



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE
DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA EN TIEMPO
REAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICA

P R E S E N T A:

KARINA JAQUELINE PÉREZ MORALES



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JESÚS GARDUÑO MEJÍA**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2019



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.

1. Datos del alumno

Pérez

Morales

Karina Jaqueline

55 29 46 43 30

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Física

311055906

2. Datos del Tutor

Dr.

Jésus

Garduño

Mejía

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Martha

Rosete

Aguilar

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Alejandro

Vásquez

Arzola

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Héctor

Cruz

Ramírez

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Yazmín

Ramiro

Cortés

7. Datos del trabajo escrito

Diseño y construcción de un sistema de
detección de fluorescencia en tiempo real

65pp

2019

Reconocimientos.

A Esperanza Formación y Vida A.C. por la beca otorgada durante la realización del proyecto.

Quiero agradecer con proyectos DGAPA, UNAM: PAPIIT-IN 111818, PAPIIT-IN 107018, por el apoyo brindado a la realización de este trabajo.

También quiero agradecer a Intercovamex y Horiba Scientific, por el apoyo brindado para corroborar las muestras de este trabajo con su equipo.

Índice

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	8
1.1. Conceptos básicos	8
1.1.1. <i>Absorción</i>	8
1.1.2. <i>Fotoluminiscencia</i>	8
1.1.3. <i>Relación señal a ruido</i>	10
1.2. Factores que influyen en la intensidad de la fluorescencia de la muestra	10
1.2.1. <i>Efecto de la temperatura</i>	11
1.2.2. <i>Efecto del disolvente</i>	11
1.2.3. <i>Efecto de la concentración</i>	11
1.3. La fluorescencia y sus aplicaciones	14
1.4. Fluoróforos.	15
1.4.1. <i>¿Como se caracterizan los fluoróforos?</i>	17
1.5. Técnicas de medición	18
CAPÍTULO 2. TÉCNICAS DE MEDICIÓN	22
2.1. Preparación de las muestras	23
2.2. Caracterización con Espectrómetro	25
2.2.1 <i>Método experimental</i>	25
2.2.2. <i>Resultados experimentales. Espectrómetro</i>	28
2.3. Tubo fotomultiplicador.	32
2.3.1 <i>Método experimental</i>	32
2.3.2. <i>Resultados experimentales. PMT</i>	34
2.4. Tubo fotomultiplicador (PMT) con Lock-in (amplificador de amarre de fase).	38
2.4.1. <i>Método experimental</i>	38
2.4.1. <i>Resultados experimentales. Lock- in</i>	42
CAPÍTULO 3. APLICACIONES	44
3.2. Fluorescencia como función de la temperatura.	46
3.2.1. <i>Método experimental</i>	46
3.2.1. <i>Resultados experimentales. Fluorescencia en función de la temperatura</i>	49

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS.	54
ANEXO I. TUBO FOTO-MULTIPLICADOR (PTM).....	56
ANEXO II. MÉTODO DE LOCK-IN.....	58
ANEXO III. CIRCUITO 555.	61
ANEXO IV. FIBRA ÓPTICA.....	63
ANEXO V. PROGRAMAS REALIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS.....	64
<i>Análisis de los datos obtenidos del Lock in.</i>	64
<i>Código para analizar las temperaturas de las diferentes mediciones</i>	64

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La luz puede ser absorbida por un material de acuerdo a la longitud de onda del mismo. La radiación emitida por una molécula o un átomo, después de haber absorbido energía para colocarse en un estado excitado, es definida como luminiscencia, la cual se divide en: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado [1].

A pesar de que existen relativamente pocos materiales luminiscentes, este fenómeno es frecuente en especies de gran importancia biológica y farmacéutica o de interés orgánico y en los casos en los que son aplicables las técnicas luminiscentes, presentan muchas ventajas analíticas únicas en lo que se refiere a sensibilidad (a niveles de trazas) y selectividad [3]. Los materiales que fluorescen lo hacen porque contienen estructuras con configuraciones moleculares particulares conocidas como fluoróforos o fluorocromos [3,4]. Los fluorocromos son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda característica. La parte de la molécula que emite la fluorescencia se denomina fluoróforo.

Las principales dificultades para la detección de fluorescencia, por ejemplo en DNA, están relacionadas con la baja intensidad emitida y por otro lado el ruido luminoso, provocada por la fuente de excitación, que enmascara la señal, para lo cual es necesario aplicar técnicas ópticas de alta sensibilidad acompañadas de sistemas de filtraje óptico y electrónico. Actualmente existen una amplia variedad de sistemas ópticos que utilizan una combinación de fuentes luminosas, filtros y detectores para medir la cantidad de fluorescencia presente en las muestras. Las fuentes luminosas utilizadas para excitar los fluoróforos utilizadas con mayor frecuencia son:

- a) Arreglos de LEDs en combinación RGB (Rojo, Verde y Azul). Estos arreglos emiten luz en las longitudes de ondas necesarias para cubrir con el espectro de los fluoróforos de interés.

- b) Lámparas de halógeno que emiten luz blanca de amplio espectro; para ello es necesario el filtrado del haz de luz a las longitudes de onda de interés.

- c) Fuentes Láser que emiten luz de alta intensidad, pero en un ancho de banda estrecho, limitando su uso en modo multiplexado.

- d) Detección: los sensores ópticos utilizados para detectar la luz de las muestras excitadas pueden ser foto-diodos, CCDs, tubos fotomultiplicadores (PMT) y espectro-fotómetros. El amplificador de amarre de fase, es una técnica viable a desarrollar porque tiene la capacidad de detectar señales de baja intensidad enmascaradas en una señal ruido. Esta técnica se puede implementar de manera digital usando softwares como LabView.

Objetivo

El objetivo de éste trabajo es diseñar y construir un sistema de detección de fluorescencia en tiempo real y de alta sensibilidad, generada por fluoróforos. El sistema de detección está basado en un tubo fotomultiplicador actuando como sensor y un Lock-in digital (amplificador de amarre de fase). Diseñado y construido en el laboratorio como parte de éste trabajo, para filtrar el ruido y amplificar la señal de manera electrónica-digital.

Metodología

Fue diseñado un sistema de detección que facilite la medición de la señal de fluorescencia. Fueron realizadas pruebas con detección directa aplicando un tubo fotomultiplicador (PMT) y posteriormente fue integrado al sistema de detección un amplificador de amarre de fase (Lock-in). Se compararon los resultados entre ambos sistemas de detección a partir de muestras fluorescentes con diferentes concentraciones. Se implementó un dispositivo que regule la temperatura de las muestras y se probó el mejor de los sistemas de detección para medir cambios de la fluorescencia en función de la temperatura.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1. Conceptos básicos

1.1.1. Absorción

Este proceso ocurre cuando la energía de la luz ocurre cuando un fotón incidente promueve la transición de un electrón de un estado de menor a mayor energía. Los electrones excitados eventualmente pierden esta energía ganada y, por un proceso de radiación regresan a su estado inicial. La luz puede ser absorbida por un material de acuerdo con la longitud de onda de esta [1].

La mayoría de las sustancias que absorben la radiación ultravioleta o visible la convierten en energía interna. Sin embargo, hay otros que reemiten radiación en forma de longitudes de onda más largas que la absorbida, por ejemplo, absorben en ultravioleta y reemiten en azul. Este fenómeno se llama fotoluminiscencia, que comprenden dos fenómenos a la vez: fluorescencia y fosforescencia [5].

1.1.2. Fotoluminiscencia

Para explicar ambos fenómenos luminiscentes a nivel atómico-molecular se hace uso del diagrama de Jablonski, ver Figura 1.1.

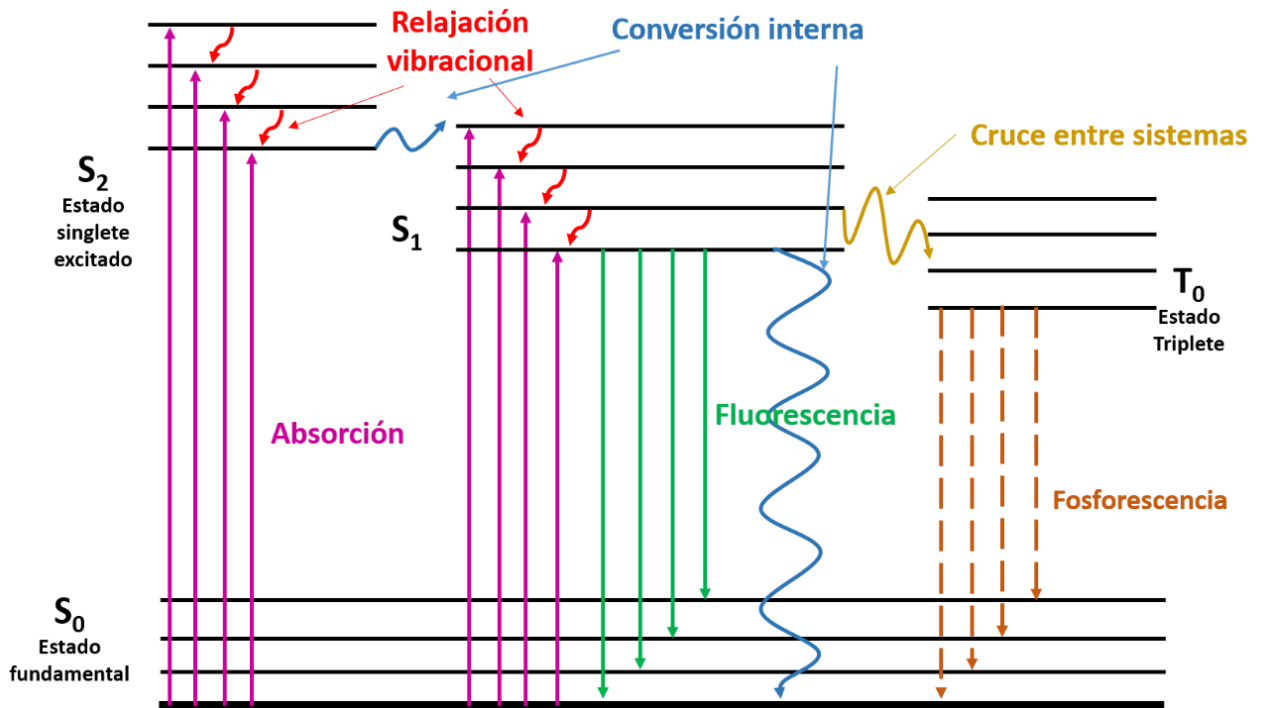


Figura 1.1 Diagrama de Jablonski [2].

El tiempo de absorción es del orden de 10^{-15} segundos y, se define como el tiempo necesario para que una molécula pase de un estado electrónico a otro [2]. El tiempo de vida del electrón en el estado excitado es de $10^{-7} - 10^{-8}$ segundos y, posteriormente, la molécula pierde el exceso de energía que la hizo pasar del estado fundamental al estado excitado emitiendo o no radiación [2].

En los procesos en los que la relajación ocurre con emisión de radiación se encuentran la fluorescencia y la fosforescencia. En ambos fenómenos, algunos electrones pasan de estados vibracionales y electrónicos fundamentales (S_0) a los correspondientes estados excitados (S_1 , S_2 ...) según la cantidad de energía absorbida. En la transición del estado fundamental al estado excitado, cuando el spin del electrón no cambia y permanece "apareado" con el electrón no excitado se le conoce como transición singulete-singulete (fluorescencia) [2]. La fosforescencia comienza igual que la fluorescencia, absorbiendo energía de excitación, pero la almacena retardando la emisión, siendo capaz de emitir esa radiación luminosa durante minutos u horas después de haber cesado la fuente de radiación excitadora inicial (triplete excitado) [4].

La diferencia entre ellos radica en el tiempo entre absorción y reemisión. En el caso de la fluorescencia, es inmediata (menos de 10 ns) mientras que en la fosforescencia transcurre en más tiempo, de modo que los materiales fosforescentes emiten luz en la oscuridad [5].

En los procesos en los que la desactivación ocurre sin emisión de radiación, la pérdida de energía electrónica tiene lugar mediante choques o interacciones en los que la energía se pierde en forma de calor. Puede ocurrir una desactivación por conversión interna, en la que la molécula pasa de un estado excitado a otro estado excitado siendo este último de menor energía. También puede ocurrir un traslape entre dos niveles de energía relativamente próximos. Esto es lo que se conoce como cruce-intersistemas y tampoco hay emisión de radiación. Este proceso implica, además, un cambio en el spin electrónico y, por tanto, en la multiplicidad de la molécula, es decir, ocurre una transición singlete-triplete (Figura 1.1) [2]. En particular éste trabajo se relaciona con procesos de la fluorescencia.

1.1.3. Relación señal a ruido

En ciencia e ingeniería, la relación señal-ruido (SNR) es una medida que compara el nivel de una señal deseada con el nivel de ruido de fondo. Matemáticamente, la SNR es el cociente de la intensidad de la señal (media) medida en una región de interés (ROI) y la desviación estándar de la intensidad de la señal [20].

$$SNR = \frac{\text{Señal}}{(\text{desviación estandar})} \quad (*)$$

1.2. Factores que influyen en la intensidad de la fluorescencia de la muestra

Hay una serie de factores que pueden influir, de manera notable, en la intensidad de fluorescencia de los compuestos, como es el caso de la estructura molecular, el entorno químico, el disolvente, el pH de la disolución o la temperatura, entre otros [2].

A continuación, se muestran algunos factores que influyen en la intensidad de la fluorescencia.

1.2.1. Efecto de la temperatura

Los cambios en la temperatura afectan la viscosidad del medio y, por lo tanto, el número de colisiones de las moléculas del fluoróforo (moléculas fluorescentes que tienen un espectro de absorción y emisión bien definidos) con las moléculas solventes. La intensidad de la fluorescencia es sensible a tales cambios y la fluorescencia de muchos fluoróforos determinados, muestra una dependencia de la temperatura [6]. En la mayoría de las moléculas, al aumentar la temperatura, aumenta la frecuencia de las colisiones y, con ello, la probabilidad de desactivación por fenómenos no radiantes (mencionados anteriormente) [2].

1.2.2. Efecto del disolvente

La fluorescencia de una molécula se reduce en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con dichos átomos en su estructura. Así mismo, un factor importante del disolvente es su viscosidad. Ésta juega un papel similar al de la temperatura. Cuanto menos viscoso sea el disolvente, mayor es la probabilidad de que haya colisiones entre las moléculas del soluto y, de este modo, se favorecen las desactivaciones no radiantes por conversión externa [2].

1.2.3. Efecto de la concentración

La intensidad de la fluorescencia se reducirá por la presencia de cualquier compuesto que sea capaz de absorber una parte de la energía de excitación o de emisión. La Figura 1.2 presenta una curva de absorbancia versus concentración, a 525 nanómetros, para soluciones de KMnO_4 . En altas concentraciones, esto puede ser causado por la absorción debido al propio fluoróforo [6,12].

La relación proporcional entre la absorción de luz y la emisión de fluorescencia solo es válida en los casos en que la absorción es pequeña. A medida que aumenta la concentración de

fluoróforo, se producen desviaciones y la gráfica de emisión contra concentración se vuelve no lineal. [6].

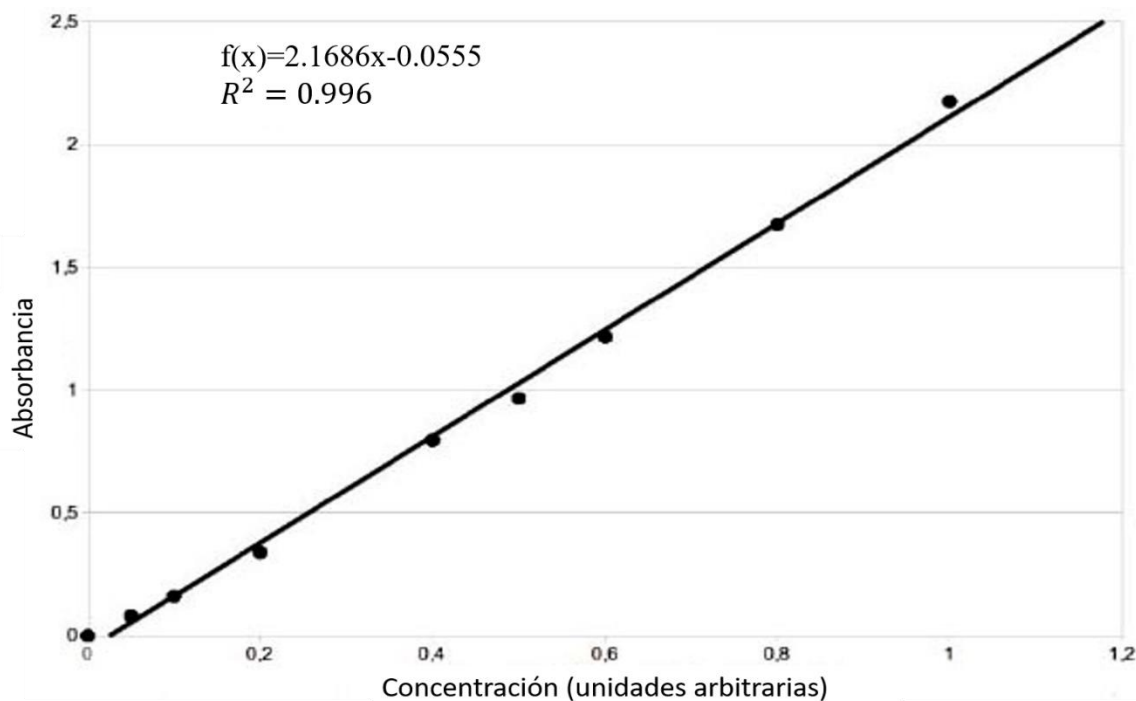


Figura 1.2. Curva de absorción vs concentración para soluciones de KMnO_4 [12].

Se puede encontrar una relación entre la intensidad de emisión de la fluorescencia con la intensidad del haz incidente. La intensidad de emisión de fluorescencia (I_F) es proporcional a la intensidad de la radiación del haz absorbido por el sistema [2] (ver Figura 1.3):

$$I_F = K'(I_0 - I) \quad (1)$$

Siendo I_0 la intensidad de radiación del haz que incide sobre la disolución, I la intensidad después de transmitirse en una distancia l del medio, I_F la intensidad de fluorescencia y K' una constante que depende de la eficacia cuántica del proceso de fluorescencia [2].

