

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
SEDE MEDELLIN

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLIN
DEPTO. DE BIBLIOTECA
BIBLIOTECA "EFF" GONZALEZ

1. Ficha del proyecto

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ Y DOS LONGITUDES DE ONDA PARA ANÁLISIS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES ENTRE MEMBRANAS

Código DIME: **030802667**

Facultad: **Ciencias**

Investigador principal: **Sigifredo Solano G.** 10 h/s

Co-investigador: **Gonzalo Vargas Q.** 20 h/s

Fecha de inicio y terminación: **Mayo de 2003 – Mayo de 2005**

2. Descripción del proyecto

El análisis de los estados redox de las sustancias involucradas en el transporte de electrones en la membrana externa y entre membranas mitocondriales, para diversas condiciones metabólicas en las mitocondrias apenas empieza.

Una de las proteínas que es importante en este proceso es el citocromo c y todavía no es claro si su estado redox es importante en la apoptosis. Por otro lado el estado redox del citocromo c debe depender de la integridad de la membrana externa de la mitocondria, ya que éste posee una alta actividad de reducción del citocromo desde afuera de la mitocondria.

La medición de concentración de sustancias que intervienen en el transporte de electrones es realizado en tiempo real mediante espectrofotómetros, pero se presenta el inconveniente de que los espectros de absorción de dos de las sustancias, citocromo c y citocromo b₅, que participan en el proceso se superponen impidiendo que mediante un espectrofotómetro de un solo haz sea posible conocer sus variaciones y por tanto, establecer las posibles rutas de transporte entre los electrones. La clase de equipo que permite realizar esta tarea es un espectrofotómetro de dos longitudes de onda y dos haces, de los



5.84

5

cuales no se posee ninguno en nuestro medio y su adquisición es altamente onerosa. Bajo esta circunstancia se implementó la instrumentación óptica y electrónica necesaria que nos permitió obtener un espectrómetro con muy buenas características.

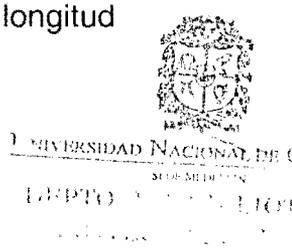
- **Objetivos del proyecto.**

Construcción de un espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda que permite registrar los procesos de oxidación-reducción de citocromos en los sistemas turbios

- **Objetivos Específicos**

Caracterización de un espectrofotómetro de doble haz y doble longitud de onda para diferentes aplicaciones.

Formar un docente de Física a nivel de maestría



3. Resultados directos

Un espectrofotómetro cuyas características se describen en el documento anexo 1: **Diseño y Construcción de un espectrofotómetro de doble haz y doble longitud de onda.**

El estudiante del posgrado de la Escuela de Física *Gonzalo Vargas Q.* realiza actualmente la tesis: *"Análisis de transporte de electrones entre membranas mitocondriales de hígado de rata con el método de espectrofotometría de doble haz y dos longitudes de onda"* (ver anexo 2)

B. Innovaciones tecnológicas.

Posibilidad de aplicación de los resultados a través de diseños industriales para reconversión de espectrógrafos o instrumentos similares a espectrofotómetros o construcción de dispositivos portátiles con base en los mismos principios.

Los desarrollos tecnológicos alcanzados permitirán la recuperación mediante una tesis de pregrado, de otro espectrofotómetro que posee el Departamento de Física, de la misma magnitud que el usado en esta investigación.

C. Montajes experimentales para investigación, docencia o extensión.

Se está incorporando, a través de proyectos de asignaturas, el diseño y construcción de fotómetros de un solo haz y una sola longitud de onda para medición autónoma de densidad óptica, utilizando todo el conocimiento adquirido con emisión, modulación y detección de señales

NC 53100

luminosas en los cursos de instrumentación y Biofísica de Ingeniería Física de la Facultad de Ciencias.

4. Resumen ejecutivo de los resultados indirectos

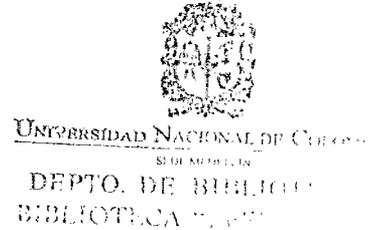
A. Formación del recursos humanos

Gonzalo Vargas Q. carne: cc: 3.382.996

Tesis: *Análisis de transporte de electrones entre membranas mitocondriales de hígado de rata con el método de espectrofotometría de doble haz y dos longitudes de onda.*

Director: Dr. Víctor Lemeshko

Estado Actual: Pendiente la versión final.



B. Divulgación de los resultados en eventos científicos

"*Diseño y construcción espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda*". Aceptado como **Mural** en el XX Congreso Nacional de Física y Escuela de Física de la materia condensada. Armenia, Septiembre 2003. Ver anexo 3.

"*Diseño y construcción espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda*" enviado como mural para el IX Encuentro Nacional de Óptica. Medellín, Junio 2005. La fecha límite para recepción de trabajos de texto completo es el 29 de Abril del presente (ver anexo 4).

5. Dificultades

Debido al recorte presupuestal para la vigencia del año 2004 y ya que no era posible disminuir ningún otro rubro como se lo hicimos saber a la Dr. Olga Cecilia Guzmán en carta de fecha Mayo 12 de 2004, el DIME autorizó modificar el rubro de viajes y viáticos de \$1.600.000 a \$100.000 para publicaciones. Desafortunadamente fue el único rubro que no se ejecutó pues hasta ahora se están presentando las ponencias.

Debido a las dificultades en la adquisición de algunos elementos para la construcción del espectrómetro en misiva de fecha febrero 24 del presente dirigida al Dr. Diego Mejía D como coordinador encargado de la Investigación en al Facultad de Ciencias se solicitó hasta el 15 de junio para enviar una ponencia al XXI Congreso Nacional de Física a realizarse en Barranquilla en Octubre del 2005 y/o sometimiento como artículo para la Revista Colombiana de Física, e igualmente, se le hizo saber nuestro deseo de presentar, como lo estamos haciendo, una ponencia al IX Encuentro Nacional de Óptica.

6. Informe financiero

Del monto total del dinero asignado al proyecto se ejecutó completamente y dentro de los plazos estipulados los recursos correspondientes a la vigencia 2003; para la el año 2004 no se ejecutaron los gastos correspondientes al rubro de publicaciones por las razones arriba expuestas y \$470.000 en el rubro de servicios de laboratorios internos debido a que el Laboratorio que prestó el servicio no presentó la factura dentro de los plazos estipulados. Ver Anexo 5.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SECRETARÍA DE
DEPTO. DE BIBLIOTECA Y DOCUMENTACIÓN
BIBLIOTECA "EL BOGOTANO"

7. Anexos



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DEPARTAMENTO DE

INGENIERIA DE SISTEMAS

ANEXO 1



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDICINA
DEPTO. DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA "E.F." GONZALEZ

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN ESPECTROFOTÓMETRO
DE DOBLE HAZ Y DOS LONGITUDES DE ONDA**

Investigador Principal
Sigifredo Solano González
ssolano@unalmed.edu.co

Co-investigador
Gonzalo Vargas Quiróz.

Asesor y Director
Dr. Víctor Lemeshko

MEDELLÍN
Abril del 2005



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

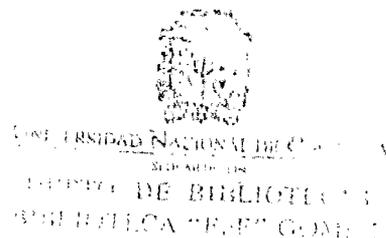
LIBRO DE TITULO

TABLA DE CONTENIDO

1. TÍTULO.
2. JUSTIFICACIÓN.
3. DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO
 - 3.1. INTRODUCCIÓN
 - 3.2 CONFIGURACIONES ÓPTICAS DE ESPECTROFOTÓMETROS
 - 3.2.1 Espectrofotómetro de un solo haz
 - 3.2.2 Espectrofotómetro de doble haz
 - 3.2.3 Espectrofotómetro de doble longitud de onda
 - 3.3 COMPONENTES Y MÉTODO DE DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO
 - 3.3.1 Descripción del monocromador
 - 3.3.1.1 Sistema de iluminación y colimador de entrada
 - 3.3.1.2 Componentes ópticos del sistema dispersivo
 - 3.3.1.3 Rejilla de difracción
 - 3.3.2 Descripción del espectrofotómetro.
 - 3.3.2.1 Complejo mecánico
 - 3.3.2.2 Sistema de adquisición y control
 - 3.3.2.2.1 Lock-in amplifier
 - 3.3.2.2.2 Tarjeta de adquisición
 - 3.3.2.3 Calibración del instrumento
 - 3.3.2.3.1 Rango espectral
 - 3.3.2.3.2 Resolución espectral

4. RESULTADOS OBTENIDOS

BIBLIOGRAFIA



1. TÍTULO

Diseño y construcción espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda para análisis de transporte de electrones entre membranas mitocondriales

2. JUSTIFICACIÓN

Existe en nuestro medio, en diversas áreas de investigación, desarrollo y de enseñanza en la Universidad, la necesidad de un equipo de espectrometría de doble haz y doble longitud de onda de buena resolución, para realizar mediciones útiles en investigaciones biofísicas, biológicas y de desarrollos en áreas eco-bio-agropecuarias.

Esta clase de equipo permite realizar mediciones de concentraciones muy bajas de dos sustancias simultáneamente, las cuales tienen diferente longitud de onda máxima de absorción y las cuales pueden ser tan cercanas como 5nm, además esta clase de equipo permite eliminar problemas como la turbidez del medio que podría interpretarse erróneamente como un cambio de concentración.

En la Sede existe una ventaja estratégica que puede ser usada para obtener un equipo que reemplace un aparato de estos de alto costo, esa ventaja consiste en un Espectrógrafo de chispa de marca Carl Zeiss Jena que fue dado de baja hace unos años porque algunas de sus partes eran ya obsoletas para el uso inicialmente destinado, pero del cual actualmente funciona su monocromador de alta calidad y resolución que puede ser convertido en la fuente ideal del espectrómetro de dos longitudes de onda y dos haces. Lo anterior ayudado con la electrónica, el equipo de medición, el software y hardware de procesamiento que se posee en la Escuela de Física permite obtener un equipo con una altamente favorable relación costo beneficio.

3. DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Bogotá
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE FÍSICA

3.1 INTRODUCCIÓN

La espectrometría óptica es hoy en día una de las áreas más usadas en el análisis químico, biológico y en las ciencias médicas. El mayor uso que se le da a la espectrometría es en la determinación de especies absorbentes (cromóforos), denominada más específicamente como espectrofotometría. Todos los métodos espectrofotométricos que miden absorción se basan en la ley de Beer-Lambert. Esta ley establece que *la luz absorbida por un medio transparente A y denominada absorbancia, es independiente de la intensidad de la luz incidente y que cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual de la luz que pasa por ella, o sea es proporcional al número de moléculas del cromóforo a través del cual pasa la luz.* Esto lleva a un decaimiento exponencial de la intensidad de la luz al pasar por la muestra y puede expresarse matemáticamente como:

$$A = \log_{10} (I / I_0) = \epsilon c d \quad (1)$$

La ley de Beer-Lambert puede ser derivada haciendo la aproximación de que la molécula es una placa cuya área transversal σ representa el área efectiva vista por un fotón de frecuencia w . Si la frecuencia de la luz es muy diferente a la de la frecuencia de resonancia, el área efectiva es aproximadamente cero y si la frecuencia es cercana a la de resonancia, el área es máxima. Tomando una placa infinitesimal de espesor dz , como se muestra en la figura 1, I_0 es la intensidad entrando en la muestra en $z = 0$, I_z es la intensidad entrando en la placa infinitesimal de la muestra en z , dI es la intensidad absorbida en la placa, e I es la intensidad de luz saliendo de la muestra. Entonces el total del área de la placa debida a N moléculas absorbentes es $\sigma N dz$, por tanto la fracción de fotones absorbidos en la placa infinitesimal será $\sigma N dz / I$, de donde,

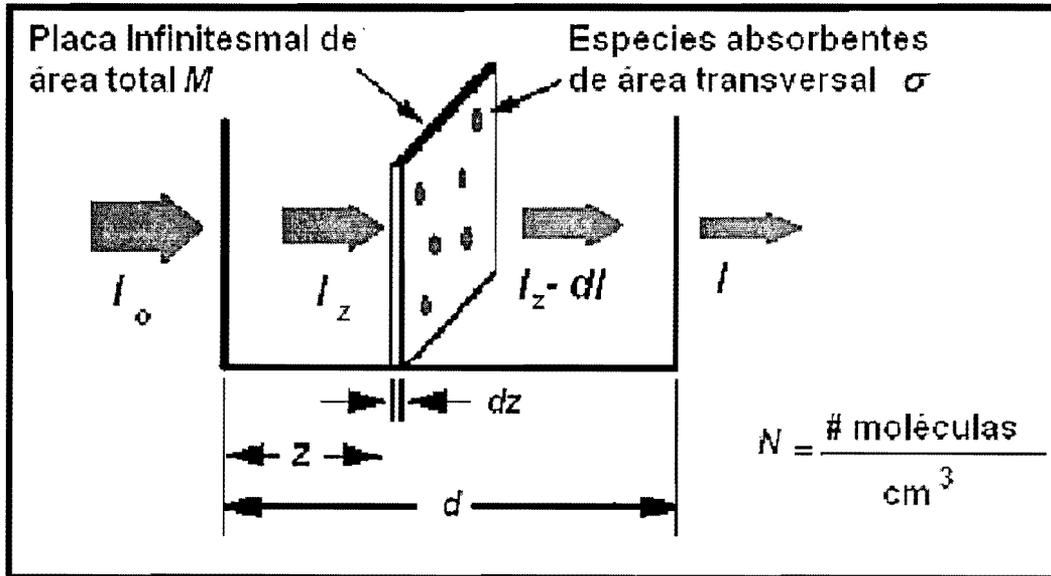


Figura 1. Ley de Beer-Lambert

$$dI / I_z = \sigma N dz \quad (2)$$

Integrando esta ecuación desde $z = 0$ a $z = d$ que es el espesor recorrido de la muestra, tenemos:

$$\ln(I) - \ln(I_0) = \sigma N d \quad (3)$$

$$\ln(I / I_0) = \sigma N d \quad (4)$$

N puede ser expresado en términos de la concentración (c) mediante la siguiente conversión

$$N (\text{moléculas}/\text{cm}^3) \times (1 \text{ mole} / 6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}) \times 1000 \text{ cm}^3 / \text{litro} = c \text{ en (moles/litro)}$$

$$N = c(6.033 \times 10^{23} / 2.303) \quad (5)$$

Ayudados con la expresión

$$2.303 \log(x) = \ln(x) \quad (6)$$

Reemplazando en la ecuación (4), tenemos

$$\log(I / I_0) = \sigma (6.023 \times 10^{20} / 2.303) c d \quad (7)$$

Si definimos el coeficiente de absorción molar dependiente de la longitud de onda de la luz incidente en términos de σ

$$\epsilon = (6.023 \times 10^{20} / 2.303) \sigma = 2.61 \times 10^2 \sigma \quad (8)$$

Y de nuevo reemplazando en (7) obtenemos,

$$\log(I / I_0) = \epsilon d c \quad (9)$$

Que es la expresión definida en la ecuación (1) y conocida como absorbancia

Comúnmente en espectrometría, del espectro de la radiación electromagnética se utilizan las regiones ultravioleta (UV, 185-400nm), visible (400, 700nm) e infrarroja.

Algunas veces el paso de la luz a través de la muestra se puede expresar con la transmitancia

$$T = I/I_0 \quad (10)$$

O como porcentaje de la transmitancia

$$\%T = 100T = I/I_0 \quad (11)$$

La relación entre la transmitancia y absorbancia a partir de las ecuaciones (1) y (10) está dada por:

$$A = -\log_{10} T \quad (12)$$

Hay que notar que únicamente la absorbancia es proporcional a la concentración del cromóforo.

3.2 CONFIGURACIONES ÓPTICAS DE ESPECTROFOTÓMETROS

Tres son las configuraciones típicas de espectrofotómetros para las medidas cinéticas procesos químicos o biológicos:

3.2.1 Espectrofotómetro de un solo haz

En esta configuración un solo haz de longitud de onda λ pasa a través del compartimiento de la muestra. La absorbancia cero o 100% se ajusta con el contenido de una sustancia buffer o solvente en la cubeta. El valor de la absorbancia se mide al paso de este mismo haz a través de la cubeta que contiene la muestra de estudio a una longitud de onda particular.

3.2.2 Espectrofotómetro de doble haz

En esta configuración un haz de luz de un monocromador a una longitud de onda dada λ se divide con un splitter (chopper) en dos haces: uno que pasa por una cubeta de referencia y otro que pasa por la cubeta con la muestra. Los dos haces, que tienen la misma longitud de onda, son separados en el espacio y el tiempo y detectados en secuencia como la señal de salida de la muestra I y la señal de salida de una segunda muestra (referencia) I_o. La transmitancia a una longitud de onda dada λ en la muestra está relacionada con la transmitancia a la misma longitud de onda λ de la referencia donde no tiene lugar ningún cambio de absorbancia. Comparada con el arreglo de un solo haz, los cambios causados por ejemplo por ruido electrónico y/o temperatura se presentan al mismo tiempo en las dos muestras de tal manera que al medir los cambios de absorbancia de la muestra con respecto a la muestra de referencia la componente de señal no deseada disminuye y así la relación señal ruido (SNR) se incrementa significativamente.

3.2.3 Espectrofotómetro de doble longitud de onda

La característica más importante en la configuración de doble haz y doble longitud de onda es la presencia de *dos* monocromadores cuyas salidas son enviadas a una sola muestra por medio de un espejo rotante (chopper). La absorbancia a una longitud de onda λ_1 en una muestra se relaciona con la de otra longitud de onda de referencia λ_2 de la misma muestra. En uno de los casos típicos, la longitud de onda de referencia se coloca en un punto del espectro en el cual no se espera ningún cambio de absorbancia en una medición particular, denominado punto isobéptico [1]. En particular los cambios de absorbancia debido a la turbiedad que se presenta son relativamente independientes de la longitud de onda, de los cambios de conformación de la molécula y de las fluctuaciones que ocurran en la fuente de luz [2]. Si hay cambios indeseados en el espectro absoluto estos son minimizados puesto que lo que se registra es la diferencia de estos espectros por las dos longitudes de onda y por lo tanto el nivel SNR se incrementa hasta en un factor de 1000.

3.3 COMPONENTES Y MÉTODO DE DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO

Para el estudio de la corriente de electrones en las membranas interna y externa o intermembranal de las mitocondrias el espectro de absorción de las diferentes situaciones de interés es la superposición de los espectros de las sustancias involucradas y sus diferentes estados redox. Esta superposición no permite, en principio, determinar la concentración de algunos de los citocromos involucrados en la reacción. Los espectros diferenciales (es decir reducido menos oxidado) de los diferentes citocromos permite determinar las absorbancias. Determinar la absorbancia (o su diferencia) de los diferentes citocromos en soluciones turbias es un problema adicional que debe resolver el espectrofotómetro de doble haz y doble longitud de onda.

En la espectrofotometría de dos longitudes de onda desarrollada en la década de 1950 por Britton Chance y a partir de allí, a pesar que se continúan implementándose diferentes versiones, siempre se han utilizado dos monocromadores para obtener las dos longitudes



de onda. El primer espectrofotómetro de doble haz fue descrito por Chance [3] hace ya 30 años y a través del tiempo se han ido modificando y adaptando [4] hasta su automatización [5] hoy en día.

Para la construcción de este espectrofotómetro de dos haces y dos longitudes de onda se utilizó un solo un monocromador método que no se ha reportado en la literatura. El monocromador se tomó del sistema óptico y mecánico original de un espectrógrafo marca Carl Zeiss Jena y del cual no se modifica ni su cavidad ni la disposición óptica o mecánica interior. Ver figura 2

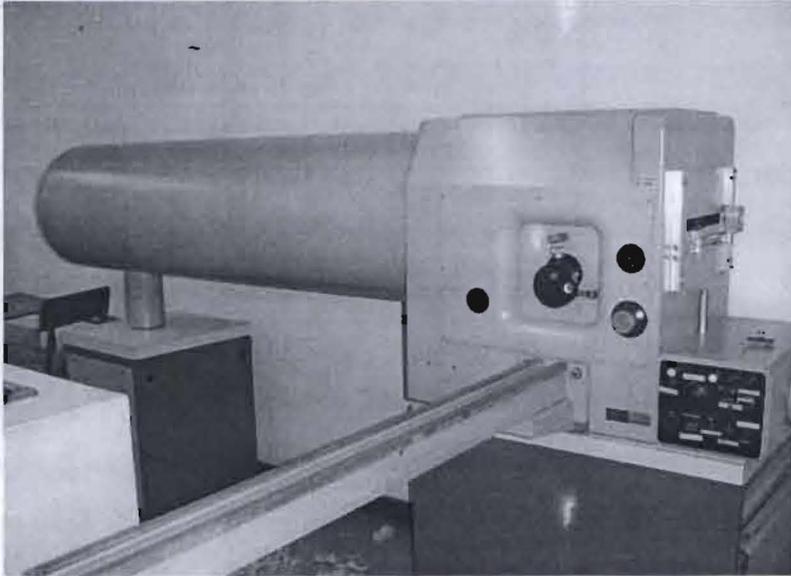


Figura 2. Espectrógrafo Carl Zeiss Jena

3.3.1 Descripción del monocromador

3.3.1.1 Sistema de iluminación y colimador de entrada

Se diseñó y construyó un sistema de iluminación para sustituir el sistema original, figura 3. El sistema de iluminación está compuesto de una lámpara de filamento de tungsteno de 150w (intercambiable para obtener las potencias deseadas) con sistema de regulación de retroalimentación óptica de corriente de línea para evitar variaciones de intensidad y un sistema condensador acromático con enfoque graduable. El filamento de la lámpara halógena se coloca vertical y paralelo a la ranura graduable de entrada del haz al sistema dispersor de luz.

3.3.1.2 Componentes ópticos del sistema dispersivo

La entrada al sistema dispersivo está compuesto de una lente de distancia focal 340 mm para enfocar el filamento sobre una ranura graduable mecánicamente hasta 3 mm de ancho. Dispone además de varios atenuadores que se seleccionan mediante perillas. De esta manera se obtienen las condiciones adecuadas del haz para el espectro dispersivo. Cuando

la luz emerge de la ranura se desvía a 90° con un espejo plano y se colima por un espejo esférico donde se refleja hasta la rejilla de difracción. La figura 4 muestra este detalle del monocromador.

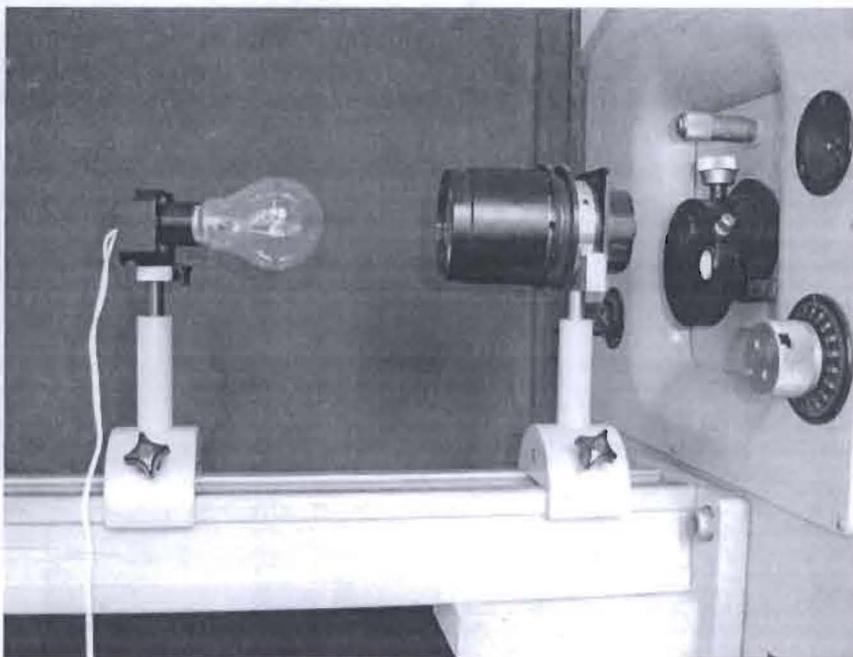


Figura 3. Sistema de iluminación usado

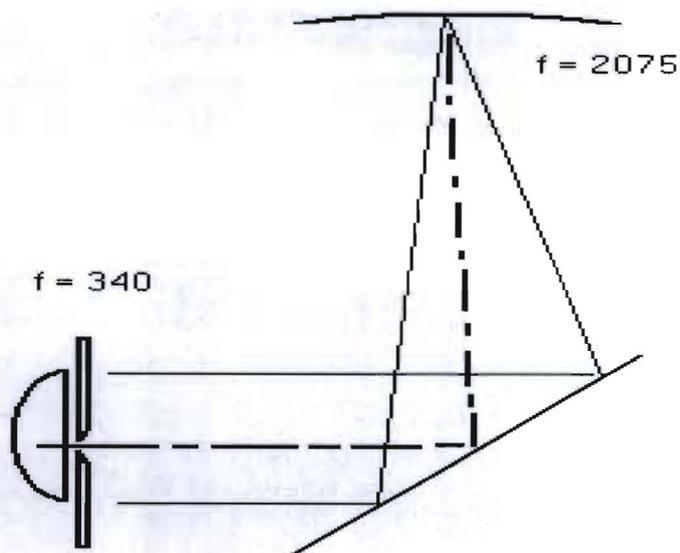


Figura 4 . Detalle de iluminación de la rejilla de difracción.

3.3.1.3 Rejilla de difracción

La rejilla plana de difracción es de reflexión y está colocada sobre un sistema rotante que permite ajustar la iluminación en sus diferentes órdenes con una resolución hasta de 1 nm por cada mm en plano de sensado. Rayada mecánicamente tiene una estructura periódica en la dirección de dispersión. La red de la rejilla es tipo blaze plana a 500 nm y cubre longitudes de onda desde 333 a 750 nm en el primer orden de difracción.

La red o rejilla plana de difracción de reflexión tiene una estructura periódica en la dirección de dispersión con líneas ranuradas o rayadas mecánicamente sobre su superficie. Está colocada sobre un sistema rotante que permite ajustar la iluminación en sus diferentes órdenes.

Las características de la rejilla son:

Ancho de la rejilla W .

El número de líneas por unidad de longitud $Nr = 650 \text{ líneas/mm}$

La constante de grilla d la cual es el recíproco de Nr . es $d = 1.5 \mu m$

La función de rejilla, es decir la función que relaciona el ángulo de incidencia ϕ_1 al ángulo de difracción ϕ_2

$$\sin \phi_1 + \sin \phi_2 = m \frac{\lambda}{d} \quad | \quad (13)$$

donde m es el orden de difracción;

La eficiencia de la rejilla $\eta(\lambda)$ que es la relación entre la potencia radiante refractada y la potencia incidente

$$\eta(\lambda) = \frac{\phi_\lambda(out)}{\phi_\lambda(in)} \quad (14)$$

El rango libre espectral en uso (sin órdenes sobrepuestos) es:

$$\Delta\lambda = \frac{\lambda}{m} \quad (14)$$

El blaze, que es la dirección de la eficiencia $\eta(\lambda)$ de la rejilla; el ángulo blaze γ representa el ángulo entre la rejilla normal y la superficie de las líneas ranuradas en la rejilla.

La longitud de onda de blaze es la longitud de onda para la cual la rejilla tiene máxima eficiencia, en nuestro caso es 500 nm., lo cual nos permite un rango 333 a 750 nm. en el primer orden

De las cantidades anteriores, las siguientes pueden ser calculadas:

La potencia teórica de resolución

$$R_o = m N r \quad (15)$$

La dispersión angular (en radianes por longitud de onda):

$$\frac{d\phi_2}{d\lambda} = \frac{R_o}{B_w}, \quad (16)$$

donde B_w es el ancho del haz óptico difractado en el plano de difracción.

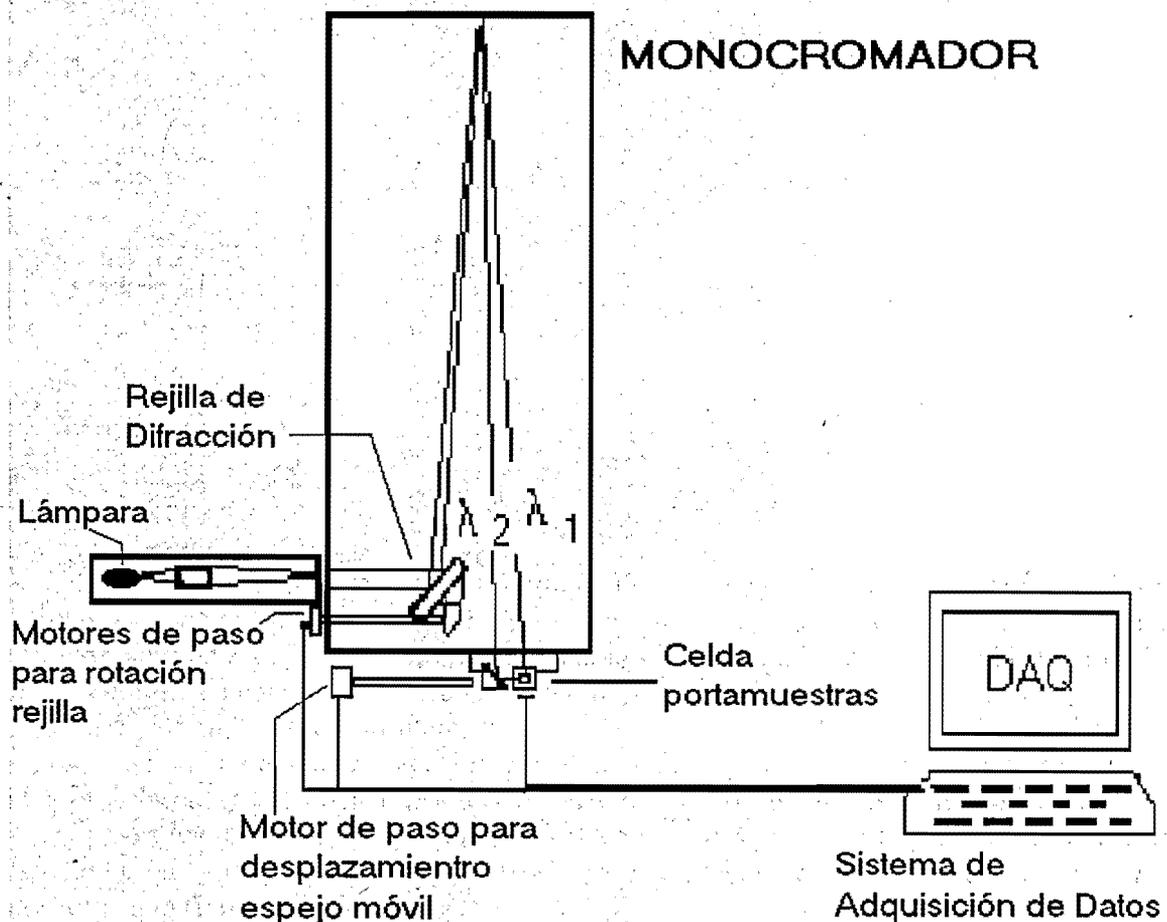


Figura 5. Montaje del espectrofotómetro

3.3.2 Descripción del espectrofotómetro.

El espectrofotómetro consiste de la fuente de luz, el conjunto de lentes para colimar el haz de luz de la lámpara, una ranura graduable, la unidad del monocromador, móviles, un complejo mecánico adaptado al monocromador sin alterar ninguna de sus partes del espectrógrafo original y un sistema de adquisición y control DAQ manejado por computador completa el instrumento. Un esquema de todo el equipo completo se presenta en la figura 5.

