

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Diseño, Construcción y Automatización de un Espectrofluorímetro:
Aplicación en el Análisis de Riboflavina en Multivitamínicos**

Evelyn Alicia Ruales Dávila

David Egas, Ph.D., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Licenciada en Química

Quito, mayo 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Diseño, Construcción y Automatización de un Espectrofluorímetro: Aplicación en el Análisis de Riboflavina en Multivitamínicos

Evelyn Alicia Ruales Dávila

David Egas, Ph.D.,
Director de la tesis

Carlos Fabara, M.Sc,
Miembro del Comité de Tesis

Andrea C. Landázuri, M.Sc.,
Miembro del Comité de Tesis

César Zambrano, Ph.D.,
Decano del Colegio de Ciencias

Quito, mayo 2015

© Derechos de autor

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Evelyn Alicia Ruales Dávila

C. I.: 1724550635

Lugar: Quito Fecha: mayo de 2015

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de tesis a mis padres. Raimundo y Alicia, por ser el pilar fundamental y la motivación para lo mejor en mi formación personal y académica.

A mis hermanos Pablo y Gabi por su apoyo y ejemplo constante.

Al Departamento de Ingeniería Química de la USFQ: profesores, alumnos, compañeros de clase que sembraron en mí la inquietud por investigar, la tenacidad por lograr y hacer con pasión las cosas que uno se plantea por difíciles que parezcan.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis implicó una ardua investigación multidisciplinaria, una lucha constante por las pruebas y obstáculos presentados para lograrlo, pero los aprendizajes y los retos logrados en este proceso marcarán mi camino de hoy en adelante.

Un agradecimiento:

A Dios, por ser la guía todos los días de mi vida.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y motivación durante mi carrera universitaria.

A David Egas, director de esta tesis, por haberme brindado su guía, apoyo, motivación y haber depositado en mí después de algún tiempo, la confianza de que sí podía lograrlo.

A Carlos Fabara, exdirector del Departamento de Química e Ingeniería Química y a todos los profesores del Departamento por los conocimientos impartidos.

A Víctor Navarrete y Cristhian Villarreal por la asistencia brindada durante la construcción y puesta en marcha de la parte electrónica del equipo.

A Andrés Jativa por su apoyo y motivación.

A Nelson Herrera, por su ayuda y consejos

A mis compañeros y colegas de laboratorio por sus consejos y motivación.

Un agradecimiento especial a Nancy Tayango por su invaluable ayuda.

RESUMEN

La espectrometría de fluorescencia molecular (o simplemente espectrofluorimetría) es uno de los métodos espectroscópicos más usados en mediciones analíticas y en investigación científica al contar con un alto nivel de sensibilidad en un amplio rango dinámico de concentraciones y diferentes campos de estudio. El Departamento de Ingeniería Química de la USFQ no dispone de este tipo de instrumento y por tal motivo, se diseñó, se construyó y se conformó el control automático de un espectrofluorímetro.

El presente trabajo de tesis presenta los parámetros teóricos necesarios del fenómeno de absorción y emisión por fluorescencia, detalles de la construcción mecánica y la parte electrónica del equipo. Adicionalmente, se discute la automatización del instrumento mediante el uso de una tarjeta de adquisición de datos NI MyDAQ y el respectivo programa de control. El instrumento consta de una linterna LED blanca como fuente de luz, una red de difracción, un compartimento para la muestra y el detector. El sistema de excitación para fluorescencia está conformado por un conjunto de 5 LED de diferentes colores ubicados a los lados del compartimento de la muestra y a 90° del detector. El financiamiento de este proyecto se obtuvo en parte con el programa de Chancellor Grants 2013 en la USFQ.

Para comprobar y demostrar el desempeño del equipo, se midió la absorbancia y la fluorescencia de Riboflavina en multivitamínicos, lográndose resultados bastante aceptables que incluyen porcentajes de error de alrededor de 2% bajo la modalidad de absorbancia y de 1% en el modo de fluorescencia para la riboflavina. Mejoras en el sistema de adquisición y control son posibles y presentan desafíos para futuros tesis.

ABSTRACT

Molecular fluorescence spectrometry (or simply spectrofluorimetry) is one of the most extensively used spectroscopic methods in analytical measurements and scientific research, because it has high sensitivity over a wide dynamic range of concentrations and different fields of investigation. The Department of Chemical Engineering at USFQ does not have this type of instrument; for this reason, a spectrofluorimeter was designed, built and automated.

This thesis comprises the theoretical background for absorption and fluorescence phenomena, both necessary to fully understand the operation principles of the instrument. It also explains the mechanical construction of the instrument, as well as the electronics aspects. Additionally, the instrument control and automation was obtained by using a NI MyDAQ card with the corresponding virtual instrument (designed by the author). The instrument consists of a white LED lamp as a light source, a diffraction grating, and sample and detector compartments. The fluorescence excitation is given by a set of five differently-colored LEDs located to the sides of the sample compartment at 90° with respect to the detector. This work was supported in part by the Chancellor Grants 2013 program at USFQ.

The performance of the instrument was assessed by measuring the absorbance and fluorescence of riboflavinoids in multivitamin supplements. Acceptable results were obtained including c.a. 2% and 1% errors when operating under absorbance and fluorescence mode, respectively. Improvements in the acquisition and control are possible and present future challenges for other students.

Tabla de Contenido

1.	Introducción	15
1.1	Antecedentes	15
1.2	Reto actual de la espectroscopía de fluorescencia	16
1.3	Justificación del proyecto	18
1.4	Objetivos	18
1.4.1	Objetivos Generales	18
1.4.2	Objetivos Específicos	19
2.	Fundamentos Teóricos	20
2.1	Propiedades de la radiación electromagnética	20
2.1.1	Espectro Electromagnético	22
2.2	Fotoabsorción y Emisión	23
2.2.1	Transiciones electrónicas en moléculas orgánicas	23
2.2.2	Absorción de la radiación	25
2.2.2.1	Espectros de Absorción	27
2.2.3	Emisión por Fluorescencia y Fosforescencia	27
2.3	Características intrínsecas de la Emisión por Fluorescencia	28
2.3.1	Diagramas de Jablonski	28
2.3.2	Desplazamiento de Stokes	30
2.3.3	Regla de Kasha	31
2.3.4	Relación entre los espectros de excitación y de fluorescencia	31
2.3.5	Factores que afectan a la fluorescencia	32
2.3.5.1	Rendimiento cuántico	32
2.3.5.2	Estructura molecular	32
2.3.5.3	Disolvente y Temperatura	35
2.3.5.4	Desactivación - Fluorescence Quenching	36

2.4	Relación entre la concentración y la Intensidad de fluorescencia	36
2.5	Medición de señales de fluorescencia.....	37
2.6	Instrumentos de medición	38
2.6.1	Componentes de un espectrofluorímetro.....	39
2.6.1.1	Fuente de luz	39
2.6.1.2	Monocromador	40
2.6.1.3	Filtros ópticos.....	41
2.6.1.4	Compartimento de la muestra.....	42
2.6.1.5	Detector	42
2.6.1.6	Adquisición de Datos	44
2.7	LabVIEW (Travis & Kring, 2006).....	44
2.7.1	Filosofía de LabVIEW	45
2.7.1.1	Principales componentes de la aplicación.....	46
2.7.2	TOOLKITS DE LabVIEW	48
2.7.2.1	LabVIEW Enterprise Connectivity Toolset:	49
2.7.2.2	LabVIEW Signal Processing Toolset:	49
2.7.2.3	LabVIEW PID Control Toolset:.....	49
2.7.2.4	LabVIEW System Simulation and design Toolset:.....	50
2.7.2.5	LabVIEW Sound and Vibration Toolset:	50
2.7.2.6	LabVIEW Report Generation Toolset for Microsoft Office:	50
2.7.2.7	LabVIEW Order Analysis Toolset:	50
2.7.2.8	LabVIEW Supervisory Control Module:	50
2.7.3	Bondades y Desventajas.....	51
3.	Diseño y Construcción del Espectrofluorímetro	52
3.1	Fuente de iluminación de excitación.....	52
3.1.1	Sistema óptico seguido de la fuente de luz	54
3.2	Monocromador de excitación	55
3.2.1	Servomotor Hitec HS – 311	56
3.2.2	Red de Difracción.....	56

3.2.2.1	Obtención de la curva de calibración de la red empleada	58
3.3	Portamuestra	62
3.4	Sistema de LED en Lugar de Monocromador de Emisión.	62
3.5	Detector.....	63
3.6	Adquisición de datos: Tarjeta NI MyDaq (National, 2014)	64
3.6.1	Detalles técnicos.....	65
3.6.1.1	Dimensiones.....	65
3.6.1.2	Hardware interno.....	66
3.6.1.3	Especificaciones.....	66
3.6.1.4	Fuentes de poder.....	67
3.7	Ensamblado del equipo	68
4.	Electrónica y Control Automático del Espectrofluorímetro	71
4.1	Sistema Electrónico del instrumento	71
4.1.1	Fuente de alimentación de + 5 V, +6 V y -6 V DC.....	72
4.1.2	Microcontrolador.....	73
4.1.2.1	Microcontrolador PIC 16F870	75
4.2	Todo el código realizado y compilado, se encuentra en el ANEXO IV	78
4.2.1	Sistema de amplificación del detector.....	78
4.2.1.1	Amplificador Operacional LM741 (Nave, 2005).....	78
4.2.1.2	Amplificador inversor	79
4.2.1.3	Amplificador no inversor	80
4.2.1.4	Seguidor de voltaje.....	81
4.3	Requerimientos para el desarrollo del instrumento virtual	81
4.3.1	Programa LabVIEW 2012.....	82
4.3.2	Sistemas de Adquisición de Datos	82
4.4	Creación del instrumento virtual (VI).....	82
4.4.1	Control de la red de difracción y LED	82
4.4.2	Detector	87

4.4.3 Almacenamiento de los datos.....	88
5. Puesta en Marcha del Espectrofluorímetro	92
5.1 Análisis de Riboflavina – Vitamina B2	92
5.1.1 Procedimiento para la Medición de Absorción y Fluorescencia de la Riboflavina	94
5.1.1.1 Preparación de las soluciones patrón de riboflavina	94
5.1.1.2 Preparación de las soluciones de los medicamentos	95
5.1.1.3 Medición de Absorción	96
5.1.1.4 Medición de Fluorescencia.....	96
5.1.2 Resultados de las mediciones.....	96
5.1.2.1 Modo Absorción - Absorbancia	97
5.1.2.1.1 Complejo B – Ariston.....	100
5.1.2.1.2 Jarabe Fortic-Hem.....	101
5.1.2.2 Modo Fluorescencia	102
5.1.2.2.1 Complejo B – Ariston.....	104
5.1.2.2.2 Jarabe Fortic – Hem	105
6. Conclusiones	108
7. Referencias Bibliográficas	110
8. ANEXOS	114
8.1 ANEXO I.....	114
8.2 ANEXO II.....	118
8.3 ANEXO III.....	121
8.4 ANEXO IV	122
8.5 ANEXO V.....	128

Índice de Tablas

Tabla 2-1: Efecto en la intensidad de fluorescencia de algunos sustituyentes(Ramos-Martos, 1999).....	33
Tabla 3-1: Características de la Linterna empleada como fuente de iluminación.....	53
Tabla 3-2: Características físicas y eléctricas del servomotor Hitec HS – 311.....	57
Tabla 3-3: Posiciones angulares, $\square\square$ de la lámpara de mercurio con el espectrogoniómetro empleado(Solá & Fernández, 2006).....	60
Tabla 3-4: Ángulos de difracción y longitudes de onda de la red empleando la luz LED blanca.....	61
Tabla 3-5: Principales características del fotodiodo de silicio modelo HS1010CE.....	64
Tabla 4-1: Distribución de los 28 pines en el PIC 16F870	76
Tabla 5-1: Voltajes del blanco y las soluciones de riboflavina en modo absorción.....	98
Tabla 5-2: Valores de Transmitancia (T) y Absorbancia (A) de las soluciones de 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm y 8 ppm.....	98
Tabla 5-3: Valores de Transmitancia (T) y Absorbancia (A) de las soluciones de 10 ppm, 15 ppm y 20 ppm.....	99
Tabla 5-4: Valores de absorbancia para cada concentración analizada	99
Tabla 5-5: Voltajes de la solución de Complejo B – Ariston.....	100
Tabla 5-6: Valores de Transmitancia (T) y Absorbancia (A) del medicamento Complejo B – Ariston	100
Tabla 5-7: Voltajes de la solución del Jarabe Fortic – Hem	101
Tabla 5-8: Valores de Transmitancia (T) y Absorbancia (A) del Jarabe Fortic – Hem	101
Tabla 5-9: Concentraciones de riboflavina en los medicamentos analizados – modo Absorción	102

Tabla 5-10: Voltajes de salida de cada LED de excitación para cada muestra	103
Tabla 5-11: Intensidad de fluorescencia generada por las soluciones estándar de Riboflavina Empleado la LED azul.....	103
Tabla 5-12: Intensidad de fluorescencia de las muestras de Complejo B con la LED azul ...	105
Tabla 5-13: Concentración de riboflavina en el Complejo B – Ariston	105
Tabla 5-14: Intensidad de fluorescencia de las muestras de Jarabe con la led azul	106
Tabla 5-15: Concentración de riboflavina en el Jarabe Fortic-Hem	106
Tabla 5-16: Porcentaje de error obtenido en los dos análisis: Absorción - Fluorescencia.....	106

Índice de Figuras

Figura 2-1: Descripción sinusoidal de la onda: onda polarizada que se propaga en una sola dirección. El campo magnético oscila en un plano perpendicular al campo eléctrico(Gende, 2006).....	21
Figura 2-2: Regiones del espectro electromagnético.(Fernández, 2011)	22
Figura 2-3: Rueda de colores en la región visible del espectro electromagnético.	23
Figura 2-4: Distribución energética de los orbitales moleculares	24
Figura 2-5: Distinción entre el estado singlete y triplete.....	25
Figura 2-6: Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente de concentración, c. La longitud de trayecto que atraviesa el rayo en la solución absorbente es b.	26
Figura 2-7: Diagrama de Jablonski.(Sauer, Hofkens, & Enderlein, 2010).....	28
Figura 2-8: Espectro de emisión y absorción que incluye el desplazamiento de Stokes.(Al-Rawashdeh, 2012)	31
Figura 2-9: Espectros de absorción y emisión de la quinina Se debe considerar que el espectro de emisión no se puede presentar correctamente en longitud y número de onda a la vez.	32
Figura 2-10: Fluoróforos que presentan fluorescencia.....	35
Figura 2-11: Señales de fluorescencia en estado estacionario. La gráfica de la izquierda, representa la intensidad vs. Tiempo. La gráfica de la derecha corresponde al espectro de emisión: Intensidad de fluorescencia vs. Longitud de onda.....	38
Figura 2-12: Señales de fluorescencia resueltas en el tiempo	38
Figura 2-13: Diagrama de bloques de instrumentos de medición de fluorescencia	39
Figura 2-14: Fuentes de luz a) Lámpara de arco de xenón de alta presión (Hamamatsu) b) Diodos emisores de luz c) Diodos láser.....	40
Figura 2-15: Esquema de un tubo fotomultiplicador (PMT).....	43

Figura 2-16: Panel Frontal de LabVIEW	46
Figura 2-17: Panel de Código de LabVIEW	47
Figura 2-18: Paletas de control y de funciones en LabVIEW	48
Figura 2-19: Paletas de control y de funciones en LabVIEW	48
Figura 3-1: Diagrama esquemático del espectrofluorímetro desarrollado.	52
Figura 3-2: Linterna LED de luz blanca marca, FEIT ELECTRIC.....	54
Figura 3-3: Lente condensador Abbe	54
Figura 3-4: Montaje: linterna – lente condensador – lente biconvexo – rendija estrecha 2.5 mm	55
Figura 3-5: Red de difracción de 1000 líneas/mm sobre el servomotor Hitec HS – 311	56
Figura 3-6: Servomotor Hitec HS – 311.....	56
Figura 3-7: Red de difracción empleada.....	57
Figura 3-8: Efecto producido la red de difracción al incidir sobre ella una haz de luz	58
Figura 3-9: Esquema de las partes del espectrogoniómetro utilizado	58
Figura 3-10: Medición de las líneas espectrales de la lámpara de mercurio	59
Figura 3-11: Curva de calibración de la red de difracción de 1000 líneas/mm.....	60
Figura 3-12: Portamuestra. a) Vista superior del portamuestra construido con 4 orificios en las 4 caras de éste, b) Celda de cuarzo usada para los análisis.....	63
Figura 3-13: Fotodiodo de silicio modelo HS1010CE	63
Figura 3-14: Vista superior y lateral del compartimento de la muestra	64
Figura 3-15: NI MyDAQ.....	65
Figura 3-16: Dimensiones de la tarjeta NI MyDAQ. Fuente: (National, 2014).....	66
Figura 3-17: Vista lateral de la tarjeta NI MyDAQ. Fuente: (National, 2014)	67
Figura 3-18: Vista superior del espectrofluorímetro desarrollado.....	69
Figura 3-19: Vista lateral del espectrofluorímetro desarrollado.....	69

Figura 4-1: Diagrama esquemático de la parte electrónica del instrumento.	71
Figura 4-2: Circuito electrónico de la fuente de alimentación de +5 V, +6 V y -6 V DC.	72
Figura 4-3: Esquema del microcontrolador empleado, PIC 16F870	75
Figura 4-4: Circuito oscilador externo conectado al PIC16F870. Entradas y salidas digitales del puerto B a la DAQ. Salidas digitales del puerto C al servomotor y a las LED	76
Figura 4-5: Diagrama del circuito del sistema amplificador para el fotodiodo.....	78
Figura 4-6: Aspecto real y símbolo de un amplificador operacional LM741	79
Figura 4-7: Circuito amplificador inversor.....	80
Figura 4-8: Circuito amplificador: no inversor - seguidor de tensión	81
Figura 4-9: Programa en LabVIEW: a) Panel Frontal, b) Diagrama de Bloques.....	83
Figura 4-10: Diagrama de bloques de la sub-VI usada para el control de las posiciones del servomotor Empleado en absorción	83
Figura 4-11: Diagrama de bloques de la sub-VI usada para el control de las 5 LED	86
Figura 4-12: Panel frontal y datos booleanos del diagrama de bloques de la sub-VI	86
Figura 4-13: Diagrama de bloques y panel frontal para la detección de la señal y lectura del sensor	88
Figura 4-14: Diagrama de bloques de la sub-VI: guardar los datos voltajes del sensor (fotodiodo).....	89
Figura 4-15: Función <i>Write to Spreadsheet file.VI</i>	89
Figura 4-16: Fragmento - Presentación de los datos tabulados en una hoja de cálculo de Excel90	
Figura 4-17: Diagrama de bloque para detener el programa y su correspondiente ícono en el Panel frontal.....	91
Figura 5-1: Puesta en marcha del espectrofluorímetro completo	92
Figura 5-2: Panel frontal del software del equipo durante las mediciones de riboflavina	93

Figura 5-3: Estructura química de la Riboflavina	93
Figura 5-4: Composición química del medicamento ComplejoB – Ariston	95
Figura 5-5: Jarabe Fortic -Hem	95
Figura 5-6: Curva de calibración de riboflavina – modo Absorción	99
Figura 5-7: Curva de calibración de Riboflavina – modo Fluorescencia. Intensidad de Fluorescencia vs. Concentración	104
Figura 5-8: Intensidad de Fluorescencia de las soluciones de los medicamentos (8ppm)	105

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Durante las últimas décadas, la espectrometría de fluorescencia molecular (o simplemente espectrofluorimetría) se ha convertido en uno de los métodos espectroscópicos ópticos más usados en mediciones analíticas y en investigación científica. (Martínez & Moctezuma, 2006)

El espectrofluorímetro es un instrumento que realiza la medida de la absorción de energía por el método de fluorescencia mediante el uso de un doble monocromador. (Bowman, 1974) El método del doble monocromador es el método considerado como referencia para determinar las propiedades colorimétricas de los materiales fluorescentes. En él, la medida se realiza con dos monocromadores por separado, uno encargado de la selección de la longitud de onda responsable de la excitación de la molécula fluorescente y el otro, encargado de la selección de la longitud de onda de emisión de la molécula para su posterior detección. El primer monocromador (monocromador de excitación) se encarga de seleccionar la longitud de onda adecuada para iluminar la muestra de manera monocromática aunque el espectro del iluminante es policromático. El segundo monocromador es del tipo detector o emisor, analizador de la radiación de salida. (Bowman, 1974; Zwinkels, Gignac, Nevins, Powell, & Bewsher, 1997). Esta luz pasará a través de filtros de interferencia estrechos y a continuación por el sistema detector.

La importancia de métodos fluorimétricos en química analítica se ha incrementado en los últimos años debido a que presenta principales ventajas sobre los de absorción (Hercules, 1960; Wahab, 2007): 1) sensibilidad entre 1 y 3 órdenes de magnitud mayor a cambios en el entorno; 2) bajos límites de detección del orden de zeptomoles (10^{-21} moles); 3) mayor intervalo de respuesta lineal; 4) doble selección de longitudes de onda (excitación/emisión) que conlleva a menos interferencias; 5) insensibilidad a turbidez; y 6) menor ruido de fondo a concentraciones bajas de muestras. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican menos que los de absorción ya que no todos los sistemas químicos son capaces de fluorescer y además el equipamiento necesario es más costoso que el empleado en espectroscopia de

absorción. Por tal motivo, en el presente proyecto de tesis se ha desarrollado el diseño, la construcción y automatización de un espectrofluorímetro como instrumento analítico de bajo costo, bajo mantenimiento y robusto para su posterior uso en el laboratorio de química, a partir de la determinación analítica de riboflavina (vitamina B2) en multivitamínicos.

A temperatura ambiente, la riboflavina puede ser promovida a varios niveles de vibración excitados. La transición está en la energía correspondiente al UV y parte del espectro azul (350-450 nm). La existencia de esta transición corresponde a la presencia de una banda de absorción en la región azul del espectro visible, la cual puede ser utilizada para cuantificar la concentración de riboflavina mediante la espectroscopía de absorción molecular.

El proceso de absorción se produce en aproximadamente 10^{-15} segundos (femtosegundos). En el caso de sustancias orgánicas como la riboflavina, la absorción es seguida por la relajación de la energía a través de un proceso de emisión espontánea (fluorescencia) en el rango de las decenas a centenas de nanosegundos. Las soluciones de riboflavina presentan una fluorescencia amarillo – verde con una absorción máxima en 565 nm en el rango de pH ácido. El espectro de fluorescencia está corrido hacia longitudes de onda más largas que el de absorción. Esta propiedad se aprovecha para la determinación cuantitativa de riboflavina. (Koziol, 1966)

1.2 Reto actual de la espectroscopía de fluorescencia

La espectrofluorimetría está relacionada con la medición de espectros de emisión producidos por muestras fluorescentes. En investigación científica, la espectroscopía de fluorescencia presenta las siguientes aplicaciones: (Gore, Bashford, & Harris, 2000; Valeur & Berberan-Santos, 2012)

- ***Análisis cualitativo y estructural***

Identificación de sustancias con espectros de emisión muy característicos como compuestos heterocíclicos e hidrocarburos aromáticos.

Identificación de iones inorgánicos: con fluorescencia nativa como sales de uranio y tierras raras y no fluorescentes por formación de quelatos fluorescentes.

- ***Análisis cuantitativo***

Determinación de trazas de iones inorgánicos y compuestos orgánicos y biológicos con límites de detección de ppb.

- ***Auxiliar en otras técnicas***

Uso de indicadores fluorescentes en volumetrías y detección fluorescente en cromatografía.

Los recientes avances en la utilización de instrumentación analítica de campo han permitido análisis *in-situ* con equipos portátiles de una forma rápida, fiable y económica. Ejemplo de ello, es la medida de fluorescencia inducida por láser (LIF) en el monitoreo de la calidad bacteriana del agua mediante ensayos cromogénicos y fluorogénicos para la detección y rastreo de indicadores patógenos a escala sinóptica, ofreciendo fluoróforos y cromóforos con alta eficiencia cuántica acoplados mediante sustratos o impresos en filmes poliméricos. Se emplean sondas inoculadas que poseen fluoróforos con alta eficiencia cuántica y que sirven como centinelas, una vez estimulados, están disponibles para ser introducidos a lo largo de una cuenca o depósito proporcionando de forma eficaz datos sobre la detección de patógenos en el agua y en los suelos. (Anderson, Fischer, Smith, Webb, & Dennis, 2003).

La espectroscopía de fluorescencia, ha permitido medir parámetros de calidad de productos lácteos consumidos en la dieta diaria durante su consumo y almacenamiento. (Andersen & Mortensen, 2008). En dicho estudio se evalúan cambios inducidos por el procesamiento de productos lácteos y oxidación inducida por la luz. Además, ofrece perspectivas de esta técnica analítica en relación con la investigación futura, desarrollo y la aplicación dentro de la industria lechera.

El uso de inducción de fluorescencia de la clorofila en plantas verdes (primarias, generales, iniciales, de adaptación) ha permitido estudiar su estado fisiológico y de salud a factores de estrés. (Nesterenko, Tikhomirov, & Shikhov, 2006)

Actualmente, la espectroscopia de fluorescencia, es ampliamente utilizada para fines biomédicos y análisis clínicos a partir del estudio de estructuras celulares y de tejidos, en la función biológica y la detección precoz del cáncer. El método de ***fluorescencia de hibridación in situ*** se ha convertido en una poderosa técnica para la investigación biomédica. Este método se basa en la detección y localización de secuencias específicas de ADN o ARN

dentro de las células o tejidos, mediante una sonda que se coloca directamente sobre la muestra, material genético como cromosomas, secciones histológicas bebidas en parafina, que previamente han sido tratadas con una enzima que facilita la introducción de la sonda al ADN nuclear, previamente desnaturalizado por el calor. La sonda ligada a una sustancia fluorescente, se agrega para la hibridación, la cual sucede si está presente el ADN complementario de la sonda. La emisión fluorescente se observa mediante microscopía de fluorescencia. (Vo-Dinh, 2014).

Por todos los estudios expuestos brevemente, se recalca la importancia de la espectroscopia de fluorescencia y el creciente campo de investigación que tiene a futuro.

1.3 Justificación del proyecto

La espectrometría de fluorescencia o espectrofluorimetría es uno de los métodos espectroscópicos más usados en mediciones analíticas y en investigación científica al contar con un alto nivel de sensibilidad y al poder realizarse en un amplio rango dinámico. El Departamento de Ingeniería Química de la USFQ, no dispone de este tipo de instrumento; por tal motivo, resulta fascinante el diseño y la construcción mecánica y de control de un espectrofluorímetro a partir de una instrumentación y materiales accesibles por un costo no muy elevado. Una vez construido y automatizado el instrumento, se lo empleará en el análisis de riboflavina en multivitamínicos que tienen una fluorescencia en la región de la luz visible. Con este proyecto se busca la comprensión teórica y práctica de esta técnica analítica y la posterior implementación del instrumento a desarrollarse en múltiples proyectos a nivel de laboratorio y del Departamento de Ingeniería Química en general.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivos Generales

El objetivo principal del presente proyecto e investigación es diseñar, construir y automatizar un espectrofluorímetro para el análisis de moléculas fluorescentes presentes en multivitamínicos y su posterior uso a nivel del Departamento de Ingeniería Química de la USFQ.

1.4.2 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos son:

- Presentar los pasos preliminares llevados a cabo para el diseño y construcción de un espectrofluorímetro analítico a partir de materiales accesibles y de bajo costo.
- Construir un circuito electrónico capaz de adquirir y procesar la señal proveniente del instrumento.
- Ejercer control de todo el sistema del instrumento, hacer la adquisición de datos y la presentación de los resultados en forma gráfica y numérica, mediante instrumentos virtuales desarrollados con el lenguaje de programación gráfica LabVIEW.
- Configurar y calibrar el espectrofluorímetro desarrollado para su posterior uso en el laboratorio.
- Análisis de sustancias fluorescentes – riboflavina – presentes en multivitamínicos.
- Cuantificación de estas sustancias a partir de curvas de calibración y su comparación con el de una solución estándar de riboflavina.

2. Fundamentos Teóricos

El creciente campo de aplicación en mediciones analíticas e investigación científica durante los últimos 20 años, han hecho de la espectroscopía de fluorescencia o espectrofluorimetría uno de los métodos espectroscópicos más usados, gracias a la amplia disponibilidad de instrumentación, la simplicidad del procedimiento, selectividad, sensibilidad, precisión, exactitud y velocidad de la técnica. Sin embargo, los métodos de fluorescencia tienen menos aplicaciones que los métodos de absorción, dado al número bastante limitado de sistemas químicos que presentan fluorescencia apreciable y las interferencias ambientales a las que es expuesto este método comparado con los métodos de absorción. (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2013)

Para entender los principios teóricos básicos de los métodos espectroquímicos y la espectroscopía de fluorescencia que incluye transiciones electrónicas, se requiere el conocimiento sobre propiedades de la radiación electromagnética, mecánica cuántica y orbitales atómicos, que serán expuestos brevemente.

2.1 Propiedades de la radiación electromagnética

Una de las formas de energía electromagnética, es la luz correspondiente a las regiones del ultravioleta y el visible (UV/Visible). Al ser una forma de energía, esta se describe como una onda que oscila de manera perpendicular estable en un campo eléctrico y magnético. En base a la Figura 2-1, se puede definir el periodo, p , de radiación como el tiempo necesario para pasar de máximos o mínimos sucesivos por un punto fijo en el espacio. La amplitud, A , como la máxima longitud respecto a la posición de equilibrio que alcanza la onda en su desplazamiento. La frecuencia, ν , corresponde al número de oscilaciones del vector campo eléctrico por unidad de tiempo. Es una cantidad inversa al periodo y equivale a $1/p$. La longitud de onda, λ , es la distancia lineal entre dos puntos equivalentes de ondas sucesivas. La velocidad de propagación, v , corresponde a la distancia que recorre la onda en una unidad de tiempo. Depende del medio y la frecuencia, por lo que en el caso de la velocidad de propagación de la luz en el vacío, se representa con la letra c . (LLC, 2005; Skoog et al., 2013)

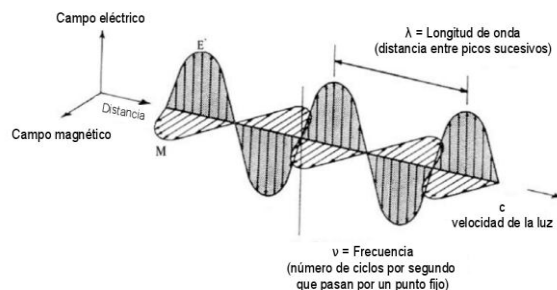


Figura 2-1: Descripción sinusoidal de la onda: onda polarizada que se propaga en una sola dirección. El campo magnético oscila en un plano perpendicular al campo eléctrico (Gende, 2006).

La teoría ondulatoria detalla como la energía electromagnética viaja con forma sinusoidal a la velocidad de la luz de acuerdo a la ecuación

$$c = v\lambda \quad \text{Ec. 2-1}$$

donde, c : velocidad de la luz (2.99792×10^8), λ : longitud de onda (nm), v : número de onda (cm^{-1}).

Estudios sobre las propiedades de la luz desarrolladas por Newton, seguidas por Einstein y la teoría corpuscular de la luz, el origen de la teoría cuántica de Planck, la teoría electromagnética, Huygens y la teoría ondulatoria, De Broglie y la teoría mecánico ondulatoria; han dado lugar al conocimiento y confirmación de que las ondas provenientes de la radiación electromagnética se examinan como un flujo de partículas discretas, o paquetes ondulatorios, de energía denominados fotones, cuya energía es proporcional a la frecuencia de la radiación. Permitiendo explicar fenómenos relacionados con absorción y emisión de la energía radiante. A partir de esta teoría se considera que una especie química, átomo o molécula, pueden absorber energía en forma de fotones o cuantos y es posible relacionar la energía de un fotón con su longitud de onda, frecuencia y número de onda, mediante la ecuación:

$$E = hv = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu} \quad \text{Ec. 2-2}$$

Donde: h : constante de Planck (6.63×10^{-34} J s)

ν : Frecuencia de la radiación (Hz o s^{-1})

c : Velocidad de la luz (2.99792×10^8)

λ : Longitud de onda (nm)

$\bar{\nu}$: Número de onda (cm^{-1})

De acuerdo con la Ec. 2-2, la energía de excitación debida a la absorción es inversamente proporcional a la longitud de onda y directamente proporcional a la potencia de un haz de radiación. Dicha absorción de energía, da lugar a un aumento de energía interna del sistema en sus distintas formas: electrónicas, vibracionales y rotacionales, que se manifiestan en un cambio energético del electrón entre sus distintos niveles energéticos.

