



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DISEÑO DE UN ESPECTROFLUORÓMETRO PORTÁTIL A PARTIR
DE UN TELÉFONO INTELIGENTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

RAÚL GONZÁLEZ AYALA

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. MANUEL GUTIERREZ AGUILAR**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX
AÑO 2022**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. SANCHEZ NIETO SOBEIDA
VOCAL: Dr. GUTIERREZ AGUILAR MANUEL
SECRETARIO: Dra. LARA NUÑEZ AURORA
1er. SUPLENTE: Dra. MALDONADO JIMENEZ PERLA DEYANIRA
2do. SUPLENTE: Dr. PEDRAZA CHAVERRI JOSE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 115, Departamento de Bioquímica
Edificio E, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México,
Coyoacán, CDMX. C.P. 04510
México.

Raúl González Ayala
(Sustentante)

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
(Asesor)

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de forjar mi vocación y de conocer personas extraordinarias.

A la Facultad de Química por el apoyo a lo largo de estos años y por permitirme ser una persona con profesión en la vida.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento para llevar a cabo la presente tesis mediante el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA208121 “Caracterización del transporte de calcio mitocondrial en la fisiología de *Arabidopsis thaliana*”.

A los miembros del honorable jurado.

Dedicatoria

Quiero agradecer especialmente a toda mi familia, mis abuelos por su apoyo y sus enseñanzas soy la persona que soy, mis padres que serán mi ejemplo a seguir y siempre me dan su amor incondicional, mis hermanos, ya que, con ellos, crecí, reí, luchamos por nuestros sueños y triunfamos juntos, tíos y primos. Donde todos creyeron en mi desde el día uno y nunca me dejaron de apoyar en cualquier circunstancia, por guiarme al crecer y enseñarme a que todos los sueños pueden ser posibles con constancia, empeño y respeto.

A mi novia, que ella desde que éramos amigos, siempre me apoyo en todo lo que estaba en sus manos, y desde entonces nunca ha dejado de apoyarme, ella para mi es y será un pilar importante en mi vida y con su amor, me ha hecho convertirme en una mejor persona.

A todas estas personas que me apoyaron para realizar este proyecto. Al doctor Manuel Gutiérrez Aguilar, por su profesionalismo, apoyo y asesoría que me ha proporcionado, mis profesores que he tenido desde el inicio y termino de mi escolaridad ya que sin ellos no estaría donde estoy ahora y a mis sinodales por sus valiosas aportaciones que me han dado.

Por último, quiero dedicarle esto a todos mis amigos que tengo desde primaria a la universidad, en su tiempo me han apoyado cada uno de ellos en cada etapa de mi vida, donde cada día de mi escuela o salidas que tuvimos me la pasaba muy bien y me hacían saber lo feliz que puede ser la vida.

Contenido

1. Antecedentes	13
1.1 Espectrofotómetros y fluorómetros	15
1.1.1 Aplicaciones de un espectrofluorómetro: La clorofila como unanalito.....	19
1.1.2 Efecto Kautsky, un sistema de medición modulado.	23
1.2 La clorofila como pigmento fluorescente	24
1.3 Características bioquímicas de la clorofila.....	25
1.4 Simplificación tecnológica y el avance de la ciencia	28
1.5 El teléfono inteligente como herramienta científica.....	30
1.6 Control de sensores de un teléfono inteligente: Programación por bloques	32
2. Justificación	34
3. Hipótesis	34
4. Objetivo.....	34
4.1 Objetivo general.....	34
4.2 Objetivos particulares.....	34
5. Metodología y procedimiento experimental.....	35
5.1 Materiales.....	35
6. Resultados	36
6.1 Diseño de la App.....	36

6.2 Diseño de los componentes físicos del espectrofluorómetro	42
6.2.1 Modelo 1.....	42
6.2.2 Modelo 2	44
6.2.3 Modelo 3.....	47
6.2.4 Modelo 4.....	49
6.3 Mediciones de fluorescencia	51
7. Discusión de Resultados	56
7.1 Elaboración de la aplicación para teléfono inteligente.....	56
7.2 Diseño del espectrofluorómetro y mediciones en hojas con diferente estado de pigmentación....	57
7.3 Comparación de los resultados con un espectrofluorómetro convencional	59
8. Conclusiones.....	60
9. Perspectivas.....	61
10.Bibliografía.....	61
ANEXO 1. Costos promedio de diferentes espectrofluorómetros de laboratorio de diferentes marcas comerciales.	73
ANEXO 2. Sensores comúnmente encontrados en dispositivos móviles inteligentes	74
ANEXO 3. Estudios de fluorescencia en hojas de plantas sometidas a diferentes condiciones y concentraciones.....	77

Índice de Figuras y Tablas

Figura	Contenido	Página
1	Esquema de funcionamiento de un es espectrofluorómetro y un fluorómetro	18
2	Fluorómetro de clorofila de excitación continúa avanzada portátil, modelo Handy PEA+, de la empresa, Hansatech-instrument.	20
3	Fluorómetro de clorofila de pulso modulado portátil de campo (FMS 2+) de la empresa Hansatech-Instruments.	23
4	Efecto de las estaciones en la fluorescencia de la clorofila a nivel global en plantas terrestres.	27
5	Cloroplastos de <i>Spinacia oleracea</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> al ser irradiadas con luz blanco y en el campo de autofluorescencia de la clorofila al ser excitada a 400nm.	28
6	Captura de pantalla del diseño gráfico MIT App inventor®	36
7	Módulo de bloques “illuminance”	36
8	Módulo de bloques para el control del sensor de luz ALS en el dispositivo móvil	38
9	Módulo de bloques “variables” para el diseño de la gráfica en el dispositivo móvil.	39
10	Programación modular en bloques de la App para el uso del sensor ALS del dispositivo móvil	40

11	Interfase gráfica de la App en el ambiente gráfico	41
12	Esquema final de programación por bloques de la aplicación MIT App Inventor para el dispositivo móvil.	42
13	Montaje experimental y esquema del primer prototipo del espectrofluorómetro portátil.	43
14	Transiluminador o filtro de luz casero	44
15	Montaje experimental y esquema del segundo prototipo del espectrofluorómetro portátil.	46
16	Montaje experimental y esquema del tercer prototipo del espectrofluorómetro portátil.	48
17	Montaje experimental y esquema del cuarto y último prototipo del espectrofluorómetro portátil.	50
Gráfica	Contenido	Página
1	Resultados de las mediciones promedio de la fluorescencia elaborados por medio del primer espectrofluorómetro hacia hojas recién cortadas.	52
2	Resultados de las mediciones promedio de la fluorescencia elaborados por medio del segundo espectrofluorómetro hacia hojas recién cortadas.	53
3	Resultados de las mediciones promedio de la fluorescencia elaborados por medio del tercer espectrofluorómetro hacia hojas recién cortadas.	54

4	Resultados de las mediciones promedio de la fluorescencia elaborados por medio del cuarto espectrofluorómetro hacia hojas recién cortadas.	55
5	Gráfica 5. Grafica comparativa, señal de fluorescencia de clorofila a (Chl a) medida con un fluorómetro PAM en una hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	60
ANEXO		
1	Costos promedio de diferentes espectrofluorómetros de laboratorio de diferentes marcas comerciales.	73-74
2	Sensores comúnmente encontrados en dispositivos inteligentes.	74-77
TABLAS SUPLEMENTARIAS		
1	Resultados obtenidos por el cuarto espectrofluorómetro desarrollado en hojas verdes bajo diferentes condiciones.	78
2	Resultados obtenidos por el cuarto espectrofluorómetro desarrollado en hojas verdes suspendidas en etanol en diferentes tiempos.	78
3	Resultados obtenidos por el cuarto espectrofluorómetro desarrollado en hojas verdes suspendidas en agua con una cucharada de sal bajo diferentes tiempos.	79
4	Resultados obtenidos por el cuarto espectrofluorómetro desarrollado en hojas verdes suspendidas en agua con dos cucharadas de sal bajo diferentes tiempos.	79

Definiciones de abreviaturas del presente texto

Abreviatura	Definición	Abreviatura	Definición
App	Aplicación	Fv	Fluorescencia variable
LED	Light Emitting Diode	HP	espectrofotómetros de alto rendimiento
nm	Nanómetros	Vis	Visible
UV	Ultravioleta	NIR	espectrofotómetros de infrarrojo cercano
PDA	Detector de matriz de fotodiodo	%T	Porcentaje de Transmitancia
IC	Chip de integrado	P&P	Fluorometría de bomba y sonda
Seg	Segundos	Fmin, Fo	Fluorescencia mínima
FRR	Tasa de repetición rápida	Fmax, Fm	Fluorescencia máxima
PDP	Fluorometría de la sonda	chl a	Clorofila a
FIRE	Técnica de inducción y relajación de fluorescencia	chl b	Clorofila b
ALF	Fluorometría láser avanzada	Δp	Fuerza Protón Motriz
PAM	Excitación continua y modulación por pulso	UV-B	Rayos Ultravioleta B
PEA+	Analizador de eficiencia fotosintética de la planta	PCR	Polymerase chain reaction
PSI	Fotosistema uno	RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
PSII	Fotosistema dos	TAOS	Chip ambiental ams AG
ALS	Sensor de luz ambiental y de proximidad	HAS	Hoja en agua con sal
CH0	Detector de luz	HEE	Hoja en etanol
CH1	Detector de proximidad	HCC	Hoja con cortes
LUX	Unidad de illuminance	HN	Hoja neutral

FRET	Transferencia de energía de resonancia fluorescente	Código QR	Quick Response
mW	Milli-Watts	PC	Personal Computer
MIT	Instituto Tecnológico de Massachusetts	HAS 1C	Hoja en agua con sal, una cucharada
NFC	Near Field Communication	HAS 2C	Hoja en agua con sal, dos cucharadas
HAN	Hoja en agua neutral		
HAC	Hoja en agua caliente		
HAF	Hoja en agua fría		

Resumen

En los últimos años se han actualizado diversos equipos de laboratorio con la finalidad de mejorar su resolución, portabilidad y disminuir su precio. Por ello, en la presente tesis se diseñó un espectrofluorómetro portátil compuesto por una aplicación para teléfono inteligente (App) acoplada a una lámpara LED, para medir la auto fluorescencia de la clorofila en hojas de la planta *Impatiens walleriana*. Los cambios en este parámetro fueron medidos utilizando el sensor de luz integrado al dispositivo móvil. Los resultados obtenidos demuestran que la fluorescencia de la clorofila puede ser registrada en una hoja recién cortada y en menor proporción en hojas semisecas o en hojas tratadas con etanol. El espectrofluorómetro portátil desarrollado tiene el potencial de ser utilizado en el campo y se podría sustituir en un futuro a un espectrofluorómetro clásico de laboratorio, con las ventajas de tener un menor costo y mayor accesibilidad.

1. Antecedentes

La ciencia, tecnología e innovación se han consolidado como pilares importantes en el desarrollo de la sociedad con el paso del tiempo. Lo anterior es posible debido a que los tres aspectos del conocimiento se encuentran entrelazados. Por ejemplo, la ciencia e innovación contribuyen en diversas formas al desarrollo de implementos tecnológicos, en forma de herramientas y técnicas que permitan estudios más detallados y reproducibles. De igual forma, no se pueden concebir los desarrollos tecnológicos -basados en el método científico- sin un componente sustancial de innovación. En tal sentido, es común encontrar adecuaciones a técnicas de laboratorio y/o métodos analíticos ya existentes con miras a proporcionar innovaciones en los campos científico o industrial. Tales adecuaciones facilitan la investigación aplicada, desarrollo y perfeccionamiento de nuevas tecnologías, permitiendo así el desarrollo de la ciencia en beneficio de la sociedad [Brooks, 1994] [Laurens, 2009].

El trabajo en los laboratorios de investigación requiere usualmente equipos altamente especializados para realizar mediciones. En muchos casos, tales equipos pueden ser costosos, de difícil obtención o de difícil utilización en el campo. Esto ocasiona que muchos experimentos de campo no sean realizados *in situ*. Por lo anterior, los resultados obtenidos de muestras trasladadas al laboratorio pueden verse afectados, debido a que las condiciones durante el traslado de las muestras de estudio pueden variar. Un ejemplo que permite ilustrar lo anterior, se da en el análisis de muestras usando espectrofotómetros y espectrofluorómetros. En muchas ocasiones, este tipo de dispositivos son de difícil transporte. Sin embargo, son instrumentos muy útiles que permiten detectar y/o cuantificar compuestos específicos en una muestra [Valentine y cols, 2013].

El espectrofluorómetro tiene varias aplicaciones, entre las que figuran el estudio de la cinética de reacciones [Fernández, 2001], el estudio de interacciones lípidos-proteínas, relaciones estructura-función e interacciones de biomoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), secuenciación de ácidos nucleicos, inmunoensayos empleados en el análisis clínico [Córsico, 2013], determinación de calidad del agua mediante la medición de materia orgánica [Zhang y cols., 2013], determinación de la autenticidad de vinos [Ranaweera y cols. 2020] e incluso en la investigación de la fotoquímica de sistemas biológicos, como es el caso de la medición de la autofluorescencia de la clorofila. En el caso de este último ejemplo, el análisis de fluorescencia permite caracterizar la homeostasis de los fotosistemas en organismos fotótrofos. Estos indicadores nos permiten elucidar -entre otras cosas- cómo es que las plantas responden a cambios ambientales y nos permiten identificar características fenotípicas deseables de estas [Neil y cols., 2004]. Estas mediciones se pueden llevar a cabo con mucha facilidad. No obstante, a pesar de que este método es relativamente sencillo de implementar, existen factores que pueden interferir con la reproducibilidad de los resultados y usualmente los equipos diseñados para medir autofluorescencia de la clorofila son de elevado precio. Este último factor limita considerablemente la utilización de estas tecnologías en muchos laboratorios [Murchie y cols., 2013] [Sauer y cols., 2011].

Por las razones anteriormente mencionadas, en el presente trabajo de tesis se decidió diseñar un espectrofluorómetro portátil haciendo uso de los sensores integrados en un teléfono inteligente. Un espectrofotómetro portátil diseñado a partir de un teléfono inteligente podría constituir una alternativa de sencillo uso y bajo costo a los espectrofotómetros portátiles disponibles en el mercado. Para ilustrar la aplicabilidad del espectrofluorómetro portátil, se decidió medir la fluorescencia de la clorofila en hojas de la planta *I. walleriana*.

1.1 Espectrofotómetros y fluorómetros

La espectrofotometría se centra en aquellas técnicas que permiten el análisis de la absorbencia de una muestra. Esta disciplina hace uso de equipos que miden cambios en la intensidad de la luz al pasar a través de una muestra. Estos equipos típicamente se componen de las siguientes partes: la fuente de radiación (por ejemplo lámparas de xenón, láser o Light Emitting Diodes (LEDs) que permiten generar luz en regiones específicas del espectro electromagnético); un monocromador de excitación (que selecciona la longitud de onda adecuada para la excitación de la muestra) y un fotomultiplicador, que recibirá las ondas lumínicas y las transformará en una señal eléctrica asociada a un convertidor que traduce la señal en un valor numérico relacionado con la intensidad de la luz que se emitió [AGSanalitica, 2021].

Un espectrofotómetro de buena calidad debe tener una fuente de luz brillante, estable, de larga vida útil y bajo costo. La mayoría de los espectrofotómetros convencionales trabajan con dos tipos de lámpara: tungsteno/halógena, la cual es la que se utiliza para los rangos visibles ya que emite luz de 340 nm a 3500 nm en el infrarrojo cercano y la lámpara de deuterio (un isótopo de hidrógeno que contiene un neutrón adicional en su núcleo) para las mediciones ultravioleta ya que esta lámpara emite luz de 150 nm a 400 nm [Shimadzu, 2021]. Cabe mencionar que otros equipos utilizan otro tipo de lámparas como la lámpara de xenón, flash entre otros [AGSanalitica, 2021].

Los espectrofotómetros convenciones también utilizan un monocromador para la separación de las ondas de luz, ya que estos dispositivos hacen que la luz se refracte y entre en el nuevo medio a un ángulo diferente, así como lo describe el principio de Huygens [Rajabalipanah y cols., 2019]. Este índice de refracción en muchos materiales varía con la longitud de onda o

la luz utilizada, lo que ocasiona que diferentes luces se refracten de manera diferente [Shimadzu, 2021]. En los equipos convencionales de espectrofotometría se utilizan dos tipos de monocromadores: el prisma y las rejillas de difracción, debido a las propiedades de las rejillas de difracción, los equipos son más compactos, por lo que se utilizan estos últimos con mayor frecuencia. El prisma logra la dispersión debido a la diferencia en el índice de refracción del material según la longitud de onda y la rejilla de difracción utiliza la diferencia en la dirección de difracción para cada longitud de onda debido a la interferencia [Cao y cols.,2019; Shimadzu, 2021].

En la actualidad los espectrofotómetros se diseñan utilizando una matriz de diodos. Esta característica les permite mediciones rápidas y simultáneas en el espectro UV/visible completo. Estos instrumentos típicamente son de haz único y su rejilla de difracción está detrás de la muestra para dispersar directamente la luz desde el detector de diodos [Shimadzu, 2021]. Cuentan con un detector de matriz de fotodiodos (PDA): Una matriz lineal de fotodiodos en un solo chip de circuito integrado (IC). El detector de red de diodos permite la recolección rápida de lecturas. Un instrumento con esta matriz recopila un espectro UV / Visible de rango completo dentro de un intervalo de milisegundos a segundos (s), según el diseño. Por esta razón los equipos con este diseño son ideales para la recolección de datos completos sobre distintos tipos de muestras.