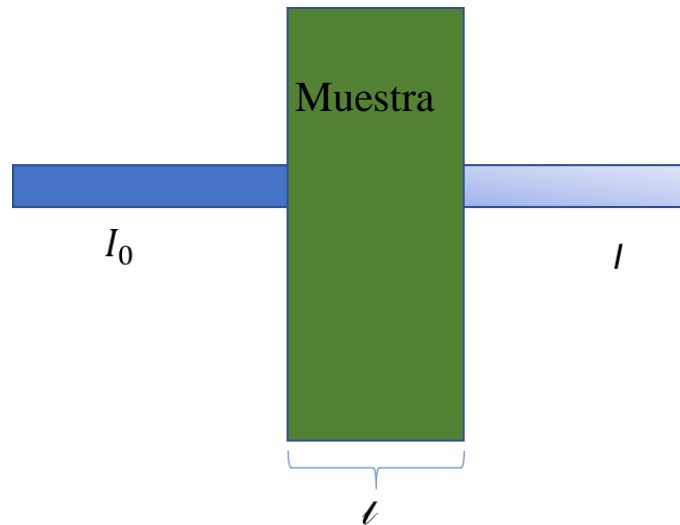


Figura 1.3. Ley de Beer-Lambert

Todos los métodos espectrofotométricos se basan en dos leyes que combinadas se conocen como la ley de Beer-Lambert. La ley de Beer-Lambert establece que *la fracción de luz absorbida por un medio transparente es independiente de la intensidad de luz incidente, y cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual de la luz pasando a través de él.* Lo cual puede ser expresado como [1]:

$$\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = kl \quad (2)$$

donde, I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, l es la longitud del medio por donde pasará la luz y k es la constante del medio. La ley de Beer dice, *la cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas del cromóforo a través del cual pasa la luz,* es decir [1]:

$$k = \epsilon c \quad (3)$$

donde c es la concentración y ϵ es el coeficiente molar de absorción, una característica propia del cromóforo. Sustituyendo la ecuación 3 en la ecuación 2 [1]:

$$\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon c l \quad (4)$$

El término $\log \left(\frac{I_0}{I} \right)$ es conocido como absorbancia y la transmitancia se define como $T = \frac{I}{I_0}$, sustituyendo en 4:

$$A = \log \left(\frac{1}{T} \right) = \epsilon c l \quad (5)$$

De acuerdo con la ley de Beer-Lambert, la absorbancia debe de ser linealmente proporcional a la concentración del cromóforo. La absorbancia de un soluto depende linealmente de su concentración [1].

Con el objeto de relacionar I_F con la concentración c de la especie fluorescente se considera la ley de Beer, de la ecuación 4:

$$\frac{I_0}{I} = 10^{\epsilon c l} \rightarrow I = I_0 10^{-\epsilon c l} \quad (6)$$

Sustituyendo la ecuación 6 en la ecuación 1:

$$I_F = K' I_0 (1 - 10^{-\epsilon c l}) \approx K' I_0 (1 - (1 - \epsilon c l)) = K' I_0 \epsilon c l \quad (7)$$

Por lo que la intensidad de la fluorescencia tiene una dependencia lineal con la intensidad incidente a bajas concentraciones.

1.3. La fluorescencia y sus aplicaciones

La fluorescencia se encuentra en diferentes materiales de la vida cotidiana, como los detergentes utilizados para lavado de ropa, iluminación fluorescente, fibras sintéticas utilizadas en la fabricación de ciertas prendas, tarjetas de crédito, tarjetas de identidad, billetes de banco, boletos para el teatro y el cine, ciertas bebidas como los tónicos o el fluoruro en la pasta de dientes [5].

La última década ha sido testigo de un avance significativo en la creación de imágenes de sistemas vivos con marcadores fluorescentes. Este progreso se ha asociado principalmente con el descubrimiento de diferentes variantes espectrales de proteínas fluorescentes. Sin embargo, la tecnología de proteínas fluorescentes tiene sus propias limitaciones y, en algunos casos, es preferible el uso de fluoróforos de bajo peso molecular [7].

Los marcadores moleculares basados en la fluorescencia han servido durante mucho tiempo como una herramienta para la obtención de imágenes *in vitro* de biomoléculas. El marcaje fluorescente con un fluoróforo sintético se informó por primera vez en 1942, cuando se obtuvieron anticuerpos antineumocócicos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) [7].

Otra ventaja de la fluorescencia es su especificidad, que permite identificar moléculas específicas en matrices complejas. Como desventaja se puede distinguir que tiene menos aplicaciones que la espectroscopía de absorción, ya que es relativamente limitada la cantidad de sistemas químicos que exhiben fluorescencia. Sin embargo, aún cuando el compuesto no exhiba fluorescencia natural, se pueden usar sondas fluorescentes que se unen a grupos funcionales específicos en la molécula en estudio [10].

Algunas de las aplicaciones de la fluorescencia son [3]:

- Visualizar partes de la célula: membrana plasmática, núcleo, vacuolas, retículo endoplásmico, etc.
- Estudiar la interacción entre moléculas *in vivo*
- Localizar moléculas específicas: proteínas, lípidos, etc

Este experimento está diseñado para la detección de la emisión de fluorescencia de fluoróforos. A continuación se muestran conceptos generales de estas muestras.

1.4. Fluoróforos.

Los fluoróforos son moléculas fluorescentes que tienen un espectro de absorción y emisión bien definidos. Cuando el fotón emitido tiene menos energía que el fotón absorbido, esta diferencia de energía se llama Stokes Shift [1, 10]. La intensidad de su fluorescencia emitida varía con la longitud de excitación, pero no varía la distribución de su espectro. En la Figura 1.4 se muestran ejemplos de los espectros de emisión y excitación de algunos fluoróforos. Entre los más utilizados se pueden encontrar moléculas orgánicas simples y proteínas fluorescentes [1].

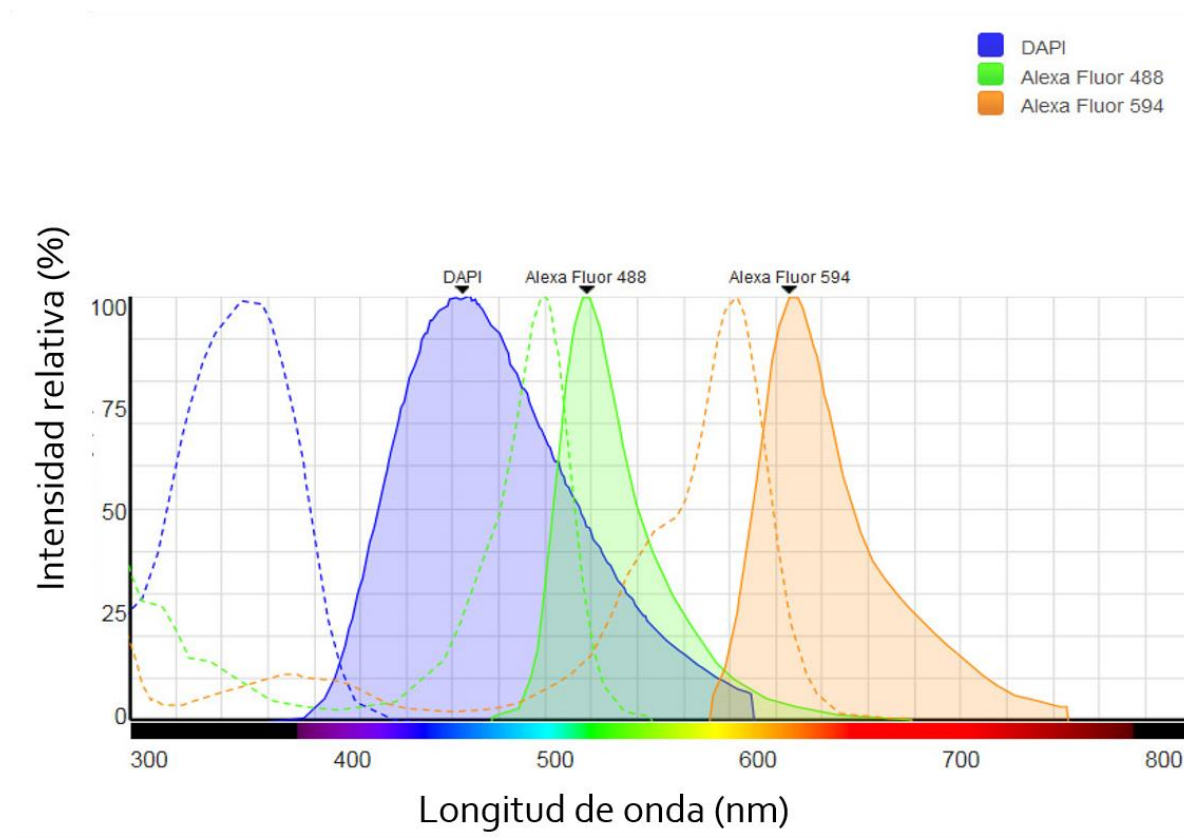


Figura 1.4. Espectros de emisión (línea continua) y excitación (línea punteada) de algunos fluoróforos [8].

La posibilidad de utilizar un determinado fluoróforo depende de su química (reactividad, solubilidad, propiedades lipofílicas, pK_a y estabilidad) y propiedades foto-físicas (excitación máxima (λ_{ex}), emisión máxima (λ_{em}), coeficiente de extinción (ϵ), rendimiento cuántico (Φ), vida útil del estado excitado y foto estabilidad). El coeficiente de extinción multiplicado por el rendimiento cuántico ($\epsilon \times \Phi$) es el parámetro universal utilizado para

determinar la sensibilidad de este método para diferentes fluoróforos. Este valor es directamente proporcional al brillo y tiene en cuenta la cantidad de luz absorbida y el rendimiento de emisión de fluoróforo [7].

Los fluoróforos se pueden dividir en dos clases generales: extrínsecos e intrínsecos. Se denomina fluoróforo intrínseco a aquel que por sí mismo presenta fluorescencia. El fluoróforo extrínseco es aquel que se agrega a una muestra que no presenta fluorescencia para transmitirle propiedades específicas [10,11].

1.4.1. ¿Como se caracterizan los fluoróforos?

- Coeficiente de extinción(ϵ) es la absorbancia de un fluoróforo en su pico de excitación
- Eficiencia cuántica (ϕ) es la probabilidad de emitir un fotón para cada fotón absorbido, es decir, es la razón entre el número de fotones emitidos por el número de fotones absorbidos [9,11].
- Vida media de la fluorescencia. Tiempo promedio que un fluoróforo permanece en estado excitado después de haber sido excitado [9, 11], es:
 - Independiente de la concentración de fluoróforo, y fenómenos como fotoblanqueo.
 - Sensible a interacciones en el entorno molecular del fluoróforo solventación, oxígeno, pH, proximidad a otros fluoróforos, etc.
 - Medir la vida media convierte algunos fluoróforos en sensores moleculares de temperatura, pH, iones, oxígeno, etc.
- “*Quenching*” o atenuación de fluorescencia puede ser definido como cualquier proceso que disminuye la intensidad de fluorescencia de un determinado fluoróforo sin cambiar el espectro de emisión, es decir, es la disminución en la emisión fluorescente por la actividad de mecanismos de regreso al estado energético basal no radiativos.[9,10].

- El fotoblanqueo es la destrucción permanente del fluoróforo por modificación covalente de su estructura [9].

Algunas propiedades idóneas de los fluoróforos son:

- Buen coeficiente de absorción y de eficiencia cuántica.
- Resistencia a fotoblanqueo y resistencia a entrar el estado triplete.
- Secundarias: Solubilidad, baja toxicidad (sistemas biológicas), un Stokes shift grande, estable, barato, espectros compatibles con líneas laser comunes, entre otras [9].

1.5. Técnicas de medición

La espectroscopía de fluorescencia es un método muy utilizado en mediciones analíticas y en la investigación científica, especialmente en bioquímica y biomedicina. Dos razones principales por las que se extendió el uso de la espectroscopía de fluorescencia son: 1) su gran sensibilidad y 2) el alto nivel de evolución alcanzado tanto por los instrumentos requeridos, como por los fluoróforos diseñados para aplicaciones específicas. Aún, cuando una de las aplicaciones más utilizadas de la fluorescencia es el marcaje de macromoléculas (como una alternativa al marcaje con isótopos radiactivos). Puede ser usada por ejemplo para realizar estudios de dinámica molecular, análisis estructural de proteínas, cuantificación de iones en compartimentos celulares, microscopía, análisis de potencial de membrana, interacciones entre macromoléculas, etc. Comparada con los métodos de absorción, la sensibilidad de los métodos basados en fluorescencia es 10 a 10.000 veces mayor, esto significa que se pueden analizar nanogramos a picogramos de diversos compuestos con buenos resultados [10].

En espectroscopia de fluorescencia se registran espectros de excitación y de emisión. El espectro de excitación se corresponde con el espectro de absorbancia. Ambos espectros son una representación de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias en función de la longitud de onda en nm. Para registrar el espectro de emisión se fija una longitud de onda de

excitación y para el de excitación se fija una longitud de onda de emisión. Alteraciones de esta regla se pueden deber a impurezas fluorescentes de la muestra o, en muestras muy diluidas [10].

Los elementos esenciales en los sistemas de detección de fluorescencia son cuatro:

- 1) Una fuente de excitación,
- 2) Un lugar apropiado para colocar la muestra,
- 3) Monocromadores o filtros para discriminar entre los fotones de emisión de los fotones de excitación y,
- 4) Un detector para registrar la emisión de los fotones, el cual produce una señal generalmente eléctrica.

Para mejorar la visualización de los resultados generalmente el equipo está acoplado a un amplificador de la señal [10].

Existen diferentes equipos que utilizan los aspectos básicos de la fluorescencia [10].

A continuación, se muestran algunos de ellos.

Espectrofluorómetro mide el promedio de la fluorescencia de la muestra (el volumen de muestra que mide ronda entre los RL a mL). En la Figura 1.5 se muestra un esquema de un espectrofluorómetro. Consta de una lámpara de arco de Xenón la cual emite luz blanca en un amplio rango de longitudes de onda que abarcan desde el UV (~ 240 nm), hasta el infrarrojo, (~ 750 nm). Este rayo de luz es colectado por el monocromador primario o de excitación (M1) el cual selecciona la longitud de onda (λ_{ex}) que va a incidir sobre la muestra y es determinada por el espectro de absorción de cada fluoróforo. El rayo de luz con la longitud de onda λ_{ex} incide sobre la cubeta que contiene a la muestra, la cual puede estar termostatzada. Las cubetas pueden ser de diferentes tipos (cuarzo, vidrio, etc.) dependiendo de la longitud de onda que incida. La emisión de fluorescencia generalmente es detectada a 90° del rayo de luz de excitación. Es colectada por un sistema de lentes y pasa a través de un monocromador secundario o de emisión (M2), el cual separa la fluorescencia emitida por la

muestra de la luz de excitación, con una longitud de onda determinada (λ_{em}). La luz incide en un fotodetector que convierte los fotones de fluorescencia en una señal eléctrica [10].

Otro componente muy importante es el canal de referencia que es un sistema que crea una señal electrónica proporcional a la intensidad de luz incidente en la muestra. En el espectrofluorómetro se pueden colocar filtros en los trayectos ópticos que impiden el paso de la luz de ciertas longitudes onda que interfieran con la medición [10].

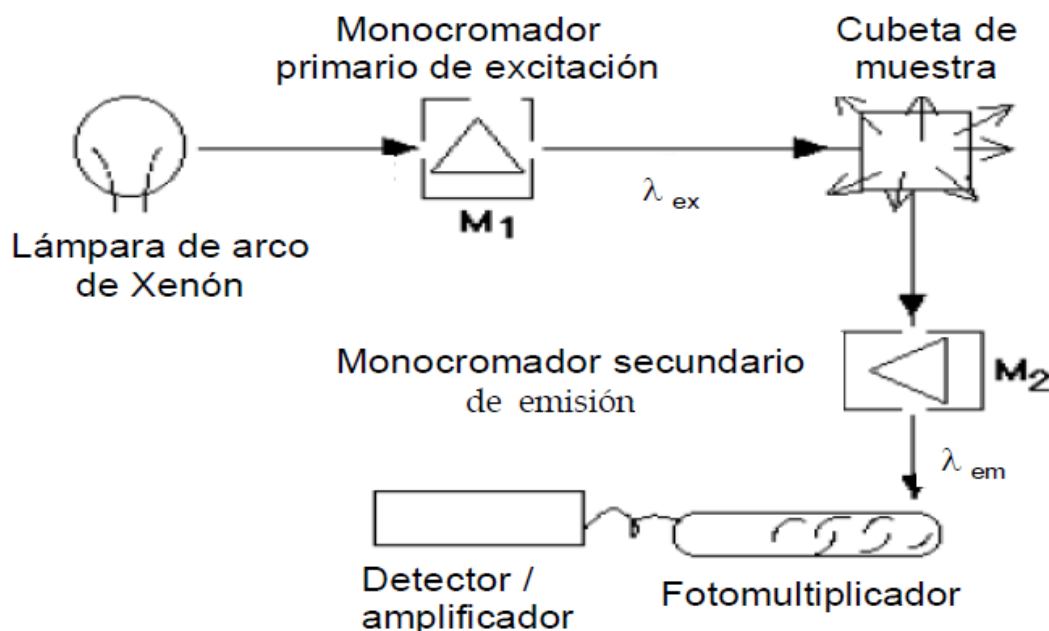


Figura 1.5. Representación esquemática de un espectrofluorómetro.

Microscopio de Fluorescencia: determina la fluorescencia como una función de las coordenadas espaciales en dos o tres dimensiones para objetos microscópicos (por debajo de $\sim 0,1$ mm de diámetro) [10].

Scanner de Fluorescencia: determina la fluorescencia en función de coordenadas en dos dimensiones de objetos macroscópicos pueden ser geles de electroforesis y cromatografías [10].

Citometría de Flujo: incorpora un detector de fluorescencia para determinar la fluorescencia de células, en un flujo a través de un capilar. Permite identificar y cuantificar subpoblaciones de células en una muestra compleja [10].

Otros tipos de instrumentos que usan la detección por fluorescencia son los sistemas de electroforesis capilar, de HPLC y los equipos de secuenciación de DNA [10].

CAPÍTULO 2. TÉCNICAS DE MEDICIÓN

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, la intensidad de la luz emitida por los fluoróforos es baja y no cualquier técnica de medición es lo suficientemente sensible y eficiente.

Recordando que, una característica principal de los fluoróforos es que tienen un tiempo de vida útil definido (en la mayoría de los casos es de nanosegundos)¹, para la calibración del detector se fabricó una “muestra de prueba” (MP), a base de pintura acrílica y acetona. Ésta tiene dos características similares con respecto de la muestra de fluoróforo FAM² y son: longitud de onda de excitación y de emisión.

En este capítulo se muestran las diferentes técnicas de medición realizadas y los resultados obtenidos en cada caso.

A continuación, se muestra con mayor detalle el proceso de realización de la MP.

¹Fluoróforos y sus aplicaciones. Consultado el 5 de noviembre del 2018 en: https://www.cio.mx/talleres/tmcmf/archivos/CW_Fluoróforos.pdf

² PCR en tiempo real. Consultado el 06 de mayo del 2018 en <https://www.tib-molbiol.de/es/lightcycler/principle/realtime.html>

2.1. Preparación de las muestras

La muestra fabricada fue a base de pintura acrílica verde fluorescente, cuyas características se muestran posteriormente. Sin embargo, la MP resultó ser más saturada que los fluoróforos que se utilizaron, por lo que fue necesario diluir con un solvente, en este caso se utilizó acetona.

En la Tabla 2.1 se muestran las diferentes concentraciones que se emplearon para poder probar la sensibilidad del detector, además también se incluye el error asociado a cada muestra.

Número de muestra	Concentración de la muestra [%]
1	2.00 ± 0.0500
2	1.00 ± 0.0250
3	0.80 ± 0.0200
4	0.60 ± 0.0301
5	0.40 ± 0.0200
6	0.20 ± 0.0050
7	0.10 ± 0.0025
8	0.09 ± 0.0022
9	0.08 ± 0.0020
10	0.07 ± 0.0017
11	0.06 ± 0.0015
12	0.05 ± 0.0004
13	0.04 ± 0.0003

Tabla 2.1. Numero de muestra con su respectivo porcentaje de pintura y error asociado.

