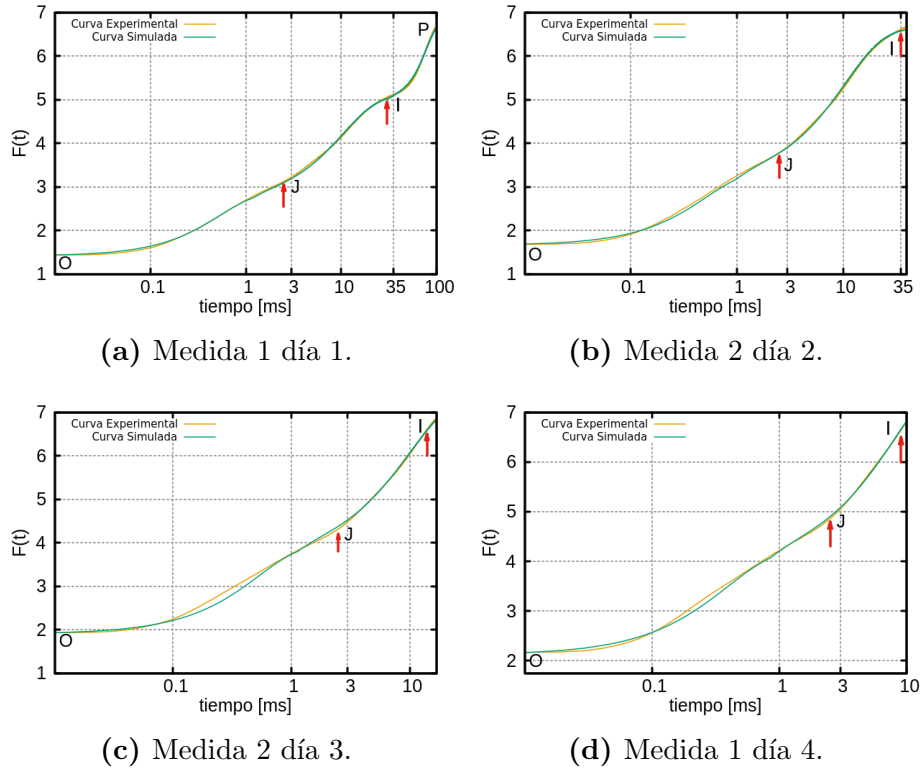
Este experimento es similar a los 2 anteriores ya que también se usaron 2 hojas; sin embargo, se lo realizó durante 4 días. Al finalizar se obtuvieron 34 curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a*.



**Figura 4.9:** (a) Curvas de fluorescencia experimentales, primeras y últimas mediciones de cada día. (b) Evolución en el tiempo de la separación entre las curvas experimentales. Experimento 3.

En la Figura 4.9a se presentan las primeras y últimas curvas experimentales obtenidas en los cuatro días. En esta figura se observa que, como en los experimentos anteriores y debido a la deshidratación en la hoja de espinaca, las curvas se desplazaron hacia valores superiores de fluorescencia. Además, al empezar el segundo día de medición la región IP no está presente en las curvas de fluorescencia, al igual que en el experimento 2 (todas las curvas experimentales se encuentran en la sección Anexos A, Figura A.3).

Adicionalmente, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.2. se encontró que  $\sigma_{8,1} = 0.3170$  [u.a.],  $\sigma_{9,1} = 0.8178$  [u.a.],  $\sigma_{9,1} = 1.3394$  [u.a.] y  $\sigma_{8,1} = 1.5343$  [u.a.]. En la Figura 4.9b se presenta la evolución en el tiempo de  $\sigma$  en donde se observa un comportamiento ascendente, es decir, a medida que la hoja pierde agua las curvas presentan una mayor separación. Se debe agregar que, el  $\sigma$  presentado representa únicamente la separación de las regiones OJ debido a que las curvas presentan valores constantes  $\sim 7$  para tiempos mayores a 10 ms (Figura 4.9a).

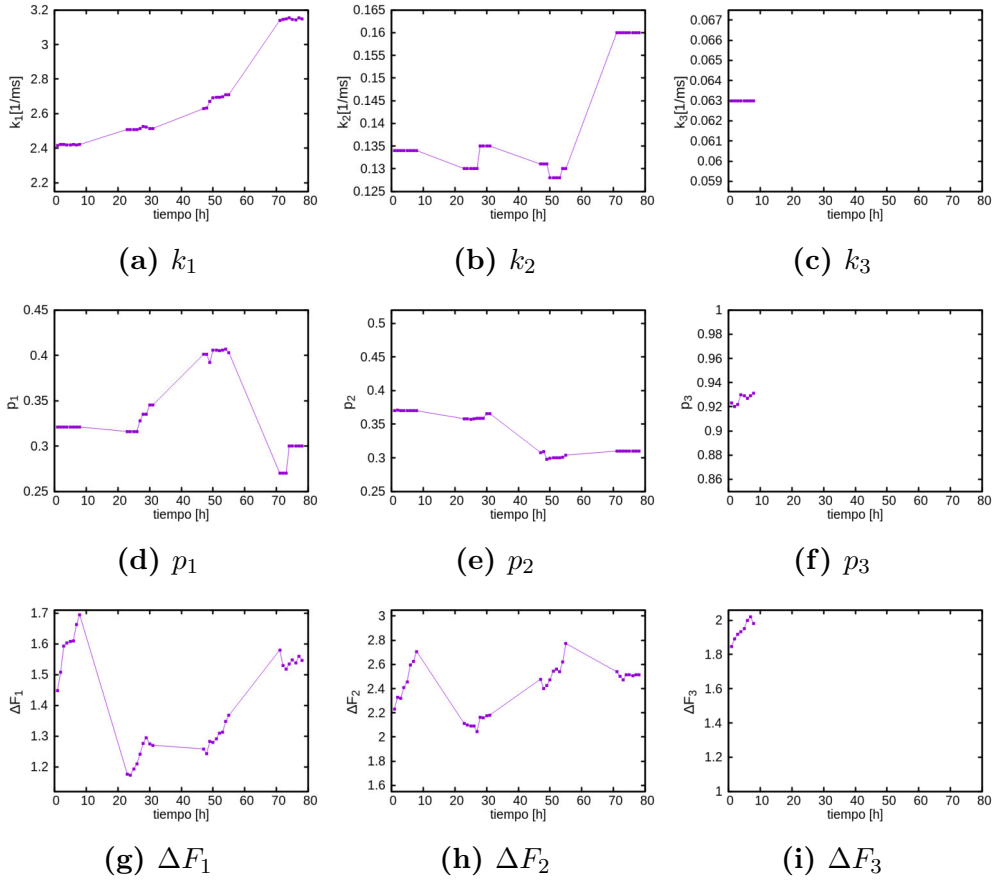


**Figura 4.10:** Curvas de Fluorescencia Experimentales y Simuladas, Experimento 3.

En la Figura 4.10 se presentan los ajustes realizados a la medida 1 del día 1 ( $\overline{\chi^2}=2.16$ ), a la medida 2 del día 2 ( $\overline{\chi^2}=2.67$ ), a la medida 2 del día 3 ( $\overline{\chi^2}=2.55$ ) y a la medida 1 del día 4 ( $\overline{\chi^2}=1.44$ ), como figuras representativas de los ajustes. Los parámetros obtenidos para el mejor ajuste de las curvas se detallan en las Tablas D.6, D.7, D.8 y D.9 (Anexo D.3), los cuales muestran que, los valores de  $\overline{\chi^2}$  son menores a 3.35. Se obtuvieron algunos valores  $\sim 1$  lo cual nos indica que las curvas teóricas obtenidas son cercanas a las curvas experimentales. Sin embargo, también se obtuvieron valores  $\sim 3$  para los cuales el ajuste de las curvas es aceptable.