Existen dos tipos de sistemas espectrofotométricos: El simple (un solo haz) y el de haz doble. En el primero, la luz monocromática ingresa al compartimiento de la muestra y se dirige al detector directamente. En los sistemas de haz doble, el monocromador se divide en un haz de muestra y haz de referencia antes de dirigirse al detector, este último tiene un diseño más

complejo debido a que presenta un mecanismo que divide el haz en dos: El de muestra y de referencia [Shimadzu, 2021].

Existen otros tipos espectrofotómetros de alto rendimiento (HP) en donde el instrumento puede detectar ondas en el espectro UV/Vis y UV/ Vis/ NIR. Se pueden diferenciar estos dos últimos por medio de una rejilla de difracción para el rango espectral del espectrofotómetro de infrarrojo cercano (NIR). Estos equipos tienen un componente clave que permite medir valores muy bajos en el porcentual de transmitancia (%T). Estos instrumentos de alto rendimiento tienen dos rejillas del mismo tipo que trabajan en conjunto para reducir la luz de ruido de los instrumentos, la cual es la radiación que sale del monocromador de todas las longitudes de onda distintas del ancho de banda deseado [Shimadzu, 2021].

Los espectrofotómetros de laboratorio varían en precio en función de las características del equipo, sus accesorios y la sensibilidad que poseen en cuanto a la detección de muestras. No obstante, el precio de lista de muchos equipos sigue siendo relativamente elevado (ver anexo 1).

Por otro lado, los fluorómetros o espectrofluorómetros son dispositivos de funcionamiento similar a los espectrofotómetros. Ambos siguen principios de funcionamiento similares: Una fuente de luz llamada “de excitación” pasa por el filtro o monocromador siendo incidida sobre la muestra. Sin embargo, en el caso de los fluorómetros la luz que incide sobre las moléculas de una muestra excita electrones en estas y al regresar a su estado basal, hay un proceso de liberación de energía en forma de un fotón (efecto Compton). Esta luz fluorescente es emitida en todas direcciones, pero algunas de ellas pasan por un segundo filtro o monocromador de emisión llegando al detector que se encuentra a 90° con respecto al haz de luz incidente. Esto se hace para minimizar el riesgo de que la luz incidente

transmitida llegue al detector de fluorescencia, donde ahí pasará al detector y se obtendrá un valor numérico de la muestra medida (Fig. 1).

Entre las diferencias entre un fluorómetro y un espectrofluorómetro destaca que, en un fluorómetro, el haz de luz pasa por un filtro (Fig. 1A) mientras que, en un espectrofluorómetro, este para a través de un monocromador (Fig.1B) [Charro C., 2018].

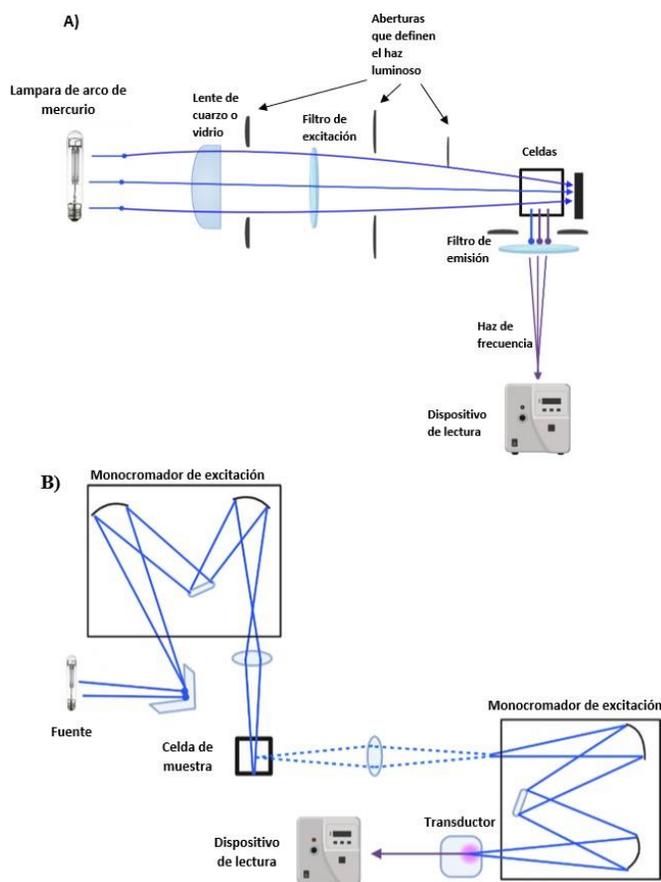


Figura 1. Esquema de funcionamiento de un (A) fluorómetro y un (B) espectrofluorómetro. La diferencia más grande entre ambos es que el fluorómetro usa filtros ópticos para el paso de luz ubicados, mientras que el espectrofluorómetro usa monocromadores. Imagen modificada de Charro, 2018.

Como se mencionó anteriormente, un fluorómetro mide la fluorescencia o bien la luz emitida por las muestras experimentales. Cuando la fluorescencia aumenta, la luz a una longitud de

onda específica excita a los electrones de la muestra, y al regresar al estado basal emiten luz en una longitud de onda mayor.

La fluorescencia producida emite en longitudes de onda específicas, del cual se selecciona luz a través de un monocromador conectado a un detector fotomultiplicador similar al espectrofotómetro. Es importante saber que un fluorómetro detecta la cantidad de luz que regresa hacia el sensor, no la cantidad de objetos que brillan por la fluorescencia. De esta manera el fluorómetro nos permite estudiar varios atributos de la fluorescencia en una muestra de estudio (intensidad, longitud de onda espectral, vida útil, interacciones de disolvente-soluto, interacciones intermoleculares y macromoleculares, entre otros). La medición de la fluorescencia por medio de los fluorómetros es comúnmente usada para el análisis cualitativo y cuantitativo en las muestras de estudio. Esto hace su utilización muy común en las ramas de la química, bioquímica y biología entre otras disciplinas [HORIBA, 2021; Oceannetworks, 2021].

1.1.1 Aplicaciones de un espectrofluorómetro: La clorofila como unanalito.

Existen diversas técnicas de medición por medio del espectrofluorómetro. Algunas de las más usadas en la actualidad son: el analizador de eficiencia fotosintética de la planta (PEA), [Strasser y cols., 1992], fluorimetría de bomba y sonda (P&P) [Mauzerall, 1972; Falkowski y cols., 1986], tasa de repetición rápida (FRR) [Kolber y cols., 1998], bomba durante la fluorimetría de la sonda (PDP) [Strasser, 2001]. La técnica de inducción y relajación de fluorescencia (FIRE) [MY Gorbunov, 2004], fluorimetría láser avanzada (ALF) [Chekalyuk y cols., 2008], excitación continua y modulación por pulso (PAM) [Hansatech instrument. 2021; Schreiber y cols., 1986]. Estas dos últimas técnicas son similares a la que se pretende

utilizar en el presente proyecto, en términos de sus principios y función. Este tipo de fluorómetros utiliza luz LED roja de alta intensidad, con el objetivo de inducir una respuesta rápida de fluorescencia de clorofila en una muestra vegetal adaptada a la oscuridad.

Por lo anterior, estos equipos constan de un adaptador de hojas y una herramienta que proporciona una aclimatación a la oscuridad para la muestra (para la medición de la máxima eficiencia fotoquímica de la hoja a analizar). Este instrumento define el área de medición mientras evita la entrada de luz ambiental hacia el fotodiodo altamente sensible que contiene el sistema para la detección de fluorescencia de clorofila (Fig.2) [Hansatech instrument.,2021].



Figura 2. Fluorómetro de clorofila de excitación continua avanzada portátil, modelo Handy PEA+, de la empresa, Hansatech-instrument. El equipo contiene: A) Estuche portátil, donde se guarda el instrumento y accesorios para recolectar resultados en el campo, B) La unidad del sensor compacto y de teclado táctil con su matriz de 3 LED rojos ultrabrillantes C) Leafclip de hojas de adaptación a la oscuridad para mantener a las hojas en un estado de relajación.

El sistema Handy PEA+ está diseñado para adaptar a la hoja a un ambiente de oscuridad, ocasionando que el conjunto de aceptores de electrones de PSII se oxide gradualmente, hasta que llegue al punto en que todos los centros de reacción de PSII sean capaces de realizar fotoquímica. Al ser activada la fuente de luz sobre la muestra, se observará un aumento

exponencial de la fluorescencia de la clorofila por alrededor de un segundo. Posteriormente la fluorescencia presentará una disminución paulatina y sostenida, hasta llegar a valores constantes [Hansatech., 2021].

Este tipo de mediciones son relativas. La fluorescencia depende de la intensidad de luz de emisión, la respuesta que presente la planta ante esas nuevas condiciones de luz que se le esté proporcionando y la concentración de clorofila que tenga en las hojas estudiadas. Es importante que las mediciones se realicen en circunstancias comparables (en caso de que sea necesaria la comparación o bien para realizar mediciones de un procedimiento experimental). También es importante saber que, si los datos de fluorescencia mínima (F_o) y máxima (F_m) no son determinados con precisión, todos los valores calculados serán inexactos, ya que F_o depende del diseño del instrumento. Este tipo de dispositivos registran rápidamente la señal de fluorescencia inducida por la iluminación y también utilizan un sistema de detección rápido capaz de registrar cada 10 microsegundos cambios en la fluorescencia, siempre y cuando la radiación de excitación no varíe en intensidad durante la medición. Si esto sucede, F_o y F_m no podrán compararse. Una ventaja que tiene este equipo al usar luz LED es que alcanza casi instantáneamente la intensidad máxima cuando se ilumina. Por esta razón, la luz debe ser de intensidad suficiente para saturar a los fotosistemas de la planta, de tal forma que no provoque fluorescencia adicional. Si la intensidad luminosa no es saturante, la fluorescencia alcanzará un pico, pero no será la señal de fluorescencia máxima posible (es decir F_m) y por lo tanto no se podrá calcular la relación entre F_m/F_o [Hansatech, 2021; Kautsky y cols., 1931].

La fluorescencia del sistema PAM se usa para el estudio de la inducción y extinción de la fluorescencia de la clorofila. Este tipo de sistemas usan una luz de excitación pulsante rápida

para inducir una emisión de fluorescencia correspondiente. Utilizan tres tipos de fuentes de luz distintas: Luz de pulso débil ($<0.1 \mu\text{mol fotones} / \text{m}^2 / \text{s}$), luz actínica de intensidad moderada (0 a $3000 \mu\text{mol fotones} / \text{m}^2 / \text{s}$) la cual impulsa la fotosíntesis -y, por último- una luz saturante de alta intensidad (hasta $18.000 \mu\text{mol fotones} / \text{m}^2 / \text{s}$), de tal manera que este equipo puede detectar y medir la señal de fluorescencia y despreciar cualquier otro tipo de señal [Hansatech,2021; Brooks y cols., 2011].

El pico de emisión de fluorescencia está entre la región roja del espectro (685 nm) y se extiende a la región infrarroja de 800 nm [Krause y cols., 1991] (Ver figura 3).



Figura 3. Fluorómetro de clorofila de pulso modulado portátil de campo (FMS 2+) de la empresa Hansatech-Instruments. A) unidad de control que aloja todos los componentes electrónicos, ópticos y fuentes de luz. B) Clip de hojas FMS / PTL, para mediciones de luz ambiental con el cable de fibra óptica. C) Sistema de batería intercambiable en campo. D) Batería de 2,0 Ahr plomo-ácido, capaz de durar 5 horas de iluminación actínica continua de $3,500 \text{ mol/m}^2 \text{ s}$. E) Leafclip de hojas de adaptación a la oscuridad FMS. F) adaptadores de cable de fibra óptica.

Una diferencia entre PAM y el sistema de extinción continua es que este último discrimina algunas señales de luz usando la luz actínica (650 nm), la cual se encarga de impulsar la fotoquímica, evitando de esta manera longitudes de onda no fluorescentes. Otra desventaja que se tiene con este sistema es que debe de protegerse de la luz ambiental durante su uso ya que el componente rojo / rojo lejano de la luz diurna se adiciona a la señal de fluorescencia, con la consecuente afectación en los resultados experimentales [Hansatech, 2021].

Por esto, el uso de PAM evita que la luz ambiental afecte a los resultados, ya que usa una modulación a pulso, separando de esta manera la luz actínica de la señal de fluorescencia [Ögren y cols., 1985]. La separación de estas señales se debe a que la luz LED de color ámbar induce una señal de fluorescencia pulsada de la muestra, excluyendo de esta manera a la luz ambiental. También posee un filtrado óptico que permite que sólo tres señales lleguen al detector: Luz ambiental de longitudes de onda de fluorescencia, la señal de fluorescencia no pulsada inducida por la luz ambiental y la señal de fluorescencia inducida por el haz modulador [Hansatech, 2021].

1.1.2 Efecto Kautsky, un sistema de medición modulado.

El efecto Kautsky fue descubierto por Kautsky y Hirsch en el año 1931. Ellos notaron en varios tipos de hojas que las transiciones de condiciones oscuras a luminosas se caracterizaban por un rápido aumento de la intensidad de la fluorescencia en la planta. Al cabo de unos segundos registraron una disminución paulatina en la fluorescencia, hasta llegar con el tiempo a un nivel mínimo. Ellos observaron que la fluorescencia se mantenía en un estado mínimo por un periodo relativamente largo de tiempo [Kalaji y cols.,2017]. Al

permanecer estable, este valor mínimo indicaba un valor estacionario denominado “extinción no fotoquímica” producida por un probable mecanismo de protección que tiene la planta, evitando de esta manera los daños debidos al exceso de luz. [Kautsky y cols., 1931].

En otras palabras, las hojas de la planta se tienen que adaptar a la oscuridad para que el conjunto de aceptores de electrones de fotosistema II (PSII) se oxide gradualmente. En estas condiciones todos los centros de reacción de PSII son capaces de realizar la fotoquímica de la clorofila. Cuando la hoja es iluminada repentinamente con una fuente de luz de alta intensidad, se observará un rápido aumento de la fluorescencia seguido de una lenta disminución en la intensidad de la fluorescencia (aproximadamente 2 min) como lo indica el efecto Kautsky, hasta que la fluorescencia llegue a un nivel asintótico [Hansatech, 2021].

Por otra parte, las curvas de inducción de Kautsky se deben de trazar en un eje logarítmico para observar el aumento polifásico del sistema, hasta obtener un máximo valor de fluorescencia de la clorofila debido a que las reacciones que causan las diferentes cinéticas ocurren típicamente en los primeros 300 ms de iluminación (3 s) [Strasser y cols, 2001].

a. La clorofila como pigmento fluorescente

Los pigmentos fotosintéticos son sustancias capaces de desempeñar múltiples funciones fisiológicas, tales como la captación de energía lumínica y transformarla en energía química mediante el proceso de la fotosíntesis. Los pigmentos de la planta tienen también otras funciones como regular la adaptabilidad de la planta ante cambios en las condiciones del ambiente, la atracción de especies polinizadoras, etc. [Reol, 2003].

Las clorofilas son el pigmento biológico más abundante en la tierra y deben su coloración verde a la capacidad de absorber las fracciones roja y azul de la luz solar [Reol, 2003]. La mayor proporción de la energía absorbida por los organismos vivos (45 %) está concentrada

entre los 380 nm y los 710 nm, que constituye el rango de absorción de las clorofilas y los pigmentos accesorios [Larcher, 1995], no absorbiendo así los demás colores cuya mezcla apreciamos en diversos tonos de verde. Las hojas pueden llegar a contener hasta 1 g/m² de clorofila, aunque esta concentración es muy variable entre especies y sobre todo depende, entre otros factores, de la especie, el tamaño de hojas, estado nutricional, la edad o la historia lumínica previa de la planta [Reo, 2003]. Sin importar la concentración, la clorofila permite que otras moléculas contenidas en las membranas tilacoidales (i.e. plastoquinonas) funcionen como acarreadores de electrones durante el proceso de la fotosíntesis [David y cols., 2013].

b. Características bioquímicas de la clorofila

Las clorofilas son pigmentos fotosintéticos verdosos que poseen una estructura primaria soluble en solventes como el etanol y en lípidos. Se componen por un ion magnesio central (Mg²⁺), unido en un anillo de porfirina y una cadena hidrófoba larga, haciendo que este conjunto sea el responsable de transferir electrones durante la fotosíntesis [YSI, 2013; Morançais y cols., 2018].

En la naturaleza existen varios tipos de clorofilas: Clorofilas a, b, c y d. Estos tipos de clorofila son muy similares y solo varían en su sustituyente del ciclo II del anillo tetrapirrólico de su estructura. Las más abundantes son las clorofilas a (chl a) y la b (chl b). La chl a se encuentra en las microalgas verdes y las plantas terrestres presentan chl a como la chl b. Estas dos clorofilas se diferencian como mencionamos en el sustituyente del anillo del compuesto tetrapirrólico, el chl a tiene en el tercer carbono un grupo metilo unido, mientras que en el chl b, su tercer carbono está unido a un grupo aldehído. [Morançais y cols., 2018]. La chl a es esencial en el proceso de la fotoquímica, mientras que la chl b es importante para la fotosíntesis y también es necesaria para fijar algunas proteínas que se unen a la clorofila para

la captación de luz. La chl b se sintetiza a partir de la chl a, y se cataboliza después de reconvertirse en chl a [Tanaka y cols, 2011].

Durante la fotosíntesis, la energía luminosa es acoplada a reacciones redox y de bombeo de protones en las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Al igual que en las mitocondrias, en cloroplastos el bombeo de protones contribuye al establecimiento de una fuerza protonmotriz (Δp) descrita por Mitchell [David y cols., 2013; Berg y cols., 2002]. El Δp es utilizado por la ATP sintasa de cloroplastos para la síntesis de ATP. Por lo anterior, la clorofila es un pigmento de importancia para la homeostasis de los cloroplastos y de sus múltiples procesos metabólicos y de transporte derivados. De esta forma la fotosíntesis activa reacciones metabólicas para asimilar el dióxido de carbono o carbohidratos, convirtiendo de esta manera la energía luminosa en energía química [Butler, 1978; Pfündel, 1998 ; Baker, 2008].