3.3.2.1 Complejo mecánico

El complejo de partes mecánicas agregadas al monocromador consiste de un sistema de sujeción que soporta los ejes para desplazamiento, la celda porta muestras, el soporte para espejo móvil y su motor y la caja que cubre todo el sistema, adicionalmente sobre el sistema de rotación se sujeta el motor de movimiento de la rejilla, ver partes en figura 6.

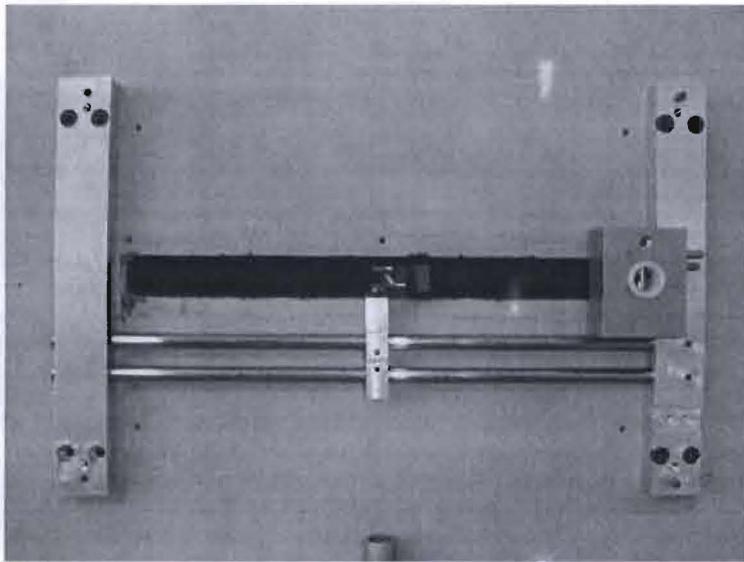


Figura 6. Detalles de sistema mecánico

La celda porta muestras consiste de un bloque donde se aloja la cavidad para las celdas o cubetas estándares que contienen las muestras, en la parte inferior se aloja el motor agitador, alrededor de la cavidad para la celda se encuentra un sistema de refrigeración: El motor chopper se encarga de hacer rotar una pieza ranurada y con espejo se encarga de la función de intermitente interrumpir el paso de un haz de luz λ_1 y permitir el paso del otro, λ_2 , con longitud de onda diferente. En este bloque también se dispone de un interruptor que detecta si la cubeta se encuentra puesta, un fotodiodo sensor del instante en que los dos haces pasan hacia la muestra, también se encuentra aquí sujeta la tarjeta que contiene el fotodiodo sensor de absorbancia y su respectiva electrónica, ver vista en corte en figura 7 y una foto en la figura 8.

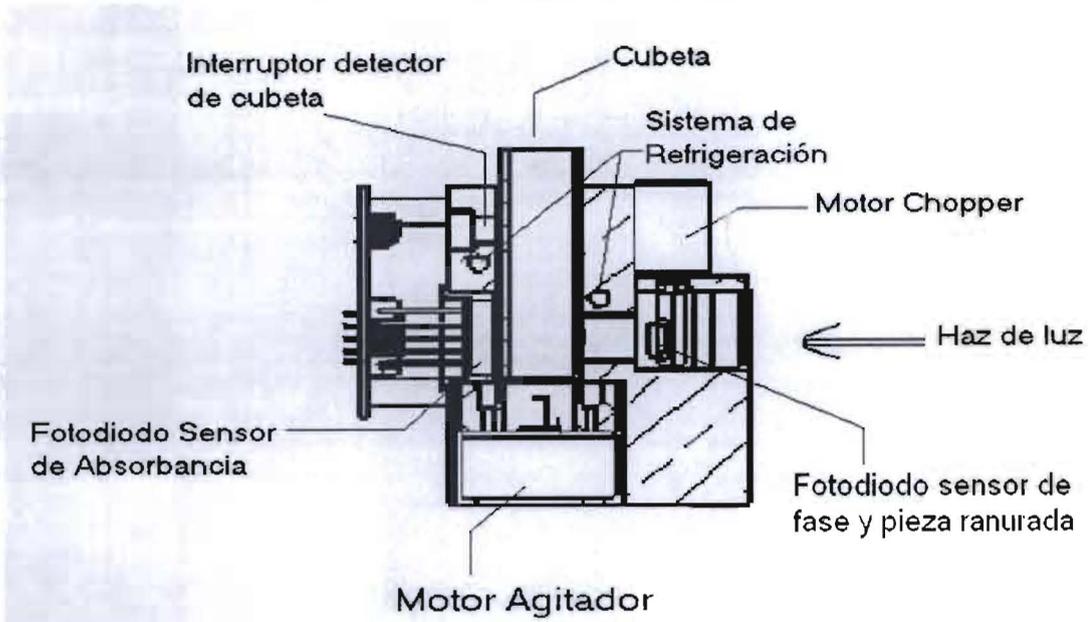


Figura 7. Vista en corte de celda porta muestras y sus partes

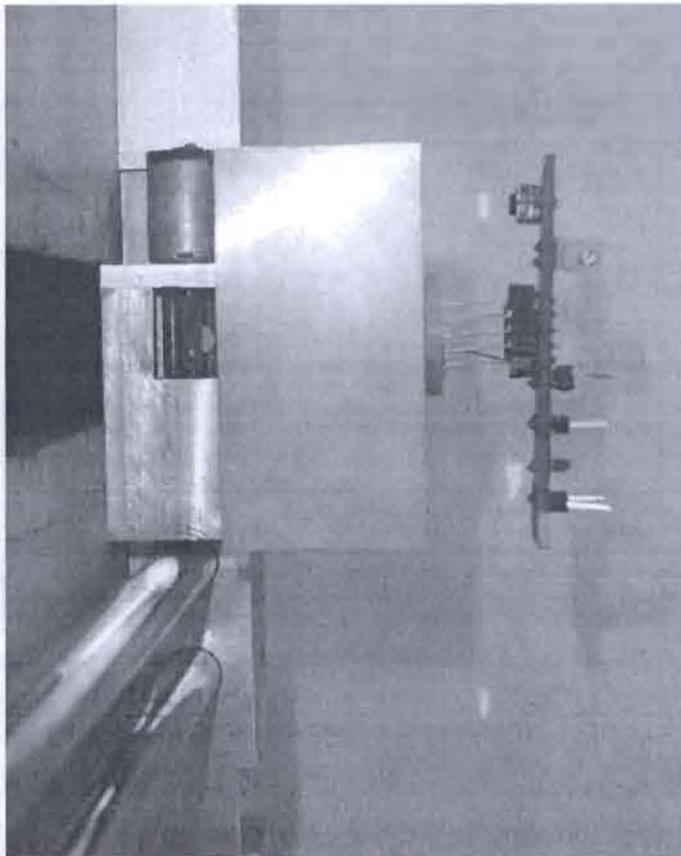


Figura 8. Foto lateral de celda porta muestra

3.3.2.2 Sistema de adquisición y control

Un esquema general del sistema electrónico de adquisición y procesamiento de la señal se muestra en la figura 9.

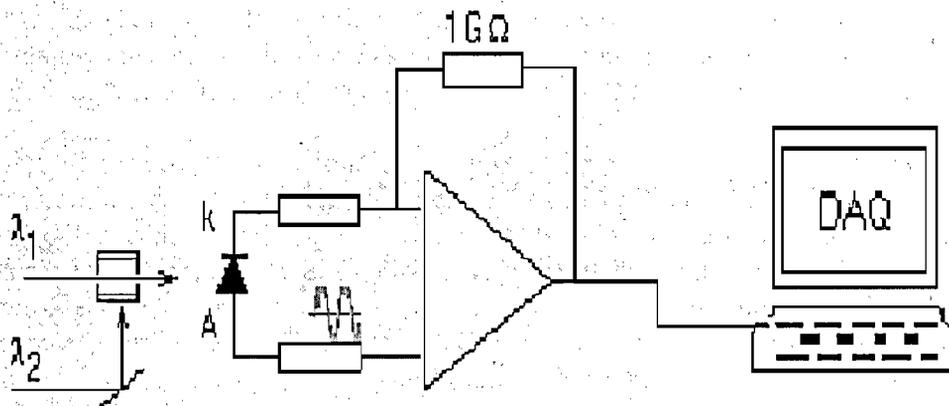


Figura 9. Sistema de adquisición y procesamiento

En todo espectrofotómetro debido al “stray light” y demás ruidos presentes en la medición, la relación señal ruido (NSR) suele ser mucho menor que uno. Para aumentar la NSR técnicas de modulación no son suficientes, pues no siempre ajusta la señal en el ancho de banda mínimo del filtro pasabajo que se pueden implementar en la práctica. Por esto se utilizan dentro del sistema de adquisición técnicas de tipo amplificación lock-in. Las componentes básicas del sistema de detección utilizado para el aumento de la relación señal ruido puede verse en la figura 10.

3.3.2.2.1 Lock-in amplifier

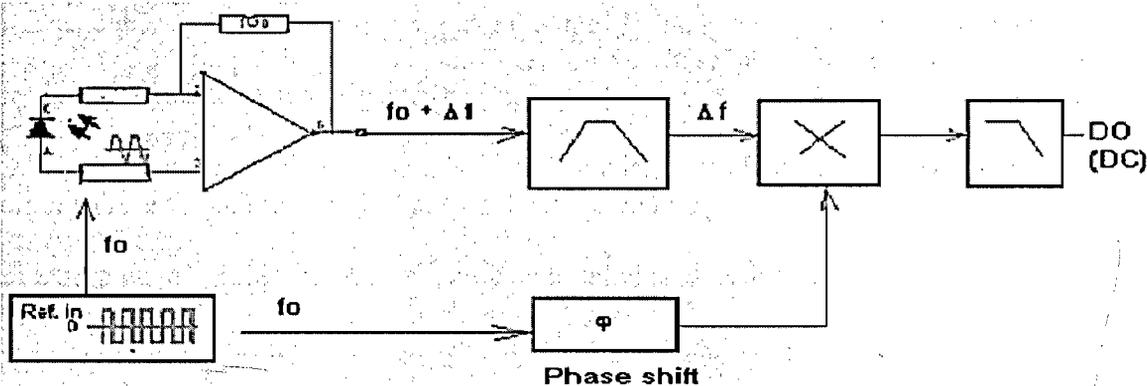


Figura 10. Amplificación tipo Lock-in

Para el uso de la amplificación tipo lock-in dentro de sistemas ópticos, la técnica de modulación “optical chopper” utiliza un motor a 8000 RPM y un fotodiodo sensor de fase

para generar una onda sincronizada a la frecuencia del chopper y a la entrada de los haces que entran en la muestra. Así el sistema se coloca para empezar a adquirir datos en un período, es decir desde cuando el fotodiodo sensor de fase recibe luz (ON) hasta cuando deja de recibir luz (OFF). El sistema de adquisición empieza la colección de datos cuando la señal de referencia hace una transición del bajo a alto a través del fotodiodo sensor de absorbancia referencia S5591 que posee amplificación integrada y resolución de nanovatios. El sistema de adquisición se coloca a una velocidad de conversión que permita unos 500 datos por periodo los cuales se promedian, con oscuridad y luego se restan para cada longitud de onda. De estas dos señales se obtiene la absorbancia mediante el software.

La selección de las dos haces de longitudes de onda λ_1 y λ_2 se hace posicionando la región del espectro de interés rotando con un motor de paso la rejilla de difracción hasta la ranura de entrada del haz de la celda porta muestra reciba la luz correspondiente a la menor longitud de onda. Desplazando el espejo móvil automáticamente se posiciona en el lugar donde recibe en su centro el segundo haz con la mayor longitud de onda, el cual es redireccionado hasta el espejo que tiene el motor chopper que en su rotación hace llegar este haz hasta la muestra y luego a fotodiodo sensor de absorbancia.

El ancho de los espejos de 3 mm y el máximo acercamiento entre el espejo móvil y la pieza ranurada y con espejo del motor chopper determina la resolución del espectrofotómetro y es de 5 nm, más que apropiado para la aplicación para la que se diseñó. La resolución espectral del espectrofotómetro se puede lograr gracias a que la resolución que se alcanza en el espectrógrafo de 1 nm por cada mm del ancho sobre la ventana de salida de 30x2 cm, mientras el enfoque del sistema de iluminación use un ancho de ranura máxima a la entrada del monocromador.

La única señal amplificada por el lock-in es aquella que tenga la misma frecuencia y fase que la señal de referencia. En el sistema (ver figura 9), la información de la señal (Δf) ha sido superpuesta a la portadora f_0 por una técnica de modulación (optical chopper) en relación de fase con la forma de onda de referencia, también a f_0 . Cuando la señal es multiplicada por la referencia, resulta una forma de onda portadora de la señal Δf a frecuencia $2f_0$. Puesto que Δf es generalmente de baja frecuencia se puede extraer de la portadora $2f_0$ con un filtro paso bajo. El espectro de la señal de frecuencia (Δf) centrada en f_0 se transforma al mismo espectro centrado en dc.

Si la señal y referencia son de la misma frecuencia, la salida es dc, siendo máxima cuando están en fase y mínima cuando están a 90° fuera de fase.

Si la fase de la señal se invierte, el signo de la señal dc de salida se invierte.

Para un amplificador lock-in, la pasabanda efectiva puede ser aproximadamente:

$$\Delta f = 1/4RC \quad (17).$$

Donde RC es la constante de tiempo del filtro pasabajo.

El software calcula la absorción de la muestra y usa el espectro de la muestra de referencia y para ello obtiene el espectro de corriente de oscuridad de la siguiente manera:

$$A = \log [(I_r - I_d) / (I_s - I_d)] \quad (18)$$

Donde A representa el espectro de absorbancia; I_r la señal incidente; I_s representa la señal transmitida e I_d la señal de corriente de oscuridad

3.3.2.2 Tarjeta de adquisición

Un circuito para el manejo y alimentación de los motores de selección de las longitudes de onda se fija al espectrofotómetro e interconecta una tarjeta de adquisición DAQ NI PCI 6013 de la compañía National Instruments incluida dentro de un computador personal.

El espectrofotómetro es totalmente operado por medio de un panel de control virtual desarrollado en Lab View en el computador. Un control de perilla se asigna para el tiempo de exposición. Un control numérico se utiliza para desplegar el número de espectros a ser capturados. Un control binario se usa para escoger entre una muestra de referencia y la muestra problema, también permite al usuario el posicionamiento de la muestra en la trayectoria óptica del espectrofotómetro

3.3.2.3 Calibración del instrumento

La calibración del espectrofotómetro se logró haciendo las siguientes mediciones: Rango espectral, resolución espectral, precisión, rango dinámico y precisión. Cubetas estándares de vidrio se usaron para calibrar.

3.3.2.3.1 Rango espectral

El espectrógrafo utilizado se basa en una red tipo blaze plana a 500 nm y cubriendo una longitud de onda en el primer orden de difracción de 333 a 750 nm.

3.3.2.3.2 Resolución espectral

La resolución espectral del espectrofotómetro de 1nm/1mm se alcanza usando un f de apertura nominal de 5.5 y un ancho de ranura de 10 mm mientras que la ventana del sensor es de 1.5 mm

4. RESULTADOS OBTENIDOS

Para verificar el rango del espectro generado por el monocromador se diseño y construyó un posicionador x-y en el plano vertical donde debe quedar, en la celda de la figura 5, el LED Hamamatsu. Sobre este plano se colocó la ventana del foto sensor de un radiómetro calibrado de la compañía International Light referencia IL1700. En la posición horizontal de máxima intensidad se buscó la posición vertical también de mayor intensidad. Los datos se muestran en la figura 11.

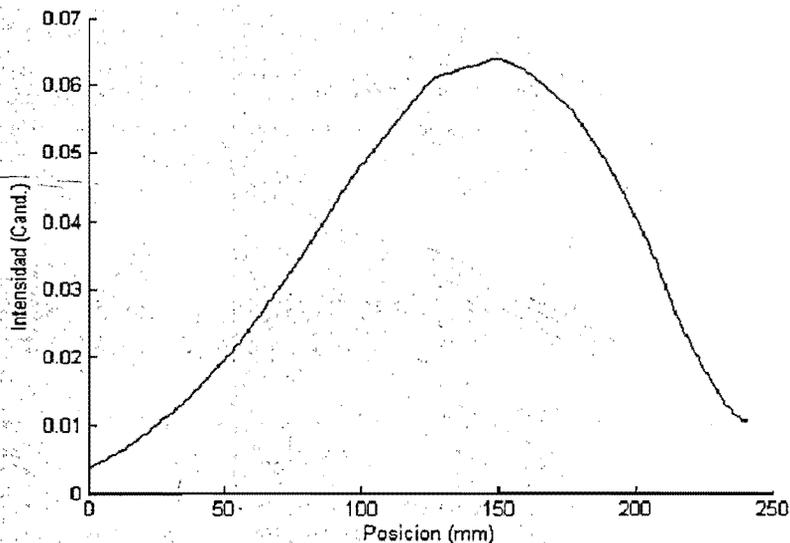


Figura 11. Respuesta espectral en la ventana de salida del monocromador. La distancia se mide desde el extremo rojo del espectro (posición 0) hasta el otro extremo del espectro visible

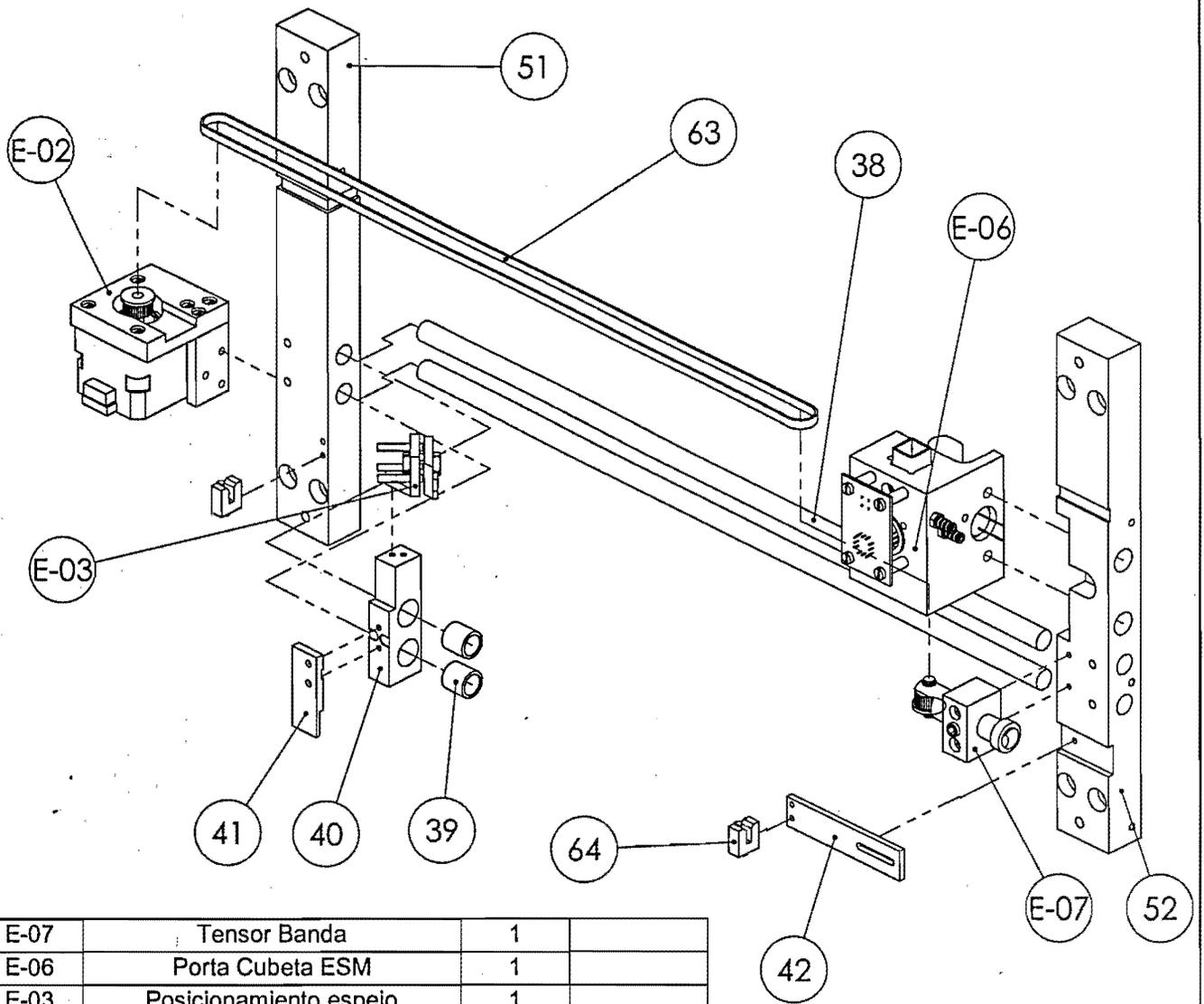
La curva obtenida está en muy buena concordancia a su vez con la respuesta del sensor dada por el fabricante. El sensor de fotodiodo usado cubre este rango efectivamente y aunque no linealmente se ajusta por software a partir de la curva característica suministrada por el fabricante.

Finalmente se logró construir un espectrofotómetro automatizado de características similares a los ofrecidos comercialmente.

Se desarrolla en este momento un software amigable para el control del instrumento, la adquisición de datos, el procesamiento y el despliegue de los datos usando LabView v 7.1 (Nacional Instruments, USA) para medir la corriente electrónica entre membranas mitocondriales con la implementación de un protocolo conocido.

BIBLIOGRAFIA

1. Shibata, S., Furukawa, M., Goto, K. "Dual wave length spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, 46, 271-279 (1969)
2. Rapp J. y Hind G. "A scanning dual wavelength spectrophotometry: Aplicacion to study of photosintethic electron transport" *Anal. Biochem.* **60** 474-488 (1974)
3. Chance B, Mayer D, Legallis V. *Anal Biochem* 1971;42:494-504.
4 W. Schmidt / *J. Biochem. Biophys. Methods* 58 (2004) 15-24
- 5 L. Noui et al. /*Chemical Engineering and Processing* 41 (2002) 107-114

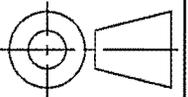


E-07	Tensor Banda	1	
E-06	Porta Cubeta ESM	1	
E-03	Posicionamiento espejo	1	
42	Riel Soporte sensor	1	
64	Foto Sensor	2	
41	Platina Sujeción banda	1	
40	Carro Deslizante	1	
39	Buje Bronce	2	
63	Banda transmision	1	
E-02	Motor espejodeslizante	1	
38	Eje rectificad 3.8 in	2	
51	Platina Soporte	1	
52	Platina Soporte Porta cubeta	1	
Ref.	Descripcion	Cant.	Pl.Ref.

E-09	Montaje Optico	1	E-10	-----	914 x 2000 x 197	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 1 : 2.5

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

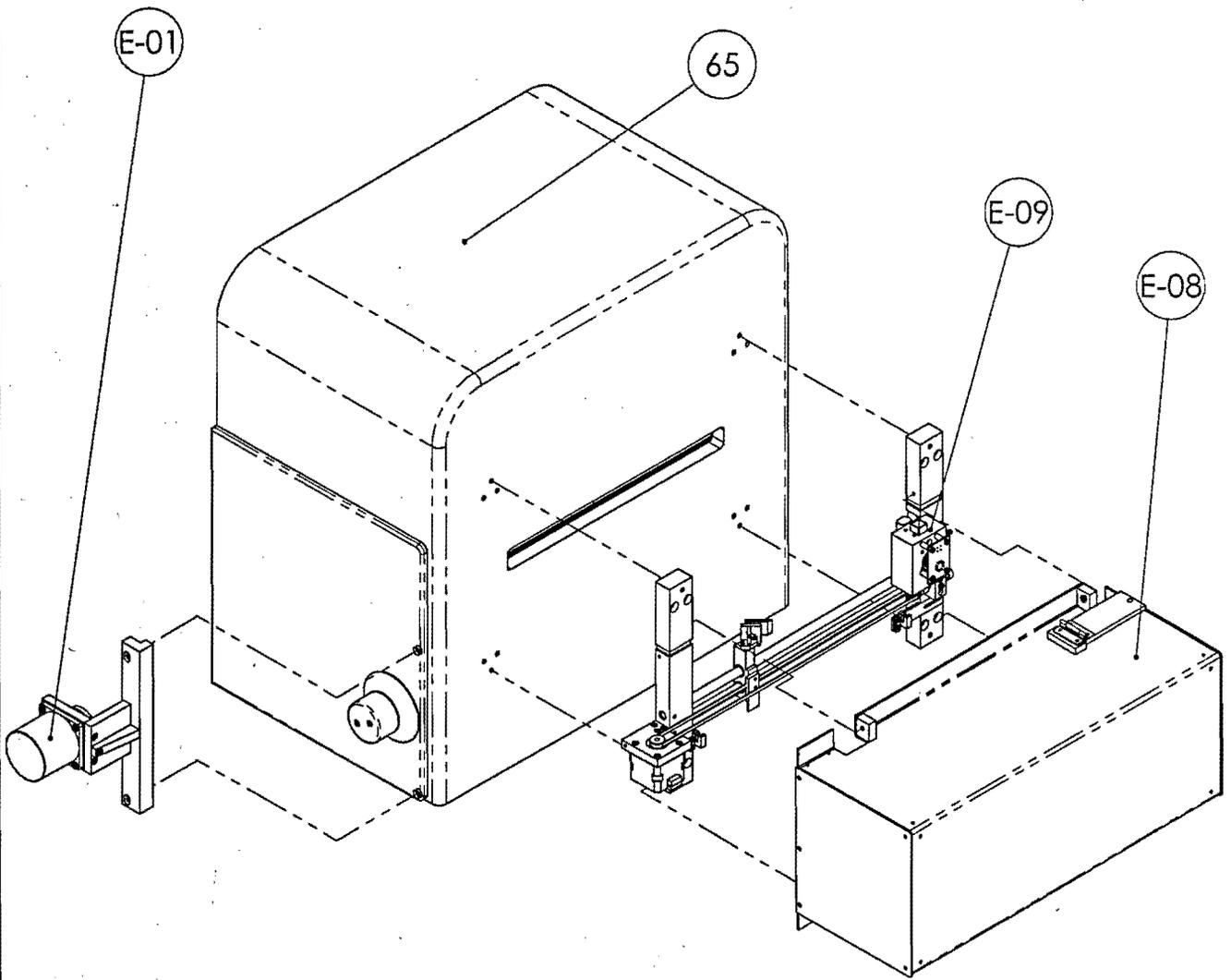
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBÓ: Sigifredo Solano González

REVISÓ: Sigifredo Solano González

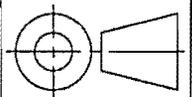
PL.No: 48



18	Montaje Optico	1	
E-08	Cubierta ESM	1	
E-01	Montaje soporte motor	1	
65	Espectrofotometro	1	
Ref.	Descripcion	Cant.	Pl.Ref.