Al igual que en los experimentos anteriores, los valores de  $f_0$  aumentaron con el paso de los días. Además, las concentraciones de centros de reacción activados,  $q_{OJ}$  y  $q_{JI}$ , fueron mayores a 0.85, pero hay una mayor concentración en la transición JI-IP. Las constantes cinéticas asociadas a las regiones OJ y JI aumentaron,  $k_1$  tomó valores  $2.4185 \pm 0.0025 \left[ \frac{1}{ms} \right]$  durante el pri-

mer día y alcanzó valores de  $3.15 \left[\frac{1}{ms}\right]$  al finalizar el cuarto día (Figura 4.11a). Por otro lado,  $k_2$  adquirió valores constantes iguales a  $0.134 \left[\frac{1}{ms}\right]$  y a  $0.16 \left[\frac{1}{ms}\right]$  para el primer y cuarto día respectivamente (Figura 4.11b); mientras que  $k_3$  únicamente tomó valores iguales a  $0.063 \left[\frac{1}{ms}\right]$  durante el primer día, el resto de días esta constante desapareció debido a la falta de agua en la hoja (Figura 4.11c).

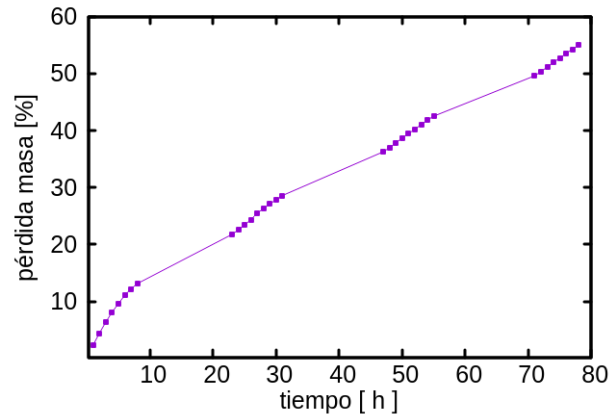


**Figura 4.11:** Evolución en el tiempo de los parámetros obtenidos mediante el ajuste de las curvas completas, Experimento 3. La ausencia de puntos en las figuras c, f e i son debido a la pérdida de agua en la hoja.

$\Delta F_1$  y  $\Delta F_2$  tomaron valores dentro de los siguientes rangos:  $[1.15 - 1.71]$  y  $[2 - 2.8]$ , respectivamente. Mientras que  $\Delta F_3$  aumentó tomando valores  $1.9 \pm 0.1$  (Figuras 4.11: g, h, i). Los parámetros de conectividad asociados a las regiones OJ y JI disminuyeron:  $p_1$  tomó valores de 0.321 durante el primer día y valores de 0.30 al finalizar el experimento (Figuras 4.11d);  $p_2$  adquirió valores de 0.37 durante el primer día y valores de 0.31 durante el cuarto



día (Figuras 4.11e). Por otro lado, mientras la región IP estuvo presente en las curvas de fluorescencia,  $p_3$  aumentó tomando valores  $0.9255 \pm 0.0055$  (Figura 4.11f). Los valores encontrados para  $p_3$  siguiendo la ecuación 2.7 eran de esperarse debido a los resultados experimentales obtenidos en donde las curvas se saturan desde  $\sim 35$  ms (Figura 4.9a).



**Figura 4.12:** Evolución en el tiempo de la pérdida de masa en la hoja, Experimento 3.

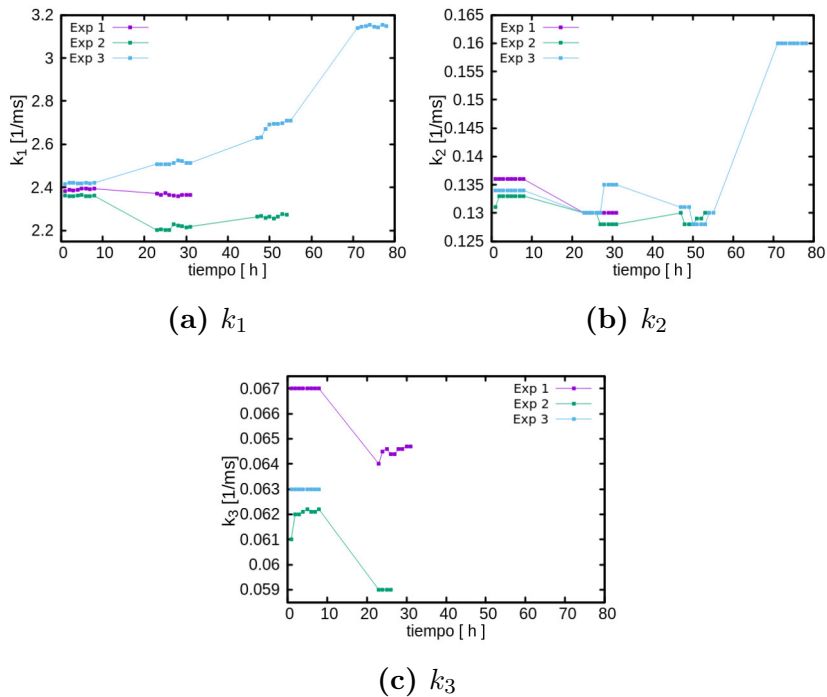
La hoja 2 sirvió como control de la pérdida de masa asociado a la pérdida de agua en la hoja de espinaca. Al iniciar el segundo día de medición a las 23 horas la hoja perdió el 22% de su masa. Como resultado las curvas experimentales se saturan en  $\sim 40$  ms, es decir, la región IP no estuvo presente en las curvas lo cual se corrobora con los valores obtenidos para  $p_3$  siguiendo la variante del modelo estocástico propuesto en este trabajo. Adicionalmente, al finalizar este experimento la hoja perdió el 55% de su masa (Figura 4.12).

## 4.4. Comparación entre Experimentos

### 4.4.1. Constantes Cinéticas

En los tres experimentos se obtuvo que  $k_1$  es mayor que  $k_2$ , y a su vez las dos son mayores que  $k_3$ . Es decir, las constantes cinéticas decrecen a medida que se avanza por las regiones de la curva Kautsky. Por lo que en la

región OJ las transiciones del estado abierto al cerrado son más rápidas que en las otras regiones. Los valores obtenidos para  $k_1$  en el primer día para todos los experimentos son similares y alrededor de  $2.39 \pm 0.03 \left[\frac{1}{ms}\right]$ . Sin embargo, el valor de esta constante disminuyó a  $2.3675 \pm 0.0075 \left[\frac{1}{ms}\right]$  y a  $2.2655 \pm 0.0095 \left[\frac{1}{ms}\right]$  al finalizar los experimentos 1 y 2, respectivamente. Por otro lado, en el experimento 3 el valor de esta constante aumentó hasta  $2.133 \pm 0.033 \left[\frac{1}{ms}\right]$  (Figura 4.13a).

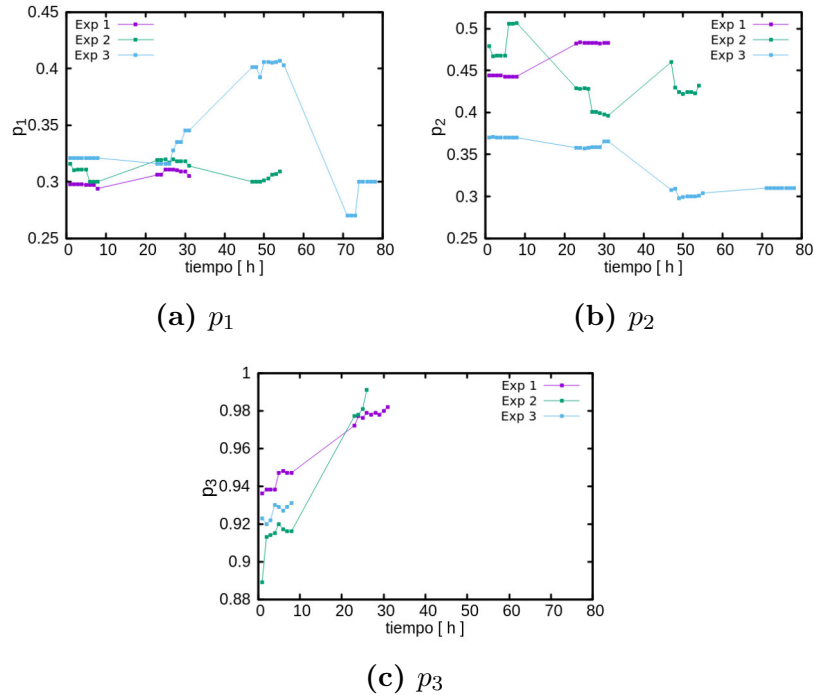


**Figura 4.13:** Evolución en el tiempo de las constantes cinéticas, Experimentos: 1, 2 y 3. La ausencia de puntos es debido a la pérdida de agua.