La intensidad de emisión de la fluorescencia de la clorofila de los sistemas de hojas enteras es débil para ser visto a simple vista. Se puede ver a partir de extractos iluminados de una solución de clorofila, donde el pico de fluorescencia de la clorofila ocurre en el rango del espectro de 685 nm extendiéndose a la región infrarroja 800 nm. [Hansatech, 2021]. Por lo tanto, la fluorescencia de la clorofila se debe en gran medida a la luz reemitida por PSII, [Strasser y cols., 2004]. Al igual que con otros compuestos fluorescentes, la longitud de onda de emisión de las clorofilas es mayor a la de la luz absorbida, donde el rendimiento de fluorescencia se puede cuantificar exponiendo una hoja a un haz de luz de longitud de onda definida y midiendo la cantidad de luz emitida a longitudes de onda mayores [Maxwell y cols., 2000], de tal forma que esta característica de la clorofila puede ser usada como una sonda fotoquímica no invasiva rápida, fiable y medible.

Las características de fluorescencia de la clorofila han permitido a los científicos estudiar fenómenos tan importantes como el efecto de las estaciones del año en el desarrollo de las plantas a nivel global [Voiland, 2011] ya que el verdor de las hojas disminuye debido a las sequías, heladas u otro tipo de eventos que limiten el proceso de la fotosíntesis, haciendo que la fluorescencia disminuya ante estos sucesos (Fig. 4).

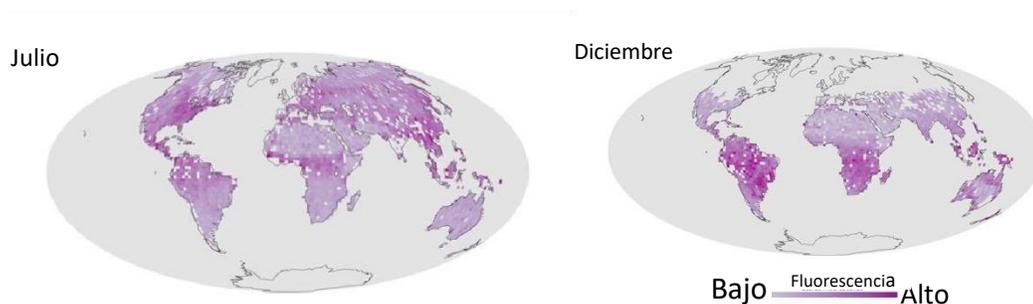


Figura 4. Efecto de las estaciones en la fluorescencia de la clorofila a nivel global en plantas terrestres. Imagen generada a partir de la suma de secuencias fotográficas satelitales en escala de morado [Imagen modificada de NASA's Earth Observatory].

Por otra parte, los estudios de la fluorescencia en la clorofila pueden ser útiles para mejorar las estrategias de cultivo de diversas especies vegetales. Esto tiene particular relevancia ya que en muchos sitios de cultivo solamente se utiliza la evaluación visual en las plantas para observar si los vegetales se encuentran en buenas condiciones. Por esto es a veces difícil saber si una planta está dañada a temprana edad, por lo que las mediciones de fluorescencia de la clorofila constituyen un diagnóstico rápido y sencillo del estado de homeostasis en diversas plantas [Neil y cols., 2004].

Los científicos han podido relacionar la eficiencia de la fotosíntesis (medida en función de la autofluorescencia de la clorofila) y la asimilación de CO₂, para detectar la respuesta que tienen las plantas ante desafíos ambientales y con esto poder identificar que tolerancia de

estrés pueden soportar. La asimilación de CO₂ puede variar dependiendo de varios factores, entre los que destacan: Contaminantes, variación en la temperatura, cambios en la intensidad de luz, disponibilidad de nutrientes, radiación UV o déficit de agua [Voiland, 2011; Neil, y cols., 2004].

Por último, en la actualidad se han realizado diversas investigaciones por medio de la fluorescencia de la clorofila donde se ha investigado las características bioenergéticas y metabólicas del uniportador de calcio mitocondrial en cloroplastos, observando los cambios que tienen algunas plantas cuando se le irradia fluorescencia (ver figura 5).

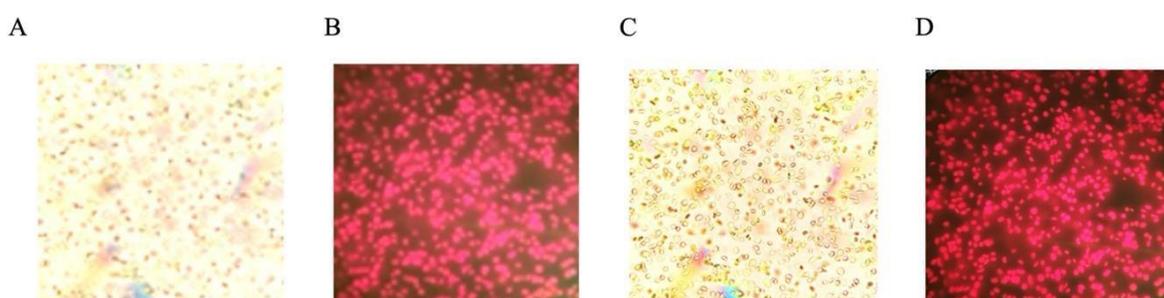


Figura 5. Cloroplastos aislados de *Spinacia oleracea* A, B y *Arabidopsis thaliana* C, D al ser irradiadas con luz blanca (A y C) y en el campo de autofluorescencia de la clorofila al ser excitada a 400nm (B y D). Micrografías representativas. Imagen tomada de (Vázquez Maldonado, 2021).

c. Simplificación tecnológica y el avance de la ciencia

En la actualidad, existen numerosas invenciones que han revolucionado la forma en que se hace ciencia. Un ejemplo de suma importancia es la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Kary Mullis [Paradowski, 2021]. A partir de este suceso, la identificación de genes específicos en muestras de diversos orígenes forma parte de procedimientos de rutina en múltiples disciplinas que se sustentan en esta metodología. Por ejemplo, en la industria alimenticia para la detección en alimentos, bebidas, cereales,

productos lácteos, frutas, especias y frutos secos. alimentos preparados, pescado y mariscos [Palomino y cols., 2014]. En la industria farmacéutica para la detección de medicamentos y en la elaboración de pruebas toxicológicas [Arikawa y cols., 2015]. Otros ejemplos son en las investigaciones de tipo clínico como de cáncer, investigaciones virológicas, microbiológicas parasitológicas y ámbito odontológico. [valones y cols., 2009]. Sin embargo, en un inicio esta tecnología no solo no era accesible para muchos laboratorios, sino que los equipos diseñados *ex profeso* para llevar a cabo estas reacciones eran muy costosos. Con el paso del tiempo, tanto los equipos como los reactivos para realizar la PCR han disminuido en costo y se han sido más accesible debido a que este tipo de técnicas se han ido innovado constantemente, la PCR-Real Time (RT-PCR) se ha vuelto la más común en laboratorios de investigación y de diagnóstico clínico de manera que sus resultados son más rápidos, precisos y cuantitativos comparándolo con la técnica convencional de PCR [Cha y cols., 2016; Marx, 2015 ; Valones y cols., 2009].

Los equipos de qPCR incluyen un termociclador que contiene una unidad capaz de detectar señales fluorescentes (fluorómetro) cuya finalidad es detectar y medir las señales de amplificación proporcionales a la cantidad del producto de PCR generado, las señales de amplificadas son registradas y capturadas en el software para su análisis [Aguilera y cols., 2014]. Estos equipos presentan versatilidad en la detección y cuantificación de secuencias específicas de diversas fuentes, dando así una mayor sensibilidad, reproducibilidad, precisión con un proceso de análisis relativamente rápido, de mejor control de la calidad y durante el proceso da un menor riesgo de contaminación [Valones y Cols, 2009]. Este tipo de instrumentos también están sujetos a mejorías constantes, de tal manera que actualmente existen equipos miniaturizados que funcionan con baterías y tienen accesorios que les

permiten conectividad a teléfonos inteligentes para la captura y evaluación de datos en tiempo real [Yi-Fan y Cols., 2013 ;<https://www.minipcr.com>].

d. El teléfono inteligente como herramienta científica

En años recientes la tecnología en teléfonos móviles ha crecido rápidamente siendo así que los procesadores, pantallas y baterías que componen estos dispositivos han mejorado con el paso del tiempo, lo que también permite un inusitado poder de procesamiento de datos aunado a capacidades de conectividad a internet. Se estima que para el año 2022 existirán más de 3,800 millones de teléfonos inteligentes [Kooistra, 2018]. Los teléfonos móviles actuales tienen integrados algunos sensores para el mejor funcionamiento del equipo, que pueden ser utilizados para diversas mediciones resumidas en la Tabla Suplementaria 2 (ver Anexo 2). Por lo cual el uso de esta tecnología puede ser usado como una computadora portátil personal, reduciendo de esta manera los costos para el desarrollo de distintas aplicaciones basadas en las necesidades de cada individuo [McCracken y cols., 2016; Vashist y cols., 2015; Contreras y cols., 2016].

Uno de los sensores en los teléfonos inteligentes más usados en la actualidad es el sensor de luz ambiental y de proximidad (ALS) integrado en los dispositivos. Este es un fotodiodo con un rango de detección espectral de 350 nm-1000 nm. El ALS usualmente es ubicado en la parte frontal en el dispositivo inteligente y es usado para minimizar el consumo de energía de batería del dispositivo, ya que al percibir cambios en la luz ambiental los teléfonos inteligentes pueden acoplar cambios en el control del brillo del panel automáticamente. Los teléfonos inteligentes típicamente cuentan con un sensor Avago APDS-9930 o AMS AG (TAOS) TMD2771 [TAOS inc., 2011] [Broadcom y cols., 2015]. Estos sensores usan dos fotodiodos: El de detección de luz (CH0) y el de proximidad (CH1), de modo que la

capacidad de fotodiodo CH0 varia de 350 nm a 1000 nm, mientras que el fotodiodo CH1 tiene un rango de 450 a 1000nm. El fotodiodo CH0 tiene un rango de medición Lux de 0 Luz-20000 Lux con una resolución de 0.01 Lux. Por lo anterior, el ALS podría ser usado como una alternativa de fotodetector de laboratorio, ya que posee un alto rango dinámico y resolución acoplados a un hardware de un aparato inteligente moderno. Estas características de diseño son idóneas para desarrollar aplicaciones de análisis, interpretación y transmisión de datos en equipos de espectroscópica [Hussain y cols., 2021]. Este tipo de integración ha sido utilizado para adaptar los dispositivos inteligentes como instrumento experimental en varios casos. Por ejemplo, en la detección de *Escherichia coli* en muestras líquidas. En este caso, el dispositivo utiliza algunos capilares, luz de excitación LED (las cuales excitan células de *E. coli*) y la cámara del dispositivo móvil donde se obtiene una imagen usando una lente adicional que se inserta entre el capilar y el teléfono celular [Zhu y cols., 2013]. Otros instrumentos se han elaborado utilizando teléfonos inteligentes como punto de partida para obtener imágenes fluorescentes de nanopartículas en ensayos de transferencia de energía por resonancia Foster (FRET) de baliza molecular [Yu y cols., 2015]. Esta tecnología permite detectar secuencias de ácidos nucleicos de una muestra líquida. Esto se logra mediante un mecanismo que detecta cambios en la eficiencia de extinción entre moléculas donante-aceptor emparejados, donde se etiqueta con un fluoróforo que reconoce específicamente el analito diana utilizando un láser color verde (potencia = 300 mW y longitud de onda = 532 nm) para excitar los emisores fluorescentes colocados en una cubeta transparente y una fibra óptica colocada con el fin de minimizar la luz recogida del láser de excitación. La salida de la fibra óptica se alimenta a un espectrómetro basado en un teléfono inteligente [Yu y cols., 2015]. Este dispositivo fue mejorado por Hossain y cols. Utilizando una rejilla de polímero recubierta de oro -personalizada como elemento dispersivo- utilizando nano impresión para

el desarrollo de la recubierta. La luz LED de excitación se alimentó con la batería del teléfono, una rejilla de reflexión y usando una imagen de la cámara del teléfono. Esto último para el posterior procesamiento de la imagen usando una aplicación de Android para decodificar la intensidad de fluorescencia frente a la curva de longitud de onda dentro de la interfaz de la aplicación y de esta manera cuantificar la concentración de moléculas de interés como la creatina y glucosa en orina [Hossain y cols., 2015; Hussain y cols., 2021].

e. Control de sensores de un teléfono inteligente: Programación por bloques

Como se mencionó anteriormente, los dispositivos móviles en la actualidad han evolucionado rápidamente y se espera que en los años que vienen evolucionen aún más. En el futuro, se espera que los sensores de los dispositivos móviles se fusionen con el aprendizaje automático y la realidad virtual. La diferencia entre una computadora de escritorio o portátil con un teléfono móvil moderno es que el teléfono contiene varios sensores que permiten recopilar información personal y de nuestro entorno al momento, sin que el dispositivo se encuentre activo [Trafton, 2015].

En la actualidad se están diseñando nuevos sensores con el motivo de que puedan ser utilizados de otra manera. Por ejemplo, el sensor GPS que ha sido de utilidad tanto en el diseño de mapas, envíos de comida, transporte público (Uber), ubicaciones de lugares turísticos, entre otras. Los científicos del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) han desarrollado un sensor capaz de detectar de forma inalámbrica tipos de gases peligrosos y contaminantes ambientales, de tal forma que se pueda leer los datos en el dispositivo móvil en tiempo real [Trafton, 2015]. En este caso en específico, los investigadores agregaron enlaces al circuito hecho por nanotubos de carbono, donde cada tubo pertenece a un gas en particular, cambiando la forma en que los tubos manejan la electricidad. El dispositivo al

detectar el cambio de corriente en el sensor le indica al teléfono el tipo de gas detectado [Joseph y cols., 2014; Trafton, 2015]

En el futuro se espera que los sensores se puedan combinar con los datos de aprendizaje automático que tiene con el dispositivo junto con la realidad virtual donde puedan rastrear y registrar datos de nuestra salud y bienestar. Se espera que los sensores puedan habilitar autos autónomos y monitorear máquinas industriales, edificios y puentes. También los sensores permitirán recopilar datos globales que ayudarán a la distribución de servicios en la agricultura y del agua, el monitoreo ambiental, así como de información sobre desastres naturales o producidos por el hombre, entre otros [Murphy, 2017].

El uso de los sensores en los dispositivos móviles requiere herramientas de codificación basadas en lenguajes de programación. De igual forma, en la actualidad existen plataformas de programación en bloques de comandos y permiten probar las aplicaciones cargadas en un teléfono o usando un emulador en la computadora. Este tipo de programas otorga a las personas sin conocimientos avanzados en programación la posibilidad de crear aplicaciones básicas y completamente funcionales [Rodríguez, 2014]. La programación en bloques se ha vuelto tendencia a nivel global ya que esta puede ser usada incluso por niños o adultos que deseen programar sin conocimientos extensivos previos. En este sentido, existen plataformas que permiten elaborar estas Apps destacando el MIT App Inventor, Thinkable, AppyBuilder y Kodular (Makeroid), entre otros [Rodríguez, 2014]. Todas las aplicaciones mencionadas tienen el mismo funcionamiento: Una plataforma de diseño gráfico de la aplicación y otra sección que permite editar los bloques de comandos para realizar y controlar los sensores en el teléfono inteligente.

2. Justificación

En el presente trabajo de tesis se propuso diseñar una App para controlar el sensor de luz que tiene integrado el teléfono inteligente, el cual usualmente funciona para que el equipo module la luminosidad de la pantalla dependiendo de la cantidad de luz ambiental. Lo anterior es particularmente relevante ya que esto permitiría convertir un dispositivo de uso común, en un poderoso equipo para llevar a cabo mediciones experimentales a un costo relativamente bajo.

3. Hipótesis

Si el sensor de luz de un teléfono inteligente es capaz de cuantificar luz ambiental, entonces este también podrá cuantificar la auto fluorescencia de la clorofila.

4. Objetivo

4.1 Objetivo general.

Desarrollar una aplicación para teléfono inteligente que permita medir cambios en la fluorescencia de la clorofila detectados en hojas de *Impatiens walleriana*.

4.2 Objetivos particulares.

- Desarrollar una aplicación en la plataforma MIT App inventor® para Android para medir cambios en la luz detectada en el sensor ALS.
- Adaptar los sensores de emisión y detección de luz del teléfono para medir autofluorescencia de la clorofila.
- Medir cambios en la fluorescencia de hojas de *I. walleriana*.

- Desarrollar un filtro de luz UV que permita el libre paso de la luz roja emitida por la clorofila.
- Obtener gráficas de fluorescencia vs tiempo y calcular parámetros comunes en el análisis de la fluorescencia de la clorofila.
- Comprobar si la sensibilidad de un espectrofluorómetro portátil es semejante a la de un espectrofluorómetro convencional.

5. Metodología y procedimiento experimental

5.1 Materiales

- Teléfono Moto Z2 Play
- Sistema Operativo Android (8.0.0)
- Computadora HP Pavilion x360 con sistema operativo CORE i5
- 15 hojas de la planta *Impatiens walleriana* verdes
- 4 hojas de la planta *Impatiens walleriana* semiverde
- 4 hojas de la planta *Impatiens walleriana* amarillas
- Fuente de poder (autocargador)
- LED's 390 nm
- Láser 405 ± 10 nm
- Lámpara UV 395 nm
- Mini caja negra 1 cm x 5 cm (elaboración casera)
- 4 portaobjetos
- 4 cubreobjetos
- 1 plumón naranja
- Silicón frío

- Regla
- 1 Leafclip de hojas de adaptación Hansatech
- 1 lápiz
- Tijeras
- 10 contenedores (vasos de plástico)
- 100 mL Agua
- 2 ¼ de cucharadas de sal de cocina
- 200 mL de etanol

6. Resultados

6.1 Diseño de la App

La aplicación para controlar al sensor de luz del teléfono inteligente y capturar e imprimir los valores de las lecturas a la interfase gráfica fue diseñada en el ambiente gráfico MIT App inventor® (<http://appinventor.mit.edu>).