2.1.1 Espectro Electromagnético

El rango de longitudes de ondas de todas las posibles radiaciones electromagnéticas está contenido en el espectro electromagnético. La energía electromagnética en una longitud de onda particular λ (en el vacío) tiene asociada una energía fotónica, E , y una frecuencia, f . Así, el espectro electromagnético puede expresarse en términos de cualquiera de estas tres variables, que están relacionadas mediante la Ec. 2-2. Las regiones del espectro electromagnético corresponden a: ondas de radio, microondas, infrarroja, región visible, que percibimos como luz, rayos ultravioleta, rayos-X y rayos gamma; cada región con su respectivo conjunto de longitudes de onda. Como se aprecia en la Figura 2-2, ondas electrónicas de alta frecuencia tienen una longitud de onda corta y alta energía; ondas electromagnéticas de baja frecuencia tienen una longitud de onda larga y baja energía. (Pérez, 2014)

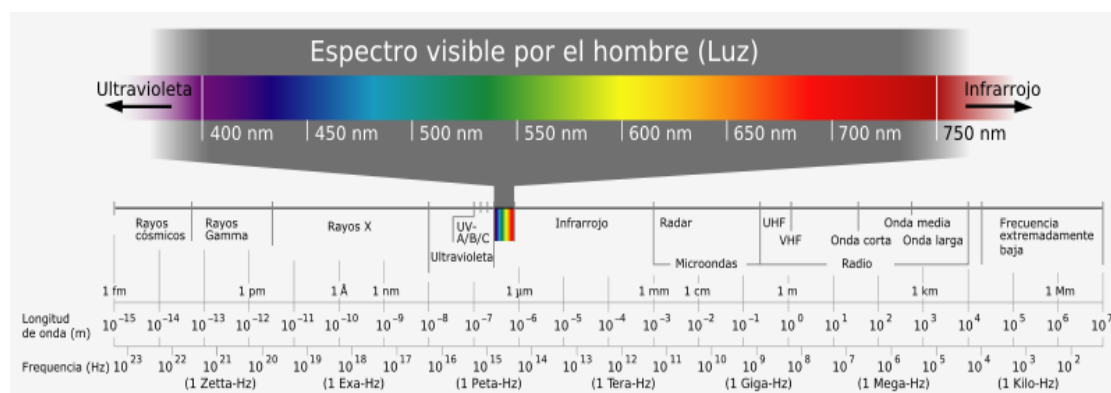


Figura 2-2: Regiones del espectro electromagnético.(Fernández, 2011)

La teoría corpuscular de Newton, señala que cuando un haz de luz incide sobre un material refractante, un prisma con un ángulo, una parte es reflejada y otra pasa a través de

esta, exponiendo distintas bandas de colores. Este fenómeno, se debe a que la luz está dispuesta por partículas o corpúsculos de diferentes colores y la diferencia en los colores corresponde a la diferencia de velocidades de cada uno de ellos. Esta teoría ha permitido que los métodos espectroscópicos de absorción y emisión de energía, que en su mayoría, trabajan en la región UV-visible, que va desde los 380 nm a 750 nm; sea posible predecir qué longitudes de onda es probable que absorba una sustancia coloreada. (Poole & Kalnenieks, 2000)



Figura 2-3: Rueda de colores en la región visible del espectro electromagnético.

Cuando la luz blanca pasa o se refleja a través de una sustancia de color, una parte característica de esta mezcla de longitudes de onda, diferentes colores, se absorbe. La luz restante asumirá entonces el color complementario a la longitud de onda absorbida. Esta relación se demuestra por la rueda de colores mostrada en Figura 2-3. Los colores complementarios son diametralmente opuestos entre sí. Esto explica porque si una solución absorbe luz entre 450 y 495 nm (azul), transmitirá todos los colores y aparecerá el color naranja al ojo, ya que el naranja es el color complementario del azul (ver Figura 2-3). Si una solución de color rojo es expuesta a una luz roja, esta luz roja será transmitida porque esta solución no puede absorber dicha luz. Sin embargo, si una luz verde se hace incidir sobre la misma solución de color rojo, no habrá luz transmitida, puesto que la solución absorberá toda la luz excepto la roja.

2.2 Fotoabsorción y Emisión

2.2.1 Transiciones electrónicas en moléculas orgánicas

Los compuestos químicos denominados *cromóforos* porque absorben luz debido a la presencia de enlaces insaturados libres o electrones no apareados; presentan bandas de

absorción en las regiones ultravioleta y visible gracias a las transiciones electrónicas de los electrones en los orbitales moleculares en la capa de valencia. A partir de la solución de la ecuación de onda por *Schrödinger* en 1926, como un conjunto de funciones de onda, llamado orbitales y sus correspondientes energías.

Estos orbitales son: *orbitales* σ y σ^* , enlazante y anti-enlazante respectivamente, localizados a lo largo del eje de unión entre dos átomos; *orbitales* π y π^* colaterales al eje de enlace por ser enlaces múltiples. Su carácter enlazante y anti-enlazante es menor que el de los orbitales σ ; y los *orbitales* n , de carácter no enlazante, corresponden a pares de electrones libres de los hetero átomos (O, N, F). (Valeur & Berberan-Santos, 2012) En la Figura 2-4 se representan esquemáticamente la distribución energética de los orbitales moleculares tratados. La energía asociada a las posibles transiciones, está dado en el siguiente orden

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

Las transiciones $n \rightarrow \pi$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ presentes en grupos cromóforos, son las empleadas en espectroscopia UV- Visible al ser de baja energía de transición, entre 200 y 700 nm.

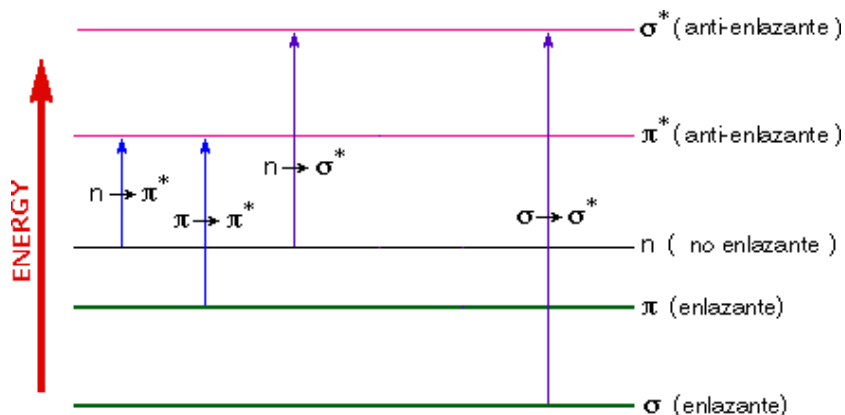


Figura 2-4: Distribución energética de los orbitales moleculares

Un orbital atómico está descrito por un conjunto de 4 números cuánticos que tiene todo átomo: n = número principal, l = momento angular/azimutal, m_l = número magnético y m_s = número magnético de spin del electrón que corresponde a $+1/2$ y $-1/2$. De acuerdo al Principio de Exclusión de Paulli: dos electrones no pueden tener al mismo tiempo, el mismo conjunto de 4 números cuánticos. Esto explica porque los electrones se distribuyen en capas alrededor de un núcleo y que por tanto los átomos con más electrones ocupen un tamaño

mayor. El spin total está dado por $S = \sum m_s$ y la multiplicidad (M) está dada como $M = 2S + 1 = 1, 2, 3, \dots$ (Singlete, doblete, triplete, respectivamente) como se muestra en la Figura 2-5. (De Paula & De Paula, 2007)

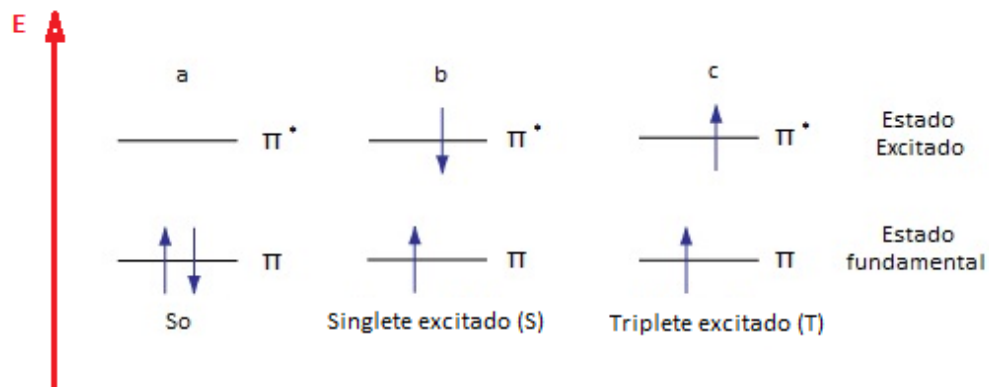


Figura 2-5: Distinción entre el estado singlete y triplete

En la espectroscopía de absorción y fluorescencia, dos importantes tipos de orbitales son considerados: el orbital ocupado de más alta energía, HOMO, y el orbital desocupado de más baja energía, LUMO.

2.2.2 Absorción de la radiación

De lo anteriormente expuesto, la radiación en la región UV- visible, tiene la suficiente energía para inducir transiciones entre los estados electrónicos en especies moleculares. Cuando un estrecho haz de una fuente de radiación monocromática, P_o , incide sobre una solución de concentración uniforme, c (mol/L), en un contenedor de longitud finita, b (cm), como se muestra en la Figura 2-6, se puede apreciar una subsecuente reducción en la potencia radiante transmitida por la solución relativa a la potencia incidente.

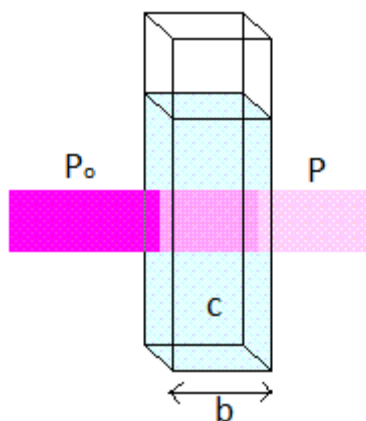


Figura 2-6: Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente de concentración, c .
La longitud de trayecto que atraviesa el rayo en la solución absorbente es b .

La eficiencia de la absorción de la luz en una longitud de onda por un medio absorbente está caracterizado por la absorbancia, A , o la transmitancia, T , definida como

$$A(\lambda) = \log \frac{P_0}{P} = -\log T(\lambda) \quad \text{Ec. 2.3}$$

$$T(\lambda) = \frac{P}{P_0} \quad \text{Ec. 2.4}$$

Donde P_0 y P corresponden a la energía radiante incidente y transmitida del medio absorbente respectivamente.

En muchos casos, la absorbancia de una muestra sigue la Ley de Beer, dada por la Ec. 2.5, que muestra que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente, c y la longitud del medio, b .

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad \text{Ec. 2.5}$$

Donde ε es el coeficiente de absortividad molar, el cual es constante para una particular sustancia en una particular longitud de onda, sus unidades son $L / \text{mol cm}$.

La Ec. 2.5 se puede emplear para conocer la concentración de una muestra mediante una *curva de calibración*: si la absorbancia medida de una serie de soluciones de concentración conocidas son graficadas contra sus correspondientes concentraciones, la gráfica de Absorbancia vs. Concentración debe ser lineal si se cumple la Ley de Beer – Lambert, por lo

tanto, al medir la absorbancia de una muestra de concentración desconocida se puede conocer su concentración. (Skoog et al., 2013)

2.2.2.1 Espectros de Absorción

Un espectro de absorción es una representación gráfica de la variación de la cantidad de luz absorbida (ϵ) por una sustancia química a diferentes valores de longitudes de onda (λ), el cual es específico para cada cromóforo, dependiendo de su estructura química.

A partir del espectro de absorción de una especie, se puede obtener el valor de la longitud de onda máxima (λ_{max}) a la cual el cromóforo presenta la mayor absorbancia. Este valor se empleará para hacer determinaciones cuantitativas y cualitativas del compuesto.

2.2.3 Emisión por Fluorescencia y Fosforescencia

La fotoluminiscencia corresponde a toda emisión de radiación electromagnética de cualquier sustancia que ocurre desde estados electrónicos excitados. Dependiendo de la naturaleza de los estados excitados, los fenómenos fotoluminiscentes se dividen en tres categorías: fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia.

En la Figura 2-5, se aprecian dos de estas transiciones electrónicas. a) Un par de electrones que ocupan el mismo estado electrónico fundamental y tienen spines opuestos, se dice que están en un estado de spin singlete, S_0 . b) El fenómeno de fluorescencia se da cuando un fotón de energía procedente de radiación electromagnética, ultravioleta o visible excita a un electrón desde su estado electrónico fundamental o basal a un estado electrónico de mayor energía, llamado singlete excitado, donde el electrón en el orbital excitado tiene distinto spin respecto al electrón en el estado basal. La especie excitada se relaja a su estado fundamental y emite su exceso de energía como fotones, este proceso produce la emisión de fluorescencia, que ocurre rápidamente en tiempos del orden $10^{-7} - 10^{-9}$ s. El tiempo de vida de la especie química capaz de fluorescer, fluoróforo, corresponde al tiempo promedio entre pasar desde el estado excitado al estado basal. c) En algunos casos, un electrón en un estado singlete excitado es transformado a un estado triplete excitado, ya que tiene el mismo spin del electrón en el estado basal, el regreso del electrón al estado basal produce emisión de fosforescencia con tiempos de vida de milisegundos hasta segundos (10^{-3} a 10^0 s). (Gore et al., 2000; Lakowicz & Geddes, 2006; Skoog et al., 2013)

2.3 Características intrínsecas de la Emisión por Fluorescencia

El fenómeno de fluorescencia presenta ciertas características generales con excepciones frecuentes. Una vez que una sustancia absorbe radiación electromagnética de forma rápida ($\approx 10^{-15}$ s), puede originarse emisión fotoluminiscente, gracias a las transiciones electrónicas que se muestran en la Figura 2-4. De todas ellas, las que tienen lugar entre los orbitales π enlazantes y antienlazantes ($\pi \rightarrow \pi^*$) son las de mayor interés en los procesos luminiscentes. A continuación, se ampliarán algunos conceptos relacionados con los procesos de absorción de fotones, conversión interna, fluorescencia, cruzamiento entre sistemas, fosforescencia, fluorescencia retardada y transiciones triplete-triplete, todas ellas aplicables a las mencionadas transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$.

2.3.1 Diagramas de Jablonski

Los procesos que envuelven la creación de un estado electrónico excitado singlete por absorción, la subsecuente emisión de fluorescencia y los mecanismos de desactivación radiativos y no radiativos; se pueden ilustrar por medio de un diagrama de Jablonski como se muestra en la Figura 2-7.

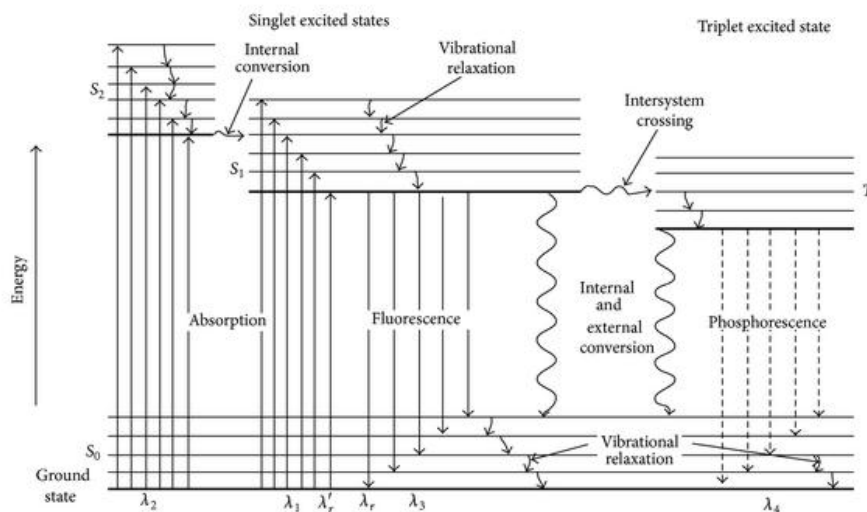


Figura 2-7: Diagrama de Jablonski. (Sauer, Hofkens, & Enderlein, 2010)

En el diagrama de Jablonski, a cada estado electrónico están asociados estados electrónicos singletes, denotados S_0 (estado fundamental), S_1 , S_2 , ...; estados tripletes, T_1 , T_2 , ... y niveles vibracionales. Las flechas verticales corresponden al inicio del proceso de absorción desde el 0, el nivel vibracional más bajo del nivel de energía de S_0 , porque la

mayoría de las moléculas están en este nivel a temperatura ambiente. La absorción de un fotón puede llevar a una molécula a uno de los niveles vibracionales de S_1 ; S_2 ;... o a múltiples estados excitados de energía, dependiendo de la longitud de onda y la fuente de luz externa. La molécula que es inestable en una configuración de alta energía, adopta un estado excitado de baja energía que es semi estable. - el tiempo que está en este estado excitado es muy corto entre ($10^{-15} - 10^{-9}$ s)-. Después, la molécula en este estado semi estable puede hacer una de dos cosas: emitir el fotón del mismo nivel vibracional al cual fue inicialmente excitado, o sufrir cambios en el nivel vibracional antes de la emisión. Los procesos de emisión radiativa o no radiativa que siga, dependen principalmente del ambiente de la molécula. Las posibles transiciones no radiativas que pueden darse son: (Lakowicz & Geddes, 2006; Valeur & Berberan-Santos, 2012):

- **Relajación vibracional:** En solución, el exceso de energía vibracional puede ser efectivamente transferida al disolvente durante las colisiones de la molécula excitada con las moléculas de disolvente circundantes.
- **Conversión interna:** Cuando dos estados electrónicos de la misma multiplicidad de espín están lo suficientemente cercanos, se puede dar un solapamiento de los niveles de energía vibracionales, y por ende la molécula puede pasar a un estado electrónico de más baja energía sin emisión de radiación (S_2 a S_1). Desde S_1 , la conversión interna a S_0 es posible, pero es menos eficiente que la conversión de S_2 a S_1 , debido a la diferencia de energía mucho más grande entre S_1 y S_0 .

Los procesos de conversión interna y de relajación vibracional transcurren en un tiempo muy pequeño (del orden de 10^{-13} a 10^{-11} s.)

- **Cruzamiento entre sistemas:** Un molécula en un estado excitado puede sufrir cambio de spin en un electrón, pasando de un estado singlete a un triplete, esta probabilidad aumenta si los niveles vibracionales se solapan.

Las posibles transiciones radiativas que se pueden dar son:

- **Fluorescencia:** Ocurre inmediatamente después de la excitación. (entre 10^{-7} a 10^{-9} s). De lo tratado en la sección 2.2.3, si la especie que se encuentra en un estado excitado S_1 , regresa al estado fundamental S_0 , el exceso de energía es liberado y emitido como

luz. La luz emitida es a una energía más baja y por ende es a una longitud de onda más larga que la luz absorbida, debido a la disipación de energía durante el excitado y transitorio tiempo de vida. Así, en relación con la **¡Error! No se encuentra el origen de a referencia.**, la excitación por radiación a la longitud de onda λ_2 normalmente dará lugar a fluorescencia en una longitud de onda λ_3 , excluyendo la transición que resultaría entre S_2 y S_0 . El fluoróforo, puede ir indefinidamente al proceso de fluorescencia siempre que exista una fuente de excitación, por lo que puede generar una señal de múltiples tiempos. Esta propiedad hace que la fluorescencia sea una técnica muy sensible. (Gore et al., 2000; Lakowicz & Geddes, 2006)

- **Fosforescencia:** Del cruzamiento entre sistemas, si se adquiere un estado triplete, la molécula puede llegar al nivel vibracional inferior mediante procesos de relajación vibracional seguido por la emisión de un fotón para retornar finalmente al estado fundamental. La emisión fosforescente se produce con un cierto retraso con respecto al proceso de absorción, entre 10^{-3} y 1 segundo, debido a que la transición entre estados de diferente multiplicidad están impedidas, por eso es factible observarla a simple vista después de cesar la radiación de excitación

De estos procesos de desactivación, se puede concluir que los procesos de relajación no radiativa son los más factibles, seguidos por emisión de fluorescencia y los menos probables, los de emisión fosforescente. Por ello, el uso de espectroscopia de absorción para análisis químicos cuantitativos y cualitativos es más utilizado.

2.3.2 Desplazamiento de Stokes

El caso más sencillo de fluorescencia comprende: excitación, conversión interna, emisión y relajación. La pérdida de energía a los alrededores, debido a la relajación vibracional y conversión interna es la razón por la cual se observa un *desplazamiento de Stokes* (ver Figura 2-8), definido como la diferencia de energía entre los picos máximos de emisión y absorción para la misma transición electrónica. El desplazamiento de Stokes se debe al hecho de que parte de la energía del fluoróforo excitado se pierde a través de las vibraciones moleculares que se producen durante el breve tiempo de vida del estado excitado de la molécula. Esta energía se disipa en forma de calor a los alrededores, moléculas del disolvente, a medida que colisionan con el fluoróforo excitado. La magnitud del

desplazamiento de Stokes está determinada por la estructura electrónica del fluoróforo, y es una característica de la molécula. (Al-Rawashdeh, 2012)

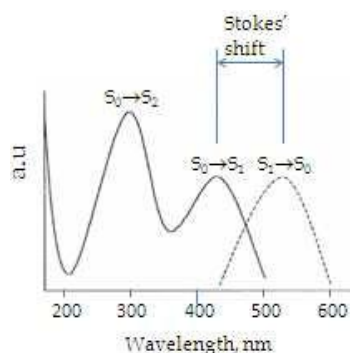


Figura 2-8: Espectro de emisión y absorción que incluye el desplazamiento de Stokes. (Al-Rawashdeh, 2012)

2.3.3 Regla de Kasha

Dado que la emisión se produce normalmente después de 10^{-9} segundos, la molécula se relaja totalmente en el momento de la emisión, por lo tanto, por regla general, la intensidad de emisión de fluorescencia o fosforescencia es independiente de la longitud de excitación y solo se produce a partir del nivel de vibración más bajo de S_1 o T_1 . Solo es aplicable a especies orgánicas en estado líquido y gaseoso. (Ramos-Martos, 1999)

2.3.4 Relación entre los espectros de excitación y de fluorescencia

Todo fluoróforo presenta un *espectro de excitación o absorción* y uno de *emisión* (ver Figura 2-9). El primero relaciona la intensidad de fluorescencia con el rango de las longitudes de onda de excitación para una longitud de onda de emisión fija. Este rango de longitudes de onda, refleja el rango de los posibles estados excitados que el fluoróforo puede alcanzar. Así cada molécula fluorescente tiene una respectiva longitud de onda máxima de excitación (λ_{exc}), la cual induce fluorescencia. El espectro de emisión de fluorescencia indica la relación entre la intensidad de fluorescencia con la variación de la longitud de onda de emisión a una longitud de onda de excitación fija, es decir, muestra el rango de longitudes de onda que el fluoróforo está emitiendo luz por cada evento de excitación. (Al-Rawashdeh, 2012; Ramos-Martos, 1999)

El espectro de excitación y el espectro de fluorescencia de un compuesto parecen imágenes especulares una de la otra, ya que las diferencias de energía entre estados vibracionales son semejantes a las que existen entre el estado fundamental y los estados

excitados. Frecuentemente se sigue la regla de la imagen especular o de espejo, sin embargo, suceden muchas excepciones a esta regla, como cuando el espectro de emisión muestra estructuras vibracionales o la capacidad que tienen algunos fluoróforos para formar complejos con ellos mismos.

2.3.5 Factores que afectan a la fluorescencia

La emisión fluorescente observada en una determinada especie está establecida por ciertos factores que incluyen: el rendimiento cuántico, la propia estructura molecular de la sustancia y factores medioambientales en que se trabaje.

2.3.5.1 Rendimiento cuántico

Consiste en la fracción del número de moléculas fluorescentes o fotones emitidos sobre el número total de moléculas excitadas o fotones absorbidos. Compuestos altamente fluorescentes como la fluoresceína poseen una eficiencia cuántica cercana a la unidad, mientras que otras especies no fluorescentes tienen una eficiencia cuántica de cero.

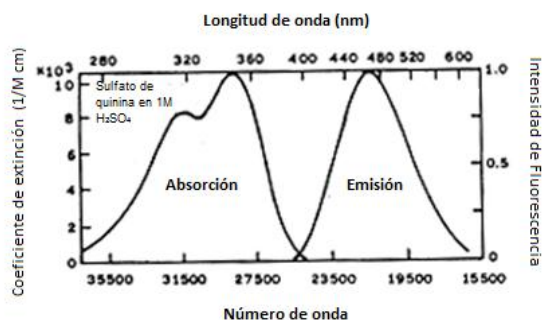


Figura 2-9: Espectros de absorción y emisión de la quinina. Se debe considerar que el espectro de emisión no se puede presentar correctamente en longitud y número de onda a la vez.

2.3.5.2 Estructura molecular

De investigaciones realizadas, a nivel estructural de compuestos orgánicos, se ha determinado que los requisitos para que una sustancia emita fluorescencia son: poseer un coeficiente de extinción molar alto, facilidad para producir transferencias electrónicas $\pi^* \rightarrow \pi$ y $\pi^* \rightarrow n$, durante el tiempo de fotoabsorción de radiación ultravioleta – visible, seguida de la emisión de un estado singlete excitado a un estado singlete fundamental. Más específicamente, para que un compuesto orgánico flurezca, presenta las siguientes particularidades: (Ramos-Martos, 1999; Valeur & Berberan-Santos, 2012)

- Alta rigidez estructural, ya que limitan las vibraciones, minimizando la degradación por colisiones y el cruzamiento entre sistemas.
- Moléculas que contengan dobles enlaces conjugados con estructuras resonantes. A medida que se aumentan los grados de conjugación, lleva a un desplazamiento de la absorción y del espectro de fluorescencia hacia longitudes de onda más largas y un incremento en el campo cuántico de fluorescencia.
- Cuando existe algún sustituyente que varíe la densidad electrónica en su estructura resonante, es decir presente un efecto mesómero que puede ser $+M_f$ si la transferencia electrónica se produce sobre el anillo, dando lugar a que el sustituyente sobre el anillo bencénico se cargue positivamente y $-M_f$ donde ocurre lo contrario, el sustituyente se carga negativamente y el anillo positivamente.
- Sustituyentes donadores de electrones como: $-OH$, $-OR$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$, donde R puede ser un H o un grupo alquilo, tiene un par de electrones apareados sobre el átomo adyacente sobre el núcleo bencénico y otros hidrocarburos aromáticos, incrementando la resonancia y por ende aumentan la probabilidad de transición $S^* \rightarrow S_0$

Tabla 2-1: Efecto en la intensidad de fluorescencia de algunos sustituyentes(Ramos-Martos, 1999)

Sustituyente	Efecto en la intensidad de Fluorescencia
$-OH$, $-OCH_3$, $-OC_2H_5$	Aumento
$-COOH$, $-CH_2COOH$	Descenso
$-N(CH_3)_3^+$	Marcada reducción
$-SH$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$	Descenso
$-NH_2$, NHR , $-NHR_2$	Aumento
$-NO_2$, $-NO$	Extinción total
$-CN$	Aumento
$=CO$, $-CHO$	Descenso
Alquilo	Aumento o descenso ligeros

- Sustituyentes aceptores de electrones como: $-COOH$, $-NO_2$, $-N=N$ y X disminuyen o eliminan la fluorescencia, debido a que introducen una transición $n-\pi^*$.

- La presencia de átomos pesados, halógenos (F, Cl, Br, I), como sustituyentes de moléculas aromáticas dan lugar a la desactivación fluorescente (fluorescence quenching) porque se incrementa la probabilidad de cruzamiento entre sistemas.

En la **Tabla 2-1**, se resumen los efectos de algunos sustituyentes en la intensidad de fluorescencia.

En la Figura 2-10 se representan algunos fluoróforos que se presentan en la vida diaria y que reúnen algunas características comentadas anteriormente. Por ejemplo el colorante POPOP (1,4-bis-(5 fenil-oxazol-2) benceno), que es estéricamente impedido, presenta considerables desplazamientos de Stokes, debido a la estructura y conformación asimétrica de sus moléculas en el estado basal y un notable aplanamiento en su primer estado excitado. El resplandor verde o rojo-naranja a veces visto en los anticongelantes se debe a trazas de fluoresceína o rodamina, respectivamente. Hidrocarburos aromáticos polinucleares, tales como antraceno y perileno, también son fluorescentes, y la emisión de tales especies se utiliza para la vigilancia del medio ambiente de la contaminación por hidrocarburos. Algunos compuestos orgánicos sustituidos también son fluorescentes, como la naranja de acridina, que es un colorante fluorescente que se emplea para reconocer el ADN y ARN. La piridina 1 y rodamina se utilizan con frecuencia como amplificador en los láseres de colorante. (Lakowicz & Geddes, 2006)

En el caso de especies inorgánicas, solo los lantánidos y actínidos, presentan fluorescencia nativa (directamente), debido a la presencia incompleta de electrones de la capa f, que permite promocionarlos dentro del nivel f, mediante absorción de luz UV. En el estado excitado no es fácil desactivarlos por conversión interna o por colisión. La fluorescencia de emisión en los lantánidos es débil, sin embargo, algunos presentan propiedades espectroscópicas especiales ya que se usan como marcadores de especies fluorescentes para compuestos orgánicos. En el caso de los actínidos, el más estudiado es el uranilo, UO_2^{+2} que exhibe fluorescencia verde con luz de excitación azul (Ramos-Martos, 1999)

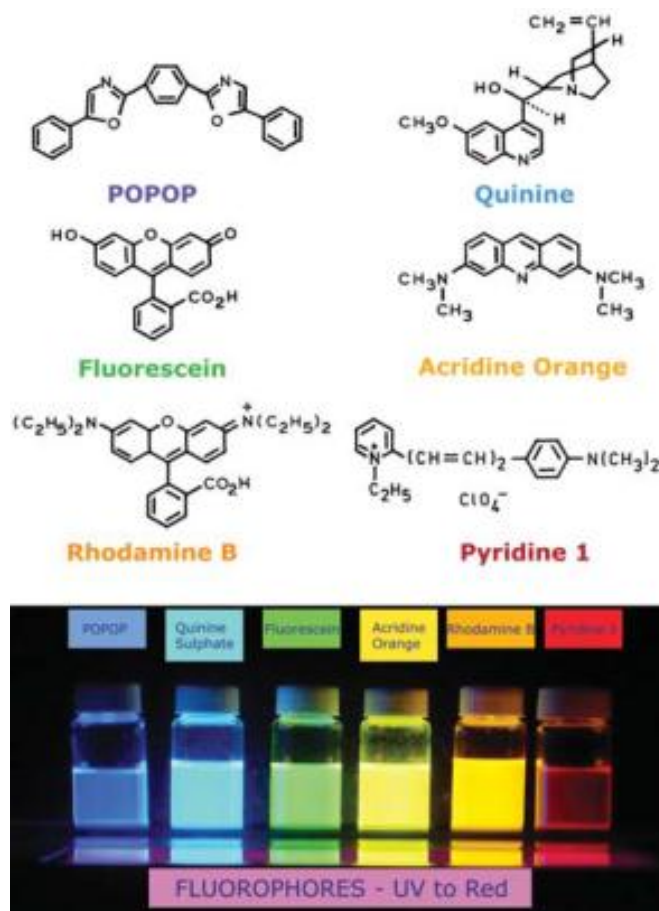


Figura 2-10: Fluoróforos que presentan fluorescencia

2.3.5.3 Disolvente y Temperatura

El disolvente empleado y la temperatura juegan un rol importante en la fluorimetría analítica. Existen interacciones entre el fluoróforo y el disolvente que pueden provocar una transferencia de electrones en función de la polaridad del disolvente, puede haber atracción electrostática entre los dipolos, dispersiones y enlaces por puentes de hidrógeno entre ellos. Por otro lado, un aumento de temperatura conlleva a una disminución de la intensidad de fluorescencia, ya que aumenta la probabilidad de relajación por colisión intermolecular, provocando un desplazamiento producido en el espectro de fluorescencia de la longitud de onda de emisión. El cambio de fluorescencia es del 1% al 5% por °C. (Ramos-Martos, 1999)

Es importante considerar que un aumento de temperatura disminuye la viscosidad del disolvente, lo cual, también aumenta la probabilidad de desactivación mediante colisiones. (Skoog et al., 2013)

2.3.5.4 Desactivación - Fluorescence Quenching

La serie de fenómenos que inducen una desactivación de la fluorescencia, son denominados de “*quenching*”. Entre las principales causas que pueden producir el efecto quenching están (Valeur & Berberan-Santos, 2012):

Formación de complejos, transferencias de cargas, reacciones en estado excitado y quenching por colisiones moleculares con elementos de transición, especialmente metales catiónicos coloreados como Cr^{3+} , Fe^{3+} y Cu^{2+} , aniones pesados como Br^- , I^- , Cl^- , NO_3^- , que actúan como atenuadores quencher y especies paramagnéticas presentes en disolución como el oxígeno que favorece el cruzamiento entre sistemas dando lugar a un estado triplete, debido a las colisiones con especies excitadas y formación transitoria de complejos de transferencia de carga.