E-10	Espectrofotometro	1	-----	-----	914 x 2000 x 197	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un
MEDELLIN

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 1 : 1

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

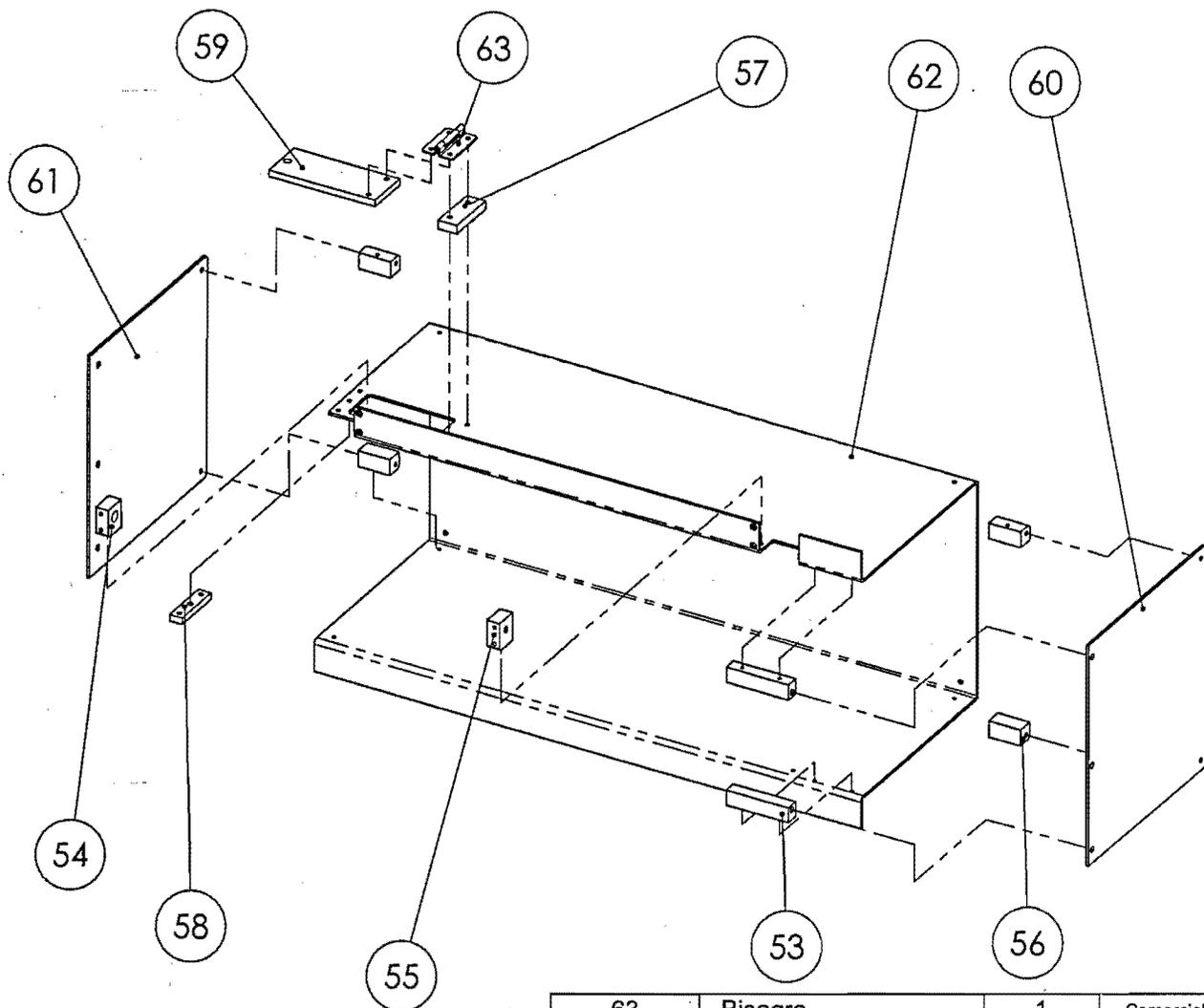
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBÓ: Sigifredo Solano González

REVISÓ: Sigifredo Solano González

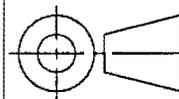
PL.No: 49



63	Bisagra	1	Comercial
62	Cubierta	1	P-46
61	Tapa L	1	P-45
60	Tapa R	1	P-44
59	Compuerta	1	P-43
58	Brida	1	P-42
57	Soporte compuerta	1	P-41
56	Fijacion Tapas	4	P-40
55	Soporte Cubierta L	1	P-39
54	Soporte Cubierta R	1	P-38
53	Fijacion Cubierta	2	P-37
Ref.	Descripcion	Cant.	Pl.Ref.

01	Estructura	1	E-10	Acero	914 x 2000 x 197	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un
MEDELLIN

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 1 : 1

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

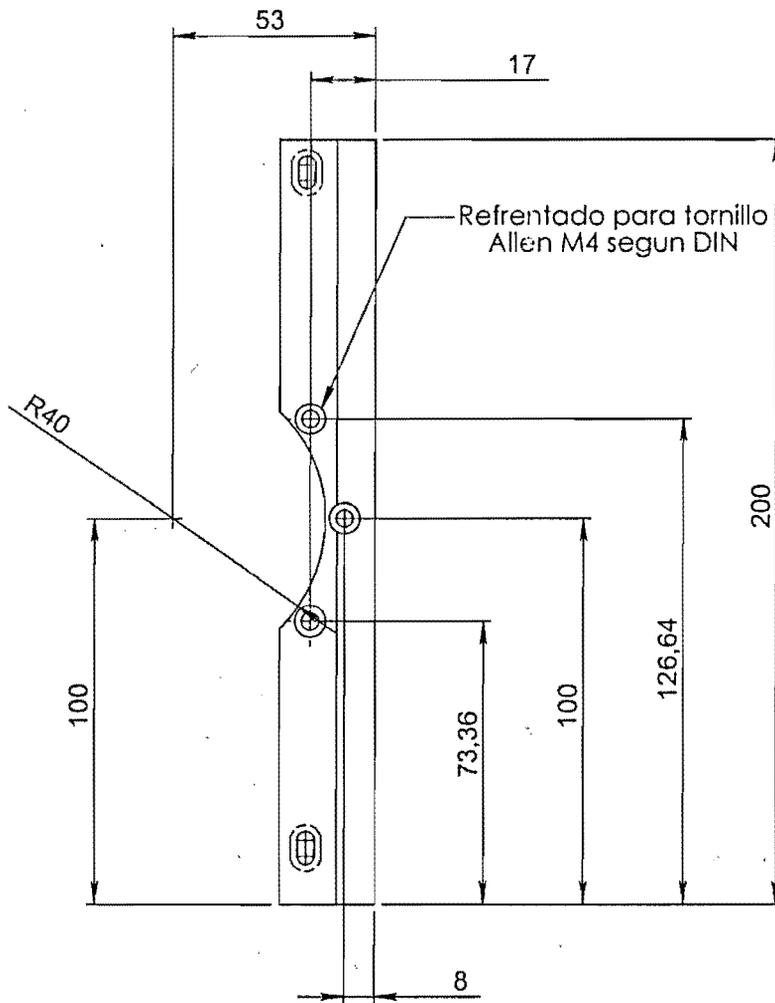
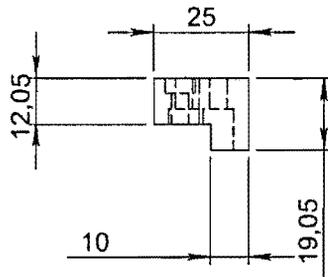
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBOSigifredo Solano González

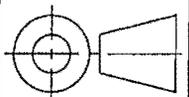
REVISOSigifredo Solano González

PL.No: 01

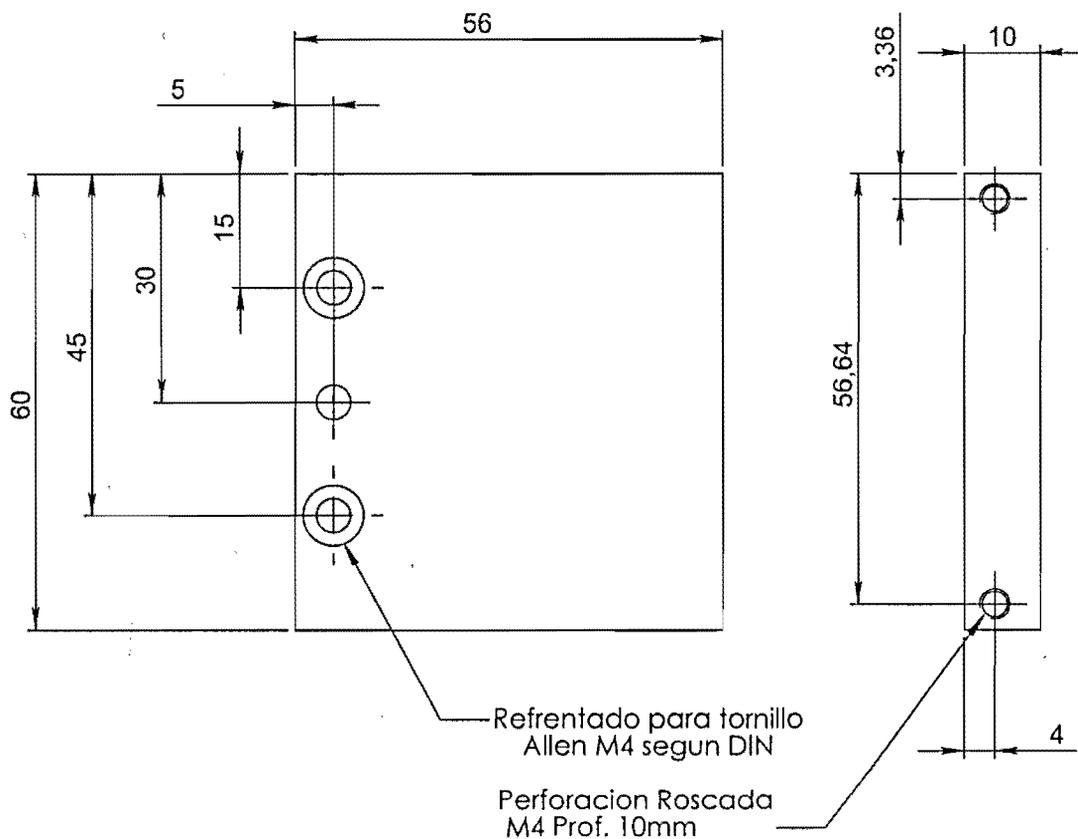


01	PL union Motor PH268	1	E-01	Aluminio	25 X 19,05 X 200	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

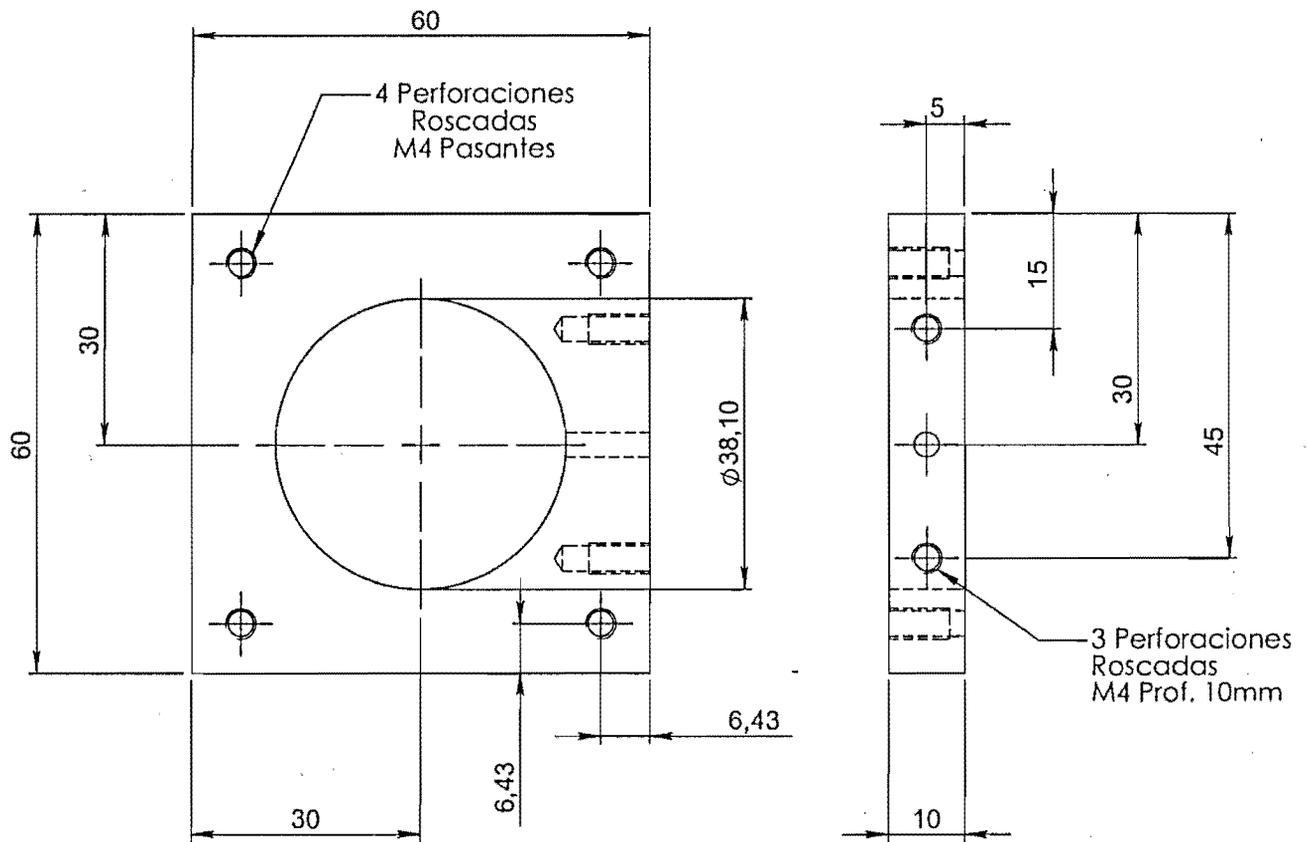
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



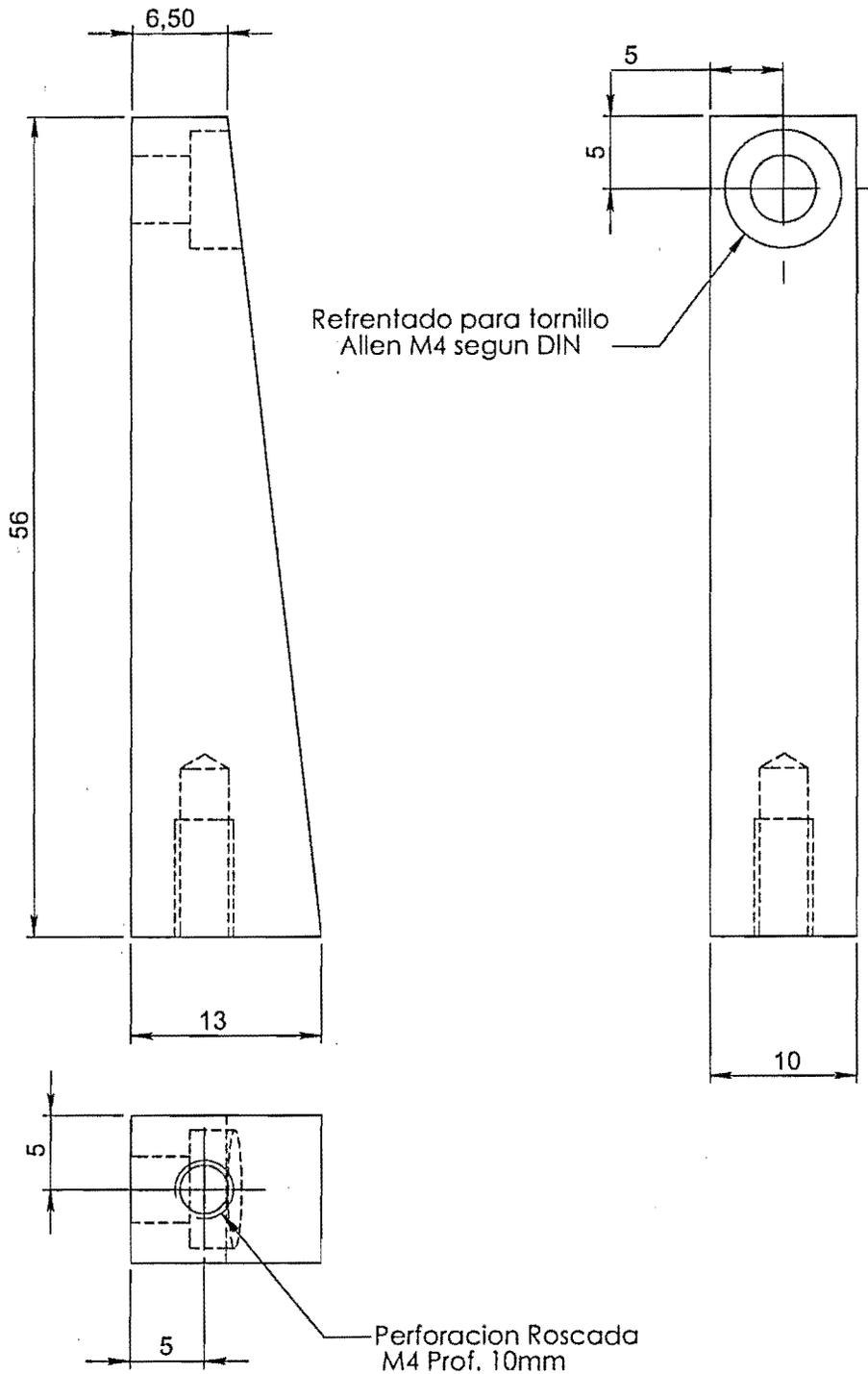
	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda			FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo	ESC: 1 : 2
	APROBO: Sigifredo Solano González		REVISO: Sigifredo Solano González	MODELO: PL.No: 01



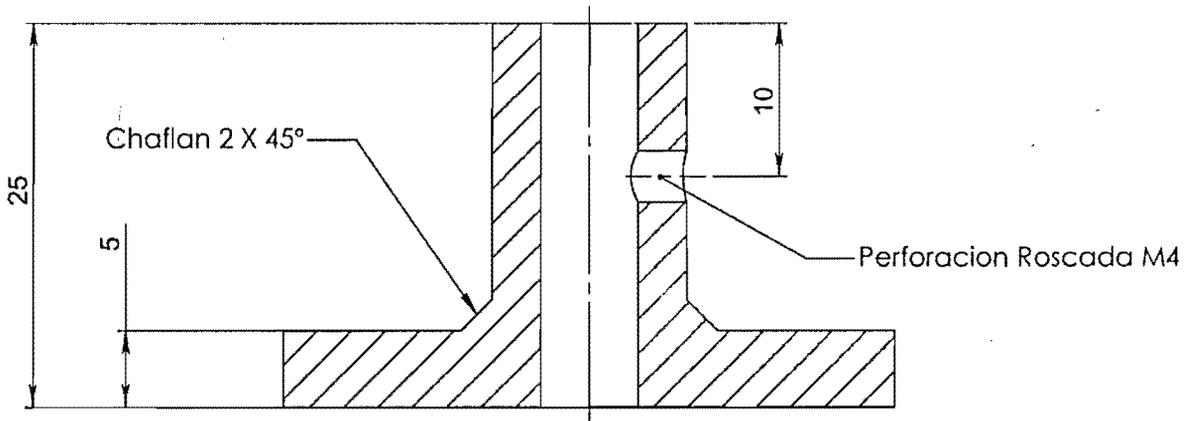
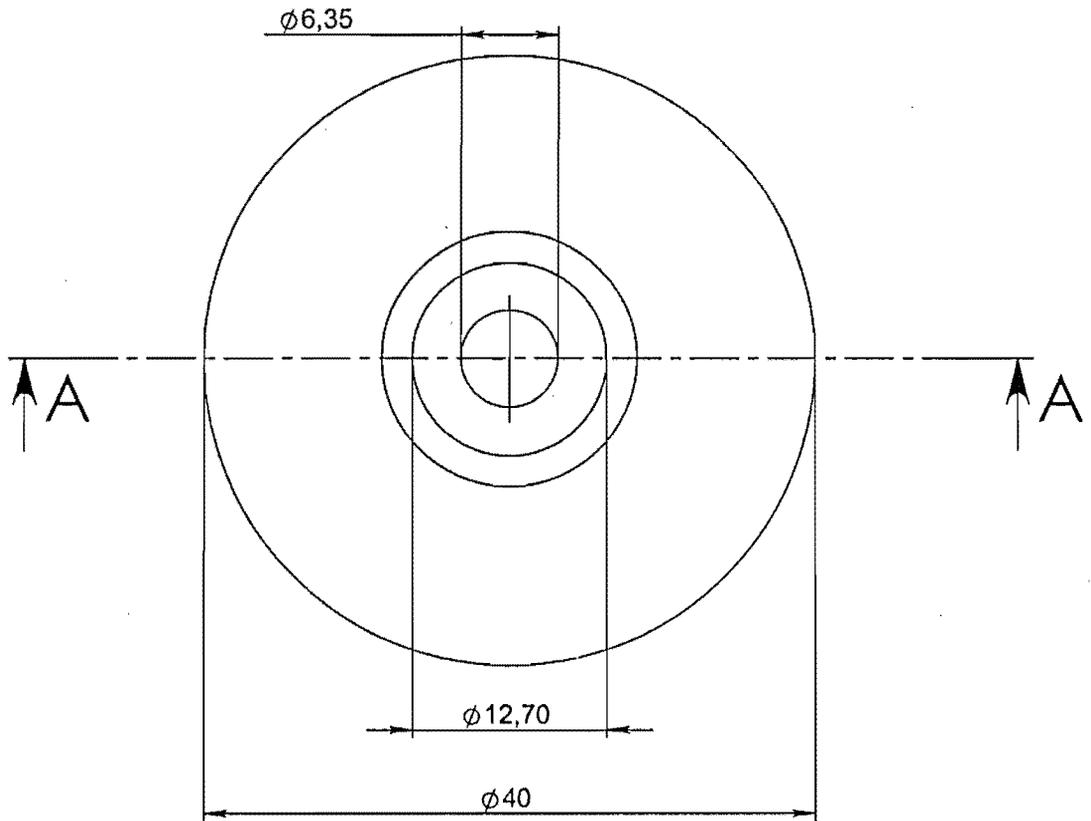
02	Soporte Motor PH268	1	E-01	Aluminio	56 x 60 x 10	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
 MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda				FECHA: 01/04/05	
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo		MODELO:	
APROBO: Sigifredo Solano González		REVISO: Sigifredo Solano González		PL.No: 02		



03	Fijación Motor PH268	1	E-01	Aluminio	60 x 60 x 10	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA:01/04/05
	DISEÑO:Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO:Juan Pablo Mejía Restrepo		MODELO:	
APROBOSigifredo Solano González		REVISOSigifredo Solano González		PL.No: 03		



05	Nervio Refuerzo	1	E-01	Aluminio	13 x 56 x 10	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
						ESC: 2 : 1
DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo			MODELO:
APROBO: Sigifredo Solano González			REVISO: Sigifredo Solano González			PL.No: 04

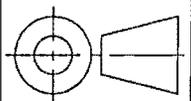


SECCIÓN A-A

06	Union Motor Perilla	1	E-01	Latón	$\phi 40 \times 25$	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

SEDE MEDELLIN



**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 1 : 1

un

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

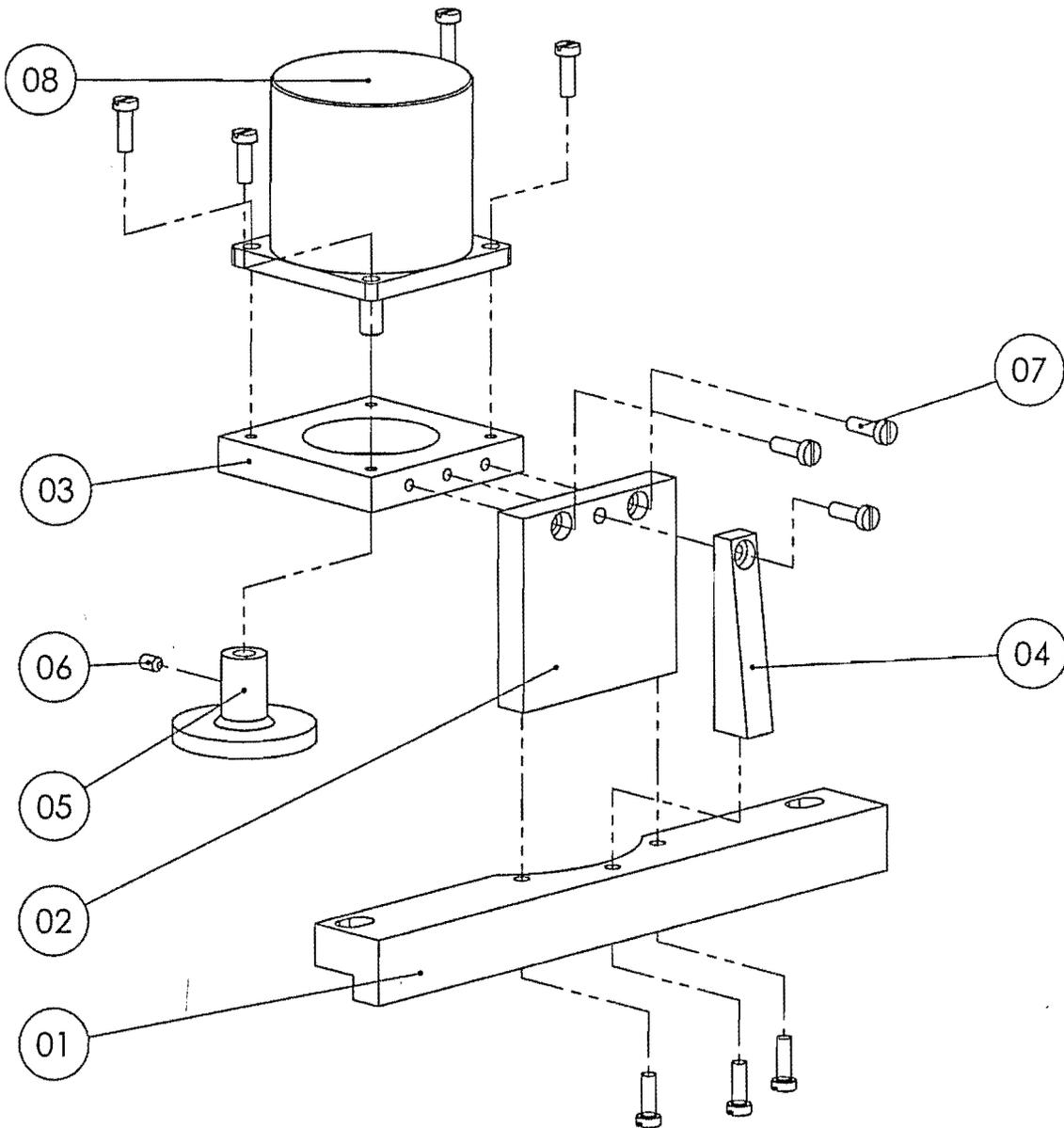
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

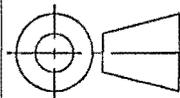
PL.No: 05



8	Prisionero M4	1	
7	Tornillo M4 x 12	10	
6	Union Motor Perilla	1	
5	Nervio Refuerzo	1	
4	Motor PH268	1	
3	Fijacion motor PH268	1	
2	Soporte motor PH268	1	
1	PI union motor PH268	1	
Cant.	Descripcion	Cant.	PI.Ref.