Por su parte,  $k_2$  presentó valores similares de  $0.1345 \pm 0.0015 \left[\frac{1}{ms}\right]$  en el primer día en todos los experimentos, al concluir los experimentos 1 y 2 disminuyó a  $0.13 \left[\frac{1}{ms}\right]$  y a  $0.129 \pm 0.001 \left[\frac{1}{ms}\right]$  respectivamente. Por otro lado, en el experimento 3 esta constante durante el segundo y tercer día disminuye, pero en el cuarto día aumentó a  $0.16 \left[\frac{1}{ms}\right]$  (Figura 4.13b). Con respecto a  $k_3$  los valores disminuyeron de  $0.067 \left[\frac{1}{ms}\right]$  a  $0.06435 \pm 0.00035 \left[\frac{1}{ms}\right]$  en el experimento 1, de  $0.0616 \pm 0.0006 \left[\frac{1}{ms}\right]$  a  $0.059 \left[\frac{1}{ms}\right]$  en el experimento 2. Mientras que, en el experimento 3 el valor de esta constante durante

el primer día es igual a  $0.063 \left[ \frac{1}{ms} \right]$ ; para el resto de días esta constante desaparece debido a la pérdida de agua en la hoja (Figura 4.13c).

#### 4.4.2. Parámetros de Conectividad

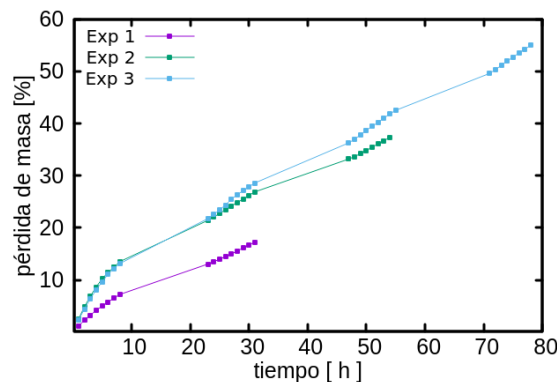


**Figura 4.14:** Evolución en el tiempo de los parámetros de conectividad, Experimentos: 1, 2 y 3. La ausencia de puntos es debido a la pérdida de agua.

Los parámetros de conectividad asociados a las regiones OJ y JI son menores al parámetro de conectividad asociado a la región IP en todos los experimentos.  $p_1$  en el experimento 1 aumentó de  $0.296 \pm 0.002$  a  $0.308 \pm 0.003$ , en el experimento 2 disminuyó de  $0.308 \pm 0.008$  a  $0.3045 \pm 0.0045$ , mientras que, en el experimento 3 este parámetro permaneció constante durante el primer día con un valor de 0.321, durante el segundo y tercer día aumentó alcanzando un valor de 0.407. Sin embargo, durante el cuarto día disminuyó a un valor de 0.30 (Figura 4.14a). Por otro lado,  $p_2$  disminuyó tomando valores de  $[0.396 - 0.507]$  y  $[0.298 - 0.37]$  en los experimentos 2 y 3, respectivamente. Al contrario, en el experimento 1 este parámetro aumentó de  $0.4435 \pm 0.0005$  a  $0.483 \pm 0.001$  (Figura 4.14b).

Mientras la región IP estuvo presente en las curvas de fluorescencia en todos los experimentos  $p_3$  aumentó a medida que las hojas de espinaca pierden agua alcanzando valores alrededor de 0.99 (Figura 4.14c). Es decir, según la ecuación 2.7 propuesta en este trabajo los valores cercanos a 1 para  $p_3$  sugieren la ausencia de la región IP en las curvas. Esto sugiere que los fotosistemas asociados a dicha región pierden funcionalidad debido a la pérdida de agua en las hojas de espinaca. Por lo que, la emisión de la fluorescencia en función del tiempo asociada a la región IP tiende a desaparecer. Estos resultados son consistentes con los efectos experimentales reportados en este estudio ya que, en las Figuras: A1, A2 y A3 (Anexos A) se observa que las curvas presentan una ausencia de la región IP.

### 4.4.3. Pérdida de masa



**Figura 4.15:** Comparación Pérdida Masa. Experimentos: 1, 2 y 3.

En los tres experimentos las hojas de espinaca perdieron agua de forma similar (Figura 4.15). Durante el primer día en todos los experimentos las hojas de espinaca perdieron menos del 15 % en masa, razón por la cual los efectos de la deshidratación no son tan evidentes. Sin embargo, durante el segundo día de medición en los experimentos 3 y 4 las hojas perdieron más del 20 % en masa, por lo que la región IP no estuvo presente en las curvas de fluorescencia. Como consecuencia, los parámetros de conectividad asociados a esta región, obtenidos mediante el ajuste de las curvas siguiendo el modelo estocástico, son mayores a 0.88 y tienen un comportamiento creciente.

# Capítulo 5

## Conclusiones

En este trabajo se estudió el efecto de la deshidratación de hojas de espinaca en las correspondientes curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a* a 25°C. Los experimentos mostraron que la pérdida de agua en las hojas causan variaciones significativas en la fluorescencia provocando incluso que la región IP no este presente en las curvas de fluorescencia inducida. El análisis de los resultados experimentales mostró que el parámetro de conectividad asociado a la región IP, incluido en el modelo estocástico utilizado, está relacionado con el grado de deshidratación de la hoja. Los resultados experimentales encontrados son consistentes con lo reportado en la literatura [4, 38].

Las tres series de curvas experimentales presentaron un comportamiento similar ya que, conforme las hojas perdieron agua, las curvas de fluorescencia se desplazaron hacia valores mayores de fluorescencia. Adicionalmente, para la región OJ, entre las últimas y primeras curvas se obtuvo que  $\sigma_{9_2,1} = 0.2500$  [u.a.],  $\sigma_{8_3,1} = 0.9666$  [u.a.] y  $\sigma_{8_4,1} = 0.15343$  [u.a.], para los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente. En conclusión, la desviación cuadrática ( $\sigma_{jk,1}$ ) planteada para determinar la separación entre las curvas experimentales se aceleró debido a la deshidratación en las hojas. Por lo que, a  $\sigma$  se lo puede considerar como una tasa de cambio debido a que, mientras mayor es la cantidad de agua que la hoja de espinaca pierde mayor es la separación

entre las curvas de fluorescencia inducida.

Dependiendo de la cantidad de agua que la hoja pierda, la región IP no estará presente parcial o completamente en las curvas de fluorescencia inducida. Este efecto fue más notorio en los experimentos 2 y 3, dado que existió una ausencia completa la fase IP en las curvas (durante el segundo día de medición). Por otro lado, en el experimento 1 sólo parte de esta región estuvo presente. Es decir, se encontró que en las hojas de espinaca existe un umbral en la pérdida de masa, asociada a la deshidratación, sobre el cual los efectos de la deshidratación son significativos. Como resultado, si la hoja pierde más del 20 % de su masa la región IP no estará presente en las curvas de fluorescencia inducida de clorofila *a*. En [38] se estima que el umbral en la pérdida de agua en una hoja es del 30 %, en el cual los procesos bioquímicos se verán afectados. La diferencia aquí posiblemente se deba a la especie de hojas utilizadas y al proceso para obtener las curvas (Capítulo 3).

