



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Desarrollo tecnológico y evaluación de un prototipo para el análisis de la contaminación de aguas mediante fluorescencia de matriz de excitación-emisión

Oscar Libardo Lombana Charfuelan

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia

2016

Desarrollo tecnológico y evaluación de un prototipo para el análisis de la contaminación de aguas mediante fluorescencia de matriz de excitación-emisión

Oscar Libardo Lombana Charfuelan

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Ambiental

Director:

Ph.D. Rodrigo Jiménez Pizarro

Codirector:

Ph.D. Oscar Edwin Piamba Tulcán

Línea de Investigación:

Nuevas tecnologías y diseños

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación de Calidad del Aire

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2016

A mi familia, por su apoyo incondicional y por su constancia, sin ellos no habría sido posible culminar esta etapa.

Agradecimientos

A Rodrigo Jiménez Pizarro, Ph.D. Profesor Asociado, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia. Agradezco sus enseñanzas y su disponibilidad tanto para atender asuntos académicos como personales. Siempre estuvo ahí para impulsarme a la culminación de este proyecto.

A Oscar Edwin Piamba Tulcan, Ph.D. Profesor Asistente, Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica, Universidad Nacional de Colombia; por su apoyo en la fase experimental del proyecto.

Al Grupo de Investigación de Calidad del Aire. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, especialmente a los ingenieros Néstor Yezid Rojas Roa y Luis Carlos Belalcazar, por su apoyo en las diferentes etapas del proyecto.

A la División de Investigación Sede Bogotá por su financiación, lo cual ayudo a adquirir algunos equipos esenciales para el desarrollo de esta investigación.

A Juan Camilo Cely, por su colaboración hasta el último momento de este proceso.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas	XIV
Resumen	2
Introducción	1
1. Marco Teórico.....	5
1.1 Fundamentos	5
1.1.2 Técnica de espectroscopia de matriz de excitación emisión (EEM)	7
1.2 Instrumentos desarrollados	9
1.2.1 Avances en espectrofluorómetros clásicos	9
1.2.2 Avances en el desarrollo de espectrómetros portátiles	9
1.2.3 Aplicaciones	11
2. Metodología	17
2.1 Diseño conceptual	17
2.2 Diseño y fabricación del sistema optomecánico.	20
2.2.1 Tabla óptica.....	20
2.2.2 Celda de fluorescencia	21
2.2.3 Postes y soportes.	23
2.2.4 Fibra óptica.....	23
2.2.5 Rueda de filtros	24
2.2.6 Soportes ópticos circulares (kinematic mounts).....	24
2.3 Fuentes de luz.....	25
2.3.1 Fuente LED	25
2.3.2 Fuente PX-2	26
2.3.3 Fuente HID-H4	27
2.3.4 Lámpara de mercurio (Hg).....	27
2.4 Otros componentes ópticos.	28
2.4.1 Lentes doble convexos.	28
2.4.2 Filtros pasa banda.	28
2.5 Mini espectrómetro AvaSpec 3648.	30
3. Análisis y discusión de resultados	31
3.1 Calibración y caracterización del mini espectrómetro	31
3.1.1 Caracterización de la longitud de onda (abscisa)	31
3.1.2 Caracterización de la señal (ordenada)	34
- Intensidad de la señal en función del tiempo de integración.....	35

3.1.3 Caracterización del ruido y razón señal a ruido (SNR)	36
- Análisis del comportamiento del ruido.....	36
- Relación señal a ruido en las mediciones (SNR).	38
3.2 Espectros de excitación y emisión.	39
3.2.1 Pruebas con LEDs	39
3.2.2 Pruebas con PX-2:	41
3.2.3 Pruebas con HID-H4	43
3.3 Ensayos con fluoróforo estándar.....	45
3.3.1 Dependencia de la fluoresceína con el pH.	48
3.2 Pruebas con combustibles.	55
3.2.1 Generación de EEMs para fluoróforos puros.....	57
3.2.2 Protocolo propuesto de calibración.	58
4. Conclusiones y recomendaciones	59
Bibliografía	61

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Diagrama de Jablonski (Lakowicz, 2006).	7
Figura 1-2: Ejemplo de (a) un espectro de emisión, (b) un espectro de excitación y (c) una EEM de una molécula (Ramanujam, 2000).	8
Figura 2-1: Diseño conceptual del sistema de medición de EEMs. (Fuente: esta investigación).	17
Figura 2-2: Esquemático sin lente (superior), esquemático con lente (inferior derecha) y fotografía (inferior izquierda) del primer montaje experimental usado para los ensayos (Fuente: esta investigación).	18
Figura 2-3: Esquemático sin lente (superior izquierda), esquemático con lente (inferior) y fotografía (superior derecha) del segundo montaje experimental usado para los ensayos (Fuente: esta investigación).	19
Figura 2-4: Esquemático del montaje experimental usado para los ensayos (Fuente: esta investigación).	20
Figura 2-5: Diseño de tabla óptica (Fuente: esta investigación).	21
Figura 2-6: Celdas de fluorescencia construida por Fabrin Ltda.	22
Figura 2-7: Portacubetas y celda adquiridos, marca Ocean Optics.	23
Figura 2-8: Postes adquiridos.	23
Figura 2-9: Rueda de filtros, marca Edmund Optics. Derecha: vista perfil. Izquierda: vista frontal.	24
Figura 2-10: Soportes ópticos para lentes, marca Edmund Optics.	25
Figura 2-11. Descripción del FWHM.	29
Figura 3-1: Lámpara de mercurio (Hg), Edmund Optics (Fuente: esta investigación).	32
Figura 3-2. Lámpara de mercurio (Hg), datos tomados de NIST.	32
Figura 3-3. Error a priori y error a posteriori (Fuente: esta investigación).	33
Figura 3-4: Análisis del grado de polinomio (n) para la función $\lambda^n = P(i)$ (Fuente: esta investigación).	34
Figura 3-5: Intensidad de la señal (lámpara de Hg) en función del tiempo de integración (Fuente: esta investigación).	35
Figura 3-6: <i>RMS</i> del <i>Dresidual</i> en función del tiempo de integración (Fuente: esta investigación).	37
Figura 3-7: Barras de error del <i>RMS</i> del <i>Dresidual</i> (Fuente: esta investigación).	37
Figura 3-8: Comportamiento de la SNR en función del tiempo de integración (<i>tint</i>) (Fuente: esta investigación).	38
Figura 3-9: Espectro LED 375 nm (Fuente: esta investigación).	39
Figura 3-10 : Espectro LED 384 nm (Fuente: esta investigación).	40