E-01	Montaje Soporte Motor	1	E-10	-----	83 x 129,15 x 200	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 1 : 2

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

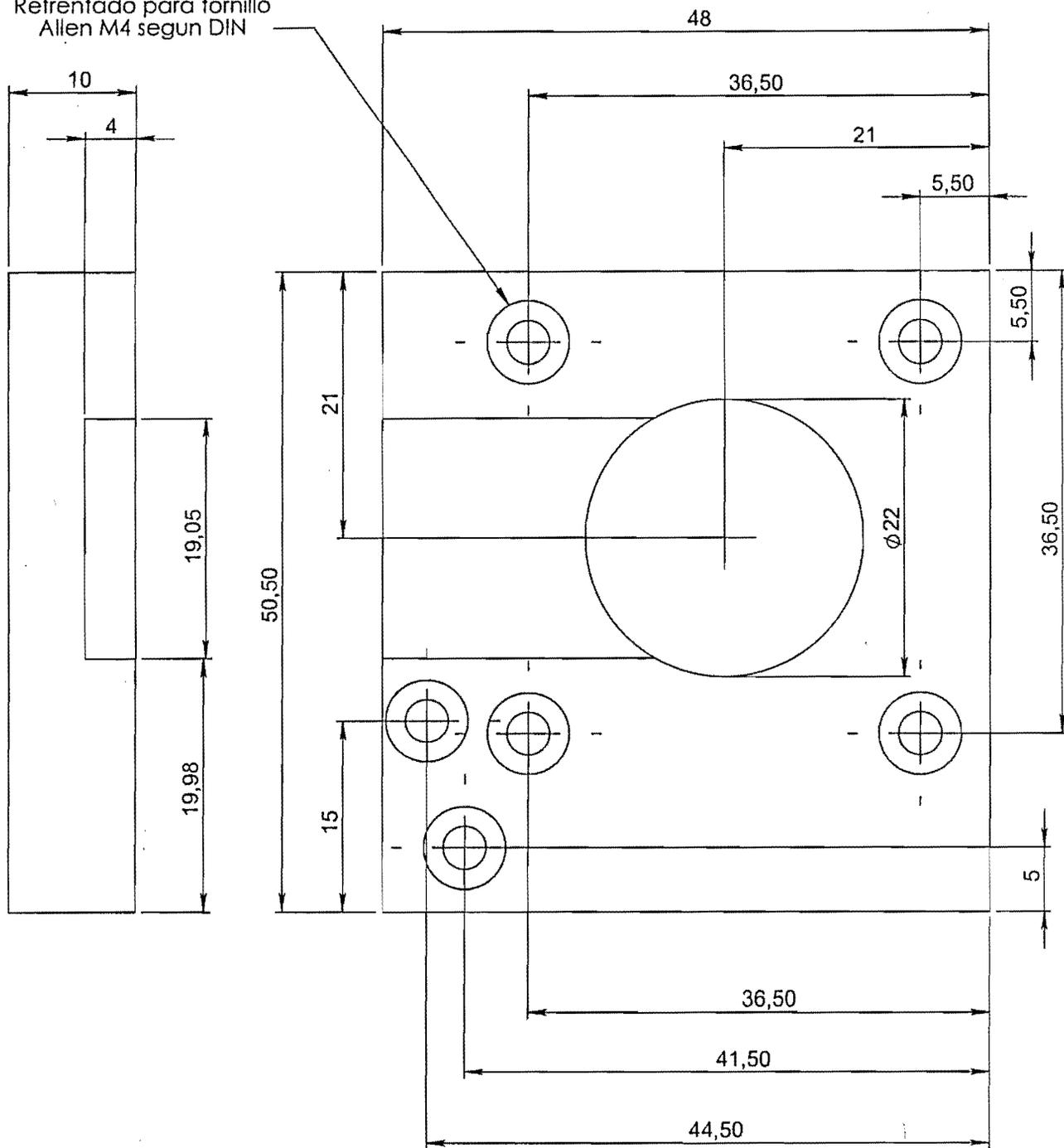
MODELO:

APROBOSigifredo Solano González

REVISOSigifredo Solano González

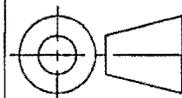
PL.No: 06

Refrentado para tornillo
Allen M4 segun DIN



09	PL Motor	1	E-02	Aluminio	48 x 50,5 x 10	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

FECHA: 01/04/05

ESC: 2 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

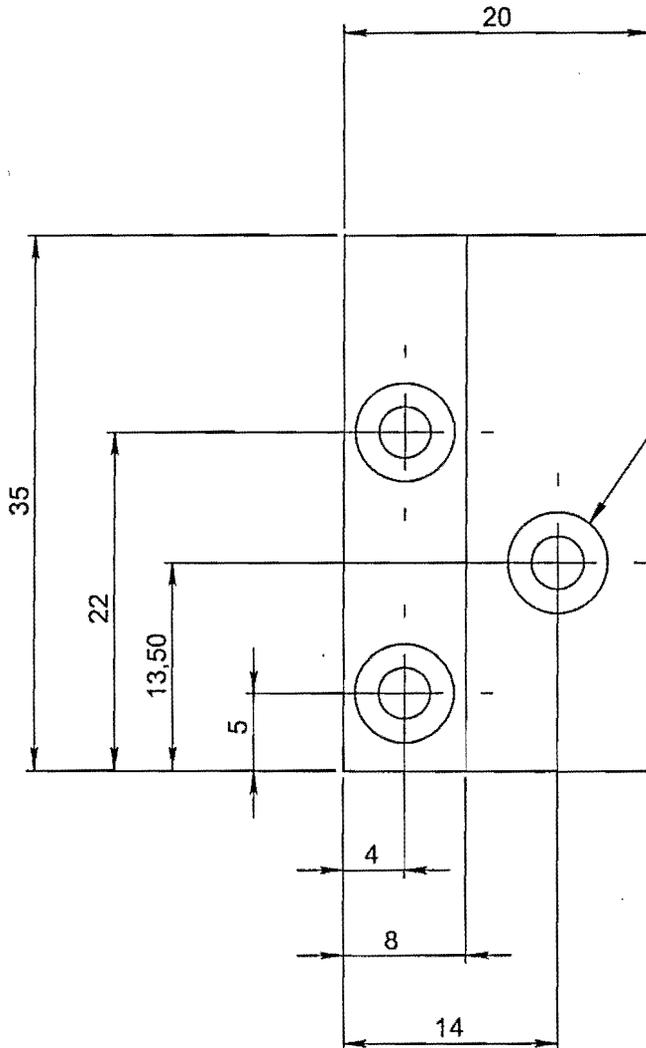
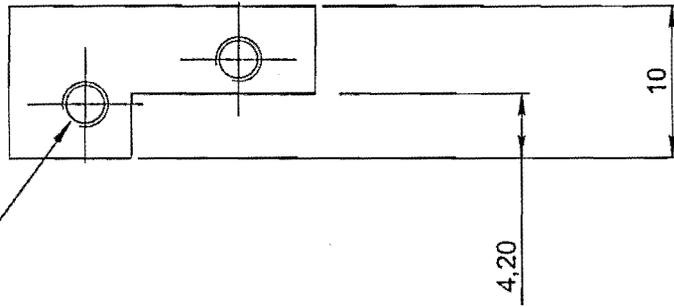
MODELO:

APROBOSigifredo Solano González

REVISOSigifredo Solano González

PL.No: 07

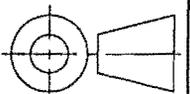
Perforacion Roscada
M4 Prof. 10mm



Refrentado para tornillo
Allen M4 segun DIN

10	PL Soporte	1	E-02	Aluminio	20 x 35 x 10	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 2 : 1

un

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

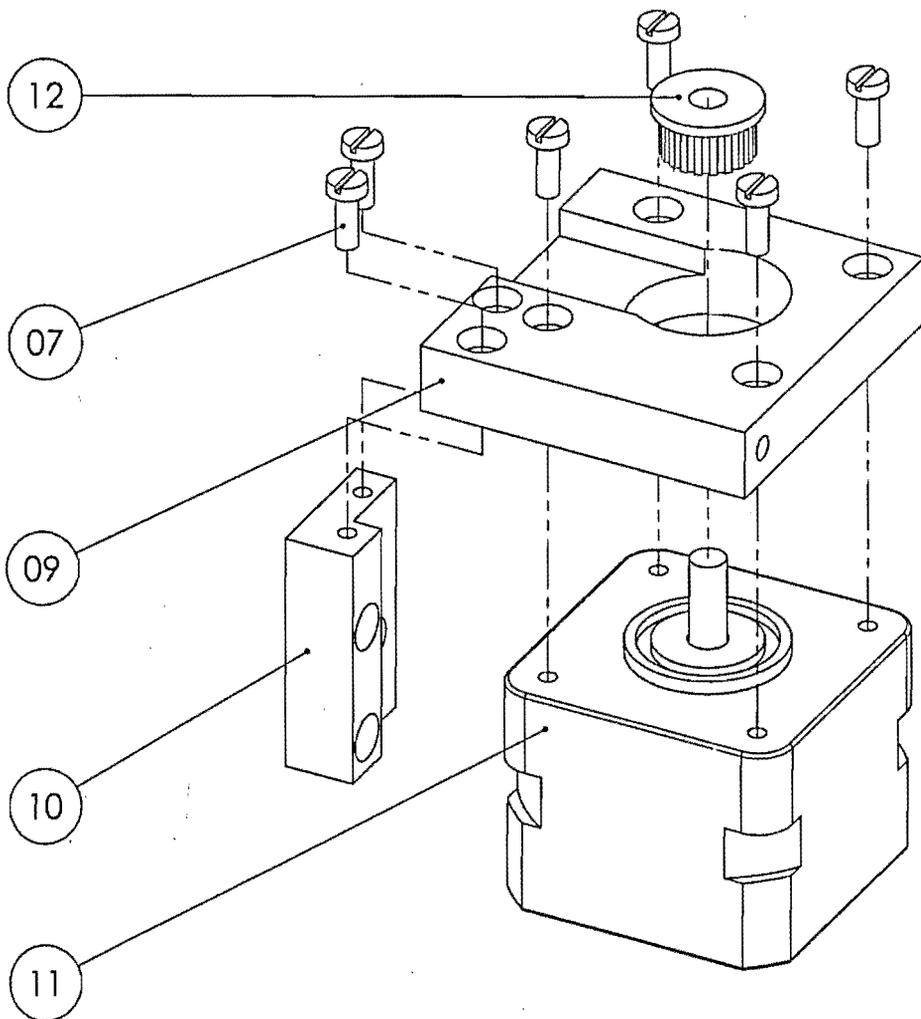
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

PL.No: 08

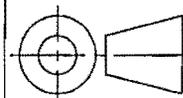


5	Tornillo m3	6	
4	Piñon motor	1	
3	PI Soporte	1	
2	Motor Arrastre	1	
1	PI Motor	1	
Ref.	Descripcion	Cant.	PI.Ref.

E-02	Motor Espejo deslizante	1	E-09	-----	48 x 45 x 56,5	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA:01/04/05

ESC: 1 : 1

MEDELLIN

DISEÑO:Gonzalo Vargas Quiróz

DIBUJO:Juan Pablo Mejía Restrepo

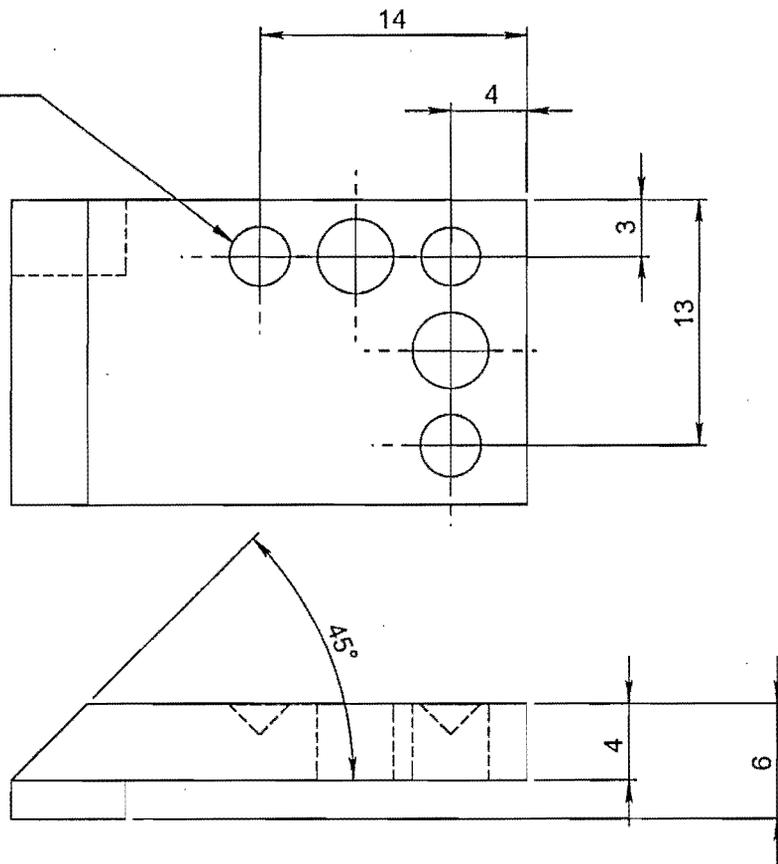
MODELO:

APROBOSigifredo Solano González

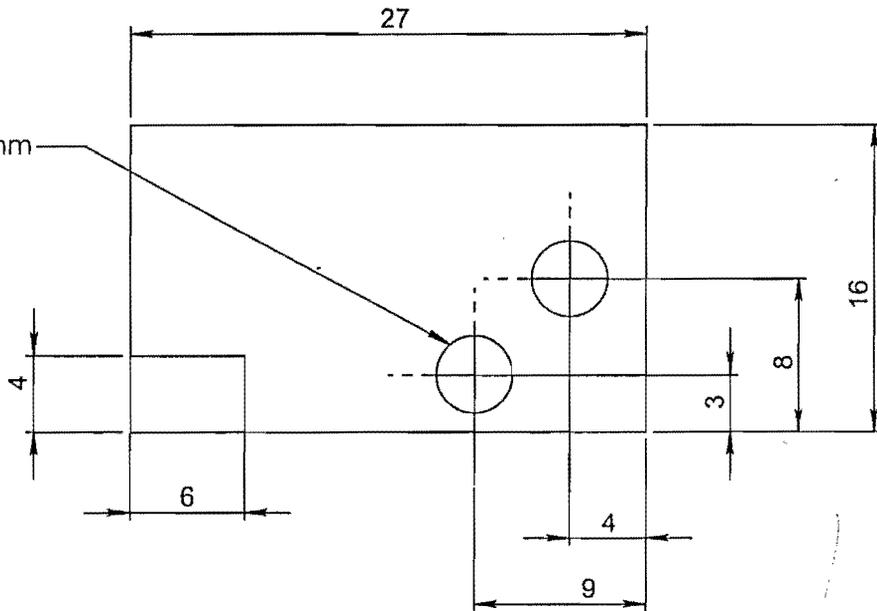
REVISOSigifredo Solano González

PL.No: 09

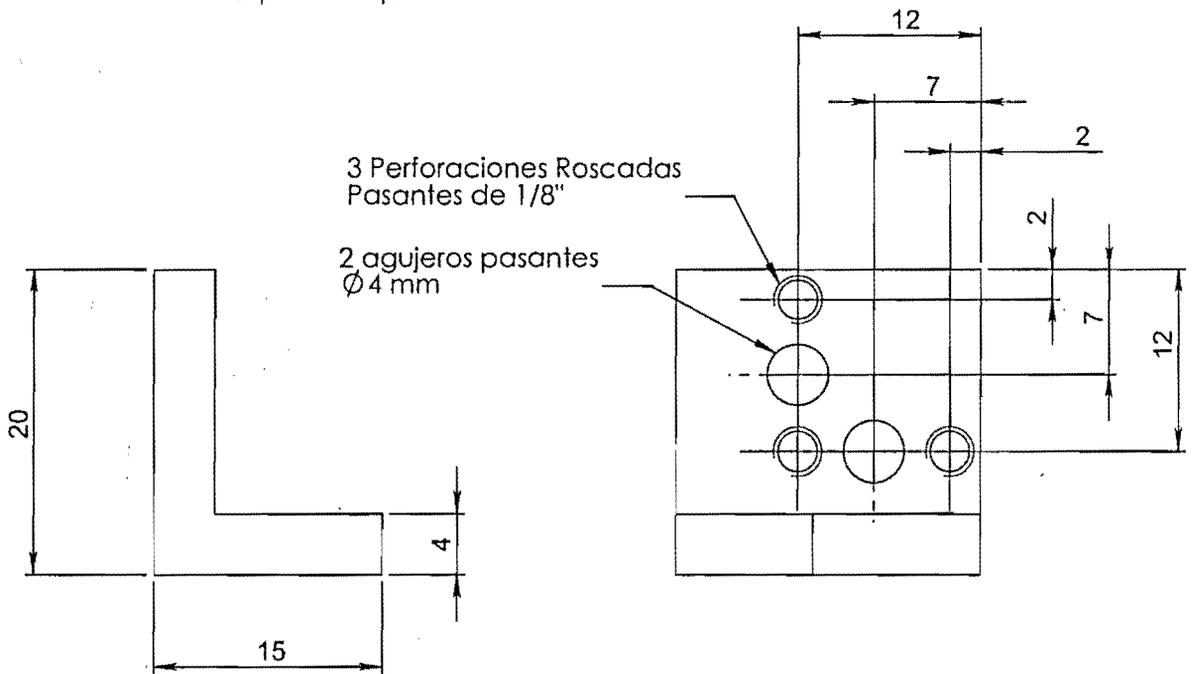
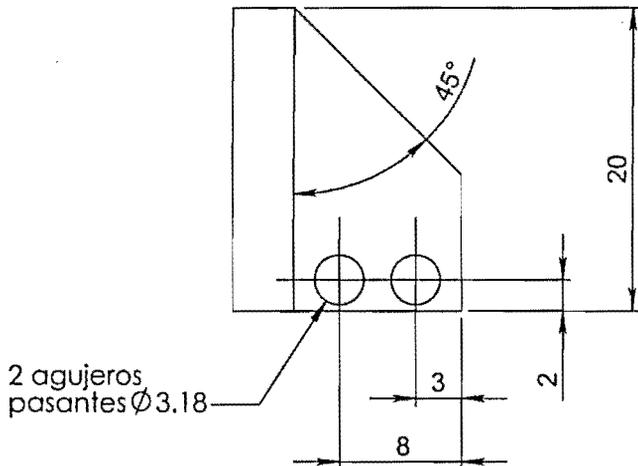
3 Agujeros Conicos de $\varnothing 3.18\text{mm}$ Prof. 2mm



2 Agujeros pasantes de $\varnothing 4\text{mm}$

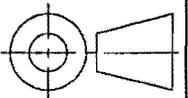


13	Porta espejo	1	E-03	Aluminio	27 x 16 x 6	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo		ESC: 2.5 : 1
	APROBO: Sigifredo Solano González			REVISO: Sigifredo Solano González		MODELO: PL.No: 10



14	Soporte PE	1	E-03	Aluminio	15 x 20 x 20	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 2 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

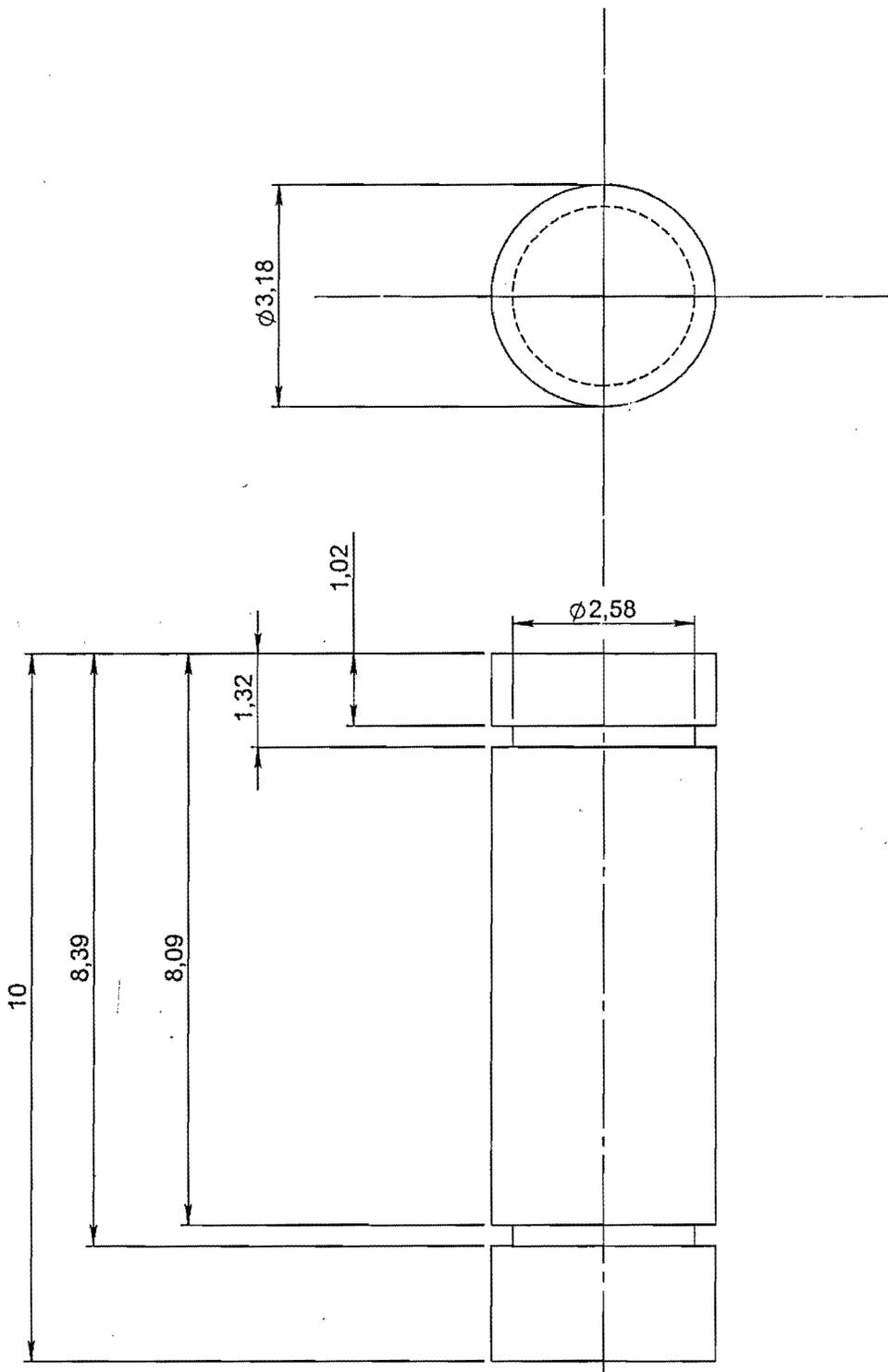
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

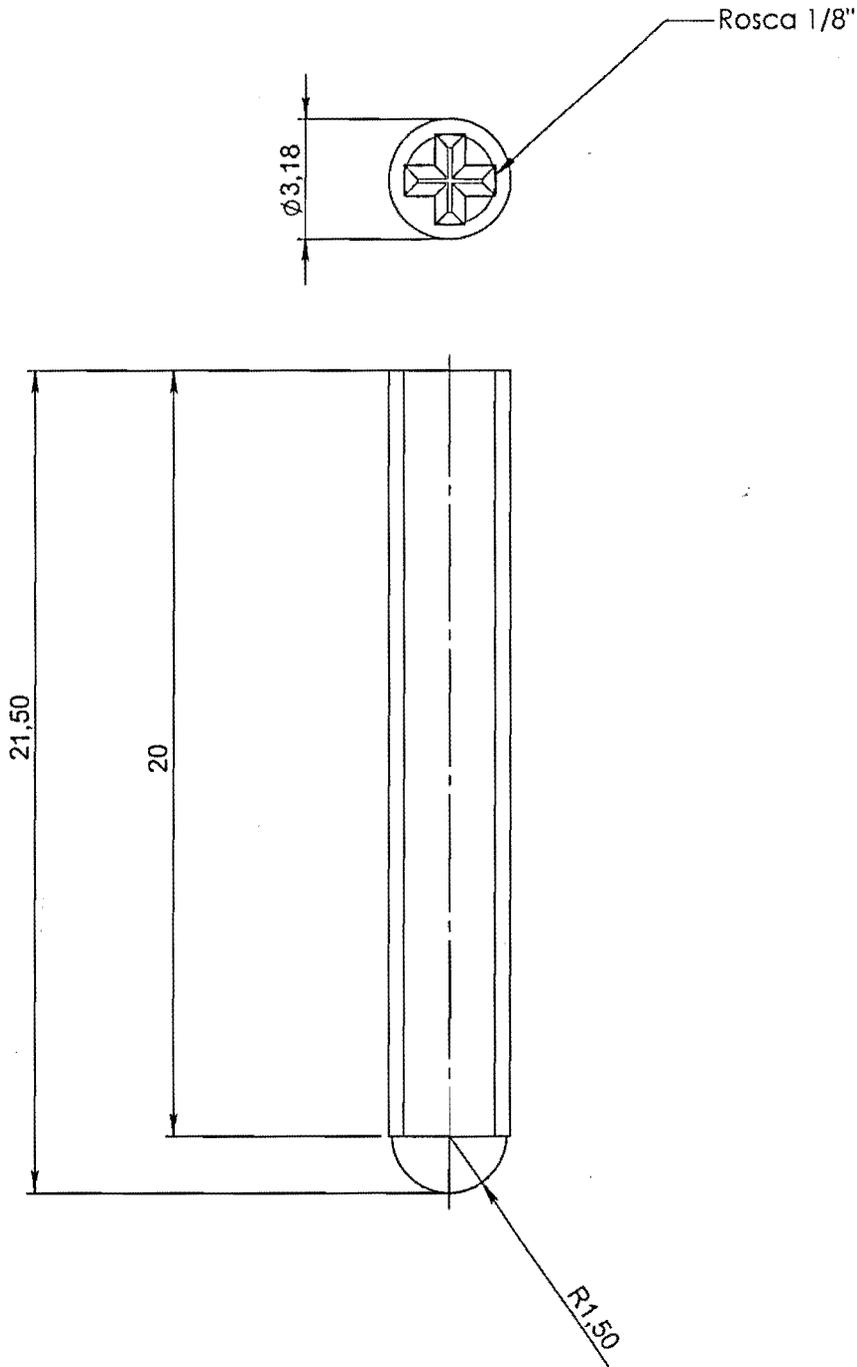
APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

PL.No: 11

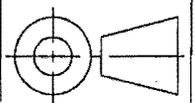


15	Tensor Ajuste	2	E-03	Latón	$\phi 3.18 \times 10$	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo			ESC: 10 : 1
APROBO: Sigifredo Solano González		REVISO: Sigifredo Solano González			MODELO:	PL.No: 12



16	Tornillo Ajuste	3	E-03	Latón	∅3,18 x 21.5	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

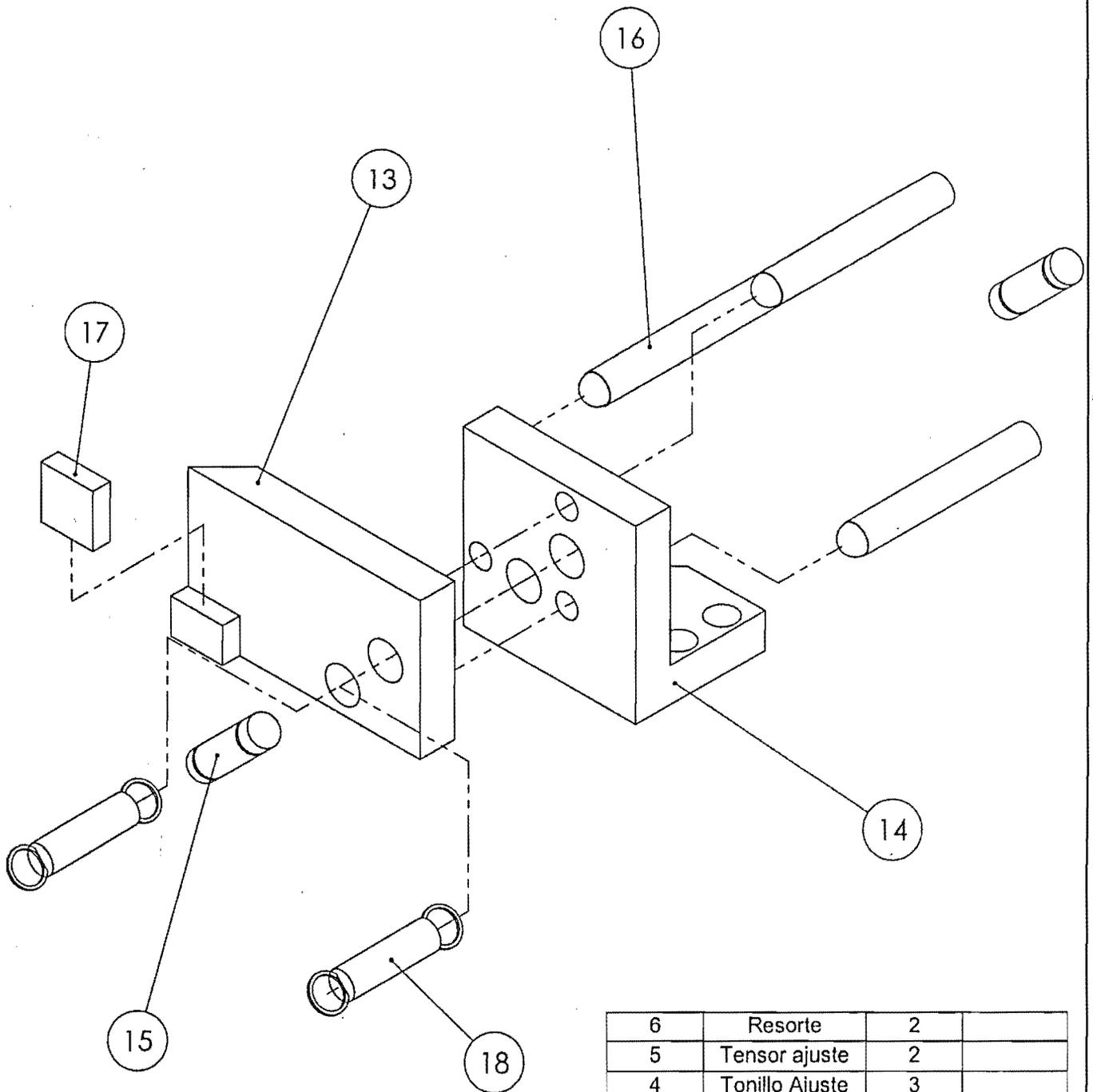
FECHA: 01/04/05
ESC: 5 : 1
MODELO:
PL.No: 13

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

APROBO: Sigifredo Solano González

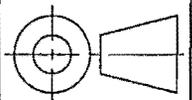
REVISO: Sigifredo Solano González



6	Resorte	2	
5	Tensor ajuste	2	
4	Tornillo Ajuste	3	
3	Espejo 6x6	1	
2	Porta Espejo	1	
1	Soporte PE	1	
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.