Mediante el modelo estocástico usado en trabajos anteriores [12, 13], pero con un cambio realizado para poder considerar la contribución directa de los parámetros de conectividad ( $p_\alpha$ ), se simularon los procesos que dan origen a cada región de la curva Kautsky. En la variante del modelo propuesto en este estudio, no se incluye a  $p_\alpha$  como parte de los pesos estadísticos. Por lo que si el valor de  $p_\alpha$  es 1, dependiendo del dominio  $\alpha = 1, 2, 3$  la región asociada a un dominio específico desaparecerá. Consistentemente, los valores obtenidos para el parámetro de conectividad asociado a la región IP únicamente aumentan y están dentro del siguiente rango [0.889 - 0.991]. Es decir, el modelo propuesto describe satisfactoriamente la ausencia de la región IP por medio de  $p_3$ .

Consistentemente con los trabajos anteriores, las constantes cinéticas decrecen conforme se avanza por las regiones de la curva Kautsky, tomando valores dentro de los siguientes rangos [2.15-3.20] [ $\frac{1}{ms}$ ], [0.125-0.165][ $\frac{1}{ms}$ ] y

[0.0585-0.0675] [ $\frac{1}{ms}$ ] para  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  respectivamente. Es decir, las transiciones de los centros de reacción del estado abierto al cerrado suceden más rápido en la región OJ, lo opuesto sucede en IP. Sin embargo, en los experimentos 1 y 2 estas constantes disminuyen mientras que, en el experimento 3 aumentan. Por otro lado,  $\Delta F_1$ ,  $\Delta F_2$  y  $\Delta F_3$  toman valores mayores a 1 pero menores a 3 en el transcurso del tiempo. Además, los parámetros de conectividad asociados a las regiones OJ y JI son menores al parámetro de conectividad asociado a la región IP ya que, toman valores dentro de los siguientes rangos [0.25 - 0.45], [0.25 - 0.52] y [0.889 - 0.991] para  $p_1$ ,  $p_2$  y  $p_3$  respectivamente. Los resultados mencionados anteriormente se obtuvieron mediante los ajustes de las curvas de fluorescencia inducida de clorofila  $a$  en donde todos los valores de  $\overline{\chi^2}$  fueron menores a 4.

Estos resultados sugieren que las características de las curvas de fluorescencia no están determinadas únicamente por la reducción de  $Q_A$  como se propone en el modelo  $Q_A$ . Por lo que, en el modelo estocástico se ha considerado cambios conformacionales y la heterogeneidad de los dominios fotosintéticos. Posiblemente, esta última sea la causa por la cual la región IP desaparece, ya que, los fotosistemas asociados a dicha región pierden funcionalidad debido a la pérdida de agua en las hojas de espinaca.

# Referencias

- [1] Lazár, D. (1999). Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1412(1), 1-28.
- [2] 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.
- [3] Stirbet, A. (2012). Chlorophyll a Fluorescence Induction: a Personal Perspective of the Thermal Phase, the J-I-P Rise. *Photosynthesis Research*. 113(1), 15-61.
- [4] Kalaji, M., Goltsev, V., Żuk-Golaszewska, K., Zivcak, M., Brestic, M. (2017). *Chlorophyll Fluorescence Understanding Crop Performance-Basics and Applications*. CRC Press.
- [5] Whitmarsh, J. (1999). The photosynthetic process in concepts in Photobiology. *Journal of Theoretical Biology*. 40(1), 189-199.
- [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] Klughammer, C., Schreiber, U. (2008). Complementary PSII Quantum Yields Calculated from Simple Fluorescence Parameters Measured by PAM Fluorometry and the Saturation Pulse Method. *PAM Appl, Notes*, 1, 27-35.



- [8] Küpper, H., Benedikty, Z., Morina, F., Andresen, E., Mishra, A., Trtílek, M. (2019). Analysis of OJIP Chlorophyll Fluorescence Kinetics and QA Reoxidation Kinetics by Direct Fast Imaging. *Plant Physiology*. 179(2), 369–381
- [9] Ritchie, G., Landis, T. (2005). Seedling Quality Tests: Chlorophyll Fluorescence. In: Dumroese, R. Katen; 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
- [10] Maxwell, K., Johnson, G. (2000). Chlorophyll Fluorescence a Practical Guide. *Journal of Experimental Botany*. 51(345), 659-668.
- [11] 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.
- [12] Villagómez, S. R. (2016). Efecto de la temperatura en las curvas de fluorescencia inducida de clorofila a en hojas de espinaca. (Trabajo de Titulación en Física). Escuela Politécnica Nacional. Quito.
- [13] Ludeña, E. J. (2019). Simulación del Efecto de la Temperatura en la Fluorescencia Inducida de Clorofila a Mediante un Modelo Estocástico. (Trabajo de Titulación en Física). Escuela Politécnica Nacional. Quito.
- [14] Athar, H., Ashraf, M. (2005). *Photosynthesis under Drought Stress* (793-893). Marcel and Dekker.
- [15] Krause, G. H., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual review of plant biology*, 42(1), 313-349.
- [16] Govindjee, K. J., Messinger, J., Whitmarsh, J. (2010). Photosystem II. *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. Wiley, Chichester.

- [17] Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L.,... Losciale, P., (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research*, 132(1), 16-66.
- [18] 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.
- [19] Bassi, R., Høyer, H. G., (1987). Chlorophyll proteins of the photosystem II antenna system. *Journal of Biological Chemistry*.
- [20] 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.
- [21] Michael, T. M., Strasser, J., R. (2008). *In vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [22] 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.
- [23] Lawlor, D. W., Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*.
- [24] Razavi, F., Pollet, B., Steppe, K., Van Labeke, M. C. (2008). Chlorophyll fluorescence as a tool for evaluation of drought stress in strawberry. *Photosynthetica*, 46(4), 633-633.

- [25] Georgieva, K., Szigeti, Z., Sarvari, E., Gaspar, L. Maslenkova, L., Peeva, V., Peli, E., Tuba, Z. (2007). Photosynthetic activity of homoiochlorophyllous desiccation tolerant plant *Haberlea rhodopensis* during dehydration and rehydration. Springer Verlag, 225, 955-964.
- [26] Oukarroum, A., Schansker, G., Strasser, R. J. (2009). Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, 137, 188-199.
- [27] Oukarroum, A., El Madidi, S., Schansker, G. Strasser, R. J. (2007). Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 438-446.
- [28] Duysens LMN, Sweers HT. (1963). Mechanism of 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.
- [29] Moise, N., Moya, I., (2004). Correlation between lifetime heterogeneity and kinetics heterogeneity during chlorophyll fluorescence induction in leaves: 2. Multifrequency phase and modulation analysis evidences a loosely connected PSII pigment-protein complex. *Biochim Biophys Acta* 1657: 47-60.
- [30] Marques da Silva, J., Bernardes da Silva, A., Pádua, M. (2010). Modulated chlorophyll a fluorescence: a tool for teaching photosynthesis. *Journal of Biological Education*.
- [31] Gillespie, D. T. (1976). A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of couple chemical reactions. *Journal of computational physics*, 22(4), 403-434.

- [32] Vestergaard, C. L., Génois, M. (2005). Temporal gillespies algorithm: Fast simulation of contagion processes on time-varying networks. *PLoS computational biology*, 11(10), e1004579.
- [33] Longenberger, P. S., Smith, C. W., Duke, S. E. (2009). Evaluation of chlorophyll fluorescence as a tool for the identification of drought tolerance in upland cotton. *Springer Science Business Media B. V.*, 166, 25-33.
- [34] Živčák, M., Brestič, M., Olšovská, K., Slamka, P. (2008). Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil Environ*, 54(4), 133-139.
- [35] Georgieva, K., Maslenkova L., Peeva, V., Markovska, Y., Stefanov, D., Tuba, T. (2005). Comparative study on the changes in photosynthetic activity of the homoiochlorophyllous desiccation-tolerant *Haberlea rhodopensis* and desiccation-sensitive spinach leaves during desiccation and rehydration. *Photosynthesis Research*, 85, 191-203.
- [36] Goltsev, V., Zaharieva, I., Chernev, P., Kouzmanova, M., Kalaji, H. M., Yordanov, I.,... Strasser, R. J. (2012). Drought-induced modifications of photosynthetic electron transport in intact leaves: Analysis and use of neural networks as a tool for a rapid non-invasive estimation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817, 1490-1498.
- [37] Razavi, F., Pollet, B., Steppe, K. and Labeke, M. C. (2008). Chlorophyll fluorescence as a tool for evaluation of drought stress in strawberry. *Photosynthetica*, 46(4), 631-633.
- [38] Kaiser, W. M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, 71(1), 142-149.
- [39] Press, W., Teukolsky, S., Vetterling, W., Flannery, B. (1992). *Numerical Recipes in C-The Art of Scientific Computing*, 2nd ed. Cambridge University Press, New York. 659–661.