Figura 3-11: Espectro de emisión de fluoresceína con LED 375nm (Fuente: esta investigación).....	41
Figura 3-12: Espectro lámpara PX-2 (Fuente: esta investigación).....	42
Figura 3-13: Espectro de emisión de fluoresceína con lámpara PX-2 (Fuente: esta investigación).....	43
Figura 3-14: Espectro de la lámpara HID-H4 (Fuente: esta investigación).	44
Figura 3-15: Espectro de emisión de fluoresceína con lámpara HID-H4, usando filtro banpass de 377 nm (Fuente: esta investigación).	44
Figura 3-16: Estructura química de la fluoresceína.	45
Figura 3-17: Montaje experimental para evaluar fluoresceína, izquierda: esquemático; y derecha: fotografía (Fuente: esta investigación).....	46
Figura 3-18: Espectros de emisión de fluoresceína a diferentes concentraciones (Fuente: esta investigación).	47
Figura 3-19: Espectros de emisión a pHs diferentes aplicando <i>Median filter</i> (Fuente: esta investigación).....	49
Figura 3-20: Comportamiento de la intensidad y la longitud de onda en función de la concentración (izquierda) y de la intensidad y el pH en función de la concentración (derecha).	51
Figura 3-21: Transmitancia relativa de fluoresceína a diferentes longitudes de onda (izquierda) y diferentes concentraciones para 470,513 nm (derecha).	52
Figura 3-22: Comportamiento de la absorbancia en función de la concentración.....	53
Figura 3-23: Representación de la hipótesis de trabajo “frente de absorción”.	54
Figura 3-24: Representación de la hipótesis de trabajo “filtrado espacial”.....	54
Figura 3-25: Variación de los espectros en función de la concentración a alrededor de 7 (izquierda) y 8 (derecha).	55
Figura 3-26: Espectros de emisión de gasolina a diferentes concentraciones (Fuente: esta investigación).	56
Figura 3-27: Variación de espectros de gasolina por efectos de filtrado espacial (izquierda) y por concentración (derecha) (Fuente: esta investigación).....	56
Figura 3-28: Intensidad de la señal en función de la mezcla gasolina-agua.	57
Figura 3-29. EEMs preliminar obtenida para la fluoresceína (Fuente: esta investigación).	58

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Aplicaciones de la técnica EEM en diferentes campos del conocimiento (Fuente: esta investigación).	14
Tabla 2-1: Especificaciones de la lámpara PX-2, marca Ocean Optics.	27
Tabla 2-2. Especificaciones de la lámpara de mercurio, marca Edmund Optics.....	27
Tabla 2-3: Especificaciones de los lentes doble convexos, marca Edmund Optics.	28
Tabla 2-4. Especificaciones de los filtros usados en el montaje experimental, marca Edmund Optics.	29
Tabla 3-1: Error a priori y a posteriori en longitud de onda del espectrómetro AvaSpec3648 (Fuente: esta investigación).	33
Tabla 3-2: Calculo de los segmentos de longitud de onda para análisis de ruido (Fuente: esta investigación).	36
Tabla 3-3: Concentraciones de fluoresceína usada para caya ensayo (Fuente: esta investigación).	46
Tabla 3-4: Concentraciones de fluoresceína teniendo en cuenta el pH (Fuente: esta investigación).	48

Resumen

La contaminación de aguas superficiales y subterráneas por hidrocarburos es uno de los mayores problemas ambientales, particularmente para países productores como Colombia. Las estadísticas de derrames accidentales de petróleo y sus derivados en Colombia son alarmantes (50 mil barriles durante 2015), esto exige la aplicación de procedimientos operacionales y de emergencia encaminados a minimizar y mitigar la contaminación de cuerpos de agua. Siendo necesario el monitoreo *in situ* en tiempo real de la contaminación por hidrocarburos.

Esta investigación presenta los resultados obtenidos al usar la técnica EEMs para determinar contaminantes en agua por medio del desarrollo y evaluación de un prototipo a partir de la visualización de los requerimientos de un futuro instrumento portátil, robusto, automático y con potencial comercial para la medición *in situ*, en tiempo real y de bajo costo de hidrocarburos en aguas superficiales y subterráneas. Para esto se empezó con la evaluación de la viabilidad de la técnica a nivel laboratorio, usando un fluoróforo estándar de características conocidas (fluoresceína sódica al 10%), la cual fue preparada a diferentes concentraciones. Se verificó la relación existente entre la intensidad de los espectros de emisión con la concentración del fluoróforo en las diferentes muestras, al igual que la dependencia de la intensidad con el pH de la solución.

El sistema de detección fue probado con fuentes de luz diferentes, empleando LEDs, lámpara de Xe pulsada (PX-2) y continua (HID-H4); utilizando filtros pasa banda (320, 365, 377, 400, 436 y 568 nm) montados sobre un carrusel de filtros. Estas fuentes de luz comparten un sistema de lentes para la proyección de haz incidente sobre una celda de fluorescencia; y para la captación de luz fluorescente. Los espectros de excitación y emisión son medidos con una fibra óptica unida a un mini-espectrómetro (AvaSpec-3648, Avantes). El prototipo ha sido capaz de detectar hasta 1 ppb para el caso de la fluoresceína, con una señal a ruido (SNR) desde 50 hasta 1000.

Palabras clave: Agua superficial, contaminación por hidrocarburos, espectroscopia de matriz de excitación-emisión, diodos emisores de luz (LEDs), lámpara Xe, desarrollo de instrumentos, razón señal a ruido (SNR).

Abstract

Contamination of surface and groundwater by hydrocarbons is one of the major environmental problems, particularly for producing countries such as Colombia. The statistics of accidental spills of oil and its by-products in Colombia are alarming (50 thousand barrels during 2015), which requires the application of operational and emergency procedures aimed at minimizing and mitigating pollution of water bodies. In-situ monitoring of oil pollution is necessary.

This research presents the results obtained using the EEMs technique to determine contaminants in water by means of the development and evaluation of a prototype from the visualization of the requirements of a future portable instrument, robust, automatic and with commercial potential for the measurement *in situ*, real-time and low-cost of hydrocarbons in surface and groundwater. For this, we began evaluating the viability of the technique at the laboratory level, using a standard fluorophore of known characteristics (sodium fluorescein 10%), which was prepared at different concentrations. The relationship between the intensity of the emission spectra and the fluorophore concentration in the different samples was verified, as was the intensity dependence with the pH of the solution.