Este ambiente gráfico utiliza herramientas de código preestablecidas llamadas “bloques”. Cada bloque tiene diferentes funciones. Por ello, se buscaron los bloques específicos para controlar al sensor de luz (ALS) y que la App imprima en pantalla los datos numéricos asociados a cambios en las lecturas reportadas por el sensor ALS.

Para poder validar el funcionamiento de la aplicación, este programa cuenta con un emulador que permite evaluar la funcionalidad del código en bloque sin necesidad de descargar la aplicación al teléfono móvil.

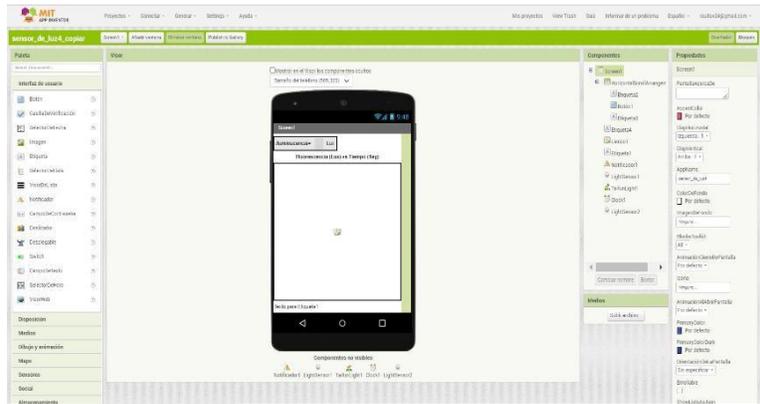


Figura 6. Captura de pantalla del diseño gráfico MIT App inventor®, donde nos muestra los componentes, propiedades, medios, interfaces, sensores, animaciones y bloques de almacenamiento que se pueden instalar en la aplicación que se desea construir. La plataforma muestra la pantalla de un celular digital, para el diseño visual de la aplicación y el cómo se verá después de la transferencia de dicha aplicación al dispositivo inteligente.

La extensión de ejecución (código) cuya función es proporcionar el andamio principal de la App es la extensión de control del sensor de luz (ver <https://puravidaapps.com/light.php>). Al descargarlo e importarlo en el ambiente gráfico, se pueden utilizar los bloques lógicos del tipo “CUANDO (argumento), EJECUTAR (argumento)”. El uso del bloque llamado “illuminance” (Fig.) es donde se controla el ALS usando un botón (botón 1) y al ser presionado en la interfase gráfica, se activa el sensor ALS y la App imprime el valor numérico de la intensidad luminosa detectada. Este valor será colocado en el lugar indicado dentro de la interfaz gráfica de la App. El bloque azul fue usado para proporcionar el formato numérico entero adquirido con el bloque de control de ALS (bloque naranja) de la siguiente manera:

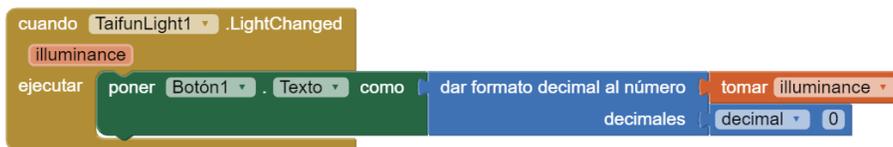


Figura 7. Módulo de bloques “illuminance” el cual permite controlar el sensor de luz ALS en forma condicional utilizando un botón en la interfase gráfica para obtener valores.

Para que los valores fueran visibles en la pantalla, se insertó un control adicional de impresión en pantalla. Esto permitió visualizar los resultados en la pantalla del teléfono inteligente una vez que el teléfono estuviese funcionando (Fig. 8).



Figura 8. Módulo de bloques que permite controlar el sensor de luz ALS y los cambios que pueda detectar este sensor pueda ser visible en la pantalla del dispositivo móvil.

Después de obtener los valores visibles de luminiscencia en la pantalla del celular se decidió adicionar un módulo de bloques que permitieran registrar un cúmulo de datos registrados con respecto al tiempo en formato de gráfica. Este tipo de captura de datos es útil para visualizar el comportamiento de la intensidad luminosa durante el transcurso del tiempo. Por ello se agregó el control del sensor de luz (bloque dorado), cuando el sensor de luz estuviera conectado (bloque dorado y verde). Donde si los valores fueran mayores o igual a cero (bloque verde y azul), activara los valores de las variables iniciando en el valor 0 (bloques naranjas) (Fig. 10).

Los bloques naranjas indican cuales son las variables en la App. En este caso se definieron cuatro variables globales: X, Y, X_before y Y_before (Fig. 9). Se les otorgó un valor inicial de cero para que inicien en el origen de una gráfica y para que los valores en la gráfica del eje X pudieran avanzar con respecto al tiempo. A cada valor adquirido se le sumó 0.1 en el eje global X anterior (ver Fig. 10A), con el objeto de obtener un algoritmo que permita desplegar un gráfico de luminosidad con respecto al tiempo.



Figura 9. Módulo de bloques “variables” usados para el diseño de la gráfica, fueron usadas para darle una secuencia de ejes a la gráfica lineal que se diseñó, el eje superior Y, representa la luminiscencia (LUX) que hay alrededor del dispositivo que pueda ser medible mientras tanto los bloques de la construcción del eje X, representa el tiempo.

Para que los valores fueran visibles en la gráfica, se utilizó un bloque específico del accesorio del lienzo (bloque morado), donde el primer punto fuera $X_1 = X_before$ (bloque naranja), $Y_1 = Y_before$ y este eje mostrara los valores en la parte superior (bloque verde), el siguiente punto serán las variables X y Y (ver Fig. 10A), recordando que este es igual a la variable X más 0.1 y la variable Y en la parte superior de la gráfica (bloques naranjas).

También se agregaron bloques que indicaran qué bloque sería el eje de las X y qué bloque sería el eje de las Y en las coordenadas de la gráfica. Específicamente, el bloque Y serían los valores de luminosidad (LUX) y los valores en X incrementarían automáticamente al tratarse de la variable tiempo (Fig. 10). Finalmente, para imprimir los valores en forma gráfica se usó el módulo de bloques morado “Lienzo1” (Fig. 10, B).

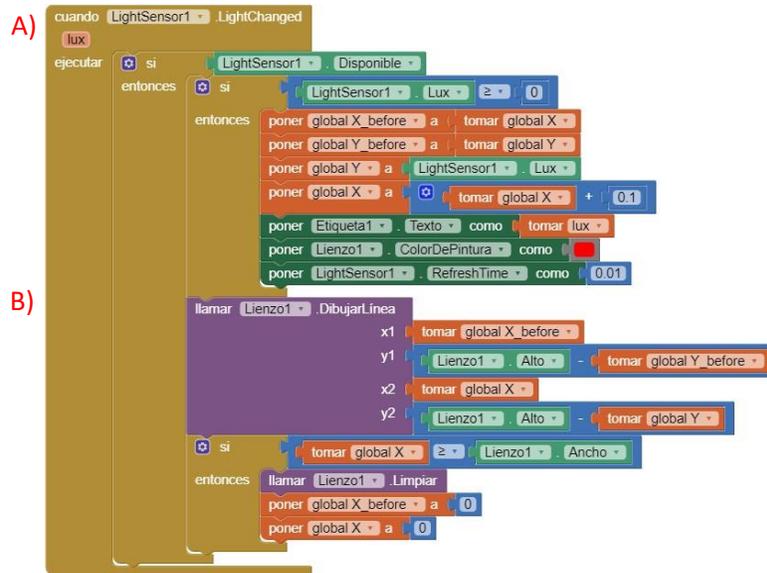


Figura 10. Programación modular en bloques de la App para el uso del sensor ALS del dispositivo móvil. La estructura jerárquica de los módulos comprende el control condicional del sensor ALS mediado por la disponibilidad de un ALS y por la disposición secuencial de datos numéricos al ser activado.

La Fig. 11 muestra la interfase gráfica de la App cargada en el dispositivo inteligente Moto Z2 Play. Cuando la gráfica llega al final de la pantalla, la App automáticamente reinicia un nuevo proceso de graficado en la pantalla. Para lograr esto se incluyó en el diseño de bloques una condicional (bloque dorado). En este caso, si el valor de la variable X (bloque naranja) es mayor o igual al ancho de la pantalla de nuestro celular (bloque verde), se dará la orden de limpiar la pantalla de la gráfica automáticamente (bloque morado). De esta forma el eje X inicia desde el valor 0 antes y después de los valores que se seleccionaron (bloque naranja y azul) si es que el sensor de luz no detecta cambios en la luminosidad del entorno.

Una vez terminada la programación en bloques (Fig. 10) se cargó el software en el teléfono inteligente. Una manera para comprobar su funcionalidad fue por medio del código QR (Descargar MIT app inventor en el celular antes) y constar su funcionalidad o por medio de un emulador que posee este programa.

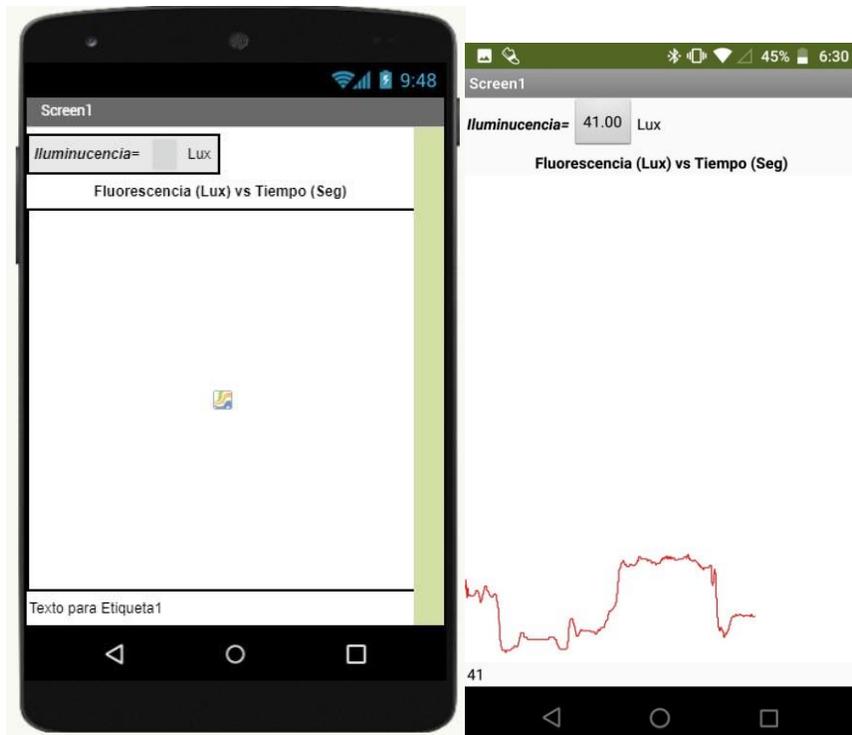


Figura 11. Interfase gráfica de la App en el ambiente gráfico y en el dispositivo móvil donde se pueden apreciar cambios en los niveles de luz ambiental (unidades LUX) con respecto al tiempo.

La figura 11 muestra la interfase gráfica y un ejemplo de captura de lecturas iniciales al variar deliberadamente la luminosidad en una recámara. Una vez terminada la programación y al haber cargado la información en el teléfono, se guardó el código en la dirección web del Laboratorio de Bioenergética de Plantas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM (<https://sites.google.com/view/lab115/home>).

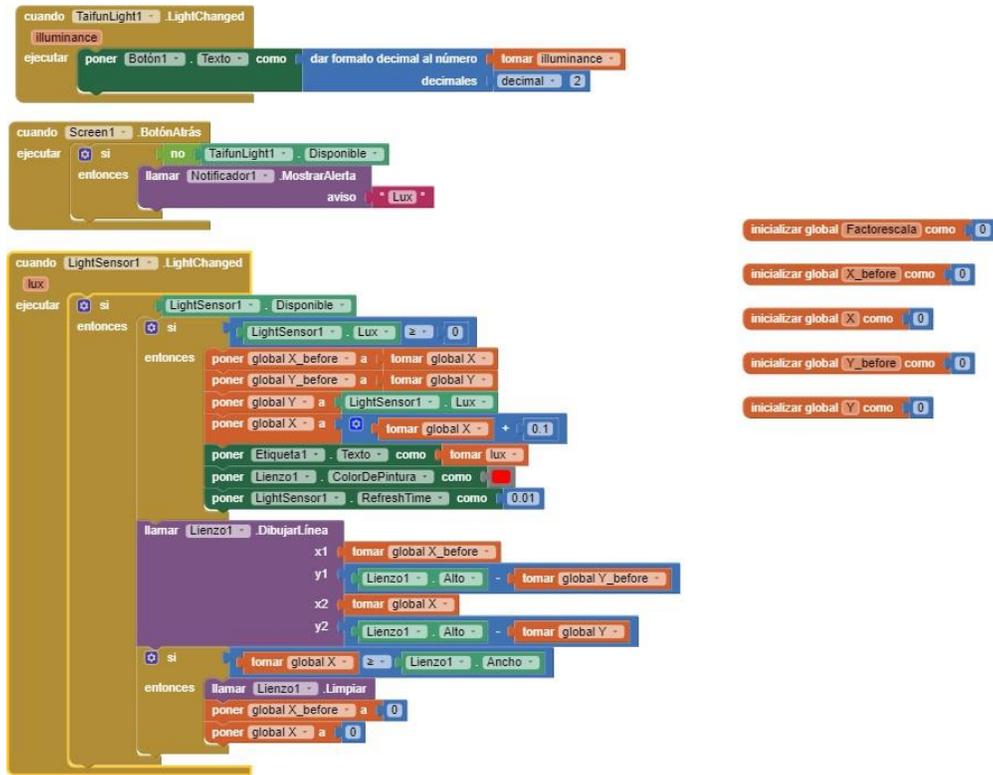


Figura 12. Esquema final de programación por bloques de la App, por medio de la aplicación MIT App Inventor®, el cual permite detectar por medio del sensor ALS la cantidad de luminosidad que hay alrededor del dispositivo móvil, graficando la cantidad de luminiscencia respecto al tiempo.

6.2 Diseño de los componentes físicos del espectrofluorómetro

Para el presente trabajo de tesis se hicieron 4 variaciones o adecuaciones a los componentes físicos (hardware) del modelo inicial del espectrofluorómetro como se describe a continuación:

6.2.1 Modelo 1

Inicialmente se elaboró el accesorio “módulo de luz” que diera el destello de luminosidad usando un LED UV (390nm-400nm) para obtener el valor mínimo de fluorescencia de clorofila (F0) cubriendo con el accesorio y mantener en un estado de relajación a la hoja de estudio. La fuente de luz LED se colocó dentro del accesorio que se elaboró anteriormente y

en estrecho contacto con una ranura para insertar la hoja de estudio. De esta manera el rayo de luz pasa a través de la muestra y posteriormente a través un filtro de luz (transiluminador) (Fig. 14). Posteriormente, se agregó la hoja de estudio en un orificio que se encuentra en la parte superior del accesorio y por medio de la aplicación del teléfono celular se midió y registro la luz filtrada correspondiente a la fluorescencia de clorofila de la hoja *I. walleriana* (ver gráfica 1).

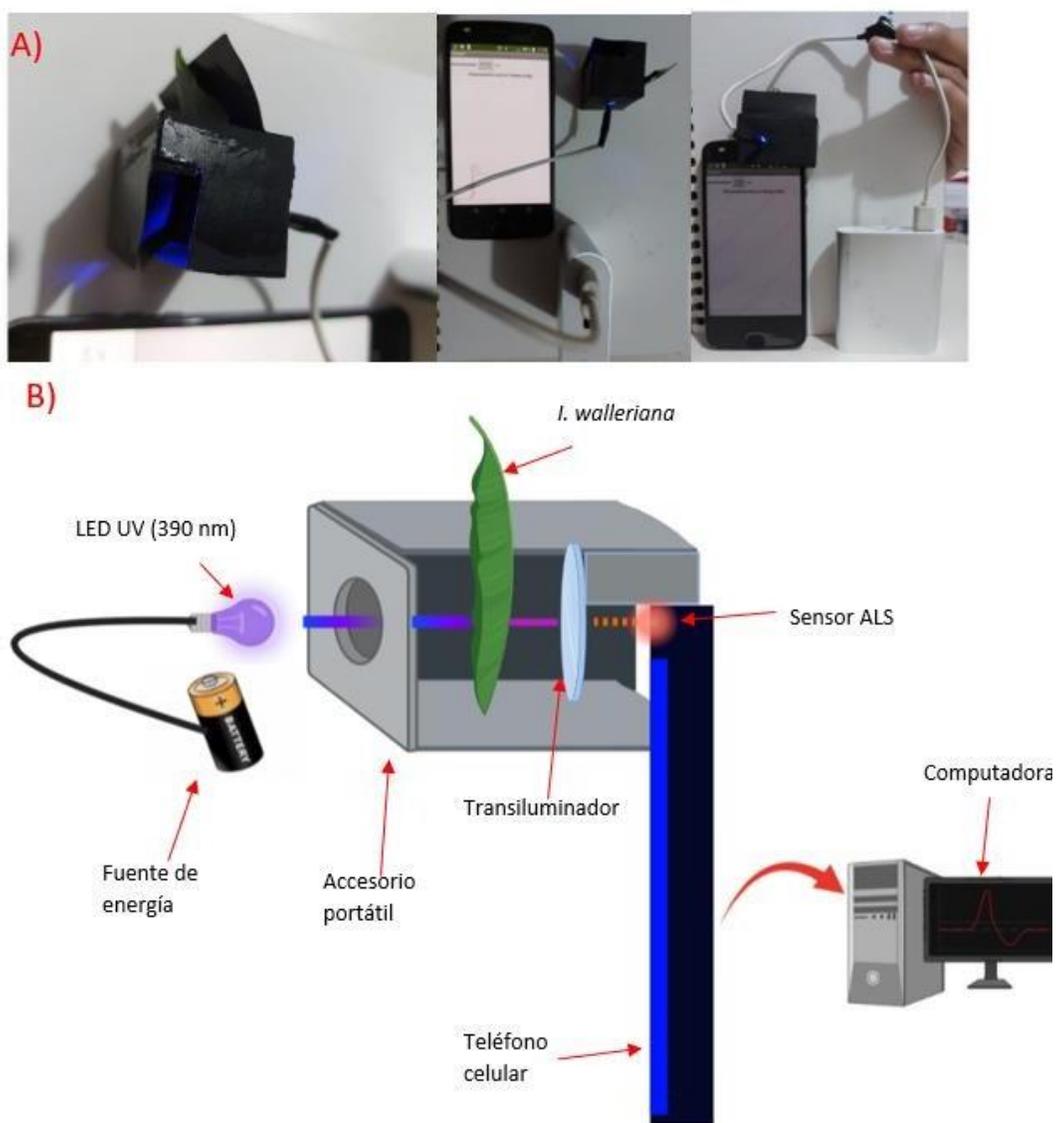


Figura 13. A) Montaje experimental del primer prototipo del espectrofluorómetro portátil. B) Esquema del primer espectrofluorómetro diseñado, donde el dispositivo inteligente móvil ya con la aplicación conectada

se pone en el orificio construido para el dispositivo móvil y con el sensor ALS queda centrado con el LED UV (390nm) para que posteriormente se inicie el registro de los resultados obtenidos.