El porcentaje asociado fue calculado siguiendo la ecuación (2.1):

$$\% \text{ de concentración} = \frac{\text{unidades de cantidad de muestra}}{\text{unidades de cantidad de acetona}} \times 100 \quad (2.1)$$

Para poder obtener el error asociado a cada muestra se modificó la ecuación 2.1 a hacer el cociente de la mínima escala a la mitad entre las unidades de acetona:

$$\% \text{ de concentración} = \frac{\text{mitad de la mínima escala en unidades}}{\text{unidades de cantidad de acetona}} \times 100 \quad (2.2)$$

En la ecuación 2.1 las cantidades de pintura y acetona se midieron por medio de jeringas de insulina. La capacidad de las jeringas es de hasta 0.3 ml con resolución de medida de 0.025ml (ver Figura 2.1).



Figura 2.1. Materiales usados para las muestras de la Tabla 1.

Para todas las técnicas realizadas, se diseñó y construyó una montura porta muestras para garantizar que las muestras quedaran ubicadas en la misma posición. Las monturas fueron diseñadas en Inventor que, posteriormente fueron impresas en una impresora 3D modelo Da Vinci. Se diseñaron dos tipos de monturas, dado que se contaba con dos modelos diferentes de viales (ver Figura 2.2).

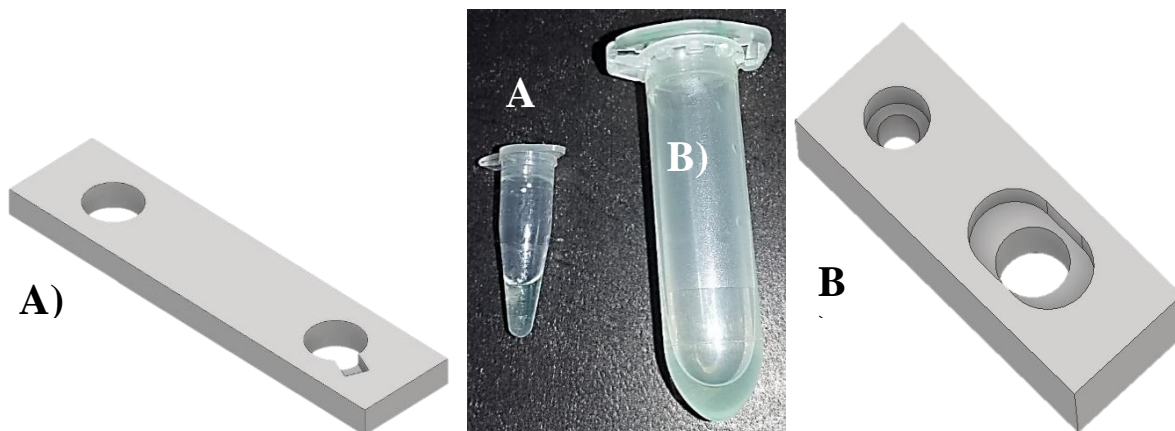


Figura 2.2. A) Montura para viales tipo A. B) Montura para viales tipo B.

A continuación, se muestran las diferentes técnicas de medición que fueron usadas para medir la intensidad de cada muestra.

2.2. Caracterización con Espectrómetro

2.2.1 Método experimental

En la Figura 2.3 se muestra el esquema del primer sistema de detección construido. El sistema consta de un LED (tipo ultrabrillante azul con $\lambda = 470 \text{ nm}$)³, la luz es enfocada en la muestra por una lente plana-convexa ($f = 2.5 \text{ cm}$), posteriormente, la fluorescencia emitida por la muestra fue medida por un espectrómetro comercial Edmund modelo BCR112E-USB-UV/VIS a través de una fibra óptica, que finalmente fue procesado en la PC por el software BWSPEC.

³Consultado 18 de febrero del 2018 en: <https://www.steren.com.mx/led-ultrabrillante-de-5-mm-color-azul.html>

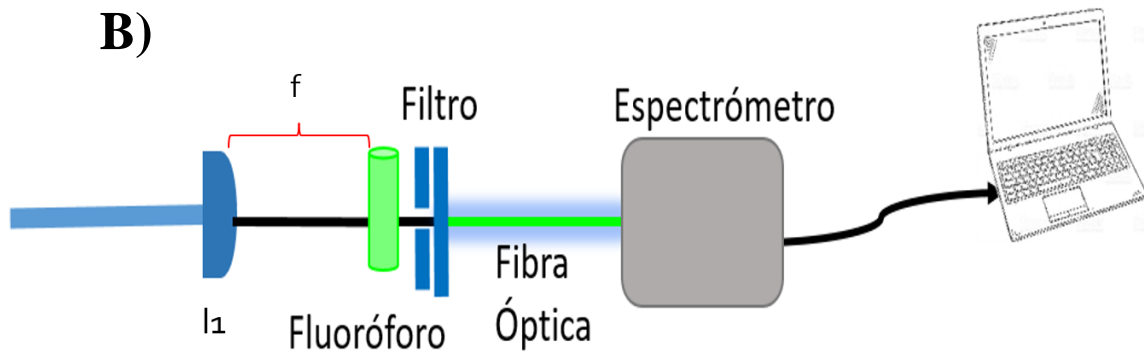
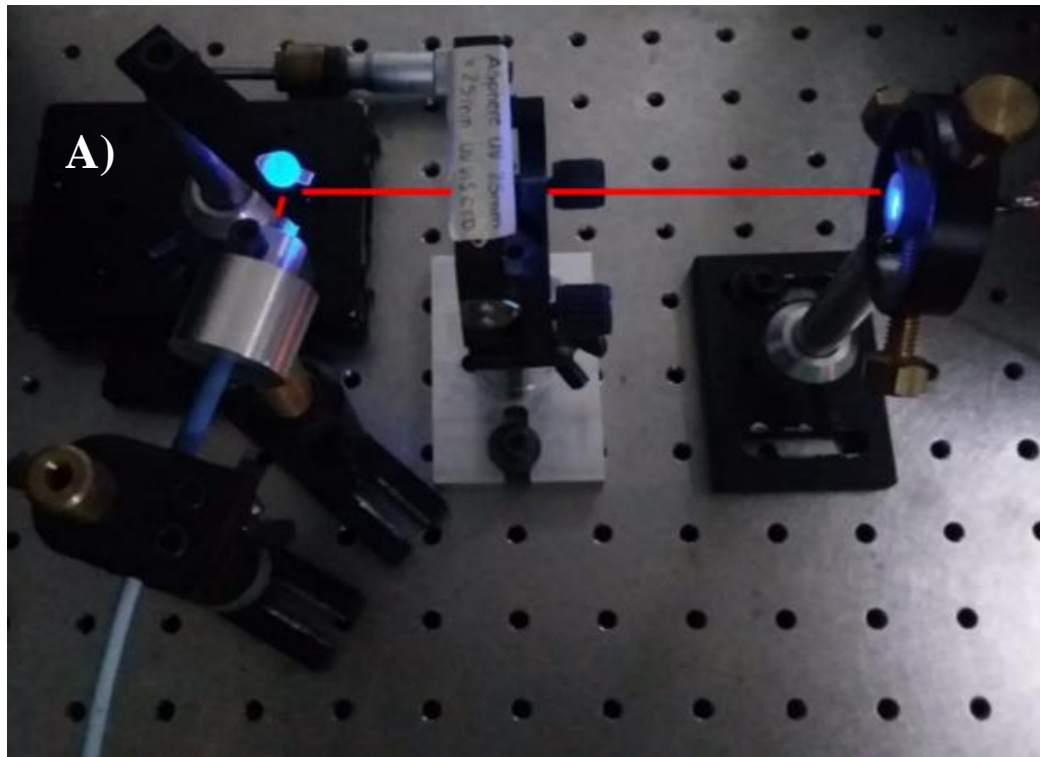


Figura 2.3. A) Montaje experimental usando espectrómetro. B) Diagrama del montaje experimental.

Para solo detectar la intensidad de la señal emitida por el fluoróforo se realizaron dos procesos de filtrados. El primero de ellos fue colocar la fibra óptica en la muestra de forma perpendicular a la dirección del LED y de esa manera sólo medir la señal de la muestra. En la Figura 2.4 se muestra la importancia de colocar el detector perpendicularmente a la muestra, esto para tener la menor contribución del haz de excitación incidente.

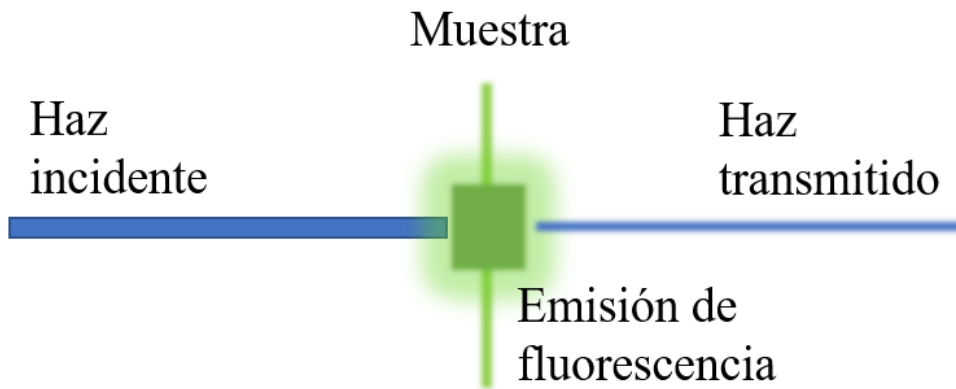


Figura 2.4 Esquema de el haz incidente sobre la muestra.

El segundo fue colocar un filtro genérico de color verde entre la fibra y la muestra, para este caso en particular, el cual fue caracterizado con un foco de luz blanca. Este filtro es pasa bandas, en la Figura 2.5 se muestra una fotografía de este filtro y el espectro de absorción del filtro.

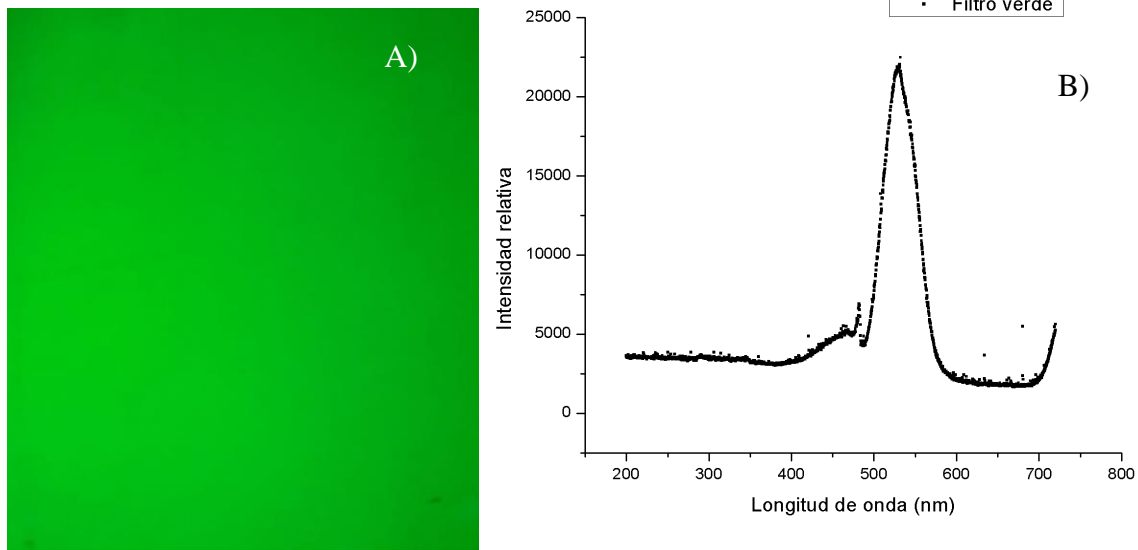


Figura 2.5. A) Fotografía de transmisión del filtro. B) Espectro de emisión de luz generada por un foco incandescente transmitida a través de un filtro de color verde.

Como se observa en la Figura 2.5, el tipo de filtrado que predomina es pasa bandas, donde el ancho de banda (FMHW) se encuentra entre 507.11 – 556 nm, por lo cual, éste es útil para

filtrar la fuente de excitación (Azul). También se puede observar que en la Figura 3.5 que de 200-400 nm, la intensidad es mayor comparada con 600-700 nm (aproximadamente cero) y, posteriormente comienza a aumentar. Esto se debe a que el filtro es genérico y de baja calidad, lo cual genera una banda lateral de 400 – 500 nm que a su vez introduce ruido en la región de excitación de la muestra. Sin embargo, para los fines de este proyecto el filtro es útil, debido a que no es significativo en el intervalo de interés a filtrar es para longitudes de onda menores a 500 nm, debido a que la fuente de iluminación tiene un ancho de banda entre (450-500) nm.

2.2.2. Resultados experimentales. Espectrómetro

En la Figura 2.6 se muestra la comparación del espectro de emisión del fluoróforo tipo FAM vs la muestra prueba (pintura fluorescente), usando como detector el espectrómetro comercial descrito anteriormente.

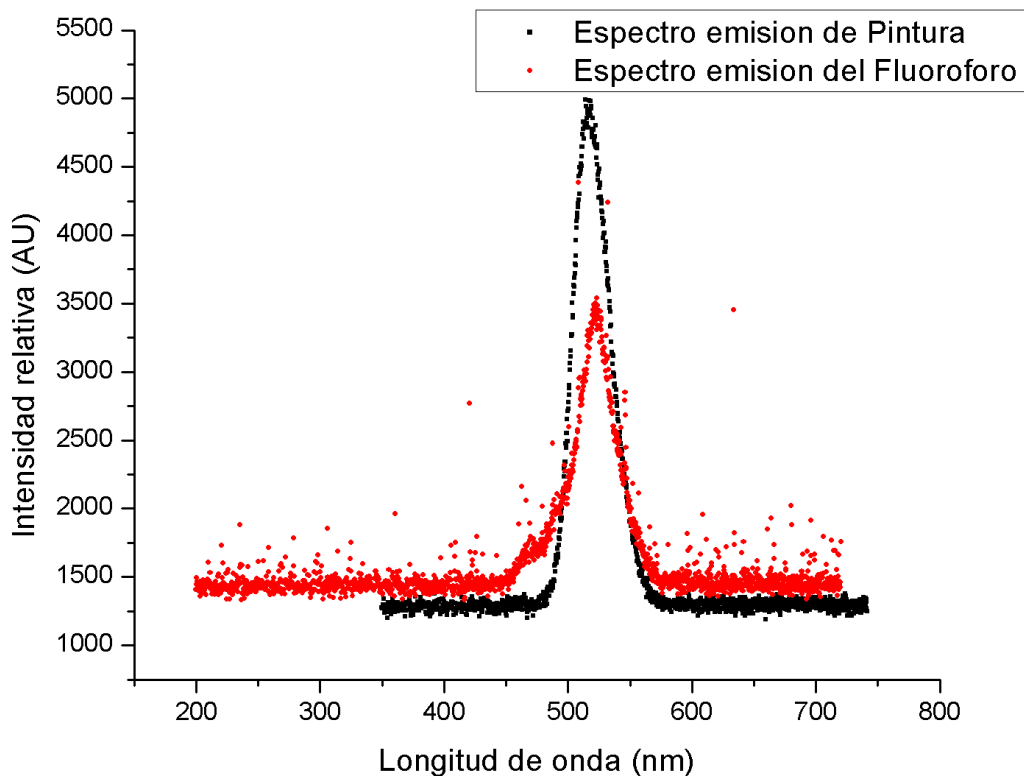


Figura 2.6. Comparación del espectro de emisión de la muestra del fluoróforo vs la muestra prueba (pintura fluorescente).

Se observa en la Figura 2.6 que ambos espectros de emisión son similares, dado que el máximo de intensidad en ambos se encuentra en longitudes de onda similares (520 nm). Esta fue la primera técnica que corrobora que la muestra prueba es adecuada para calibrar el detector. También se observa que el filtrado es mejor para la muestra prueba, ya que contaba con dos filtros, dejando pasar longitudes de onda superiores a 500 nm e inferiores a 580 nm (ver Figura 2.5).

Se aplicó una segunda técnica, a partir de un sistema comercial, para estudiar el comportamiento de la muestra prueba. En esta se mezclaron las concentraciones 12 (0.05%) y 13 (0.04%) (ver Tabla 2.1), pues se necesitaban al menos 2 ml de muestra para esta técnica. El sistema empleado consistió en el modelo Duetta Spectrofluorometer de la marca Horiba,

el cual es capaz de medir el espectro de absorción, emisión y excitación de la muestra de manera simultánea. Los resultados se muestran en la Figura 2.7 y Figura 2.8.

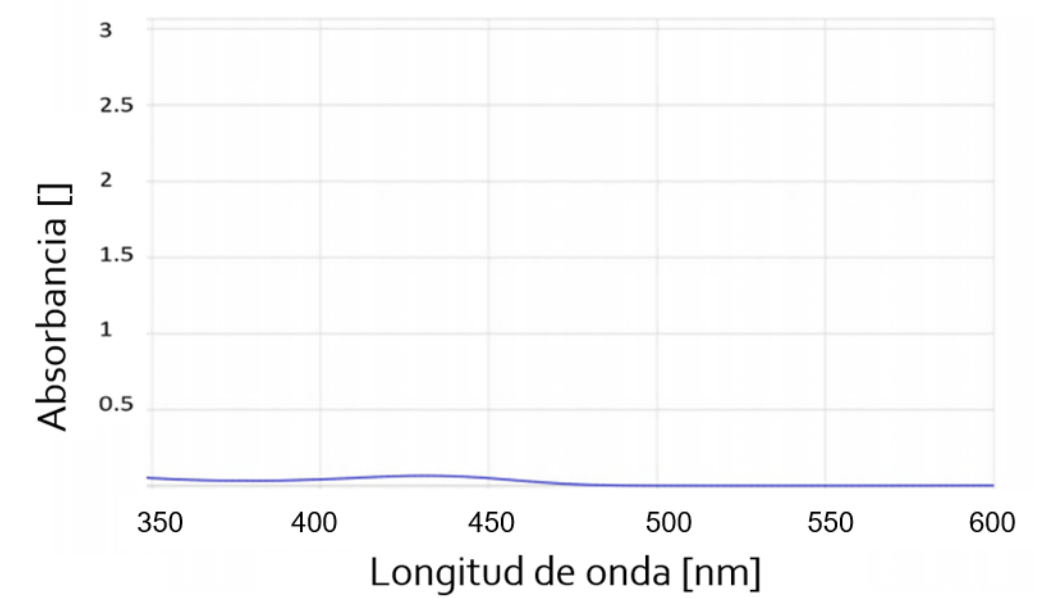


Figura 2.7. Espectro de absorción de la muestra.⁴

En la Figura 2.7 se observa que el espectro de absorción de la muestra se encuentra entre 400-450 nm. Lo cual asegura que la detección de la muestra con las diferentes técnicas es solo excitación de la muestra y no de absorción, es decir, el corrimiento Stokes (Stokes Shift) es lo suficientemente grande para diferenciar el espectro de emisión del de excitación.

En la Figura 2.8. se observa el espectro de emisión con respecto al de excitación de la muestra obtenida con el mismo sistema comercial Horiba. En los resultados se observa un máximo de intensidad en el espectro de emisión en un intervalo entre 480-520 nm; sin embargo, en la Figura 2.6 se observa un máximo alrededor de 525, esto es debido a que las muestras presentadas en la Figura 2.5. están saturadas, por lo que el ancho del espectro emisión es más

⁴ Proporcionado por: Intercovamex, Nueva China No. 400 Colonia Rincón del Valle, C.P. 62240, Cuernavaca, Morelos. MÉXICO.

