

ANEXO

Evaluación estadística de la intensidad fluorescente a 514 nm como respuesta del sistema FRET frente a concentraciones de Hg^{2+}

1. Descripción

Determinación de la relación entre la intensidad de emisión fluorescente a 514 nm y la concentración de Hg^{2+} en un sistema molecular fluorescente tipo FRET para detección de mercurio.

2. Objetivo del experimento

Evaluar si la variación de la intensidad fluorescente emitida a 514 nm presenta una relación estadísticamente significativa con la concentración de Hg^{2+} , con el propósito de establecer este parámetro como variable de calibración del sistema de detección molecular desarrollado.

3. Materiales

Reactivos y muestras

- Sistema molecular fluorescente FRET basado en la conjugación de hidracida de rodamina B y fluoresceína.
- Soluciones patrón de Hg^{2+} en diferentes concentraciones.
- Medio acuoso de análisis para evaluación espectroscópica.
- Solventes y soluciones de ajuste previamente caracterizados para garantizar estabilidad del sistema fluorescente.

Equipos

- Espectrofotómetro de fluorescencia RF-6000 Shimadzu.
- Sistema de adquisición y análisis de intensidad de emisión fluorescente.
- Software de procesamiento estadístico para análisis de distribución y correlación de variables.

4. Metodología experimental

1. Se prepararon muestras del sistema fluorescente con diferentes concentraciones conocidas de Hg^{2+} .
2. Se realizaron 15 adiciones estandarizadas de Hg^{2+} dentro de un rango de concentración entre 0 y 10000 $\mu\text{g/L}$.
3. Para cada concentración se registró el espectro de emisión fluorescente.
4. Se seleccionó la longitud de onda de 514 nm como parámetro principal de evaluación debido a que corresponde al pico de mayor variación de intensidad del sistema.
5. Los valores obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico mediante prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov, debido a que se consideró que los datos no presentaban una distribución normal.
6. Se evaluó la hipótesis de relación entre concentración de Hg^{2+} e intensidad fluorescente.

5. Resultados obtenidos

Se reportan los siguientes resultados estadísticos para la intensidad fluorescente a 514 nm:

Variable	Observaciones	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típica
Hg ²⁺ (µg/L)	15	0,000	10000,000	1259,233	2758,338
I (574 nm)	15	2078,456	3435,212	2855,506	418,346
D			0,867		
valor-p (bilateral)			<0,0001		
alfa			0,050		
Se rechaza H ₀ , y se acepta H _a .					

El resultado estadístico permitió rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, evidenciando que existe una diferencia significativa asociada a la variación de intensidad fluorescente respecto a la concentración de Hg^{2+} .

Los datos experimentales muestran que la intensidad a 514 nm disminuye progresivamente con el incremento de Hg^{2+} . La respuesta inicial del sistema presenta una alta intensidad fluorescente en ausencia de mercurio y una reducción marcada al aumentar la concentración del analito. Los valores experimentales utilizados para esta relación muestran una

disminución desde 6371,227 unidades a 0 $\mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} hasta 573,162 unidades a 10000 $\mu\text{g/L}$.

6. Análisis de resultados

La intensidad de emisión a 514 nm se identifica como el parámetro fotofísico más sensible del sistema FRET. La disminución de esta señal representa el fenómeno de apagamiento fluorescente asociado a la interacción molecular del Hg^{2+} con el sistema diseñado.

Dentro del comportamiento global del sensor, este pico presenta la mayor variación relativa y permite diferenciar cambios pequeños de concentración, especialmente en rangos bajos de Hg^{2+} . La tesis establece que la disminución del pico de 514 nm es el principal criterio para la calibración del sistema porque evoluciona desde la máxima emisión fluorescente hasta valores cercanos a desaparecer.

7. Conclusiones

1. La intensidad fluorescente a 514 nm presenta una respuesta estadísticamente significativa frente a cambios en la concentración de Hg^{2+} .
2. El parámetro de intensidad a 514 nm es adecuado como variable analítica para la calibración del sistema molecular fluorescente.
3. La respuesta del sistema confirma el funcionamiento del mecanismo FRET diseñado, donde la interacción con Hg^{2+} modifica la transferencia de energía entre los fluoróforos y produce un cambio medible en la emisión fluorescente.
4. Los resultados respaldan la posibilidad de implementar el sistema como sensor molecular para detección de Hg^{2+} en matrices biológicas, incluyendo tejido branquial de peces.