E-03	Posicionamiento Espejo	1	E-09	-----	31 x 21 x 26,5	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 2 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

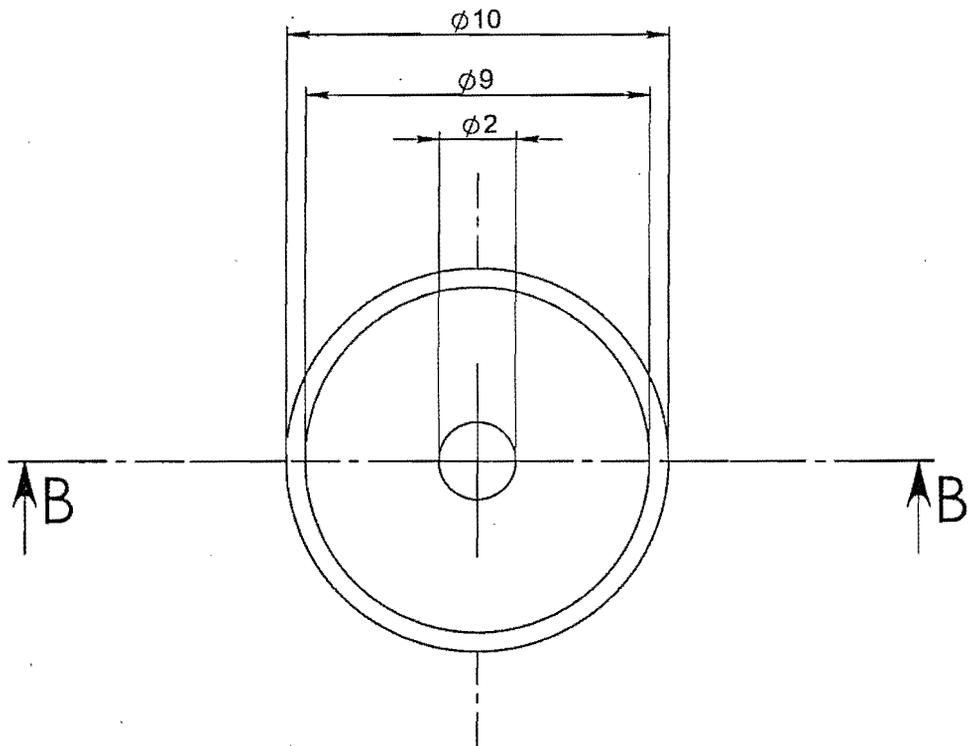
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBO: Sigifredo Solano González

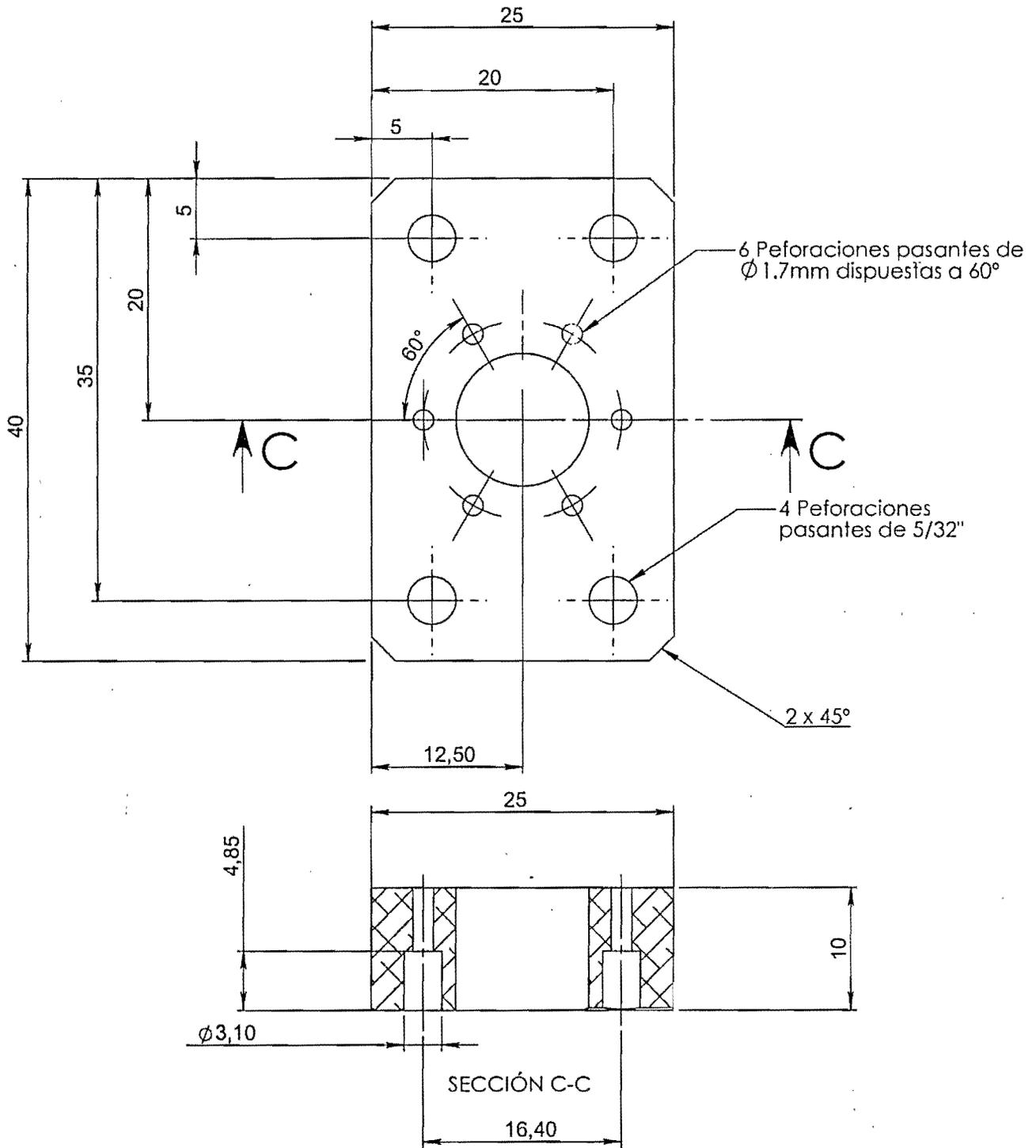
REVISO: Sigifredo Solano González

PL.No: 14



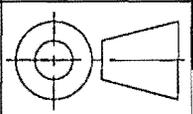
SECCIÓN B-B

19	Porta Iman	1	E-04	Aluminio	$\phi 10 \times 5$	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
 MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo		MODELO:
APROBO: Sigifredo Solano González			REVISO: Sigifredo Solano González		PL.No: 15	



20	Placa Motor	1	E-04	Aluminio	25 x 40 x 10	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



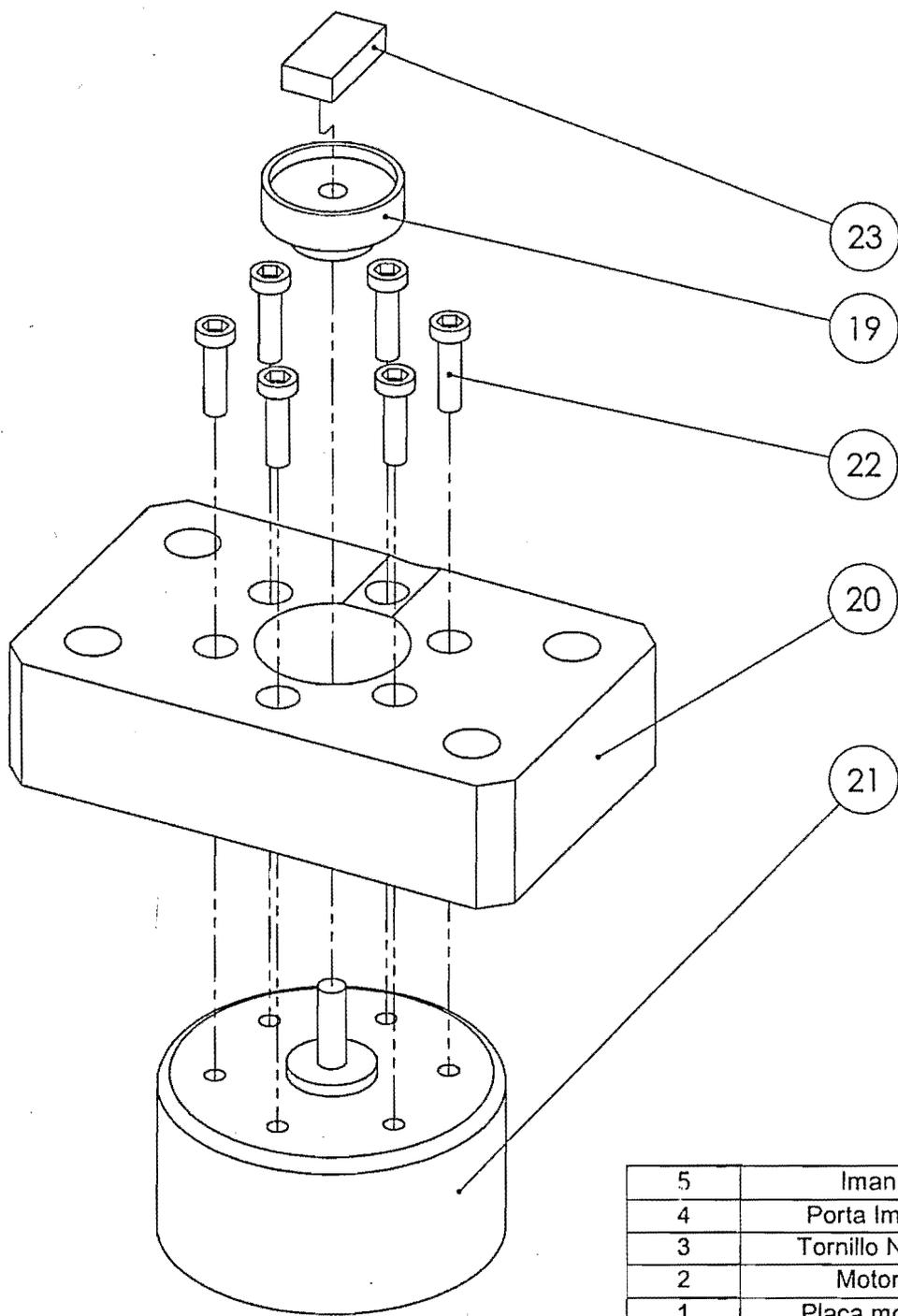
Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

FECHA: 01/04/05
ESC: 2 : 1
MODELO:
PL.No: 16

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz
APROBO: Sigifredo Solano González

DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo
REVISO: Sigifredo Solano González

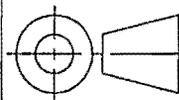
Nr. 531100



5	Iman	1	
4	Porta Iman	1	
3	Tornillo No 2	6	
2	Motor	1	
1	Placa motor	1	
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.

E-04	Agitador Magnetico	1	E-06	-----	40 x 25 x 22,4	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

FECHA: 01/04/05

ESC: 2 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

PL.No: 17

Refrentado para tornillo
Allen #2 segun DIN

D

Ø5

D

22

18,30

14

9,70

8

2

15

3

2 Perforaciones
pasantes Ø2.5mm

18

8,45

3,55

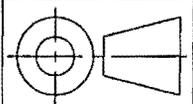
1,50

3

SECCIÓN D-D

23	Soporte motor	1	E-05	Aluminio	18 x 3 x 22	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

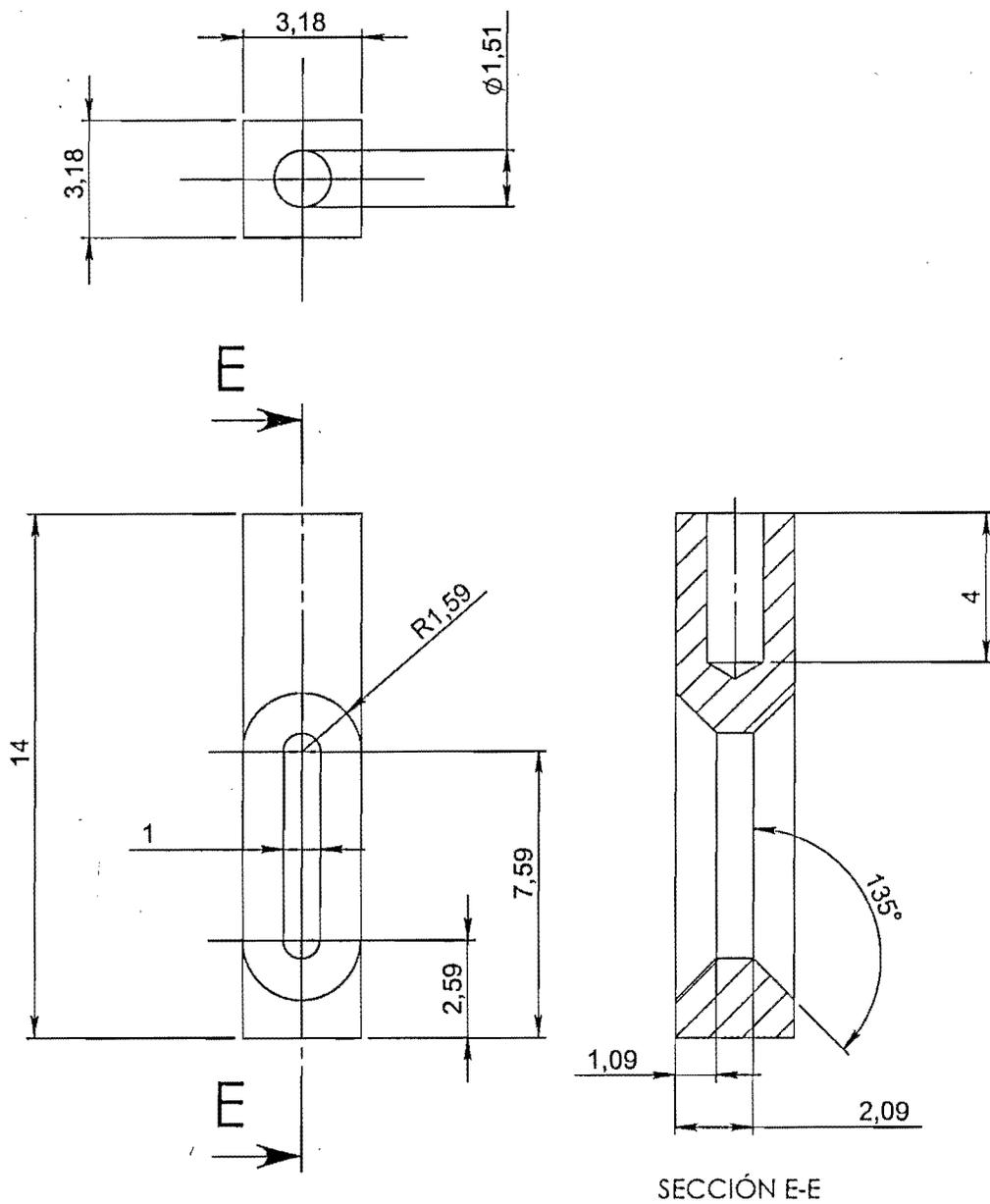
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

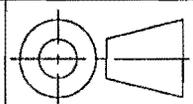
FECHA:01/04/05
ESC: 5 : 1
MODELO:
PL.No: 18

DISEÑO:Gonzalo Vargas Quiróz	DIBUJO:Juan Pablo Mejía Restrepo
APROBOSigifredo Solano González	REVISOSigifredo Solano González

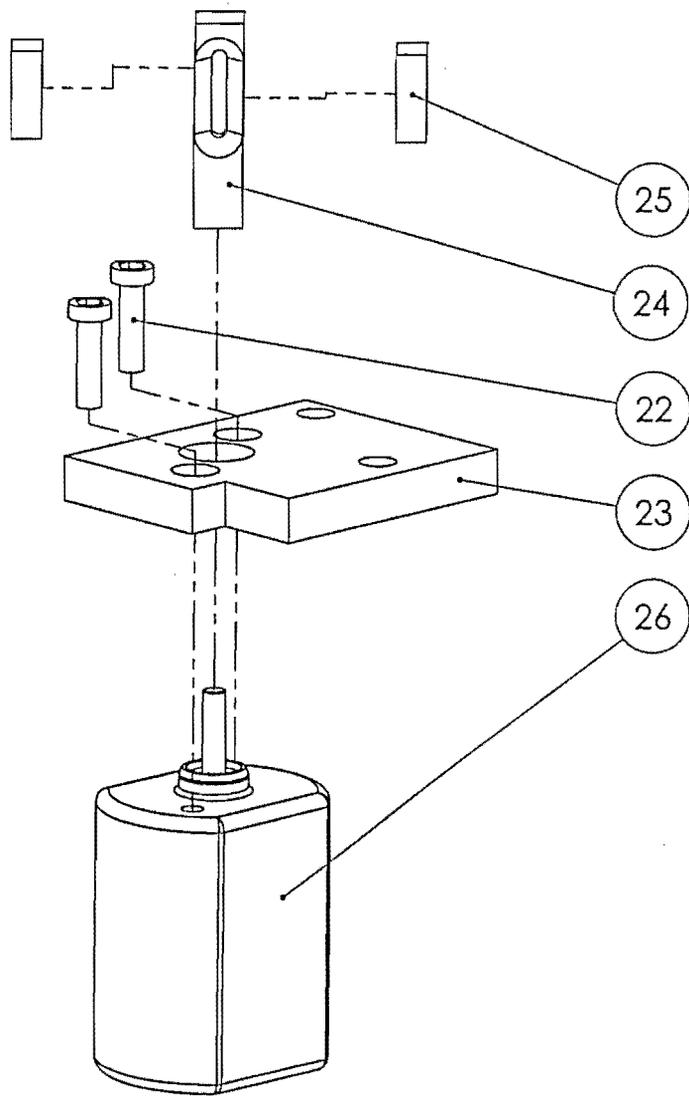


24	Soporte Espejos	1	E-05	Latón	3,18 x 3,18 x 14	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



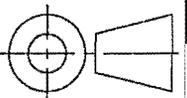
	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda		FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz APROBO: Sigifredo Solano González	DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo REVISO: Sigifredo Solano González	ESC: 5 : 1 MODELO: PL.No: 19



5	Tornillo No 2	2	
4	Espejo rotativo	2	
3	Soporte espejos	1	
2	Motor 2	1	
1	Soporte motor	1	
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.

E-05	Difractor	1	E-06	-----	18 x 22 x 36,1	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 2 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

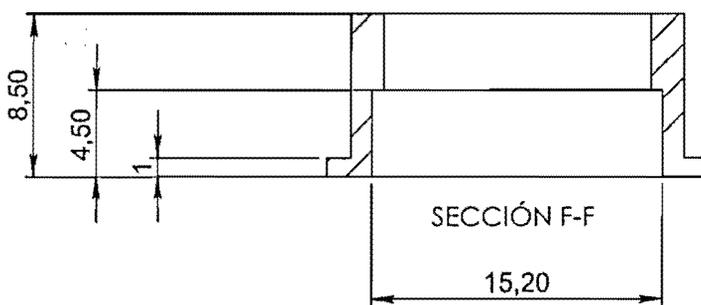
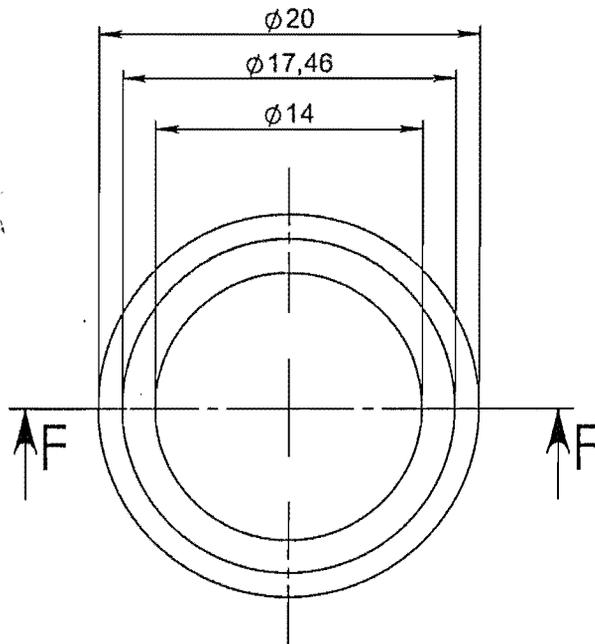
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBO: Sigifredo Solano González

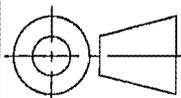
REVISO: Sigifredo Solano González

PL.No: 20



27	Aislante Sensor	1	E-06	Nylon	Ø20 x 8,5	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 2.5 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

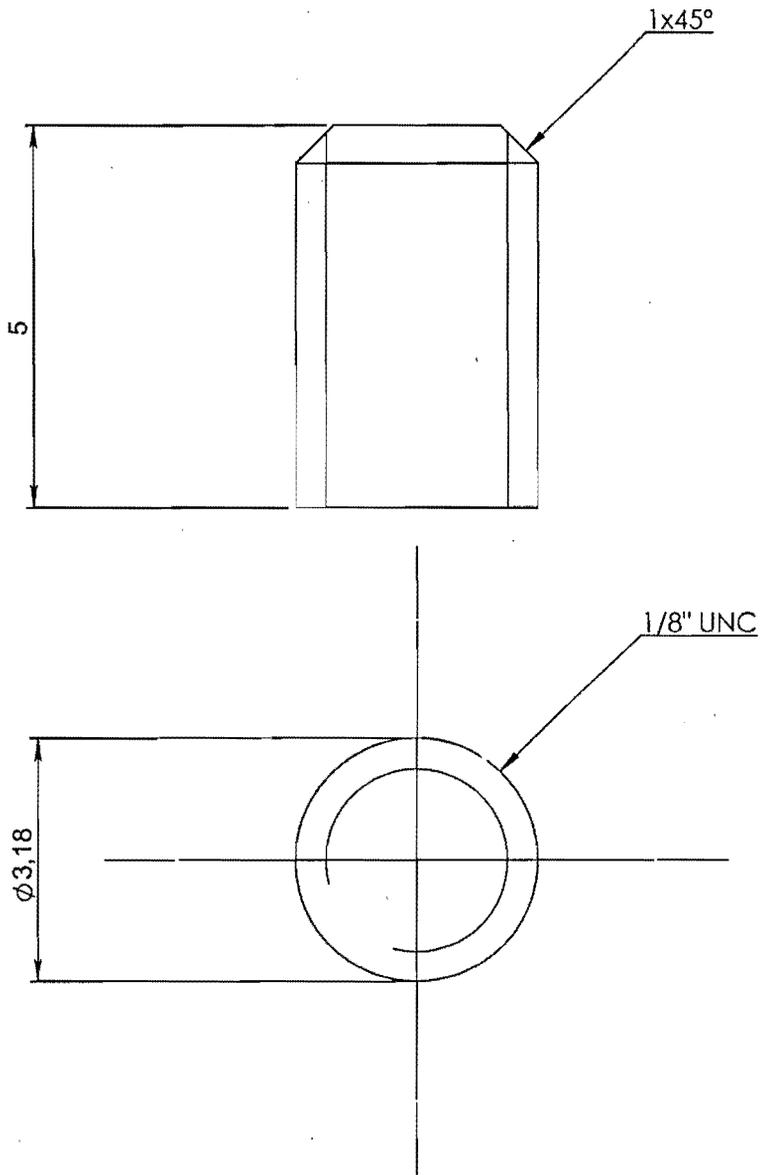
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

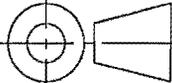
MODELO:

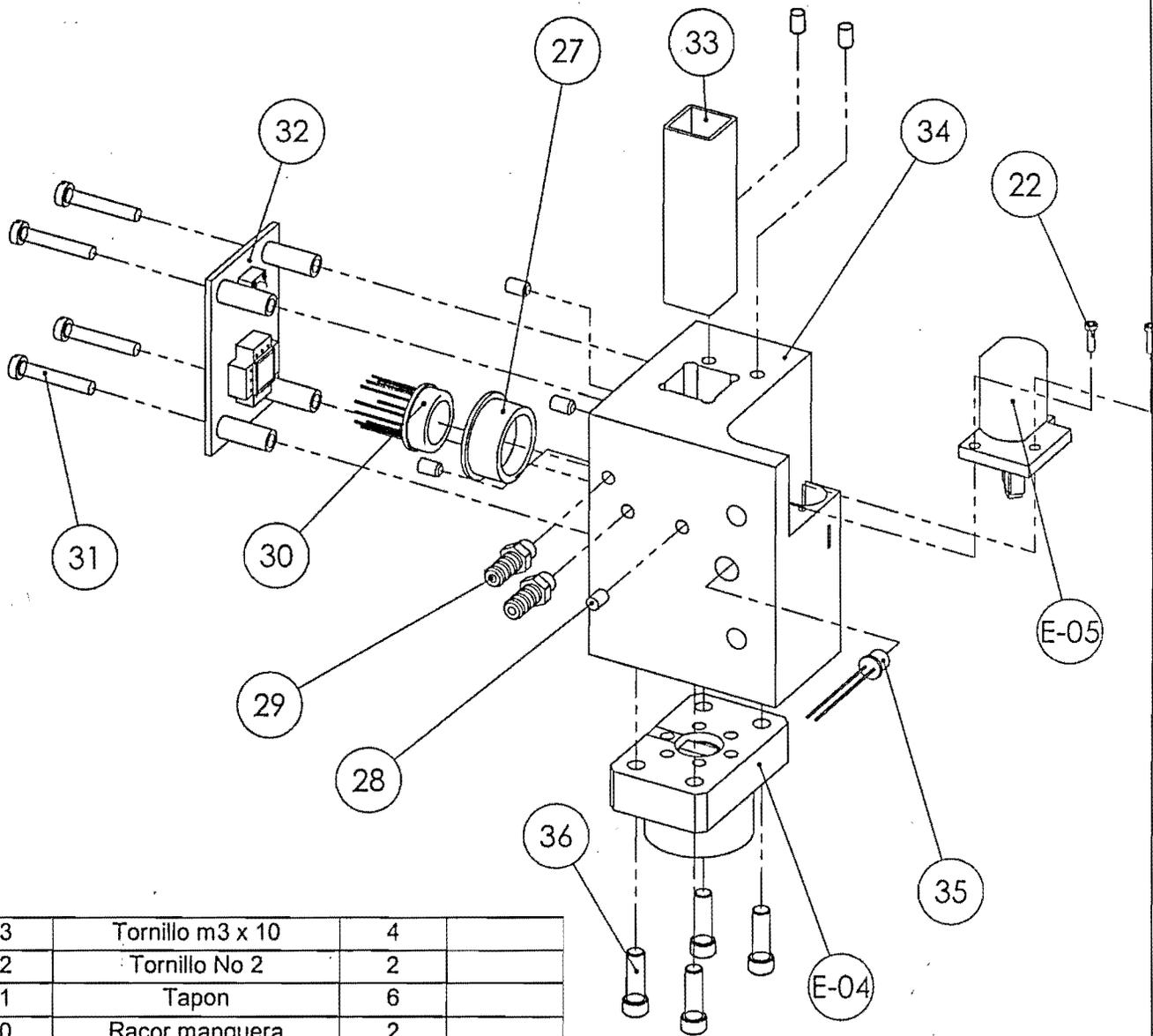
APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

PL.No: 21



28	Tapón	6	E-06	Latón	$\phi 3.18 \times 5$	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
						ESC: 10 : 1
DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo			MODELO:
APROBOSigifredo Solano González			REVISOSigifredo Solano González			PL.No: 22

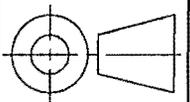


13	Tornillo m3 x 10	4	
12	Tornillo No 2	2	
11	Tapon	6	
10	Racor manguera	2	
9	Foto sensor	1	
8	Circuito ESM	1	
7	Cubeta	1	
6	Sensor	1	
5	Aislante sensor	1	
4	Difractor	1	
3	Tornillo m4	4	
2	Agitador magnetico	1	
1	Porta cubeta V2	1	
Ref.	Descripcion	Cant.	Pl.Ref.

E-06	Porta Cubeta ESM	1	E-09	-----	59,7 x 69,5 x 64	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

SEDE MEDELLIN



un

MEDELLIN

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 1 : 2

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

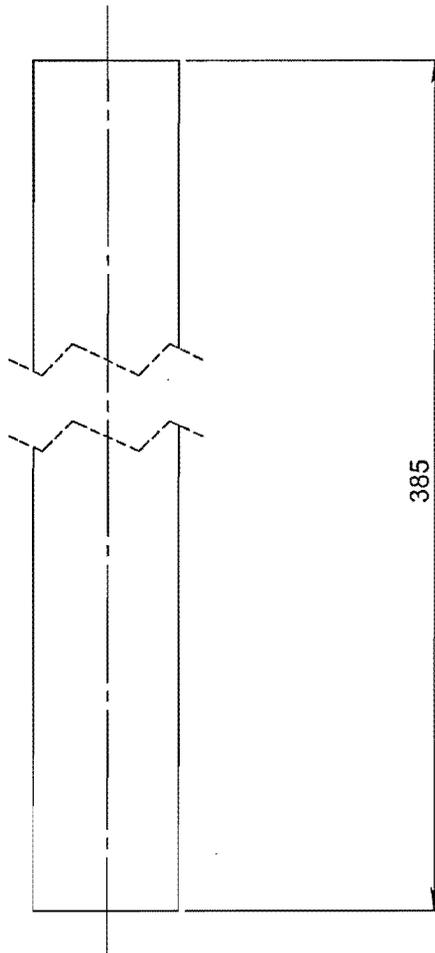
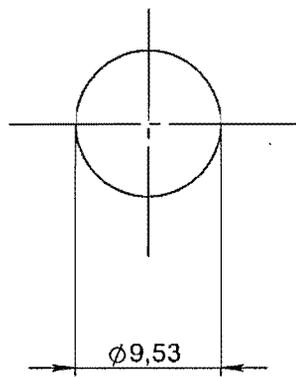
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

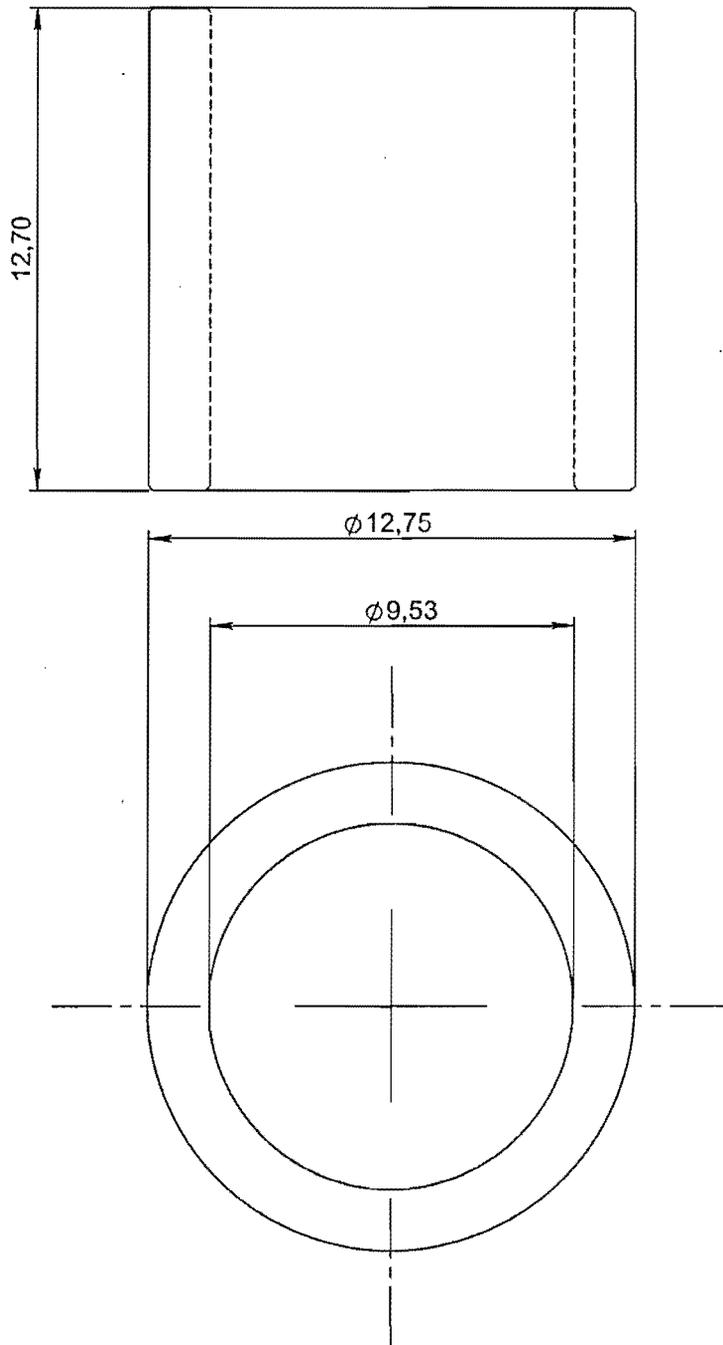
APROBÓ: Sigifredo Solano González

REVISÓ: Sigifredo Solano González

PL.No: 24

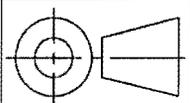


Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
37	Eje Rectificado	2	E-09	Acero	$\phi 9,53 \times 385$	medidas en mm
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
 MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo		MODELO:	
APROBO: Sigifredo Solano González		REVISO: Sigifredo Solano González		PL.No: 25		