El equipo con el que se contó fue: Duetta Spectrofluorimeter Horiba Scientific, 3880 Park Avenue Edison, NJ 08820, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

grande que para una muestra diluida. Por otro lado, hay un máximo de excitación en la región de (410-460) nm, corroborando que la fuente de excitación (LED azul) y el filtro son los correctos para la muestra diluida, como se mencionó en el capítulo anterior, el ancho de banda de la fuente de excitación está en la región de 450-500 nm, por lo que también es posible excitar la muestra diluida con esta fuente de excitación.

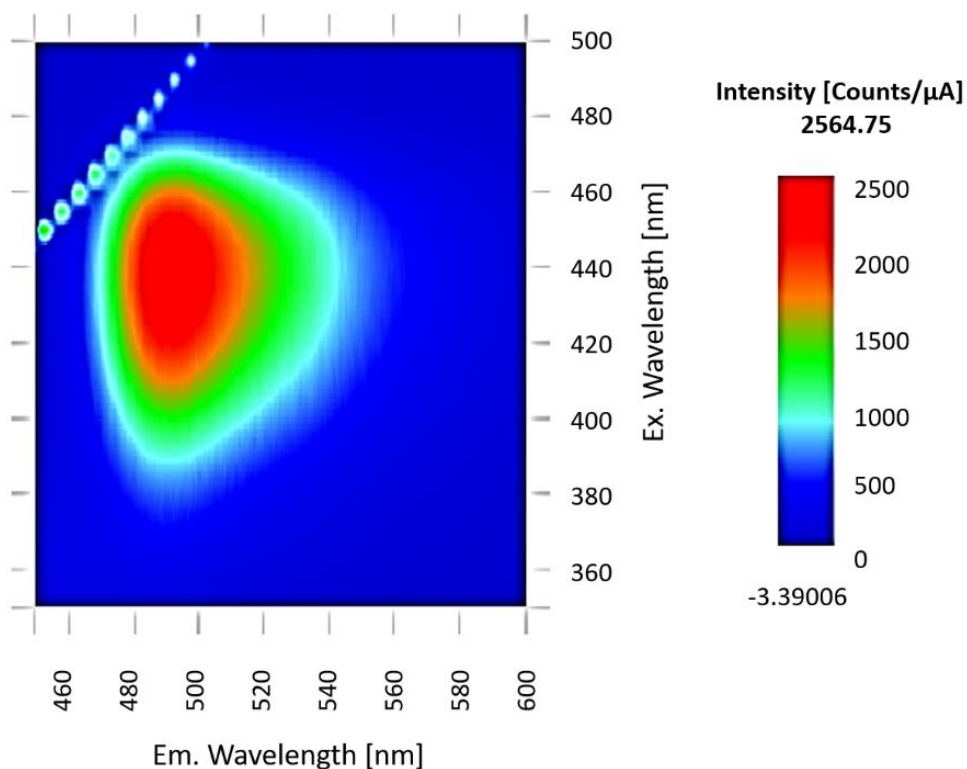


Figura 2.8. Espectro de emisión y excitación de la muestra prueba.¹

Se observa en la Figura 2.6 que la muestra prueba está más saturada que la muestra del fluoróforo, lo que provoca que a concentraciones más pequeñas (ver Tabla 2.1), el espectrómetro solo mida ruido (ver Figura 2.13). Para corregir este problema se cambió el detector, es decir, se reemplazó el espectrómetro por un PMT para medir concentraciones menores, aprovechando su alta sensibilidad para detectar en el rango visible. Los resultados obtenidos se presentan en a la siguiente sección.

2.3. Tubo fotomultiplicador.

2.3.1 Método experimental

En este caso el sistema constó de una fuente de iluminación (LED de 1W de potencia, azul $\lambda=450-500$ nm)⁵, donde el haz es enfocado a través de una lente planoconvexa ($f = 2.5$ cm), sobre la muestra, para después ser colimada con una lente biconvexa ($f = 2.5$ cm). Posteriormente con un arreglo espectro-métrico del tipo 2F (Fourier) (Figura 2.10), la luz es dispersada con un prisma, ubicado a la distancia focal de otra lente biconvexa ($f = 9.6$ cm), y dirigida al tubo fotomultiplicador (PMT Hamamatsu: modelo H10721) ubicado a la distancia focal de la lente (plano de Fourier), el cual tiene montado una rendija de ancho variable (R). La señal del PTM fue medida con LabView en una PC a través de una tarjeta de adquisición NI USB 6009 de National Instruments. Adicionalmente, el sistema cuenta con un filtro de color, igual al del caso del espectrómetro, para poder filtrar la señal de excitación. Se diseñó también una montura para el PMT (ver Figura 2.9), la cual incluye una ranura para montar y desmontar con facilidad los filtros colocados. Se determinó que la apertura óptima de la rendija es de 0.24 mm, para poder filtrar de manera eficiente la luz del LED utilizando el menor voltaje posible del PTM.

⁵ Led de potencia 1W (datasheet). Consultado el 25 de enero del 2018 en: <https://hardtofind.com.mx/pdfs/textos/L/LEDPOT1S.PDF>

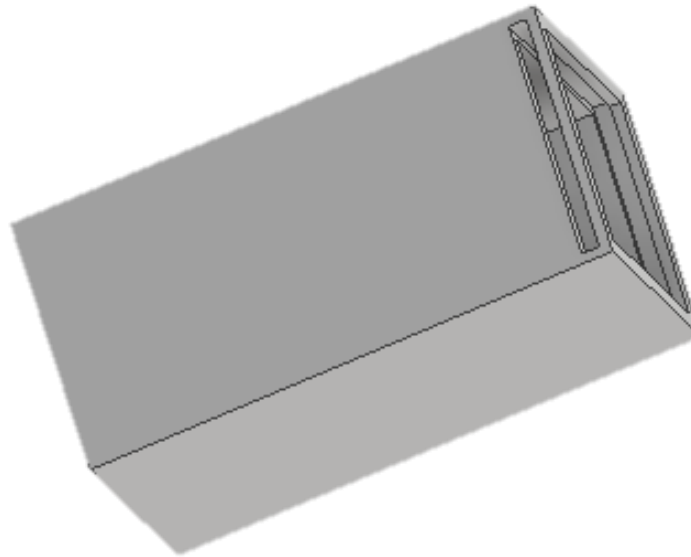


Figura 2.9. Montura diseñada para la colocación de filtros del PMT

En la Figura 2.10 se muestra el diagrama experimental de este montaje.

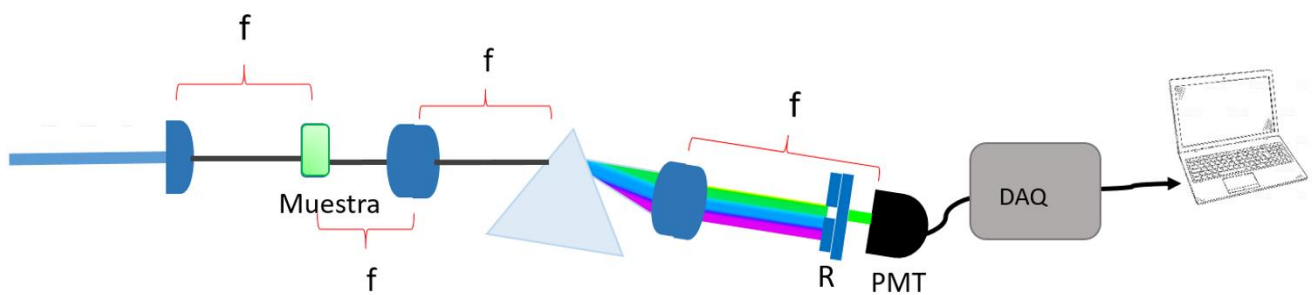


Figura 2.10. Diagrama del montaje experimental para el detector usando un PMT.

En la Figura 2.11 se muestra el diagrama de bloques y diagrama de flujo del programa en LabView para detectar la señal medida por el PMT.

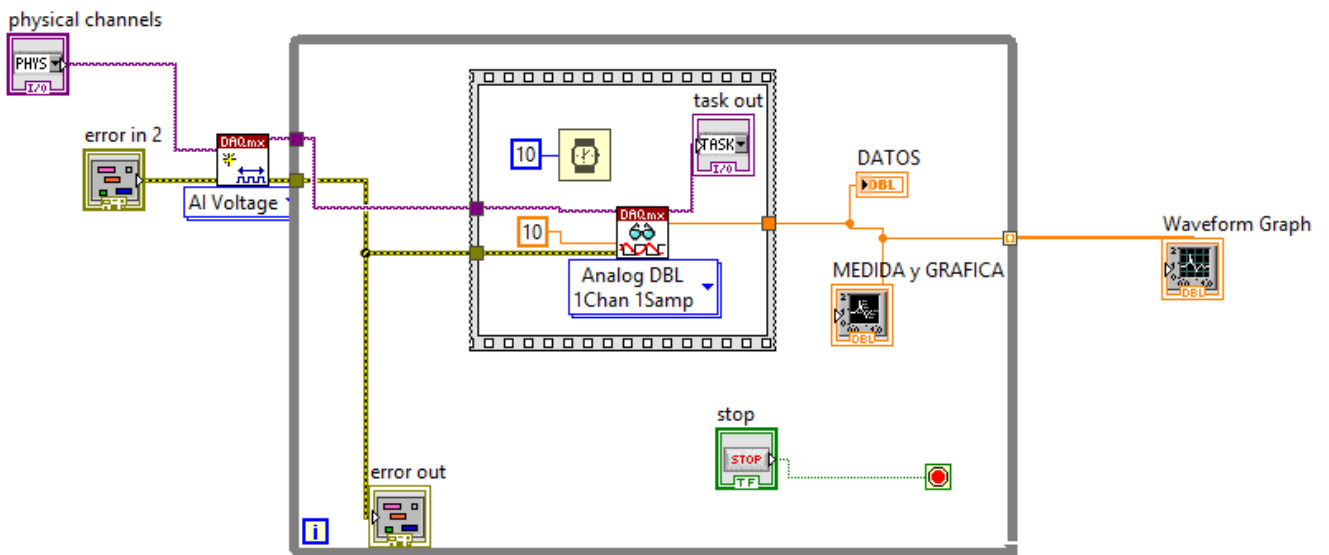
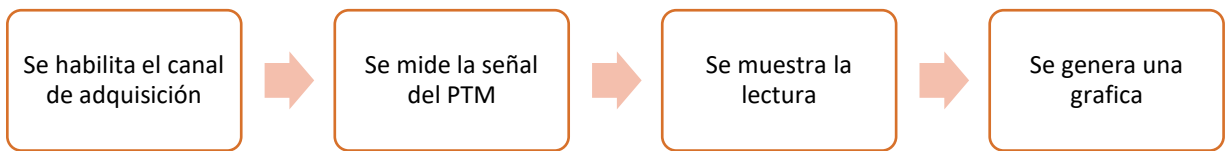


Figura 2.11. Diagrama de flujo y programa de adquisición en LabView.

2.3.2. Resultados experimentales. PMT

Para esta técnica, primero se varió la abertura de la rendija con el objetivo de lograr el menor voltaje de operación del PTM. En particular para esta rendija, una vuelta corresponde a 0.12 mm de apertura, por lo que media vuelta corresponde a 0.06 mm. En la Figura 2.12 se muestran las marcas que indican media y una vuelta completa.

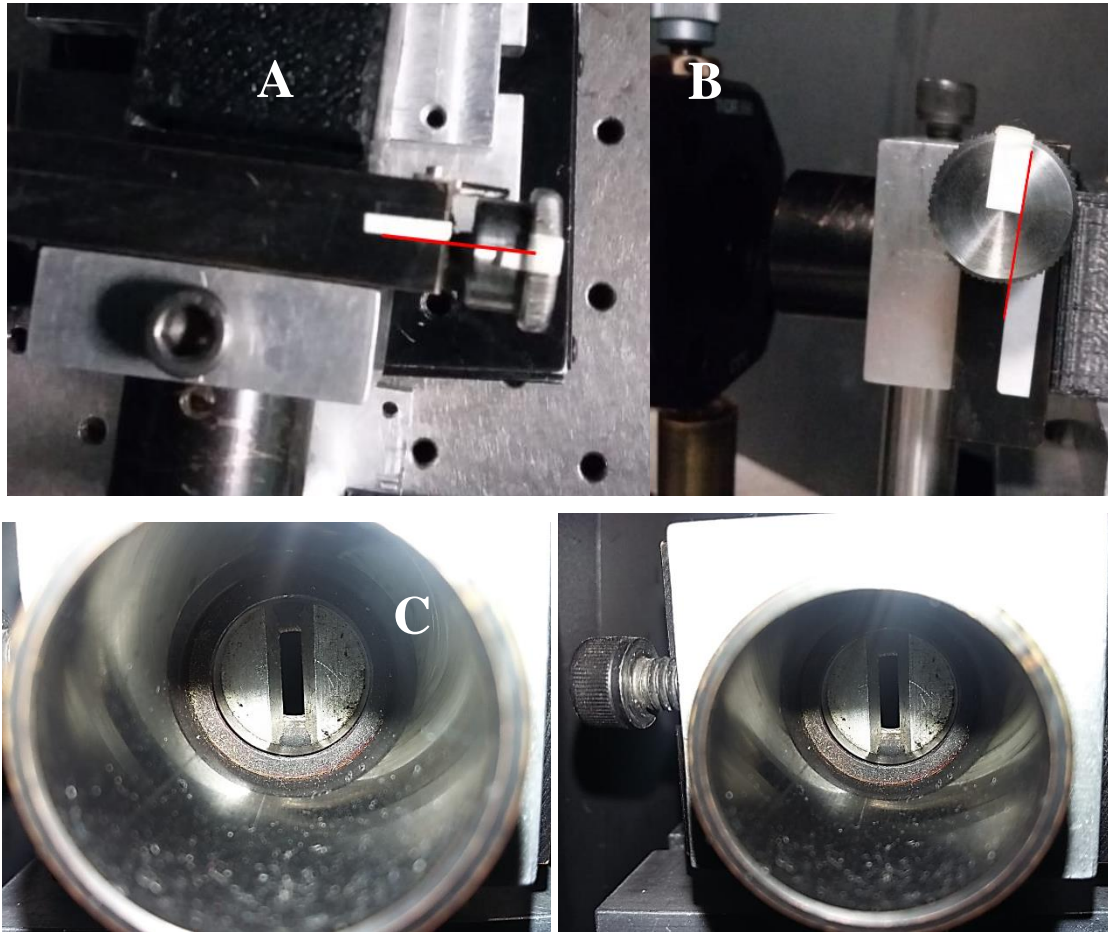


Figura 2.12. Marcas en la rendija para caracterizarla; A) Vista por arriba: cero de la medición, B) Vista lateral: marca inferior, media vuelta. C) Rendija vista de frente (apertura 0.24mm)

En la Tabla 2.2. se muestra la relación de la abertura de la rendija con la intensidad detectada en el PMT. Dejando pasar por la rendija el espectro de fluorescencia de la muestra, ver Figura 2.13

Apertura [mm]	Máximo de intensidad [AU]	Voltaje [mV]
0.06	0.03	400
0.12	0.05	370
0.18	0.05	340
0.24	0.06	330
0.30	0.06	325

Tabla 2.2. Relación entre la abertura de la rendija, la intensidad máxima detectada y el voltaje usado en el PMT.

Al no tener cambios evidentes en las últimas dos aberturas, 0.24 mm y 0.3 mm, ver Tabla 2.2, se decidió dejar la abertura a 0.24 mm previniendo así el no exceder el máximo voltaje de operación del PMT.

Para asegurar que la señal de detección correspondiera únicamente a la generada por la muestra, se usó el espectrómetro después de la rendija (en lugar del PMT). El espectro se muestra en la Figura 2.13. Además, también se muestra el espectro medido después de pasar por la rendija (al observar con detalle). Como se puede observar en la gráfica, la señal medida es muy baja, por lo cual se concluye que el método del espectrómetro deja de ser eficiente al colocar más elementos para filtrar la señal de excitación de la muestra.

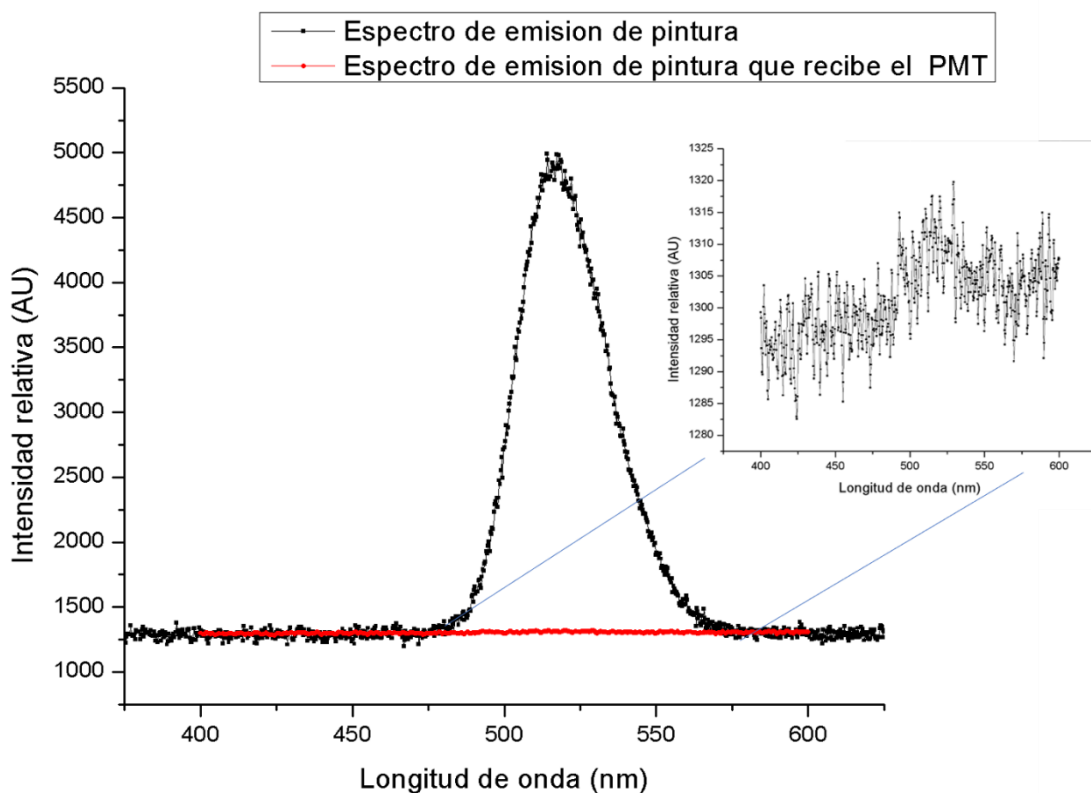


Figura 2.13. Comparación del espectro de emisión de pintura vs el espectro de emisión que detecta el PMT de pintura

Se observa un ligero cambio en longitud de onda cercana a 500 nm en la Figura 2.13. En esta detección no se usó un filtrado adicional que el de la rendija y el prisma.

En la Figura 2.14 se compararán las señales detectadas al usar un filtro antes y después de utilizar el detector. Se observa un ligero cambio a partir de 500 nm en ambas señales con máximo en 520 nm. Sin embargo, al usar un filtro el ruido se minimiza para longitudes menores de 500 nm, aunque la señal de la muestra también lo hace. Con el PMT esto no es un problema dado que es muy sensible a la luz visible.