- [40] Bennett, C., Franklin, N. (1954). Statistical Analysis in Chemistry and the Chemical Industry. John Wiley & Sons, Inc. 96-620.
- [41] Evans, D. (1969). The Atomic Nucleus. McGraw-Hill, Inc. 774-777.

# Anexos A

## Curvas Experimentales

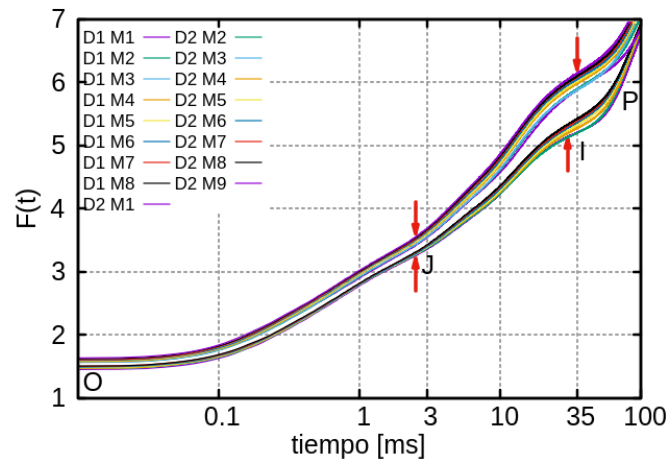


Figura A.1: Todas las curvas obtenidas en el Experimento 1.

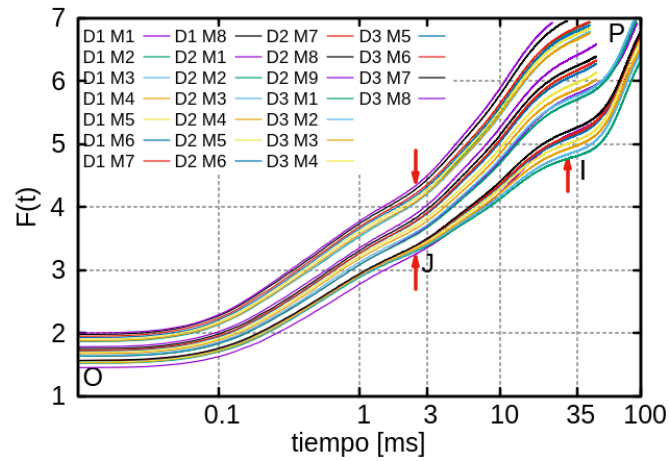
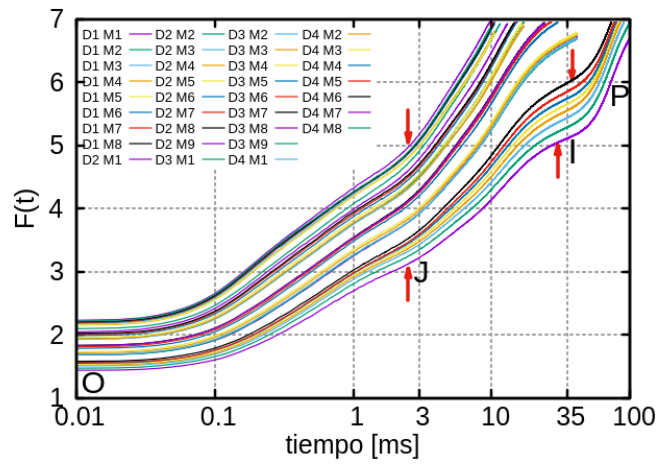


Figura A.2: Todas las curvas obtenidas en el Experimento 2.



**Figura A.3:** Todas las curvas obtenidas en el Experimento 3.

# Anexos B

## Código de Simulación

Este código genera un archivo de texto que muestra como evolucionan los parámetros de la variante del modelo estocástico y la función objetivo.

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

using namespace std;

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

// Funcion que calcula un numero aleatorio entre 1-a/2 y 1+a/2
double randfactor (double a)
{
    double r;
    r= (double) rand()/(double)RANDMAX;
    r=1+(r-0.5)*a;
    return r;
}

//Calculo del tiempo de reaccion con Gillespie
// c= constante 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()/RANDMAX;
    t= (1/(A*c))*log(1/r);

    return t;
}

//Tiempo de reaccion
double ttime (double A, double c, double B, double U)
{
    double r, t;

    if (B>U)
    {
        t= rtime(A,c);
    }
    else
    {
        t=1000000;
    }

    return t;
}

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

// Calculo de la primera parte de la curva de Fluorescencia (Region OJ)
double Fluo1 (double fo, double a, double b, double f)
{
    double r;
    r=fo+a*(1-b)*f/(1-b*f);
    return r;
}

// Calculo de la primera y segunda parte de la curva de Fluorescencia (

```

```

    Regiones OJ y JI)
double Fluo2 (double fo, double a1, double b1, double a2, double b2, double
    f1, double f2)
{
    double r;
    r=fo+a1*(1-b1)*f1/(1-b1*f1)+a2*(1-b2)*f2/(1-b2*f2);
    return r;
}

//Funcion constante cinetica asociada a la region OJ
double Kinetics1 (double& dtt, double& A1, double& B1, double c1)
{
    double t,tao,x;

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

//Funcion constantes cinetica asociada a la regiones JI e IP
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)
  {
    tao= rtime(A2,c2);
    A2--;
    B2++;
    if( tao < dte){
      t=t+tao;
    }
    else {
      t=dte;
    }
  }
  else
  {
    t=dte;
  }
}
dtt=t-dte;
x=B2/N;
return x;
}

int main()
{
  int U1,U2,count ,countx ,pts ,p,n, caux;
  double nllm , ff , fx , dtt ,mm,x1 ,x2 ,x3 ,A1,B1,A2,B2,A3,B3 ,b1 ,b2 ,b3 ,c1 ,c2 ,c3 ,
    k1 ,k2 ,k3 ,t ,tt ,tao ,tao1 ,tao2 ,tao3 ,test ,a1 ,aa1 ,a2 ,aa2 ,a3 ,aa3 ,p1 ,pp1 ,p2 ,
    pp2 ,p3 ,pp3 ,F ,F1 ,F2 ,F3 ,FF ,dif ,sq ,er ,erx ,u1 ,u2 ,v1 ,v2 ,chi2 ;

  srand(time(NULL)); //requerido para "randomness"
  ifstream exp ("experiment.dat"); // datos experimentales
  ofstream sim;
  sim.open ("model.dat"); // datos simulados
  ofstream par ("parml.dat"); // parametros de la curva simulada

  pts=10000;

  ff=1.42; // F0

  k1=2.374; // constante cinetica para la region OJ (1/ms)
  a1=1.49; // delta F1
  p1=0.298;

  k2=0.136; // constante cinetica para la region JI (1/ms)
  a2=2.323; // delta F2
  p2=0.444;

```

```

k3=0.067; // constante cinetica para la region IP (1/ms)
a3=1.932; // delta F3
p3=0.934;

u1=0.86; // tiempos umbrales
u2=0.99;

double eu ,eux ,dd ,delta ;

par<<"k1_....."<<"a1_....."<<"p1_....."<<"k2_....."<<"a2_....."<<"p2_....."<<"k3
....."<<"a3_....."<<"p3_....."<<"u1_...."<<"u2_...."<<"n1_..."<<"_error"<<
endl;

double dtt1 ,dtt2 ,dtt3 ;
int cn=0;
er=0.04; //
dd=0;
count=0;
do {
cout<<" Iteration :_"<<count+1<<"_" ;
dtt1=0;
dtt2=0;
dtt3=0;
A1=N;
A2=N;
A3=N;
B1=0;
B2=0;
B3=0;
sq=0;