38	Buje Bronce	2	E-09	Bronce Fosforado	∅12.75 x 12.7	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

FECHA:01/04/05

ESC: 5 : 1

MEDELLIN

DISEÑO:Gonzalo Vargas Quiróz

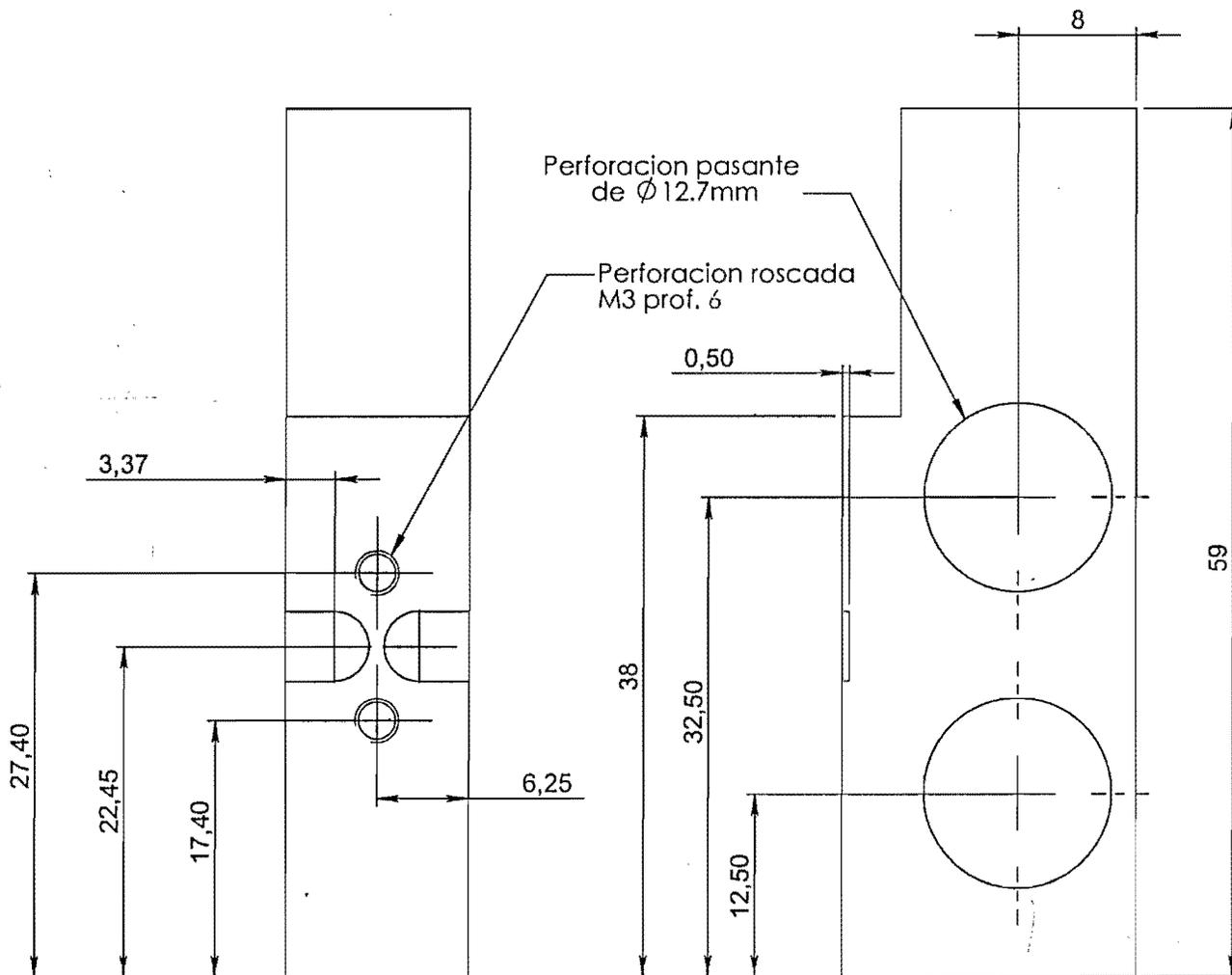
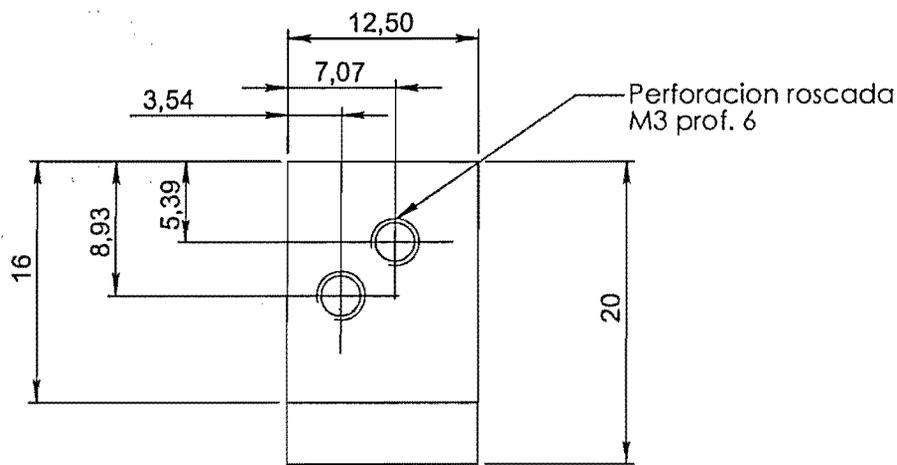
DIBUJO:Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBOSigifredo Solano González

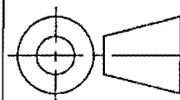
REVISOSigifredo Solano González

PL.No: 26



39	Carro Deslizante	1	E-09	Aluminio	12.5 x 59 x 20	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

FECHA: 01/04/05

ESC: 2 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

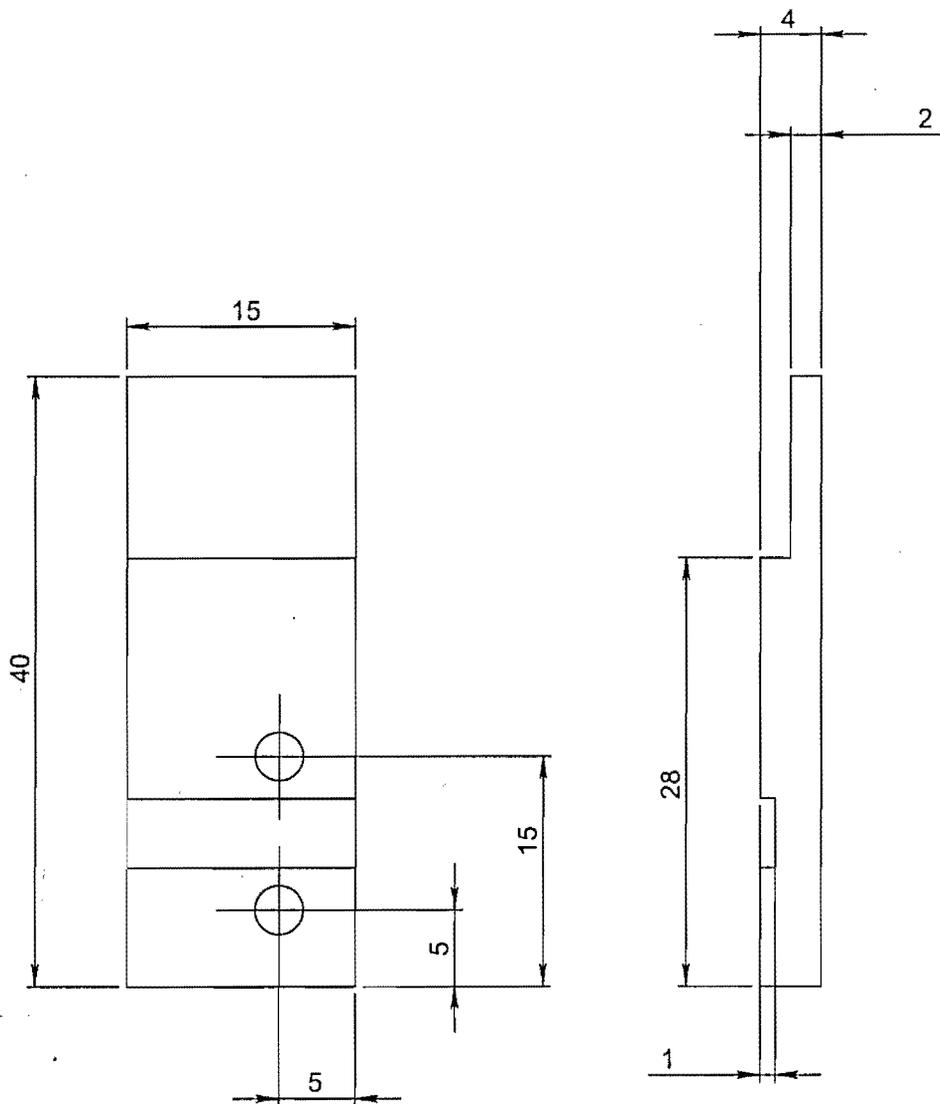
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

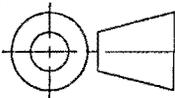
MODELO:

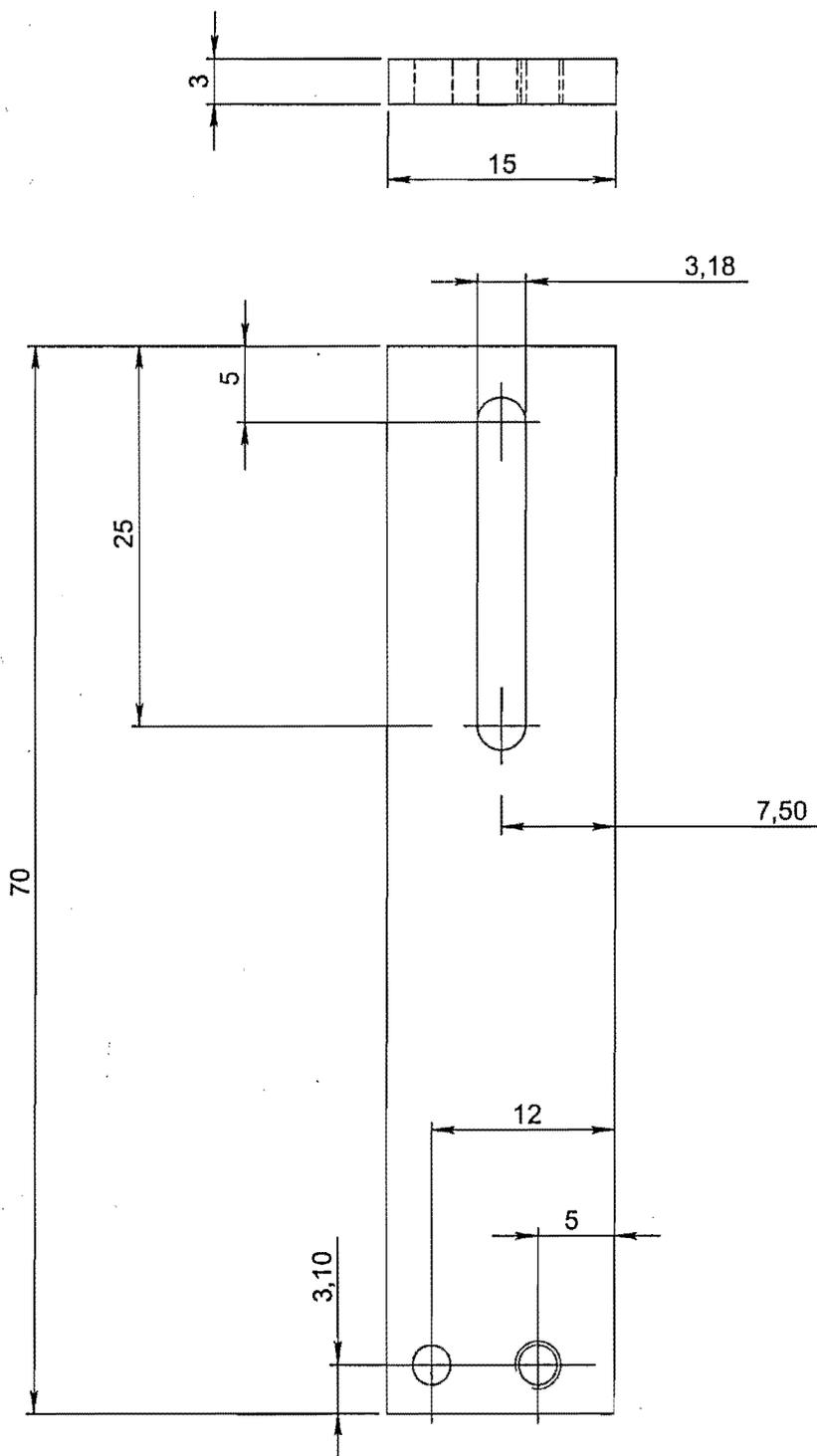
APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

PL.No: 27

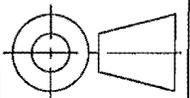


40	Platina Sujecion Banda	1	E-09	Aluminio	15 x 40 x 4	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
						ESC: 2 : 1
DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo			MODELO:
APROBO: Sigifredo Solano González			REVISO: Sigifredo Solano González			PL.No: 28



41	Riel Soporte sensor	1	E-09	Aluminio	70 x 15 x 3	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 2 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

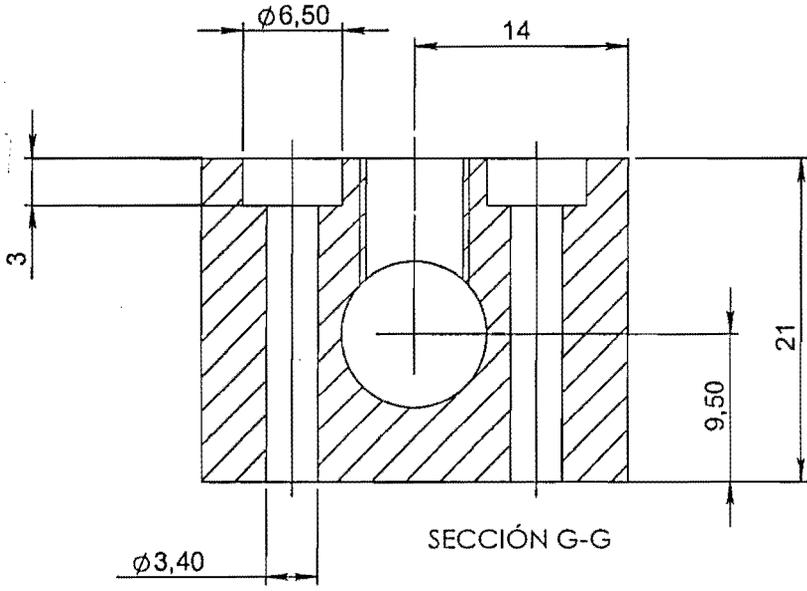
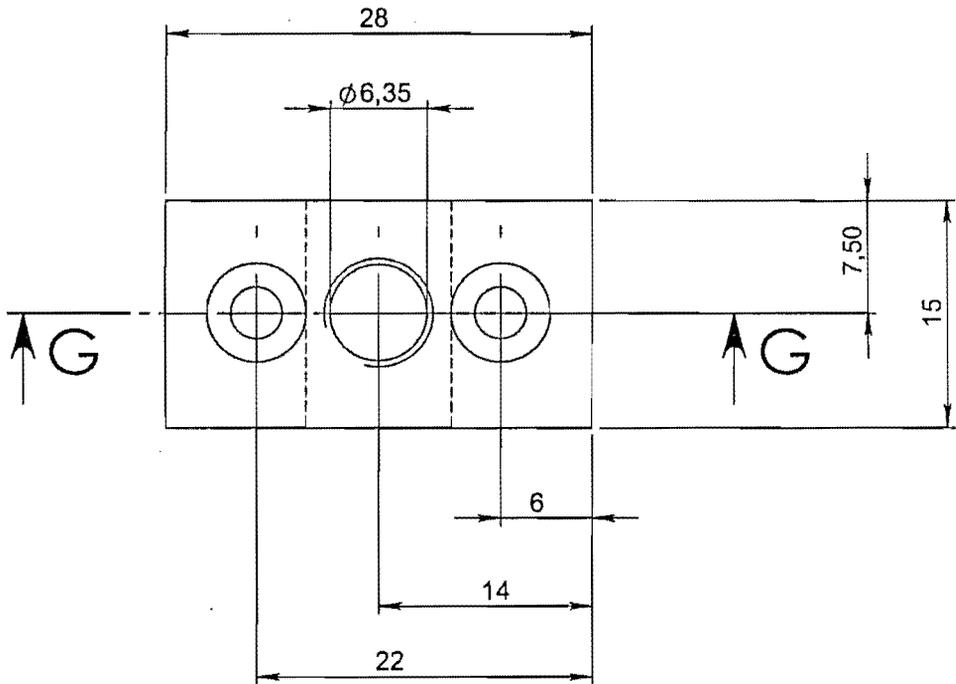
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

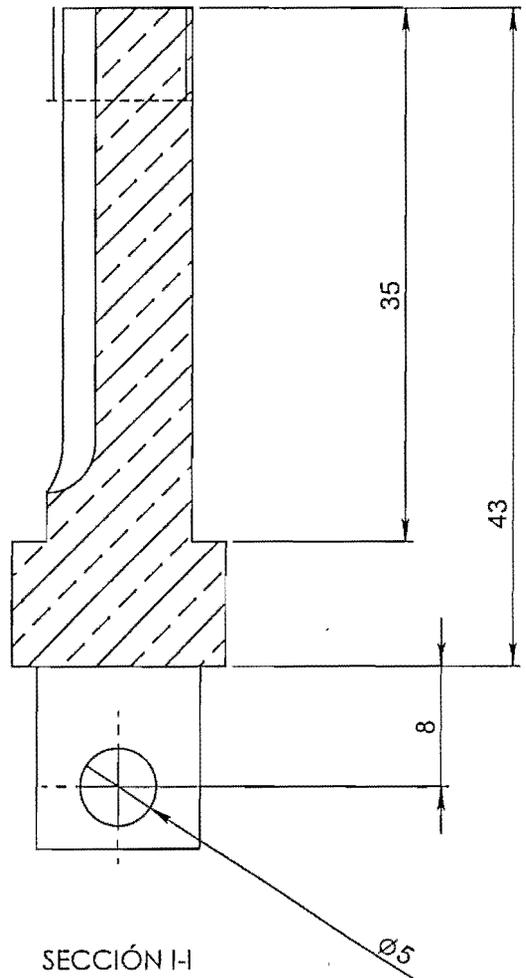
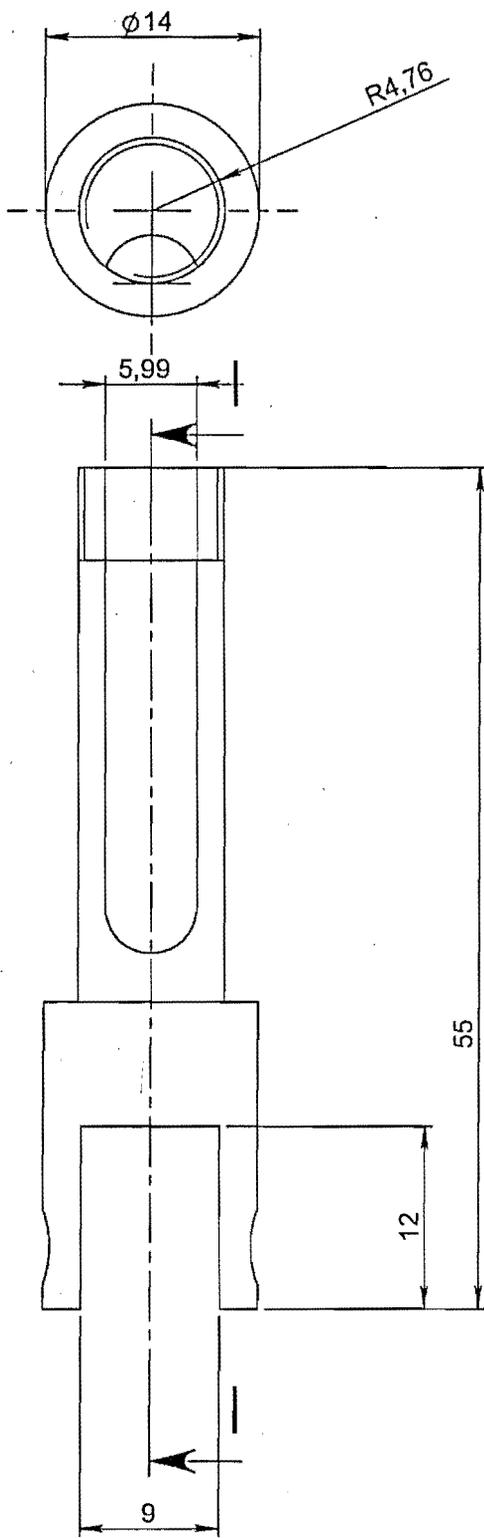
APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

PL.No: 29

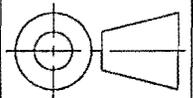


42	Tensor	1	E-07	Aluminio	28 x 21 x 15	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo		ESC: 2 : 1
	APROBO: Sigifredo Solano González			REVISO: Sigifredo Solano González		MODELO: PL.No: 30

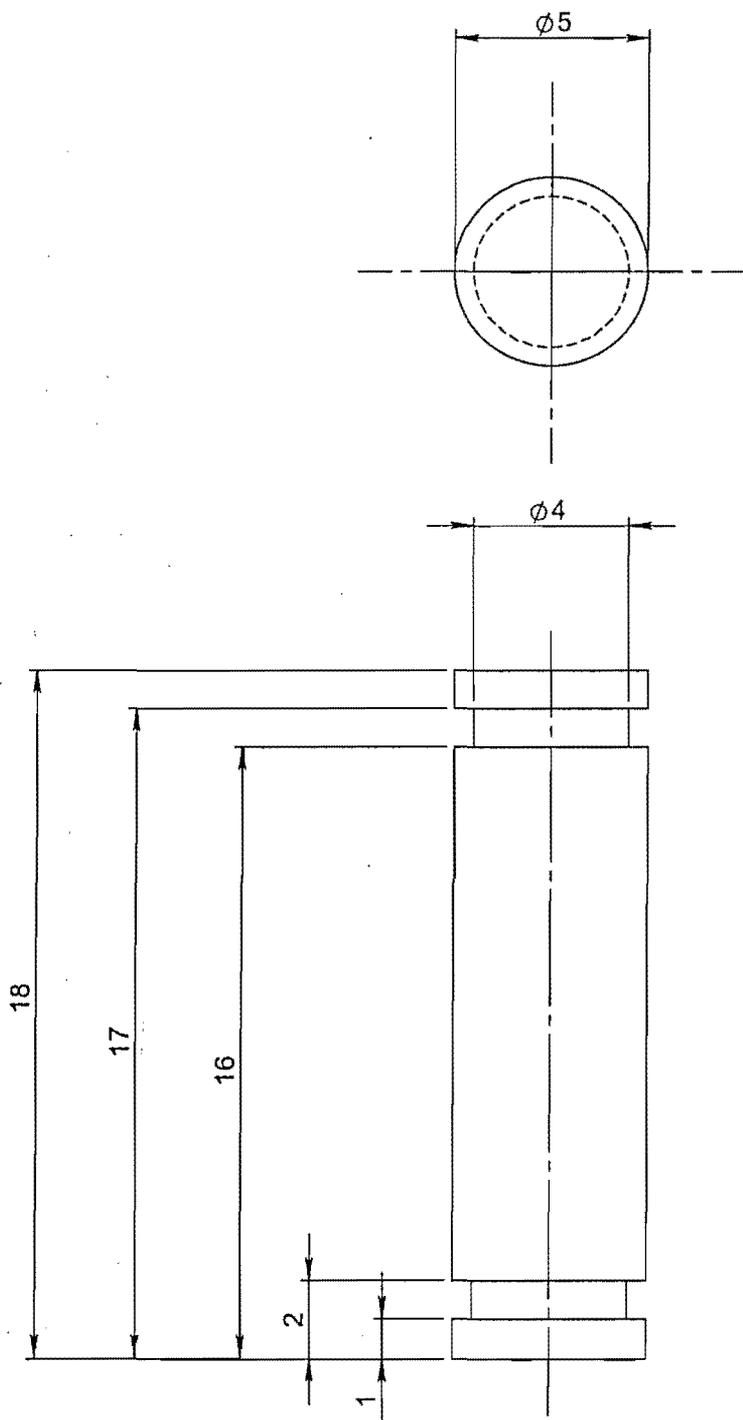


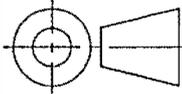
43	Sujecion Piñon	1	E-07	Latón	Ø 14 x 55	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

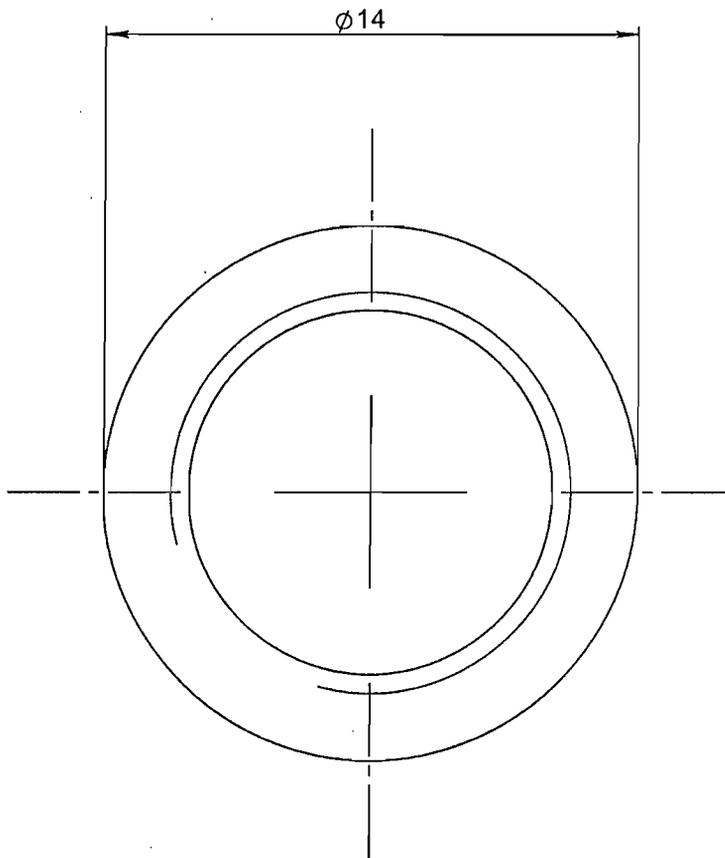
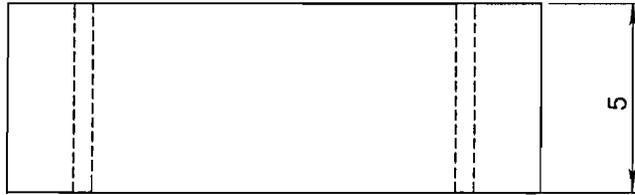
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



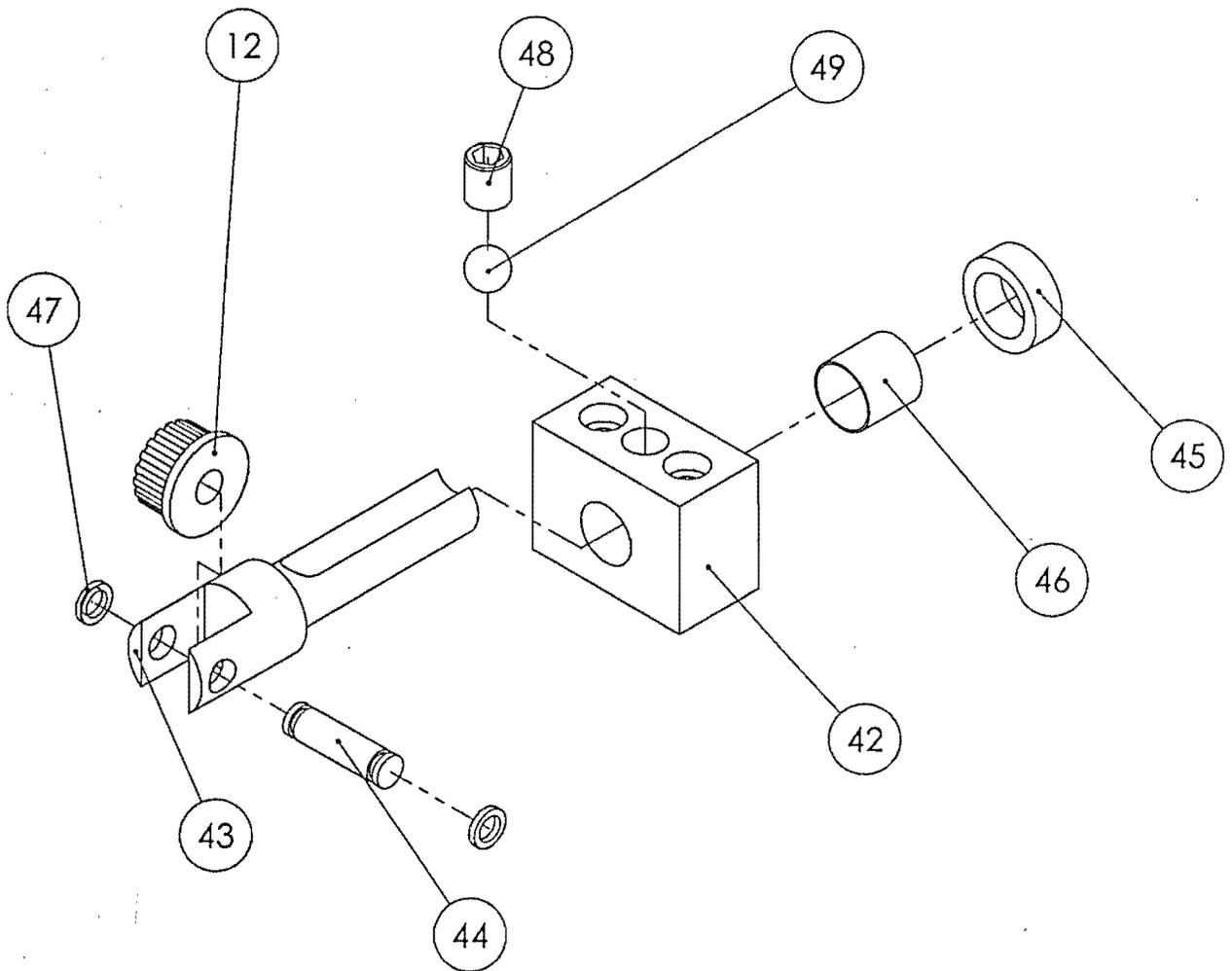
un	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda			FECHA: 01/04/05
	MEDELLIN	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz	DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo	MODELO:
APROBO: Sigifredo Solano González		REVISO: Sigifredo Solano González	PL.No: 31	