En ocasión a medida que se aumenta la concentración de un fluoróforo hasta un cierto valor, la intensidad de fluorescencia decrece. Este fenómeno se conoce como “quenching de concentración”.

2.4 Relación entre la concentración y la Intensidad de fluorescencia

La intensidad de radiación de la fluorescencia, I_f , es directamente proporcional a la intensidad radiante del haz de excitación que absorbe el sistema (Skoog et al., 2013):

$$I_f = K'(P_0 - P) \quad \text{Ec. 2.6}$$

Donde: P_0 es la intensidad del haz incidente en la solución y P es la energía de la radiación después de haber atravesado un trayecto b del medio conteniendo la solución. K' es una constante que depende de la eficiencia cuántica de la fluorescencia. La ley de Beer dada por la ecuación 2.5, Ec. 2.5, nos permite relacionar la I_f con la concentración de la siguiente manera:

$$\frac{P_0}{P} = 10^{-\epsilon bc} \quad \text{Ec. 2.7}$$

El termino ϵbc , corresponde a la absorbancia. Si la Ec. 2.7 reemplazamos en la Ec. 2.6, se obtiene:

$$I_f = K'P_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad \text{Ec. 2.8}$$

Según la serie Mac Laren, el término exponencial

$$1 - 10^{-\varepsilon bc} = 1 - e^{-2.3\varepsilon bc} = \left[2.3\varepsilon bc - \frac{(-2.3\varepsilon bc)^2}{2!} - \frac{(-2.3\varepsilon bc)^3}{3!} - \dots \right] \quad \text{Ec. 2.9}$$

Considerando que se trabaja a bajas concentraciones, solo se considera el primer miembro del desarrollo de la serie, dando lugar a la ecuación:

$$I_f = K'P_0 2.3\varepsilon bc \quad \text{Ec. 2.10}$$

Y cuando la intensidad de radiación incidente, P_0 , se mantiene constante:

$$I_f = K'c \quad \text{Ec. 2.11}$$

De esta manera, al realizar una gráfica de la intensidad de fluorescencia vs. la concentración de la especie fluorescente, esta debe ser lineal si las concentraciones son bajas.

La Ec. 2.11 será de gran importancia para la cuantificación del fluoróforo en estudio, riboflavina, midiendo la intensidad de fluorescencia del espectrofluorímetro empleado.

2.5 Medición de señales de fluorescencia

La medición de la intensidad de fluorescencia se puede realizar de dos formas:

- *Medición en estado estacionario* (Figura 2-11): Se emplea un haz de luz continuo que incide sobre la muestra bajo estudio y se registra la intensidad de emisión fluorescente a medida que se realiza un barrido en varias longitudes de onda del espectro UV/Visible.
- *Mediciones resueltas en el tiempo* (Figura 2-12): La muestra bajo estudio es excitada con pulsos de luz con anchos menores a los tiempos de vida de fluorescencia de la muestra. Con el objetivo de registrar el decaimiento de la intensidad fluorescente en función del tiempo.

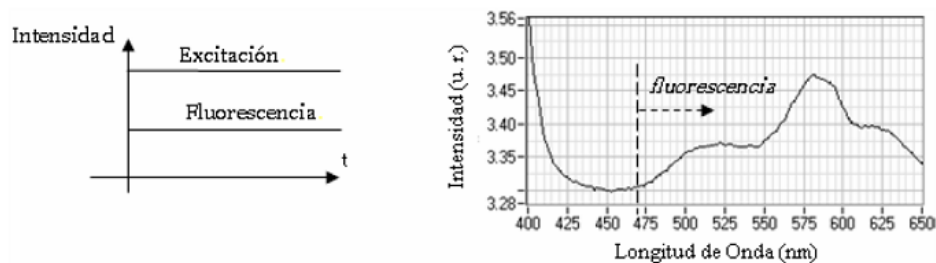


Figura 2-11: Señales de fluorescencia en estado estacionario. La gráfica de la izquierda, representa la intensidad vs. Tiempo. La gráfica de la derecha corresponde al espectro de emisión: Intensidad de fluorescencia vs. Longitud de onda.



Figura 2-12: Señales de fluorescencia resueltas en el tiempo

La relación que existe entre los dos tipos de mediciones es que la intensidad de fluorescencia en estado estacionario es un promedio de la respuesta resuelta en el tiempo.

2.6 Instrumentos de medición

La medición de las señales de la intensidad fluorescente de una muestra, se realiza por medio de varios instrumentos. Todos tienen el diagrama de bloques general de la Figura 2-13, si los dos selectores de longitud de onda son filtros, el instrumento se llama *fluorímetro*, si ambos son monocromadores, se llama *espectrofluorímetro*, ambos sistemas permiten aislar la luz incidente y la luz fluorescente. Algunos instrumentos suelen ser híbridos y utilizan un filtro de excitación además de un monocromador de emisión.

En ambos tipos de instrumentos, la luz de una fuente de radiación pasa a través de un filtro o monocromador, e incide sobre la muestra. Una parte de esta luz incidente es absorbida por la muestra, provocando que algunas de las moléculas de la muestra produzcan fluorescencia. La luz fluorescente es emitida en todas las direcciones. Parte de esta luz fluorescente pasa a través de un segundo filtro o monocromador y llega a un detector, el cual muy a menudo se encuentra a 90° con respecto al haz de luz incidente, este tipo de geometría,

evita que el detector “vea” la fuente, para minimizar el riesgo de que la luz incidente reflejada o transmitida llegue al detector. (Skoog et al., 2013)

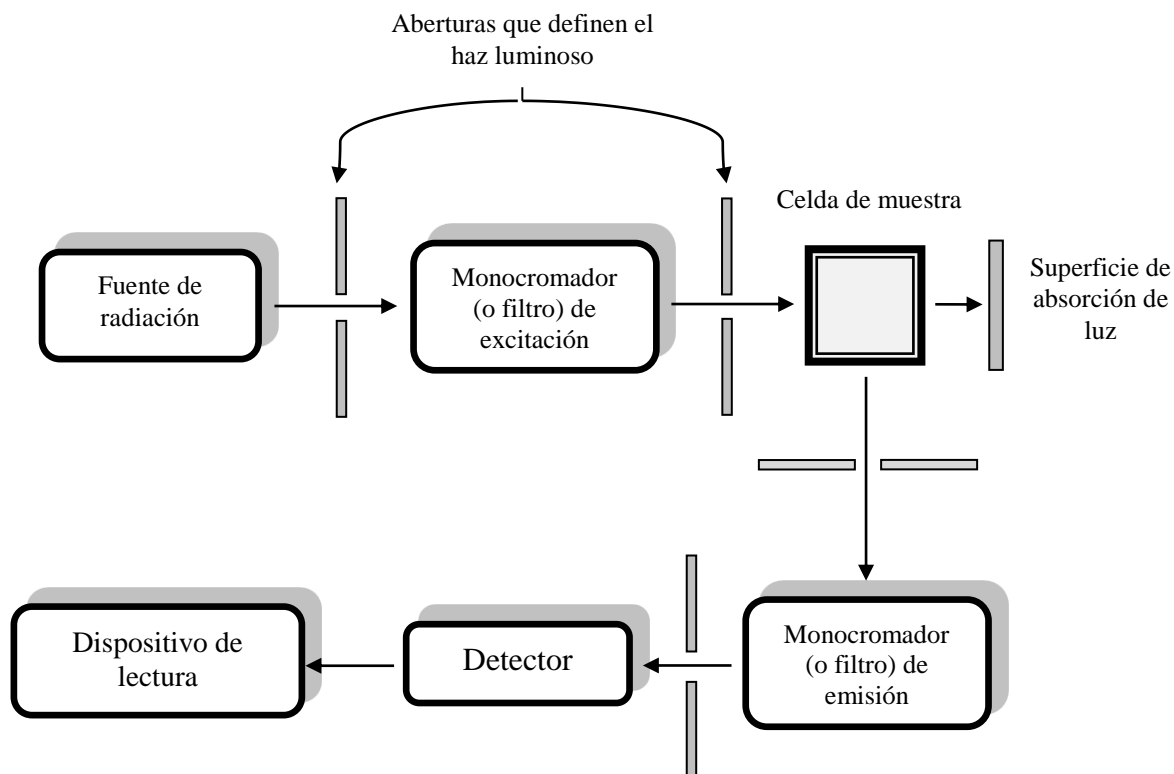


Figura 2-13: Diagrama de bloques de instrumentos de medición de fluorescencia

Mediante un espectrofluorímetro de dos monocromadores, es posible obtener los espectros de excitación o absorción, (manteniendo fija la longitud de onda de emisión se barre la longitud de onda de excitación) y los espectros de emisión o fluorescencia (manteniendo fija la longitud de onda de excitación se barre la longitud de onda de emisión) de un fluoróforo o material luminiscente.

2.6.1 Componentes de un espectrofluorímetro

2.6.1.1 Fuente de luz

La fuente de luz de excitación determina la cantidad de luz y el rango espectral disponible que incidirá en la muestra. La opción más utilizada y de mayor costo para la mayoría de espectrofluorímetros es la lámpara de arco de xenón de alta presión (Figura 2-14.a), ya que posee un espectro de luz continua de alta intensidad en el intervalo de 230 a 1700 nm y por la potencia eléctrica que consumen (150 W, 450 W, 1000 W). Otra gran opción

cuando se requiere una fuente de banda ancha con una excelente estabilidad, es la lámpara de tungsteno brillante que tiene una salida por encima de 1000 nm, normalmente el rango útil de una lámpara de tungsteno es de 400 a 2200 nm. (Lakowicz & Geddes, 2006)

Durante los últimos años, las fuentes de luz de diodos emisores de luz (LED) y diodos láser (DL) se han empleado para realizar las mediciones de fluorescencia. Los LED (Figura 2-14b) son extremadamente asequibles, brillantes, con un mayor tiempo de vida, un consumo menor de energía y disponibles en una amplia gama de longitudes de onda con un estrecho ancho de banda, comprendiendo desde la región UV hasta el infrarrojo (250 – 950 nm). Por otro lado, los DL (Figura 2-14c), emiten luz coherente y en la actualidad se encuentran disponibles en un intervalo de longitudes de onda a partir de los 405 nm hasta los 1500 nm. La ventaja que presentan estos últimos es que su luz es fácilmente manipulada y enfocada. Sin embargo, tienen un costo más elevado que los LED. (Lakowicz & Geddes, 2006)

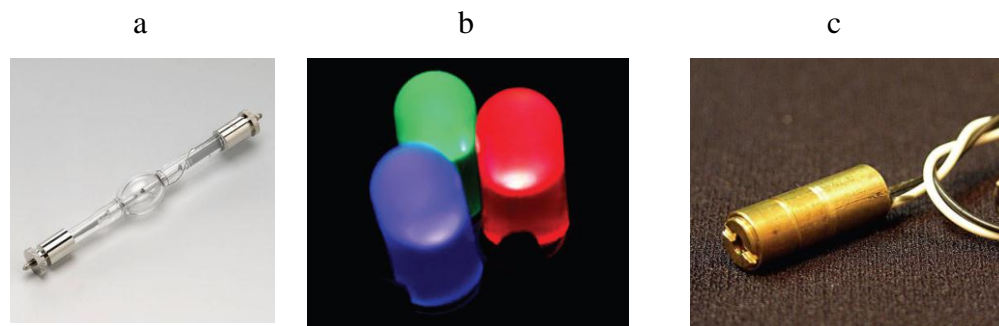


Figura 2-14: Fuentes de luz a) Lámpara de arco de xenón de alta presión (Hamamatsu) b) Diodos emisores de luz c) Diodos láser.

2.6.1.2 *Monocromador*

La luz emitida por la fuente de iluminación de excitación es colectada con espejos y enfocada a través de lentes en un haz de luz, es decir, pasa a un sistema óptico para la selección de la longitud de onda de excitación apropiada a través de filtros o monocromadores.

Los monocromadores se utilizan para descomponer la luz policromática o blanca en los diferentes colores correspondientes a diferentes longitudes de onda. Los elementos de dispersión pueden ser prismas o redes de difracción. En la mayoría de espectrofluorímetros se utilizan redes de difracción en lugar de prismas. Los parámetros para considerar la eficacia y

rendimiento de un monocromador incluyen dispersión, generalmente dada en nm/mm; y el nivel de luz parásita o luz transmitida por el monocromador, a longitudes de onda distintas a la seleccionada. (Lakowicz & Geddes, 2006)

La resolución en la longitud de onda, por lo general, es de baja importancia, ya que los espectros de emisión rara vez presentan picos con anchos de línea inferiores a 5 nm. Un monocromador tiene anchuras de rendija tanto de entrada como de salida generalmente variables y la intensidad de la luz que pasa a través de un monocromador es aproximadamente proporcional al cuadrado de la anchura de la rendija de entrada. Mientras mayor sea el ancho de la rendija, mayor será la intensidad luminosa que pasa a través de ella y por lo tanto la relación señal–ruido será mayor. Una rejilla angosta proporciona mayor resolución a expensas de la intensidad. (Gore et al., 2000; Lakowicz & Geddes, 2006)

Como se mencionó antes, la fluorescencia se mide frecuentemente en un ángulo de 90° en relación a la luz de excitación, ya que si el sensor se coloca en la línea de la luz de excitación en un ángulo de 180° habrá interferencia de la luz de excitación transmitida. El monocromador no es perfecto y transmitirá la luz con otras longitudes de onda diferentes a las establecidas (existiendo también la posibilidad de radiación de diferentes órdenes dispersadas a un mismo ángulo que radiación de menor orden deseada). Al medir en un ángulo de 90° , sólo la luz dispersa por la muestra provoca luz que sea captada por el sensor, mejorando la relación señal-ruido, y reduciendo el límite de detección a un factor de aproximadamente 10000, comparada con la geometría de 180° . Por otra parte, si se utilizan muestras turbias, la fluorescencia también puede ser medida desde la parte delantera. (Pérez, 2014)

2.6.1.3 Filtros ópticos

A menudo es importante utilizar filtros ópticos, además de monocromadores, para compensar y minimizar una de las mayores fuentes de error en las mediciones de fluorescencia debida a la interferencia por la dispersión y desviación de la luz. Asimismo, cuando se conocen las propiedades espectrales de un fluoróforo, la máxima sensibilidad se obtiene con el uso de filtros en lugar de monocromadores. Una amplia gama de filtros están disponibles en el mercado y los fabricantes suelen proporcionar los espectros de transmisión de estos. Antes de los avances en la tecnología de capa fina, la mayoría de filtros empleados eran filtros de vidrio de color que pueden transmitir una gama de longitudes de onda.

Algunos filtros de color son llamados filtros de paso largo (*long – pass filters*) que transmiten todas las longitudes de onda superiores a cierta longitud de onda particular, bloqueando las que están por debajo de ese valor. También, suelen emplearse filtros de paso de banda (*bandpass filters*) que dejan pasar una banda determinada del espectro y bloquean el resto y filtros de corto paso (*short pass filters*) que dejan pasar el espectro por debajo de una longitud de onda determinada y bloquean las que están por encima de esta. (Lakowicz & Geddes, 2006). Los filtros ópticos son altamente versátiles, de bajo costo y eficaces.

2.6.1.4 *Compartimento de la muestra*

Las celdas manejadas en espectrofluorimetría suelen ser de un 1 cm de espesor y se caracterizan por tener las cuatro caras lisas ya que generalmente se trabaja en una geometría de 90° con respecto al haz de incidencia. En la mayoría de los casos las celdas son de cuarzo pero si la longitud de onda de excitación y la de la fluorescencia se encuentran sobre 300 nm se pueden utilizar celdas de vidrio óptico o de plástico. Por otro lado, los procesos de desactivación por fluorescencia son usualmente dependientes de altas temperaturas consecuentemente el contenedor de la celda debe ser termoestable. Posteriormente, los fotones de la fluorescencia son colectados con lentes y enfocados a un segundo selector de longitud de onda sea filtro o monocromador y dirigidos al detector.

2.6.1.5 *Detector*

El tipo de detector más empleado en un espectrofluorímetro es el tubo fotomultiplicador (PMT por sus siglas en inglés, ver Figura 2-15) gracias a que tienen alta ganancia con bajo ruido. Este tipo de detector consta de un fotocátodo y una serie de dinodos que actúan como etapas de amplificación. El fotocátodo es una fina película de metal delgada dentro de la ventana del PMT y los fotones que inciden en esta película de metal dan lugar a la emisión de electrones en su superficie. El fotocátodo se polariza con un potencial negativo entre -1 y -2 kV con respecto al ánodo y los dinodos también se polarizan con potenciales negativos menores en magnitud al potencial del fotocátodo. Esta diferencia de potenciales permite que los electrones sean expulsados del fotocátodo hacia el primer dinodo y por efectos de emisión secundaria se expulsan más electrones de este dinodo hacia el siguiente dinodo de la cadena. Continuando este proceso a lo largo de toda la cadena de dinodos, hasta que los electrones

alcanzan el ánodo del PMT. Para análisis cuantitativo la corriente del ánodo debe ser proporcional a la intensidad de corriente incidente sobre el ánodo.

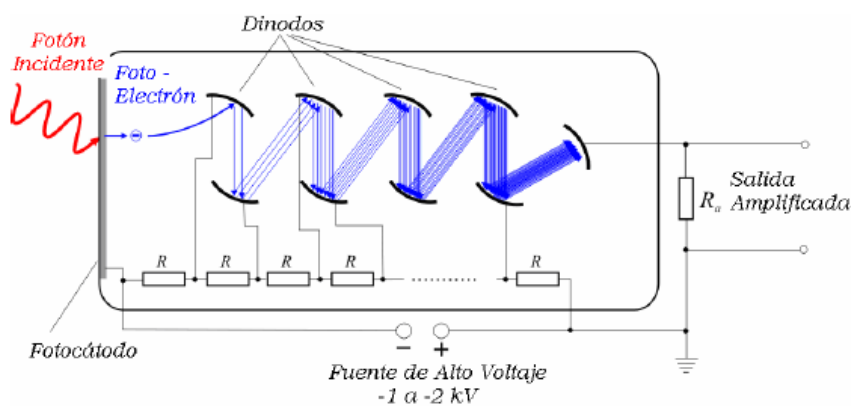


Figura 2-15: Esquema de un tubo fotomultiplicador (PMT)

Actualmente, se emplea en espectroscopía de fluorescencia, dispositivos de carga acoplado o CCD (Charge-Coupled Device), fotodiodos PIN y fotodiodos de avalancha (APD) que ofrecen un rendimiento excelente para una amplia gama de aplicaciones espectroscópicas en la región del UV hasta el IR. El funcionamiento de un CCD, se basa en el fenómeno conocido como efecto fotoeléctrico. La luz incidente, cargada de fotones, llega hasta la superficie sólida del CCD que es sensible a la luz y está constituida por un arreglo de una o dos dimensiones de substratos semiconductores de silicio con elementos fotodetectores. Los fotones que inciden en cada elemento semiconductor liberan electrones produciendo una acumulación de carga negativa, proporcional a la cantidad de fotones incidentes que son atraídos por los electrodos y se acumulan a su alrededor. Cada elemento del arreglo está dotado de unos circuitos que permiten leer y almacenar electrónicamente las imágenes que se proyectan sobre ella. Estas señales se procesan y envían a una computadora donde un software especial, grafica el espectro de excitación o emisión correspondiente. (Lakowicz & Geddes, 2006)

El fotodiodo PIN, es relativamente fácil de fabricar, es altamente fiable, tiene bajo ruido, es compatible con circuitos amplificadores de baja tensión y es sensible a un gran ancho de banda debido a que no tiene mecanismo de ganancia. Los APD son similares a los diodos PIN mientras trabajan con tensiones inversas lo suficientemente elevadas, en ausencia de grandes corrientes de oscuridad. (Quinteros, Centellas, & Durán, 2010)

2.6.1.6 Adquisición de Datos

El concepto de adquisición de datos se refiere a la captura y análisis de las señales analógicas generadas por el detector con una PC a través de una interface. Las señales deben ser cambiadas del dominio analógico al digital (que es un formato que puede ser interpretado en la computadora). Para realizar el cambio de formato de la información se emplean convertidores Analógico/Digital (CAD) y Digital/Analógico (CDA).

La interface suele ser una *Tarjeta de Adquisición de Datos* o DAQ (*Data Acquisition Board*) que permite que la información adquirida sea procesada y reconocida por una computadora. Las tarjetas DAQ, constituyen sistemas electrónicos completos, que se conectan con el computador a través de su bus interno o de un puerto externo o USB. Las principales funciones de una DAQ son:

- Entradas / salidas Analógicas
- Entradas / salidas Digitales
- Contadores / temporizadores

También existen tarjetas que realizan otro tipo de funciones como: adquirir imágenes, controlar motores (AC, DC de pasos), generar instrumentos básicos en la PC (osciloscopios, multímetros, generadores de funciones). (National, 2014)

En el campo de aplicación específica, para valerse de un sistema de adquisición de datos en forma óptima, es necesario conocer los fundamentos y las principales características de operación de las diversas funciones que se puede realizar con el sistema. En el presente trabajo de tesis, la adquisición de la señal y la interacción con el ordenador, se llevó a cabo con NI MyDAQ a través de un programa virtual creado en LabVIEW.

2.7 LabVIEW (Travis & Kring, 2006)

Significa "*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*", LabVIEW, es un software hecho para hacer aplicaciones de automatización, monitoreo y control virtual con lenguaje de programación gráfico (*lenguaje G*), con el que se pueden manejar sistemas de adquisición de datos, instrumentación, comunicación serial o paralela, comunicación TCP/IP, sistemas tipo SCADA, cálculos complejos, procesamiento digital que facilitan la

implementación en aplicaciones de ciencia y tecnología, posee más de 15000 drivers de instrumentación de 100 fabricantes diferentes.

Está hecho para ser integrado con programas de cálculos numéricos complejos, entre los cuales el más utilizado es MATLAB, se acopla perfectamente a todos los componentes de Microsoft Office como Word, Excel y Access, además posee componentes o herramientas (Toolkits). LabVIEW también está desarrollado para ser integrado con lenguajes de programación como C/C++, Visual C+, Visual Basic.

2.7.1 Filosofía de LabVIEW

La filosofía de LabVIEW hace posible que las aplicaciones sean escalables, es decir pueden ser mejoradas y ajustadas fácilmente a las necesidades de los usuarios, además pueden funcionar con cualquier versión de LabVIEW, y no requieren de CPUs específicos, funciona perfectamente en arquitecturas Intel de 32 bits, con requerimientos mínimos.

Las aplicaciones en LabVIEW son desarrolladas en forma modular, la aplicación global se la llama VI (Virtual Instrument) y sus componentes se los conoce como SubVI, todo VI desarrollado como componente de una aplicación específica es grabado como un VI en un bloque de librerías, y estos pueden ser llamados desde otras aplicaciones como Sub VI representado por un icono con entradas de control y salidas de sus procedimientos, el desarrollo de las aplicaciones es intuitivo.

Toda aplicación, programas y componentes API del sistema operativo (funciones) para el manejo del hardware y archivos también se lo maneja de forma gráfica, con la misma estructura lógica de un lenguaje común de programación. Las aplicaciones desarrolladas por LabVIEW pueden ser compiladas como un archivo ejecutable, de tal manera que en el computador donde se instala la aplicación no necesita el software LabVIEW, porque en el instalador se incluyen todos los componentes que requiere la aplicación para funcionar adecuadamente. Como LabVIEW está desarrollado para hacer aplicaciones remotas de monitoreo y control de procesos en tiempo real se incluye en el software un Toolkit para servidor Web denominado Web Publishing Tools, el cual es totalmente configurable, y provee las seguridades necesarias para controlar el acceso de usuarios por nombre con login y password, dirección IP o nombre de la máquina.

2.7.1.1 Principales componentes de la aplicación.

El software LabVIEW tiene dos partes fundamentales bien estructurados, *el panel frontal* y *el panel de código (diagrama de bloques)*, son de fácil manejo y totalmente gráficos, los dos en conjunto forman el software de aplicación LabVIEW que maneja menús, VIs, herramientas y funciones, existe versiones de LabVIEW que operan en plataformas Windows y Linux, a continuación se detalla sus componentes utilizando un ejemplo básico:

- *Panel Frontal.*

Es una interface entre programador o usuario y software, es una consola de programación gráfica como se puede ver en la Figura 2-16, en la que se ubican los íconos de control e indicadores que conforman el control virtual (Front End), cada icono colocado aquí tiene una representación única en el panel de código. En esta pantalla se puede observar a la izquierda un menú gráfico que contiene la herramientas básicas del software de aplicación LabVIEW, en el lado derecho se observa otro menú gráfico que contiene las funciones representadas por iconos que dan versatilidad al lenguaje de programación gráfico, en la que están todos los controles, indicadores y funciones específicas.

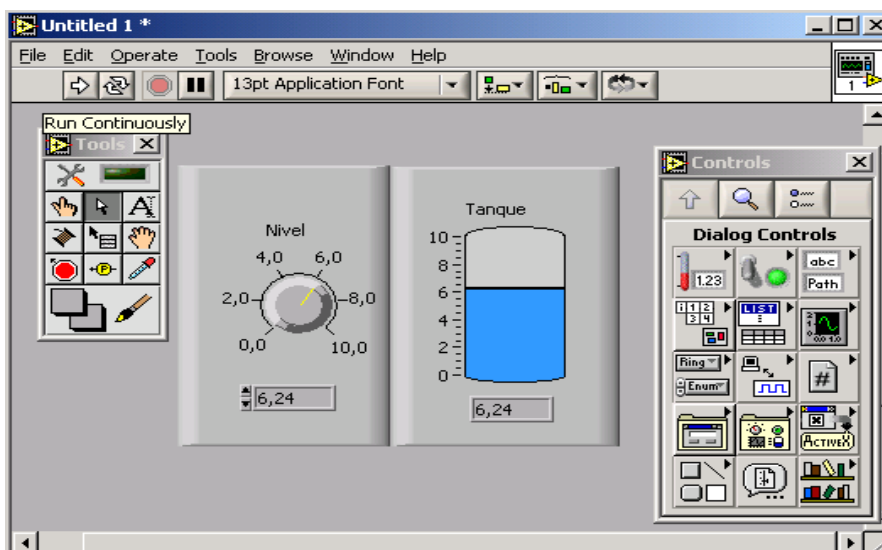


Figura 2-16: Panel Frontal de LabVIEW

- *Panel de código (DIAGRAMA DE BLOQUES).*

Es la consola de programación de los procedimientos y algoritmos de la aplicación, también se programa en forma gráfica, la programación se realiza enlazando líneas con la

herramienta que tiene el icono de madeja entre los objetos o iconos que conforman los componentes del Back End. En la Figura 2-17 aparecen representados los iconos de cada componente así como también el procedimiento y algoritmo que maneja la aplicación del ejemplo.

En la pantalla de la aplicación del ejemplo se puede observar el procedimiento desarrollado en forma gráfica, en la parte izquierda están las herramientas básicas y en la parte derecha el menú que permite acceder en forma gráfica a las funciones, controles e indicadores del software LabVIEW.

Cada control o indicador del panel frontal tiene una terminal correspondiente en el diagrama de bloques. Cuando un VI se ejecuta, los valores de los controles fluyen a través del diagrama de bloques, en donde estos son usados en las funciones del diagrama, y los resultados son pasados a otras funciones o indicadores.

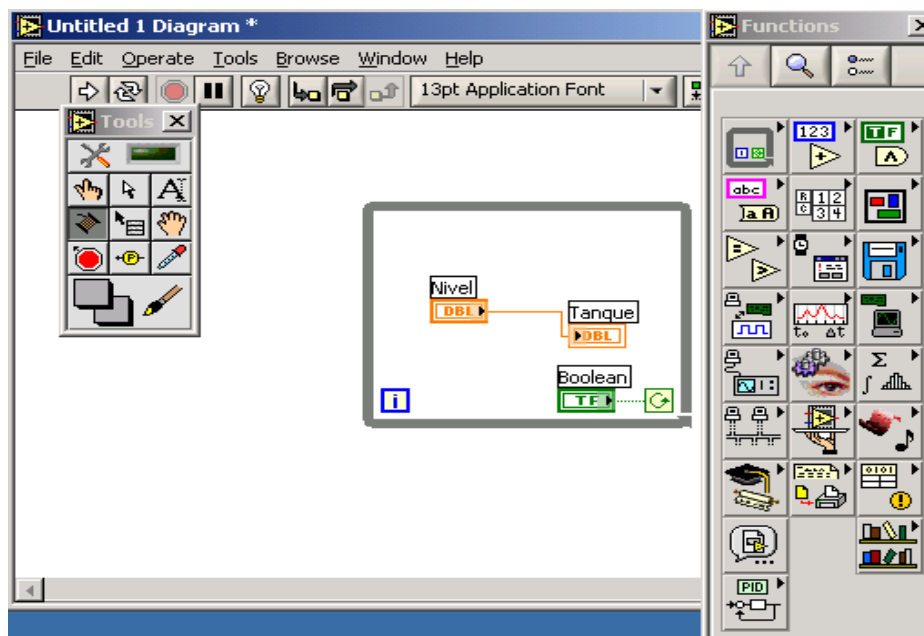


Figura 2-17: Panel de Código de LabVIEW

- *Paleta de controles*

Use la paleta de controles (**Controls**) para colocar los controles e indicadores en el panel frontal. La paleta de controles está disponible solamente en el panel frontal.

- *Paleta de funciones*

Use la paleta de funciones (**Functions**, Figura 2-18), para construir un diagrama de bloque. La paleta de funciones está disponible solamente en el diagrama de bloque.

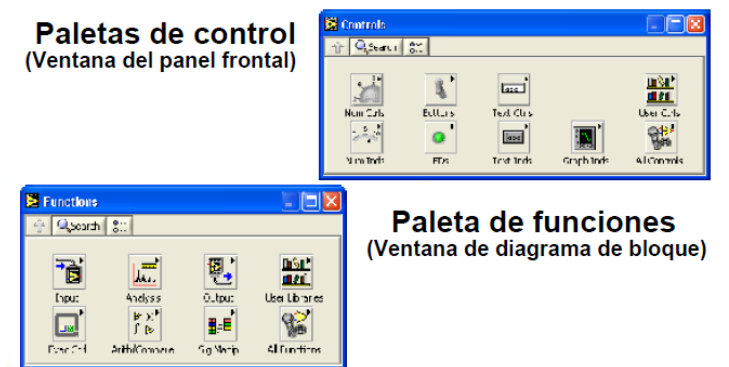


Figura 2-18: Paletas de control y de funciones en LabVIEW

- *Paleta de Herramientas*

Si la herramienta de selección automática está habilitada y si el usuario mueve el cursor sobre un objeto en el panel frontal o en el diagrama de bloque, LabVIEW automáticamente selecciona la herramienta correspondiente de la paleta de controles, Figura 2-19.

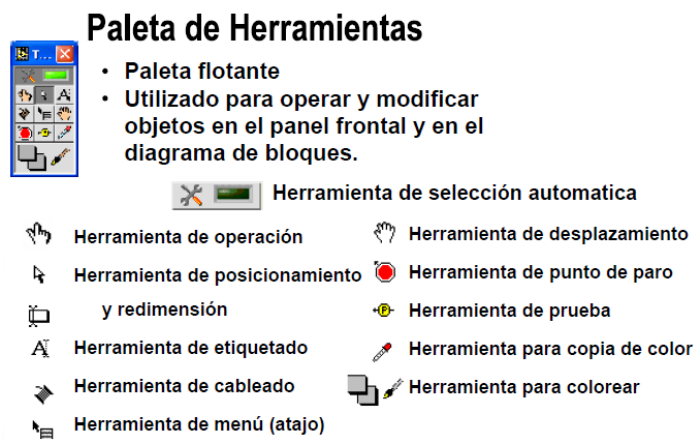


Figura 2-19: Paletas de control y de funciones en LabVIEW

2.7.2 TOOLKITS DE LabVIEW

El programa de aplicación LabVIEW tiene un CD con Toolkits para los sistemas operativos: Windows, Macintosh OS y UNIX. Los Toolkits para UNIX son muy limitados, Los módulos de LabView ToolKits de desarrollo son:

2.7.2.1 LabVIEW Enterprise Connectivity Toolset:

Es una suite de Toolkits que permite realizar conexiones de distinto tipo según el toolkit utilizado, así: los toolkits de esta suite son:

- *Internet tools.*- con esta herramienta se puede hacer conexiones entre hosts utilizando las aplicaciones que ofrece la suite de protocolos TCP/IP, como FTP, Telnet, mail y Web.
- *Database tools.*- Es una herramienta que permite conectar fácilmente y en forma gráfica bases de datos locales o remotas. Para pequeñas aplicaciones la base de datos puede ser Microsoft Acces, y para el caso de aplicaciones a gran escala (transaccionales) la base de datos es SQL de Microsoft.
- *SPC Statistical Process Control Tools.*- es una herramienta que permite extraer reportes, estadística de la información contenida en una base de datos.