The pulsed (PX-2) and continuous (HID-H4) Xe lamp system uses bandpass filters (320, 365, 377, 400, 436 and 568 nm) mounted on a filter carousel. These light sources share a lens system for incident beam projection on a fluorescence cell, and for capturing fluorescent light. Excitation and emission spectra are measured with an optical fiber attached to a mini-spectrometer (AvaSpec-3648, Avantes). The prototype has been able to detect up to 1 ppb for the case of fluorescein, with a signal to noise (SNR) from 50 to 1000.

Keywords: Surface water and groundwater, hydrocarbon pollution, excitation-emission matrix spectroscopy, light emitting diodes, Xe lamp, instrument development, signal to noise reason.

Introducción

La contaminación de aguas superficiales y subterráneas por hidrocarburos es un problema ambiental local, regional y global que afecta directamente los ecosistemas, su productividad y servicios ambientales, e indirectamente el bienestar y la salud humana, p.e. comprometiendo el suministro de agua potable. Esta contaminación puede ser puntual o sistemática. En este último caso, el cuerpo de agua es contaminado durante periodos prolongados por uno o varios pequeños efluentes contaminados con hidrocarburos. Por tanto, la identificación de las fuentes y la determinación de su toxicidad dependerán de los hidrocarburos vertidos y las mezclas resultantes.

Tanto los grandes derrames como la suma de pequeñas fugas y derrames accidentales de petróleo crudo y sus derivados contribuyen a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. En Colombia, en 2015, el número de incidentes aumento con respecto a los años 2013 y 2014, y se convirtió en una de las tragedias ambientales más preocupantes que Ecopetrol ha enfrentado, en donde 50 mil barriles fueron derramados a cuerpos de agua y suelos principalmente en los departamentos de Putumayo, Nariño, Arauca y Norte de Santander; afectando a los ríos Mira, Caunapí, Rosario, Tibú y Catatumbo, debido a atentados terroristas en la infraestructura (Ecopetrol, 2015).

En este contexto, es por tanto imperativo que se desarrollen y apliquen procedimientos operacionales y de emergencia que minimicen y mitiguen la contaminación ambiental por actividades de producción, refinación y transporte de petróleo y sus derivados. Estos procedimientos requieren de la identificación, medición y el monitoreo de la contaminación por hidrocarburos y de la determinación de las fuentes de emisión.

Es así como la técnica de matriz de excitación emisión -EEM- (excitation-emission matrix) ha sido usada para la detección y análisis de la contaminación de ríos (Baker, 2002), aguas subterráneas (Pharr, 1992), aguas costeras (Coble, 1996; Muroski, 1996), y para la

detección de combustibles adulterados (Patra & Mishra, 2002). La mayoría de estas investigaciones fueron llevadas a cabo con espectrómetros de fluorescencia clásicos de laboratorio, los cuales usan una fuente de luz policromática (p.e. una lámpara de Xe de alta presión) seguida de un monocromador o un sistema de filtros ópticos para producir un haz monocromático de excitación. Este tren óptico adiciona complejidad y peso al fluorímetro.

Otros sistemas aún más complejos y costosos usan láseres, particularmente para mediciones LIDAR aeroportadas (Brown & Fingas, 2003). El desarrollo reciente de diodos emisores de luz (LED) a longitudes de onda ultravioleta (UV) tan bajas como 210 nm (Taniyasu, 2006), y su rápida disponibilidad comercial (Wallace, 2006), ha motivado el desarrollo de fluorímetros LED (Hart & JiJi, 2002). El uso de LEDs en EEMs simplifica el sistema óptico y optoelectrónico (no requieren altos voltajes de arranque), disminuye el consumo de energía (alta eficiencia de conversión energética) y el costo del fluorímetro, y lo hace portable. Además, los LEDs tienen vidas prolongadas (> 50 mil horas), textura espectral muy suave, un nivel de ruido bajo comparado con lámparas halógenas y permiten operación pulsada debido a su muy reducido tiempo de arranque (Araki & Misawa, 1995). El uso de LEDs en conjunto con espectrómetros miniatura potencializa el desarrollo de fluorímetros de bolsillo.

Por lo anterior, el objetivo general de esta investigación es *desarrollar y evaluar un prototipo instrumental de laboratorio y la técnica analítica asociada para la detección, identificación espectral y cuantificación de fluoróforos puros o en fase acuosa, mediante espectroscopia de matriz de excitación-emisión.*

Por su parte, los objetivos específicos que se han desarrollado son:

1. Diseñar conceptualmente y de forma detallada el sistema de medición prototipo (hardware y software de adquisición de datos y control instrumental) y la técnica de medición (procedimiento de medición espectral y análisis quimiométrico), a partir de la visualización de los requerimientos de un futuro instrumento portátil, robusto, automático y con potencial comercial para la medición in situ, en tiempo real y de bajo costo de hidrocarburos en aguas superficiales y subterráneas.

2. Desarrollar e integrar los subsistemas que componen el sistema de medición: fuente de potencia, fuente de luz, celda de fluorescencia, mini-espectrómetro y software para el análisis y reducción de datos espectrales por quimiometría.

3. Evaluar y calibrar la respuesta espectral del instrumento sobre rangos amplios de concentración a partir ensayos controlados con compuestos orgánicos diluidos en fase acuosa y combustibles líquidos colombianos.

4. Identificar y cuantificar efectos secundarios de la matriz acuosa en la espectroscopia de fluorescencia, tales como pH.

Finalmente, es importante resaltar que algunos resultados parciales de esta investigación han sido presentados en los siguientes eventos nacionales e internacionales:

- *13th Conference on Methods and Applications of Fluorescence*: Poster “Developing a portable, low-cost LED and pulsed Xe lamp based fluorometer for hydrocarbon contamination detection and quantification”, 2013
- *VI Coloquio de ingenieros químicos UN*: Ganador en el concurso de poster, con el trabajo “Developing a portable, low-cost LED and pulsed Xe lamp based fluorometer for hydrocarbon contamination detection and quantification”, 2013.
- *VII Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental. XII Encuentro de Química Analítica y Ambiental*: Ponencia “Desarrollo de un prototipo instrumental con potencial para el análisis de la contaminación de aguas por hidrocarburos mediante EEMs”, 2014.