//Rango de busqueda de parametros
c1=randfactor(0.001)*k1;
aa1=randfactor(0.01)*a1;
pp1=randfactor(0.001)*p1;

c2=randfactor(0.001)*k2;
aa2=randfactor(0.01)*a2;
pp2=randfactor(0.001)*p2;

c3=randfactor(0.001)*k3;
aa3=randfactor(0.01)*a3;
pp3=randfactor(0.001)*p3;

v1=randfactor(0.01)*u1;
v2=randfactor(0.01)*u2;

```

```

U1=v1*N;
U2=v2*N;
fx=0;
caux=0;
//calculo de error
for( int i = 0; i < pts; i++ )
{
    b1=Kinetics1 ( dtt1, A1, B1, c1);
    b2=Kinetics2 ( dtt2, B1, U1, A2, B2, c2);
    b3=Kinetics2 ( dtt3, B2, U2, A3, B3, c3);
    exp>>t>>FF;
    F=Fluo ( ff, aa1, pp1, aa2, pp2, aa3, pp3, b1, b2, b3);
    dif=FF-F;
    sq=sq+dif*dif;
    if (fx==F) {
        cout<<" atencion :_"<< i<<"_"<<F<<"_"<<b1<<"_"<<dtt1<<"_"<<b2<<"_"<<dtt2
            <<"_"<<b3<<"_"<<dtt3<<endl;
        caux=caux+1;
        if (caux>10) {
            count=count-1;
            break;
        }
    }
    fx=F;
}
chi2=sq/(sigm*sigm);
erx=sqrt(sq/pts);
par<<c1<<"_"<<aa1<<"_"<<pp1<<"_"<<c2<<"_"<<aa2<<"_"<<pp2<<"_"<<c3<<"_"
    <<aa3<<"_"<<pp3<<"_"<<v1<<"_"<<v2<<"_"<<chi2<<"_"<<erx<<endl;
cout<<" Error :_"<<erx<<endl;
if (erx<er && caux<2) {
    k1=c1;
    a1=aa1;
    p1=pp1;

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

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

    u1=v1;
    u2=v2;
    er=erx;
}

```

```

cout<<"Mejor ajuste"<<endl;
cout<< k1 <<"_"<<a1<<"_"<< p1<< "_"<< v1<<endl;
cout<< k2 <<"_"<<a2<<"_"<< p2<< "_"<< v2<<endl;
cout<< k3 <<"_"<<a3<<"_"<< p3<<endl;
nllm=chi2;
}
count++;
exp.clear();
exp.seekg(0, ios::beg);
} while (count<100);

// Creando el archivo final

cout<<"Printing final data"<<endl;
do {
count=0;
dtt1=0;
dtt2=0;
dtt3=0;
A1=N;
A2=N;
A3=N;
B1=0;
B2=0;
B3=0;
sq=0;
caux=0;
fx=0;
for( int i = 0; i < pts; i++ ) {
b1=Kinetics1 (dtt1, A1, B1, k1);
b2=Kinetics2 (dtt2, B1, U1, A2, B2, k2);
b3=Kinetics2 (dtt3, B2, U2, A3, B3, k3);
exp>>t>>FF;
F=Fluo (ff, a1, p1, a2, p2, a3, p3, b1, b2, b3);
dif=FF-F;
sq=sq+dif*dif;
sim<<t<<"_"<<FF<<"_"<<F<<endl;
if (fx==F) {
cout<<"atencion:_"<<F<<"_"<<b1<<"_"<<b2<<"_"<<b3<<"_"<<i<<endl;
caux=caux+1;
if (caux>10) {
break;
count=1;
}
}
fx=F;
}
}
}

```

```

} while(count==1);
  chi2=sq/(sigm*sigm);
  eu=sqrt(sq/pts);
  cout<<"Maximum_Likelihood_Estimation:_"<<endl;
  cout<<"k_""<<"a_""<<"p_""<<endl;
  cout<<k1<<"_""<<a1<<"_""<<p1<<endl;
  cout<<k2<<"_""<<a2<<"_""<<p2<<"_""<<u1<<endl;
  cout<<k3<<"_""<<a3<<"_""<<p3<<"_""<<u2<<endl;
  cout<<"chi2:_""<<chi2<<endl;
  cout<<"Error:_""<<eu<<endl;