44	Eje Piñon	1	E-07	Acero	$\phi 5 \times 18$	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA:01/04/05
	DISEÑO:Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO:Juan Pablo Mejía Restrepo		MODELO:	
APROBO:Sigifredo Solano González		REVISO:Sigifredo Solano González		PL.No: 32		



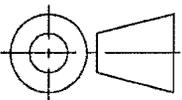
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
45	Tuerca Tension	1	E-07	Latón	∅14 x 5	medidas en mm
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
 MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo		MODELO:	
APROBOSigifredo Solano González		REVISOSigifredo Solano González		PL.No: 33		



46	Resorte tension	1	
48	Prisionero	1	
45	Tuerca Tension	1	
49	Esfera	1	
47	Pin Candado	2	
44	Eje Piñon	1	
12	Piñon motor	1	
43	Sujecion piñon	1	
42	Tensor	1	
Ref.	Descripcion	Cant.	PI.Ref

E-07	Tensor Banda	1	E-09	-----	914 x 2000 x 197	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

**Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda**

FECHA: 01/04/05

ESC: 1 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

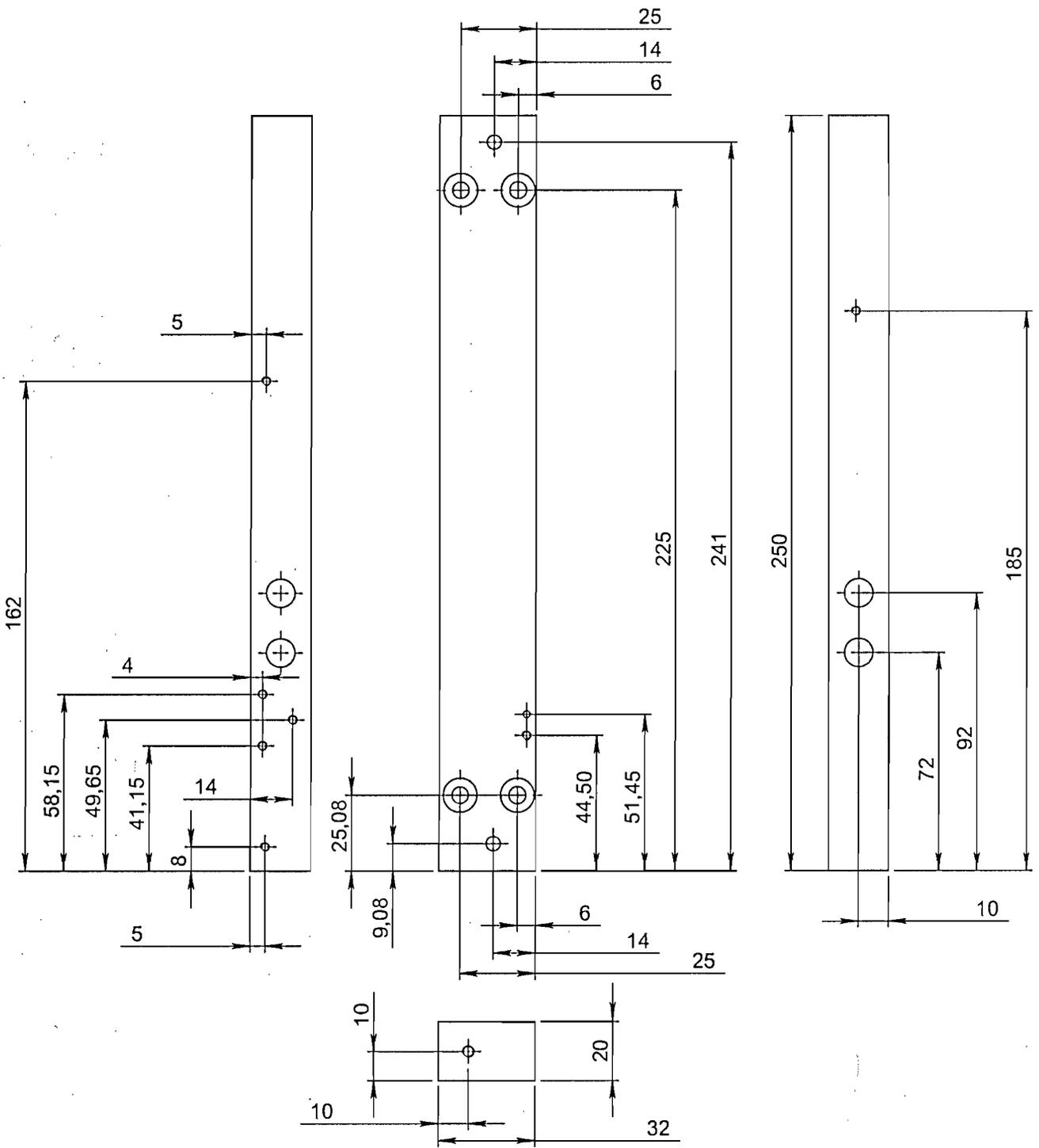
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

APROBOSigifredo Solano González

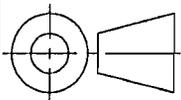
REVISOSigifredo Solano González

PL.No: 34



50	Platina Soporte	1	E-09	Aluminio	20 x 32 x 250	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

FECHA: 01/04/05

ESC: 1 : 2



MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

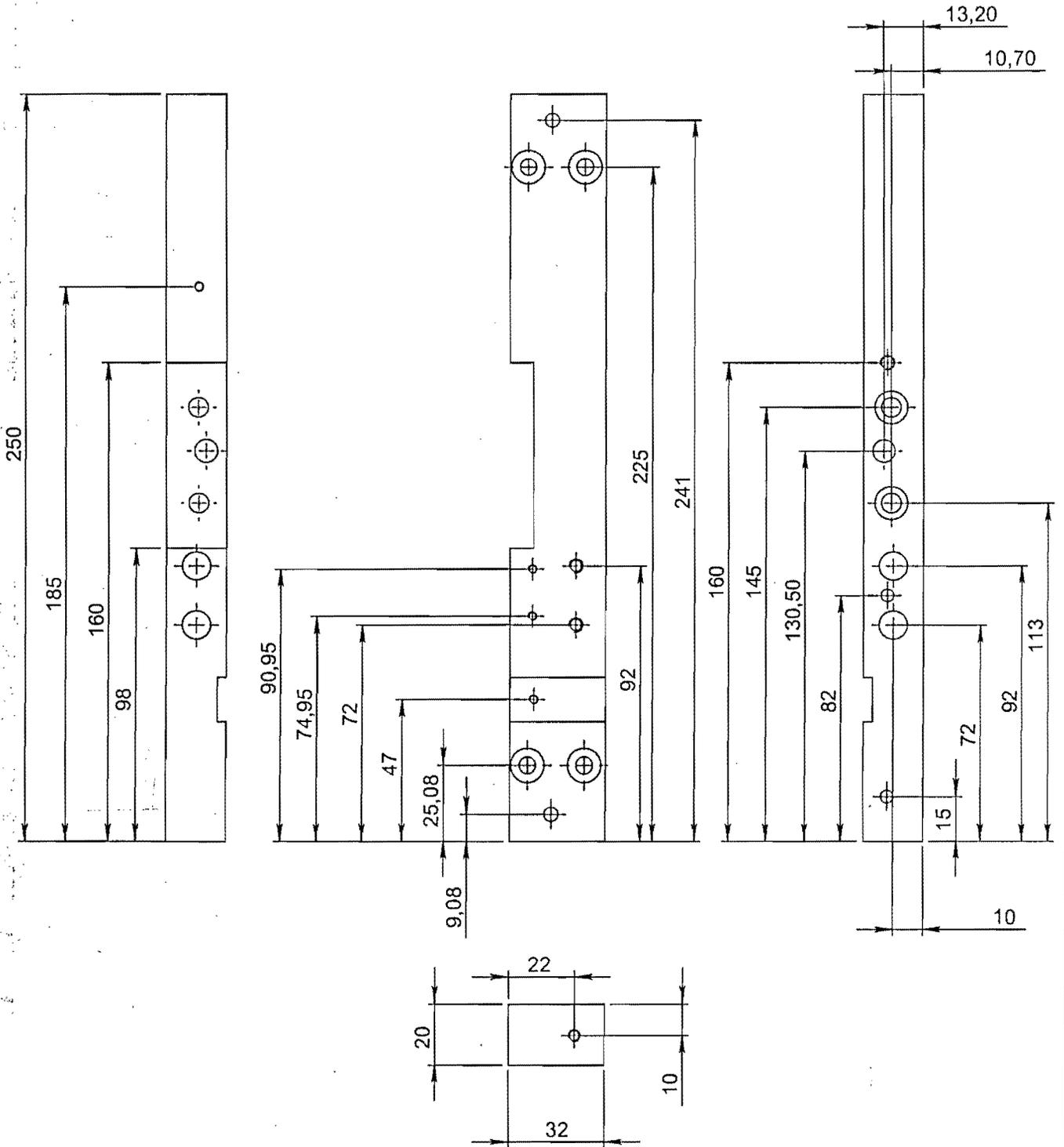
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

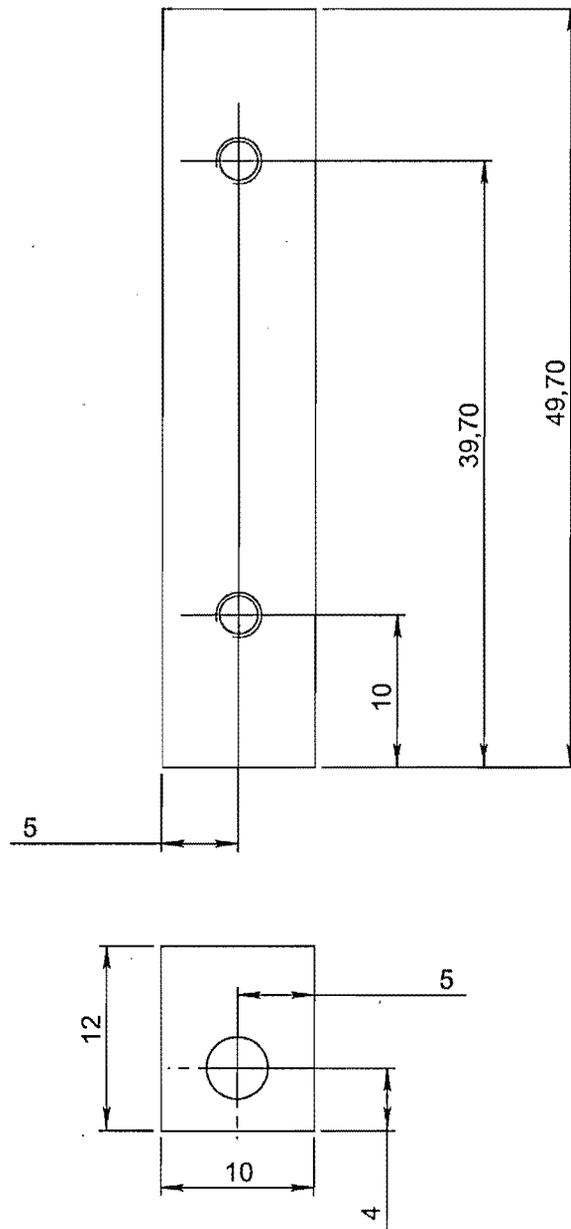
APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

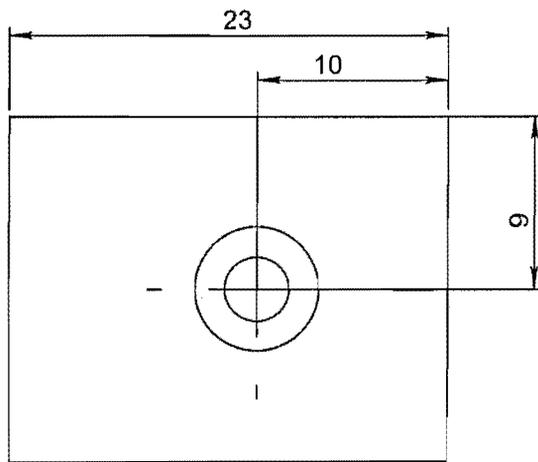
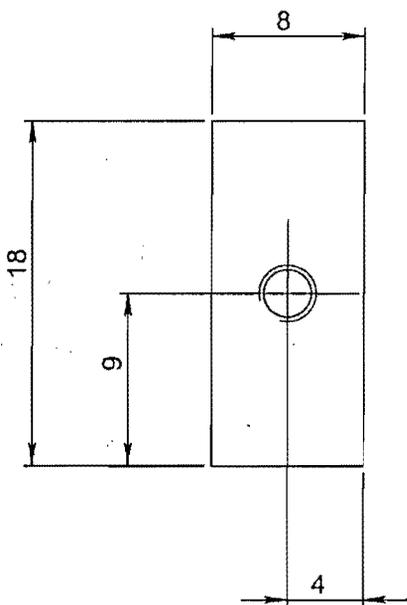
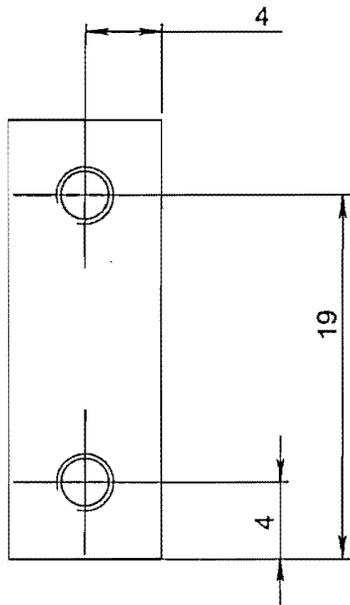
PL.No: 35



51	Platina Soporte Porta cubeta	1	E-09	Aluminio	20 x 32 x 250	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
 MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
						ESC: 1 : 2
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo		MODELO:	
APROBO: Sigifredo Solano González		REVISO: Sigifredo Solano González		PL.No: 36		

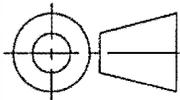


52	Fijación Cubierta	2	E-08	Aluminio	10 x 12 x 49.7	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA:01/04/05
	DISEÑO:Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO:Juan Pablo Mejía Restrepo		MODELO:	
APROBO:Sigifredo Solano González		REVISO:Sigifredo Solano González		PL.No: 37		



53	Soporte Cubierta R	1	E-08	Aluminio	8 x 18 x 23	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



un

Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

FECHA: 01/04/05

ESC: 2.5 : 1

MEDELLIN

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz

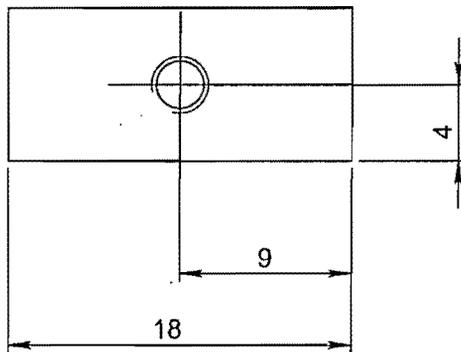
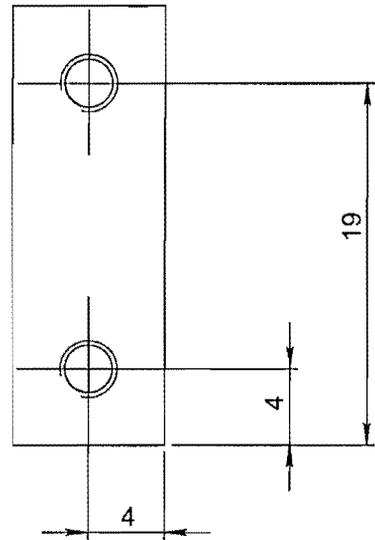
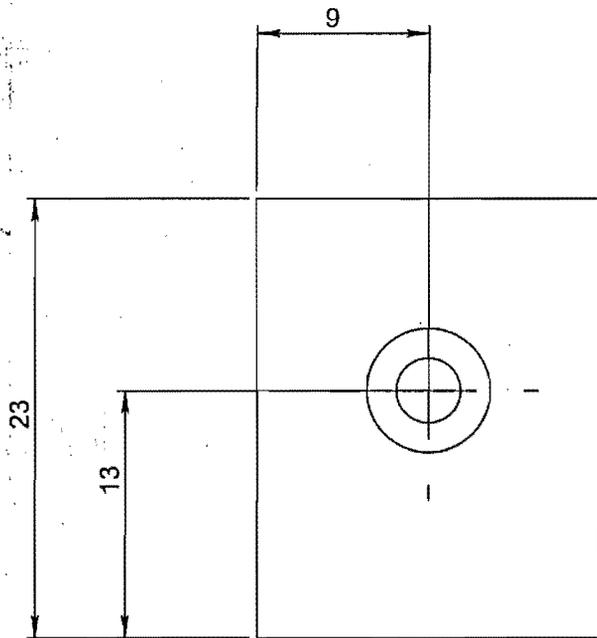
DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo

MODELO:

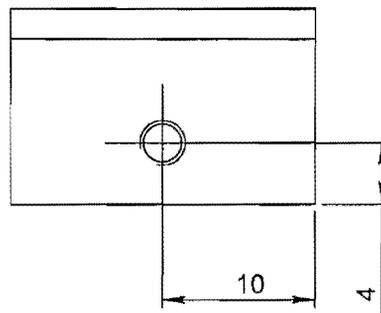
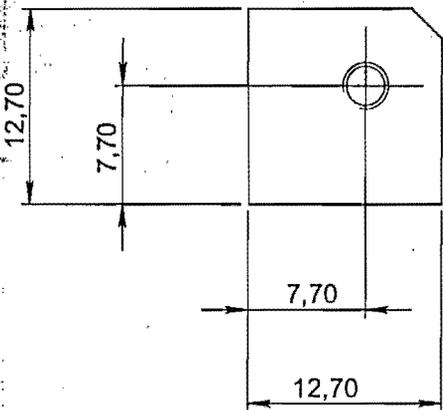
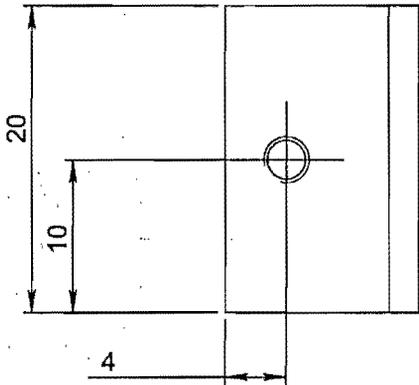
APROBO: Sigifredo Solano González

REVISO: Sigifredo Solano González

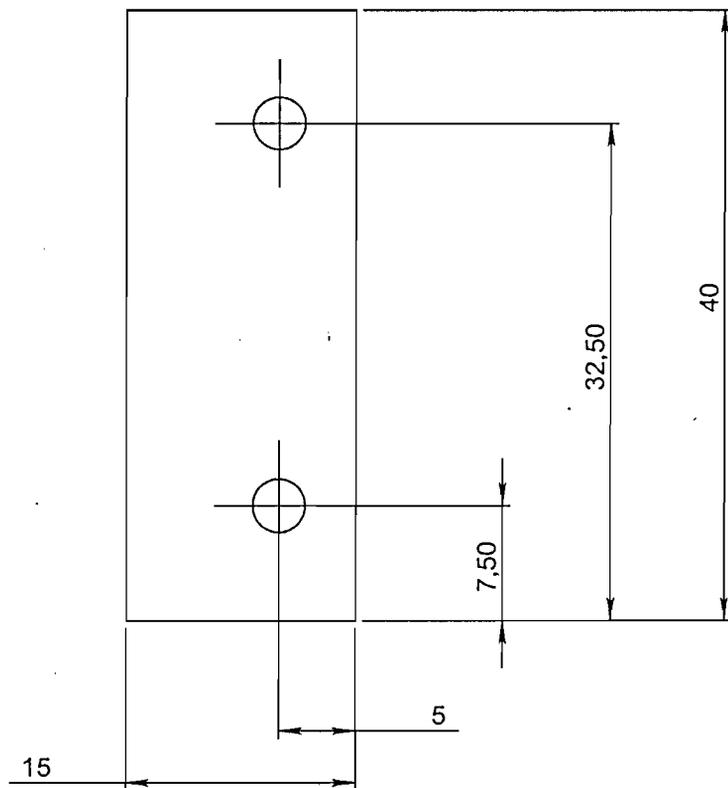
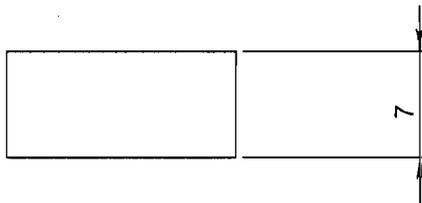
PL.No: 38



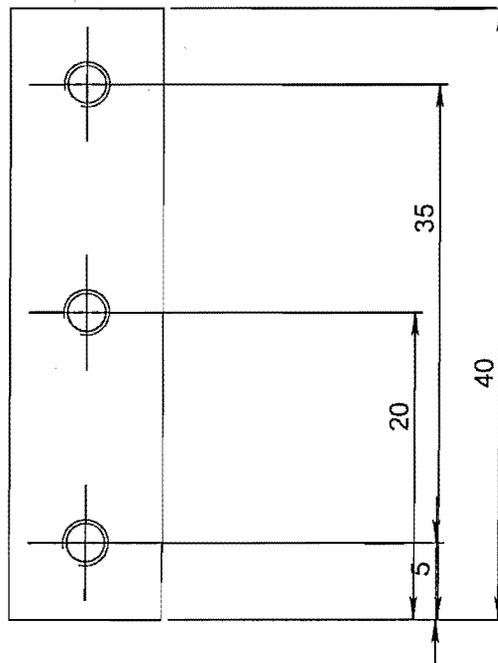
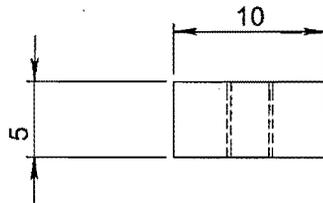
54	Soporte Cubierta L	1	E-08	Aluminio	8 x 18 x 23	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
						ESC: 2.5 : 1
DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo			MODELO:
APROBO: Sigifredo Solano González			REVISO: Sigifredo Solano González			PL.No: 39



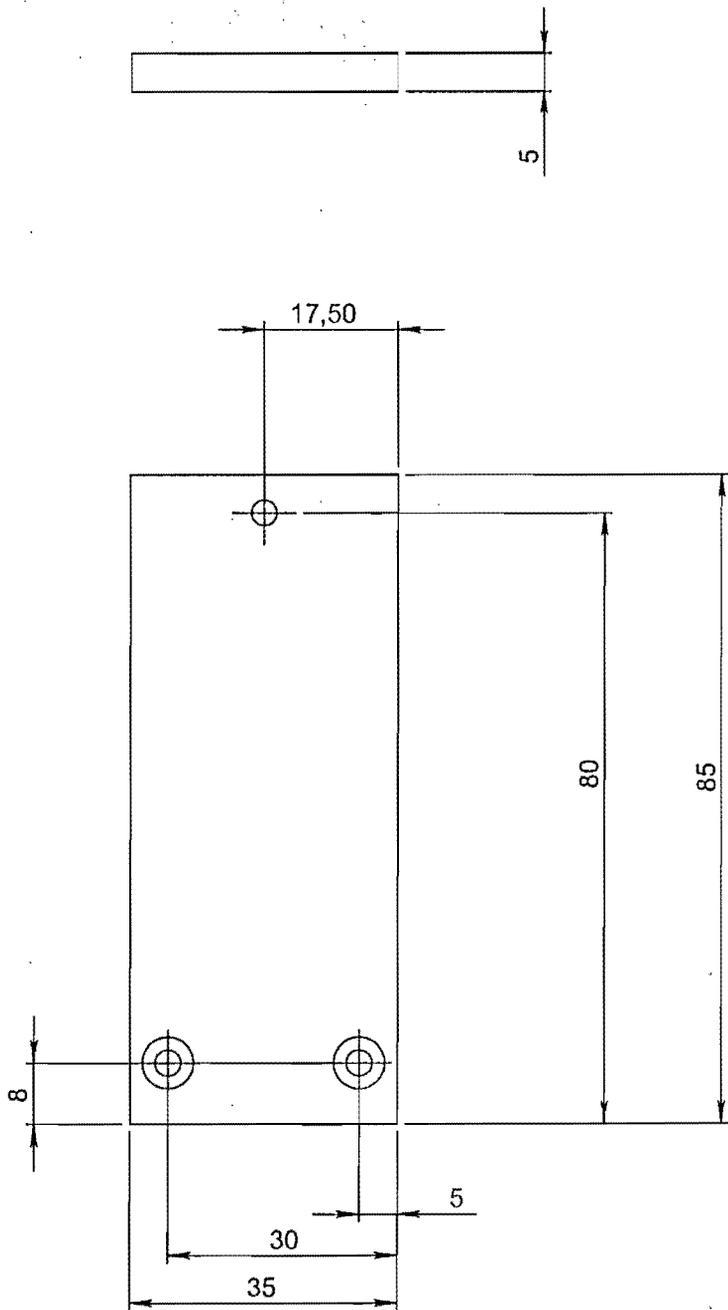
55	Fijacion Tapas	4	E-08	Aluminio	12,7 x 12,7 x 20	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA:01/04/05
	DISEÑO:Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO:Juan Pablo Mejía Restrepo		ESC: 2 : 1
APROBOSigifredo Solano González			REVISOSigifredo Solano González		MODELO:	PL.No: 40



56	Soporte Compuerta	1	E-08	Aluminio	7 x 15 x 40	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
 MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
						ESC: 2 : 1
DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo			MODELO:
APROBO: Sigifredo Solano González			REVISO: Sigifredo Solano González			PL.No: 41

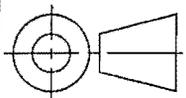


57	Brida	1	E-08	Aluminio	5 x 10 x 40	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo					ESC: 2 : 1
APROBO: Sigifredo Solano González REVISO: Sigifredo Solano González					MODELO:	PL.No: 42



58	Compuerta	1	E-08	Aluminio	5 x 35 x 85	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones

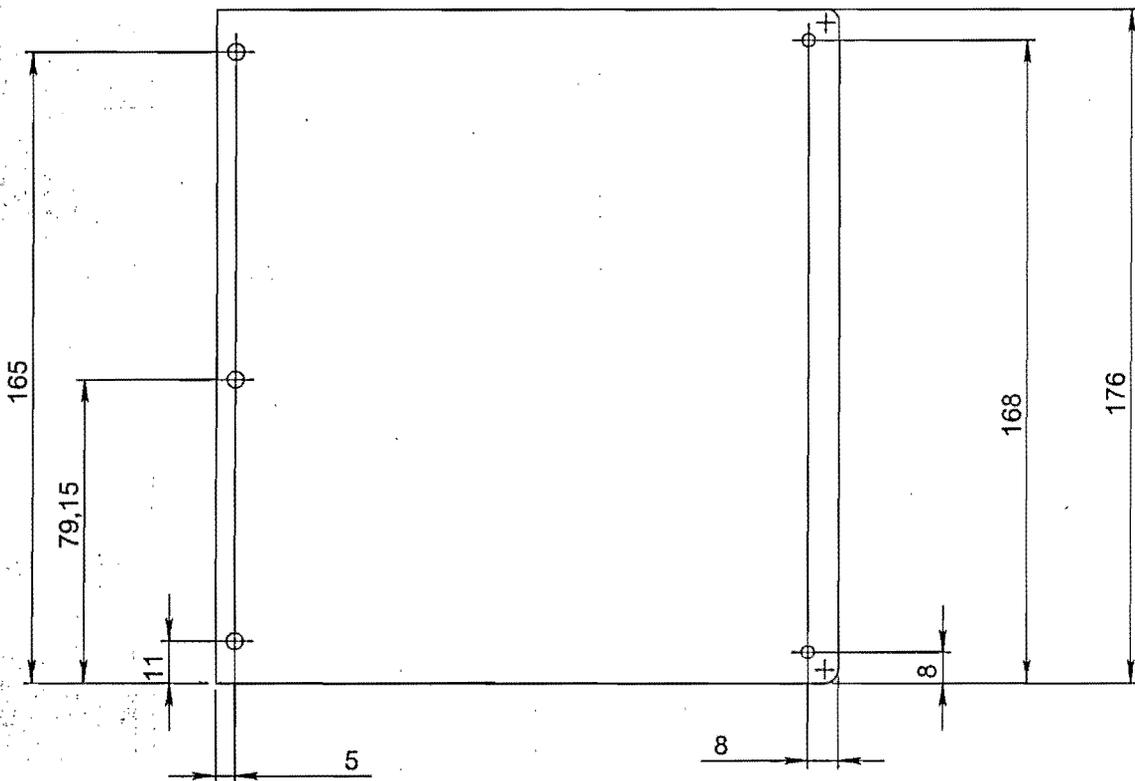
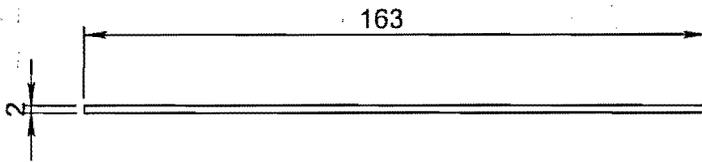
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
SEDE MEDELLIN



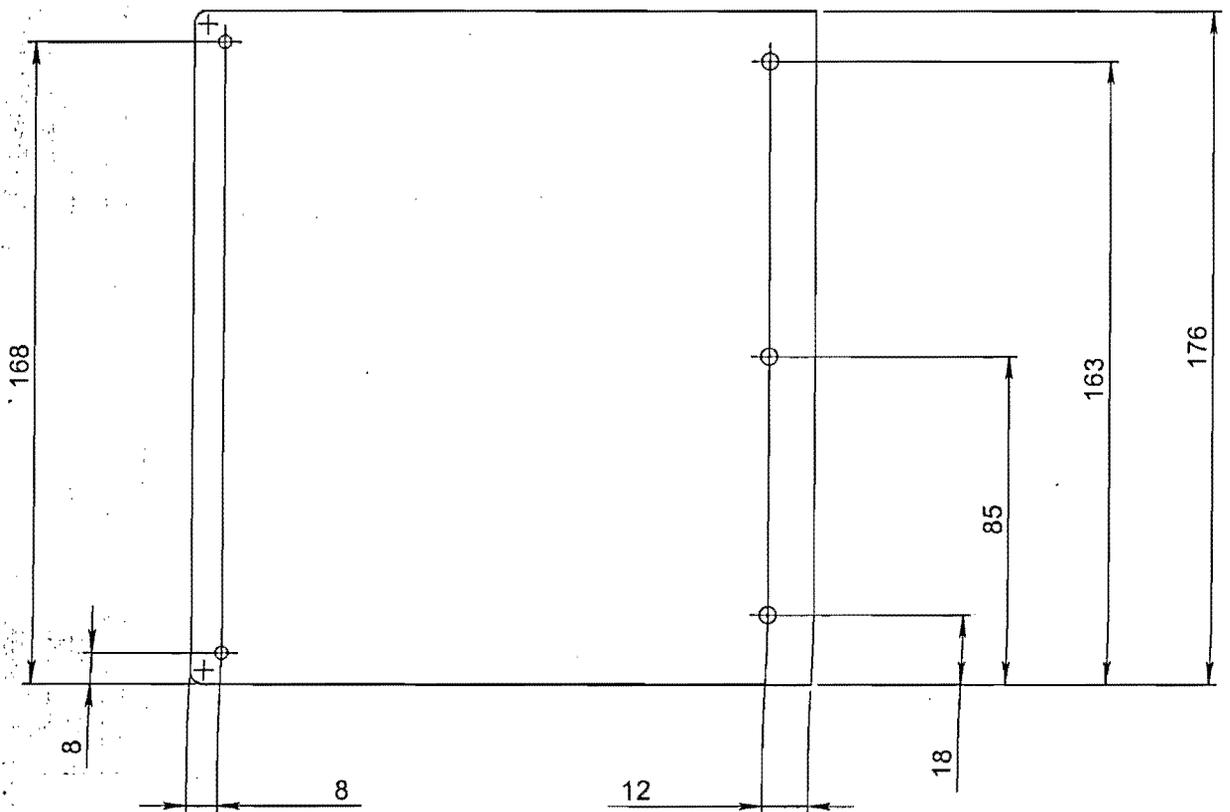
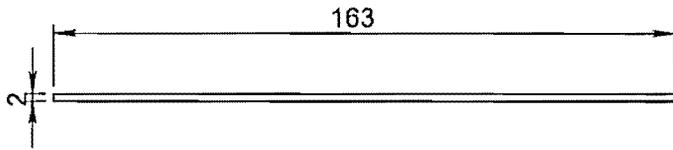
Espectrofotómetro de doble haz
y dos longitudes de onda

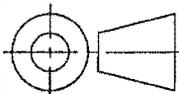
FECHA: 01/04/05
ESC: 1 : 1
MODELO:
PL.No: 43

DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz	DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo
APROBO: Sigifredo Solano González	REVISO: Sigifredo Solano González



59	Tapa R	1	E-08	Aluminio	2 x 163 x 176	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	Pl.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN.						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
	DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz		DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo			ESC: 1 : 2
APROBOSigifredo Solano González		REVISOSigifredo Solano González			MODELO:	PL.No: 44



60	Tapa L	1	E-08	Aluminio	2 x 163 x 176	medidas en mm
Ref.	Descripción	Cant.	PI.Ref.	Material	Especificaciones	Observaciones
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. SEDE MEDELLIN						
un MEDELLIN	Espectrofotómetro de doble haz y dos longitudes de onda					FECHA: 01/04/05
						ESC: 1 : 2
DISEÑO: Gonzalo Vargas Quiróz			DIBUJO: Juan Pablo Mejía Restrepo			MODELO:
APROBO: Sigifredo Solano González			REVISO: Sigifredo Solano González			PL.No: 45

ANEXO 2

PCEF-060

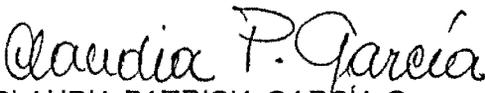
Medellín, 28 de abril de 2005

A QUIEN CORRESPONDA:

Como coordinadora del Comité de Programas Curriculares de la Carrera de Ingeniería Física me permito dar constancia que, el docente GONZALO VARGAS QUIROZ con documento de identidad 3.382.996, estuvo matriculado en el programa de Maestría en Física en el semestre 02 de 2003, semestres 01 y 02 de 2004.