1. Marco Teórico

1.1 Fundamentos

El fenómeno de la fluorescencia fue reportado por primera vez por N. Monardes en el año de 1565 (Harvey, 1957; Valeur, 2001). Posteriormente se realizaron experimentos simples con sustancias como sulfato de quinina usando como fuente de excitación la luz solar, y como filtros, vasos de vidrio, (Lakowicz, 2006; Stokes, 1852);. Estos experimentos llevaron a la identificación y reporte del fenómeno de fluorescencia, el cual fue en ese momento denominado “reflexión dispersiva”, debido a la característica de dispersión de la luz emitida a longitudes de onda más largas. Fue en su siguiente publicación que Stokes (1852) utilizó la palabra fluorescencia por primera vez para describir el fenómeno.

La luminiscencia es un fenómeno de liberación de energía desde un estado excitado al estado de baja energía o relajación de una molécula. Dependiendo de la naturaleza del estado excitado el fenómeno puede ser fluorescencia o fosforescencia (Lakowicz, 2006).

El estado electrónico de una molécula está referido a las propiedades de todos los electrones en todos sus orbitales. La forma en que una molécula absorbe energía es por medio de un proceso mecánico cuántico, donde una molécula es transformada de un estado basal a un estado excitado. En los átomos la absorción involucra la promoción de un electrón de una capa orbital externa hacia un orbital vacío de mayor energía. En moléculas, un electrón es promovido del mayor orbital molecular ocupado (HOMO, *highest occupied molecular orbital*), al menor orbital molecular desocupado (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*). Cuando un electrón en una molécula es movido de un orbital a otro, cambia el estado de la molécula y entonces también es importante considerar los estados de la molécula involucrados.

Existe sólo un estado basal para una molécula dada. Sin embargo, hay diversos estados excitados posibles aún para moléculas muy simples, y la naturaleza exacta de los cuales depende de los tipos de orbitales involucrados (Martínez & Moctezuma, 2006).

Los estados electrónicos se pueden agrupar en dos grandes categorías: estados *singlet* (Si) y *triplet* (Ti). En el estado excitado *singlet*, un electrón en un orbital excitado está apareado (spin opuesto) a un segundo electrón en un orbital en el estado basal, es decir, todos los electrones en la molécula tienen sus *spins* apareados. De modo que, el regreso al estado basal es permitido por el *spin* y ocurre rápidamente por emisión de un fotón. Este es el caso de la fluorescencia, y las velocidades de emisión de ésta son típicamente de 10^8 s^{-1} , por lo que la vida media de la fluorescencia es cercana a 10 ns (10^{-9} s).

Por su parte, los estados excitados *triplet* son aquellos en los cuales un par de electrones tiene sus *spins* desapareados, es decir, el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación que un electrón en el estado basal. La transición al estado basal es impedido y las velocidades de emisión son lentas ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$), tal que la vida media es típicamente de milisegundos a segundos. Este es el caso de la fosforescencia. (Lakowicz, 2006; Martínez & Moctezuma, 2006).

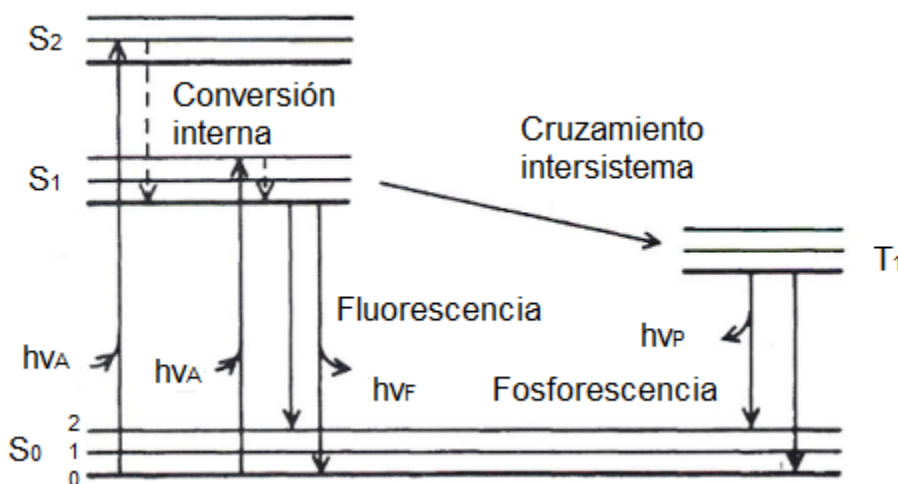
La forma más directa para la promoción de un electrón es que la molécula absorba un fotón de la energía apropiada. La diferencia de energía entre los dos estados corresponderá a la energía del fotón absorbido, $\Delta E = hc/\lambda$, donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz en el vacío y λ es la longitud de onda de la luz.

A temperatura ambiente, la energía térmica no es adecuada o suficiente para poblar significativamente los estados excitados, y por esta razón se usa luz y no calor para inducir fluorescencia.

Los procesos que ocurren entre la absorción y emisión de luz se ilustran por el diagrama de Jablonski (Figura 1-1). Los estados *singlet*, primero y segundo estado electrónico son nombrados como S_0 , S_1 y S_2 respectivamente. Cada uno de los estados electrónicos, excitado o basal, tiene un número de niveles vibracionales 0, 1, 2, 3, 4, etc. Los niveles vibracionales explican que una molécula en un estado electrónico puede absorber

pequeños incrementos de energía, aunque mantiene la misma configuración electrónica. La conversión interna ocurre cuando un electrón vuelve al nivel bajo de los estados excitados de S_1 o S_2 después de haber estado en los niveles vibracionales altos. Por lo general la fluorescencia ocurre desde el nivel menor de S_1 hasta el estado S_0 . Finalmente los electrones en el estado S_1 pueden experimentar una conversión de spin al primer estado T_1 , llamado cruzamiento intersistema. Luego la emisión desde T_1 es llamada fosforescencia y ocurre a mayores longitudes de onda comparada con la fluorescencia (Lakowicz, 2006).

Figura 1-1: Diagrama de Jablonski (Lakowicz, 2006).



1.1.2 Técnica de espectroscopia de matriz de excitación emisión (EEM)

La técnica de análisis por medio de fluorescencia se desarrolló a mediados de los años 1930 y su crecimiento se dio con la invención de los tubos fotomultiplicadores en los años 1940 (Turner, 1964). Este avance de tecnología permitió la medición de intensidades de luz bajas, lo cual es característico de las mediciones de emisión de fluorescencia.