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

```

# Anexos C

## Tablas Ajustes por Regiones

### C.1. Experimento 1

#### C.1.1. Día 1

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	1	OJ	200	1.42	2.38	1.549	0.299	0.029	251.13	1.26
		JI	3000	2.969	0.136	2.19	0.444	0.024	4020.55	1.34
		IP	6000	5.159	0.067	1.91	0.943	0.022	7327.9	1.22

Tabla C.1: Ajustes por Regiones, Experimento 1: medida 1 día 1.

#### C.1.2. Día 2

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	23	OJ	200	1.545	2.262	1.648	0.371	0.035	557.32	2.79
		JI	3000	3.193	0.134	2.569	0.488	0.038	7737.8	2.58
		IP	6000	6.09	0.0644	1.20	0.97	0.035	4512	0.75

Tabla C.2: Ajustes por Regiones, Experimento 1: medida 1 día 2.



## C.2. Experimento 2

### C.2.1. Día 1

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	1	OJ	200	1.42	2.373	1.558	0.316	0.025	219.44	1.01
		JI	3000	2.98	0.13	2.258	0.464	0.030	10162	3.3
		IP	6000	5.238	0.061	1.906	0.892	0.014	2740.13	0.46

**Tabla C.3:** Ajustes por Regiones, Experimento 2: medida 1 día 1.

### C.2.2. Día 2

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	23	OJ	200	1.60	2.363	1.73	0.32	0.025	257.99	1.29
		JI	3000	3.33	0.119	1.462	0.428	0.030	10541.8	3.51
		IP	4300	5.96	0.06	1.22	0.84	0.015	2432.74	0.67

**Tabla C.4:** Ajustes por Regiones, Experimento 2: medida 1 día 2.

### C.2.3. Día 3

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	47	OJ	200	1.825	2.494	1.963	0.309	0.035	501.62	2.5
		JI	3000	4.22	0.128	1.775	0.338	0.031	10466.9	3.47
		IP								

**Tabla C.5:** Ajustes por Regiones, Experimento 2: medida 1 día 3. La ausencia de puntos en la región IP es debido a la pérdida de agua.

## C.3. Experimento 3

### C.3.1. Día 1

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
		OJ	200	1.41	2.42	1.469	0.32	0.022	219.44	1.1
1	1	JI	3000	2.879	0.134	2.202	0.365	0.022	3158.48	1.05
		IP	6000	5.089	0.0629	1.961	0.923	0.014	2945.03	0.5

Tabla C.6: Ajustes por Regiones, Experimento 3: medida 1 día 1.

### C.3.2. Día 2

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
		OJ	200	1.65	2.445	1.823	0.311	0.023	188.11	0.94
1	23	JI	3000	3.473	0.131	2.01	0.365	0.028	6667.45	2.22
		IP								

Tabla C.7: Ajustes por Regiones, Experimento 3: medida 1 día 2. La ausencia de puntos en la región IP es debido a la pérdida de agua.

### C.3.3. Día 3

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
		OJ	200	1.89	2.487	2.13	0.30	0.041	679.98	3.4
1	23	JI	1500	4.18	0.135	2.437	0.266	0.026	2610.58	1.74
		IP								

Tabla C.8: Ajustes por Regiones, Experimento 3: medida 1 día 3. La ausencia de puntos en la región IP es debido a la pérdida de agua.

### C.3.4. Día 4

Parámetros										
M	t[h]	Región	pts	$f_{0\alpha}$	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
		OJ	200	2.12	3.22	2.17	0.30	0.035	300.21	1.5
1	71	JI	800	4.68	0.16	2.37	0.30	0.030	1789.87	2.23
		IP								

**Tabla C.9:** Ajustes por Regiones, Experimento 3: medida 1 día 4. La ausencia de puntos en la región IP es debido a la pérdida de agua.



# Anexos D

## Tablas Ajustes Completos

### D.1. Experimento 1

#### D.1.1. Día 1

Parámetros												
M	t[h]	$f_0$	pts	Región	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	1	1.42	20000	OJ	2.382	1.482	0.298	0.87	0.99	0.036	32489.7	1.6
				JI	0.136	2.32	0.444					
				IP	0.067	1.942	0.936					
2	2	1.42	20000	OJ	2.389	1.538	0.298	0.90	0.99	0.031	24009.2	1.2
				JI	0.136	2.271	0.444					
				IP	0.067	1.933	0.938					
3	3	1.435	20000	OJ	2.387	1.574	0.298	0.91	0.99	0.036	33084.7	1.65
				JI	0.136	2.251	0.444					
				IP	0.067	1.911	0.938					
4	4	1.445	20000	OJ	2.389	1.559	0.298	0.91	0.99	0.035	30928	1.55
				JI	0.136	2.27	0.44					
				IP	0.067	1.895	0.938					
5	5	1.445	20000	OJ	2.396	1.565	0.297	0.90	0.983	0.036	33163.9	1.65
				JI	0.136	2.286	0.443					
				IP	0.067	1.901	0.947					
6	6	1.445	20000	OJ	2.394	1.556	0.297	0.90	0.982	0.036	33399.5	1.67
				JI	0.136	2.333	0.443					
				IP	0.067	1.879	0.948					
7	7	1.459	20000	OJ	2.392	1.554	0.297	0.82	0.98	0.036	32508.8	1.63
				JI	0.136	2.335	0.443					
				IP	0.067	1.845	0.947					
8	8	1.48	20000	OJ	2.394	1.533	0.294	0.82	0.98	0.036	32694.4	1.63
				JI	0.136	2.367	0.443					
				IP	0.067	1.787	0.947					

## D.1.2. Día 2

Parámetros												
M	t[h]	$f_0$	pts	Región	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
<b>1</b>	23	1.545	10000	OJ	2.372	1.559	0.306	0.825	0.807	0.038	36463.4	3.65
				JI	0.13	2.732	0.482					
				IP	0.064	1.069	0.972					
<b>2</b>	24	1.55	9500	OJ	2.365	1.529	0.306	0.70	0.72	0.034	27574.8	2.9
				JI	0.13	2.773	0.484					
				IP	0.0645	1.141	0.977					
<b>3</b>	25	1.545	9000	OJ	2.375	1.549	0.311	0.70	0.70	0.035	27228.5	3.03
				JI	0.13	2.75	0.483					
				IP	0.0646	1.19	0.976					
<b>4</b>	26	1.55	9000	OJ	2.366	1.518	0.311	0.72	0.74	0.030	19982.9	2.22
				JI	0.13	2.899	0.483					
				IP	0.0644	1.186	0.979					
<b>5</b>	27	1.55	8800	OJ	2.362	1.543	0.311	0.72	0.73	0.028	17441.9	1.98
				JI	0.13	2.886	0.483					
				IP	0.0644	1.185	0.978					
<b>6</b>	28	1.555	8700	OJ	2.36	1.574	0.31	0.72	0.73	0.025	13960.7	1.60
				JI	0.13	2.897	0.483					
				IP	0.0646	1.182	0.979					
<b>7</b>	29	1.568	8500	OJ	2.365	1.568	0.309	0.70	0.73	0.028	16737.8	1.97
				JI	0.13	2.921	0.482					
				IP	0.0646	1.194	0.978					
<b>8</b>	30	1.578	8000	OJ	2.366	1.524	0.309	0.80	0.75	0.035	24041.1	3.01
				JI	0.13	2.994	0.483					
				IP	0.0647	1.189	0.98					
<b>9</b>	31	1.595	8000	OJ	2.364	1.651	0.305	0.85	0.73	0.035	24488.5	3.06
				JI	0.13	2.912	0.483					
				IP	0.0647	1.214	0.982					

**Tabla D.2:** Ajustes Curvas Completas, Experimento 1, día 2.

## D.2. Experimento 2

### D.2.1. Día 1

Parámetros												
M	t[h]	$f_0$	pts	Región	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	1	1.42	10100	OJ	2.361	1.66	0.316					
				JI	0.131	2.10	0.479	0.77	0.99	0.037	34739.5	3.44
				IP	0.061	1.694	0.889					
2	2	1.48	10100	OJ	2.36	1.664	0.31					
				JI	0.133	1.71	0.467	0.928	0.988	0.039	38515.4	3.81
				IP	0.062	1.725	0.913					
3	3	1.48	10100	OJ	2.36	1.651	0.311					
				JI	0.133	1.746	0.468	0.889	0.984	0.038	36756.5	3.64
				IP	0.062	1.804	0.914					
4	4	1.49	10100	OJ	2.361	1.696	0.311					
				JI	0.133	1.769	0.468	0.911	0.984	0.035	31281.2	3.10
				IP	0.0621	1.827	0.915					
5	5	1.517	11000	OJ	2.364	1.652	0.311					
				JI	0.133	1.91	0.468	0.887	0.987	0.038	39572.6	3.6
				IP	0.0622	1.892	0.92					
6	6	1.53	11000	OJ	2.36	1.65	0.30					
				JI	0.133	1.984	0.506	0.71	0.987	0.033	29443.4	2.68
				IP	0.0621	1.846	0.917					
7	7	1.54	11000	OJ	2.36	1.656	0.30					
				JI	0.133	1.985	0.506	0.71	0.988	0.035	33839	3.08
				IP	0.0621	1.845	0.916					
8	8	1.54	11000	OJ	2.361	1.67	0.30					
				JI	0.133	2.061	0.507	0.664	0.989	0.036	33985	3.09
				IP	0.0622	1.856	0.916					

Tabla D.3: Ajustes Curvas Completas, Experimento 2, día 1.

## D.2.2. Día 2

Parámetros												
M	t[h]	$f_0$	pts	Región	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	23	1.595	10000	OJ	2.201	1.67	0.319					