2.7.2.2 LabVIEW Signal Processing Toolset:

Es una suite de Toolkits que permite hacer análisis de señales, entre las herramientas están:

- *Digital Filter Design Tools.*- Es una herramienta que permite analizar y diseñar filtros para señales digitales.
- *Joint Time Frequency Analysis Tools.* - Es una herramienta que permite analizar señales con métodos matemáticos conocidos.
- *Wavelet and Filter Bank Design Tools.* - Es una herramienta que permite analizar señales de corta duración, entre varias ventajas permite filtrar el ruido existente en una señal.
- *Super-Resolution Spectral Analysis Tools.*- es una herramienta que permite analizar señales de alta frecuencia.

2.7.2.3 LabVIEW PID Control Toolset:

La herramienta posee librerías de control PID con sofisticados algoritmos de control para la automatización de sistemas, la implementación se la realiza con la misma filosofía gráfica de LabVIEW, los componentes de esta suite PID Control Toolset son:

- *PID Toolset.*- Es una herramienta que contiene varias librerías para control automático tipo Proporcional (P), Proporcional Integral (PI) y proporcional integral derivativo (PID).

2.7.2.4 LabVIEW System Simulation and design Toolset:

Esta herramienta permite realizar la simulación de control automático de sistemas lineales y no lineales, la cual permite diseñar y analizar el comportamiento de sistemas, encontrar la función de transferencia con diagramación Bode, Nyquist y Root-Locus.

2.7.2.5 LabVIEW Sound and Vibration Toolset:

Esta herramienta permite realizar análisis de vibraciones y medir parámetros de las señales de sonido lineales o logarítmicos, permite encontrar atenuaciones, aplicar filtros, medir frecuencias en dominio del tiempo, amplitudes RMS, pico, pico a pico y obtener sus componentes espectrales utilizando los teoremas de Fourier.

2.7.2.6 LabVIEW Report Generation Toolset for Microsoft Office:

Es una herramienta que permite realizar reportes del control y monitoreo de aplicaciones remotas o locales en componentes de la aplicación de Microsoft Office como Word, Excel y Access.

2.7.2.7 LabVIEW Order Analysis Toolset:

Esta herramienta contiene librerías que permiten analizar vibraciones y sonidos provocados por sistemas mecánicos en movimiento de rotación, ideal para el desarrollo de máquinas y automóviles.

2.7.2.8 LabVIEW Supervisory Control Module:

Esta herramienta permite administrar alarmas, realizar históricos en tiempo real en archivo plano o en base de datos, una de las ventajas de esta herramienta es que posee más de 3300 gráficos, los cuales son utilizados para armar los Front End de presentación de una planta.

Cabe señalar que existen otros ToolKits pero se adjuntan solamente en la versión profesional y estos son: LabView DSP test integration Toolkit, Express VI Development

Toolkit, State Diagram Toolkit, Math Interface Toolkit. Y DIAdem Interactive data analysis and report generation.

2.7.3 Bondades y Desventajas

LabVIEW tiene las siguientes bondades:

- Fácil uso del lenguaje de programación gráfico.
- El software de aplicación desarrollado es totalmente modular y estructurado.
- Es un software integrado y versátil con varios componentes y librerías.
- Posee un servidor Web totalmente configurable.
- Posee herramientas (Toolkit) para todo tipo de aplicaciones.
- Posee sobre los 15000 drives de más de 100 fabricantes de hardware.
- Posee librerías para todos los protocolos de comunicación estandarizados.
- Posee una herramienta para la simulación y depuración de las aplicaciones desarrolladas.
- Toda aplicación puede ser utilizado como un Sub VI en otras aplicaciones VI.
- Integración con los principales lenguajes de programación.
- Integración con programas de aplicación de cálculos numéricos.

LabVIEW tiene las siguientes desventajas:

- Es un software costoso.
- Cada componente Toolkit debe ser comprado a NI como adicional.
- La versión estándar de LabVIEW para el caso de conexiones remotas permite solamente un usuario, si se desea más usuarios hay que adquirir más licencias.

3. Diseño y Construcción del Espectrofluorímetro

En la Figura 3-1 se muestra un diagrama esquemático del espectrofluorímetro desarrollado. El instrumento, básicamente está compuesto de una linterna LED blanca como fuente de luz, un espectrofotómetro básico conformado por la red de difracción, compartimento de la muestra y el detector. El sistema de emisión o fluorescencia está dado por el conjunto de 5 LED de diferentes colores ubicados a los lados laterales del compartimento de la muestra y a 90° del detector. La parte electrónica y el desarrollo del programa virtual en LabVIEW, detallada en el siguiente capítulo 0, consta de circuitos adicionales para la amplificación, el movimiento del servomotor, el encendido/apagado de las LED y la adquisición de datos a través de la tarjeta NI MyDAQ con una Laptop mediante el software creado en LabVIEW.

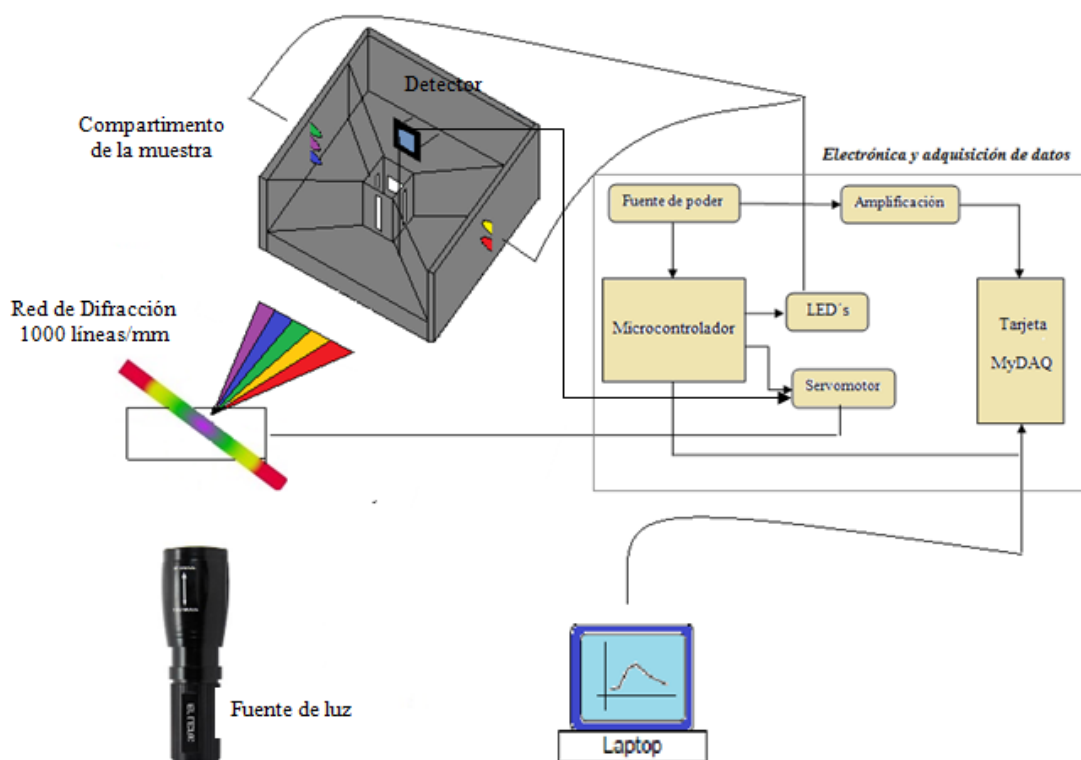


Figura 3-1: Diagrama esquemático del espectrofluorímetro desarrollado.

3.1 Fuente de iluminación de excitación

En este proyecto de tesis, se trabajó con una Linterna LED de luz blanca, de marca FEIT ELECTRIC, modelo 72328, que se aprecia en la Figura 3-2. Hecha de aluminio de calidad aeronáutica resistente a la intemperie. La LED de luz blanca es de alta potencia, de 500

lúmenes. La linterna cuenta con un zoom deslizante que permite acercarse rápidamente hacia dentro (*zoom in*) y hacia fuera (*zoom out*) simplemente deslizando la cabeza hacia adelante y hacia atrás. Funciona con tres pilas "C" alcalinas, que no vienen incluidas.

En la parte posterior de la linterna se encuentra un botón de goma que permite el encendido/apagado de la linterna, ofreciendo varias opciones de iluminación:

- Luz alta si se aplasta una vez
- Luz baja si se presiona ligeramente, una sola vez, el botón de goma.
- Luz estroboscópica o intermitente, si se presiona ligeramente, dos veces, el botón de goma.
- Luz SOS, si se presiona ligeramente, tres veces el botón de goma.

Tabla 3-1: Características de la Linterna empleada como fuente de iluminación

Marca	FEIT ELECTRIC
Modelo	72328
Origen	China
Peso	2.86 gramos (1.3 libras)
Dimensiones	26.67 x 26.67 x 5.08 cm
Tamaño	Largo
Color	Negro
Material	Cuerpo de aluminio - calidad aeronáutico
Fuente de poder	3 Baterías alcalinas C
Tipo de luz	LED – alta potencia
Baterías requeridas	Si

La primera opción de iluminación al ser de alta potencia, se empleó para los análisis realizados en la puesta en marcha del instrumento.



Figura 3-2: Linterna LED de luz blanca marca, FEIT ELECTRIC
Empleada como fuente de iluminación

En la **Tabla 3-1** se incluyen las principales características de la linterna empleada como fuente de iluminación.

3.1.1 Sistema óptico seguido de la fuente de luz

A pesar de la alta iluminación de la LED de la linterna, se empleó un juego de lentes para condensar, enfocar y aumentar la luz emergente de la linterna. A la salida de la linterna, se ubicó un primer lente condensador, marca Abbe (Figura 3-3), obsequiado por el Departamento de Física de la USFQ. El condensador Abbe, normalmente incorpora dos lentes sin corrección y un diafragma de iris para dar como resultado una iluminación y resolución aumentada. (Leica Microsystems, 2000). La amplitud numérica (A.N) del lente condensador empleado es de 1.25.



Figura 3-3: Lente condensador Abbe

Se colocó un segundo lente de lupa biconvexo de vidrio, cuyo diámetro es de 45 mm y Al tener un aumento 5x, permite que el haz de luz sea aún más convergente. Este lente está cubierto por una rendija de salida estrecha de 2.5 mm de ancho para proporcionar una imagen estrecha y coherente de la fuente de radiación.

El sistema óptico de la linterna con el lente condensador Abbe, fue ensamblado en una caja negra cuyas dimensiones son 20 cm de largo, 11 cm de ancho y 12 cm de alto, con el fin de evitar la mayor cantidad de pérdida de la luz emergente de la linterna. La conexión con el segundo lente biconvexo se realizó conectando un tubo de 8 cm de largo a la salida de la caja negra, esta estructura también fue encerrada en una segunda caja cuadrada de 6 cm de lado y a la salida de este se encuentra la rendija estrecha de 2.5 mm de ancho y 3.5 cm de largo. En la Figura 3-4, se muestra el montaje del sistema óptico del equipo. La dimensión total de la estructura de la fuente de iluminación es de 34 cm de largo, 12 cm de alto y el ancho es variable según las dimensiones de las dos cajas que aíslan la luz. De la caja más grande se dejó una abertura para que el segmento de la linterna que contiene el botón para encenderla o apagarla, quede externo a la caja para poderlo manipular manualmente. Estas dimensiones es necesario saber para el diseño final de la carcasa que cubrirá esta estructura.

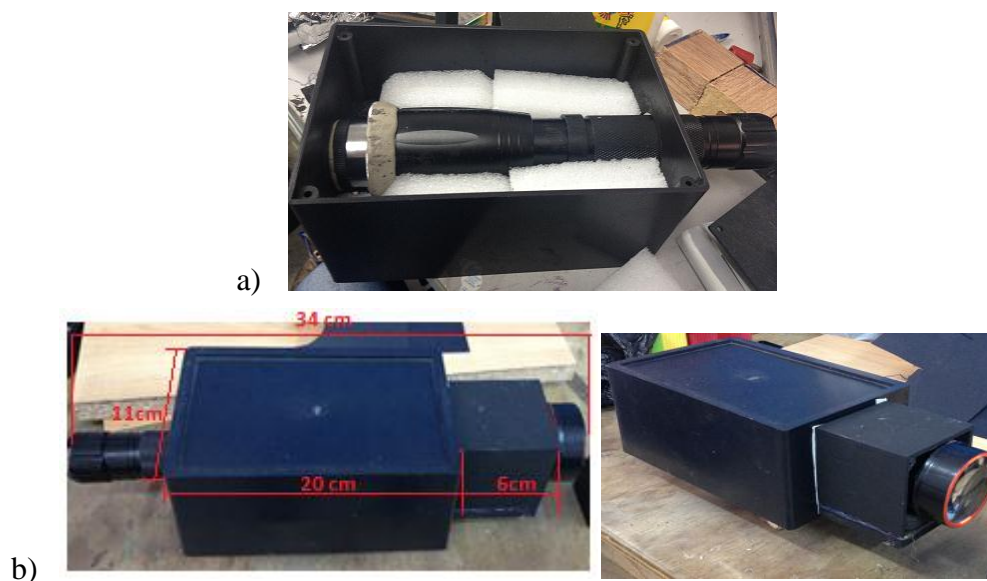


Figura 3-4: Montaje: linterna – lente condensador – lente biconvexo – rendija estrecha 2.5 mm
 a) Acople linterna con lente condensador b) Vista superior y frontal del montaje ensamblado en dos cajas negras. La más grande (20 x 11 x 12 cm) y una más pequeña (6 cm de cada lado).

3.2 Monocromador de excitación

El elemento difractante (ver Figura 3-5), selector de las diferentes longitudes de onda, que se emplea está constituido por una red de difracción de 1000 líneas/mm, colocado sobre un servomotor que actúa como una plataforma giratoria que desvía el rayo de luz incidente.



Figura 3-5: Red de difracción de 1000 líneas/mm sobre el servomotor Hitec HS – 311

3.2.1 Servomotor Hitec HS – 311

El servomotor utilizado es del tipo Hitec HS – 311 (Figura 3-6) que resulta ideal para girar la red de difracción. Este dispositivo tiene un eje de rendimiento controlado permitiendo posiciones angulares específicas al enviar una señal codificada. Las principales características de este servomotor se muestran en la **Tabla 3-2**.



Figura 3-6: Servomotor Hitec HS – 311

3.2.2 Red de Difracción

El elemento empleado que dispersa la radiación emergente de la fuente de iluminación en sus longitudes de ondas individuales, es decir, que separa los diferentes colores de la luz monocromática (blanca), es una red de difracción de 1000 líneas/mm plana montada en un cartón de 5 cm de lado (ver Figura 3-7), importado de Scientific Equipment of Houston desde eBay.

Tabla 3-2: Características físicas y eléctricas del servomotor Hitec HS – 311

Características	Descripción
Tamaño	40 x 20 x 37 (mm)
Peso	43 gramos
Pulso requerido	3 V – 5 V pico – pico de onda cuadrada
Tensión de funcionamiento	4.8 V – 6 V
Velocidad de funcionamiento	0.19 s/60°
Torque	3.7 kg/cm
Angulo de funcionamiento	45° un impulso lateral
Dirección	Multi - direccional

Como se aprecia en la Figura 3-7, el efecto de esta red se puede describir en términos de una disposición regular de rendijas paralelas, cuando el haz de luz monocromático incide sobre la red, las ondas que emergen de cada rendija están en fase y sobre un pantalla colocada a una gran distancia dará lugar a un diagrama de interferencia debido a un número de focos igualmente espaciados (Palmer, Loewen, & Thermo, 2005). Los máximos de interferencia estarán localizados en ángulos θ_m dados por la ecuación:

$$d \sin \theta_m = \pm m \lambda \quad (m = 1, 2, 3, \dots) \quad \text{Ec. 3-1}$$



Figura 3-7: Red de difracción empleada

Para la red de 1000 líneas/mm la distancia entre puntos correspondientes de dos rayas contiguas, d , es inversamente proporcional al número de líneas por lo que resulta que $d = 1/1000 = 1\mu\text{m}$. El entero m indica el orden del máximo interferencial, es decir, el orden de difracción que toma los valores: 0, 1, 2...; para el máximo central, el de primer orden, el de segundo orden, etc. El ángulo θ_m es el ángulo de dispersión.

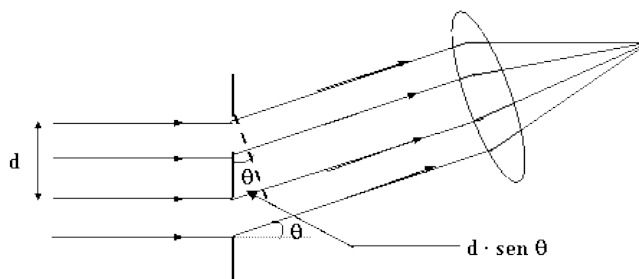


Figura 3-8: Efecto producido la red de difracción al incidir sobre ella una haz de luz

3.2.2.1 Obtención de la curva de calibración de la red empleada

Con el objetivo de usar la red de difracción como monocromador, en la formación del espectro y la medición de los ángulos de difracción para cada color correspondientes a las longitudes de onda de excitación, se realizó una curva de calibración. Con la gráfica de calibrado, se puede medir los ángulos de los diferentes colores generados por la luz blanca LED de la linterna usada, a partir de la mediciones de las posiciones angulares de los colores en el limbo graduado. Los ángulos correspondientes sirven para programar al servomotor en la posición angular deseada para cada color.

Para la obtención de la curva de calibración, se utilizó como patrón de calibrado, el espectro de una lámpara de mercurio y el espectrogoniómetro, facilitados por el Departamento de Física de la USFQ. El espectrogoniómetro (Figura 3-9) es un dispositivo que consta de una plataforma giratoria en la que se coloca la red de difracción y un círculo graduado, de modo que se puede medir los ángulos de desviación de las líneas espectrales. Consta de dos tubos, uno como colimador y el otro como anteojo.

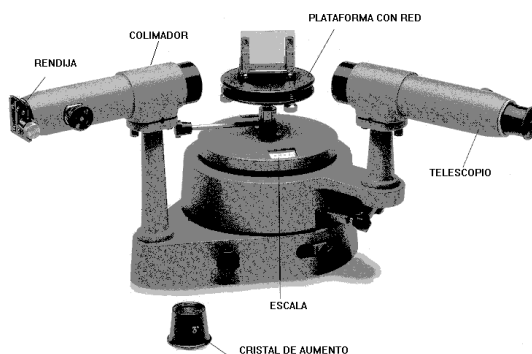


Figura 3-9: Esquema de las partes del espectrogoniómetro utilizado

Para observar el espectro y efectuar las medidas, se colocó la lámpara de mercurio estabilizada por unos segundos, frente a la rendija de entrada del colimador, Figura 3-9, una

vez localizado el máximo central, se movió ligeramente todo el conjunto del aparato respecto de la lámpara, con el fin de que la iluminación observada por el ojo sea la mejor posible.

Para buscar las líneas del espectro de la lámpara de mercurio que están situadas a uno y a otro lado del máximo central fue necesario girar manualmente la red de difracción. Se realizó un minucioso barrido observando con el ojo para localizar las distintas líneas del espectro.

Las posiciones angulares θ observadas por la lámpara de mercurio en sus respectivas longitudes de onda para las líneas espectrales están resumidas en la Tabla 3-3. *En el caso de la aparición de un doblete (II), se consideró como una sola línea midiendo la posición angular del centro.* La curva de calibración (ver Figura 3-10) se realizó graficando las longitudes de onda conocidas de las líneas espectrales del mercurio (Solá & Fernández, 2006) respecto a la posición angular promedio de los ángulos medidos hacia la izquierda y hacia la derecha del máximo central. *La posición angular del máximo central en el limbo graduado es: $\theta_0 = 234^\circ$*

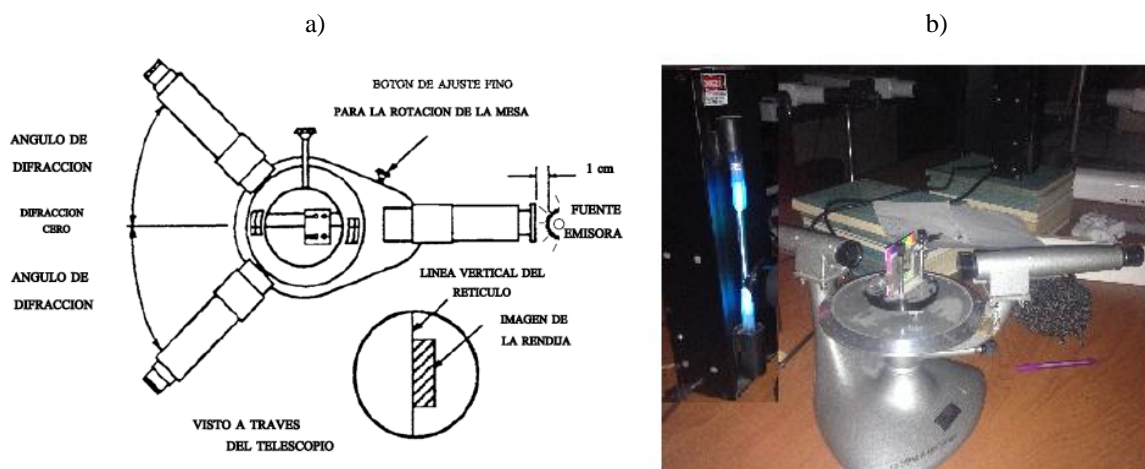


Figura 3-10: Medición de las líneas espectrales de la lámpara de mercurio

a) Forma en que se llevó a cabo las lecturas del ángulo de difracción, b) medición con la lámpara de mercurio.

Tabla 3-3: Posiciones angulares, θ , de la lámpara de mercurio con el espectrogoniómetro empleado (Solá & Fernández, 2006)

Línea	Longitud de onda λ/nm^*	θ izq	θ der	$ \theta_o - \theta $ Izq.	$ \theta - \theta_o $ Der.	Promedio $ \theta - \theta_o $
Violeta	404.8	209.8	257.8	24.2	23.8	24
Azul-violácea	435.8	207.8	259.7	26.2	25.7	25.95
Verde (I)	495.9	204	263.2	30	29.2	29.6
Verde manzana intensa	546.1	200.3	266.9	33.7	32.9	33.3
Amarilla (doblete)	580	198	269	36	35	35.5
Anaranjada	615.2	195	271	39	37	38
Roja (última)	671.6	191	275	43	41	42

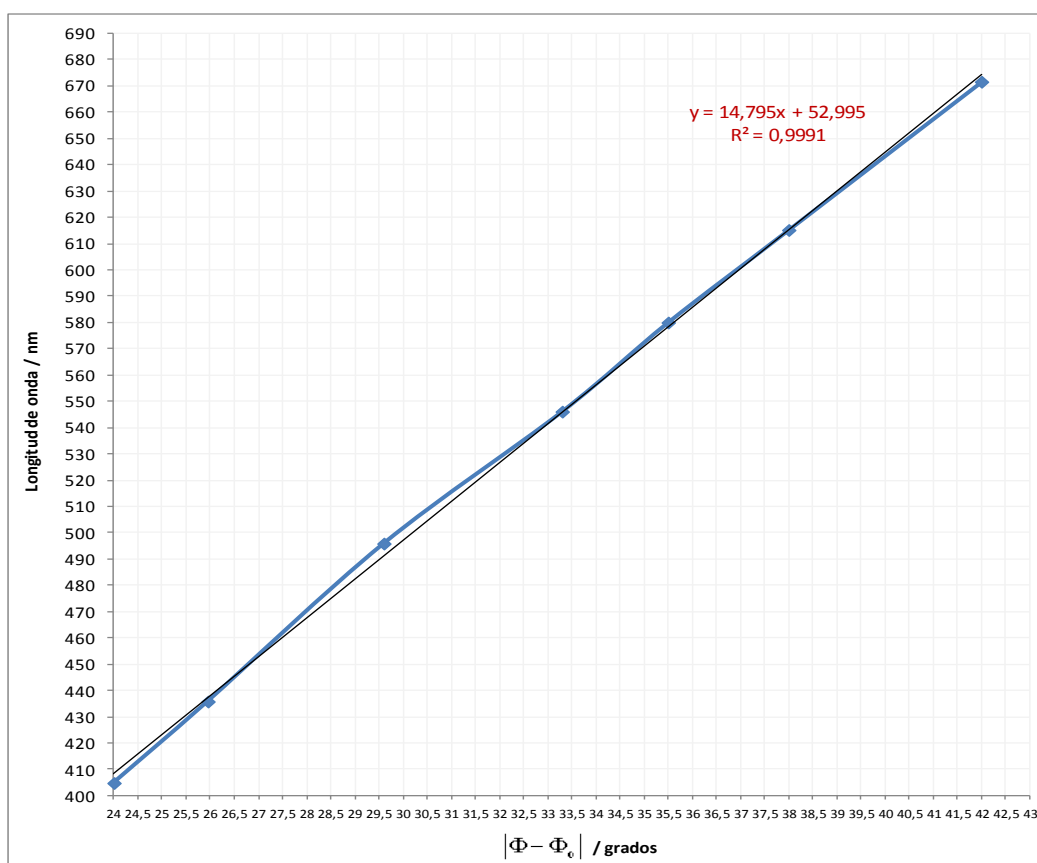


Figura 3-11: Curva de calibración de la red de difracción de 1000 líneas/mm

Una vez obtenida la gráfica de calibrado (Figura 3-11), se procedió a medir las posiciones angulares de los colores emergentes de la red de difracción, utilizando el haz de luz blanca LED de la linterna empleada como fuente de iluminación. Debido a la dificultad en

detectar todas las líneas espectrales que se observaron con la lámpara de mercurio, se escogieron solo cinco colores: violeta, azul, verde intenso, anaranjado y rojo. En la **Tabla 3-4**, se muestran las medidas de las posiciones angulares de los colores observados considerando el primer orden de difracción. Las longitudes de onda correspondientes a cada color, se obtuvieron a partir de la ecuación obtenida de la gráfica de calibrado:

$$\lambda = 14.795 \theta - 52.995 \quad \text{Ec. 3-2}$$

Tabla 3-4: Ángulos de difracción y longitudes de onda de la red empleando la luz LED blanca

Colores	θ Grados	Longitud de onda λ/nm
Violeta	25.017	423.121
Azul	29.249	485.734
Verde intenso	33.735	552.104
Amarillo	37.191	603.235
Rojo	42.198	677.314

El rango de las longitudes de onda correspondientes a los colores (Skoog et al., 2013) son:

- Violeta: 380 – 450 nm
- Azul: 450 – 495 nm
- Verde: 496 – 570 nm
- Amarillo: 570 – 590 nm
- Naranja: 590 – 620 nm
- Rojo: 620 – 750 nm

Basándose en estos rangos, las longitudes de onda obtenidas correspondientes a cada color están dentro de los límites, por lo que se puede confirmar que la calibración resultó satisfactoria

Los ángulos medidos sirvieron de guía para programar al servomotor y que este gire automáticamente para dar cada una de las posiciones referentes a los colores seleccionados. La longitud entre el lente colimador a la red, y la longitud entre la red y la formación del espectro fueron consideradas en la construcción del equipo para establecer las distancias correctas entre

la fuente de iluminación y la red montada sobre el servomotor, así como entre la red y la ubicación adecuada del compartimento de la muestra.

3.3 Portamuestra

Los tipos de celda empleadas para la medición de fluorescencia fueron celdas de cuarzo prestadas en el Laboratorio de Química de la USFQ y celdas de vidrio óptico, importadas de Science Outlet desde Amazon. Ambos tipos de celda tiene sus 4 caras transparentes y sus dimensiones son: $45 \times 12.5 \times 12.5$ mm con capacidad de 4.5 mL.

En función de las características de las celdas empleadas y sabiendo que la fluorescencia que emite la muestra se da en todas las direcciones, se tuvo que diseñar el compartimento de la muestra con cuatro orificios, cada uno ubicado en las 4 caras del portamuestra, Figura 3-12. Dos orificios de las caras laterales son diseñados para recibir la iluminación de las LED, el orificio de la cara frontal está diseñado para recibir la señal (color) que sale de la red de difracción. Estos orificios son del tamaño de la rendija de salida ubicada a la salida de la fuente de iluminación, 2.5 mm de ancho por 3.5 cm de alto. Un cuarto orificio ubicado en la cara posterior del portamuestra está diseñado en función de la dimensión del detector y para que este reciba directamente la señal.

El portamuestra diseñado, se montó en la parte central de una caja externa de tal manera que reciba la iluminación de las LED para medir fluorescencia mediante el detector. (ver Figura 3-14)

3.4 Sistema de LED en Lugar de Monocromador de Emisión.

En principio, la luz emitida por la muestra debía pasar por una segunda red de difracción, sin embargo, la fuente de iluminación no era lo suficientemente potente para alcanzar la segunda red y por ende que la señal pase al sensor para su detección. Por ese motivo y considerando los cinco colores escogidos para el primer monocromador, se diseñó un sistema de 5 LED de alto brillo, cada LED corresponde a un color específico, los cuales se ubicaron en hilera en la parte interior de las caras laterales del compartimento de la muestra a 90° del detector. En la parte lateral derecha se ubicaron los LED verde, violeta y azul y en la parte lateral izquierda se ubicaron los LED amarillo y rojo. El arreglo de LED se muestra en la Figura 3-14.

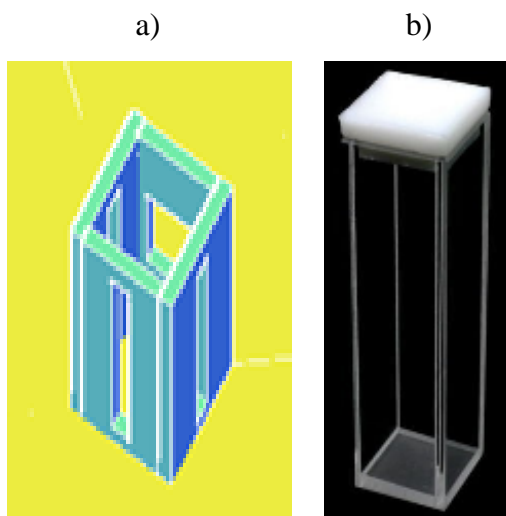


Figura 3-12: Portamuestra. a) Vista superior del portamuestra construido con 4 orificios en las 4 caras de éste, b) Celda de cuarzo usada para los análisis.

La ubicación de las LED se basó en el hecho de que la fluorescencia se mide frecuentemente en un ángulo de 90° en relación a la luz de excitación, para evitar interferencias de las luces de excitación; así, sólo la luz dispersa por la muestra provoca luz que será captada por el sensor, mejorando la relación señal-ruido, y reduciendo el límite de detección.

3.5 Detector

El sensor empleado es un fotodiodo de silicio modelo HS1010CE (Figura 3-13), importado de BaseLine Chromtech desde eBay. Su alta sensibilidad y velocidad de respuesta en el rango de longitudes de onda que van desde 300 nm a 1000 nm, lo hace muy útil en instrumentos de análisis, sobre todo, en los detectores espectrofotométricos. El fotodiodo está cubierto de una estructura de plástico con una ventana plana.



Figura 3-13: Fotodiodo de silicio modelo HS1010CE

En la **Tabla 3-5**, se detallan las principales características de este sensor.

Tabla 3-5: Principales características del fotodiodo de silicio modelo HS1010CE

Párametro	Descripción
Tensión inversa	30 V
Área activa de detección	10.0mm x 10.0mm
Max pico de longitud de onda	700 nm
Respuesta espectral	300 - 1000 nm
Temperatura de funcionamiento	-40 a + 100 °C
Temperatura de almacenamiento	-40 a + 100 °C

En la Figura 3-14, se muestra el esquema del compartimento de la muestra completo. Las LED están distribuidas a los costados laterales del compartimento y el sensor está ubicado lo más cercano posible en la parte posterior del portamuestra a 90° con respecto a los LED.

El compartimento de la muestra está encima de una plataforma de 5.5 cm de alto para coincidir con la altura de la red de difracción montada sobre el servomotor. Tiene una tapa removible en la parte superior para la manipulación de la muestra, los LED, el sensor y, adicionalmente, para evitar filtración de luz, el momento de realizar los análisis.

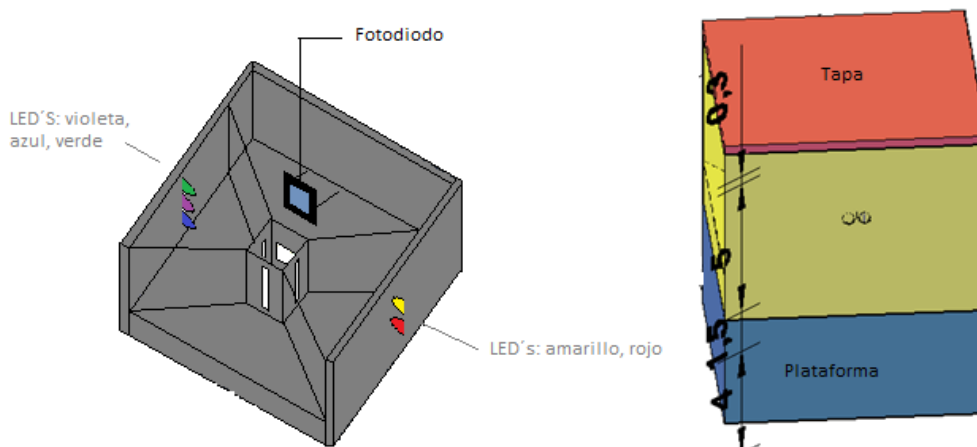


Figura 3-14: Vista superior y lateral del compartimento de la muestra

3.6 Adquisición de datos: Tarjeta NI MyDaq (National, 2014)

El sistema de adquisición de datos en tiempo real, así como el control automático del equipo se realizó empleando la tarjeta electrónica, MyDAQ (Figura 3-15), de reducidas dimensiones con comunicación USB a través de LabVIEW. Es importante mencionar que esta tarjeta fue adquirida con el financiamiento de la USFQ a través del programa de Chancellor Grants 2013.