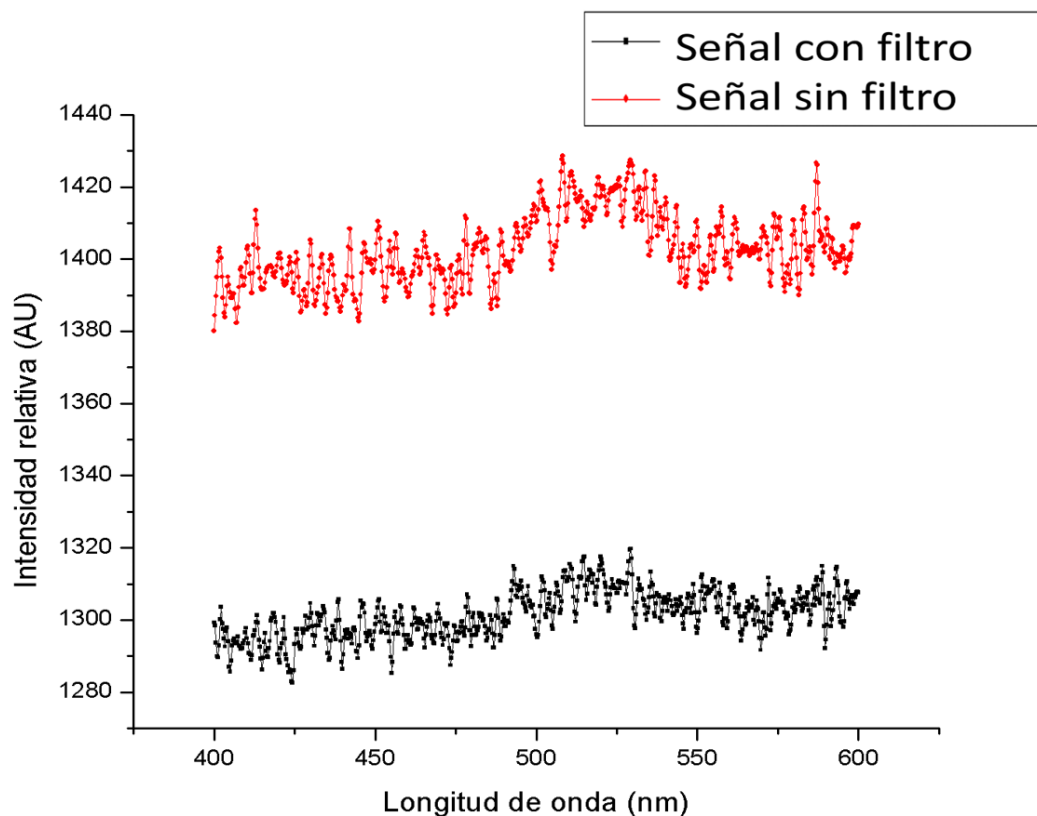


Figura 2.14. Comparación entre el espectro después de la rendija con y sin filtro.

Se optó por usar el filtro durante la obtención de los datos.

En la Figura 2.15 se muestra la relación entre la concentración y la intensidad medida, realizando un zoom para concentraciones bajas.

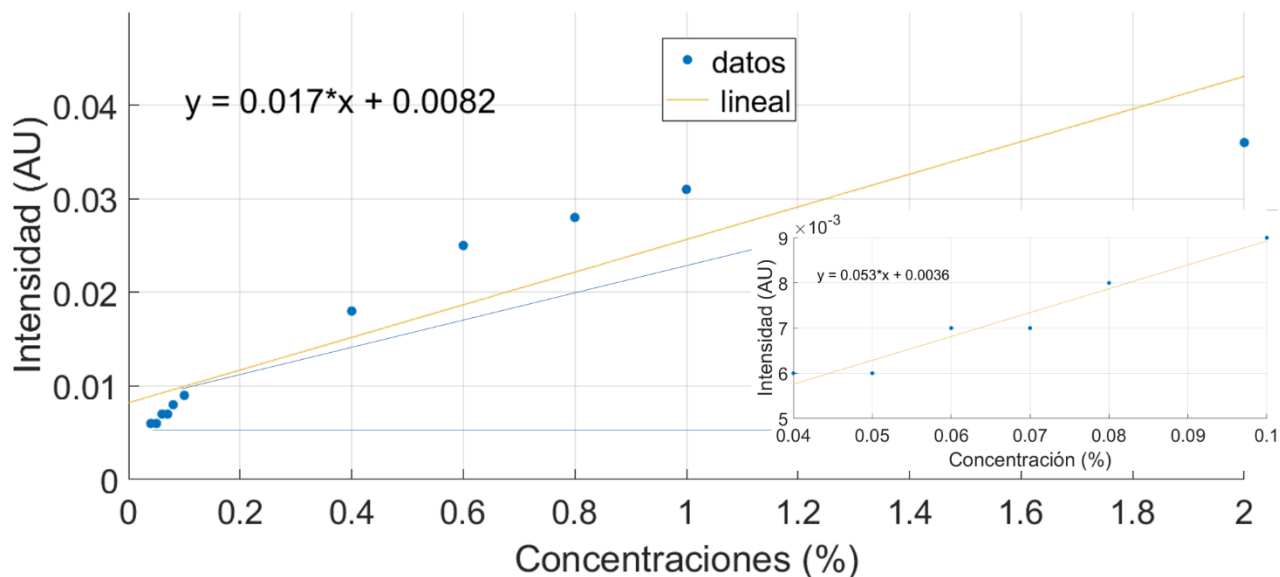


Figura 2.15. Detección de la señal de las muestras usando un PMT

2.4. Tubo fotomultiplicador (PMT) con Lock-in (amplificador de amarre de fase).

2.4.1. Método experimental

Para este caso, el arreglo experimental es similar al del caso anterior. La diferencia radica en la manera que se excita la muestra (en este caso, fue de manera modulada) y, la manera en que se procesaban las lecturas del PMT. La señal modulada se utiliza como referencia para el sistema de amarre de fase digital, y con ello filtrar y amplificar la señal (Lock-in) siguiendo a la frecuencia de modulación. El sistema de Lock-in digital fue diseñado en LabView.

Para controlar el LED de manera modulada, se utilizó un circuito integrado 555 con el cual se fijó una frecuencia de (10.112 ± 0.046) kHz. La medida de frecuencia se obtuvo con un osciloscopio. Debido a que la frecuencia de modulación fluctuaba alrededor de los 10 kHz, se tomó un video cuya duración fue de 3 min para realizar el promedio de las mediciones y tener una frecuencia más precisa (1695 frecuencias diferentes, alrededor de 10kHz). El

análisis se hizo a través de Tracker⁶ para tener mejor precisión al obtener las frecuencias del LED (se tienen 30 cuadros por segundo).

Se trasladó el prototipo realizado en una placa de pruebas (Protoboard) a una placa con los componentes soldados para tener mejor estabilidad y conectividad en la señal enviada al LED. En la Figura 2.16 se muestra el diseño del circuito, el primer prototipo de este y la placa realizada para modular el LED. Los cálculos para los componentes del circuito se muestran en el Anexo III.

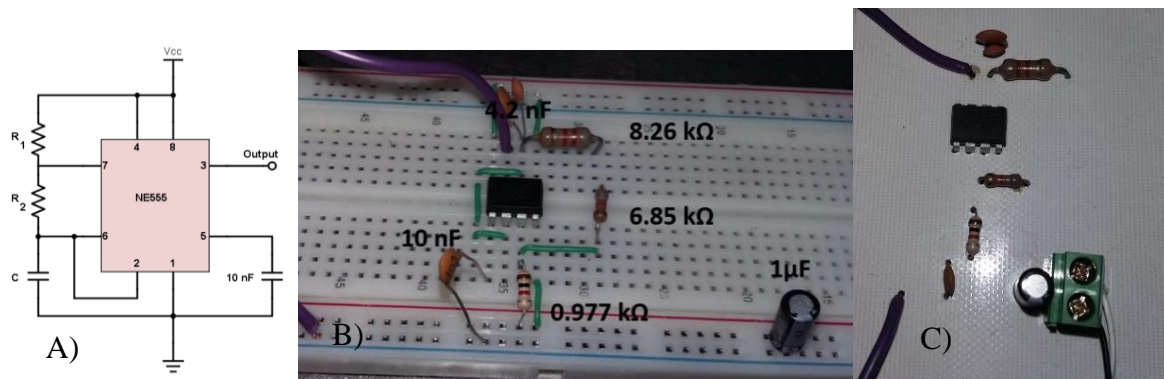


Figura 2.16.. A) Diagrama del circuito 555. B) Prototipo del circuito en Protoboard. C) Placa del circuito.

En las Figura 2.17 y 2.18 se muestra el esquema experimental y una foto del diagrama del montaje experimental.

⁶Tracker es un paquete de análisis de video construido sobre una plataforma Java Open Source Physics(OSP). Incluye como características; seguimiento de objetos y su posición, velocidad y aceleración laminar, gráficos, filtros con efectos especiales, multiples cuadros de referencia, puntos de calibración, líneas de perfil para el análisis del espectro, patrones de interferencia y modelos dinámicos de partículas

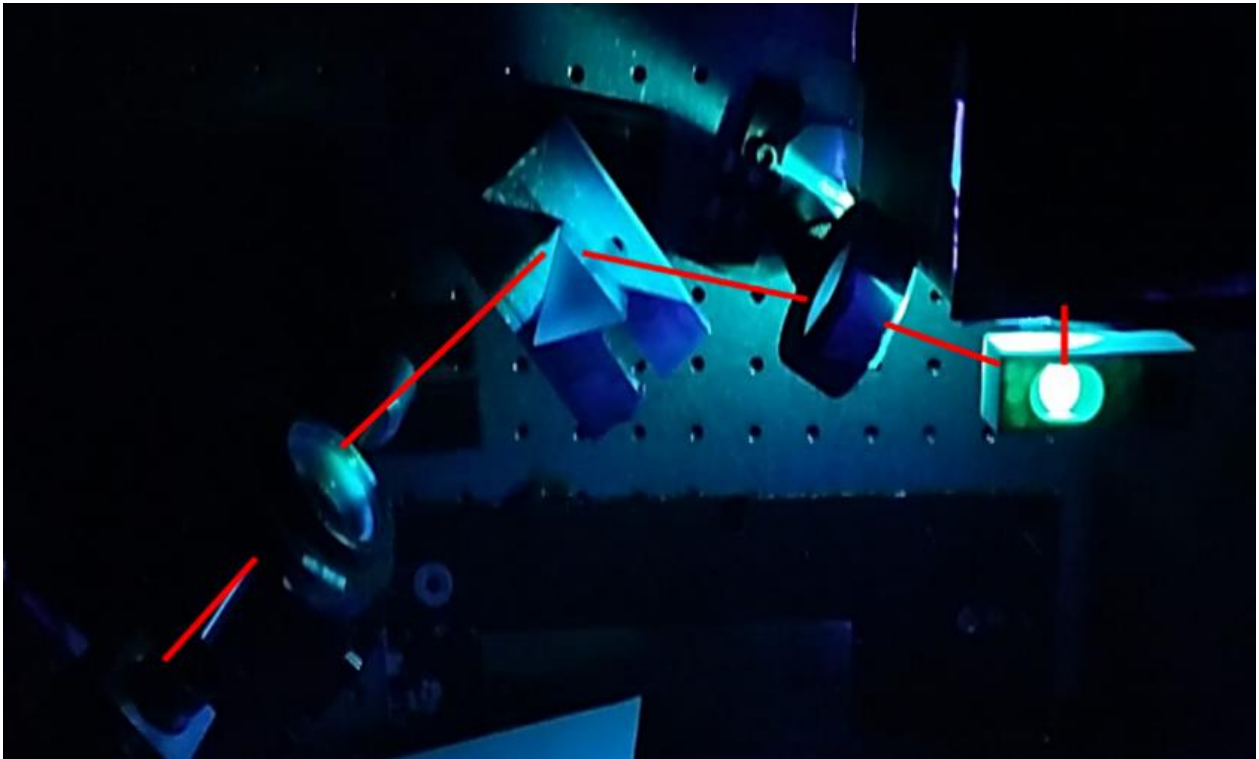


Figura 2.17. Montaje experimental usando Lock in

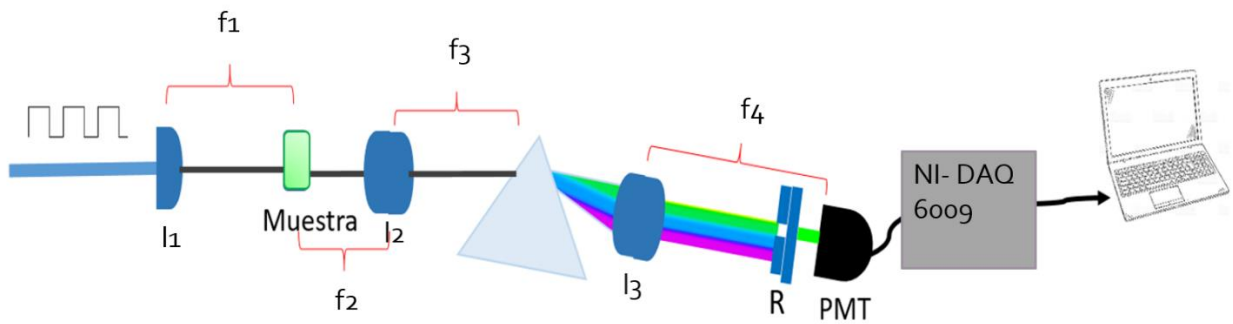


Figura 2.18. Diagrama del montaje experimental.

En la Figura 2.19 se muestra el diagrama de flujo y en la Figura 2.20 se muestra diagrama de bloques del programa en LabView para analizar la señal medida por el PMT, éste fue añadido al que se muestra en la Figura 2.11.

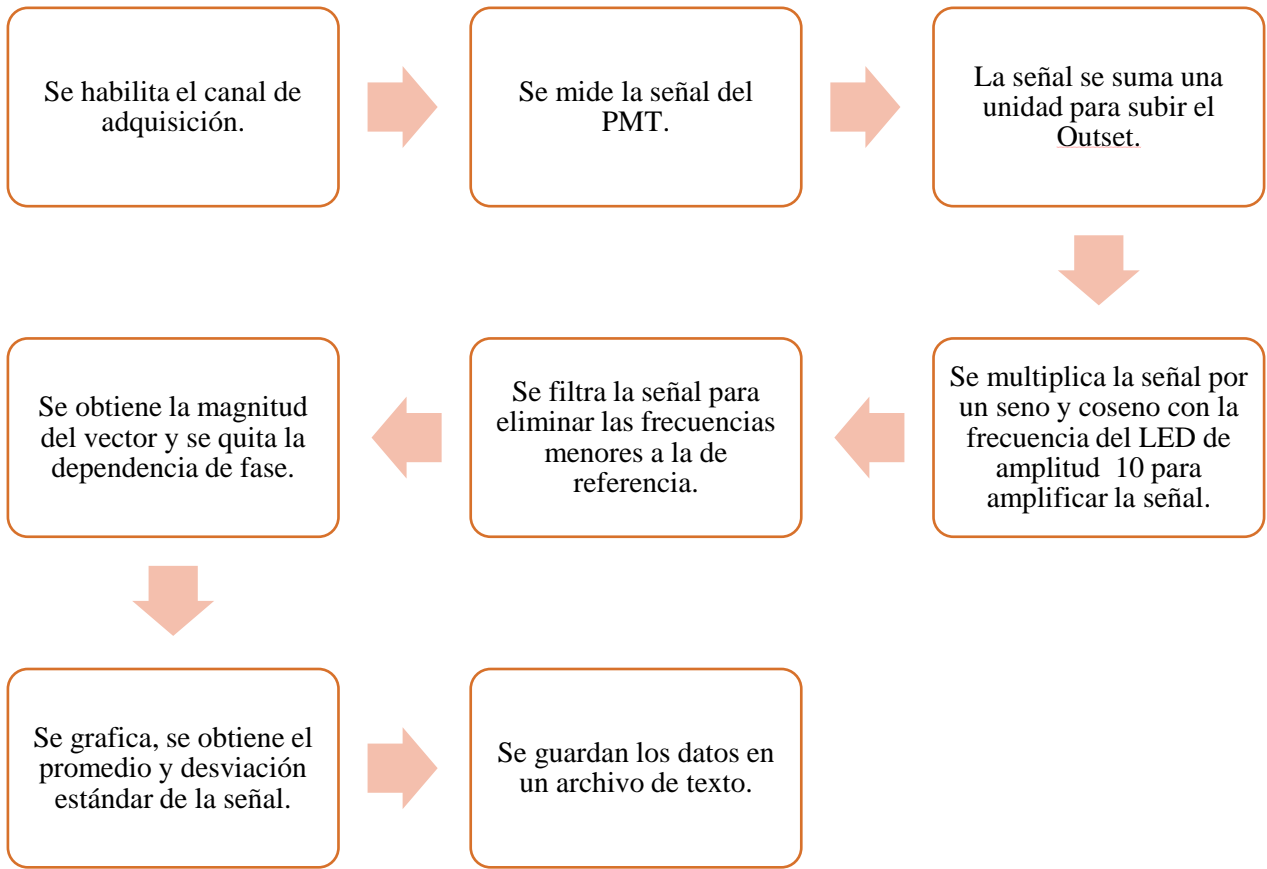


Figura 2.19. Diagrama de flujo del programa de LabView

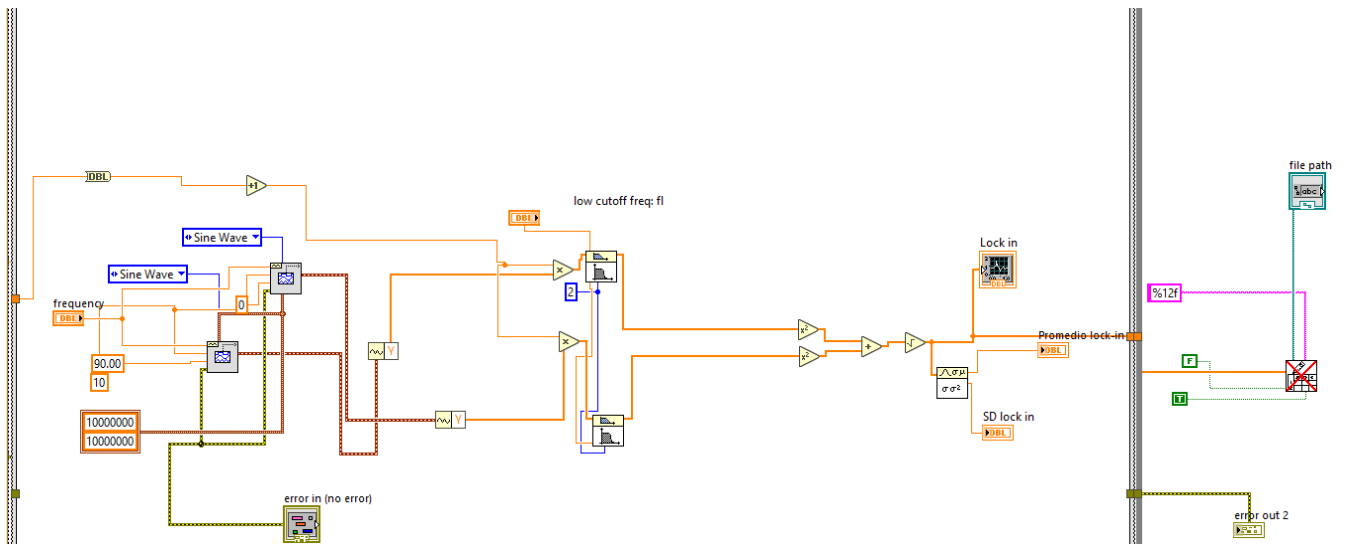


Figura 2.20. Código del amplificador Lock-in digital.