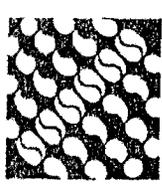
En la actualidad tiene un proyecto de tesis aprobado titulado "ANÁLISIS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DE HIGADO DE RATA CON EL MÉTODO DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE DOBLE HAZ Y DOS LONGITUDES DE ONDA", bajo la dirección del profesor Víctor Lemeshko, actualmente se encuentra pendiente de la presentación de la versión final de la tesis.

Atentamente,

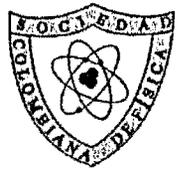

CLAUDIA PATRICIA GARCÍA G.
Coordinadora Programas Curriculares
Escuela de Física

Laura T.

ANEXO 3



XX Congreso Nacional de Física
V Escuela Nacional de Física
de la materia condensada



48 años cumpliendo con la misión de divulgar y promover la Física

CÓDIGO:12S1

Armenia Q., julio 11 de 2003

Señor(es):

Sigifredo Solano .

Gonzalo Vargas Quiróz

Estimado(s) participante(s):

Confirmamos que el resumen de su trabajo ***DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ Y DOS LONGITUDES DE ONDA*** ha sido aceptado por el Comité Académico para su presentación *Mural.*

Los Murales se presentarán los días Martes 2 y Jueves 4 de septiembre en el horario que indique la programación definitiva.

Para someter los artículos a la revista recordamos que la entrega debe realizarse el día 1 de septiembre en las instalaciones del Congreso, cumpliendo los requisitos de la Revista Colombiana de Física.

Cordialmente,

Hernando Ariza Calderón
Presidente
Sociedad Colombiana de Física

Aminta Mendoza Barón
Secretaria Ejecutiva
XX Congreso Nacional de Física

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ Y DOS LONGITUDES DE ONDA

Sigifredo Solano González. Gonzalo Vargas Quiróz.
Universidad Nacional Sede Medellín¹

RESUMEN

En el análisis bioquímico, la medida de la concentración de las sustancias por métodos espectrofotométricos en muestras turbias no genera resultados ciertos cuando se usa un espectrofotómetro de un solo haz. Este problema se resuelve mediante el uso de un espectrofotómetro de doble haz y doble longitud de onda.

Si la concentración de una sustancia se realiza midiendo la absorción con un espectrofotómetro de un haz y una longitud de onda, cualquier cambio de absorción, debido a la variación que por alguna causa se da en el enturbiamiento de la muestra, se podría interpretar como un cambio de concentración de la sustancia, sin que ello fuera cierto.

En este trabajo, partiendo de un monocromador Carl Zeiss Jena hemos diseñado un espectrofotómetro con rango de 200nm a 1000nm que permite medir la absorción en dos longitudes de onda diferentes. Una de ellas se toma donde la sustancia tiene la máxima absorción y la otra tan cercana que permite una resolución de menos de 10nm; con una sensibilidad con la que se logra mediciones de concentración de menos de 1 μ M gracias a la medición de absorbancia de menos de 0.01A.

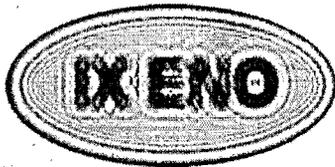
La medición de intensidades se realiza con sensores que permiten detectar valores de potencia en el rango de los nanovatios lo cual implica el uso de técnicas electrónicas de detección en fase mediante el uso de amplificadores lock-in.

El equipo se diseña específicamente para la medición de concentración de sustancias que intervienen en el transporte de electrones entre membranas de mitocondria de hígado de rata proceso, en la cual el hinchamiento de las mitocondrias tiene un comportamiento equivalente al enturbiamiento en una muestra.

La producción de un equipo con estas características tendrá un costo decenas de veces inferior al valor comercial de un equipo comparable y podrá ser usada en diversas áreas que requieren de un equipo de estos en nuestro medio.

¹. A.A. 3840. Medellín. ssolano@unalmed.edu.co, gvargas@unalmed.edu.co

ANEXO 4



IX Encuentro Nacional de Óptica

Universidad EAFIT Medellín, Junio 13 - 17 de 2005

Medellín, Mayo 24 de 2005.

Señores

Gonzalo Vargas Quiroz

Sigifredo Solano González

Viktor Lemeshko

Escuela de Física

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

A.A. 3840, Medellín

Referencia:

Diseño y construcción de un espectrofotómetro de dos haces y dos longitudes de onda

Gonzalo Vargas¹, Sigifredo Solano, Víctor Lemeshko

Escuela de Física, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, AA 3840 Medellín

Concepto:

El artículo ha sido aceptado para su presentación en el Evento. En consecuencia, esperamos su participación.

Tipo de presentación:

POSTER

Cordial saludo,

Dr.rer.nat. ROMÁN CASTAÑEDA S.

Comité Académico

¹ gvargas@unalmed.edu.co; teléfono: 57 4 430 9329; fax: 57 4 260 44 89

Diseño y construcción de un espectrofotómetro de dos haces y dos longitudes de onda

Gonzalo Vargas*, Sigifredo Solano, Víctor Lemeshko

Escuela de Física, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, AA 3840 Medellín

RESUMEN

Se presenta el diseño, construcción y calibración de un espectrofotómetro de dos haces y dos longitudes de onda, de alta resolución y bajo costo, que será usado en la medición simultánea de la absorbancia de dos diferentes sustancias en muestras turbias. El equipo está constituido por un monocromador de alta resolución con un sistema mecánico-óptico que automáticamente escoge las dos longitudes de onda y las hace pasar alternadamente por una celda con la muestra, después de la cual un sensor óptico de alta sensibilidad entrega una señal a un sistema de adquisición y procesamiento de datos tipo lock-in.

Palabras claves: Monocromador, doble haz, doble longitud de onda, absorbancia, amplificador lock-in

ABSTRACT

In this paper, the design, construction and calibration of a high resolution and low cost spectrophotometer of double-beam and double-wavelength is presented, which will be used in the simultaneously absorbance measurement of two different substances in turbid samples. The equipment uses a high resolution monochromator with an optic-mechanic system to automatically select one wavelength at time and pass it through the sample. The output signal is detected with a high sensitive optical sensor linked to lock-in data acquisition system for post processing.

Keywords: Monochromator, double-beam, double-wavelength, absorbance, lock-in amplifier.

1. INTRODUCCIÓN

La espectrometría óptica es hoy en día una de las áreas más socorridas en el análisis químico, biológico y en las ciencias médicas. Comúnmente se ha utilizado el espectro de la radiación electromagnética en las regiones ultravioleta (UV, 185-400nm) y visible (400, 700nm) y en los últimos años en el infrarrojo. El mayor uso que se le da a la espectrometría es en la determinación de especies absorbentes (cromóforos), denominada más específicamente como espectrofotometría [1]. Todos los métodos espectrofotométricos que miden absorción se basan en la ley de Beer-Lambert:

$$\log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = kd \quad (1)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente e I es la intensidad de la luz transmitida, d es el espesor recorrido por la luz en la muestra y k una constante que depende del medio. La ley de Beer describe que la constante es proporcional al número de moléculas del cromóforo a través del cual pasa la luz. En otras palabras la constante k es proporcional a la concentración (c) del cromóforo: $k = \epsilon c$, donde ϵ es el coeficiente de absorción molar.

El término $\log_{10}(I_0/I)$ se llama la absorbancia (A). Algunas veces el paso de la luz a través de la muestra se puede expresar con la transmitancia, $T = I/I_0$, como un porcentaje, pero hay que notar que únicamente la absorbancia es proporcional a la concentración del cromóforo. La relación entre la transmitancia y absorbancia está dada por:

$$A = -\log_{10} T \quad (2)$$

Se han propuesto diferentes configuraciones ópticas para realizar las medidas de absorbancia pero todas ellas tienen como base los espectrofotómetros de un haz, de doble haz y de doble longitud de onda [2]. La complejidad, resolución y

* gvargas@unalmed.edu.co; teléfono: 57 4 430 9329; fax: 57 4 260 44 89

costo de los espectrofotómetros comerciales de doble haz y doble longitud de onda es mayor que el de cualquier otro tipo. La propuesta presentada aquí se basa en esta última configuración.

En 1951 Britton Chance [3], propuso la técnica de "espectrometría de dos longitudes de onda" para mediciones de muestras turbias en análisis bioquímicos y desde entonces se han reportado muchos métodos basados en esta técnica. Entre las mayores ventajas que presenta este método están, la independencia de la absorbancia de la turbidez de la muestra y la posibilidad de determinación de dos componentes simultáneamente en una solución gracias a la presencia de un doble haz y una doble longitud de onda obtenidas de un monocromador que luego son enviadas a una sola muestra. La absorbancia a una longitud de onda λ_1 en una muestra se relaciona con la de otra longitud de onda de referencia λ_2 de la misma muestra. En uno de los casos típicos, la longitud de onda de referencia se coloca en un punto del espectro en el cual no se espera ningún cambio de absorbancia en una medición particular, denominado punto isosbético [4]. En particular los cambios de absorbancia debido a la turbiedad que se presenta son relativamente independientes de la longitud de onda, de los cambios de conformación de la molécula y de las fluctuaciones que ocurran en la fuente de luz [5].

2. COMPONENTES Y MÉTODO DE DISEÑO

Para la construcción de este espectrofotómetro de dos haces y dos longitudes de onda se usa solo un monocromador, método este, que no se ha reportado en la literatura. El monocromador se formó del sistema óptico y mecánico original de un espectrógrafo marca Carl Zeiss Jena del cual no se modifica ni su cavidad ni la disposición óptica o mecánica interior.

2.1 Descripción del monocromador

2.1.1. Sistema de iluminación y colimador de entrada

Se diseñó y construyó un sistema de iluminación para sustituir el sistema original (figura. 1). El sistema de iluminación está compuesto de una lámpara de filamento de tungsteno de 150w (intercambiable para obtener las potencias deseadas) con sistema de regulación de retroalimentación óptica de corriente de línea para evitar variaciones de intensidad y un sistema condensador acromático con enfoque graduable. El filamento de la lámpara halógena se coloca vertical y paralelo a la ranura graduable de entrada del haz al sistema dispersor de luz.

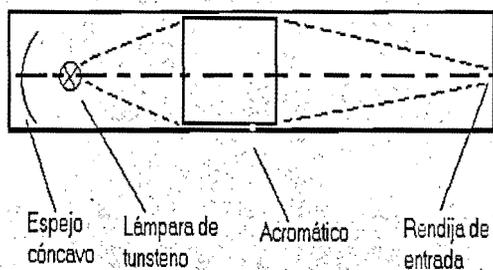


Figura 1. Sistema de iluminación

2.1.2 Componentes ópticos del sistema dispersivo

La entrada al sistema dispersivo está compuesto de una lente de distancia focal 340 mm para enfocar el filamento sobre una ranura graduable mecánicamente hasta 3 mm de ancho. Dispone además de varios atenuadores que se seleccionan mediante perillas. De esta manera se obtiene las condiciones adecuadas del haz para el espectro dispersivo. Cuando la luz emerge de la ranura se desvía a 90° con un espejo plano y se colima por un espejo esférico donde se refleja hasta la rejilla de difracción. La figura 2 muestra este detalle del monocromador.

2.1.3 Rejilla de difracción

La rejilla plana de difracción es de reflexión y está colocada sobre un sistema rotante que permite ajustar la iluminación en sus diferentes órdenes con una resolución hasta de 1 nm por cada mm en plano de sentido. Rayada mecánicamente tiene una estructura periódica en la dirección de dispersión. La red de la rejilla es tipo blaze plana a 500 nm y cubriendo una longitud de onda (primer orden de difracción) de 333 a 750 nm

2.2 Descripción del espectrofotómetro.

El espectrofotómetro consiste de la fuente de luz, el conjunto de lentes para colimar el haz de luz de la lámpara, una ranura graduable, la unidad del monocromador, un complejo mecánico adaptado al monocromador sin alterar ninguna partes del espectrógrafo original y un sistema de adquisición y control DAQ manejado por computador. Un esquema de todo el equipo completo se presenta en la figura 3.

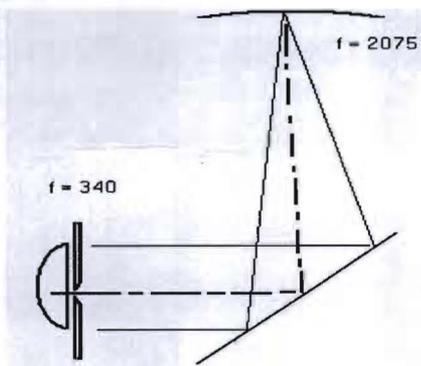


Figura 2. Detalle de iluminación de la rejilla de difracción.

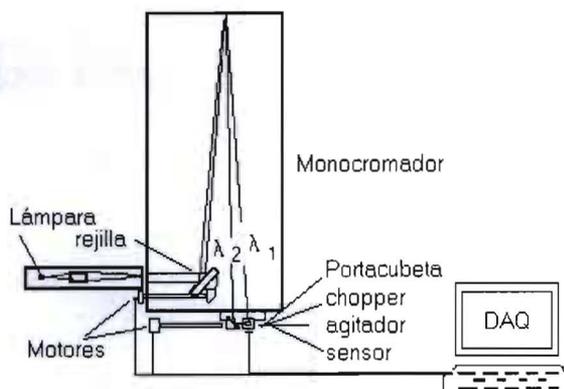


Figura 3. Montaje del espectrofotómetro

2.2.1 Complejo mecánico

El complejo de partes mecánicas agregadas al monocromador consiste de un sistema de sujeción que soporta los ejes para desplazamiento, la celda porta muestras, el soporte para espejo móvil y su motor y la caja que cubre todo el sistema. Adicionalmente sobre el sistema original de rotación de la rejilla se sujeta el motor para automatizar el movimiento de la rejilla. La figura 4 es una fotografía de la posición del sistema óptico-mecánico de selección de los dos haces.

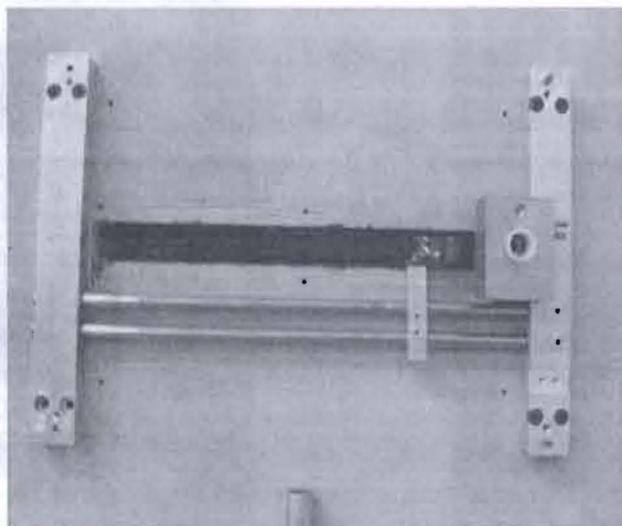


Figura 4. Detalles de sistema mecánico

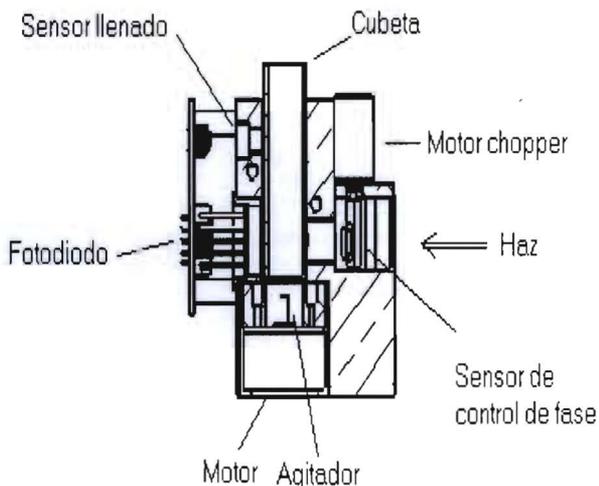


Figura 5. Vista en corte de celda porta muestras y sus partes

La celda porta muestrás consiste de un bloque donde se aloja la cavidad para cubetas estándares que contienen las muestras con su respectivo motor agitador y laberinto de agujeros para refrigeración. También se encuentra allí el motor chopper que hace rotar una pieza y que con un juego de ranura y espejos, tiene como función interrumpir intermitentemente un haz de una longitud de onda y a la vez permitir el paso del otro haz con la otra longitud de onda.

En este bloque también se dispone de un interruptor que detecta si la cubeta se encuentra en su lugar y un fotodiodo sensor del instante en que los haces pasa hacia la muestra. La tarjeta que contiene el fotodiodo y la respectiva electrónica que sensa los cambios de densidad óptica está sujeta a este bloque. La vista en corte de figura 5 muestra los detalles.

2.2.2 Sistema de adquisición y control

En todo espectrofotómetro debido al "stray light" y demás ruidos presentes en la medición, la relación señal ruido (NSR) suele ser mucho menor que uno. Para aumentar la NSR técnicas de modulación no son suficientes, pues no siempre ajusta la señal en el ancho de banda mínimo del filtro pasabajo que se pueden implementar en la práctica [5]. Por esto se utilizan técnicas de tipo amplificación lock-in. Las componentes básicas del sistema de detección utilizado para el aumento de la relación señal ruido puede verse en la figura 6.

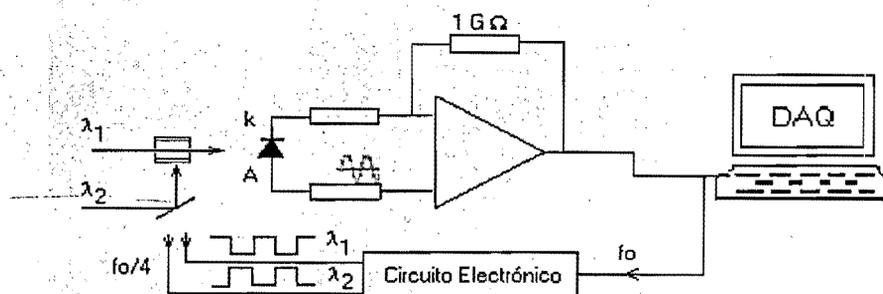


Figura 6. Sistema tipo lock-in

La técnica de modulación "optical chopper" utiliza un motor a 8000 RPM y sistema fotodiodo sensor de fase para generar una onda sincronizada a la frecuencia del chopper y a la entrada de los haces que entran en la muestra. Así el sistema se coloca para empezar a adquirir datos en un período, es decir desde cuando el fotodiodo sensor de fase recibe luz (ON) hasta cuando deja de recibir luz (OFF). El sistema de adquisición empieza la colección de datos cuando la señal de referencia hace una transición del bajo a alto a través del fotodiodo Hamamastu S5591 que posee amplificación integrada y resolución de nanovatios. El sistema de adquisición se coloca a una velocidad de conversión que permita unos 500 datos por periodo los cuales se promedian, con oscuridad y luego se restan para cada longitud de onda. De estas dos señales se obtiene la absorbancia por programa.

La selección de las dos haces de longitudes de onda λ_1 y λ_2 se hace posicionando la región del espectro de interés rotando con un motor de paso la rejilla de difracción hasta la ranura de entrada del haz de la celda porta muestra reciba la luz correspondiente a la menor longitud de onda. Desplazando el espejo móvil automáticamente se posiciona en el lugar donde recibe en su centro el segundo haz con la mayor longitud de onda, el cual es redireccionado hasta el espejo que tiene el motor chopper que en su rotación hace llegar este haz hasta la muestra y luego a fotodiodo sensor.

El ancho de los espejos de 3 mm y el máximo acercamiento entre el espejo móvil y la pieza ranurada con espejo del motor chopper determina la resolución del espectrofotómetro, 5 nm, más que apropiado para la aplicación para la que se diseñó. La resolución espectral del espectrofotómetro se puede lograr gracias a que la resolución que se alcanza en el espectrógrafo de 1 nm por cada mm del ancho sobre la ventana de salida de 30x2 cm, mientras el enfoque del sistema de iluminación usó un ancho de ranura máxima a la entrada del monocromador.

Un circuito para el manejo y alimentación de los motores de selección de las longitudes de onda se fija al espectrofotómetro e interconecta una tarjeta de adquisición DAQ NI PCI 6013 de la compañía National Instruments inserta en un computador personal

3. RESULTADOS OBTENIDOS

Para verificar el rango del espectro generado por el monocromador se diseñó y construyó un posicionador x-y en el plano vertical donde debe quedar, en la celda de la figura 5, el LED Hamamatsu. Sobre este plano se colocó la ventana del foto

sensor de un radiómetro calibrado de la compañía International Light referencia IL1700. En la posición horizontal de máxima intensidad se buscó la posición vertical también de mayor intensidad. Los datos se muestran en la figura 7. La curva obtenida está en muy buena concordancia a su vez con la respuesta del sensor dada por el fabricante. El sensor de fotodiodo usado cubre este rango efectivamente y aunque no linealmente se ajusta por software a partir de la curva característica suministrada por el fabricante.

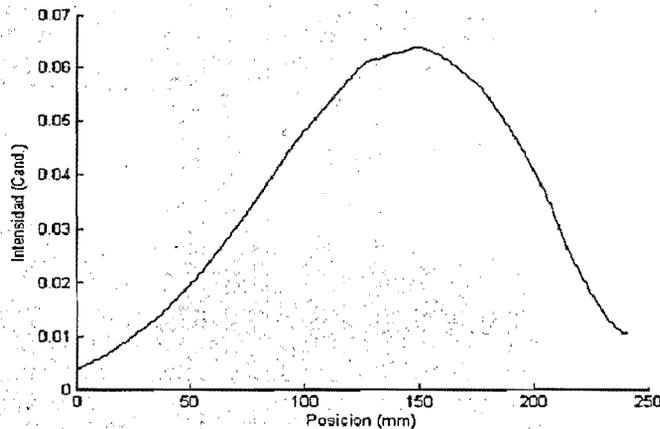


Figura 7. Respuesta espectral en la ventana de salida del monocromador. La distancia se mide desde el extremo rojo del espectro (posición 0) hasta el otro extremo del espectro visible

De esta manera se logra tener un espectrofotómetro automatizado de características similares a los ofrecidos comercialmente.

Se desarrolla en este momento un software amigable para el control del instrumento, la adquisición de datos, el procesamiento y el despliegue de los datos usando LabView v 7.1 (National Instruments, USA) para medir la corriente electrónica entre membranas mitocondriales con la implementación de un protocolo conocido [6,7].

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es financiado por la Universidad Nacional de C. Sede Medellín. Proyecto DIME No 030802667

REFERENCIAS

1. Porro T.J. "Double-Wavelength Spectrometry" *Anal. Chem.* **44**(4) 93-103 (1972)
2. Schmidt W, J. "A high performance micro-dual-wavelength-spectrophotometer (MDWS)" *Biochem. Biophys. Methods* **58** 15-24 (2004)
3. Chance B. "Rapid and sensitive spectrophotometry III A double beam apparatus" *Rev. sci. Instr.* **22** 619-638 (1951)
4. Shibata, S., Furukawa, M., Goto, K. "Dual wavelength spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, **46**, 271-279 (1969)
5. Rapp J. y Hind G. "A scanning dual wavelength spectrophotometry: Application to study of photosynthetic electron transport" *Anal. Biochem.* **60** 474-488 (1974)
6. Hieftje G. M. "Signal-to-Noise Enhancement Through Instrumental Techniques" *Anal. Chem.* **44**(6) 81-88 (1972)
7. Lemeshko V. "Mg²⁺ induces intermembrane electron transport by cytochrome c desorption in mitochondria with ruptured outer membrane" *Febs Letter* **472** 5-8 (2000).
8. Louahad N, et al. "Development for a high resolution UV spectrophotometer for at-line monitoring of bioprocesses" *Chemical Engineering and processing* **41** 107-114 (2002)

ANEXO 5



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLIN**

**Ejecución Presupuestal Acumulada por Proyecto y Recurso
3001 NIVEL CENTRAL SEDE MEDELLIN**

SFI - Sistema Financiero Integrado
Módulo Presupuesto

Página 1 de 1
27/04/2005 10:46:59
Programa: PYMREAPP
USUARIO 3 DEL CINDEC-D

8999999063

Desde 200501 hasta 200504

Proyecto: 20201004542-DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ Y DOS LONGITUDES DE ONDA PARA ANÁLISIS DE ELECTRONES ENTRE MEMBRANAS

Recurso: Imputación	21	RECURSOS DE CAPITAL	Descripción	Apropiación Destinada	Cupo	Disponibilidad	Registro	Obligaciones	Pago	Saldo x Comprometer %por Eje
2			TOTAL: GASTOS	1,087,949.00	.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	595,788.00 54.76
24			INVERSION	1,087,949.00	.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	595,788.00 54.76
24410			Investigación aplicada a estudios	1,087,949.00	.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	595,788.00 54.76
24410705			Educación superior	1,087,949.00	.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	595,788.00 54.76
2441070501			PROGRAMA DE DESARROLLO INVESTIGATIVO	1,087,949.00	.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	595,788.00 54.76
244107050102			GASTOS DE OPERACION	1,087,949.00	.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	595,788.00 54.76
244107050102001			ADQUISICION DE BIENES	517,949.00	.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	25,788.00 4.98
24410705010200102			MATERIALES Y SUMINISTROS	517,949.00	.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	492,161.00	25,788.00 4.98
244107050102002			ADQUISICION DE SERVICIOS	570,000.00	.00	.00	.00	0.00	0.00	570,000.00 .00
24410705010200205			IMPRESOS Y PUBLICACIONES	100,000.00	.00	.00	.00	0.00	0.00	100,000.00 .00
24410705010200215			OPERACIONES INTERNAS-ADQUISICION DE SERVICIOS	470,000.00	.00	.00	.00	0.00	0.00	470,000.00 .00

CLAUDIA PATRICIA CASTAÑO ALZATE
PRESUPUESTO

EDGAR CADAVID CALDERON
PRESUPUESTO