Figura 3-15: NI MyDAQ

La MyDAQ al ser utilizada como un laboratorio real portátil, diseñada para la experimentación práctica en cualquier entorno, se escogió por su fácil manejo, sus reducidas dimensiones y su bajo costo comparado con otros sistemas de adquisición. Sus propiedades la hacen ideal, para programar la MyDAQ con un microcontrolador PIC 16F870 enviando los pulsos de las salidas digitales al PIC que darán las posiciones angulares calculadas (ver **Tabla 3-4**) al servomotor con la red. Facilitar el procesamiento de las señales por el sensor, el encendido/apago de las LED y el almacenamiento de la lectura realizada durante el muestreo. La electrónica y el control automático del equipo se detallan en el Capítulo 4.

En esta sola tarjeta, se tendrá la posibilidad de controlar todos los sistemas, elementos del equipo diseñados y construidos, ya que esta interfaz posee entradas y salidas, tanto digitales como analógicas que harán posible la comunicación entre los sistemas y los programas implementados.

3.6.1 Detalles técnicos

3.6.1.1 Dimensiones

Las dimensiones de la tarjeta NI MyDAQ se pueden apreciar en la Figura 3-16. Tiene 147 mm de alto, 89 mm de ancho, 23 mm de profundidad y apenas 173 g de peso.

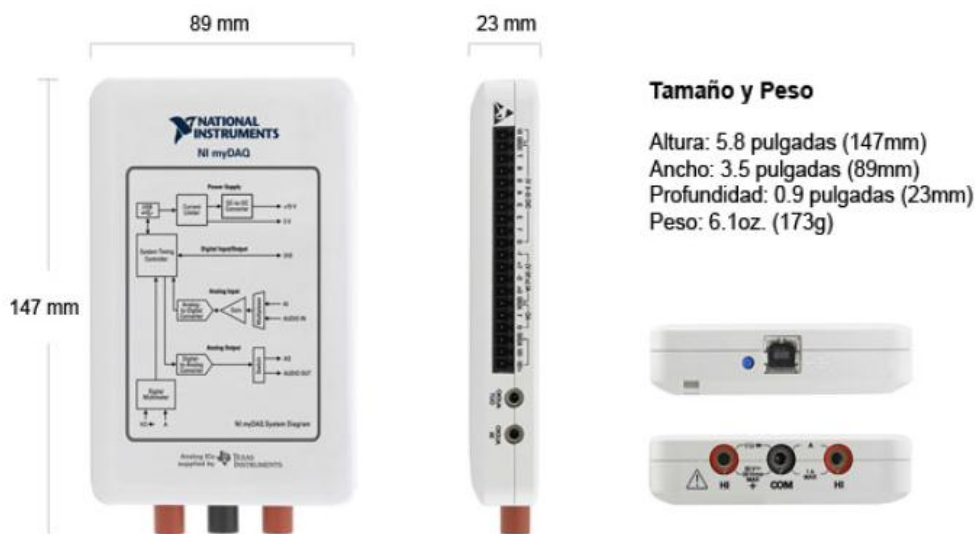


Figura 3-16: Dimensiones de la tarjeta NI MyDAQ. Fuente: (National, 2014)

3.6.1.2 Hardware interno

La MyDAQ contiene 8 entradas o salidas digitales (DIO = Digital Input/Output), así como 2 entradas analógicas y 2 salidas analógicas. También posee una entrada analógica con su respectiva salida analógica para audio mediante un jack de 3.5 mm. Además posee tres terminales que sirven para utilizar el multímetro digital (DMM) mediante un VI que nos muestra dicho multímetro.

Internamente esta tarjeta, tiene varios subsistemas ya analizados en la electrónica digital y analógica convencional, tales como, amplificadores operacionales, reguladores de voltaje, convertidores ADC y DAC, amplificadores de instrumentación, registros de desplazamiento y multiplexores. Todos estos subsistemas reciben y entregan datos del controlador principal USB-STC3, desarrollado por National Instruments. Es importante reconocer que la tarjeta también posee una fuente de voltaje que está limitada en corriente.

3.6.1.3 Especificaciones

- **Entradas Analógicas**

Son 2 que pueden ser configuradas como entradas de voltaje diferencial de alta impedancia de propósito general o como entradas de audio. La relación máxima de muestreo es de 200 Ks/s, es decir de 200000 muestras por segundo en cada canal, lo

que permite ser muy útil a la hora de adquirir formas de onda. En el modo de propósito general se puede obtener señales desde -10 V hasta +10V.

- **Salidas Analógicas**

Son 2 salidas referenciadas a tierra, que pueden ser configuradas como salidas de propósito general o salidas de audio. En el modo de propósito general se puede generar señales de ± 10 V. Las salidas son actualizadas constantemente ya que al igual que las entradas, muestran 200000 muestras por segundo.

- **Entradas/Salidas digitales (DIO)**

Hay un solo puerto con 8 líneas digitales que pueden ser utilizadas como entradas o salidas. Cada línea es un interfaz de función programable, PFI, ya que se pueden configurar por software como entradas o salidas digitales o como un contador digital. Las entradas pueden ser hasta de +5 V DC para circuitos, las salidas son a 3.3 V DC.

- **Temporizadores/Contadores**

Posee un temporizador interno de 32 bits de resolución que dispone de 5 líneas para entrada o salida de contadores respectivamente. La base de tiempo del reloj interno es de 100 MHz.

3.6.1.4 Fuentes de poder

La interfaz MyDAQ cuenta con 3 fuentes de poder independientes, ± 15 V, ideales para alimentar circuitos electrónicos analógicos, tales como amplificadores operacionales, reguladores, entre otros.

En la Figura 3-17, se puede apreciar los pines para conectores que posee la MyDAQ: canales de entrada y salida analógicos, el puerto digital DIO enumeradas del 0 al 7 y los conectores para los canales de audio. Además se debe tomar en cuenta que posee dos tierras diferentes para la parte analógica AGND y la parte digital DGND

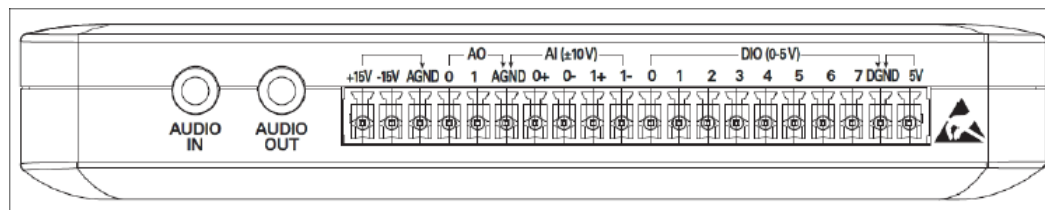


Figura 3-17: Vista lateral de la tarjeta NI MyDAQ. Fuente: (National, 2014)

El desarrollo del instrumento virtual, implica la programación de la MyDAQ con el software LabVIEW para todo el funcionamiento del instrumento. El interfaz para dicha tarea se explica en el Capítulo 0.

3.7 Ensamblado del equipo

Todos los componentes del instrumento (la fuente de iluminación, el monocromador de excitación, el compartimento de la muestra que incluye el arreglo de las LED y el detector que fueron diseñados y construidos) se ensamblaron en una sola estructura (carcasa), Figura 3-18, para unificar la parte mecánica y electrónica del instrumento. La estructura final de la carcasa se diseñó en Autocad 2014, considerando todas las calibraciones y ajustes realizados para cada componente.

La estructura en forma de L, en su parte interior consta de tres cámaras: la primera corresponde a la fuente de iluminación y la red de difracción, la segunda es el compartimento de la muestra con las LED y el sensor de detección, y la tercera corresponde a la parte electrónica (componentes electrónicos y tarjeta MyDAQ). Exteriormente, el instrumento es desmontable en la parte superior. En una de las caras laterales se encuentra una pequeña ventana para visualizar los colores emergentes de la red de difracción y en la parte trasera está un switch que conecta el instrumento a la fuente de corriente/poder externa y un puerto para la conexión de la DAQ al computador mediante un cable USB.

El material de la carcasa (por su versatilidad y bajo peso) es acrílico transparente recubierto de vinil negro mate para aislar lo que más se pueda la luz de los exteriores.



Figura 3-18: Vista superior del espectrofluorímetro desarrollado



Figura 3-19: Vista lateral del espectrofluorímetro desarrollado

Un detalle completo del costo de los materiales empleados para la construcción del instrumento se encuentra en el ANEXO II. Las dimensiones de todo el instrumento realizadas en Autocad 2014, se encuentran detalladas en el ANEXO III.

4. Electrónica y Control Automático del Espectrofluorímetro

4.1 Sistema Electrónico del instrumento

En la Figura 4-1 se muestra un diagrama de flujo del sistema de control de los circuitos empleados en la automatización del instrumento.

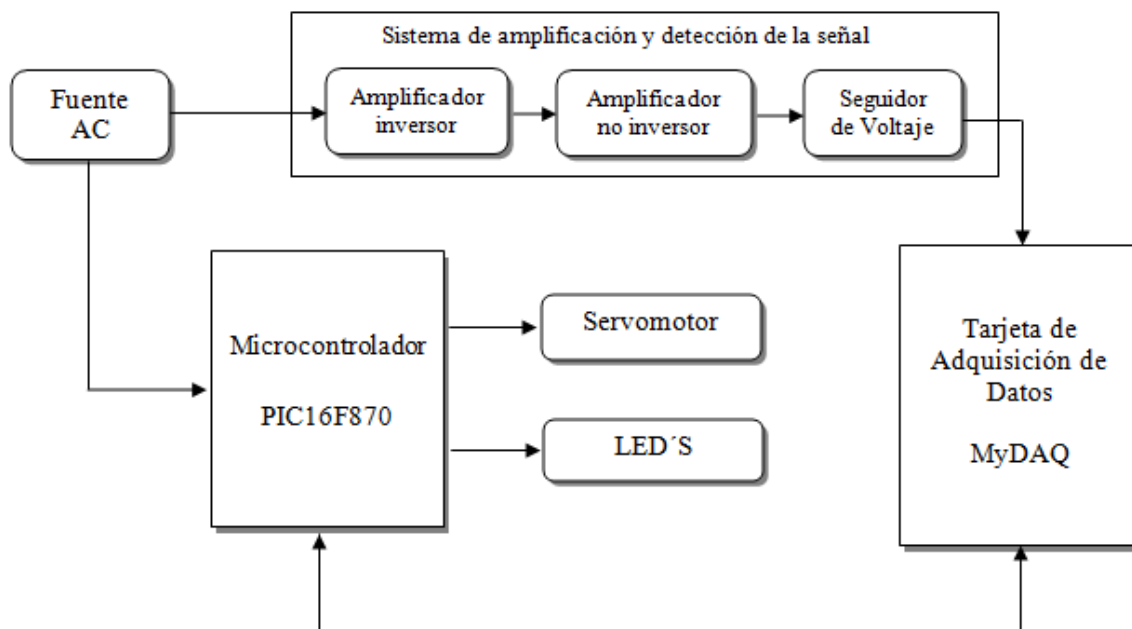


Figura 4-1: Diagrama esquemático de la parte electrónica del instrumento.

La tarjeta de adquisición de datos, MyDAQ, permite procesar y reconocer, por medio de LabVIEW, en el computador: el sistema de amplificación y detección de la señal, funcionamiento del microcontrolador y por ende el control del servomotor y de las LED. La tarjeta MyDAQ puede generar y medir señales de máximo ± 10 V, por ello el sistema electrónico se diseñó de tal manera que la DAQ pueda aceptar las señales dentro de este rango.

En el ANEXO III, se encuentra el circuito completo del instrumento. A continuación se detallan las partes que componen la electrónica del mismo.

4.1.1 Fuente de alimentación de +5 V, +6 V y -6 V DC

El funcionamiento de la fuente de alimentación se explica basado en el circuito que se muestra en la Figura 4-2. El circuito está formado por varios componentes muy importantes, el primero de ellos es el *transformador* de 12 V – 1 A, el cual toma el valor de corriente alterna del toma corriente (enchufe) de 110 V AC (o de 220 V AC en algunos países) a través de su bobina primaria y lo convierte a dos tensiones de voltaje más pequeño 12 V AC en la bobina secundaria, esta última se puede observar en el diagrama esquemático marcada como - 12 VAC – 0 – 12 VAC.

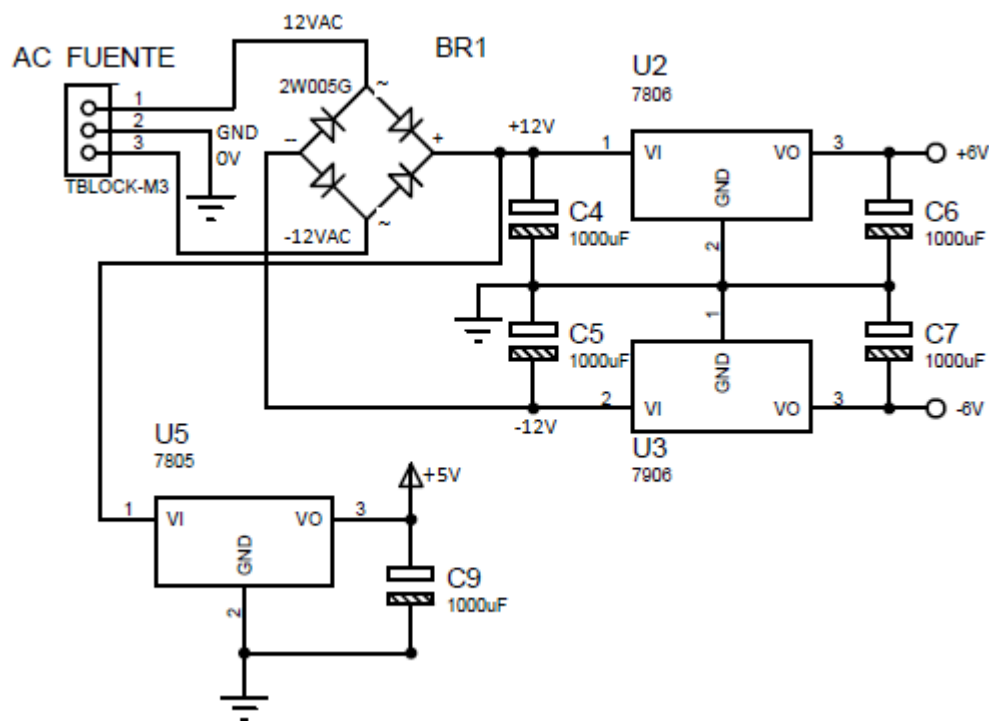


Figura 4-2: Circuito electrónico de la fuente de alimentación de +5 V, +6 V y -6 V DC.

Los voltajes de corriente alterna obtenidos se deben pasar a corriente directa o continua, es decir a un voltaje constante pulsante, este proceso se llama *rectificación*. Para realizar dicha labor se utilizó el montaje con cuatro diodos que se muestra en el diagrama esquemático, esta estructura es conocida como *punteo rectificador* (2W005G) de diodos. Dicho circuito se puede obtener conectando cuatro diodos independientes, pero se empleó un dispositivo que tiene los 4 diodos en un solo paquete.

Las salidas del transformador marcadas con 12VAC se conectan a las entradas del puente rectificador que tienen el símbolo de corriente alterna ~. Las salidas del puente

rectificador están marcadas con el símbolo + y – van a alimentar los reguladores de voltaje de +6 V (7806) y de -6 V (7906) respectivamente.

El cable central de la bobina secundaria del transformador se conecta a la tierra de los dos reguladores de voltaje que están más adelante, con el fin de conformar la tierra de corriente continua general para el circuito. Hasta este punto, el voltaje que se ha obtenido a la salida del puente rectificador no está regulado. Por lo tanto, puede variar de acuerdo a las fluctuaciones de la línea de corriente alterna que alimenta a la bobina primaria.

Para mejorar la calidad de la señal que se ha obtenido se utilizan dos condensadores o capacitores de 1000 μF (C4 y C5 en la Figura 4-2), uno de ellos conectado entre el voltaje positivo que va a la entrada del regulador de +6 V (7806) y la tierra de corriente continua, y el otro a la entrada del regulador de -6 V (7906) y la misma tierra. Estos capacitores son de filtro, hacen que el voltaje pulsante se parezca más a la corriente directa DC, sin embargo presentan un voltaje de rizo de pérdida, es por eso que se conectan a los dos reguladores de voltaje de 6 V, el uno positivo y el otro negativo, con el fin de mantener a su salida un nivel constante, a pesar de las variaciones de su voltaje de entrada. En el circuito, las salidas de los dos reguladores 7806 y 7906 van conectados a dos capacitores de 1000 μF (C6 y C7 en la Figura 4-2) y a los conectores de salida. Estos capacitores dan estabilidad evitando caídas bruscas de tensión a la salida de los reguladores.

Se emplea un tercer regulador positivo de 5 V (7805), que toma su alimentación de la salida del rectificador de +12 V, su salida va también a un capacitor (C9) de 1000 μF y al conector de salida. Está marcado en el circuito impreso como +5V.

La *fuentes de alimentación* DC de +6V y -6 V, van alimentar el sistema de amplificación para el fotodiodo empleado como detector y la fuente de +5V DC, alimentan al Microcontrolador PIC16F870 cuyas salidas digitales controlan las LED y el servomotor. Todo el sistema se conecta a la DAQ que puede generar y reconocer las señales en un rango máximo de ± 10 V.

4.1.2 Microcontrolador

El microcontrolador programable, PIC, es un Controlador de Interfaz Periférico, es decir, es un circuito integrado programable, el cual contiene todos los componentes de un

computador normalmente pero con limitadas prestaciones que están contenidas en un solo chip. Dispone de una memoria pequeña pero lo bastante eficiente, para almacenar y llevar a cabo una única tarea y gracias a su reducido tamaño suele incorporarse en el propio dispositivo que controla. Su arquitectura es tipo Harvard, es decir que tiene una unidad central de proceso (CPU) conectada a dos memorias, una de ellas contiene solamente las instrucciones del programa (Memoria de Programa), y la otra únicamente almacena los datos (Memoria de Datos). El CPU se conecta a las dos memorias por medio de dos buses o canales diferentes, facilitando que la CPU acceda de forma independiente y simultánea a la memoria de las instrucciones y a la de datos, mejorando así la velocidad del proceso. En general, los elementos de un microcontrolador son: (Angulo Usategui, Martínez Angulo, & Romero Yesa, 2006)

- Unidad Central de proceso (CPU)
- Memoria Central: incluye la memoria de programa y de datos
- Buses o canales de control, datos y direcciones.
- Líneas de Entrada/Salida (puertos): Son los pines del microcontrolador que ayudan a comunicarse con el exterior, es decir, envían o reciben datos digitales al o desde los puertos periféricos conectados al sistema. Manejan la información en paralelo y se agrupan en conjuntos que reciben el nombre de **puertos o pórtricos**, los cuales pueden configurarse independientemente cada uno de ellos como entrada o salida.
- Recursos auxiliares: Serie de complementos que aumentan su potencia y flexibilidad, entre ellos están:
 - Generador de impulsos de reloj, encargado de la sincronización del sistema.
 - Temporizador para controlar los tiempos y contar los ciclos del programa.
 - Perro guardián (*watchdog*) provoca una reinicialización cuando el programa se queda colgado.
 - Conversor Análogo/Digital y Digital/Análogo para recibir y enviar señales analógicas.
 - Comparador analógico para comprobar el valor de una señal analógica.
 - Sistema de protección ante fallos de alimentación.
 - Estado de reposo, para minimizar el consumo de energía.

4.1.2.1 Microcontrolador PIC 16F870

Se empleó el microcontrolador, modelo PIC 16F870, para recibir las señales digitales desde la MyDAQ y generar los pulsos para el movimiento del servomotor y el funcionamiento de las LED. El microcontrolador PIC 16F870, presenta las siguientes principales características:

- Memoria de programa de 2K de 14bits, EEPROM.
- Dispone de una pila de 8 niveles para permitir llamadas a subrutinas anidadas.
- Juego reducido y sencillo de 35 instrucciones.
- Encapsulado de plástico DIP (Dual in line) con 28 pines, ordenados en dos hileras paralelas.
- Rango máximo de frecuencia de trabajo de 20 MHz.
- Tiene 22 líneas de entrada/salida digitales, divididas en 3 puertos: Puerto A = 6 pines (5 pines A/D), Puerto B = 8 pines, Puerto C = 8 pines.
- Voltaje de alimentación, V_{DD} , entre 2.5 y 5 V.

En la Figura 4-3, se muestra el esquema del microcontrolador PIC 16F870 y en la **Tabla 4-1**, se da una breve explicación de la distribución de los 28 pines.

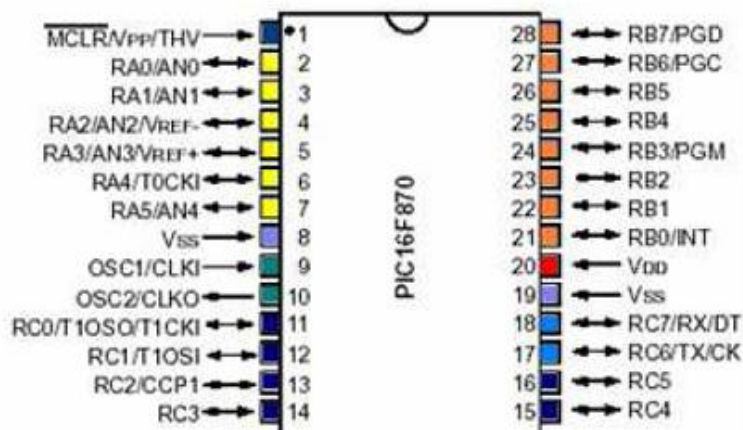


Figura 4-3: Esquema del microcontrolador empleado, PIC 16F870

Tabla 4-1: Distribución de los 28 pines en el PIC 16F870

Tipo de Pin	Asignación	Uso
PIN 1	MCLR/V _{pp} /THV	Reset del microcontrolador, introduce el voltaje de programación.
PIN 2 - PIN 7	RA0/AN0 a RA5/AN5	Puerto A, con 6 pines (color amarillo, Figura 4-3), configurados como entradas o salidas.
PIN 8	V _{ss}	Para polarización del microcontrolador, 0V
PIN 9	OSC1/CLKIN	Entrada del circuito oscilador externo.
PIN 10	OSC2/CLKOUT	Auxiliar del circuito oscilador.
PIN 21 - PIN 28	RB0 a RB7	Puerto B, con 8 pines (color naranja, Figura 4-3), configurados como entradas o salidas.
PIN 11 - PIN 18	RC0 a RC7	Puerto C, con 8 pines, (color azul, Figura 4-3), configurados como entradas o salidas.

En la Figura 4-4, se muestra el circuito correspondiente al microcontrolador y sus conexiones externas al servomotor, LED y la DAQ.

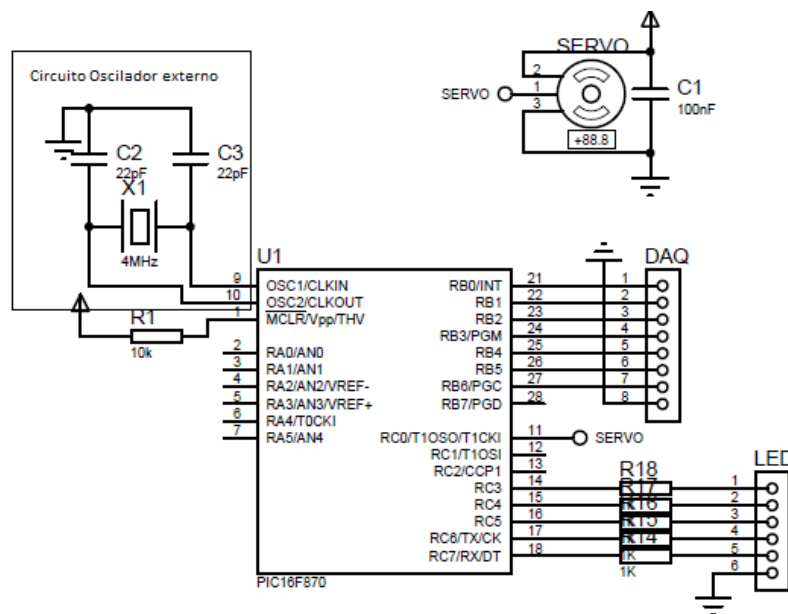


Figura 4-4: Circuito oscilador externo conectado al PIC16F870. Entradas y salidas digitales del puerto B a la DAQ. Salidas digitales del puerto C al servomotor y a las LED

Para que el PIC funcione correctamente necesita estar conectado al oscilador externo que da una señal de reloj, es el corazón del PIC. En el circuito, consta de un cristal de cuarzo de 4 MHz que da una velocidad de trabajo al microcontrolador y dos condensadores de 22 pF

para la polarización externa, que están conectados al pin 9 (OSC1/CLKIN) como entrada del circuito oscilador externo y al pin 10 (OSC2/CLKOUT) como auxiliar del circuito externo. Una resistencia de 10K conectada al pin 1, introduce los +5 V de la fuente de alimentación al microcontrolador y actúa como reset del mismo.

El puerto C0, (pin 11) está conectado como salida al servomotor para que trabaje con +5 V y los pulsos enviados desde la MyDAQ, para que gire. Al servomotor está conectado un condensador de 100 nF (C1) para evitar que oscile o de pulsos cuando esté en funcionamiento al girar la red de difracción.

Los pines 14 al 18, del puerto C, están configurados como salidas a las 5 LED empleadas para que estas enciendan y apaguen, los pines están conectados así:

- Puerto RC3 (pin 14) – LED amarillo.
- Puerto RC4 (pin 15) – LED verde.
- Puerto RC5 (pin 16) – LED rojo.
- Puerto RC6 (pin 17) – LED azul.
- Puerto RC7 (pin 18) – LED violeta.

Los pines del 21 al 28, correspondientes al puerto B, están configurados para recibir las señales desde la MyDAQ que envía pulsos al microcontrolador para girar el servomotor y controlar el apagado y encendido de las LED. El puerto RB2 (pin 23) da la posición de lectura, el puerto RB3 (pin 24) da el cambio de medición (modo absorción o modo fluorescencia) y el puerto RB4 (pin 25) es un reset de la posición del servomotor, lo regresa a su estado inicial.

El proceso del desarrollo del código y grabación del microcontrolador se realizó de la siguiente manera:

1. Se escribió el código assembler (texto) en lenguaje C, generando un archivo con extensión .ASM, empleando MPLAB, un software que ofrece Microchip gratis en su página web para estos fines.
2. Se compiló el código assembler, generando un archivo con extensión .HEX, empleando el programa de MPSAM que viene integrado en MPLAB.

3. Se grabó (transfirió) el programa desde la PC al micro mediante el programador, PICSTART PLUS. Es un programador de MICROCHIP bien integrado con MPLAB.
4. Una vez que se tuvo el PIC con el programa dentro, se probó en la placa del circuito diseñado.

Todo el código realizado y compilado, se encuentra en el ANEXO IV.

4.1.3 Sistema de amplificación del detector

El diagrama del circuito para la amplificación del fotodiodo, empleado como detector se muestra en la Figura 4-5. El sistema de amplificación se monta a partir de varios componentes electrónicos, que incluyen amplificadores operacionales, condensadores y resistencias. A continuación, se dará una breve explicación de los principales componentes usados.

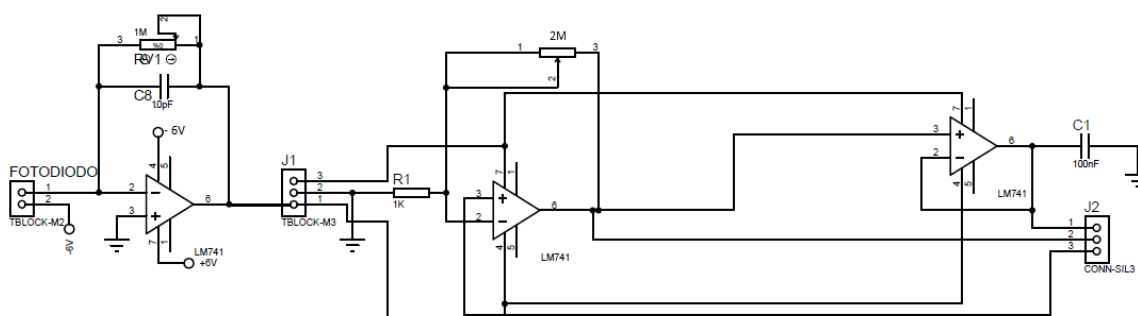


Figura 4-5: Diagrama del circuito del sistema amplificador para el fotodiodo. Consta de tres circuitos: un amplificador inversor, un amplificador no inversor y un seguidor de voltaje. El voltaje de salida se conecta a un canal análogo de entrada de la DAQ

4.1.3.1 Amplificador Operacional LM741 (Nave, 2005)

Los amplificadores operacionales empleados para el sistema de amplificación, son el modelo LM741, que contiene internamente un amplificador diferencial, capaz de amplificar la diferencia de las dos tensiones de entrada.

Como se ve en la Figura 4-6, este tipo de amplificador, dispone de ocho pines, tres de ellos se usan para funciones especiales, los demás pines tienen asignadas las siguientes funciones:

- Pin 2: entrada de señal inversora, se indica con un signo negativo.
- Pin 3: entrada de señal no inversora, se indica con un signo positivo
- Pin 6: terminal de salida.

- Pin 7: terminal de alimentación positiva (+Vcc)
- Pin 4: terminal de alimentación negativa (-Vcc)

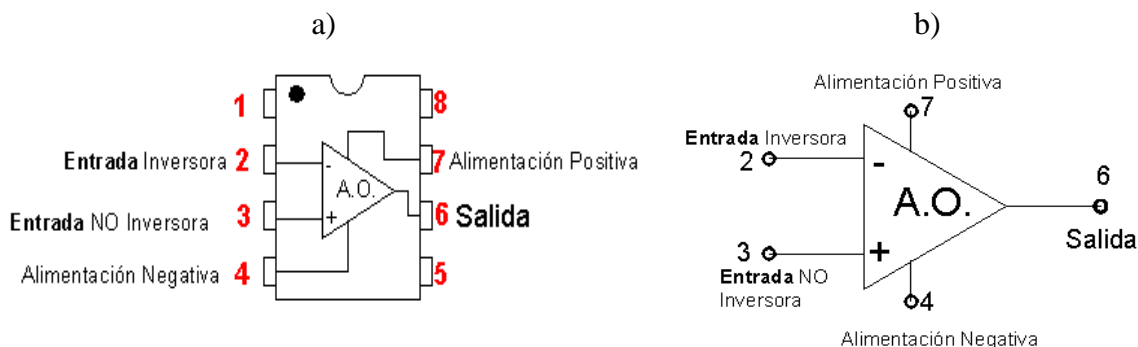


Figura 4-6: Aspecto real y símbolo de un amplificador operacional LM741

Este tipo de amplificador presenta las siguientes características más importantes: (Nave, 2005)

- **Alta impedancia (resistencia) de entrada:** implica que la intensidad de corriente por los terminales de entrada sea despreciable.
- **Baja impedancia de salida:** pudiendo atacar cualquier carga (circuito) sin que su funcionamiento se modifique dependiendo del valor de ésta.
- **Tensión máxima de alimentación:** $\pm V_{cc} = \pm 18 \text{ V}$. Implica que la tensión de salida nunca podrá superar a la de alimentación.
- **Alta ganancia de tensión en lazo abierto** (sin conectar ningún componente entre la salida y cualquiera de las entradas) con pequeños valores de tensión en los terminales de entrada se consiguen grandes tensiones de salida.

El sistema de amplificación recibe una alimentación negativa, -6 V, y consta de tres sistemas de amplificación que se detallan a continuación.

4.1.3.2 Amplificador inversor

La Figura 4-7, ilustra la primera configuración básica del sistema de amplificación: el amplificador inversor. Como se aprecia, la realimentación al amplificador operacional desde la salida a través de R_1 (1 M Ω) es negativa, la señal se aplica a la entrada inversora (-) a través del fotodiodo, estando el terminal de la entrada no inversora (+) del amplificador operacional directamente conectado a tierra. Se emplea esta configuración para que los voltajes detectados por el fotodiodo sean amplificados y positivos.