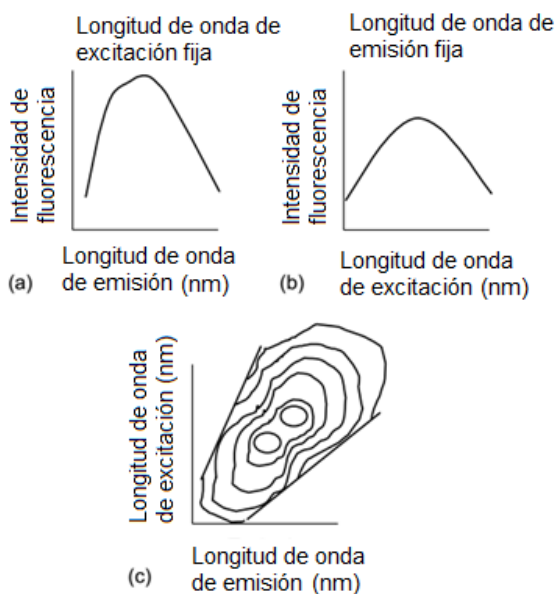
Las matrices de excitación-emisión (EEMs) son una técnica de fluorescencia de gran alcance, desarrollado por primera vez en la década de 1980 (Hershberger, 1981; Kallir,

1986), que permite la toma de huellas dactilares y la medición cuantitativa de sustancias que contienen fluoróforos.

La IUPAC¹ define la matriz o “espectro” de excitación-emisión (excitation-emission matrix or spectrum) como el espectro tridimensional generado por el escaneo de la longitud de onda del espectro de emisión a pasos incrementales de longitud de onda de excitación, en donde, la abscisa es la longitud de onda de emisión, la ordenada es la longitud de onda de excitación y el eje z es flujo de emisión. Éste espectro es particularmente útil para la investigación de muestras con más de una especie emisora.

Una EEM es un gráfico de contorno de dos dimensiones que muestra las intensidades de fluorescencia como una función de un rango de longitudes de onda de excitación y emisión. Cada contorno representa puntos de igual intensidad de fluorescencia (Ramanujam, 2000). La Figura 1-2 ilustra un espectro de emisión de fluorescencia (a), un espectro de excitación de fluorescencia (b) y una EEM de fluorescencia (c).

Figura 1-2: Ejemplo de (a) un espectro de emisión, (b) un espectro de excitación y (c) una EEM de una molécula (Ramanujam, 2000).



¹ Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

1.2 Instrumentos desarrollados

1.2.1 Avances en espectrofluorómetros clásicos

Las matrices de excitación-emisión (EEMs) son comúnmente obtenidas con espectrofluorómetros clásicos de alta resolución. El tren de excitación-emisión de estos instrumentos generalmente incluye una lámpara de arco potente (lámpara de Xe de alta presión ~150-450 W), un monocromador de emisión (con rejillas, tipo Czerny-Turner), una celda o cubeta (en donde va la muestra a analizar), un monocromador de detección y un detector de un solo canal de alta sensibilidad (fotomultiplicador con rango ~ 200 a 850 nm). En el Anexo A se muestra la información completa de algunos equipos de uso comercial que han sido desarrollados en los últimos años.

Estos instrumentos proporcionan una alta precisión y resolución para las EEMs pero son lentos (~ 4 min por espectro de fluorescencia, ~ 2 min por EEM), costosos (~ 3.000 – 50.000 USD), pesados (~ 36 kg), y voluminosos, además de que las muestras deben ser recogidas en el sitio de la contaminación y llevadas al laboratorio, dependiendo de factores como distancia y condiciones ambientales (temperatura y presión) (Fabila *et al.*, 2011).

1.2.2 Avances en el desarrollo de espectrómetros portátiles

Han sido muchas las técnicas usadas para la identificación de hidrocarburos como por ejemplo cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), entre otros (Hershberger, 1981; Harvey, 1957), de igual forma existen varios métodos estándar (ASTM D3328-78, D3650-78 y D3414-79), la mayoría de las técnicas y métodos han sido desarrollados para analizar las muestras en laboratorio, y por lo general los sistemas usados son grandes y voluminosos, y en ocasiones se emplean marcadores moleculares, es decir componentes del petróleo original (p.e. alcanos isoprenoides, esteranos, fenantrenos, dibenzotiofenos).

Es así como las múltiples aplicaciones de la fluorescencia por espectroscopia han avanzado en gran medida hacia el desarrollo de equipos portátiles que puedan ser utilizados en campo (análisis *in situ*). Es importante y necesario para detección de diferentes contaminantes pasar de un instrumento de banco a uno portable que pueda ser

llevado al lugar del análisis en cuestión. Grandes esfuerzos han sido realizados en este sentido, tal es el caso de Alarie *et al.* (1993) quienes lograron desarrollar un equipo portátil el cual lo uso para la medición de trazas de algunos contaminantes peligrosos, por ejemplo los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) y los Policlorobifenilos (PCB), compuestos heterocíclicos, algunos metales (p.e. uranio) o complejos metálicos fluorescentes; y/o el análisis de aguas subterráneas. Este equipo tenía un peso de 22 kg y estaba conformado por dos monocromadores, fotomultiplicador, y una lámpara de arco de xenón. Básicamente consta de tres partes: 1) la unidad de control en donde está la óptica y electrónica necesaria, 2) la batería que suministra la potencia y 3) el laptop que permite el control del instrumento y el almacenamiento y análisis de los datos.

Algunos avances posteriores enfocados a reducir el tamaño y mejorar la portabilidad son los mostrados por (Obeidat *et al.*, 2008), quienes desarrollaron un espectrómetro LED² portable. En comparación con el instrumento anterior, este pesa tan solo 11 kg y usa un sistema de múltiples LEDs de modo que no es necesario el uso de monocromadores ni tampoco la lámpara de xenón. Además de probarlo con diferentes fluoróforos (rodamina 6G, rodamina B, riboflavina fluoresceína) y sus mezclas (rodamina 6G y fluoresceína), también se usaron extractos de alimento animal. Estas muestras han sido analizadas usando EEMs. A este equipo se le acoplo un detector en conjunto con un graficador de espectros. Las muestras fueron excitadas principalmente con luz LED que abarca esencialmente el rango visible (380-700 nm). Las muestras analizadas con este instrumento fueron también comparadas con un Fluorómetro de banco comercial (Varian, modelo Cary Eclipse) equipado con una lámpara de xenón pulsada (80 Hz) y un fotomultiplicador (Hamamatsu, modelo R928).