El esquema de la Fig. 13 representa el primer sistema de detección que se construyó para la elaboración de un espectrofluorómetro portátil a base de papelería de casa. De esta manera se disminuyeron significativamente los costos para su construcción. Para obtener los registros de las variaciones en la fluorescencia minimizando interferencias, la luz LED entró de forma perpendicular hacia la hoja de la planta, con la intención de solo medir la señal asociada a la fluorescencia de la muestra y tener la menor contribución del haz de excitación incidente (Fig. 13). El filtro de color naranja (Fig. 14), usado como el transiluminador del dispositivo fue un cubreobjetos pintado con plumón naranja permanente, que permitió filtrar la luz azul de la fuente de excitación proveniente del LED/UV y con ello obtener resultados correspondientes a la fluorescencia de la clorofila.



Figura 14. Transiluminador o filtro de luz casero. Este fue elaborado por medio de cubreobjetos pintado de color naranja con un sharpin (plumón) para la absorción de luz azul que emita el foco LED UV, este cubreobjetos marcado de color naranja estará en la parte interior de la caja en una distancia de 1.0 cm al sensor de luz.

6.2.2 Modelo 2

El diseño del experimento fue cambiando ya que se encontraron algunos puntos de mejora en el primer dispositivo propuesto. Por ejemplo, se optó por utilizar un alimentador de corriente portátil con un cable conectado a una mayor cantidad de diodos LED (3) para obtener fuente de iluminación de mayor potencia y que de esta manera el sensor ALS pudiera

obtener una mayor relación señal: ruido de la hoja de estudio. Así mismo, este nuevo implemento permitiría a la fuente de luz una vida útil mayor, ya que, en el diseño original, el foco led se fundía muy rápido por la potencia que se le daba no era la adecuada. Por lo anterior, el foco led iba disminuyendo su intensidad en poco tiempo (aproximadamente 3 horas), por lo cual a este diseño fueron agregados resistencias en los LEDs para que su tiempo de duración fuera mayor. Con estas mejoras, las hojas que se estuvieran estudiando iban a tener una mayor cantidad de luz para poder determinar valores de Fm y comprobar si la hoja presenta cambios significativos, claros y reproducibles de los resultados obtenidos. Este instrumento se diseñó para que fuera más pequeño y cómodo, comparándolo con el de la Fig. 13 debido a que en el equipo anterior se dificultaba centralizar al sensor ALS con la luz transmitida por el foco LED UV y con ello los valores de Fm eran muy variables.

Por las razones anteriores, se decidió incluir en el Modelo 2 un dispositivo dividido en dos partes (ver Fig. 15A). El accesorio “1” contenía al filtro o transiluminador, ubicado en línea recta con el sensor ALS. El accesorio “2” contenía tres diodos UV y a su alrededor el contenedor que cubría a la hoja con la finalidad de minimizar la cantidad de luz externa o “contaminante” (ver Fig.15A). Una ventaja del anterior dispositivo es que la fuente de luz LED tendría mayor potencia y esta estaría más cercana al sensor de ALS del dispositivo inteligente (Ver Fig.15B).

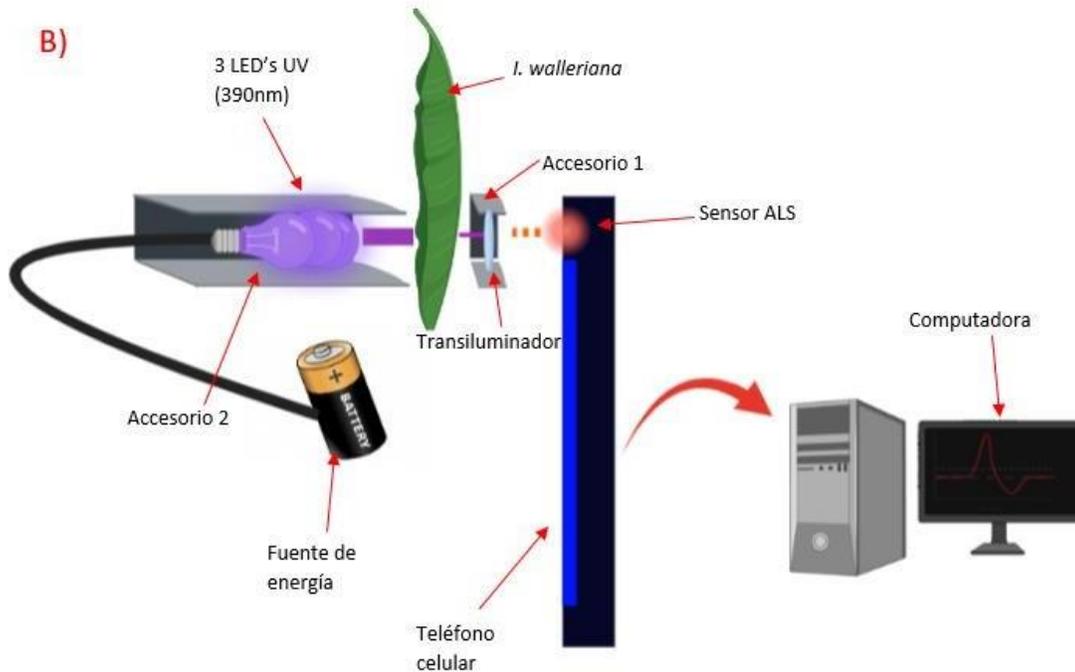


Figura 15. A) Montaje experimental del segundo diseño del espectrofluorómetro portátil B) Esquema del segundo espectrofluorómetro diseñado, donde el dispositivo móvil activado y con la aplicación conectada se superpone el accesorio 1 en el sensor ALS, después de ello se agrega la hoja de estudio para que posteriormente se agregue el accesorio 2 y se inicie el experimento encendiendo las luz de los LED's con la fuente de energía portátil, una vez obteniendo los resultados se llevan a una computadora para registrar los resultados obtenidos.

El esquema del segundo espectrofluorómetro diseñado (ver Fig. 15 B) muestra un prototipo más compacto en comparación al espectrofluorómetro diseñado anteriormente (ver Fig.13).

De esta manera, la luz emitida por los diodos LED's se encontraba más cercana a la hoja.

Esto permitiría aumentar -en principio- incrementar la intensidad de la luz en el punto de incidencia sobre la muestra y con ello el sensor ALS detectaría una probable señal mejorada.

6.2.3 Modelo 3

Para el tercer prototipo de espectrofluorómetro portátil se usó una fuente de luz con mayor potencia, la cual se basó en una fuente de luz láser de 405 ± 10 nm. En este modelo se obtuvieron valores máximos de lecturas en el sensor ALS. (Fig. 16). El diseño de este espectrofluorómetro era similar al de la Fig. 15 presentando variaciones solamente en el tipo de fuente de luz y alimentación. El láser LED cuenta con una potencia mayor al presentar un haz de luz coherente a 405 ± 10 nm. Este diseño permitiría -en principio- minimizar el tamaño del dispositivo.

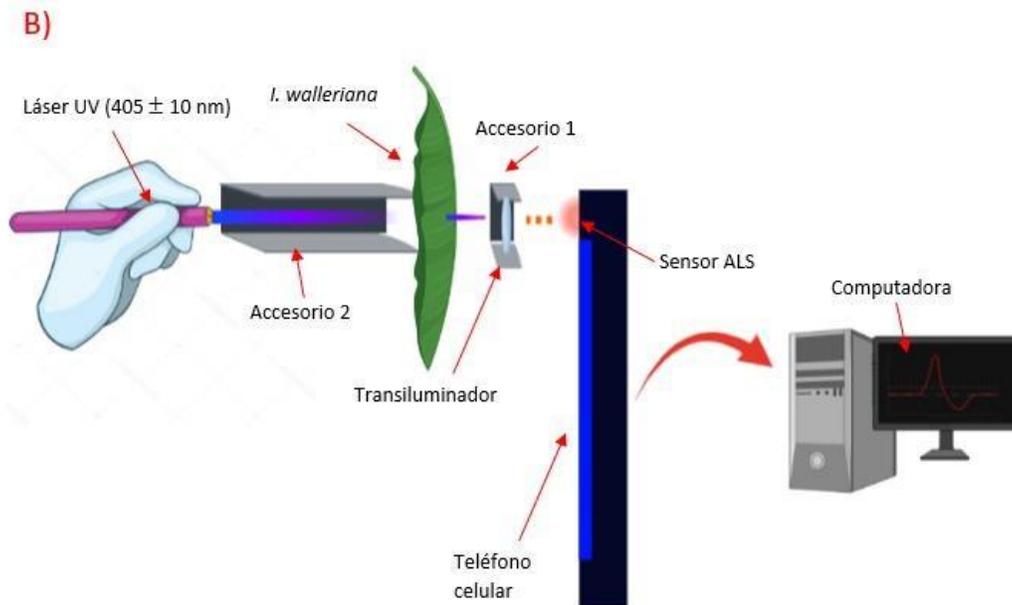
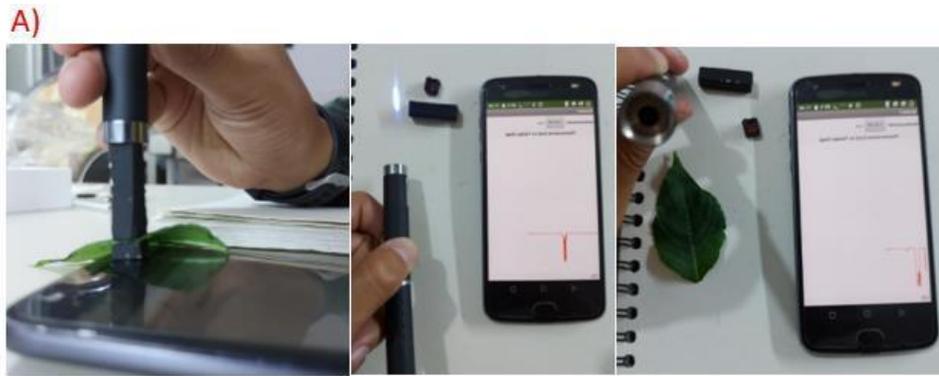


Figura 16. A) Montaje experimental del tercer diseño del espectrofluorómetro portátil B) Esquema del tercer espectrofluorómetro diseñado, donde el dispositivo móvil activado y con la aplicación conectada se superpone el accesorio 1 en el sensor ALS, después de ello se agrega la hoja de estudio para que posteriormente se agregue el accesorio 2 y se inicie el experimento encendiendo la luz laser LED (405 nm), una vez obteniendo los resultados se llevan a una computadora para registrar los resultados obtenidos.

Este equipo se integró junto con un adaptador parecido a los diseños para colocar la muestra descritos con anterioridad (ver Figs. 13 y 15), de tal manera que la hoja a estudiar estuviera en un estado basal sin estrés de luz externa (Fig. 16A). Acoplado al láser se agregó el filtro transiluminador para eliminar la luz azul proveniente de la fuente de emisión. Esto permitió minimizar la presencia de ruido en la medición (Fig. 16B). Esta adecuación redundó en un

dispositivo más pequeño y simple que los anteriores dispositivos y con mayor resolución respecto a los modelos anteriores.

Posteriormente se montó el espectrofluorómetro portátil y se colocó la hoja para su estudio. La salida de luz del filtro fue colocada sobre el sensor de luz del teléfono inteligente con la App activada (Fig. 16 A). En estas condiciones se aseguró que el área de la hoja a estudiar estuviese en condiciones de oscuridad durante 15 min. y con ello poder hacer las mediciones correspondientes con este modelo.

6.2.4 Modelo 4

Para el cuarto y último modelo se usó una lámpara de luz UV a 395 nm equipada con un reflector convergente externo como fuente de excitación. Este lente se utiliza como un “colimador” para mantener el haz de luz en constante y paralelo y con un diámetro aceptable para las mediciones maximizando así la excitación de la clorofila de la hoja. Este último modelo permitió acoplar un “clip” para fijar a la hoja y de esta forma dejando la muestra en un estado de oscuridad temporal permitiendo así obtener lecturas más precisas (Fig. 17).

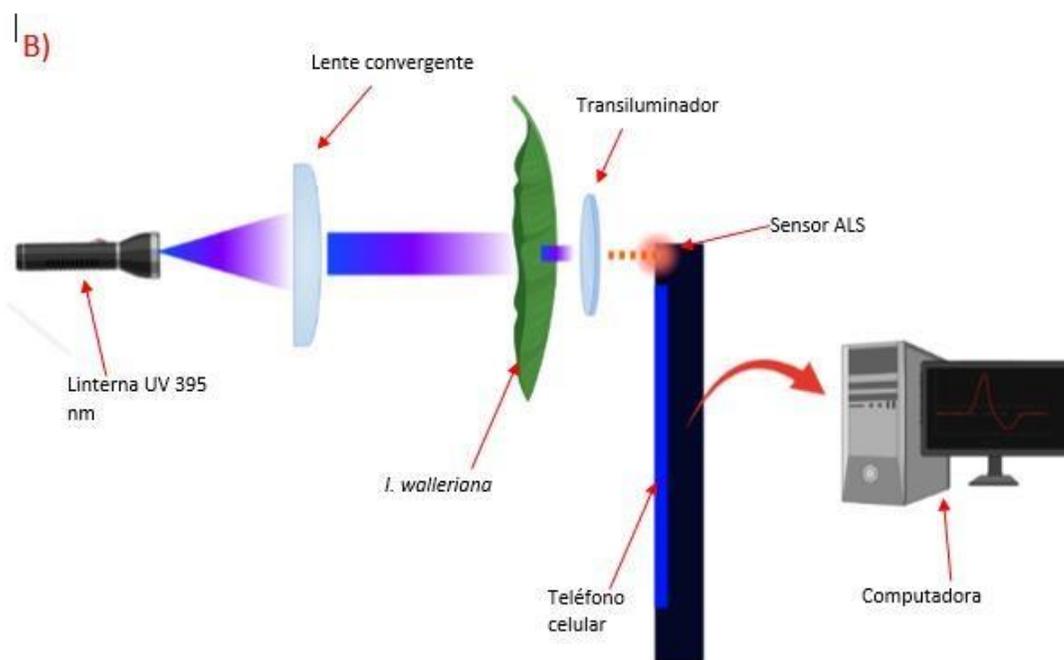


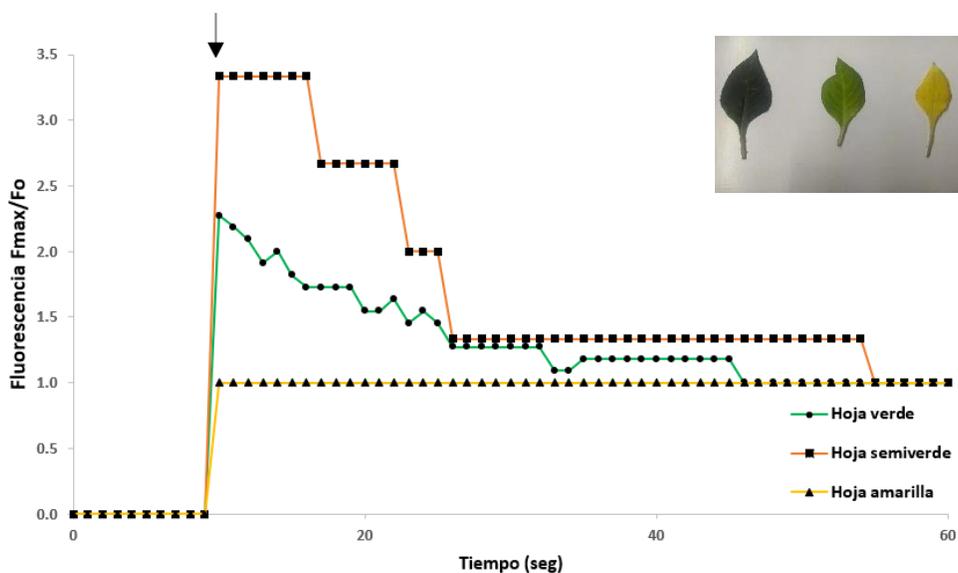
Figura 17. A) Montaje experimental del cuarto diseño del espectrofluorómetro portátil B) Esquema del segundo espectrofluorómetro diseñado, donde el dispositivo móvil activado y con la aplicación conectada se superpone el accesorio 1 en el sensor ALS, después de ello se agrega la hoja de estudio para que posteriormente se agrega el accesorio 2 y se inicie el experimento encendiendo la lámpara LED como fuente de energía portátil, una vez obteniendo los resultados se llevan a una computadora para registrar los resultados obtenidos.