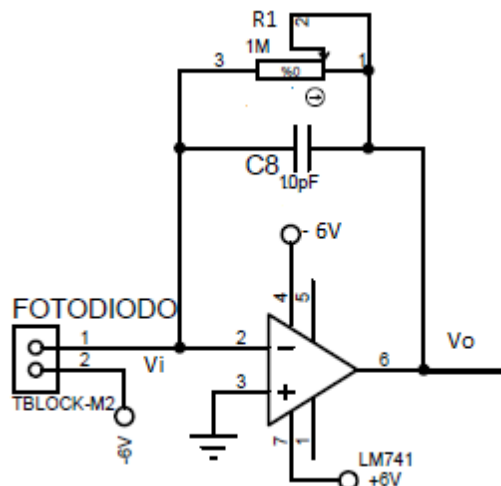


Figura 4-7: Circuito amplificador inversor

El factor de amplificación del circuito está dado por la ganancia del amplificador inversor:

$$G = \frac{V_0}{V_i} = -\frac{\text{Fotodiodo}}{R_1} \quad \text{Ec. 4.1}$$

De la Ec. 4.1, el valor de la tensión de salida se ajustó variando R_1 . La impedancia de entrada es igual a los valores que registra el fotodiodo, por lo que el voltaje de entrada y el fotodiodo únicamente determinan el valor de la corriente I , de esta manera la corriente que circula por R_1 es siempre I , para cualquier valor del fotodiodo.

4.1.3.3 Amplificador no inversor

Una vez que la señal de voltaje pasa por el primer sistema de amplificación, se aplica una segunda configuración, correspondiente a un amplificador no inversor, Figura 4-8. La diferencia respecto al inversor, está en que una resistencia R_1 (1 K Ω) se conectó a tierra y la señal de entrada V_i se conectó a la terminal no inversora (+) del segundo amplificador operacional. Esta configuración permite aumentar el nivel del voltaje de la señal de entrada, de tal forma que la señal que entra en la terminal no inversora sale amplificadas, es decir la ganancia (factor de amplificación del circuito) es más alta.

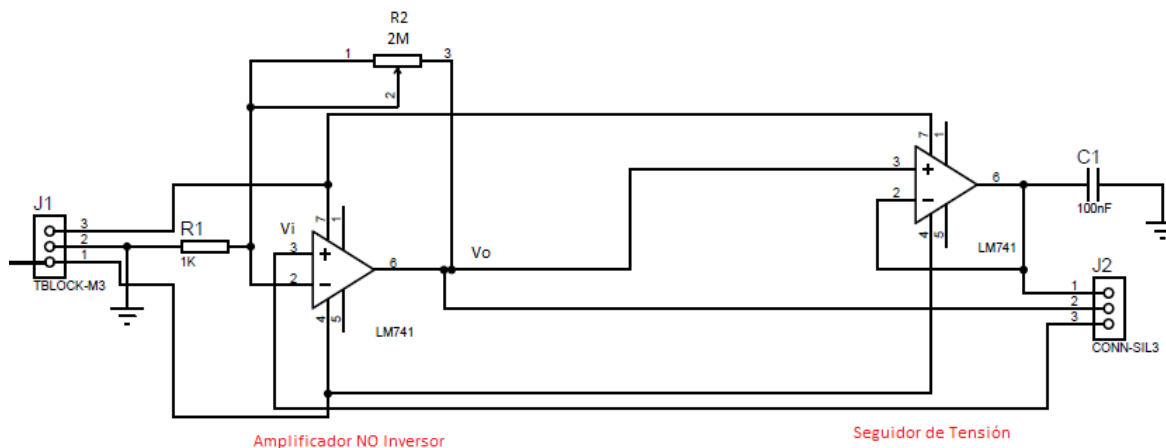


Figura 4-8: Circuito amplificador: no inversor - seguidor de tensión

Para este circuito, la ganancia está dada por la ecuación:

$$G = \frac{V_0}{V_i} = \left(1 + \frac{R_2}{R_1}\right) \quad \text{Ec. 4-2}$$

En este amplificador no inversor, la corriente a través de R_1 siempre determina la corriente a través de R_2 (2 MΩ), independientemente del valor de R_2 . Por lo que R_2 se utilizó como un control de ganancia lineal, capaz de incrementar la ganancia del circuito.

4.1.3.4 Seguidor de voltaje

Después de que la señal pasa por el amplificador no inversor, pasa a una tercera configuración, un seguidor de tensión, que actúa como buffer, ya que ayuda a estabilizar la señal y aislar los dos circuitos anteriores, de manera que el segundo no resulte una carga para el primero, pues la impedancia de entrada del operacional sería altísima. En este caso, el seguidor de tensión sirve para “adaptar impedancias”. En la Figura 4-8, se muestra el tercer circuito de amplificación.

El voltaje de salida del sistema de amplificación entra a un canal análogo de la MyDAQ, para registrar la señal digital que será enviada al PC, a través de LabVIEW.

4.2 Requerimientos para el desarrollo del instrumento virtual

Para la realización de este proyecto de tesis se necesitan de los siguientes factores que nos ayudarán en la creación de los VI (Instrumentos Virtuales), para el análisis de las variables electrónicas de elementos y circuitos, reales e implementados. A continuación se detallan algunos de los requisitos.

4.2.1 Programa LabVIEW 2012

Con la programación gráfica que ofrece LabVIEW se puede diseñar el instrumento virtual (VI) a medida, creando interfaces gráficas de usuario en la pantalla de la computadora para:

- Operar el programa de instrumentación mediante salidas digitales de la DAQ al microcontrolador que controla: el movimiento del servomotor (red de difracción) y el encendido/apagado de las 5 LED empleadas como fuentes de excitación para la fluorescencia. Un canal de entrada analógica del fotodiodo a la DAQ se utiliza para registrar la señal del sistema de amplificación para el fotodiodo.
- Controlar el hardware seleccionado.
- Analizar y guardar los datos adquiridos en un archivo de extensión de Excel, .xls., para su posterior análisis y uso.
- Visualizar los resultados de la detección de la señal en tiempo real, al graficar voltaje detectado (V) vs tiempo (s).

4.2.2 Sistemas de Adquisición de Datos

El sistema de adquisición de datos está basado entre la interfaz de comunicación de la PC con la Tarjeta NI MyDAQ, empleando LabVIEW. A través de este sistema, se pudo realizar las medidas de las magnitudes eléctricas reales de las señales de voltaje de la luz de absorción o emisión de la muestra empleada en tiempo real.

4.3 Creación del instrumento virtual (VI)

Mediante LabVIEW se desarrolló las interfaces para la automatización del instrumento. El panel frontal y el diagrama de bloques implementado se muestran en la

Figura 4-9. En el panel frontal se diseña la interfaz con el usuario, viene a ser la cara del VI y en el diagrama de bloques se programa en lenguaje G el funcionamiento del VI para la obtención de las señales electrónicas desde la PC a través de la tarjeta de adquisición de datos NI MyDAQ. A continuación se detalla, la interfaz desarrollada.

4.3.1 Control de la red de difracción y LED

El sistema de control del movimiento del servomotor se conforma de 5 posiciones (desde el 0 hasta el 4), correspondientes a los 5 colores que se desea detectar a partir de la red de difracción: violeta, azul, verde, amarillo y rojo, esta tarea se ejecuta siempre y cuando se

esté realizando la medición en modo *ABSORCIÓN*. Por el contrario, el sistema de control del encendido/apagado de las 5 LED correspondientes a los mismos colores se lleva a cabo siempre y cuando se esté operando en modo *FLUORESCENCIA*. Ambas tareas están controladas por las señales (pulsos) que recibe el microcontrolador desde la DAQ.

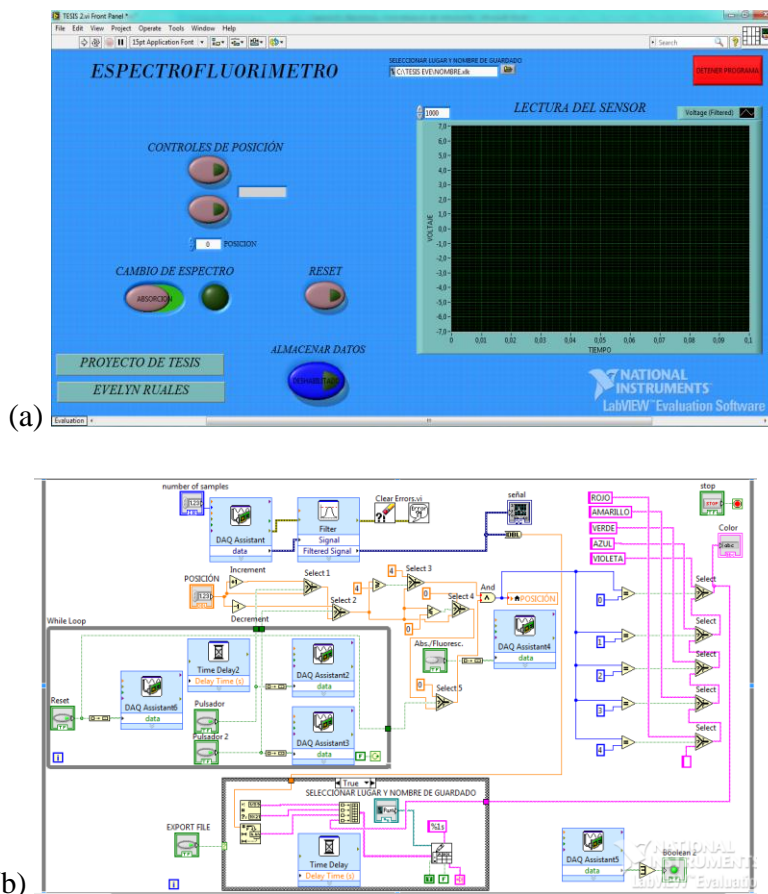


Figura 4-9: Programa en LabVIEW: a) Panel Frontal, b) Diagrama de Bloques

En la Figura 4-10, se aprecia el segmento del código, sub-VI, responsable de la tarea de posicionar al servomotor en los diferentes ángulos, basado en el código desarrollado para el microcontrolador.

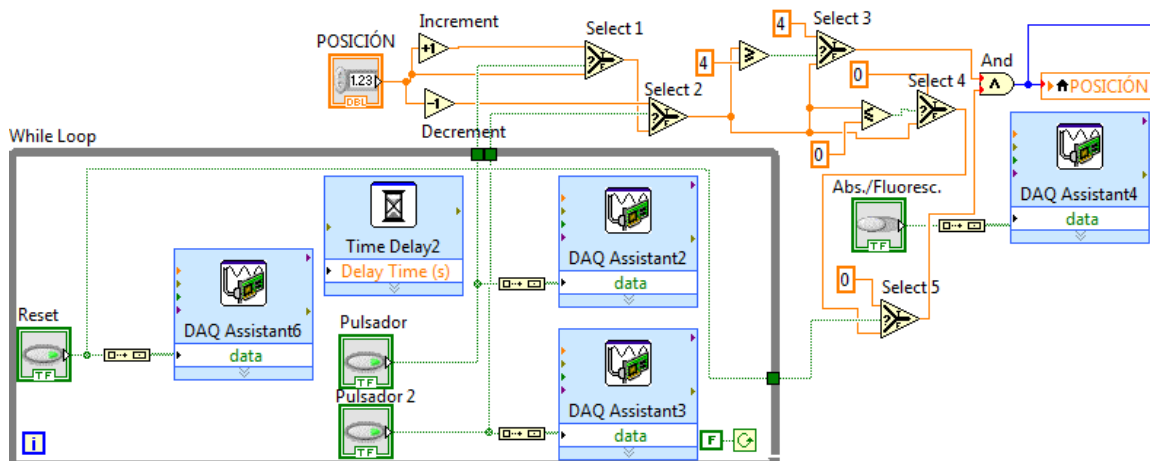


Figura 4-10: Diagrama de bloques de la sub-VI usada para el control de las posiciones del servomotor Empleado en absorción

En este sub-VI, el ícono POSICIÓN, relacionado con el movimiento del servomotor, está declarado como un tipo de dato doble flotante con valor inicial de 0. Mediante dos selectores (*Select 1* y *Select 2*) anidados a dos condiciones, su valor de entrada se puede incrementar (+1) o decrecer (-1). En caso de ser verdadera, la sentencia sumará el valor de la posición inicial del servomotor ($posición + 1$), si por el contrario es falsa, se restará el valor de la posición inicial ($posición - 1$). Luego, el valor de salida pasa a un tercer selector (*Select 3*), condicionado a que el valor de entrada es mayor o igual a 4 (máximo valor dado ya que son 5 posiciones), si es verdadero el valor es cuatro, si es falso pasa a un cuarto selector (*Select 4*), condicionado a que el valor es menor o igual a 0, si es verdadero será igual a cero, si es falso regresa a la condición anterior. El valor de salida pasa a un quinto selector (*Select 5*), si es verdadero da la posición inicial, 0, si es falso regresa a la condición anterior. De esta manera se van ejecutando las cinco posiciones del servomotor.

El control del movimiento del servomotor, está dado por los pulsos generados de la MyDAQ. Dos pulsadores de tipo booleano ejecutan las posiciones del servomotor en función de las sentencias con expresiones lógicas (verdadero/falso) explicadas anteriormente. Este control se logra a través del recurso de programación *DAQ Assistant*. Como se ve en la

Figura 4-9, el control de los selectores 1 y 2 está dado por *DAQ Assistant 2* y 3 respectivamente. El recurso *DAQ Assistant* creado acepta valores booleanos del tipo DDT (Dynamic Data Type), para tener un mayor control sobre el tamaño de estas variables en

tiempo de ejecución, o sea, cuando el programa se está ejecutando, y como los valores dados no cumplen esta condición, se emplea un convertidor de datos booleanos a DTT. En este caso, los pulsadores (íconos booleanos), se unen con un convertidor y de la salida del mismo se unen a la DAQ Assistant correspondiente. El quinto selector (*Select 5*) está controlado por el ícono booleano, *Reset*, conectado a DAQ Assistant 6 con el mismo tipo de convertidor. Como su nombre lo indica, resetea al servomotor a la posición original, cada vez que se aplaste el ícono RESET en el panel frontal.

A la salida de la instrucción del movimiento del servomotor, se encuentra la estructura lógica, y, empleada para encender y apagar las LED, que se activa cuando el ícono booleano, *Abs./Fluoresc.*, da el cambio de medición o espectro a *FLUORESCENCIA*. (ver Figura 4-11) La instrucción diseñada es similar a la del movimiento del servomotor. Se emplean selectores anidados a la condición de que si la posición es 0, se prenderá el LED violeta y si es falso pasará a la siguiente condición: si la posición es ahora igual a 1 se prenderá el LED azul, si es falso pasará a una tercera condición: si la posición es ahora 2, se prenderá el LED verde, si es falso pasará a una cuarta condición: si la posición es ahora 3, se prenderá el LED amarillo, si es falso pasará a una última sentencia: si la posición es ahora 4, se prenderá el LED rojo, si es falso no se prenderá ninguna LED. Los valores de salida están conectados a un ícono de texto, que mostrará en el panel frontal la palabra del color de LED que se encienda cada vez que se ejecute las sentencias explicadas.

El control de los selectores que condicionan las posiciones del servomotor y el funcionamiento de las LED, están encerrados en una estructura de control, un ciclo de *ejecución while*, que se ejecuta hasta una condición terminal que en este caso es hasta cuando no se hacen mediciones de absorción y fluorescencia. Dentro de este ciclo se encuentra otro recurso de programación denominado, *Time Delay*, que se emplea para dar una pausa o retrasar la ejecución de los pulsos de esta sección del VI. En este caso el tiempo de espera para que la DAQ envíe sus pulsos al microcontrolador y este ejecute el control del servomotor y las LED es de 1 segundo.

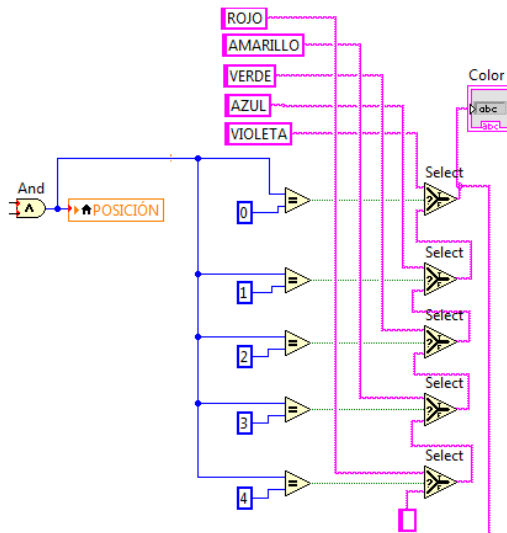


Figura 4-11: Diagrama de bloques de la sub-VI usada para el control de las 5 LED Empleadas en Fluorescencia

En la Figura 4-12, se muestra el panel frontal de la interfaz del VI con el usuario junto con las estructuras booleanas correspondientes a los diagramas de bloques detallados.

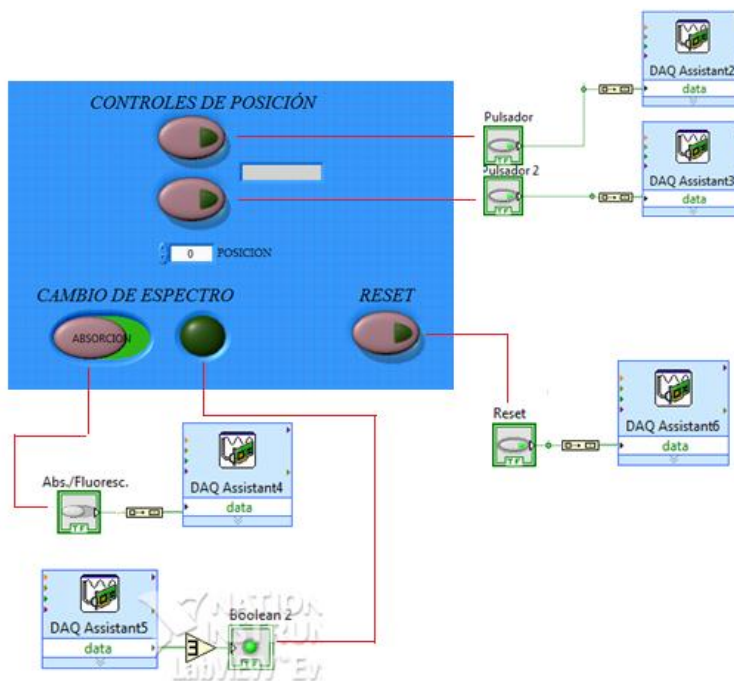


Figura 4-12: Panel frontal y datos booleanos del diagrama de bloques de la sub-VI Usada para el control del servomotor y las 5 LED

Los controles de posición del servo y las LED están dados por los dos pulsadores, un icono de RESET está asociado al dato booleano con el mismo nombre. El cambio de espectro se da por los dos comandos booleanos: Abs./Fluoresc. y Boolean 2, el cual permanece apagado si está en modo absorción y se prende si está en modo fluorescencia.

4.3.2 Detector

El fotodiodo se conecta a la MyDAQ a través de una entrada análoga para que los datos de tensión analógica detectados por el fotodiodo se conviertan en un valor digital y sean enviados al ordenador PC para su interpretación. Se conectó la señal de interés a la terminal del canal 0 (AI0) de entrada analógica de la MyDAQ. En la Figura 4-13, se aprecia el sub-VI desarrollado en LabVIEW y su respectiva tarea en el panel frontal. Para esta tarea se colocó un DAQ Assistant y se configuró como una entrada análoga de voltaje. A la entrada del DAQ Assistant, está un carácter numérico del tipo flotante (codifica valores decimales) correspondiente al tiempo en que se actualizarán los datos (voltajes) detectados por el fotodiodo. En el panel frontal, se mira que la configuración de adquisición, es decir, la frecuencia en la cual el dispositivo de medida muestrea una señal entrante es de 1000 muestras/s. La frecuencia de muestreo rápida de la entrada establecida, adquiere más puntos en un tiempo dado y se puede formar una mejor representación de la señal original que una frecuencia de muestreo lenta.

A la salida del DAQ Assistant, está configurado un filtro digital de paso bajo, low – pass, que deja pasar frecuencias bajas atenuando los de alta frecuencia, con esto se asegura que el contenido de la frecuencia de la señal de entrada sea limitado. A la salida del filtro está una función, *clear errors*, que se emplea para ignorar y eliminar posibles errores de la adquisición de la señal en la entrada del filtro. Independientemente de si se produjo un error antes de la adquisición de la señal, esta función no devuelve ningún error a la salida.

Se creó un indicador gráfico a la salida de la señal filtrada para visualizar los valores detectados de voltaje, desde el canal de entrada analógica de la MyDAQ conectada a la salida del amplificador de fotodiodo en función del tiempo.

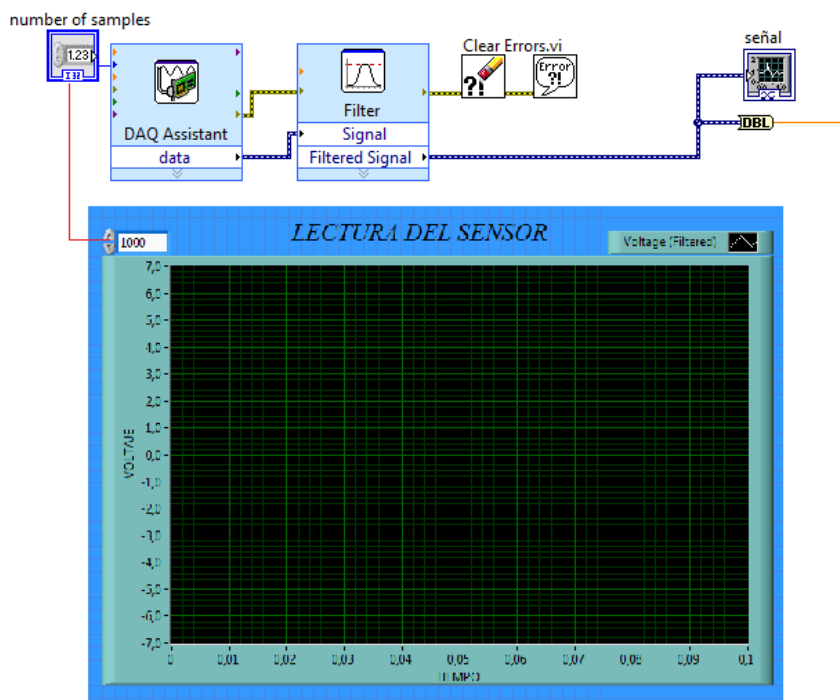


Figura 4-13: Diagrama de bloques y panel frontal para la detección de la señal y lectura del sensor

4.3.3 Almacenamiento de los datos

Las señales de lectura del sensor (fotodiodo) en función de las posiciones de la red de difracción para medir absorción y de las LED para medir fluorescencia, se recopilan y se presentan los datos tabulados en un archivo de hoja de cálculo de Excel con extensión .xlk, para su posterior análisis e interpretación. En la Figura 4-14, se muestra el diagrama de bloques desarrollado para el almacenamiento de los datos tabulados en Excel y partes del panel frontal que corresponden a esta tarea.

Las señales de adquisición (voltajes) por el fotodiodo pasan por la función *'to double precisión float'* que convierte las señales detectadas en un solo dato flotante, los datos de salida pasan a la función *'number to fractional string'* para convertirlos en una cadena de punto flotante con notación fraccional. Por otro lado, la función *Color*, empleada para que en el panel frontal se presenten los diferentes colores para los que se realizan las medidas dadas por las posiciones del servomotor y las LED, se conectan a un arreglo, *Build Array*, que concatena estas cadenas. Una tercera función *'Get Date/Time String'* cuyo conector del primer bloque corresponde a la fecha (*date string*) y el inferior a la hora (*time string*) también se conectan a este arreglo.

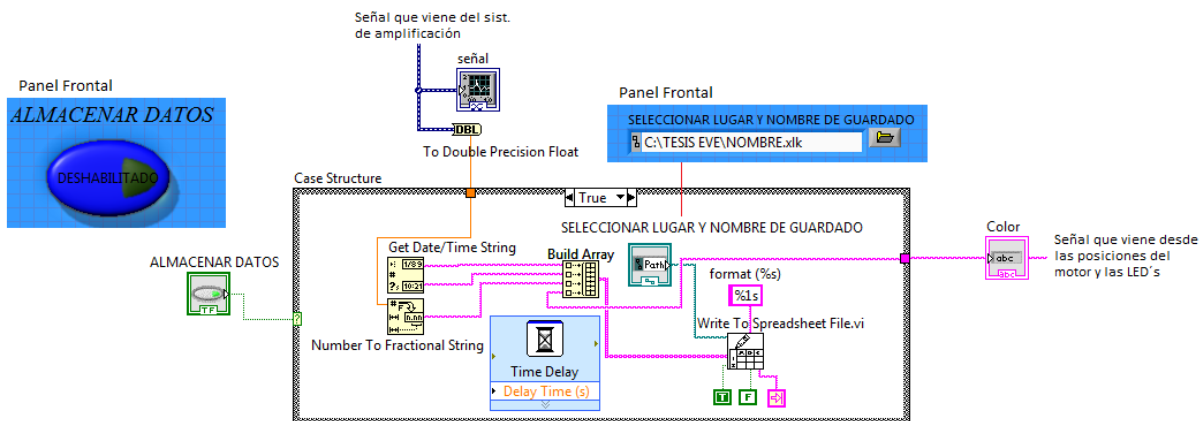


Figura 4-14: Diagrama de bloques de la sub-VI: guardar los datos voltajes del sensor (fotodiodo) en un archivo de Excel

La salida de este arreglo va a la función *Write to Spreadsheet file.VI* (ver Figura 4-15), que convierte al conjunto de datos de adquisición en una hoja de cálculo en Excel. Este ícono consta de la ruta del archivo en el que se almacenarán los datos que en la Figura 4-15, se muestra como *Seleccionar Lugar y Nombre guardado*, el formato de cómo se desea presentar los datos, *%1s*, indica que el siguiente carácter distinto, dé un espacio en blanco. Tres caracteres adicionales se usan para la forma en que se desea presentar los datos.

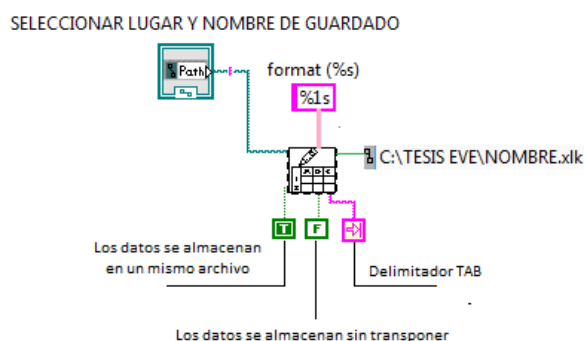


Figura 4-15: Función *Write to Spreadsheet file.VI*.

En el disco C, se creó la carpeta TESIS EVE, donde se almacenan los datos cada vez que se realizaban las mediciones, el nombre del archivo dependía del tipo de muestra que se emplee. En la Figura 4-16, se muestra, un fragmento de la forma de presentación de los datos tabulados en una hoja de cálculo de Excel con extensión, *.xlk*.

La ejecución de esta tarea, se lleva a cabo por una estructura del tipo *CASE* simple, *if-then* (si – entonces). En este caso si la entrada booleana, *Almacenar datos*, en el panel frontal

es activada, es decir el valor booleano de la entrada es verdadero (true), el caso verdadero se ejecutará que corresponde al almacenamiento de los datos mientras se lleva a cabo la medición; de otra manera el caso falso (False) se ejecutará, en este caso no se almacenará los datos. La ejecución de esta estructura para la adquisición de la señal tiene un tiempo de pausa, *Time Delay*, de 300 ms.

Finalmente, todo el programa, como se aprecia en el diagrama de bloques completo de la

Figura 4-9, está gobernado por una estructura *while*, la cual se ejecuta hasta cuando se detenga el programa virtual. Para ello, se creó un último dato booleano, que se muestra en la Figura 4-17, una vez que se activa este ícono se interrumpe por completo el programa y no se ejecuta ninguna acción.

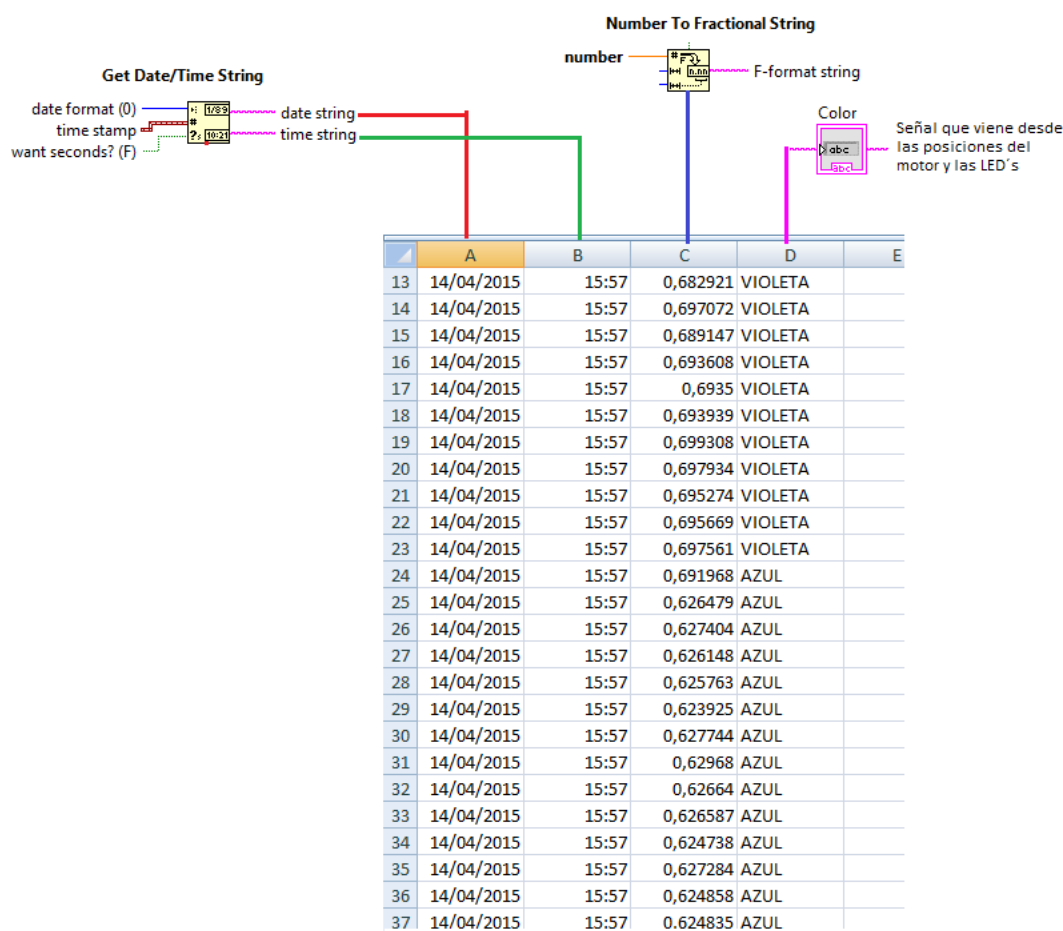


Figura 4-16: Fragmento - Presentación de los datos tabulados en una hoja de cálculo de Excel

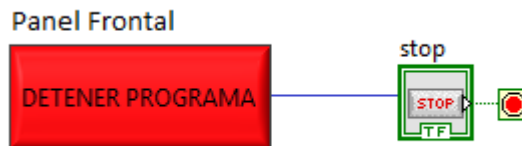


Figura 4-17: Diagrama de bloque para detener el programa y su correspondiente ícono en el Panel frontal

El código de programación gráfica empleado, es tan sólo una de las muchas maneras posibles en que se puede crear un programa de LabVIEW que realice estas funciones. Un diagrama de bloques completo para el programa se puede encontrar en el ANEXO V

5. Puesta en Marcha del Espectrofluorímetro

Una vez logrado el diseño, la construcción de la parte mecánica y electrónica, el control automático del instrumento y el software implementado se procede a comprobar su funcionamiento mediante el análisis de riboflavina (vitamina B2) como principio activo de productos farmacéuticos. A continuación se detalla el protocolo seguido para la puesta en marcha del espectrofluorímetro, Figura 5-1 y Figura 5-2, y los resultados de las mediciones de absorción y fluorescencia para la riboflavina.



Figura 5-1: Puesta en marcha del espectrofluorímetro completo

5.1 Análisis de Riboflavina – Vitamina B2

La riboflavina (vitamina B2, ver Figura 5-3) es una vitamina hidrosoluble. Está formada básicamente por un grupo de tres anillos, dos de ellos heterocíclicos que forman la isoaloxazina, un anillo de isoaloxazina dimetilado se une al ribitol, un alcohol derivado de la ribosa. Los tres anillos forman la isoaloxacina y el ribitol es la cadena de 5 carbonos en la parte inferior. En forma sólida, la riboflavina es de color amarillo anaranjado intenso. En solución acuosa, tiene una fluorescencia amarillo-verdosa muy intensa.