Por su parte Hart & JiJi (2002) también fueron capaces de desarrollar un equipo de menor tamaño semi-portable y de bajo costo, usando LEDs y logrando cuantificar e identificar correctamente el anión y dianión de la fluoresceína, para lo cual los espectros resultantes de EEM fueron tratados por el método de análisis factorial paralelo (PARAFAC). La

² Diodo emisor de luz, también conocido como LED (por su acrónimo del inglés, *light-emitting diode*).

configuración constaba del arreglo de LEDs, lentes, la celda con la muestra, lentes nuevamente, y un CCD³.

En otros campos como la medicina, también se han hecho esfuerzos para mejorar la portabilidad en equipos para mediciones de fluorescencia, tal es el caso de (Fabila *et al.*, 2011) quienes lograron diseñar un equipo para diferenciación entre la emisión de tejido cerebral afectado por tumores del tipo Glioblastoma Multiforme (GBM), que es el cáncer de cerebro más agresivo, y tejido cerebral sano; haciendo uso de LEDs, una fibra óptica bifurcada que permitía con un extremo inyectar la luz sobre tejido vivo, y con el otro captar la señal de fluorescencia.

1.2.3 Aplicaciones

La técnica de EEM ha sido aplicada en varios campos, entre los que sobresalen investigaciones y trabajos realizados para la caracterización de aguas residuales, calidad y monitoreo del agua en plantas de tratamiento, determinación de contaminantes como hidrocarburos o aceites en cuerpos de aguas, adulteraciones de hidrocarburos, alimentos y bebidas, entre otras. En la Tabla 1-1 se presentan las diferentes aplicaciones de acuerdo a las temáticas y los autores que han llevado a cabo las investigaciones.

En **contaminación de aguas** hay estudios relacionados con la caracterización del petróleo derramado (p.e el accidente del Deepwater Horizon, Golfo de Mexico) y de sus vías de degradación, al igual que la caracterización de sus derivados. Estos estudios han sido llevados a cabo usando muestras preparadas y controladas en laboratorio, así como muestras naturales de aguas marinas, incluso de muestras obtenidas de las plumas de las aves que han estado en contacto con derivados del petróleo; logrando la identificación de los contaminantes a través, en todos los casos, de EEMs seguido de un análisis de factores paralelos (PARAFAC).

También se ha usado la espectroscopia de fluorescencia cuando hay incidentes de derrames, esto con el fin de identificar la fuente causante de la contaminación, los cuales debieran hacerse responsables de las labores de limpieza y mitigación. Gracias a la “*huella*

³ Dispositivo de carga acoplada (por su acrónimo del inglés, charge coupled device).

dactilar” propia de cada contaminante, esta puede ser comparada con las diferentes fuentes e identificar de donde proviene. Este método fue usado en la costa este de Sudáfrica, en donde han ocurrido varios episodios de derrames de crudo, y se ha logrado determinar una buena correlación entre las fuentes y los contaminantes encontrados, teniendo en cuenta que el contaminante puede sufrir pequeños cambios en su composición original debido a efectos de evaporación, oxidación y fotólisis (Mason & Kerley, 1988).

De igual forma, una de las principales aplicaciones de la espectroscopia de fluorescencia es el **monitoreo de la calidad del agua**. La técnica ha demostrado su selectividad y sensibilidad en las mediciones en diferentes cuerpos de agua, permitiendo el análisis y caracterización de diferentes parámetros y diferentes analitos. En casos relacionados con la industria del petróleo, el monitoreo de la dispersión del crudo permite obtener información del impacto inmediato de la contaminación originada, así como un análisis preliminar de las características del hidrocarburo disperso en el agua, también ha sido estudiado el monitoreo de los vertimientos industriales. La evaluación de la calidad del agua requiere una medición y caracterización selectiva y rápida, de lo cual el uso de la información obtenida a partir de los EEM se ha constituido como una herramienta viable en vertimientos industriales y aguas residuales que permite el estudio de las características de calidad de los diferentes cuerpos de agua.

En cuanto a la **adulteración** en alimentos, se han hecho investigaciones relacionadas con la calidad del aceite de oliva, el cual puede ser adulterado agregando aceites de menor calidad; de forma similar se ha usado la EEMS para la determinación de diferentes tipos de aceite, siendo un método fácil y comparativamente económico para este sector productivo. Cabe resaltar que se ha logrado asociar las intensidades a ciertas longitudes de onda con el estado de oxidación (estabilidad) de los aceites, así como el agrupamiento de forma natural (virgen, puro y orujo) dependiendo del resultado de EEMs de los tipos de aceites.

Por su parte, en bebidas ha sido posible la identificación de adulteración por adición de etanol y agua, usando EEMs en conjunción con PARAFAC y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), obteniéndose valores del error cuadrático medio de alrededor de 2% en ambos casos.

Finalmente, también se han desarrollado aplicaciones en otros campos, como por ejemplo medicina y biología, que valen la pena mencionar. Se reportan investigaciones en el análisis de la fluorescencia para el diagnóstico de enfermedades en tejidos *in vivo* (Chung et al., 1994), así como para la caracterización de tejidos cancerosos o enfermos (DaCosta et al., 2003), (Neves, Fernandes de Araújo, Luiza Cabral de Sá Leitão Oliveira, Antunes de Araújo, & de Lima, 2014), (Wu, Gayen, & Xu, 2014), en la caracterización de organismos patógenos tipo bacterias presentes en los humanos (Dartnell, Roberts, Moore, Ward, & Muller, 2013), (Richards-kortum, 1995) y en la identificación de organismos presentes en reservorios de agua potable (Ziegmann, Abert, Müller, & Frimmel, 2010).

Tabla 1-1: Aplicaciones de la técnica EEM en diferentes campos del conocimiento (Fuente: esta investigación).