En el cuarto modelo, el filtro transiluminador está adosado a un Leafclip (Hansatech) que permite fijar a la hoja muestra cerca del sensor ALS del teléfono (ver fig. 17A). El Leafclip cuenta con una pequeña apertura que permite la entrada de luz del accesorio 2 al sensor ALS,

y de esta manera incidir con la hoja y del otro lado que salga luz de fluorescencia roja al sensor.

6.3 Mediciones de fluorescencia

Para probar el sistema usando el Modelo 1, se colocaron hojas de la planta *I. walleriana* en el orificio o puerto para las muestras descrito anteriormente (Fig. 13). Se efectuaron tres mediciones en hojas recién cortadas durante 60 s. En cada experimento se permitió que las muestras permanecieran en condiciones de oscuridad durante 15 min. y posteriormente se monitoreó la fluorescencia basal durante 10 s en condiciones de oscuridad para que la clorofila se mantuviera en un estado de fluorescencia mínima. Posteriormente se activó el sistema de luz UV construido durante 60s (Fig. 12). Los trazos fueron almacenados en el dispositivo móvil y posteriormente exportados a una computadora. Donde fueron promediados y graficados como se observan en la gráfica 1.



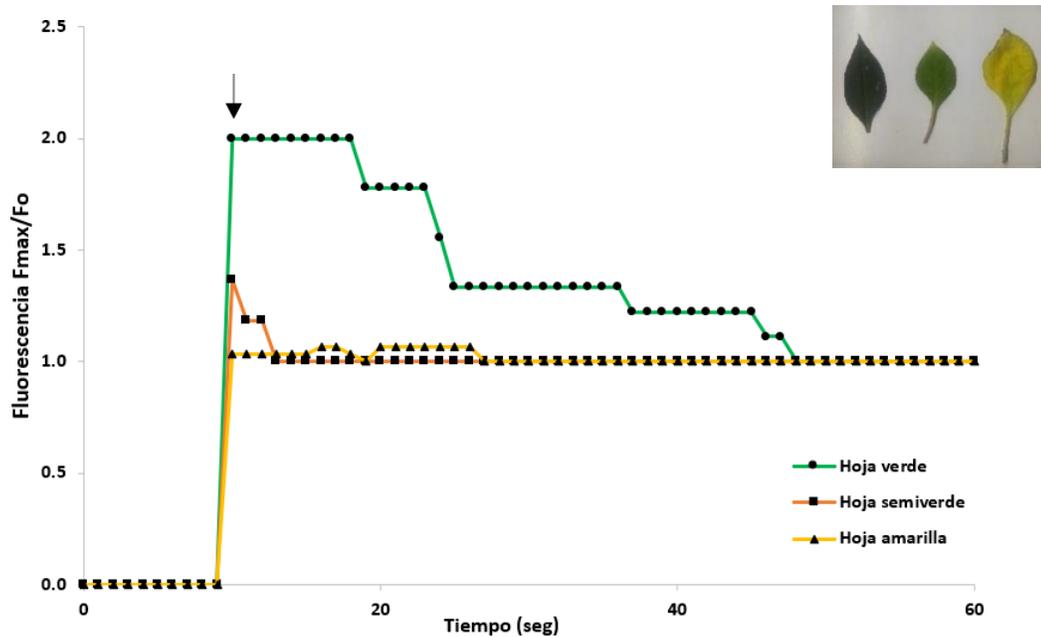
Gráfica 1. Evaluación de las variaciones en la relación F_{max}/F_o : Modelo 1. Resultados promedio de tres determinaciones obtenidas con el Modelo 1 con hojas recién cortadas, pero en diferente estado de pigmentación. Se muestra la relación F_{max}/F_o con respecto al tiempo (s) durante 60 segundos. A los 10s se activó el haz de luz LED UV (flecha).

En el caso de la hoja verde se observó un aumento en la relación F_{max}/F_o al activar la fuente de luz. Esta relación fue decayendo con respecto al tiempo debido al blanqueamiento de la hoja hasta permanecer relativamente constante. Posteriormente se determinó la misma relación en una hoja semiverde recién cortada. En estas condiciones, la relación F_{max}/F_o fue mayor al activar la fuente de luz y decayó con respecto al tiempo. Finalmente, al llevar a cabo el mismo experimento en una hoja seca y al activar la fuente de luz, se observó un ligero incremento en la relación F_{max}/F_o , pero en menor proporción que en las condiciones anteriores. Estos experimentos demuestran que se pueden obtener mediciones de fluorescencia con el Modelo 1, pero hubo variaciones en los resultados debido a varios inconvenientes en el modelo, primero el accesorio que se utilizó (Fig. 13) no embonaba con el sensor del celular, segundo la hoja no se mantenía fija en el accesorio y por último la cantidad de luz LED que se obtuvo era de baja intensidad.

Para evaluar si una fuente de luz con mayor potencia podría originar resultados con mayor resolución, se intercambió la fuente LED por un conjunto de 3 LED's UV (Modelo 2).

Las hojas analizadas en esta serie de experimentos se dejaron nuevamente en un estado de oscuridad durante 15 minutos y estas fueron posteriormente entrepuestas entre los accesorios uno y dos del Modelo 2 (Fig. 15). Las hojas se dejaron en el espectrofluorómetro y en el segundo diez se encendió el haz de luz del conjunto de focos LED's para registrar los resultados. Se observó que en este dispositivo se obtuvo un aumento en la relación F_{max}/F_o al encender la fuente de luz en hojas verdes cercana a 2.5 (Gráfica 1). A partir de los 15 s se

observó una disminución paulatina en la relación hasta obtener lecturas constantes. También se observó que los valores tenían relación a lo que se reportó en la literatura, notando que la clorofila de la hoja verde contenía mayor fluorescencia que las hojas semiverdes y a su vez la hoja amarilla contenía menos fluorescencia que la anteriores.

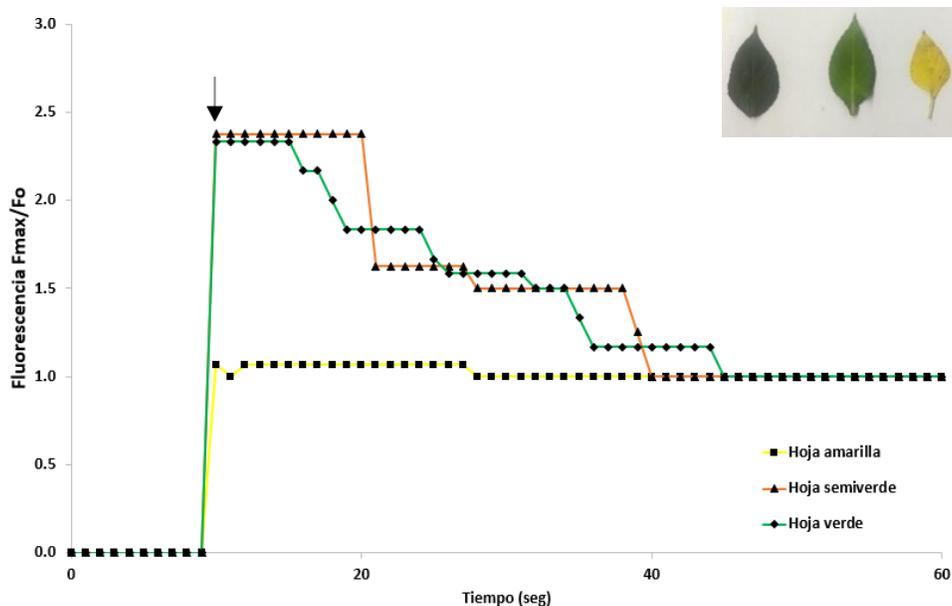


Gráfica 2. Evaluación de las variaciones en la relación F_{max}/F_o : Modelo 2. Resultados promedio obtenidos con el Modelo 2 con hojas recién cortadas, pero en diferente estado de pigmentación. Se muestra la relación F_{max}/F_o con respecto al tiempo (s) durante 60 segundos. A los 10s se activó el haz de luz LED UV (flecha).

En estas condiciones, las lecturas con las hojas semiverdes fueron muy similares en magnitud y cinética a las hojas amarillas. Finalmente se observó una relación F_{max}/F_o cercana a 1 con hojas amarillas aún en presencia de luz UV, sugiriendo que el efecto es específico de la clorofila.

Para el Modelo 3, se decidió evaluar la relación F_{max}/F_o en respuesta a irradiación con una fuente de luz laser de mayor potencia en hojas con las mismas características (Gráfica 3). En estas condiciones se observó un comportamiento similar en las hojas estudiadas

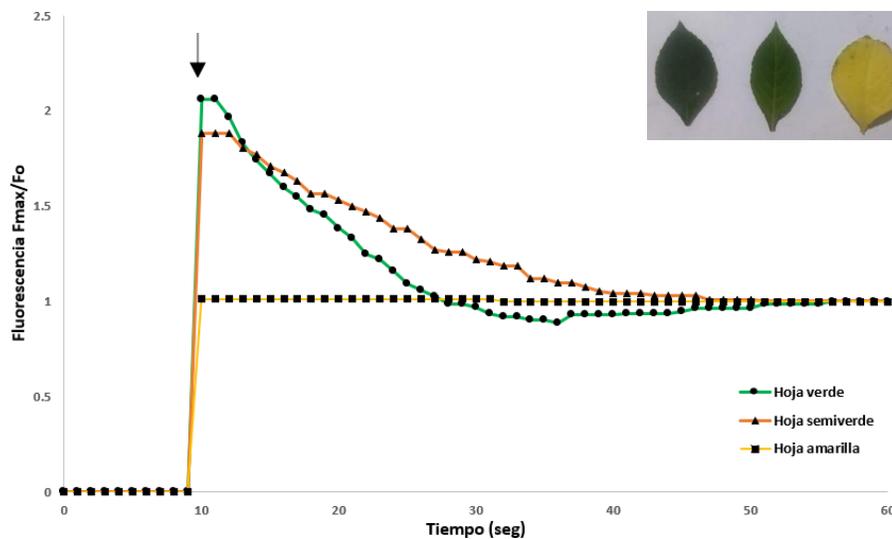
anteriormente. Específicamente se observó un incremento en la relación F_{max}/F_o al incidir el haz de luz. Conforme el tiempo de irradiación aumentaba se comenzó a detectar un decaimiento en la relación. Es importante recalcar que el comportamiento con hojas semiverdes fue muy similar al de hojas verdes con el Modelo 3. En este sentido se observó una relación F_{max}/F_o cercana a 1 en hojas secas. Cabe mencionar que con este modelo la superficie de radiación era menor que la observada con los anteriores. En forma adicional, era relativamente difícil centrar el sensor del dispositivo móvil (por el diseño del láser) al haz de luz lo cual derivó en la obtención de variaciones sustanciales en las lecturas entre replicados.



Gráfica 3. Evaluación de las variaciones en la relación F_{max}/F_o : Modelo 3 Resultados promedio obtenidos con el Modelo 3 con hojas recién cortadas, pero en diferente estado de pigmentación. Se muestra la relación F_{max}/F_o con respecto al tiempo (s) durante 60 segundos. A los 10s se activó el haz de luz LED UV (flecha).

El Modelo 4 permitió la obtención de datos de F_{max}/F_o con la mejor resolución. Esto se debió específicamente a mejoras respecto a la mayor superficie de irradiación y a una mayor

intensidad de luminiscencia (Fig. 17). Se cortaron hojas con las características descritas anteriormente y se aislaron de la luz durante 15 min. Posteriormente se adicionó una hoja verde en el Leafclip y se inició el trazo (Gráfica 4). Se registraron valores basales durante 10s. Posteriormente se activó la fuente de luz y se registró un incremento en la relación F_{max}/F_o seguido de una disminución gradual y con mucha mayor resolución a la observada con los tres modelos anteriores. Al hacer el experimento con una hoja semiverde se observó un comportamiento prácticamente idéntico al observado con la hoja verde (Gráfica 4, trazo naranja). Finalmente, al hacer los experimentos con una hoja seca, la relación F_{max}/F_o se mantuvo constante y siempre cercana a un valor de 1, lo que sugiere que el método es específico para la fluorescencia de la clorofila (Gráfica 4, trazo amarillo).



Gráfica 4. Evaluación de las variaciones en la relación F_{max}/F_o : Modelo 4. Resultados promedio obtenidos con el Modelo 4 con hojas recién cortadas, pero en diferente estado de pigmentación. Se muestra la relación F_{max}/F_o con respecto al tiempo (s) durante 60 segundos. A los 10s se activó el haz de luz LED UV (flecha).

Los resultados mostrados demuestran que es posible construir un espectrofluorómetro a partir de materiales accesibles, lo que incrementa el potencial de utilización de estos dispositivos

en el campo. Es importante mencionar que se están llevando a cabo pruebas preliminares de medición de fluorescencia en hojas sometidas a diversos tratamientos, los cuales se detallan en el Anexo.

7. Discusión de Resultados

7.1 Elaboración de la aplicación para teléfono inteligente

En la figura 12 se observa el diseño de bloques completo para la aplicación diseñada en el transcurso del proyecto con la ayuda de la plataforma MIT App inventor[®]. Los resultados mostraron que fue posible controlar el sensor ALS del dispositivo Moto Z2 play en forma exitosa, ya que al modular la luz del medio se detectaron cambios en las medidas de luminosidad en la pantalla del celular. Cabe mencionar que los valores obtenidos con esta aplicación eran solamente números enteros. Para poder obtener números con decimales será necesario programar el bloque de control de ALS ya que la salida de datos de este sensor es en forma de números enteros. En este sentido existen dispositivos nuevos que cuentan con sensores ALS con mayor capacidad y sensibilidad debidos a una mayor superficie de captación de luz. Los resultados obtenidos fueron registrados en forma gráfica de acuerdo con el diseño de la App hasta los 47s. Los datos obtenidos posteriores a ese umbral de tiempo fueron re graficados al inicio del gráfico (la gráfica se reinicializaba). Los resultados fueron posteriormente transferidos a la computadora en forma manual. Será objeto de futuras adecuaciones al Modelo 4 la capacidad de transferir datos en forma alámbrica o inalámbrica a una computadora.

La plataforma MIT app inventor® presenta un ambiente gráfico de programación en bloques para construir aplicaciones en cuestión de minutos. En ese sentido el uso de lenguajes como Python también presentan ventajas sobre la programación en bloques ya que es posible una mayor adecuación de la App en función de las necesidades del programador. Sin embargo, para los alcances del presente proyecto, la utilización de la plataforma MIT app inventor® superó con creces las expectativas en cuanto al desarrollo de la App.

7.2 Diseño del espectrofluorómetro y mediciones en hojas con diferente estado de pigmentación.

La Fig. 13 muestra algunas imágenes del Modelo 1 diseñado junto al esquema que se utilizó para ser construido. Este sistema constó de un diodo LED UV (390 nm) el cual estaba en un dispositivo construido ex profeso para albergar a la fuente de luz, otro para insertar la hoja de estudio y de esa manera cuantificar la fluorescencia de emisión de la muestra al activar el foco LED UV. Esta fue medida y registrada a través del sensor ALS del dispositivo móvil (MOTO Z2 Play) y finalmente registrado y graficados los datos a través de la PC con el uso del programa Excel (ver gráfica 1). Se optó utilizar un filtro de luz partiendo de un portaobjetos recubierto con plumón color naranja para evitar el paso de luz azul en base a filtros disponibles en forma comercial. Específicamente se trató de igualar el color a un filtro disponible en un transiluminador en el laboratorio usado para visualizar DNA en muestras que son separadas por electroforesis (ver Fig. 14).

Los resultados obtenidos al realizar las mediciones en diferentes tipos de hojas mostraron un comportamiento similar al reportado en la literatura (ver gráfica 1). Sin embargo, es importante mencionar que los valores de fluorescencia obtenidos en hojas semiverdes en ocasiones eran mayores a las de hojas verdes. Esto podría deberse a una menor penetración

del rayo de luz a través de las hojas verdes en comparación con las semiverdes. De igual forma, en hojas secas constantemente se monitoreaban valores mayores de fluorescencia en comparación con las hojas verdes y semiverdes. Es por esta razón que se decidió procesar los datos crudos y evaluar la relación F_{max}/F_0 como un indicador más adecuado de los cambios en la fluorescencia de la clorofila [Müller y cols., 2001].

Los resultados hasta este punto fueron alentadores. Por esta razón se decidió diseñar el Modelo 2 con mejoras sustanciales (Fig. 15). Este modelo presentó un tamaño reducido y mayor potencia de excitación al agregar tres diodos UV hacia la hoja. En la gráfica 2, la hoja verde presentó una señal de fluorescencia mayor que la hoja semiverde. La señal detectada con hojas amarillas fue baja y constante. A pesar de que el Modelo 2 presentó una mejoría en la señal de excitación, las lecturas en el equipo siguieron siendo relativamente bajas, razón por la cual se decidió diseñar el Modelo 3 (Fig. 16).