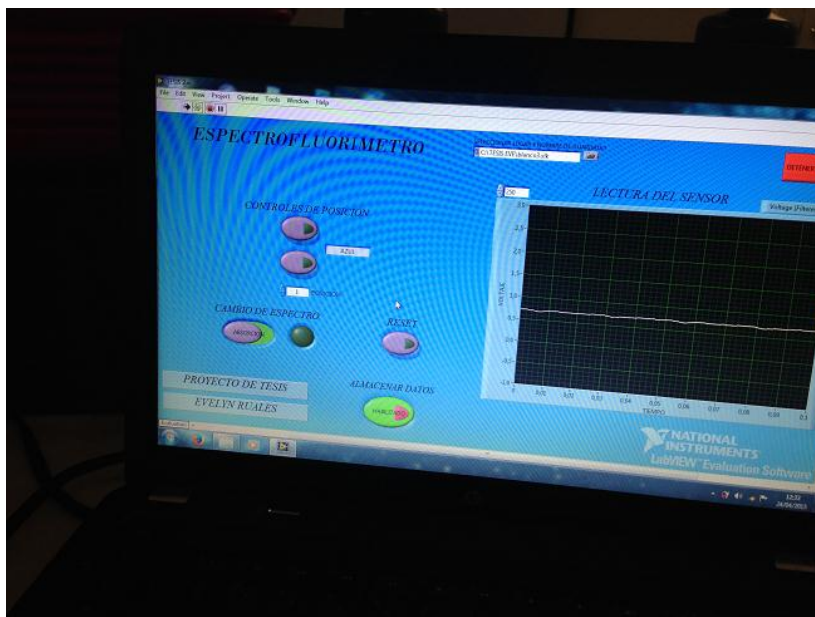


Figura 5-2: Panel frontal del software del equipo durante las mediciones de riboflavina

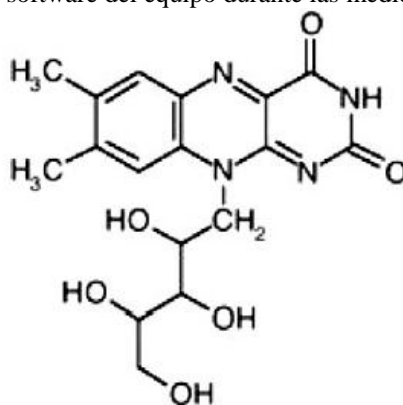


Figura 5-3: Estructura química de la Riboflavina

A temperatura ambiente, la riboflavina puede ser promovida a varios niveles de vibración excitados, en el primer estado excitado electrónico. La transición está en el rango de longitud de onda correspondiente al UV y parte del espectro azul (350-450 nm).

La existencia de esta transición corresponde a la presencia de una banda de absorción en la región azul del espectro visible, la cual puede ser utilizada para cuantificar la concentración de riboflavina mediante la espectrometría de absorción molecular y fluorescencia.

El proceso de absorción se produce en aproximadamente 10^{15} segundos (femtosegundos). La absorción es seguida por la relajación vibracional, luego de la cual se establece una distribución de la población térmica de moléculas excitadas de tal manera que se

acumulan en los niveles más bajos de vibración del estado electrónico excitado. Esta relajación vibracional está casi terminada dentro de los 10 picosegundos desde la absorción.

Las moléculas electrónicamente excitadas se "relajan" a los distintos niveles de vibración del estado fundamental a través de diversos procesos. En las sustancias no-fluorescentes, el mecanismo dominante es la relajación vibracional, que disipan en forma de calor la energía del estado excitado. Algunas sustancias como la riboflavina pueden relajar la energía a través de un proceso de emisión espontánea en el rango de las decenas a centenas de nanosegundos. Este tipo de emisión es fluorescencia. El espectro de fluorescencia está corrido hacia longitudes de onda más largas que el de absorción. En el caso de la riboflavina, la emisión fluorescente que se observa es de color verde amarilla intensa.

Para comprobar el funcionamiento del espectrofluorímetro, se analizó el fenómeno de absorción y fluorescencia en la riboflavina. Para ello se registró el voltaje generado por las soluciones patrón de diferentes concentraciones de riboflavina en los cinco colores establecidos en modo absorción y en modo fluorescencia, configurados por el instrumento. Estos valores permitieron realizar una curva de calibración tanto para la absorción como para la fluorescencia, y en función de ello se pudo cuantificar la cantidad de vitamina B2 presente en dos medicamentos: Grageas de complejo B, marca Ariston y el jarabe Fortic-Hem.

5.1.1 Procedimiento para la Medición de Absorción y Fluorescencia de la Riboflavina

5.1.1.1 Preparación de las soluciones patrón de riboflavina

Al ser la fluorescencia una técnica analítica de alta sensibilidad, se prepararon soluciones de concentraciones relativamente bajas. Así, una solución madre de riboflavina de 50 ppm, se preparó diluyendo 50 mg de riboflavina (Sigma Aldrich, Lote SLBC6522V) en un matraz de 1 L y se diluyó con una solución de ácido acético al 5% (vol/vol.) La riboflavina es sensible a la luz y también sufre una oxidación rápida, por tal motivo la solución fue transferida a un frasco ámbar. A partir de esta solución, se hizo una dilución de 1:5 para obtener una segunda solución 10 ppm en ácido acético al 5%, y al igual que la anterior solución se almacenó en un frasco ámbar. De esta segunda solución, se prepararon una serie de soluciones diluidas en ácido acético al 5%: 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 15 ppm

y 20 ppm. Estas soluciones fueron cubiertas con papel aluminio para evitar su descomposición.

Todas las muestras se prepararon el mismo día que se realizó el análisis.



COMPOSICIÓN: Cada GRAGEA contiene: 15 mg de vitamina B1; 3 mg de vitamina B2; 15 mg de nicotinamida; 5 mg de vitamina B6; 10 mg de pantotenato de calcio y excipientes, c.s.p 1 gragea. Cada 5 mL de JARABE contienen: Vitamina B1: 1.5 mg; vitamina B2: 0.6 mg; nicotinamida: 10 mg; vitamina B6: 0.7 mg; pantotenato de calcio: 3.1 mg; vitamina B12: 0.002 mg; biotina: 0.10 mg; ácido fólico: 0.14 mg.

Figura 5-4: Composición química del medicamento ComplejoB – Ariston

5.1.1.2 Preparación de las soluciones de los medicamentos

- *Complejo B – Ariston*

La composición química de este medicamento señala que hay 3 mg de riboflavina en una gragea. A partir de ello, se pesó una gragea, se pulverizó y se diluyó en un matraz de 250 mL con ácido acético al 5% para obtener una solución de 12 ppm.

- *Jarabe Fortichem*

La composición química del jarabe indica que una dosis de 5 mL contiene 1.2 mg de riboflavina. Se tomó 5 mL de jarabe y se diluyó en un matraz de 100 mL con ácido acético al 5%.



Figura 5-5: Jarabe Fortic -Hem

5.1.1.3 Medición de Absorción

Se conectó el espectrofluorímetro al toma corriente, y la MyDAQ se conectó a la laptop a través del cable USB. En el panel frontal del software, se configuró el espectrofluorímetro en medición de *ABSORCIÓN* y se estableció el tiempo en que las mediciones se van actualizando, para este caso fue de 1000 mediciones/s. Se encendió manualmente la fuente de iluminación y se procedió a realizar las mediciones de cada una de las soluciones preparadas mediante el barrido en cada uno de los colores configurados por el monocromador. Durante las corridas de las muestras, en el panel frontal se seleccionó, *ALMACENAR DATOS*, para almacenar los datos en el archivo creado. Las mediciones se hicieron por triplicado para cada solución.

5.1.1.4 Medición de Fluorescencia

Una vez terminado las mediciones en modo absorción, se procedió a realizar las medidas de fluorescencia. Para ello se apagó manualmente la fuente de iluminación externa y se configuró el modo de *FLUORESCENCIA*, activando el interfaz para que cada una de las LED según el orden manejado por el usuario se prenda. Durante las corridas de las muestras, en el panel frontal se seleccionó, *ALMACENAR DATOS* para almacenar los datos en el archivo creado. Las mediciones se hicieron por triplicado para cada solución.

Un parámetro esencial que no debe de pasar desapercibido es que se corrió una muestra blanco (solución de ácido acético al 5%) en cada experimento. El blanco está conformado exactamente como las muestras pero sin fluoróforo. Este tipo de control, permite calcular y controlar la dispersión, además de que permite corregir cualquier tipo de inconsistencia generalmente asociada a si en la muestra se encuentran impurezas fluorescentes.

5.1.2 Resultados de las mediciones

De cada archivo generado en Excel para cada una de las soluciones se realizó el posterior análisis. Como se realizó por triplicado cada experimento se obtuvo un promedio de cada medición en el respectivo color en el modo establecido.

5.1.2.1 Modo Absorción - Absorbancia

Del sistema de amplificación diseñado, las mediciones de voltaje de salida están dados por la ecuación, Ec. 5-1. El voltaje de salida se puede calcular en términos de la corriente de entrada que fluye a través la resistencia de realimentación del circuito.

$$V_{out} = I_{in} * R \quad \text{Ec. 5-1}$$

Esta ecuación establece que a medida que aumenta la corriente, la tensión medida también aumenta. Dado que la corriente de salida para cualquier transductor es proporcional a la intensidad de la luz, entonces la tensión también es directamente proporcional a la intensidad de la luz. Si se mide el voltaje para una solución en blanco junto con la tensión de una solución que va a absorber la luz, los valores de absorbancia se pueden obtener. (Thal & Samide, 2001):

$$\text{Transmitancia} = T = \frac{P}{P_0} = \frac{V_{\text{muestra}}}{V_{\text{blanco}}} \quad \text{Ec. 5-2}$$

$$\text{Absorbancia} = A = -\log(T) = -\log\left(\frac{V_{\text{muestra}}}{V_{\text{blanco}}}\right) \quad \text{Ec. 5-3}$$

La absorbancia de cada muestra se calculó empleando la Ec. 5-3, usando los voltajes obtenidos del blanco y de cada una de las soluciones.

En la **Tabla 5-1**, se dan los voltajes promediados obtenidos para el blanco y las soluciones de diferente concentración. En la **Tabla 5-2**, se encuentran los valores de transmitancia y absorbancia calculados a partir de las ecuaciones: Ec. 5-2 y Ec. 5-3 para las soluciones de concentración: 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm y 8 ppm. En la **Tabla 5-3**, se encuentran los valores de transmitancia y absorbancia calculados a partir de las mismas ecuaciones para las soluciones de concentración: 10 ppm, 15 ppm, y 20 ppm.

Tabla 5-1: Voltajes del blanco y las soluciones de riboflavina en modo absorción

Color	Voltaje (V)							
	Blanco	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm
Violeta	1.165	1.131	1.011	0.938	0.846	0.794	0.724	0.672
Azul	0.704	0.703	0.704	0.681	0.672	0.659	0.640	0.640
Verde	1.045	1.051	1.041	1.001	0.979	0.974	0.957	0.959
Amarillo	1.043	1.109	1.089	1.063	1.036	0.981	0.995	0.963
Rojo	0.847	0.863	0.859	0.853	0.850	0.843	0.812	0.804

Tabla 5-2: Valores de Transmitancia (T) y Absorbancia (A) de las soluciones de 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm y 8 ppm

Color	2 ppm		4 ppm		6 ppm		8 ppm	
	T	A	T	A	T	A	T	A
Violeta	0.971	0.013	0.868	0.062	0.805	0.094	0.727	0.139
Azul	0.998	0.001	0.999	0.000	0.967	0.014	0.955	0.020
Verde	1.006	-0.003	0.996	0.002	0.958	0.019	0.937	0.028
Amarillo	1.064	-0.027	1.044	-0.019	1.020	-0.008	0.994	0.003
Rojo	1.020	-0.008	1.014	-0.006	1.007	-0.003	1.004	-0.002

En la **Tabla 5-2** y la **Tabla 5-3**, se aprecia (en función de los valores de absorbancia) que el VIOLETA, es el color que los estándares de riboflavina absorben. Los valores de absorbancia para este color se consideraron para la curva de calibración: absorbancia con respecto a las diferentes concentraciones.

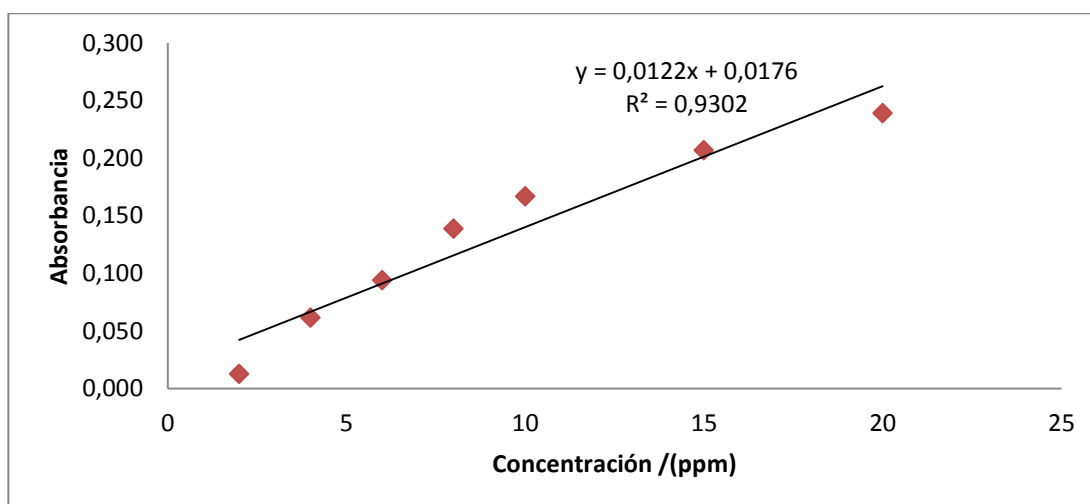
En la **Tabla 5-4**, están los valores de absorbancia de cada una de las concentraciones de las muestras. En la Figura 5-6, se presenta la curva de calibración obtenida a partir de estos datos.

Tabla 5-3: Valores de Transmitancia (T) y Absorbancia (A) de las soluciones de 10 ppm, 15 ppm y 20 ppm

Color	10 ppm		15 ppm		20 ppm	
	T	A	T	A	T	A
Violeta	0.681	0.167	0.621	0.207	0.577	0.239
Azul	0.935	0.029	0.908	0.042	0.909	0.042
Verde	0.932	0.030	0.916	0.038	0.918	0.037
Amarillo	0.941	0.026	0.955	0.020	0.924	0.035
Rojo	0.995	0.002	0.959	0.018	0.949	0.023

Tabla 5-4: Valores de absorbancia para cada concentración analizada

Absorbancia	Concentración (ppm)
0.013	2
0.062	4
0.094	6
0.139	8
0.167	10
0.207	15
0.239	20

**Figura 5-6:** Curva de calibración de riboflavina – modo Absorción

De la curva de calibración se obtiene la ecuación de la recta:

$$\text{Absorbancia} = 0.012 * \text{Concentración (ppm)} + 0.018c$$

Ec. 5-4

La Ec. 5-4 se emplea para obtener la concentración de riboflavina presente en los medicamentos analizados. A continuación se presentan las mediciones obtenidas (voltajes) de las soluciones de los medicamentos analizados por triplicado.

5.1.2.1.1 Complejo B – Ariston

En la **Tabla 5-5**, se presentan las señales de voltaje (por triplicado) registradas por cada muestra y en la **Tabla 5-6** los valores de absorbancia y transmitancia calculados.

Tabla 5-5: Voltajes de la solución de Complejo B – Ariston

Color	Voltaje (V)		
Violeta	0.808	0.791	0.807
Azul	0.632	0.628	0.653
Verde	0.952	0.957	0.961
Amarillo	0.962	0.976	0.995
Rojo	0.804	0.851	0.865

Tabla 5-6: Valores de Transmitancia (T) y Absorbancia (A) del medicamento Complejo B – Ariston

Color	T	A
Violeta	0.694	0.159
	0.679	0.168
	0.693	0.160
Azul	0.898	0.047
	0.891	0.050
	0.927	0.033
Verde	0.911	0.040
	0.916	0.038
	0.920	0.036
Amarillo	0.923	0.035
	0.936	0.029
	0.954	0.020
Rojo	0.949	0.023
	1.005	-0.002
	1.021	-0.009

5.1.2.1.2 Jarabe Fortic-Hem

Se presentan los voltajes, por triplicado, generados por cada muestra de jarabe en la **Tabla 5-7** y en la **Tabla 5-8** los valores de absorbancia y transmitancia correspondientes a dichos voltajes.

Tabla 5-7: Voltajes de la solución del Jarabe Fortic – Hem

Color	Voltaje (V)		
Violeta	0.792	0.806	0.805
Azul	0.651	0.654	0.637
Verde	0.961	0.947	0.983
Amarillo	0.995	0.978	0.978
Rojo	0.844	0.818	0.835

Tabla 5-8: Valores de Transmitancia (T) y Absorbancia (A) del Jarabe Fortic – Hem

Color	T	A
Violeta	0.680	0.168
	0.692	0.160
	0.692	0.160
Azul	0.924	0.034
	0.929	0.032
	0.905	0.043
Verde	0.920	0.036
	0.906	0.043
	0.941	0.026
Amarillo	0.954	0.020
	0.938	0.028
	0.938	0.028
Rojo	0.996	0.002
	0.966	0.015
	0.986	0.006

A partir de los valores de absorbancia para los dos medicamentos, se confirma que la longitud de onda en la que absorben estas soluciones está en la región del violeta, ver **Tabla 5-6** y **Tabla 5-8**. Empleando la ecuación, Ec. 5-4, se calcula la concentración de riboflavina a partir de los valores de absorbancia obtenidos. En el **Complejo B - Ariston hay 3 mg de Riboflavina en una gragea (m gragea = 0.489g)** que se diluyó como se detalló anteriormente. La solución obtenida es de **12 ppm**, y en el jarabe Forti - Hem hay **1.2 mg de riboflavina en 5**

mL de jarabe que se trató como se menciona anteriormente. La solución obtenida es también de *12 ppm*.

En la **Tabla 5-9**, se muestran los valores de las concentraciones de riboflavina calculadas y su respectivo error.

Tabla 5-9: Concentraciones de riboflavina en los medicamentos analizados – modo Absorción

Medicamento	Absorbancia	Concentración exp. ppm	Concentración Teórica ppm	% Error
Complejo B - Ariston	0.159	11.515	12	4.045
	0.168	12.302	12	2.520
	0.160	11.594	12	3.383
Jarabe Fortic - Hem	0.168	12.247	12	2.058
	0.160	11,599	12	3.339
	0.160	11.641	12	2.990

Por el error obtenido, se puede confirmar que la medición de la absorbancia empleando el espectrofluorímetro es bastante precisa. Esto demuestra que la sensibilidad del sistema construido es bastante semejante a la de un instrumento comercial (datos no incluidos).

5.1.2.2 Modo Fluorescencia

A partir de la Ec. 5-5:

$$I_f = K'c \quad \text{Ec. 5-5}$$

La intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de la muestra. Sin embargo, igual que en absorción, se debe considerar el voltaje que genera el blanco por ello la Ec. 5-6 que considera este parámetro será empleada para obtener el verdadero valor de la intensidad de fluorescencia.

$$I_f = (P - P_o) * C = (V_{muestra} - V_{blanco}) * C \quad \text{Ec. 5-6}$$

Por lo tanto, a los voltajes de salida de cada una de las muestra se les restará el voltaje del blanco generado cuando cada uno de las LED exciten a las muestras. La diferencia de voltajes será el verdadero valor de la intensidad de fluorescencia. Con estos valores de

intensidad de fluorescencia y la concentración de las soluciones de riboflavina, se obtiene la curva de calibración de la especie fluorescente, que será de ayuda para la cuantificación del fluoróforo en estudio.

Cuando se analizaron los datos generados en Excel, se apreció que del conjunto de los cinco LED únicamente el azul fue el que excitó a la muestra generando intensidad de fluorescencia. Del análisis realizado por triplicado, en la Tabla 5-10, se muestran los voltajes de salida promediados de los estándares de vitamina B2, para cada uno de los LED de excitación. El color que genera fluorescencia en la muestra es el azul. En función de ello, los únicos voltajes considerados para la obtención de la curva de calibración corresponden a los dados por el éste, en la Tabla 5-11 se exponen los voltajes generados por la LED azul y la diferencia de este voltaje con el blanco. ($V_{blanco} = 0.465 V$)

Tabla 5-10: Voltajes de salida de cada LED de excitación para cada muestra

Color	Blanco (V)	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm
Violeta	0.444	0.440	0.465	0.498	0.514	0.507	0.516	0.526
Azul	0.465	1.069	1.174	1.298	1.389	1.467	1.607	1.715
Verde	0.438	0.465	0.471	0.483	0.486	0.518	0.497	0.536
Amarillo	0.431	0.450	0.495	0.491	0.511	0.494	0.497	0.516
Rojo	0.438	0.465	0.464	0.481	0.523	0.500	0.506	0.504

Nota: Las mediciones fueron hechas en voltios (V)

Tabla 5-11: Intensidad de fluorescencia generada por las soluciones estándar de Riboflavina Empleando la LED azul

Int. Fluorescencia (V)	Int. Fluorescencia REAL* (V)	Concentración ppm
1.069	0.603	2
1.175	0.709	4
1.298	0.832	6
1.389	0.923	8
1.467	1.002	10
1.607	1.141	15
1.715	1.249	20

Nota:* ($V_{blanco} = 0.465V$). Ver Tabla 5-10

Se realizó la curva de calibración: Intensidad de Fluorescencia real con respecto a la concentración de los estándares de riboflavina.

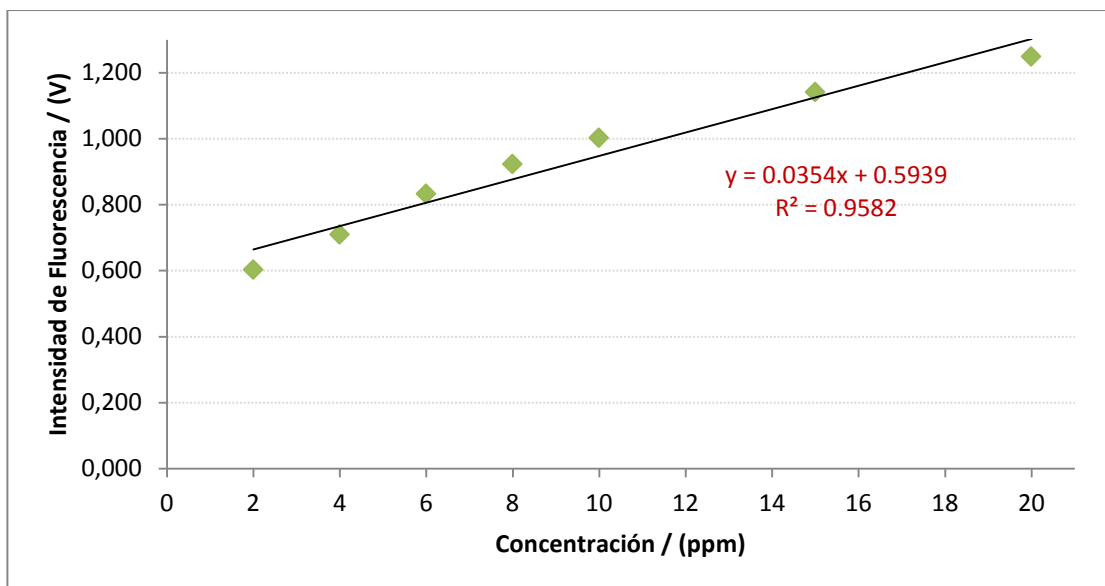


Figura 5-7: Curva de calibración de Riboflavina – modo Fluorescencia. Intensidad de Fluorescencia vs. Concentración

A partir de la curva de calibración, se obtiene la ecuación de la recta de calibración en la Ec. 5-7.:

Intensidad de Fluorescencia

Ec. 5-7

$$= 0.0354 * \text{Concentración (ppm)} + 0.5939$$

La intensidad de Fluorescencia emergente de los dos medicamentos analizados, empleando la LED azul, se aprecia en la Figura 5-8. Conociendo los valores de intensidad de fluorescencia generados para los medicamentos en estudio y empleando la Ec. 5-7, se puede saber la concentración de riboflavina presente en estas muestras.

5.1.2.2.1 Complejo B – Ariston

Del análisis realizado por triplicado, la intensidad de fluorescencia de las muestras generadas por las 5 LED se incluye en la **Tabla 5-12**.

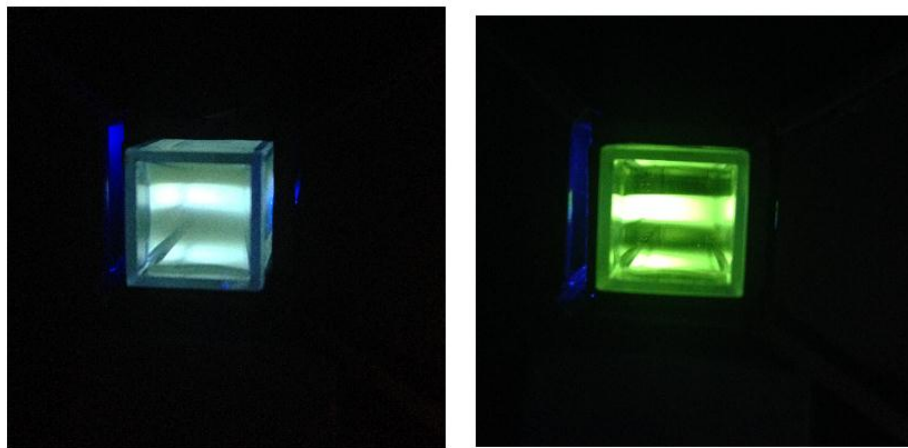


Figura 5-8: Intensidad de Fluorescencia de las soluciones de los medicamentos (8ppm) complejo B – Ariston (Izquierda) y del jarabe Fortic – Hem (derecha).

Tabla 5-12: Intensidad de fluorescencia de las muestras de Complejo B con la LED azul

Color	Voltaje (V)		
Violeta	0.513	0.522	0.497
Azul	1.476	1.477	1.479
Verde	1.040	1.023	0.985
Amarillo	0.515	0.486	0.510
Rojo	0.599	0.603	0.604

A partir de los datos en la **Tabla 5-12**, se confirma que el medicamento Complejo B – Ariston, emite fluorescencia con la luz azul, una vez confirmado esto, se emplean únicamente los valores de la intensidad dada por la LED azul.

De manera análoga a los cálculos realizados en la sección de absorción, se sabe que el **Complejo B - Ariston tiene una concentración de 12 ppm**, y con ello se puede saber la concentración de riboflavina presente en este medicamento, resumido en la **Tabla 5-13**.

Tabla 5-13: Concentración de riboflavina en el Complejo B – Ariston

Int. Fluorescencia (V)	Int. Fluo real* (V)	Concentración ppm	Error %
1.476	1.011	11.772	1.901
1.477	1.012	11.800	1.664
1.479	1.013	11.836	1.365

Nota:* ($V_{blanco} = 0.465V$). Ver Tabla 5-10

5.1.2.2.2 Jarabe Fortic – Hem

El mismo procedimiento se llevó a cabo para el análisis del Jarabe.

Tabla 5-14: Intensidad de fluorescencia de las muestras de Jarabe con la led azul

Color	Voltaje (V)	Voltaje (V)	Voltaje (V)
Violeta	0.469	0.479	0,479
Azul	1.477	1.482	1,480
Verde	0.675	0.682	0.686
Amarillo	0.466	0.483	0.474
Rojo	0.477	0.500	0.529

De la **Tabla 5-14**, se confirma que la LED azul excita de mejor manera a las muestras, por lo que se emplean únicamente las intensidades dadas por ésta. Para el análisis del jarabe Forti - Hem se verán los datos en la **Tabla 5-15**.

Tabla 5-15: Concentración de riboflavina en el Jarabe Fortic-Hem

Int. Fluorescencia (V)	Int. Fluo real (V)	Concentración ppm	Error %
1.477	1.012	11.801	1.662
1.482	1.017	11.943	0.477
1.480	1.015	11.877	1.023

Tabla 5-16: Porcentaje de error obtenido en los dos análisis: Absorción - Fluorescencia

Multivitamínico	Error %	
	Absorción	Fluorescencia
Complejo B - Ariston	4.045	1.901
	2.520	1.664
	3.383	1.365
Jarabe Fortic - Hem	2.058	1.662
	3.339	0.477
	2.990	1.023

A partir de los análisis realizados, se confirma que los estándares de riboflavina absorben con la luz violeta correspondiente a una longitud de onda de 350-450 nm, ver **Tabla 5-2** y **Tabla 5-3**. De la misma manera, los multivitamínicos analizados absorben con la luz violeta, ver **Tabla 5-6** y **Tabla 5-8**. A partir de los valores de absorbancia obtenidos se obtuvo la curva de calibración en modo absorción, **Figura 5-6**, con una gran linealidad facilitando una verdadera aproximación de la concentración de vitamina B2 en estas muestras. Estos valores se resumen en la **Tabla 5-9**.

La excitación de la riboflavina y su consecuente emisión de fluorescencia en las soluciones estándares se logró con la LED azul, los datos de la **Tabla 5-10** lo confirman y gracias a ello se pudo obtener la curva de calibración de la intensidad de fluorescencia, **Figura**

5-7, de las muestras para su posterior utilidad en la cuantificación de riboflavina en los multivitamínicos analizados, ver Tabla 5-13 y Tabla 5-15.

Finalmente, una forma de medir la eficiencia del espectrofluorímetro es a partir del porcentaje de error, de la concentración de riboflavina presente en los dos multivitamínicos analizados mediante las señales de absorción y fluorescencia. El error obtenido es aceptable y confirma que la cuantificación del fluoróforo, riboflavina, en multivitamínicos a través de fluorescencia, es más exacta y precisa al dar un porcentaje de error menor con respecto a la medición realizada por absorción, ver la **Tabla 5-16**. Además de que confirma el verdadero propósito del instrumento que es medir fenómenos de absorción y emisión de fluorescencia a nivel de laboratorio.

6. Conclusiones

El diseño, la construcción mecánica, el control automático y el desarrollo del software de un espectrofluorímetro se logró concluir satisfactoriamente. El espectrofluorímetro desarrollado está compuesto de una linterna LED blanca como fuente de luz, un espectrofotómetro básico conformado por la red de difracción girada por un servomotor, el compartimento de la muestra y un fotodiodo de silicio como detector. El sistema de emisión o fluorescencia esta dado por un conjunto de 5 LED de diferentes colores ubicados a los lados del compartimento de la muestra y a 90° del detector. La parte electrónica y el desarrollo del programa virtual en LabVIEW consta de circuitos adicionales para la amplificación, el movimiento automático del servomotor, el encendido/apagado de las LED y la adquisición de datos a través de la tarjeta NI MyDAQ con una Laptop.

El instrumento construido se ha empleado para facilitar la comprensión y la aplicación de la espectroscopia de absorción molecular y fluorescencia, mediante el análisis de moléculas fluorescentes presentes en multivitamínicos, con lo que se entendió y se confirmó los siguientes parámetros del fenómeno de fluorescencia:

- a) La emisión de fluorescencia de una molécula implica un proceso físico y químico energético y no es simplemente la luz incidente que viaja en la solución.
- b) Razón para utilizar una configuración de 90° entre la fuente de excitación y el detector.
- c) Longitudes de onda emitidas por las moléculas son independientes de las longitudes de ondas de excitación.
- d) La emisión de fluorescencia se produce en longitudes de onda más largas que las de absorción, conocido como desplazamiento de Stokes. En el análisis de riboflavina realizado, la longitud de onda que muestra mayor absorción corresponde al violeta, y la luz que realmente excita a la molécula es la azul.
- e) La dependencia de la intensidad de fluorescencia con la intensidad de la luz incidente

Se logró construir un circuito electrónico capaz de adquirir y procesar la señal proveniente del instrumento. Además, se consiguió ejercer un control automático de todo el

sistema del instrumento, hacer la adquisición de datos y la presentación de los resultados en forma gráfica y numérica, mediante instrumentos virtuales desarrollados con el lenguaje de programación grafica LabVIEW.

Se logró configurar y calibrar el espectrofluorímetro desarrollado para su posterior uso en el laboratorio mediante el análisis de sustancias fluorescentes – riboflavina – presentes en multivitamínicos. La cuantificación de la riboflavina en los multivitamínicos, se realizó a partir de curvas de calibración de soluciones estándar de riboflavina por la medición de las señales de absorción y fluorescencia configuradas por el espectrofluorímetro.

El espectrofluorímetro está destinado para su posterior uso a nivel de pregrado especializados en Química Analítica y Análisis Instrumental en el Departamento de Ingeniería Química de la USFQ.