2.4.1. Resultados experimentales. Lock-in

En la Figura 2.21 se observan los valores obtenidos para las muestras en períodos de minuto y medio. Se puede observar que con esta técnica hay cambios en la intensidad, pues a mayor concentración la señal detectada es mayor. En la Figura 2.21, adicionalmente, se muestra un ajuste lineal a los datos obtenidos, observando que el comportamiento es decreciente conforme disminuye la concentración. Es importante mencionar que para esta técnica se usó un promedio sobre todas las detecciones con períodos de minuto y medio en cada muestra, pues al tratarse de un Lock-in digital, el amarre de fase de la señal de referencia con la señal de modulación del LED resulta complicado, en comparación con uno analógico. El número de detecciones que se tomaron en este tiempo fue de 72 detecciones por cada la medición.

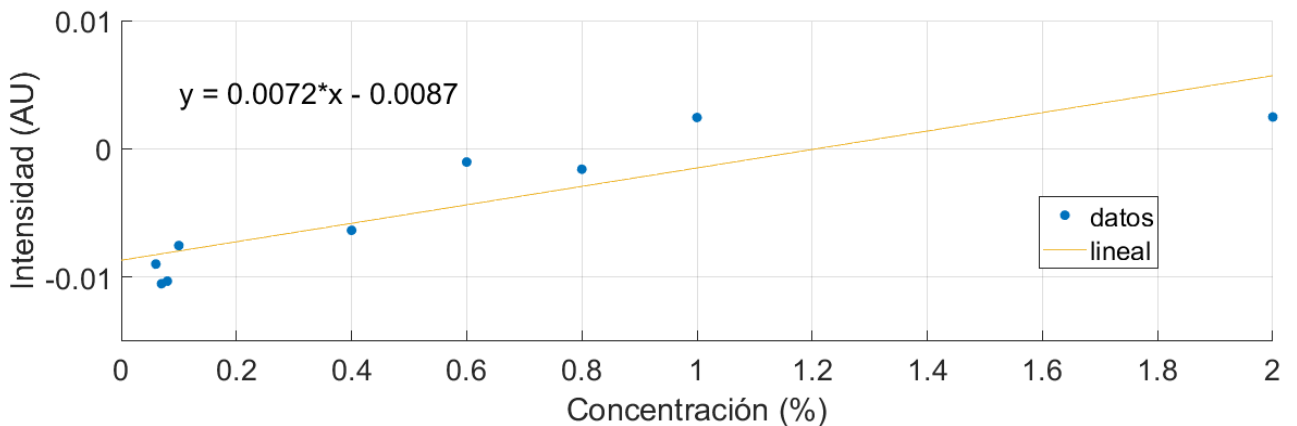


Figura 2.21. Detección de la señal de las muestras usando la técnica de Lock in.

Una diferencia importante con la técnica anterior es la intensidad con la que se excita la muestra ya que, al ser modulada, la potencia promedio de excitación disminuye. En la Figura 2.22 se muestra como disminuye de intensidad de la señal medida en el osciloscopio con un detector de silicio (DET210 - Thorlabs) emitida por el LED vs el voltaje de alimentación.

El voltaje de alimentación es de 5 V, pero al pasar por el circuito de modulación termina en 3.36 ± 0.04 V como máximo, pero después de pasar por el LED disminuye a 0.72 V, lo cual se ve reflejado en la intensidad con la que excita a la muestra.

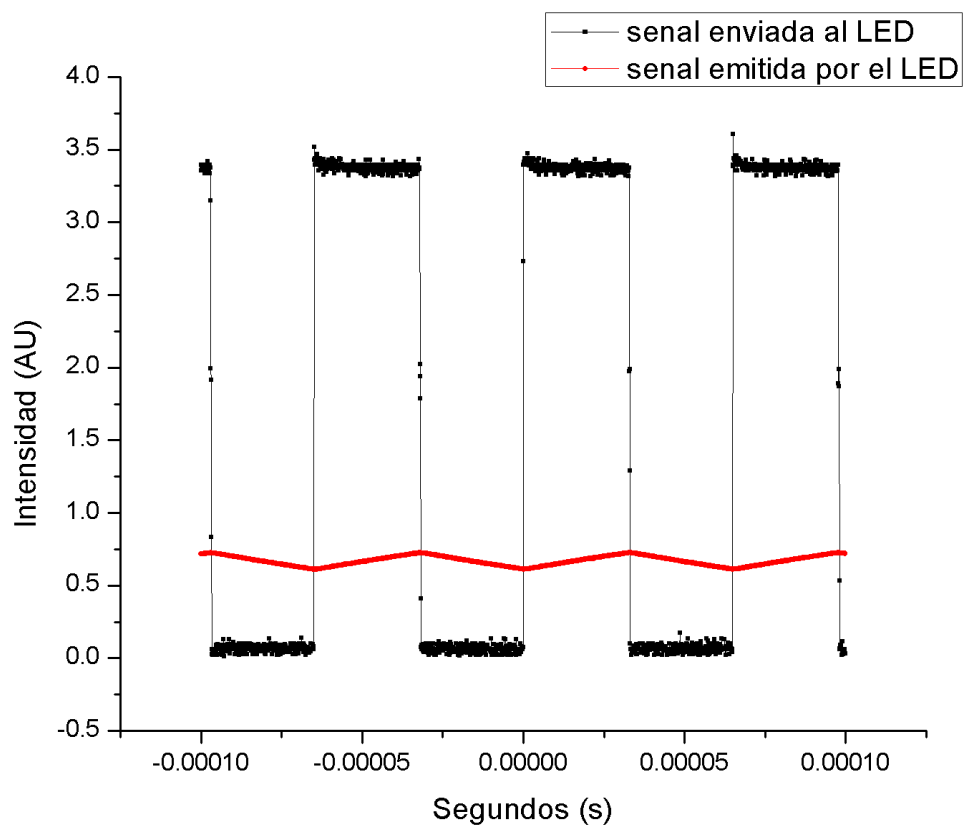


Figura 2.22 Comparación de la intensidad de la señal enviada vs la emitida por el LED

Una vez corroborado que efectivamente hay cambios en la detección a diferentes concentraciones, la siguiente prueba fue medir cambios de fluorescencia, al variar la temperatura de la muestra.

Los resultados se muestran en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 3. APLICACIONES

En este capítulo se muestra la comparación de las técnicas aplicando detección directa con un PMT y detección con PMT + Lock-in digital. Se realizan pruebas a diferentes concentraciones de pintura fluorescente además de medidas modificando la temperatura de las muestras.

3.1. Comparación de las técnicas de detección: PMT y Lock in.

En la Tabla 3.1 se muestran los valores de intensidad para las diferentes concentraciones con su desviación estándar (SD) asociada para la técnica de medición directa con PMT y su relación señal-ruido (SNR), así como las medidas realizadas con el PMT + Lock-in. Se puede observar que para la medición directa con PMT, a concentraciones bajas, la SD es del mismo orden de magnitud que la medición. Además, también se puede observar que para concentraciones bajas el sistema no distingue entre una concentración y otra.

Concentración [%]	PMT			PMT-Lock in		
	Intensidad [AU]	SD	SNR	Intensidad [AU]	SD	SNR
2	0.036	0.0016	22.50	0.00248	0.01137	0.218
1	0.031	0.0016	19.37	0.00244	0.0105	0.232
0.8	0.028	0.0016	17.50	-0.00159	0.01128	0.140
0.6	0.025	0.0015	16.66	-0.00103	0.00713	0.144
0.4	0.018	0.0016	11.25	-0.00635	0.00519	1.223
0.1	0.009	0.0015	6.00	-0.00754	0.00259	2.911
0.08	0.008	0.0016	5.00	-0.01031	0.00228	4.521
0.07	0.007	0.0016	4.37	-0.01051	0.00179	5.871
0.06	0.007	0.0016	4.37	-0.00898	0.00146	6.150
0.05	0.006	0.0015	4.00	-0.01134	0.00289	3.923

Tabla 3. 1. Intensidades detectadas, su desviación estándar usando un PMT y su factor de sensibilidad (relación señal ruido).

Por otro lado, para la técnica de PMT+Lock in se puede observar que, para concentraciones bajas, la SD es un orden de magnitud menor que la medición.

De los valores que se obtuvieron, ver Figura 3.1 y Figura 3.2, se puede comprobar que para concentraciones bajas el método de Lock-in es más eficaz debido a que presenta valores de SNR mayores comparados con los valores obtenidos con la detección directa con el PMT, 6.150 y 4.37 respectivamente para concentraciones de 0.06%. Se puede observar también que la SNR decae, en ambos casos para concentraciones menores a 0.05%, lo cual sugiere el límite de detección confiable para ambos métodos.

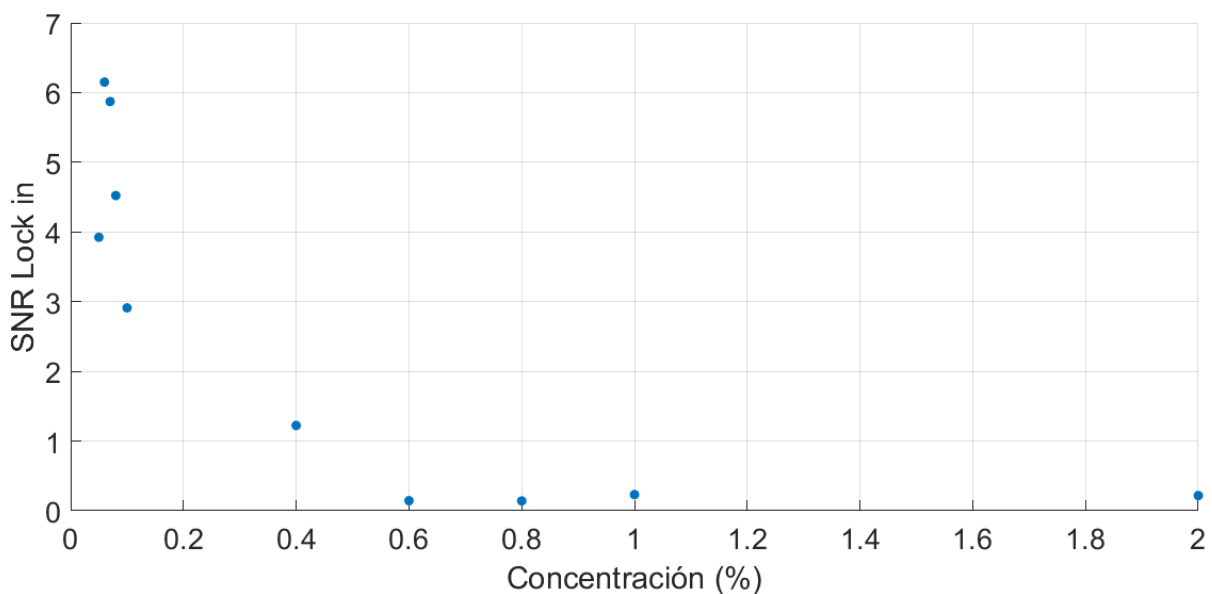


Figura 3.1 SNR usando un PMT+ Lock in.

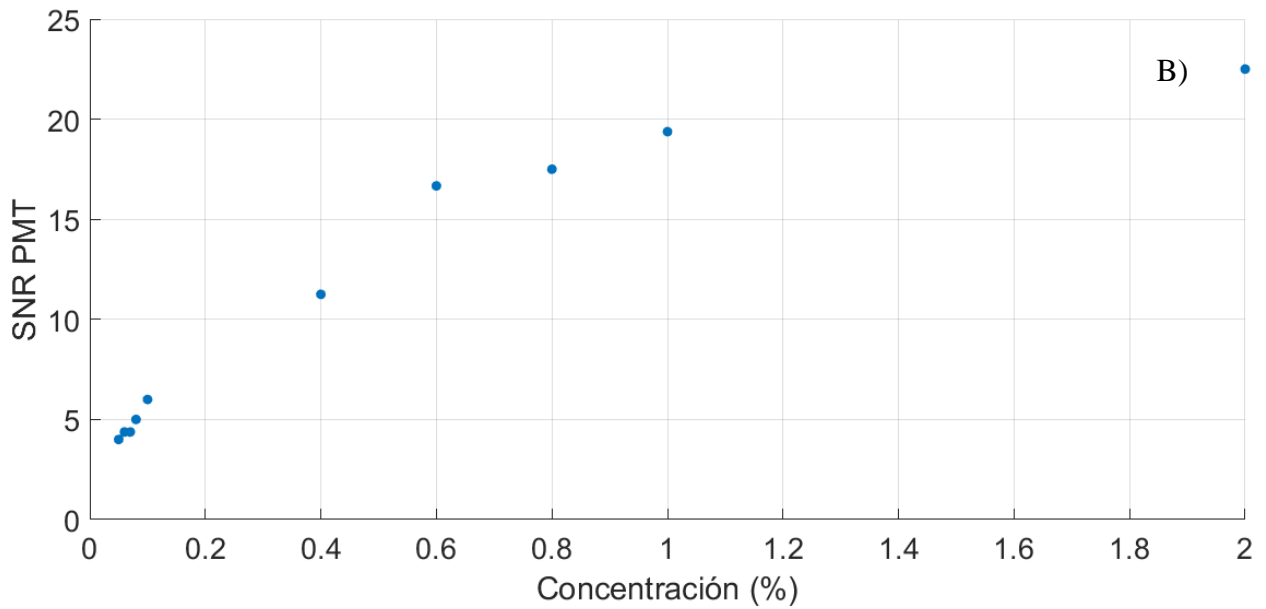


Figura 3.2. SNR usando solo un PMT

3.2. Fluorescencia como función de la temperatura.

3.2.1 Método experimental

Considerando que la técnica de medición PMT+Lock-in es la más eficiente y con menos ruido, se propuso aplicarla para medir cambios de fluorescencia como función de las muestras.

El montaje para este experimento es similar al de la técnica de Lock-in, solo se modificó en dos aspectos: un filtro adicional (FGL495 filtro pasa altas 495 nm de Thorlabs) antes de la rendija R y, la muestra es sumergida en un vaso de precipitados, este cuenta con un sensor LM35 (circuito electrónico) para monitorear la temperatura. Para poder calentar la muestra se fabricó una parrilla con dos resistencias de 10Ω colocadas en paralelo, teniendo una resistencia equivalente de 5Ω . El arreglo de resistencias fue calentado mediante una diferencia de potencial de 12V (la fuente de voltaje fue de una PC), para calentar el agua uniformemente se colocó una placa de metal (latón).

En la Figura 3.3 se muestra el diagrama y el arreglo experimental para medir el cambio de fluorescencia en función de la temperatura.

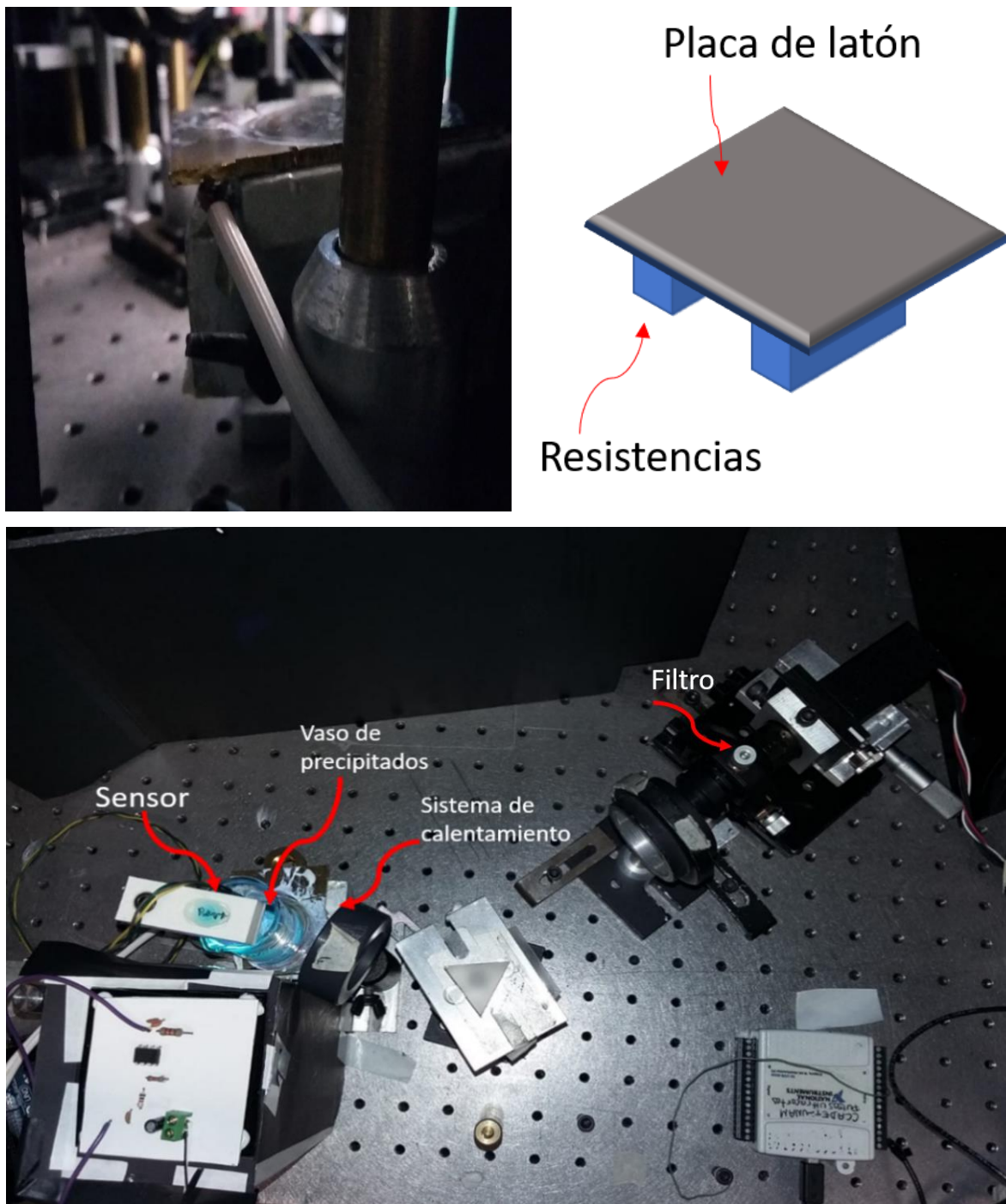


Figura 3.3. Montaje experimental variando la temperatura de la muestra

El programa de la Figura 3.4 fue modificado con el propósito de poder realizar un censo de la temperatura, el cual sería a través de un Arduino modelo Uno. El programa final tiene la posibilidad de adquirir datos con una tarjeta de adquisición y el registro de la temperatura con un Arduino. En la Figura 4.3 se puede observar el código del censo de temperatura y un diagrama de flujo.