Al implementar un láser LED UV en el Modelo 3, se pretendió incrementar la relación señal/ruido en las lecturas (Fig.16). Esto fue gracias a que el láser contó con una mayor potencia asociada al haz de luz coherente a 405 ± 10 nm. Después de estos cambios en la fuente de luz, se esperaba que esta fuera capaz de aumentar la excitación de clorofila. Sin embargo -como se muestra en la gráfica 3- estos valores aún carecían de la resolución deseada probablemente debidos a una superficie de radiación menor.

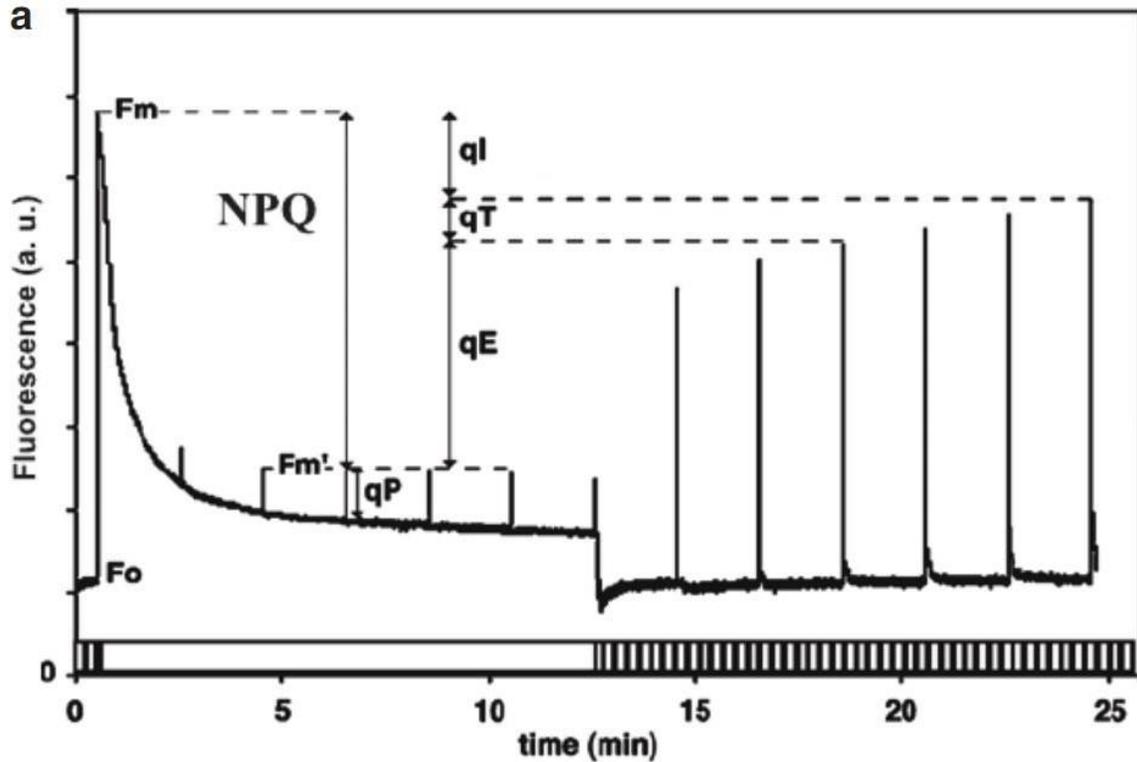
Por las razones anteriormente descritas, se optó por implementar el Modelo 4 (Fig. 17). Este cuarto y último modelo constó de una lámpara UV ($\lambda=395$ nm) que contenía un lente convexo para enfocar el haz de luz a un punto en específico. A este modelo se acopló un Leafclip del fluorómetro comercial Hansatech FM2+ disponible en el laboratorio para fijar las hojas en línea entre el haz de luz y el sensor ALS en el pequeño orificio del clip. Este arreglo permitió

eliminar la contaminación de luz externa. Las muestras fueron colocadas en el Modelo 4 durante 15 minutos para realizar las mediciones correspondientes.

Los resultados obtenidos con este dispositivo presentaron mucha mayor resolución y fue posible detectar el fenómeno de apagamiento o “blanqueamiento” de la fluorescencia de la clorofila. Este incremento en la resolución de las lecturas probablemente se debió a potencia de la lámpara acoplada al lente convexo.

7.3 Comparación de los resultados con un espectrofluorómetro convencional

Los resultados fueron comparados con resultados obtenidos de la literatura [Ralph y cols., 2010; Müller y cols., 2001], con la finalidad de observar las similitudes que existen entre un dispositivo convencional y el elaborado durante el presente trabajo. La gráfica 5 muestra un trazo típico de auto fluorescencia de la clorofila [Ralph y cols., 2010]. En este trazo se observa una señal basal previa al pulso de luz. Al incidir el haz de luz de elevada potencia a los 20s, se observa un rápido incremento en la señal asociado a un estado máximo de fluorescencia de la clorofila. Posterior a este estado de excitación se presenta un decaimiento paulatino en la señal el cual no vuelve a recuperarse en el intervalo de tiempo medido a pesar de que se activó la fuente de luz. En nuestros experimentos se observó el mismo fenómeno ya que al volver a incidir luz sobre las muestras, no se observó un incremento en la señal (resultados no mostrados).



Gráfica 5. Señal de fluorescencia de clorofila a (Chl a) medida con un fluorómetro PAM en una hoja de *Arabidopsis thaliana*. Después de una fase de adaptación a la oscuridad, se mide el nivel mínimo de fluorescencia (F_o). Cuando se da un pulso de luz saturante, las reacciones de luz fotosintética aumentan y la fluorescencia alcanza un nivel máximo (F_m). Con luz actínica continua un exceso moderado de luz (fotones de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; la luz de crecimiento fue de fotones de $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), una combinación de q_P y NPQ reduce el rendimiento de fluorescencia. NPQ ($q_E + q_T + q_I$) es la diferencia entre F_m y la fluorescencia máxima medida después de un pulso de luz de saturación durante la iluminación (F'_m): $\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m$. Después de apagar la luz actínica, se puede observar el decaimiento en el nivel F'_o . Además, la recuperación de F'_m en unos pocos minutos refleja la relajación del componente q_E de NPQ. q_T toma más tiempo para relajarse mientras q_I es un enfriamiento sostenido. Adaptado de Ralph y cols. 2010.

8. Conclusiones.

- 1) Se desarrollaron cuatro modelos de fluorómetro portátil controlados con una aplicación en la plataforma MIT App inventor®.
- 2) Los cuatro dispositivos permitieron detectar cambios en la fluorescencia de hojas *I. walleriana* en condiciones distintas.
- 3) La aplicación proporcionó una interfase gráfica intuitiva que permitirá mejoras en la toma de datos y su utilización.

- 4) El modelo 4 permitió obtener la mejor resolución de lecturas dentro de los modelos diseñados.

9. Perspectivas.

- 1) Implementar mejoras en el código que permitan incrementar la sensibilidad en las mediciones.
- 2) Adicionar un módulo de exportación de datos a la computadora para que los datos lleguen automáticamente a la computadora.
- 3) Acoplar al dispositivo de emisión de luz LED un concentrador de radiación (lupa).

10. Bibliografía

-Murchie E, Lawson T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>

-Sauer M.& Hofkens J. (2011). *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging. From Ensemble to Single Molecules*. Edited by Markus Sauer, Johan Hofkens and Jörg Enderlein. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(39), 9017–9018. <https://doi.org/10.1002/anie.201104398>

-Butler WL. (1978). Distribution of energy in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 29, 457-478. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.29.060178.002021?journalCod>

e=arplant.1

-Pfündel MI. (1998). Estimación de la contribución del fotosistema I a la fluorescencia total de la clorofila foliar. *Investigación de la fotosíntesis* 56, 185 -195.

- Baker NR. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual review of plant biology*, 59, 89–113.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>

-Reol M. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, XII (1), 1–11. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54012108>.

- Larcher W. (1995). *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin, 506 p.

-Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10, 51–62 <https://doi.org/10.1007/BF00024185>

-Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. 2004. Análisis de la clorofila a fluorescencia transitoria. En: Papageorgiou GC, Govindjee (eds.) *Chlorophyll a Fluorescence. Avances en la fotosíntesis y la respiración*, vol. 19. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12

- Kooistra J. (2018). Newzoo's 2018 Global Mobile Market Report: Insights into the World's 3 billion Smartphone Users | Newzoo. <https://newzoo.com/insights/articles/newzoos-2018-global-mobile-market-report-insights-into-the-worlds-3-billion-smartphone-users/>

-McCracken KE, Yoon JY. (2016). Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: a brief review. *Analytical Methods*, 8(36), 6591–6601. <https://doi.org/10.1039/C6AY01575A>

- Vashist SK, Zheng D, Al-Rubeaan K., Luong, JHT, Sheu, FS. (2011). Technology behind commercial devices for blood glucose monitoring in diabetes management: a review. *Analytica Chimica Acta*, 703 (2), 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.024>
- Contreras NJC, Wei Q, Ozcan A. (2016). Mobile Phone-Based Microscopy, Sensing, and Diagnostics. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 22(3), 1–14. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2015.2478657>
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2013). *Bioenergetics (Fourth Edition)*. Academic Press, <https://www.sciencedirect.com/book/9780123884251/bioenergetics>
- Brooks H. (1994). The relationship between science and technology. *Research Policy*, 23(5), 477–486. [https://doi.org/10.1016/0048-7333\(94\)01001-3](https://doi.org/10.1016/0048-7333(94)01001-3)
- Laurens K-H, Van Lente H, Smits R. (2009). In search of relevance: The changing contract between science and society, *Science and Public Policy*, Volume 36, Issue 5, June 2009, Pages 387–401, <https://doi.org/10.3152/030234209X442034>
- Maxwell K., Johnson G N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Kalaji HM, Schansker G, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Ferroni L, Goltsev V, Guidi L, Jajoo A, Li P, Losciale P, Mishra VK, Misra AN, Nebauer SG, Pancaldi S, Penella C, Pollastrini M, Suresh K, Tambussi E, & Yanniccari M. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research*, 132(1), 13–66. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y>

-Valentine A, Ruzvidzo O, Kleinert A, Kang Y & Bennedito V. (2013). Infrared Gas Analysis Technique for the Study of the Regulation of Photosynthetic Responses. *Cyclic Nucleotide Signaling in Plants*, 1016, 261–269. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-441-8_19

-Fernández SE. (2005). Síntesis y estudio fotofísico de sondas fluorescentes: seguimiento de procesos de fotopolimerización y fotodegradación: aplicación en adhesivos. *Eprints.ucm.es*. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/4474/>

-Córsico B, Falomir LJ, Franchini GR & Scaglia N. (2013). Capítulo 2. Análisis estructural y funcional de macromoléculas (1st ed.). Buenos Aires Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/37269>

-Zhang, Xiaomin & FANG, Yanjun & ZHAO, Youquan. (2013). A Portable Spectrophotometer for Water Quality Analysis. *Sensors and Transducers*. 148. 47-51. https://www.researchgate.net/publication/288203737_A_Portable_Spectrophotometer_for_Water_Quality_Analysis

-Ranaweera KR, Gilmore M, Capone LD, Bastian S & Jeffery W. (2020). Authentication of the geographical origin of Australian Cabernet Sauvignon wines using spectrofluorometric and multi-element analyses with multivariate statistical modelling. *Food Chemistry*, 335, 127592. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127592>

-Krause GH, Weis E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:313-349. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>

-Kautsky H. y A. Hirsch (1931). Chlorophyll fluoreszenz und Kohlensäure assimilation *Naturwissenschaften*, 19, 964-964. <https://doi.org/10.1007/BF01516164>

-Hansatech. (n.d.). Chlorophyll Fluorescence. Hansatech Instruments Ltd. Retrieved September 24, 2021, from <http://www.hansatech-instruments.com/chlorophyll-fluorescence/>

-Hansatech. (n.d.). Pulse Modulated Chlorophyll Fluorescence. Hansatech Instruments Ltd. Retrieved September 24, 2021, from <http://www.hansatech-instruments.com/pulse-modulated-chlorophyll-fluorescence/>

-Hansatech. (n.d.). Continuous excitation chlorophyll fluorescence. Hansatech Instruments Ltd. Retrieved September 24, 2021, from <http://www.hansatech-instruments.com/product-category/chlorophyll-fluorescence/continuous-excitation-chlorophyll-fluorescence/>

- Brooks MD, Niyogi KK. (2011) Use of a Pulse-Amplitude Modulated Chlorophyll Fluorometer to Study the Efficiency of Photosynthesis in Arabidopsis Plants. In: Jarvis R. (eds) Chloroplast Research in Arabidopsis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 775. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-61779-237-3_16

-Ögren E, Baker NR. (1985). Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. End Plant, Cell and Environment (539-547). Department of Biology, University of Essex, Colchester: Editorial board. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302653978>

-YSI Inc. (2013). The Basics of Chlorophyll Measurement. <https://www.yisi.com/File%20Library/Documents/Technical%20Notes/T606-The-Basics-of-Chlorophyll-Measurement.pdf>

- Strasser RJ, Govindjee (1992) The Fo and the O-J-I-P Fluorescence Rise in Higher Plants and Algae. In: Argyroudi-Akoyunoglou J.H. (eds) Regulation of Chloroplast

Biogenesis. Nato ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 226. Springer, Boston, MA.

https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3366-5_60

-Mauzerall D. (1972). Light-induced fluorescence changes in *Chlorella*, and the primary photoreactions for the production of oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), 1358–1362.

<https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1358>

-Falkowski P, Wyman K, Ley AC, Mauzerall D. (1986). Relación de la fotosíntesis en estado estacionario con la fluorescencia en algas eucarióticas *Biochim. Biophys. Acta*, 849 (1986), pp. 183 – 192.

[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90024-1)

-Kolber ZS, Prášil O & Falkowski, PG. (1998). Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochimica et Biophysica. Bioenergetics*, 1367(1-3), 88–106.

[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00135-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00135-2)

- Gorbunov MY & Falkowski, PG. (2004). Fluorescence induction and relaxation (FIRE) technique and instrumentation for monitoring photosynthetic processes and primary production in aquatic ecosystems. In 13th international congress of photosynthesis (Vol. 2, pp. 1029-1031). Montreal, QC: Allen Press.

-Chekalyuk A, Hafez M. (2008) Next generation Advanced Laser Fluorometry (ALF) for characterization of natural aquatic environments: new instruments, *Opt. Express* 21, 14181-14201

- Strasser RJ, Stirbet A. (2001). Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P. *Mathematics and Computers in Simulation*, 56(4-5), 451–462. [https://doi.org/10.1016/s0378-4754\(01\)00314-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4754(01)00314-7)
- Stirbet A, Govindjee M. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1-2), 236–257. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010>
- Marx V. (2015). PCR heads into the field. *Nature Methods*, 12(5), 393–397. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3369>
- TAOS inc. (2010, February). Intelligent opto sensor designer’s notebook TAOS. *Manualzz.com*. <https://manualzz.com/doc/20036654/ams-ag--taos-inc.-is-now>
- Zhu H, Sikora U, Ozcan A. (2013). Quantum dot enabled detection of Escherichia coli using a cellphone. *The Analyst*, 137(11), 2541. <https://doi.org/10.1039/c2an35071h>
- Broadcom Limited. (2015). APDS-9930. *broadcom.com*. <https://www.broadcom.com/products/optical-sensors/integrated-ambient-light-proximity-sensors/apds-9930>
- Hussain I, Bowden AK. (2021). Smartphone-based optical spectroscopic platforms for biomedical applications: a review. *Biomedical Optics Express*, 12(4), 1974–1998. <https://doi.org/10.1364/BOE.416753>
- Yu H, Tan Y, Cunningham BT. (2015). Smartphone fluorescence spectroscopy. In B. T. Cunningham, B. L. Miller, & P. M. Fauchet (Eds.), *Frontiers in Biological Detection: From*

Nanosensors to Systems VII [93100B] (Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE; Vol. 9310). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.2083999>

-Hossain A, Canning J, Ast S, Cook K, Rutledge PJ, Jamalipour A. (2015). Combined "dual" absorption and fluorescence smartphone spectrometers. *Optics letters*, 40(8), 1737–1740. <https://doi.org/10.1364/OL.40.001737>

-Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002) *Biochemistry*. 5ª edición. Nueva York: WH Freeman; Sección 19.4, A Proton Gradient Across the Thylakoid Membrane Drives ATP Synthesis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22519/>

-Morançais M, Luc MD. (2018) *Proteins and Pigments* Editor(s): Ira A. Levine, Joël Fleurence, *Microalgae in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Pages 145-175, ISBN 9780128114056, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114056000074>

- Paradowski RJ. (2021). *Mullis Develops the Polymerase Chain Reaction*. Salem Press Encyclopedia, <https://search-ebshost-com.pbidi.unam.mx:2443/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=89315499&lang=es&site=eds-live>.

- Palomino C, Carolina & Yuniesky GM. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(3), 535-546. Recuperado en 07 de julio de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020&lng=es&tlng=es

- Arikawa E, Prabhakar S, Zhang H, You M, Wang Y, Quellhorst G, Zeng X, Hung J & Yang J. (2015). RT2 Profiler PCR Array application examples Pathway-focused gene expression profiling in toxicology, oncology, and immunology research. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=8329f09f-941e-4123-8123-c1ba52a0c526&lang=en>

- Aguilera P, Ruiz Tachiquín M, Rocha Munive MG, Pineda OB, & Chánez Cárdenas ME. (2014). (PDF) PCR en tiempo real. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/259042551_PCR_en_tiempo_real

- Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, Souza PR, Albuquerque TC y Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822009000100001>

- Chan K, Wong PY, Yu P, Hardick J, Wong KY, Wilson SA, et al. (2016) A Rapid and Low-Cost PCR Thermal Cycler for Infectious Disease Diagnostics. *PLoS ONE* 11(2): e0149150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149150>

- Yi-Fan H, Da-Sheng L, Ping-Hei C, Shao-Kai L, Shiou-Hwei Y, Pei-Jer C, An Shik Y. (2013). A real-time convective PCR machine in a capillary tube instrumented with a CCD-based fluorometer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 183, 2013, Pages 434-440, ISSN 0925-4005, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.003>.