Aunque es bastante eficiente el espectrofluorímetro desarrollado, sirve de peldaño para seguir perfeccionándolo enormemente. Por ejemplo, en la parte mecánica se puede cubrir de mejor manera al instrumento para evitar filtración de luz; en la parte electrónica, se puede mejorar el movimiento del servomotor con más posiciones para tener una mayor variabilidad en el rango de longitudes de onda del UV/Visible., se puede mejorar la señal de adquisición empleando un mejor sensor de lectura analógica y digital. El software, programa virtual, desarrollado es una de las muchas maneras en las que se puede tener el control del instrumento, por lo que el campo de investigación para mejorarlo es realmente amplio.

7. Referencias Bibliográficas

- Al-Rawashdeh, N. A. (2012). Current Achievement and Future Potential of Fluorescence Spectroscopy. *Edited by Jamal Uddin*. Retrieved from In Tech website: <http://www.intechopen.com/books/macro-to-nano-spectroscopy/current-achievement-and-future-potential-of-fluorescence-spectroscopy> doi:10.5772/48034
- Andersen, C. M., & Mortensen, G. (2008). Fluorescence spectroscopy: a rapid tool for analyzing dairy products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(3), 720-729.
- Anderson, J., Fischer, R., Smith, C., Webb, S., & Dennis, J. (2003). *In situ detection of pathogen indicators using laser-induced fluorescence*. Paper presented at the Proceedings of 2003 UCOWR Annual Conference “Water Security in the 21st Century.
- Angulo Usategui, J., Martínez Angulo, I., & Romero Yesa, S. (2006). Microcontroladores “PIC”: diseño práctico de aplicaciones. PIC16F87X, PIC18FXXXX. Segunda parte: España: McGraw-Hill.
- Bowman, R. (1974). History and Development of the spectrophotofluorometer. *Fluorescence News*, 3(1).
- De Paula, A., & De Paula, J. (2007). *Química-Física*: Ed. Médica Panamericana.
- Fernández, L. (2011). Ciencias Físicas Primero. Retrieved Mayo 2015, 2015, from <http://cs-fs-primero.blogspot.com/2011/04/espectro-electromagnetico.html>
- Gende, M. (2006, 2006). Sensores Remotos. Retrieved Mayo 2015, 2015, from http://fcaglp.fcaglp.unlp.edu.ar/referenciacion/index.php?title=Sensores_Remotos
- Gore, M. G., Bashford, C., & Harris, D. (2000). *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*: Oxford University Press New York.

- Hercules, D. M. (1960). Some aspects of fluorescence and phosphorescence analysis. *Analytical Chemistry*, 38(12), 29A-43A.
- Koziol, J. (1966). Studies on Flavins in Organic Solvents, spectral characteristics of riboflavin, Riboflavin Tetrabutryrate and Lumichrome. *Photochemistry and Photobiology*, 5(1), 41-54.
- Lakowicz, J. R., & Geddes, C. D. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3rd Ed. ed. Vol. 1). New York: Springer.
- Leica Microsystems, I. (2000). *Glosario de Términos Ópticos* Retrieved from http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20BM%20E/Brochures/Leica_Glossary_of_optical_terms_RvA-Booklet_ES.pdf
- LLC, T. (2005). Bienvenidos a las maravillas de la Luz Retrieved 12 de diciembre, 2014, from <http://teoriassobreelorigendelaluz.wikispaces.com/TEOR%C3%8DA+ONDULATORI+A+DE+LA+LUZ>
- Martínez , M. T., & Moctezuma, C. L. (2006). *Espectrofluorimetría* U. A. d. México (Ed.) Retrieved from <http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrofluorimetria.pdf>
- National, I. (2014). NI MyDAQ. Retrieved 23 de marzo, 2015, from <http://www.ni.com/mydaq/esa/>
- Nave, C. R. (2005). HyperPhysics OP-AMP. *HyperPhysics*. Retrieved 26 de Abril, 2015, from <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/electronic/opamp.html>
- Nesterenko, T., Tikhomirov, A., & Shikhov, V. (2006). [Chlorophyll fluorescence induction and estimation of plant resistance to stress factors]. *Zhurnal obshchei biologii*, 68(6), 444-458.

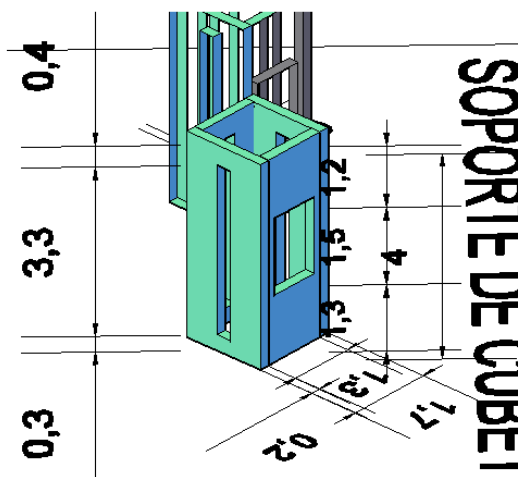
- Palmer, C. A., Loewen, E. G., & Thermo, R. (2005). *Diffraction grating handbook*: Newport Corporation Springfield, OH.
- Pérez, G. (2014, 1 de febrero de 2014). Espectrometría.com. Retrieved 27 de Marzo 2015, from http://www.espectrometria.com/espectro_electromagntico
- Poole, R. K., & Kalnenieks, U. (2000). Introduction to light absorption: visible and ultraviolet spectra. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry*. Oxford University Press, Oxford, 1-31.
- Quinteros, J. A., Centellas, A., & Durán, B. (2010). Receptores ópticos. (Sistemas de fibra optica).
- Ramos-Martos, N. (1999). *Determinación de principios activos en fármacos mediante el uso de técnicas fluorimétricas*. Universidad de Jaén.
- Sauer, M., Hofkens, J., & Enderlein, J. (2010). *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules*: John Wiley & Sons.
- Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2013). *Fundamentals of analytical chemistry*: Cengage Learning.
- Solá, J., & Fernández, R. (2006). Calibrado de un espectroscopio y medición de las longitudes de onda de un espectro. *Enseñanza de la Física y Química*. Retrieved 26 de abril de 2015 from <http://www.heurema.com/PF18.htm>
- Thal, M. A., & Samide, M. J. (2001). Applied electronics: Construction of a simple spectrophotometer. *Journal of Chemical Education*, 78(11), 1510.
- Travis, J., & Kring, J. (2006). *LabVIEW for Everyone: Graphical Programming Made Easy and Fun (National Instruments Virtual Instrumentation Series)*: Prentice Hall PTR.

- Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular fluorescence: principles and applications*: John Wiley & Sons.
- Vo-Dinh, T. (2014). *Biomedical Photonics Handbook: Biomedical Diagnostics* (Vol. 2): CRC press.
- Wahab, M. F. (2007). Fluorescence spectroscopy in a shoebox. *Journal of Chemical Education*, 84(8), 1308 - 1312.
- Zwinkels, J. C., Gignac, D., Nevins, M., Powell, I., & Bewsher, A. (1997). Design and testing of a two-monochromator reference spectrofluorimeter for high-accuracy total radiance factor measurements. *Applied optics*, 36(4), 892-902.

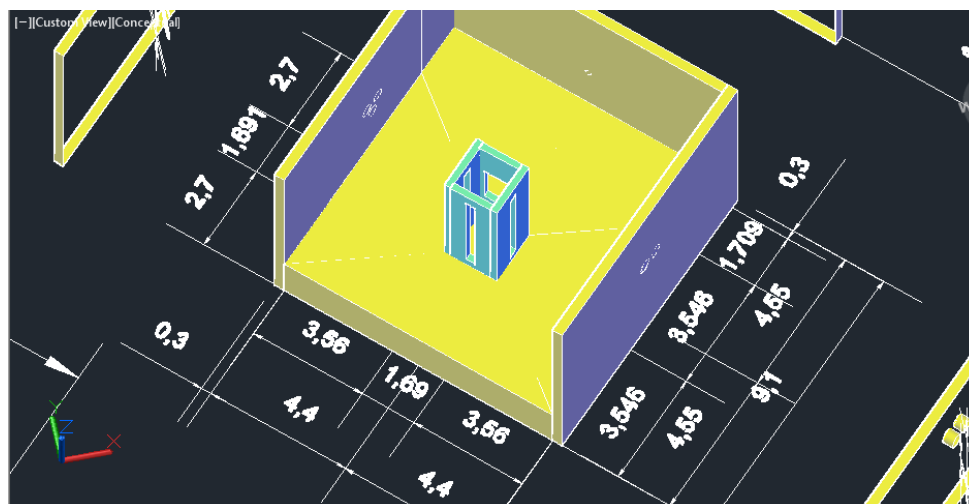
8. ANEXOS

8.1 ANEXO I

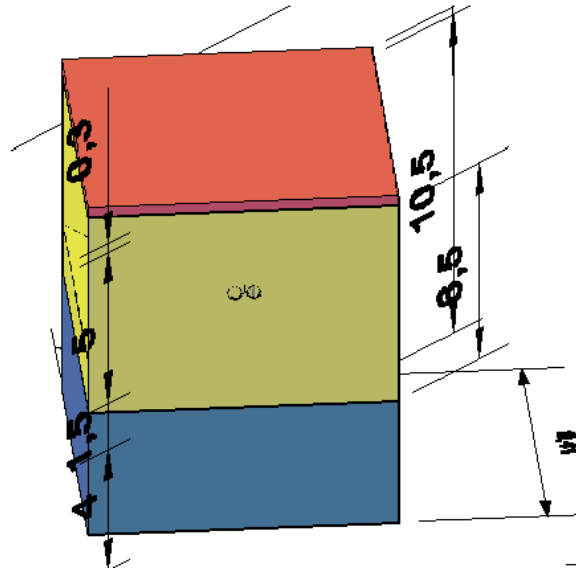
Dimensiones de la carcasa del espectrofluorímetro



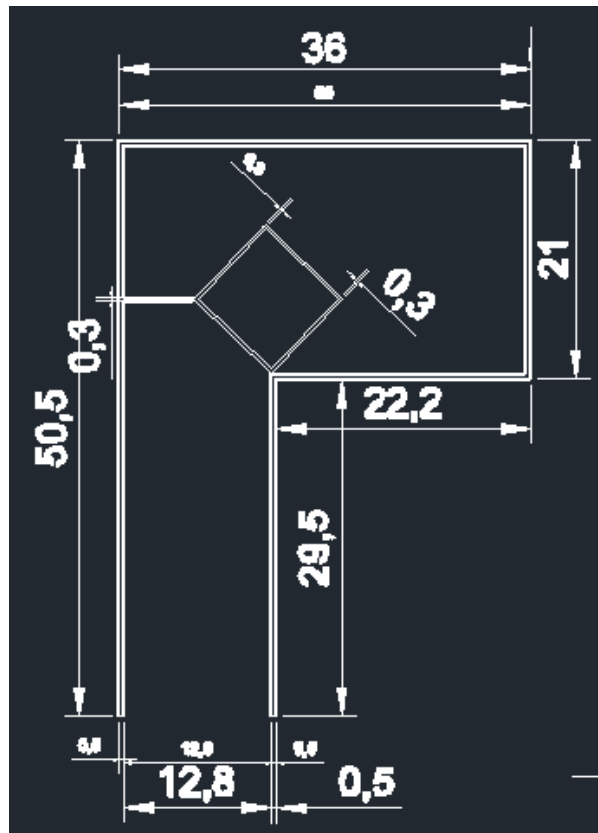
Soporte Cubeta



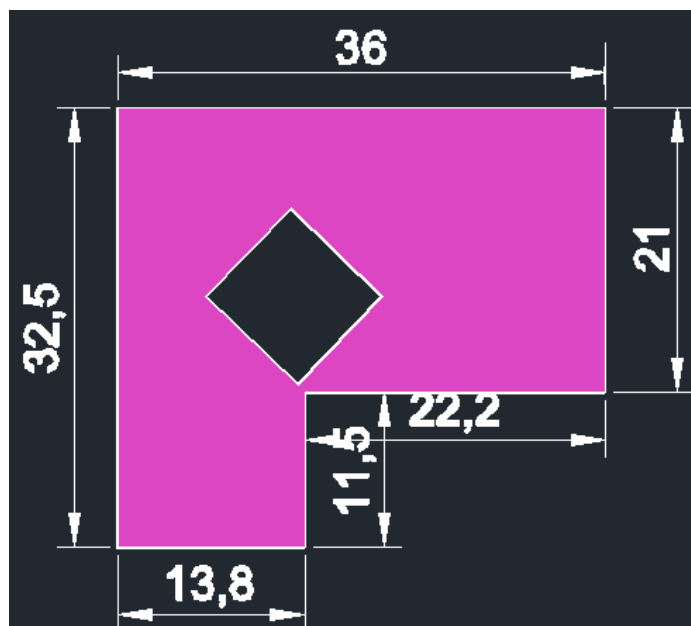
Vista superior del Compartimento de la muestra



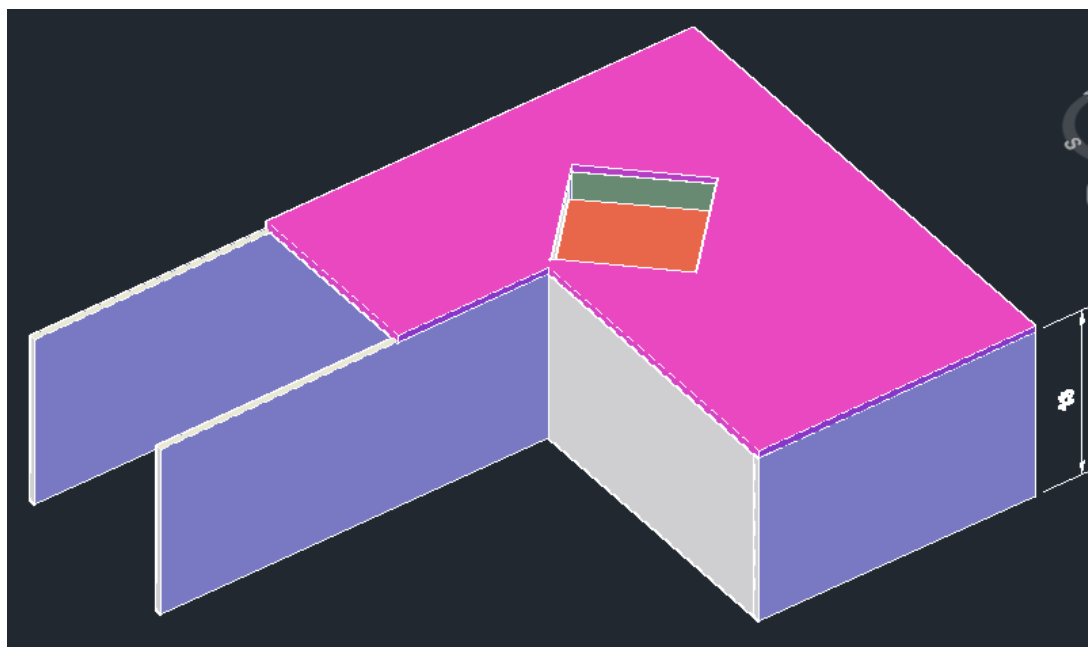
Vista lateral del compartimento de la muestra



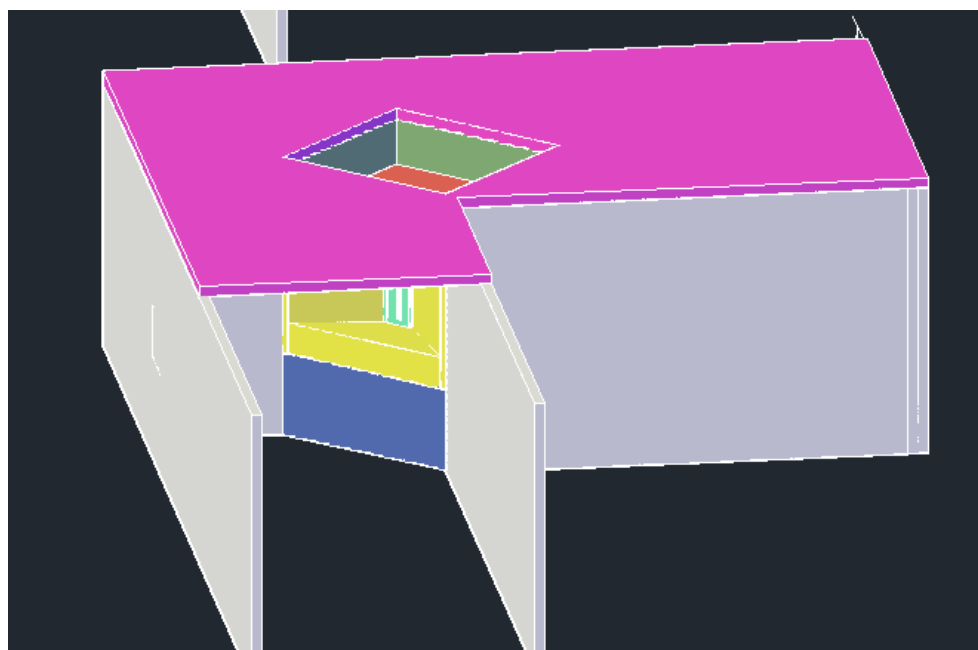
Dimensiones del plano del instrumento



Dimensiones de la tapa superior removible del instrumento



Vista frontal superior de la carcasa del instrumento



Vista frontal del instrumento.

8.2 ANEXO II

Planilla de Gastos en la Construcción del Espectrofluorímetro

- Fuente de luz**

Componente	Proveedor	Costo
Linterna de Aluminio con LED de 100 lúmenes, marca TRUPER	MEGAKIWI	\$ 32.23
Lente de lupa Biconvexo de 3x D = 45 mm.	MEGAKIWI	\$ 0.50
Lente condensador marca Abbe (N.A. 1.25), doble lente y diafragma Iris.	Laboratorio de Óptica de USFQ	Donado

- Monocromador de excitación**

Componente	Proveedor	Costo
Red de Difracción de 1000 líneas/mm de 8 onzas	Importado de Scientific Equipment of Houston desde eBay	\$ 10.42
Servo motor HITEC , velocidad (sec/60o): 0.19, torque (Kg-cm/Oz-in): 3.7/49, tamaño (mm): 40 x 20 x 37, peso (g/oz): 43/1.51	Electrónica Colón	\$ 12.70

- Compartimento de la muestra**

Componente	Proveedor	Costo
Celda de cuarzo de 4 caras transparentes (mm) : 45 × 12.5 × 12.5, capacidad (ml): 4,5	Dr. Carlos Fabara	Préstamo
Celda de vidrio óptico de 4 caras transparentes de 45mm × 12.5mm × 12.5mm, capacidad 4.5 mL.	Importado de Science outlet desde Amazon	\$ 19.99 (x2)

- Monocromador de emisión**

Componente	Proveedor	Costo
4 LEDs de alto brillo - cinco colores: violeta, azul, verde, amarillo y rojo.	Radiocrom	\$ 0.134 (x 4)

- **Detector**

Componente	Suministrador	Costo
Fotodiodo de Silicio HS1010CE, area fotosensible: 10.0mm x 10.0mm, respuesta de 300 a 1000 nm, longitud de onda máxima: 700nm	Importado de BaseLinE Chromtech desde eBay	\$ 15.00 (x 3)

- **Software: Registrador, Adquisición de datos y Automatización del instrumento**

Componente	Proveedor	Costo
NI myDAQ (Kit estudiantil NI myDAQ y versión de LabVIEW Estudiantil para Windows)	Importado de National Instruments, EEUU.por DataLights.	\$ 330.00

- **Parte Electrónica Adicional**

Componente	Proveedor	Costo
Transformador 12V – 1 A	Electrónica Colón	\$ 5.00
Regulador LM 7805	Electrónica Colón	\$ 0.40
Regulador LM 7905	Electrónica Colón	\$ 0.49
Capacitor 1000 μ F / 25 V	Electrónica Colón	\$ 0.22 (x 4)
Capacitor 22 pF - SMD	Electrónica Colón	\$ 0.08
Capacitor 100 nF / 100 V	Electrónica Colón	\$ 0.13
Capacitor 10 pF / 50 V	Electrónica Colón	\$ 0.07
Microcontrolador PIC16F870	APM all power microcontroller	\$ 4.82
OP – AMP LM741	Electrónica Colón	\$ 0.31 (x 3)
Potenciometro de precisión - 2 M Ω	Electrónica Colón	\$ 0.54
Zócalo 8 pines	Electrónica Colón	\$ 0.05 (x 3)
Zócalo 16 pines	Electrónica Colón	\$ 0.08
Cable un PIN 15 cm - mm	Electrónica Colón	\$ 0.16
Bornes 2P - AZ	Electrónica Colón	\$ 0.22

Total = \$ 26.96

- **Carcasa instrumento**

Componente	Proveedor	Costo
Carcasa del instrumento: acrílico negro mate	Acrílicos Nicole	\$ 180.00

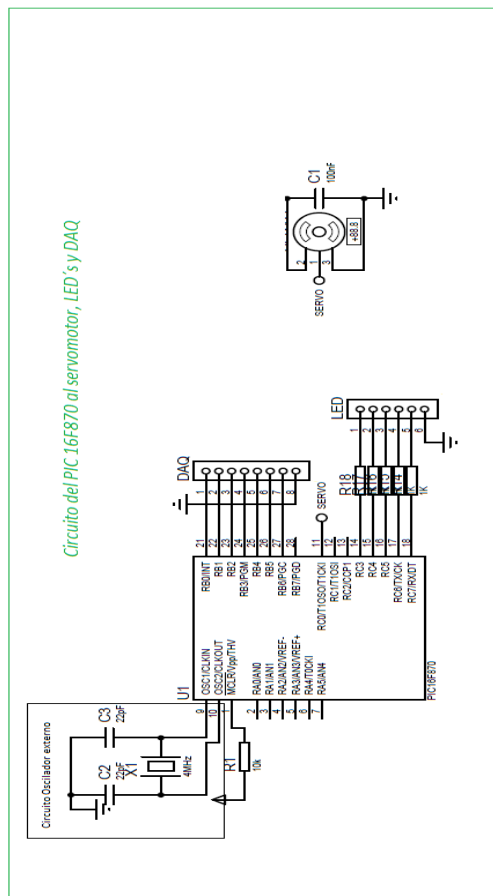
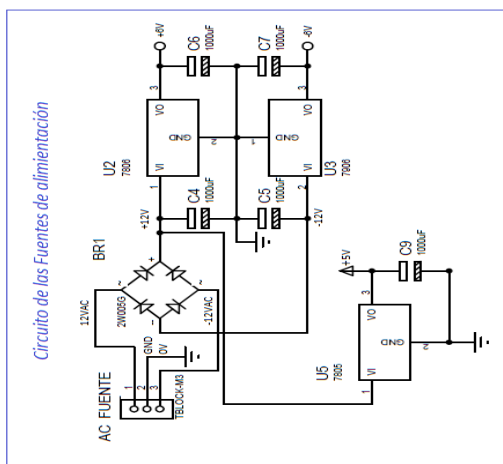
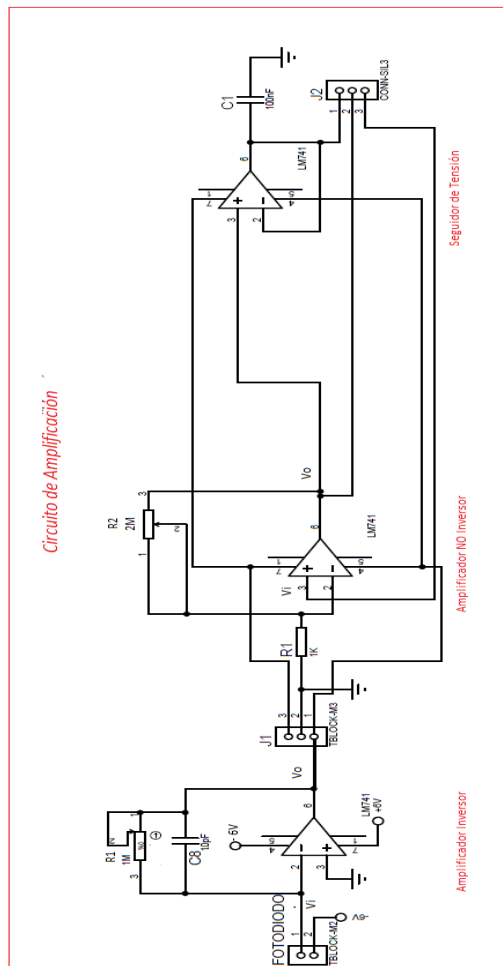
- **Reactivos**

Sustancia	Proveedor	Costo
Riboflavina	Sigma Aldrich – Lab. De Química USFQ	0.00
Ácido Acético Glacial	Lab. De Química USFQ	0.00

El Total de gastos es = \$678.33

8.3 ANEXO III

Circuito electrónico y control del espectrofluorímetro



8.4 ANEXO IV

Código de Programación del Microcontrolador, PIC 16F870

DEFINE OSC 4

'DEFINICION DE PUERTOS

TRISB=%00010111 'TRIS(PUERTO) 0=SALIDA - 1=ENTRADA

PORTB=0

TRISC=%00000000

PORTC=0

POSICION VAR BYTE 'POSICION DEL SERVO DEL 0-4

POSICION = 0

X VAR BYTE 'AYUDA DE POSICION DEL SERVO

SERVO VAR PORTC.0 'PIN DEL SERVO

'PINES A LA DAQ

UP VAR PORTB.0

DOWN VAR PORTB.1

SELECCION VAR PORTB.2 'POSICION DE LECTURA

INDICADOR VAR PORTB.3 'SABER QUE SE CAMBIO DE MEDICIÓN (ABSOR./FLUORESC.)

RESET VAR PORTB.4 'RESET POSICION

'PINES DE LEDS

ROJO VAR PORTC.5

AMARILLO VAR PORTC.3

VERDE VAR PORTC.4

AZUL VAR PORTC.6

VIOLETA VAR PORTC.7

ABSORCION:

LOW INDICADOR

LOW ROJO

LOW AMARILLO

LOW VERDE

LOW AZUL

LOW VIOLETA

IF UP = 1 THEN

 POSICION = POSICION + 1

 PAUSE 1000

ENDIF

IF DOWN = 1 THEN

 POSICION = POSICION - 1

 PAUSE 1000

ENDIF

IF SELECCION = 1 THEN

 GOTO FLUORESCENCIA

ENDIF

IF RESET = 1 THEN

 POSICION = 0

 PAUSE 1000

ENDIF

```
IF POSICION >= 4 AND POSICION <= 20 THEN
```

```
    POSICION = 4
```

```
ENDIF
```

```
IF POSICION >= 100 AND POSICION <= 0 THEN
```

```
    POSICION = 0
```

```
ENDIF
```

```
IF POSICION = 4 THEN      'POSICIONES DEL SERVO
```

```
    FOR X = 0 TO 100 STEP 1
```

```
        PULSOUT SERVO,188
```

```
        pause 10
```

```
    NEXT
```

```
ENDIF
```

```
IF POSICION = 3 THEN
```

```
    FOR X = 0 TO 100 STEP 1
```

```
        PULSOUT SERVO,183
```

```
        pause 10
```

```
    NEXT
```

```
ENDIF
```

```
IF POSICION = 2 THEN
```

```
    FOR X = 0 TO 30 STEP 1
```

```
        PULSOUT SERVO,176
```

```
        pause 10
```

```
    NEXT
```

```
ENDIF
```

```
IF POSICION = 1 THEN
```



```
FOR X = 0 TO 100 STEP 1
  PULSOUT SERVO,171
  pause 10
NEXT
ENDIF
```

```
IF POSICION = 0 THEN
  FOR X = 0 TO 100 STEP 1
    PULSOUT SERVO,167
    pause 10
  NEXT
ENDIF
```

GOTO ABSORCION

FLUORESCENCIA:

HIGH INDICADOR

```
IF UP = 1 THEN
  POSICION = POSICION + 1
  PAUSE 1500
ENDIF
```

```
IF DOWN = 1 THEN
  POSICION = POSICION - 1
  PAUSE 1500
ENDIF
```

```
IF SELECCION = 0 THEN
```

```
GOTO ABSORCION
ENDIF

IF RESET = 1 THEN
    POSICION = 0
    PAUSE 1500
ENDIF

IF POSICION >= 4 AND POSICION <= 20 THEN
    POSICION = 4
ENDIF

IF POSICION >= 100 AND POSICION <= 0 THEN
    POSICION = 0
ENDIF

IF POSICION = 4 THEN
    HIGH ROJO
    LOW AMARILLO
    LOW VERDE
    LOW AZUL
    LOW VIOLETA
ENDIF

IF POSICION = 3 THEN
    LOW ROJO
    HIGH AMARILLO
    LOW VERDE
    LOW AZUL
    LOW VIOLETA
```

ENDIF

IF POSICION = 2 THEN

LOW ROJO

LOW AMARILLO

HIGH VERDE

LOW AZUL

LOW VIOLETA

ENDIF

IF POSICION = 1 THEN

LOW ROJO

LOW AMARILLO

LOW VERDE

HIGH AZUL

LOW VIOLETA

ENDIF

IF POSICION = 0 THEN

LOW ROJO

LOW AMARILLO

LOW VERDE

LOW AZUL

HIGH VIOLETA

ENDIF

GOTO FLUORESCENCIA

END

8.5 ANEXO V

Panel Frontal del Instrumento Virtual Implementado

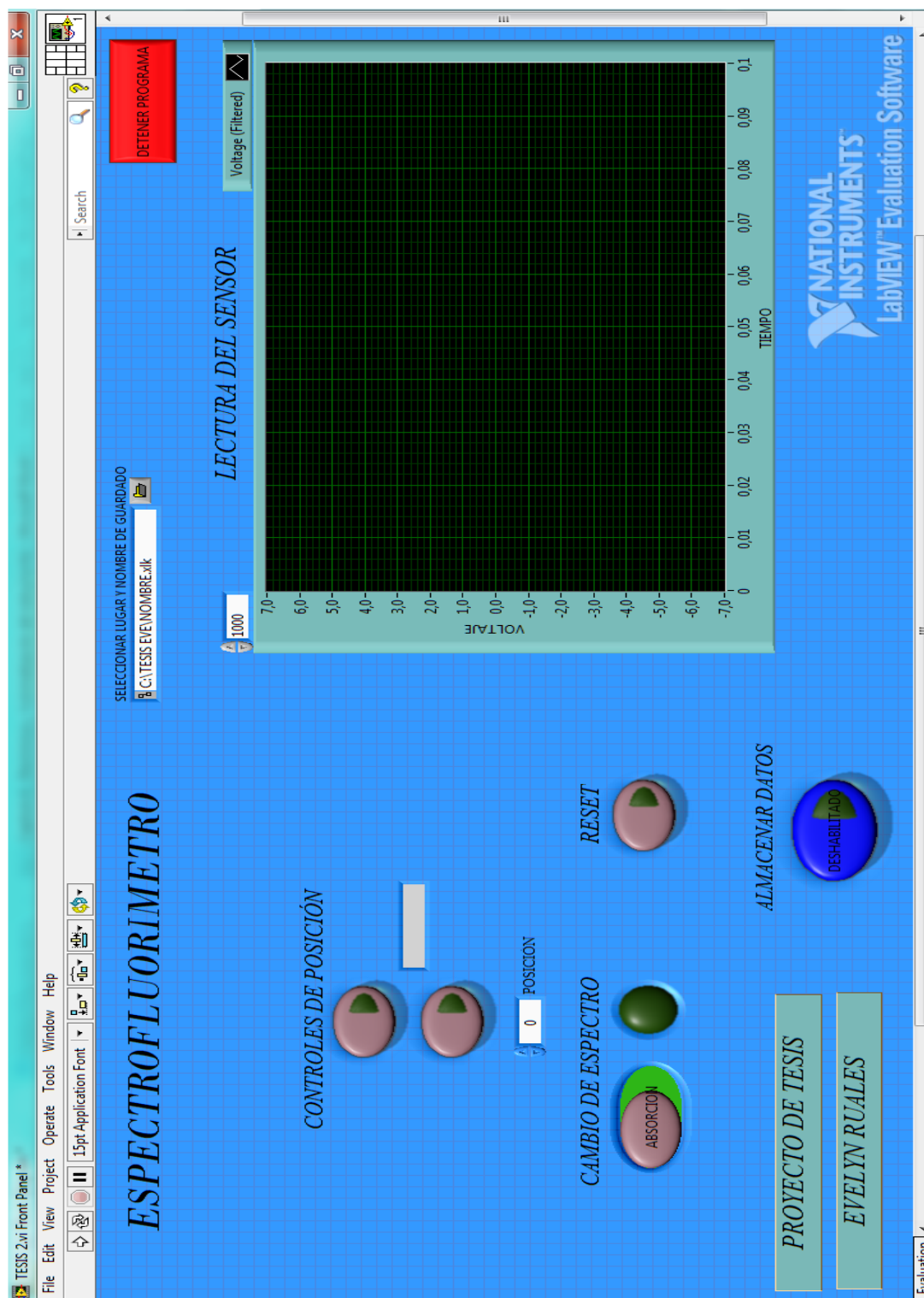


Diagrama de Bloques de Instrumento Virtual Implementado