Temas	Subtema	Analitos/Propiedades	Resultados/Logros	Referencias
Contaminación de aguas	Caracterización de la degradación del petróleo	Crudo en condiciones de laboratorio controladas	Se determinó un tiempo de vida media de 20 días de degradación para los HC y su relación con el carbón orgánico disuelto. De igual forma se proporcionó huellas para diferentes productos derivas del petróleo y sus concentraciones.	(Zhou, Liu, & Guo, 2013), (Alostaz, Donahue, Hall, & Biggar, 2008)
	Caracterización del petróleo y sus componentes provenientes del Deepwater Horizon	Crudo en agua marina, Golfo de México	Se diferenciaron 3 componentes diferentes de petróleo y su relación con la materia orgánica disuelta marina, ayudando a rastrear el destino y transporte del petróleo	(Zhou, Guo, et al., 2013)
	Caracterización de huellas de fluorescencia UV del petróleo en aguas marinas	Crudo en agua marina, más solvente Corexit	Caracterización de huellas de contaminantes y mejoramiento de la fluorescencia usando dispersante Corexit. Caracterización de contaminantes con un límite de detección considerable: estireno 11 ppb y naftaleno 8 ppb.	(Bugden, Yeung, Kepkay, & Lee, 2008), (Booksh, Muroski, & Myrick, 1996), (Muroski, Booksh, & Myrick, 1996)
	Análisis simultaneo mediante un método fluorimetrico sincrónico	HAP en solución de metanol y acetonitrilo	Análisis simple y rápido, evitando un pretratamiento de datos, resuelve gran cantidad de datos y no requiere una gran cantidad de solución para la calibración.	(Patra & Mishra, 2001a, 2002)
	Identificación de crudo derramado	Crudo en plumas de pájaros	Se comparó los espectros de los contaminantes con los de posibles fuentes.	(Mason & Kerley, 1988)
Monitoreo y calidad del agua	Medición de la dispersión de crudo	Crudo y dispersantes	Análisis de la dispersión de hidrocarburos en aguas marítimas por información obtenida de la técnica de matriz de excitación emisión (EEMS)	(Bugden et al., 2008)
	Análisis de materia orgánica disuelta en agua	Materia orgánica disuelta	Caracterización y monitoreo de materia orgánica disuelta en agua en agua residual utilizando EEMS	(Chen, Westerhoff, Leenheer, & Booksh, 2003), (Lapworth, Goody, Butcher, & Morris, 2008), (Thoss, Baird, & Lock, 2000)
	Evaluación de calidad del agua	Materia orgánica disuelta y demanda bioquímica de oxígeno	Medición en aguas residuales, vertimientos industriales utilizando equipos portables con detección en línea	(Hudson et al., 2008), (Hambly et al., 2010), (Lapworth, Goody, Allen, & Old, 2009)

Temas	Subtema	Analitos/Propiedades	Resultados/Logros	Referencias
	Detectores para monitoreo de sistemas de aguas	Materia orgánica disuelta y demanda bioquímica de oxígeno	La espectroscopia de fluorescencia constituida como una herramienta potencial en monitores debido a su sensibilidad y selectividad analítica.	(Henderson et al., 2009), (Kellerman, Kothawala, Dittmar, & Tranvik, 2015)
	Algoritmos para visualización y análisis de EEMS	Monitoreo en aguas residuales	Software de uso libre para la visualización y análisis de datos EEMS.	(Dan J. Lapworth & Kinniburgh, 2009)
	Caracterización de carga biológica en aguas residuales	Material residual biodegradable	El método permite la visualización de substratos fluorescentes y por medio de métodos numéricos (PARAFAC) su identificación.	(Esparza-Soto, Núñez-Hernández, & Fall, 2011)
	Predicción de Carbón orgánico disuelto (DOC) en aguas continentales.	Carbón orgánico disuelto.	Predicción de la cantidad de aguas residuales como función de las respuestas de fluorescencia medidas en los ríos.	(Goldman, Rounds, & Needoba, 2012), (A. Baker, 2001), (Guo et al., 2010)
	Regiones de excitación emisión en cuerpos de agua	Sustancias húmicas, tirosina, triptófano	Caracterización de las regiones de excitación y emisión en diferentes cuerpos de agua.	(Coble, 1996), (Baker et al., 2004), (Pingqing, Fengchang, & Congqiang, 2004)
	Fluorescencia en residuos agrícolas	Sustancias húmicas, fúlvicas, tirosina, triptófano	Aplicación de la técnica de EEMS para medición de la contaminación aguas residuales de origen agrícola	(Baker, 2002)
Detección y adulteración	Adulteración y caracterización de aceites	Aceite de oliva, diferentes tipos de aceite españoles	Detección de adulteración de aceites de oliva por adición de otros aceites vegetales, discriminación de diferencias entre aceites por medio de Análisis de Componentes Principales (PCA), discriminación del origen del aceite por el método de regresión de mínimos cuadrados parciales (DU – PLSR).	(Nikolova et al., 2013), (Guimet, Boqué, & Ferré, 2004), (Guimet, Ferré, Boqué, Vidal, & Garcia, 2005), (Guimet, Ferré, & Boqué, 2005), (Kongbonga, 2011)
	Adulteración de licores	Licor de manzana	Detección de adulteración de licores por medio del contenido de etanol o de agua.	(Jakubíková, Sádecká, & Májek, 2015)
	Mejoramiento de propiedades fluorescentes en aceites	Aceite de oliva	El proceso de dopaje mejora la fluorescencia del aceite de oliva, intensificando la intensidad del pico de fluorescencia correspondiente a la vitamina E	(Saiof & Hamza, 2013)

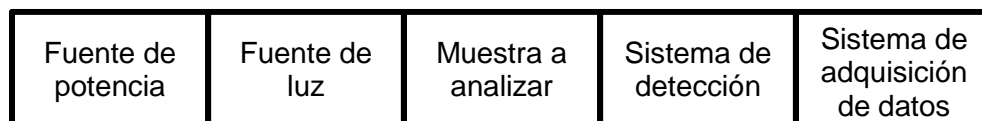
2. Metodología

2.1 Diseño conceptual

Para la detección de la señal de fluorescencia es necesario como primera instancia el desarrollo de un diseño conceptual, con sus implicaciones inherentes (p.e. elementos mecánicos, ópticos y accesorios adicionales), que permita obtener resultados confiables y reproducibles.

En este sentido, para esta investigación en particular el sistema de medición de EEMs está compuesto por 5 subsistemas: fuente de potencia, fuente de luz, muestra a analizar, sistema de detección y sistema de adquisición de datos espectrales, como se puede apreciar en la Figura 2-1.