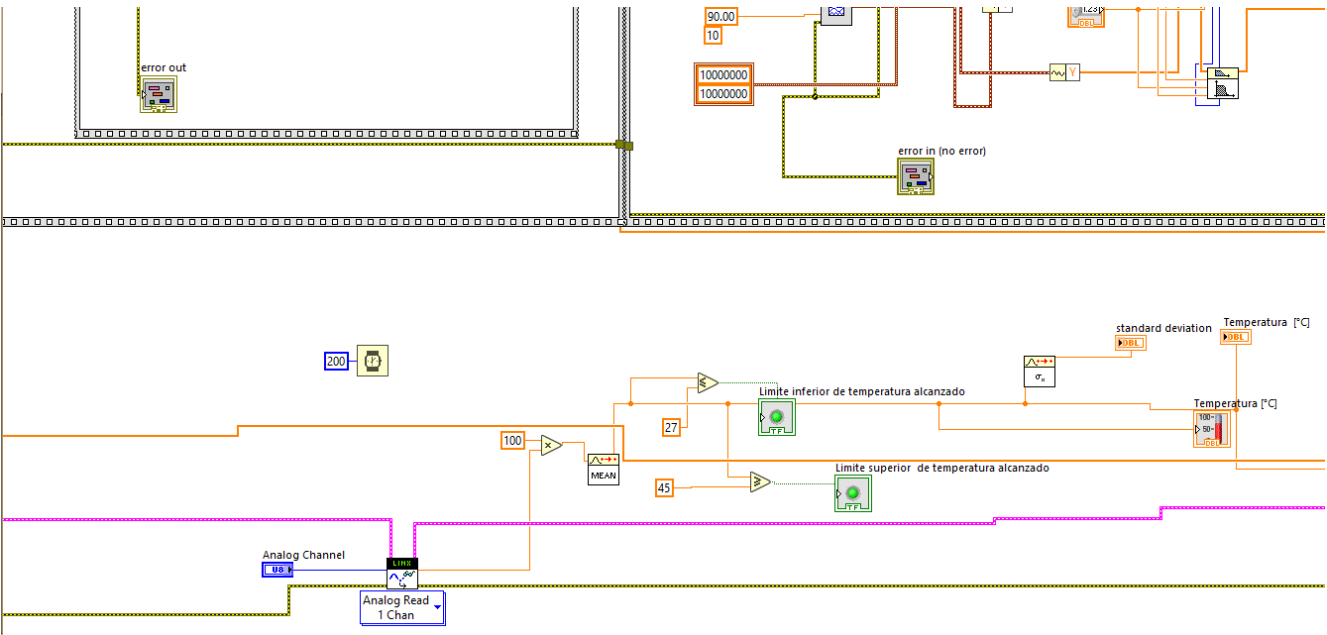
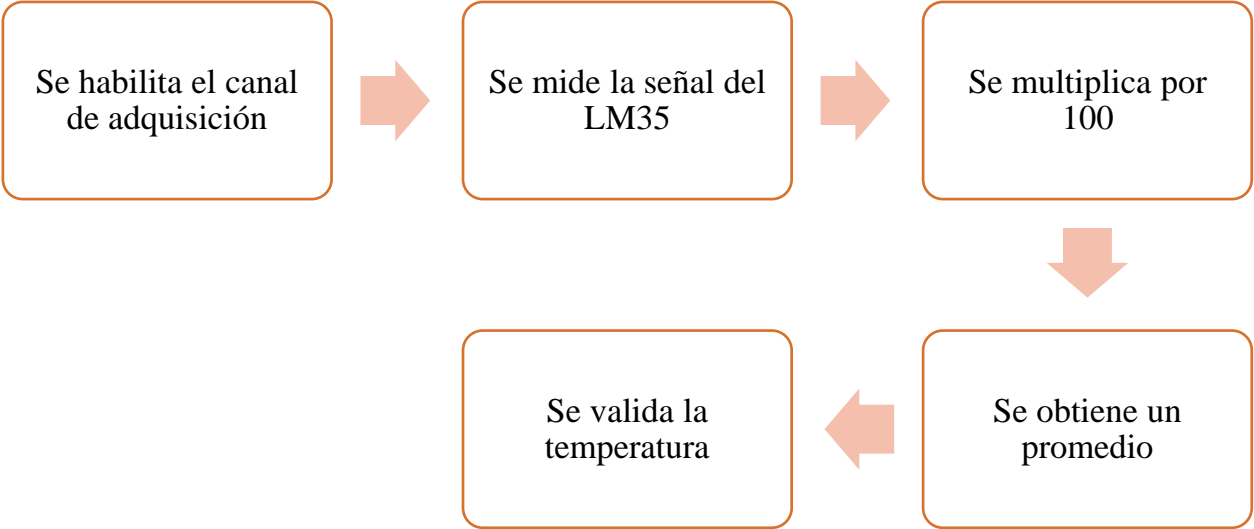


Figura 3.4 Código en LabView y diagrama del censo de la temperatura.

3.2.1. Resultados experimentales. Fluorescencia en función de la temperatura

Se analizaron 2 muestras, la muestra de pintura (100%) y una muestra arbitraria de las mostradas en la Tabla 3.1. Para los siguientes experimentos se eligió la muestra 12 (0.05%), que representa la mínima concentración, para este tipo de muestras, a la cual consideramos que el sistema de detección responde adecuadamente, de acuerdo a los resultados presentados en la sección anterior.

En las Figuras 3.5 y 3.6 se muestran los valores obtenidos durante 12.5 minutos para ambas muestras. Se puede observar que con esta técnica si hay cambios en la intensidad al variar la temperatura. A mayor temperatura la intensidad de fluorescencia disminuye.

En la Figura 3.5 se muestra el valor obtenido para la muestra saturable (pintura) y el ajuste lineal hecho en Origin.

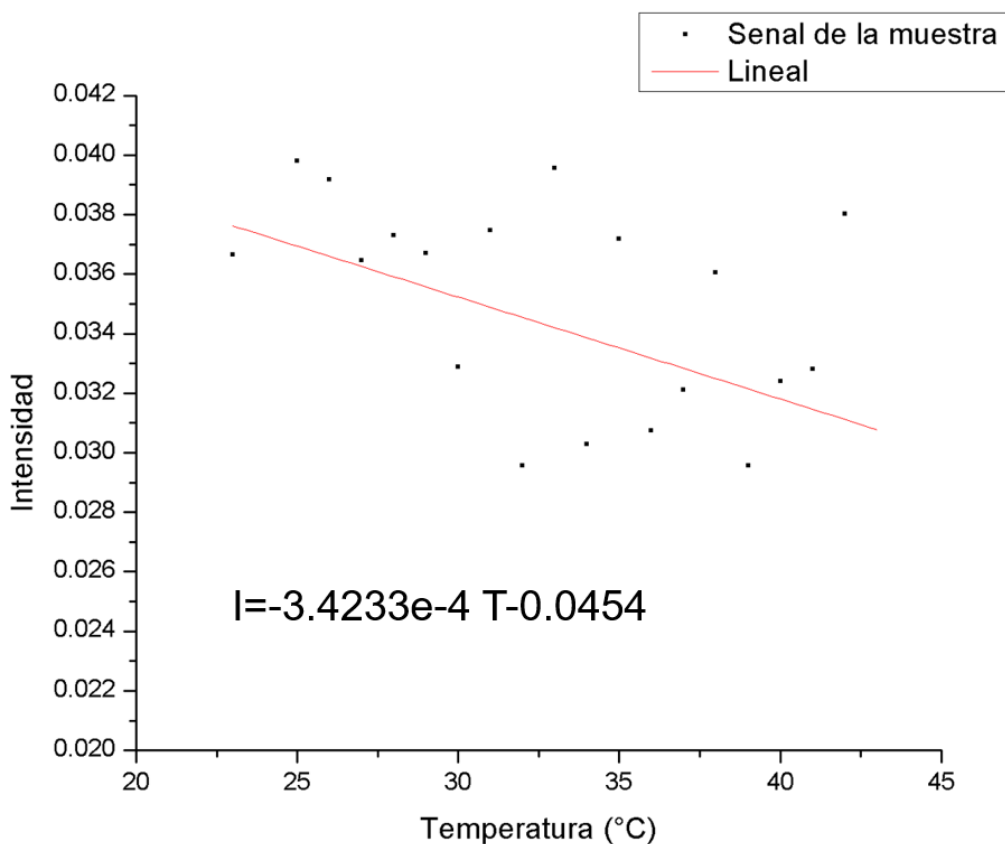


Figura 3.5 Detección de la señal usando el método del Lock-in cambiando la temperatura de la muestra (pintura).

En la Figura 3.6 se muestra la detección para la muestra 12 (0.05%). A diferencia de la muestra saturada, los cambios no son tan evidentes, por lo cual el ajuste se tuvo que hacer en Matlab.

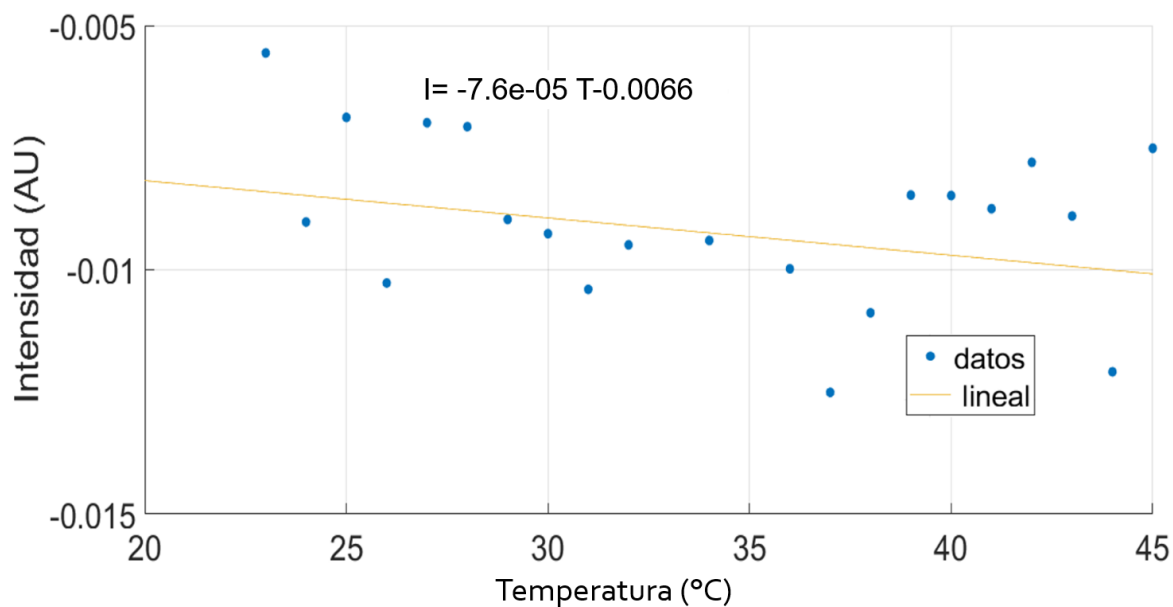


Figura 3.6. Detección de la señal usando el método del Lock-in cambiando la temperatura de la muestra 12 (0.05%).

Un factor importante para no observar cambios en la intensidad de fluorescencia fue el agua. En la Figura 3.7 se observan burbujas de aire formadas en el contorno del vial y en las paredes del vaso. Lo cual disminuye más la intensidad de la fluorescencia de la muestra.

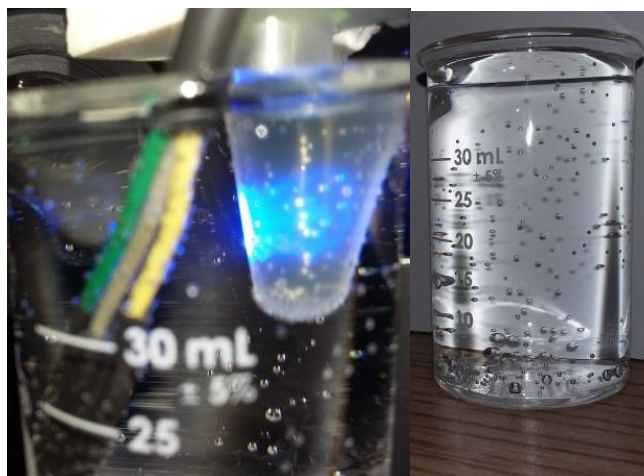


Figura 3.7. Burbujas generadas al calentar el agua. A) Adheridas al vial, B) Adheridas a las paredes del vaso de precipitados.

Analizando el espectro de absorción del agua, como se puede observar en la Figura 3.8, que no hay una absorción considerable. Por otro lado, considerando que la señal de intensidad de la muestra es muy pequeña, el esparcimiento que ocasionan las burbujas adheridas tanto al vial como a las paredes del vaso (ver Figura 3.7), disminuyen la intensidad de la muestra que llega al detector.

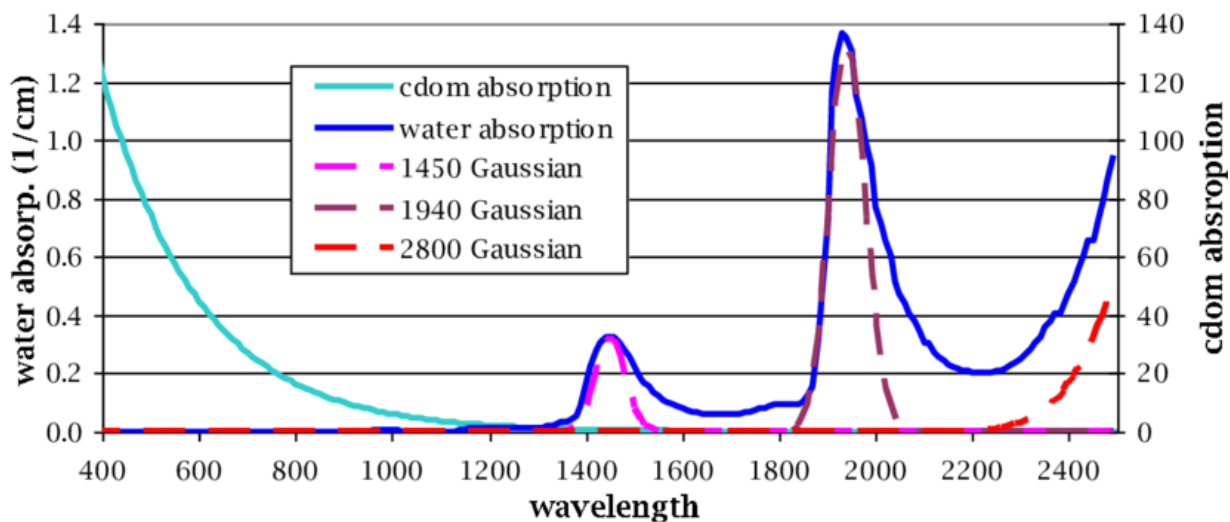


Figura 3.8. Espectro de absorción del agua.⁷

⁷ Spectral Reflectance of Wetted Soils - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Absorption-spectrum-for-dissolved-organic-material-DOM-and-Gaussian-approximations-of_fig3_268505651 [accessed 16 Mar, 2019]

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

En este trabajo se diseñó y construyó un detector de fluorescencia de alta sensibilidad y con la capacidad de obtener medidas en el orden de 15 segundos. Se utilizó como fuente de excitación un LED de potencia azul (450-500 nm) y como muestra de referencia para propósitos de calibración, pintura fluorescente verde diluida en acetona.

Para poder detectar la intensidad emitida por las muestras se utilizaron tres técnicas diferentes de detección: usando un espectrómetro, un PMT y, finalmente a este último, se integró un sistema de amarre de fase (Lock-in) para filtrar la señal de excitación. Se aplicó un Lock in debido a que tiene la capacidad de detectar señales de baja intensidad enmascaradas por ruido, típicamente generado por la misma excitación. Esta técnica se implementó de manera digital usando el software LabView.

Se comprobó que el detector es sensible a diferentes concentraciones de la muestra prueba, desde 2% hasta 0.05 %, dando como resultado una respuesta lineal decreciente respecto a la concentración de la muestra. Los resultados se obtuvieron, a través de la detección directa con el PMT como detector y un sistema de PMT+Lock-in digital para el filtrado de la señal de excitación.

Se diseñó un prototipo para probar la sensibilidad del detector cambiando la temperatura de la muestra. Para ello se utilizó como técnica de detección un PMT + Lock-in digital.

A partir del valor de la razón señal a ruido SNR obtenida en ambos casos de detección (PMT y PMT+Lock-in) concluimos que, para concentraciones bajas, el método de Lock-in es más eficaz, en tanto que, para concentraciones altas, la detección directa con PMT la SNR resulta mayor. Esto es debido a que experimentalmente el Lock in no esta en fase con la señal de referencia, por lo que, a concentraciones mayores, la diferencia entre el cero y la detección es mayor, dando así una desviación estándar considerable.

En el experimento de la medida de la variación de fluorescencia como función de la temperatura, como medio de calentamiento se utilizaron dos resistencias y para distribuir el calor de manera uniforme se utilizó una placa metálica bajo de éste.

Se comprobó que el detector es capaz de medir los cambios de fluorescencia como función de la temperatura a concentraciones de 0.05%, los cuales mostraron ser lineales con tendencia decreciente.

Trabajo a futuro

Una mejora adicional sería cambiar los depósitos de la muestra, es decir, cambiar los viales por cubetas especializadas usadas para espectrofluorometría. Este cambio implicaría utilizar más material para hacer la detección, pero elimina el problema de las burbujas adheridas al vial y el vaso de precipitados, que funciona como medio de calentamiento de la muestra.

Un diseño ideal consistiría en tener control para incrementar y disminuir la temperatura. Para ello, se propone a futuro, colocar un sistema que tenga dos relevadores: el primero de ellos conectado a las resistencias y el segundo de ellos conectado a una bomba de agua (la cual estaría sumergida en un recipiente con agua, la cual estará enfriándose por medio de dos celdas Peltier). El primer relevador se apagará cuando el agua del vaso de precipitados alcance la temperatura máxima. El segundo relevador se activará cuando el primero se apague, haciendo circular el agua fría por la base del vaso de precipitados (a través de unas mangueras), consiguiendo así enfriar la muestra.

REFERENCIAS.