				JI	0.13	2.48	0.429	0.71	0.78	0.032	23672.6	2.15
				IP	0.059	1.474	0.977					
2	24	1.595	10000	OJ	2.206	1.637	0.319					
				JI	0.13	2.454	0.428	0.70	0.80	0.033	25032.4	2.5
				IP	0.059	1.765	0.978					
3	25	1.605	9000	OJ	2.203	1.671	0.32					
				JI	0.13	2.462	0.429	0.70	0.79	0.034	24753.5	2.75
				IP	0.059	1.957	0.981					
4	26	1.64	9000	OJ	2.202	1.686	0.317					
				JI	0.13	2.569	0.428	0.7	0.8	0.030	10631.9	1.18
				IP	0.059	1.90	0.991					
5	27	1.66	5000	OJ	2.218	1.15	0.32					
				JI	0.128	1.597	0.401	0.7		0.028	8645.22	1.72
				IP								
6	28	1.68	5000	OJ	2.224	1.154	0.318					
				JI	0.128	1.678	0.401	0.7		0.030	9750.32	1.95
				IP								
7	29	1.69	4500	OJ	2.219	1.14	0.318					
				JI	0.128	1.724	0.399	0.70		0.033	12027.9	2.67
				IP								
8	30	1.71	4500	OJ	2.215	1.176	0.318					
				JI	0.128	1.724	0.398	0.7		0.031	10953.8	2.43
				IP								
9	31	1.745	4500	OJ	2.218	1.212	0.314					
				JI	0.128	1.783	0.396	0.7		0.037	15420.1	3.43
				IP								

**Tabla D.4:** Ajustes Curvas Completas, Experimento 2, día 2. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua.



### D.2.3. Día 3

Parámetros												
M	t[h]	$f_0$	pts	Región	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	47	1.825	4300	OJ	2.263	1.31	0.30					
				JI	0.13	2.736	0.46	0.7	0.034	12641.8	2.94	
				IP								
2	48	1.84	4300	OJ	2.267	1.262	0.30					
				JI	0.128	1.774	0.43	0.70	0.035	13439	3.13	
				IP								
3	49	1.853	4300	OJ	2.258	1.258	0.30					
				JI	0.128	1.775	0.424	0.68	0.037	14948.8	3.48	
				IP								
4	50	1.905	4300	OJ	2.692	1.28	0.406					
				JI	0.128	2.473	0.299	0.97	0.031	3876.49	0.90	
				IP								
5	51	1.95	4300	OJ	2.695	1.291	0.406					
				JI	0.128	2.546	0.30	0.97	0.031	3633.45	0.84	
				IP								
6	52	1.958	4300	OJ	2.696	1.31	0.405					
				JI	0.128	2.56	0.30	0.97	0.035	4621.15	1.07	
				IP								
7	53	1.978	3000	OJ	2.697	1.313	0.406					
				JI	0.128	2.539	0.30	0.97	0.034	4244.19	1.41	
				IP								
8	54	1.78	3000	OJ	2.515	1.275	0.345					
				JI	0.135	2.175	0.366	0.892	0.029	4984.93	1.66	
				IP								

**Tabla D.5:** Ajustes Curvas Completas, Experimento 2, día 3. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua.

## D.3. Experimento 3

### D.3.1. Día 1

M	t[h]	$f_0$	pts	Región	Parámetros								
					$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$	
1	1	1.41	11000	OJ	2.416	1.448	0.321						
				JI	0.134	2.231	0.37	0.939	0.983	0.030	24869.2	2.26	
				IP	0.063	1.845	0.923						
2	2	1.435	11000	OJ	2.421	1.507	0.321						
				JI	0.134	2.327	0.371	0.934	0.979	0.035	32854.9	2.9	
				IP	0.063	1.89	0.92						
3	3	1.47	9000	OJ	2.421	1.592	0.321						
				JI	0.134	2.321	0.37	0.957	0.972	0.033	25658.6	2.85	
				IP	0.063	1.919	0.922						
4	4	1.49	8500	OJ	2.42	1.602	0.321						
				JI	0.134	2.41	0.37	0.944	0.966	0.032	21715.6	2.55	
				IP	0.063	1.932	0.93						
5	5	1.51	8500	OJ	2.42	1.608	0.321						
				JI	0.134	2.455	0.37	0.92	0.966	0.035	24149.9	2.84	
				IP	0.063	1.95	0.929						
6	6	1.525	8000	OJ	2.421	1.609	0.321						
				JI	0.134	2.593	0.37	0.92	0.98	0.025	11932.1	1.49	
				IP	0.063	2.00	0.927						
7	7	1.54	8000	OJ	2.42	1.662	0.321						
				JI	0.134	2.626	0.37	0.91	0.98	0.022	9086.97	1.13	
				IP	0.063	2.02	0.929						
8	8	1.557	7500	OJ	2.421	1.695	0.321						
				JI	0.134	2.707	0.37	0.90	0.979	0.020	6444.91	0.86	
				IP	0.063	1.98	0.931						

Tabla D.6: Ajustes Curvas Completas, Experimento 3, día 1.

### D.3.2. Día 2

Parámetros												
M	t[h]	$f_0$	pts	Región	$k_\alpha[\frac{1}{m.s}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	23	1.65	4500	OJ	2.509	1.176	0.316					
				JI	0.13	2.11	0.358	0.902	0.038	14879.9	3.31	
				IP								
2	24	1.655	4500	OJ	2.507	1.173	0.316					
				JI	0.13	2.11	0.358	0.911	0.034	12130.2	2.67	
				IP								
3	25	1.663	4500	OJ	2.509	1.193	0.316					
				JI	0.13	2.092	0.357	0.938	0.031	9640.88	2.14	
				IP								
4	26	1.673	4500	OJ	2.508	1.209	0.316					
				JI	0.13	2.089	0.358	0.898	0.033	10862.1	2.41	
				IP								
5	27	1.685	4500	OJ	2.514	1.241	0.328					
				JI	0.13	2.046	0.359	0.911	0.033	11110.7	2.47	
				IP								
6	28	1.725	4000	OJ	2.526	1.276	0.335					
				JI	0.135	2.162	0.359	0.90	0.022	3572.98	0.89	
				IP								
7	29	1.762	3500	OJ	2.523	1.295	0.335					
				JI	0.135	2.159	0.359	0.905	0.028	5234.89	1.5	
				IP								
8	30	1.78	3000	OJ	2.515	1.275	0.345					
				JI	0.135	2.175	0.366	0.892	0.029	4984.93	1.66	
				IP								
9	31	1.79	3000	OJ	2.514	1.27	0.345					
				JI	0.135	2.181	0.366	0.894	0.028	4400.66	1.47	
				IP								

**Tabla D.7:** Ajustes Curvas Completas, Experimento 3, día 2. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua.

### D.3.3. Día 3

Parámetros												
M	t[h]	$f_0$	pts	Región	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	47	1.877	2000	OJ	2.629	1.258	0.401					
				JI	0.131	2.478	0.308	0.956	0.032	4382.22	2.19	
				IP								
2	48	1.891	2000	OJ	2.631	1.243	0.401					
				JI	0.131	2.40	0.309	0.95	0.035	5107.66	2.55	
				IP								
3	49	1.89	2000	OJ	2.672	1.282	0.392					
				JI	0.131	2.425	0.298	0.97	0.031	4127.43	2.06	
				IP								
4	50	1.905	2000	OJ	2.692	1.28	0.406					
				JI	0.128	2.473	0.299	0.97	0.031	3876.49	1.94	
				IP								
5	51	1.95	1500	OJ	2.695	1.291	0.406					
				JI	0.128	2.546	0.30	0.97	0.031	3633.45	2.42	
				IP								
6	52	1.958	1500	OJ	2.696	1.31	0.405					
				JI	0.128	2.56	0.30	0.97	0.035	4621.15	3.08	
				IP								
7	53	1.978	1500	OJ	2.697	1.313	0.406					
				JI	0.128	2.539	0.30	0.97	0.034	4244.19	2.83	
				IP								
8	54	1.99	1500	OJ	2.709	1.347	0.407					
				JI	0.13	2.773	0.304	0.97	0.038	5386.85	3.59	
				IP								
9	55	2.03	1500	OJ	2.71	1.367	0.403					
				JI	0.13	2.773	0.304	0.97	0.038	5311.91	3.54	
				IP								

**Tabla D.8:** Ajustes Curvas Completas, Experimento 3, día 3. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua.

### D.3.4. Día 4

Parámetros												
M	t[h]	$f_0$	pts	Región	$k_\alpha[\frac{1}{ms}]$	$\Delta F_\alpha$	$p_\alpha$	$q_{OJ}$	$q_{JI}$	error	$\chi^2$	$\overline{\chi^2}$
1	71	2.11	1300	OJ	3.14	1.58	0.27					
				JI	0.16	2.539	0.31	0.93	0.027	1871.68	1.44	
				IP								
2	72	2.10	1300	OJ	3.147	1.53	0.27					
				JI	0.16	2.50	0.31	0.92	0.031	2566.27	1.97	
				IP								
3	73	2.11	1300	OJ	3.148	1.518	0.27					
				JI	0.16	2.474	0.31	0.92	0.032	2663.08	2.05	
				IP								
4	74	2.123	1300	OJ	3.153	1.535	0.30					
				JI	0.16	2.514	0.31	0.94	0.032	2688.77	2.07	
				IP								
5	75	2.133	1300	OJ	3.145	1.547	0.30					
				JI	0.16	2.516	0.31	0.95	0.037	3520.35	2.71	
				IP								
6	76	2.142	1050	OJ	3.144	1.537	0.30					
				JI	0.16	2.506	0.31	0.94	0.036	3285.39	3.13	
				IP								
7	77	2.163	1000	OJ	3.155	1.56	0.30					
				JI	0.16	2.514	0.31	0.94	0.037	3268.04	3.27	
				IP								
8	78	2.166	1000	OJ	3.148	1.546	0.30					
				JI	0.16	2.514	0.31	0.96	0.035	2933.84	2.93	
				IP								

**Tabla D.9:** Ajustes Curvas Completas, Experimento 3, día 4. La ausencia de puntos en las regiones IP es debido a la pérdida de agua.