- Voiland A. (2011). NASA, First-of-its-Kind Fluorescence Map Offers a New View of the World's Land Plants. *Nasa.gov*. <https://www.nasa.gov/topics/earth/features/fluorescence-map.html>

- Neil RB, Rosenqvist E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities, *Journal of Experimental Botany*, Volume 55, Issue 403, Pages 1607–1621, <https://doi.org/10.1093/jxb/erh196>
- Instruments Shimadzu (2019). UV-Vis frequently asked questions - instrument design. Shimadzu.com.<https://www.ssi.shimadzu.com/products/uv-vis-spectrophotometers/faqs/instrument-design.html>
- AGSanalitica. (n.d.). ¿Para qué sirve un Espectro-fluorómetro? AGS ANALÍTICA. Retrieved 2021, from <https://www.agsanalitica.com/que-es-la-fluorescencia>
- Rajabalipanah H., Abdolali A., Shabanpour J, Momeni A. y Cheldavi A. (2019). Asymmetric Spatial Power Dividers Using Phase–Amplitude Metasurfaces Driven by Huygens Principle. *ACS omega*, 4 (10), 14340-14352. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02195>
- Cao J, Sun Y, Kong Y y Qian W. (2019). The Sensitivity of Grating-Based SPR Sensors with Wavelength Interrogation. *Sensor* 19, no. 2: 405. <https://doi.org/10.3390/s19020405>
- Vázquez M. (2021). Caracterización bioenergética y metabólica del uniportador de calcio mitocondrial en cloroplastos. Tesis de licenciatura (UNAM).
- Charro CJ. (2018). Calibración y verificación de equipos analíticos. Uvadoc.uva.es. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/32066>
- Ocean Networks Canada. (n.d.). Fluorometer. www.oceannetworks.ca. Retrieved June 28, 2021, from <https://www.oceannetworks.ca/learning/ocean-sense/resources-lessons/fluorometer>

-HORIBA. (n.d.). Fluorometers (fluorimeters). Wwww.horiba.com. Retrieved June 29, 2021,
from https://www.horiba.com/en_en/products/scientific/molecular-and-microanalysis/fluorometers/

- Tanaka R, Tanaka A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8), 968–976. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.01.002>

Joseph M. Azzarelli, Katherine A. Mirica, Jens B. Ravnsbæk, and Timothy M. Swager (2014). Wireless gas detection with a smartphone via rf communication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(51), 18162–18166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415403111>

- Trafton A. (2014). Detecting gases wirelessly and cheaply. MIT News Massachusetts Institute of Technology. <https://news.mit.edu/2014/wireless-chemical-sensor-for-smartphone-1208>

- Murphy M. (2017). The future of sensory technology. MIT News Massachusetts Institute of Technology. <https://news.mit.edu/2017/future-of-sensory-technology-mit-nano-0522>

-Rodríguez J. (2014). Los 7 mejores recursos y servicios para crear aplicaciones. ComputerHoy. <https://computerhoy.com/listas/apps/7-mejores-recursos-servicios-crear-aplicaciones-9239>

-Ralph P, Wilhelm C. et.al. (2010). Fluorescence as a Tool to Understand Changes in Photosynthetic Electron Flow Regulation. DOI: 10.1007/978-90-481-9268-7_4

-Müller, P., Li, X. P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant physiology, 125(4), 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>

ANEXO

ANEXO 1. Costos promedio de diferentes espectrofluorómetros de laboratorio de diferentes marcas comerciales.

Marca	Modelo	Características	Costo (dólares)
Jenway	6850 / 115V / IQOQ		\$ 13,803.30
Hach	DR 6000™ UV VIS Spectrophotometer		\$10,104.12
Único	Unico SQ4802 Double Beam UV/Vis Spectrophotometer		\$7,312.16
METASH	UV-8000A		\$6,471.50
Thermo Scientific	AquaMate 7100		\$ 3,535.84
Jenway	Jenway 630501 6300 Visible Spectrophotometer		\$2,269.80

Scilogex	Scilogex 401021010009		\$1,260.00
----------	--------------------------	--	------------

ANEXO 2. Sensores comúnmente encontrados en dispositivos móviles inteligentes

Parámetro	Sensor	Propósito original
Temperatura	Termopar	Detectar la temperatura interna y externa del dispositivo
Iluminancia del entorno	Sensor de luz	Este sensor calcula la iluminancia del entorno y envía los datos al dispositivo para el ajuste de iluminación de pantalla automática.
Velocidad angular	Giroscopio	Se utiliza para rastrear la rotación del dispositivo.
Orientación	Acelerómetro	Calcula la orientación de tres ejes del dispositivo y envía los datos a las aplicaciones y juegos requeridos.
Detecta un objeto cercano	Proximidad	Activa un rayo de luz que se refleja y el dispositivo apaga la visualización de la pantalla temporalmente.

Presión atmosférica	Barómetro	Funciona con el sensor GPS sobre las mediciones del nivel del mar del para una mayor precisión del GPS.
Frecuencia cardíaca	Monitor de frecuencia cardíaca	Calcula el pulso del usuario por minuto al ponerlo en el sensor y lo muestra en la pantalla.
Detector de huellas	huellas dactilares	Tiene varias funciones, pero la más importante es para desbloquear el dispositivo
Numero de pasos	Podómetro	Calcula el número de pasos que da el usuario.
Lugar de posición	GPS	Se conecta al satélite y dará un resultado de posición preciso para el usuario.
Funciones con el contacto	Pantalla táctil	Sensor que funciona con el tacto en la pantalla para realizar diversas funciones.
Detector de imanes	Sensor Hall	cubiertas abatibles que eran funcionales, como si tuviera una opción para apagar la pantalla cuando los enciende,

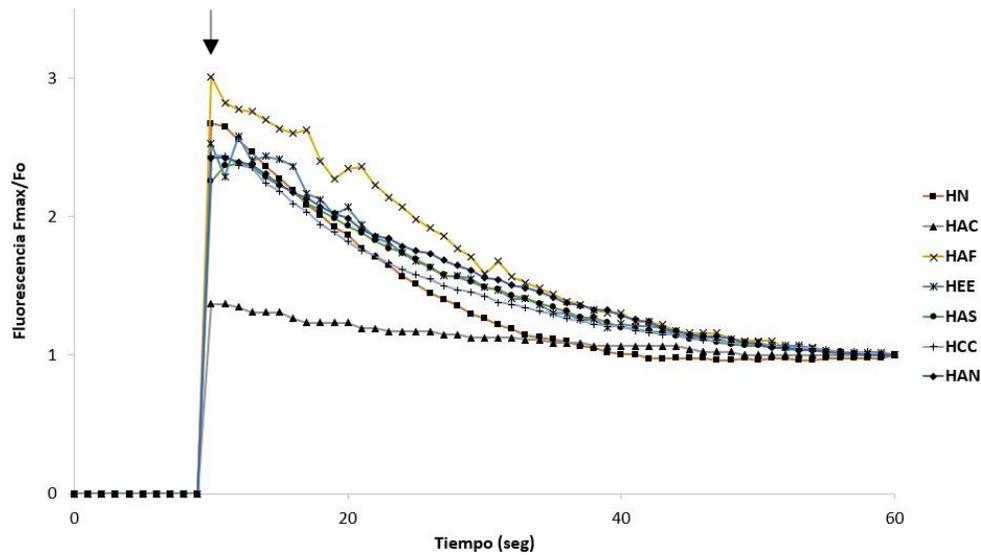
Indica posición y dirección	Brújula digital	Este sensor proporciona la posición y direcciones directas del dispositivo a las aplicaciones sin ningún problema.
Gráfica y profundiza imágenes	Realidad virtual y aumentada	Estos ayudarán más tarde a organizar diferentes cosas a través de AR o VR.
Trabaja con la radiación emitida	Sensor de infrarrojos	Este escáner se utiliza principalmente para cifrar el dispositivo con los datos faciales de cualquier persona.
Detecta la presión en dispositivo	Sensor de presión	Detecta la cantidad de presión que se ejerce sobre el dispositivo en los lados o en la pantalla
Detectar el patrón del iris de la persona.	Escáner de iris	Escanear el patrón que se encuentra en el iris de las personas, esto es para encriptar el dispositivo con los ojos de una persona en particular.
Manejo de dispositivos	Control remoto por infrarrojos	Utilizan el mando a distancia por infrarrojos para recibir señales y realizar una función determinada.
Medición de humedad en el aire	Sensor de humedad del aire	Se utiliza para encontrar el nivel de humedad en el aire.

Mide cantidad de oxígeno en sangre	Oxímetro de pulso	Se usa para encontrar la cantidad de oxígeno que se encuentra en su sangre.
Transferencia de datos	NFC	Se usa para realizar transacciones financieras e incluso se puede usar para compartir fotos y videos.
Enfocar la cámara	Láser	Se usa para medir realmente la distancia entre el teléfono móvil y lo que está detrás. Incluso se puede utilizar para enfocar su cámara con mayor precisión.
Control de celular	Gesto de aire	Se usa para hacer funciones en el celular solamente moviendo los brazos, sin tocar el celular.

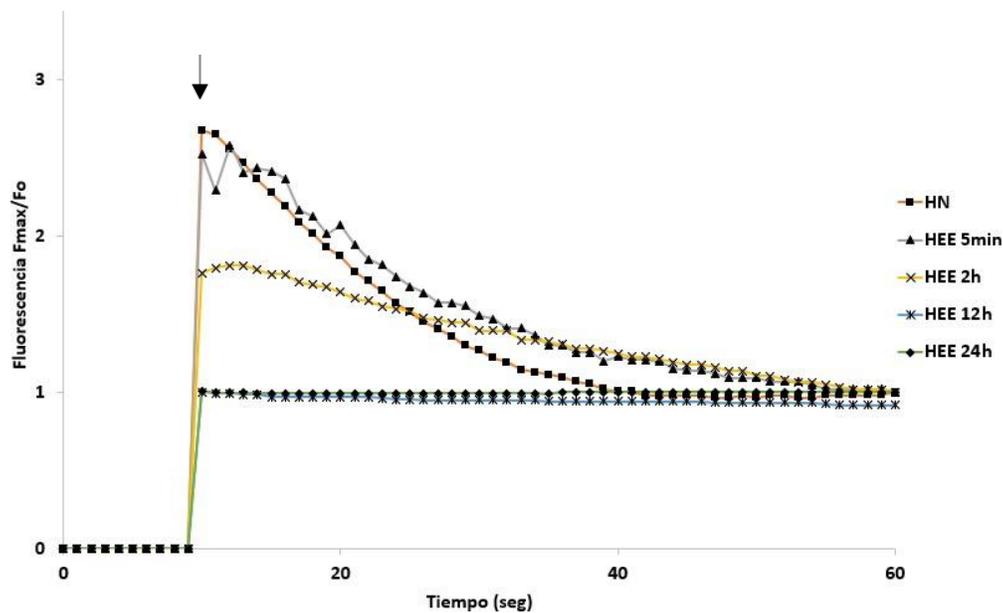
ANEXO 3. Estudios de fluorescencia en hojas de plantas sometidas a diferentes condiciones y concentraciones

Los resultados mostrados a continuación denotan pruebas hechas con el Modelo 4 en hojas sometidas a las condiciones detalladas en el pie de figura. De todas ellas, las dos condiciones que ocasionaron una disminución sustancial en la señal de la clorofila fueron a las hojas sometidas a un tratamiento con agua caliente (HAC) (Gráfica Suplementaria 1) y a un tratamiento de extracción con etanol (HEE) (Gráfica Suplementaria 2).

También las hojas sometidas en diferentes concentraciones de NaOH se muestran como graficas suplementarias 3 y 4.

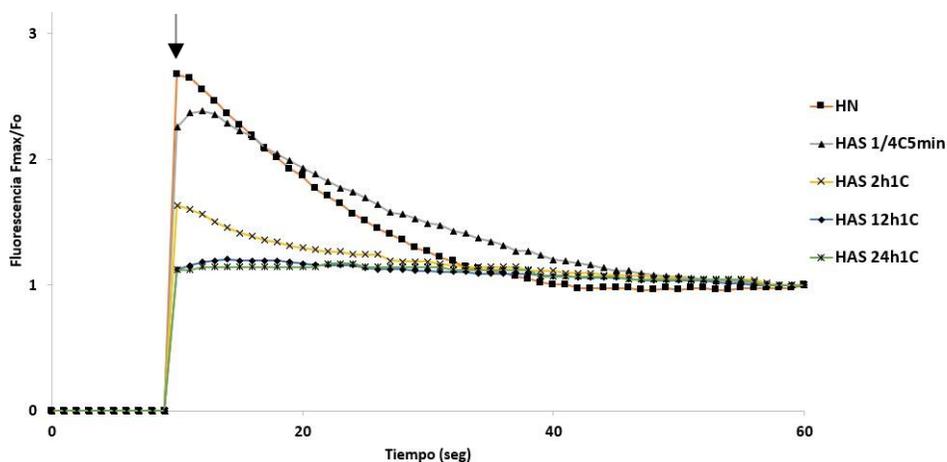


Gráfica Suplementaria 1. Resultados obtenidos con el Modelo 4 de un promedio de tres repeticiones. Las hojas estuvieron en diferentes condiciones durante 5 minutos: Hoja normal sin ninguna sustancia (HN) una hoja en agua caliente (HAC), una hoja en agua fría (HAF), una hoja en etanol al 98% (HEE), una hoja en agua con sal (HAS), una hoja con cortes (HCC) y una hoja en agua a temperatura ambiente (HAN). Cada hoja se repitió la medición en 3 ocasiones y en diferente parte de la hoja durante 60 segundos, donde el en segundo 10 se le hizo incidir el haz de luz LED UV (flecha).

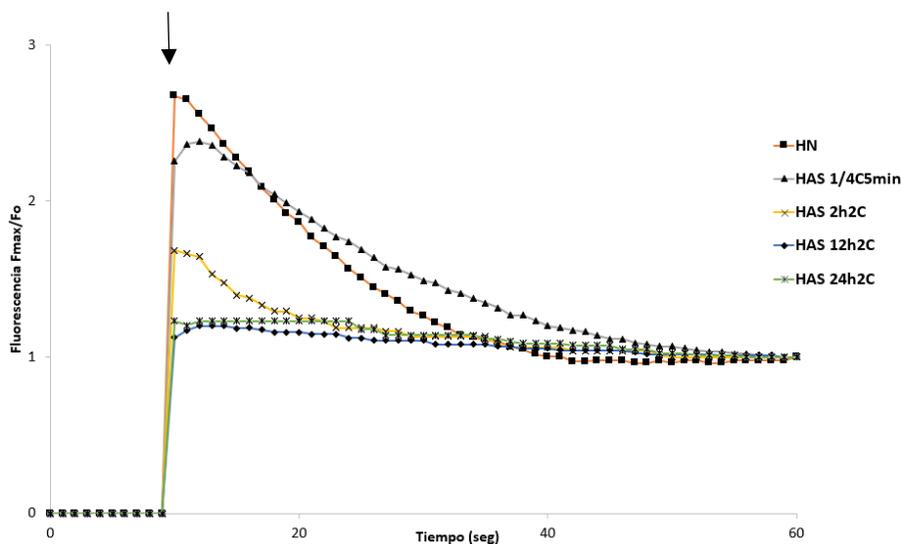


Gráfica Suplementaria 2. Resultados obtenidos con el Modelo 4 de un promedio de tres repeticiones. Las hojas estuvieron en diferentes condiciones. Hoja normal sin ninguna sustancia (HN) durante 5 minutos, una hoja en etanol durante 5 minutos (HEE 5 min), una hoja en etanol durante 2 horas (HEE 2h), una hoja en etanol durante 12 horas (HEE 12h) y una hoja en etanol durante 24 horas (HEE 24h). Cada hoja se repitió la medición

en 3 ocasiones y en diferente parte de la hoja durante 60 segundos, donde el en segundo 10 se le hizo incidir el haz de luz LED UV (flecha).



Gráfica Suplementaria 3. Resultados obtenidos con el Modelo 4 de un promedio de tres repeticiones. Las hojas estuvieron en diferentes tiempos y en dos diferentes concentraciones de sal de mesa. Una hoja normal sin ninguna sustancia (HN) durante 5 minutos, una hoja en agua con sal (1/4 cucharada) durante 5 minutos (HAS ¼ C5 min), una hoja en sal (1 cucharada) durante 2 horas (HAS 2h1C), una hoja en agua con sal (1 cucharada) durante 12 horas (HAS 12h1C) y una hoja en agua con sal (1 cucharada) durante 24 horas (HAS 24h1C). En cada hoja se repitió la medición en 3 ocasiones, en una diferente parte de la hoja durante 60 segundos, donde el en segundo 10 se le hizo incidir el haz de luz LED UV (flecha).



Gráfica Suplementaria 4. Resultados obtenidos con el Modelo 4 de un promedio de tres repeticiones. Las hojas estuvieron en diferentes tiempos y en dos diferentes concentraciones de sal de mesa. Una hoja normal sin ninguna sustancia (HN) durante 5 minutos, una hoja en agua con sal (1/4 cucharada) durante 5 minutos (HAS ¼ C5 min), una hoja en sal (2 cucharadas) durante 2 horas (HAS 2h2C), una hoja en agua con sal (1 cucharada) durante 12 horas (HAS 12h2C) y una hoja en agua con sal (2 cucharada) durante 24 horas (HAS 24h2C). En cada hoja se repitió la medición en 3 ocasiones, en una diferente parte de la hoja durante 60 segundos, donde el en segundo 10 se le hizo incidir el haz de luz LED UV (flecha).