- [1] Trabajo de investigación UNAM. Instituto de Biotecnología. María Teresa Martínez Estrada; Claudia I. Moctezuma González. Espectrofluorimetría. 30 de mayo del 2006.
- [2] García Suárez A. Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por métodos indirectos. Master Tesis, Universidad de Oviedo, Oviedo, España, Julio 2015.
- [3] Bosch Estrada José. Optimización de técnicas ópticas y eléctricas para el estudio de heteroestructuras basadas en compuestos III-V. Tesis de doctorado en Ciencias físicas. Universitat de Barcelona. Facultat de Física. Septiembre de 1993.
- [4] Fluorescencia
consultado el 6 de Julio del 2018 en:
<http://iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504634347.pdf>
- [5] García, J. A.; Moreno, J. M.; Perales, F. J.; Romero, J.; Sánchez, P.; Gómez-Robledo, L. *Fluorescence: An Interdisciplinary Phenomenon for Different Education Levels*. European Journal of Physics Education, v3 n3 p30-35 2012
- [6] An introduction to fluorescence spectroscopy. Consultado el 15 de Marzo del 2019 en:
<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Fluorescence%20Spectroscopy.pdf>
- [7] Martynov, V. I., Pakhomov, A. A., Popova, N. V., Deyev, I. E., & Petrenko, A. G. (2016). *Synthetic Fluorophores for Visualizing Biomolecules in Living Systems*. Acta naturae, 8(4), 33–46.
- [8] Fluorophore Databases. Consultado el 13 de abril del 2019 en:
<http://www.microscopist.co.uk/general-techniques/fluorophore-databases/>
- [9] Fluoroforos y sus aplicaciones. Consultado el 13 de abril del 2019 en:
https://www.cio.mx/talleres/tmcmf/archivos/CW_Fluoroforos.pdf
- [10] La espectroscopía de fluorescencia en el análisis estructural de proteínas y de agregados amiloides. Consultado el 13 de Abril del 2019 en:
<http://ecaths1.s3.amazonaws.com/qbiologica2/1534887501.Fluorescencia%20para%202011.pdf>

- [11] Bases de la fluorescencia. Consultado el 13 de Abril del 2019 en: <http://www.scian.cl/archivos/uploads/1345921380.5467>
- [12] Montoya Rossi, Eduardo, Baltuano Elías, Óscar, & Arbildo López, Aurelio. (2013). *Espectrómetro para radiación visible hecho en casa, de bajo costo y altas prestaciones*. Revista de la Sociedad Química del Perú, 79(1), 80-91.
- [13] Knoll Glenn F. Radiation detection and measurement. 4th edition. United States of America. John Wiley & Sons, Inc. 2010. Chapter 9.
- [14] Amplificadores Lock in. Apunte teórico. Universidad Nacional de la Plata at: <https://catedra.ing.unlp.edu.ar/electrotecnia/electronicos2/download/Apuntes/Teo5.2-AmpliLockin.pdf> (Accessed on: July 6, 2018)
- [15] What is a Lock-in amplifier? at: http://paginas.fisica.uson.mx/horacio.munguia/aula_virtual/Cursos/Instrumentacion%20II/Documentos/Lock_In%2002.PDF (Accessed on: Jun 21, 2018)
- [16] Teoría del 555 at: <https://www.uv.es/~marinjl/electro/555.htm> (Accessed on: August 20, 2018).
- [17] Caracterización de los Fotomultiplicadores del Experimento Double Chooz bajo Campo Magnético y Diseño y Construcción de sus Blindajes Magnéticos. Consultado el 13 de Abril del 2019 en: <http://inspirehep.net/record/1605353/files/fulltext.pdf>
- [18] ¿Sabes cómo funciona la fibra óptica? Consultado el 19 de Abril del 2019 en <https://www.etsist.upm.es/estaticos/ingeniatic/index.php/multimedia/infografias/item/706-sabes-como-funciona-la-fibra-optica.html>
- [19] Imagen de fibra óptica Consultado el 19 de Abril del 2019 en https://programas.cuaed.unam.mx/repositorio/moodle/pluginfile.php/869/mod_resource/content/2/fibraoptica_plantilla/index.html
- [20] Welvaert M, Rosseel Y (2013) On the Definition of Signal-To-Noise Ratio and Contrast-To-Noise Ratio for fMRI Data. PLoS ONE 8(11): e77089. doi:10.1371/journal.pone.0077089
- [21] Esquema del tubo fotomultiplicador at: http://www.sapiensman.com/tecnoficio/optica/tecnologia_de_vision_nocturna.php?psps_page=6 (Accessed on: March 19, 2018)

ANEXO I. TUBO FOTO-MULTIPLICADOR (PTM)

El tubo fotomultiplicador convierte señales de luz que típicamente consisten en no más de unos pocos cientos de fotones en un pulso de corriente utilizable sin agregar una gran cantidad de ruido aleatorio a la señal [13].

Un fotomultiplicador (PMT) es un dispositivo muy utilizado en física de partículas que recoge la luz y la convierte en señal eléctrica. Como se puede ver en la Figura I.1 consiste en un tubo de vacío formado por un cátodo fotosensible (fotocátodo), electrodos de focalización, un sistema de multiplicación de electrones (dínodos) y un ánodo. Cuando la luz entra en el fotocátodo, los fotoelectrones (pe's) son emitidos dentro del vacío del tubo. Estos pe's se dirigen gracias a los electrodos de focalización hacia el sistema de multiplicación donde se incrementa el número de pe's a su paso por los electrodos de emisión secundaria (dínodos). Finalmente, el flujo total de electrones se recolecta en el ánodo. El fotocátodo, que es un semiconductor (puede describirse mediante un modelo de bandas), convierte los fotones incidentes en electrones mediante el efecto fotoeléctrico. En el caso de los semiconductores, los electrones en la banda de valencia pueden excitarse y por lo tanto tener la energía necesaria para saltar a la banda de conducción, dejando huecos en la primera. Si la energía absorbida es alta, los electrones pueden incluso ser emitidos hacia el interior del PMT [17].

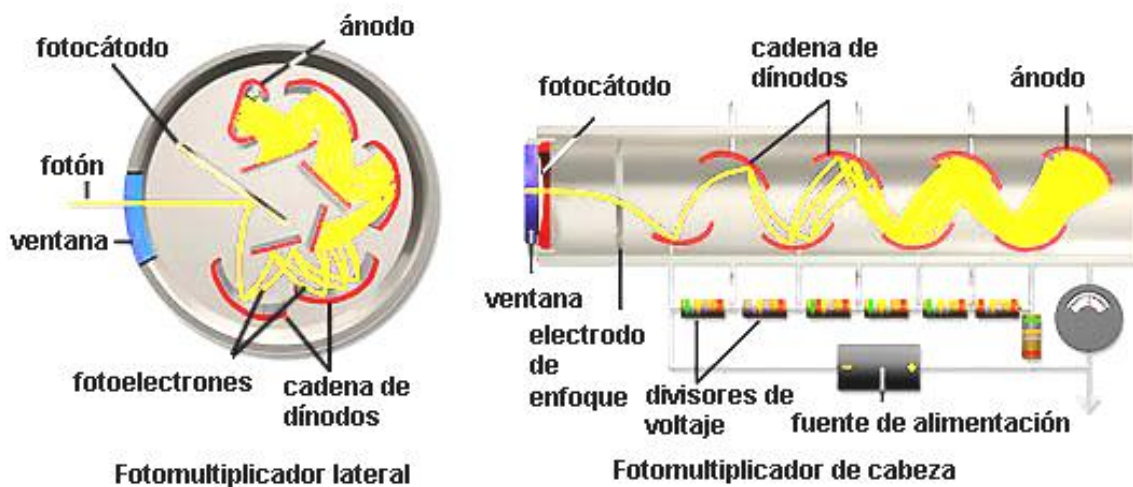


Figura I.1. Esquema de un tubo fotomultiplicador [21]

La cobertura exterior sirve como un límite de presión para mantener las condiciones de vacío dentro del tubo que se requieren para que los electrones de baja energía puedan ser acelerados eficientemente por los campos eléctricos internos. Los dos componentes principales dentro del tubo fotomultiplicador son una capa fotosensible, llamada fotocátodo, acoplada a una estructura multiplicadora de electrones. El fotocátodo sirve para convertir tantos fotones de luz incidente como sea posible en electrones de baja energía. Debido a que solo unos pocos cientos de fotoelectrones pueden estar involucrados en un pulso típico, su carga es demasiado pequeña en este punto como para servir como una señal eléctrica conveniente. La sección del multiplicador de electrones en un tubo fotomultiplicador proporciona una geometría de recolección eficiente para los fotoelectrones, además de servir como un amplificador casi ideal para aumentar enormemente su número. Después de la amplificación a través de la estructura del multiplicador, un pulso de centelleo típico dará lugar a $10^7 - 10^{10}$ electrones, suficiente para servir como la señal de carga para el evento de centelleo original. Esta carga se recoge convencionalmente en el ánodo o etapa de salida de la estructura multiplicadora [13].

ANEXO II. MÉTODO DE LOCK-IN

El principio del amplificador de amarre de fase (Lock-in) es el de tratar a la señal de modo que pueda ser diferenciada del ruido [14,15] a partir de su modulación con una frecuencia de referencia. Por lo general, un experimento se excita con una frecuencia fija (de un oscilador o generador de funciones) y el Lock-in detecta la respuesta del experimento a la frecuencia de referencia.

En el siguiente diagrama, la señal de referencia consiste en una onda cuadrada a la frecuencia ω_r . La señal para excitar el experimento consiste en una onda sinusoidal, $V_{sig} \sin(\omega_r t + \theta_{sig})$ donde V_{sig} es la amplitud de la señal. La respuesta puede ser la forma de onda de la señal mostrado a continuación en la Figura II.1 [15].

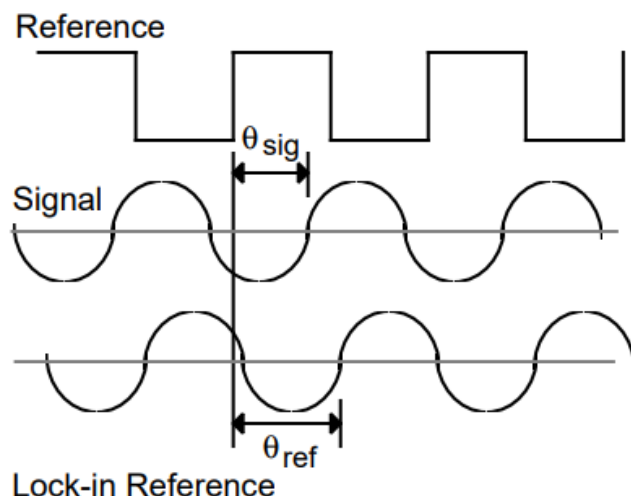


Figura II.1. Ejemplos de la señal de referencia y una experimental [9].

La referencia del Lock-in es $V_L \sin(\omega_L t + \theta_{ref})$. La salida del detector sensible a la fase (PSD) es simplemente el producto de dos ondas sinusoidales [15].

$$V_{psd} = V_{sig} V_L \sin(\omega_r t + \theta_{sig}) \sin(\omega_L t + \theta_{ref}) = \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos([\omega_r - \omega_L]t + \theta_{sig} - \theta_{ref}) - \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos([\omega_r + \omega_L]t + \theta_{sig} + \theta_{ref}) \quad (1)$$

La salida de PSD es de dos señales de AC, una a la diferencia frecuencia ($\omega_r - \omega_L$) y la otra en la frecuencia de suma ($\omega_r + \omega_L$) [15].

Si la salida PSD se pasa a través de un filtro pasa bajas, las señales de AC se eliminan. Sin embargo, si ω_r es igual a ω_L , el componente de diferencia de frecuencia será una señal de DC. En este caso, el PSD filtrado salida será [15]

$$V_{psd} = \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos(\theta_{sig} - \theta_{ref}) \quad (2)$$

Esta es una señal es DC proporcional a la amplitud de señal.

Suponiendo que existiera ruido, el PSD y el filtro pasa bajas solo detectarían señales cuyas frecuencias están muy cerca de la de referencia del Lock in. Por lo que señales de ruido a frecuencias lejos de la referencia se atenúan en la salida del PSD por el filtro pasa bajas. Ruido en frecuencias muy cerca de la frecuencia de referencia resultan en salidas de AC de muy baja frecuencia del PSD ($|\omega_{noise} - \omega_{ref}|$ es pequeño). Su atenuación depende del ancho de banda del filtro de pasa bajas y roll-off. El ancho de banda del filtro pasa bajas determina el ancho de banda de detección. Solo la señal en la frecuencia de referencia dará como resultado una salida de DC verdadera y no será afectado por el filtro-pasa bajas Se necesita hacer que la referencia del Lock-in sea la misma que la frecuencia de la señal, es decir, $\omega_r = \omega_L$. No solo las frecuencias tienen que ser iguales, la fase entre las señales no puede cambiar con el tiempo, de lo contrario $\cos(\theta_{sig} - \theta_{ref})$ cambiará y V_{psd} no sería una señal DC. Los amplificadores Lock-in utilizan un bucle de bloqueo de fase (PLL) para generar la señal de referencia. En este caso, la referencia es proporcionada por la excitación fuente (el generador de funciones) [15].

Recordando que la salida de PSD es proporcional a $V_{sig} \cos\theta$ donde $\theta = (\theta_{sig} - \theta_{ref})$. θ es la diferencia de fase entre la señal y la referencia de bloqueo oscilador. Ajustando θ_{ref} podemos hacer θ igual a cero, en cuyo caso podemos medir V_{sig} ($\cos\theta = 1$). Por el contrario, si θ es 90° , no habrá salida en absoluto [15].

Esta dependencia de fase puede ser eliminada agregando un segundo PSD. Si el segundo PSD se multiplica la señal con el oscilador de referencia desplazado en 90° , es decir, $V_L \sin(\omega_L t + \theta_{ref} + 90^\circ)$, su filtrado de salida pasa bajas será [15]

$$V_{psd2} = \frac{1}{2} V_{sig} V_L \sin(\theta_{sig} - \theta_{ref}) \quad (3)$$

$$V_{psd2} \sim V_{sig} \sin\theta \quad (4)$$

De manera que se tendrá dos salidas, una proporcional a $\cos\theta$ y el otro proporcional a $\sin\theta$. Si llamamos la primera salida X y la segunda Y [15],

$$X = V_{sig} \cos\theta; Y = V_{sig} \sin\theta \quad (5)$$

estas dos cantidades representan la señal como un vector relativo al oscilador de referencia del Lock-in. X se llama el componente 'en fase' y Y el componente 'cuadratura'. Esto es porque cuando $\theta = 0$, X mide la señal mientras Y es cero [15].

Calculando la magnitud (R) de la señal vector, la dependencia de fase se elimina [15].

$$R = (X^2 + Y^2)^{\frac{1}{2}} = V_{sig} \quad (6)$$

R mide la amplitud de la señal y no depende de la fase entre la señal y Referencia del Lock-in. La fase θ entre la señal y la referencia del Lock-in, se puede medir usando [15]

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{Y}{X}\right)$$

ANEXO III. CIRCUITO 555.

El dispositivo 555 (ver Figura III.1) es un circuito integrado muy estable cuya función primordial es la de producir pulsos de temporización con una gran precisión y que, además, puede funcionar como oscilador.

Sus características más destacables son:

- Temporización desde microsegundos hasta horas.
- Modos de funcionamiento:
 - Monoestable.
 - Astable.
- Aplicaciones:
 - Temporizador.
 - Oscilador.
 - Divisor de frecuencia.
 - Modulador de frecuencia.
 - Generador de señales triangulares.

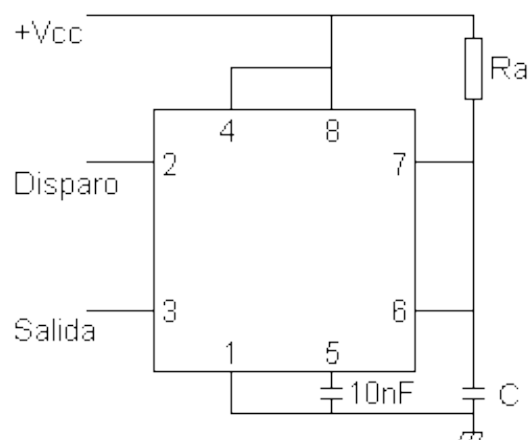


Figura III.1. Diagrama de un circuito 555.

Pasemos ahora a mostrar las especificaciones generales del 555 ($V_c = \text{disparo}$):

En este modo se genera una señal cuadrada oscilante de frecuencia:

$$F = \frac{1}{T} = \frac{1.44}{C * (Ra + 2 * Rb)}$$

La señal cuadrada tendrá como valor alto V_{cc} (aproximadamente) y como valor bajo 0V.

ANEXO IV. FIBRA ÓPTICA

La fibra óptica es un medio de transmisión empleado habitualmente en redes de datos; un hilo muy fino de material transparente, vidrio o materiales plásticos, por el que se envían pulsos de luz que representan los datos a transmitir. El haz de luz queda completamente confinado y se propaga por el interior de la fibra con un ángulo de reflexión por encima del ángulo límite de reflexión total, en función de la ley de Snell. La fuente de luz puede ser láser o un LED [18].

Las fibras se utilizan ampliamente en telecomunicaciones, ya que permiten enviar gran cantidad de datos a una gran distancia, con velocidades similares a las de radio o cable. Son el medio de transmisión por excelencia al ser inmune a las interferencias electromagnéticas, también se utilizan para redes locales, en donde se necesite aprovechar las ventajas de la fibra óptica sobre otros medios de transmisión [18].

En la Figura IV.1 se muestra un esquema de una fibra óptica multimodo y monomodo.

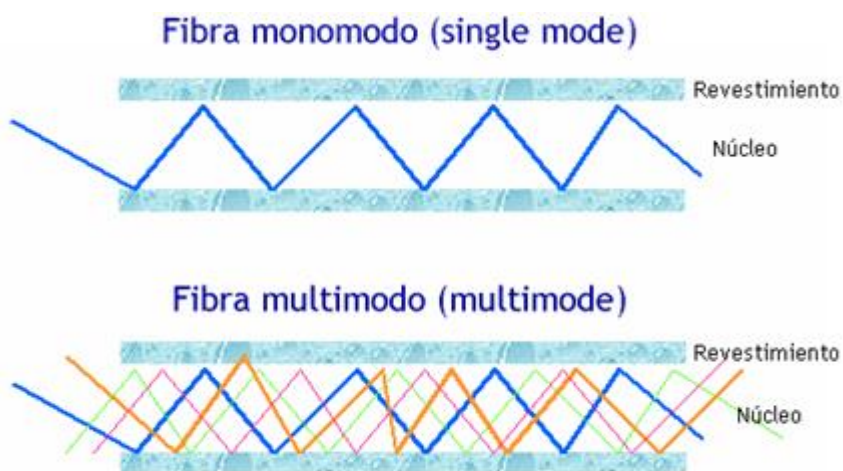


Figura IV.1 Diagramas de fibras ópticas [19].

ANEXO V. PROGRAMAS REALIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS.

Análisis de los datos obtenidos del Lock in.

```
fileID = fopen('resultados1.txt','w');
    for i=3:10
        x = load([num2str(i) '.txt']);
        F(i,:)= x(1:50);
        M=mean(F);
        R=10.-M;
        fprintf(fileID,'%6.4f %12.8f\n',R);
    end
    type resultados1.txt;
    fclose(fileID);
    x=importdata('resultados1.txt');
    x=importdata('resultados1.txt');
    y=importdata('x.txt');
    scatter(x,y,'filled')
```

Código para analizar las temperaturas de las diferentes mediciones

```
x = importdata("1.txt");
[a b]=size(x);
cont=0;
n=1;
To=floor(x(1,1))
Tm=To+0.5;
Ti=To-0.5;
```

```

Tf=floor(x(a,1))
ni=floor(Tf-To);
Prom=zeros(ni+1,1);
Temp=[To:1:Tf];

for i=1:a
    if (x(i,1)> Ti)&&(x(i,1)< Tm)
        cont=cont+1;
        Prom(n,1)= Prom(n,1)+ x(i,2);
    else
        Ti=Ti+1;
        Tm=Tm+1;
        Prom(n,1)= Prom(n,1) /cont
        cont=0;
        n=n+1;
        Prom(n,1)= Prom(n,1)+ x(i,2);
        cont=cont+1;
    end
end

Prom(n,1)= Prom(n,1) /cont

T=Temp.';
fileID = fopen('resultados1.txt','w');
fprintf(fileID,'%6.4f %12.8f\n',Prom(1:ni, 1))
fclose(fileID);
plot(T(1:ni, 1),Prom(1:ni, 1))

```