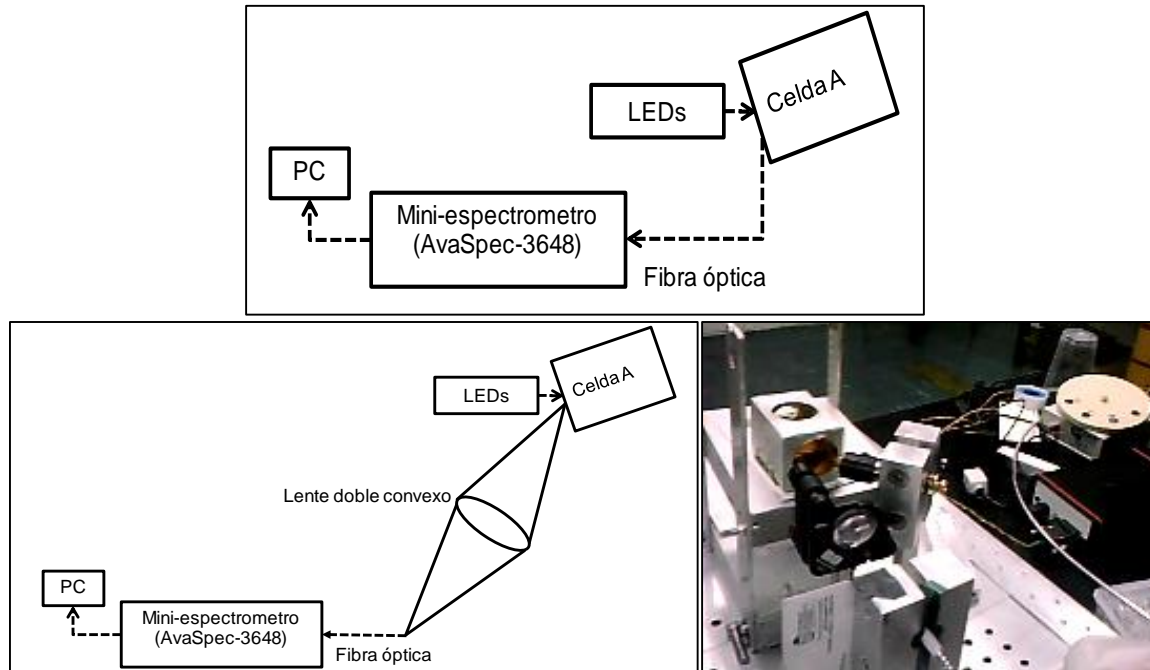
Figura 2-1: Diseño conceptual del sistema de medición de EEMs. (Fuente: esta investigación).



El diseño conceptual permitió la visualización de cada uno de los requerimientos del sistema de medición de EEMs, es por ello que, y teniendo en cuenta el factor económico, se desarrollaron varias alternativas para tal fin.

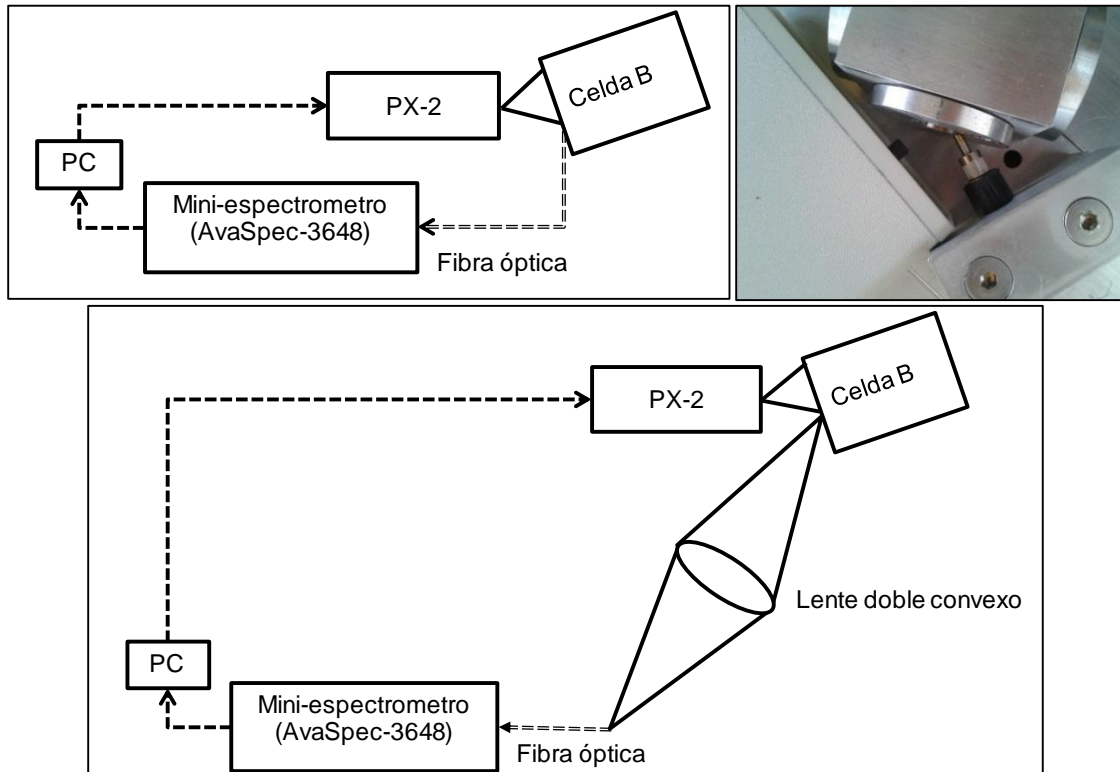
El primer sistema desarrollado usó como fuente de potencia una corriente continua (batería LEDs), como fuente de luz los LEDs, la muestra a analizar se depositó en celdas construidas en aluminio (Celda A), y como sistemas de detección y de adquisición, el espectrómetro AvaSpec 3648 y el software AvaSoft acoplado a este; en la sección 2.2 *Diseño y fabricación del sistema optomecánico* se describen cada uno de los equipos y componentes (ver Figura 2-2).

Figura 2-2: Esquemático sin lente (superior), esquemático con lente (inferior derecha) y fotografía (inferior izquierda) del primer montaje experimental usado para los ensayos (Fuente: esta investigación).



En el segundo sistema, se realizó una variación de la fuente de luz, usando para esto una lámpara de xenón pulsada, la cual es controlada desde el computador (PC), siendo esta la fuente de potencia de corriente continua, de igual forma se cambió la celda (Celda B). Los demás componentes se mantienen constantes (ver Figura 2-3).

Figura 2-3: Esquemático sin lente (superior izquierda), esquemático con lente (inferior) y fotografía (superior derecha) del segundo montaje experimental usado para los ensayos (Fuente: esta investigación).

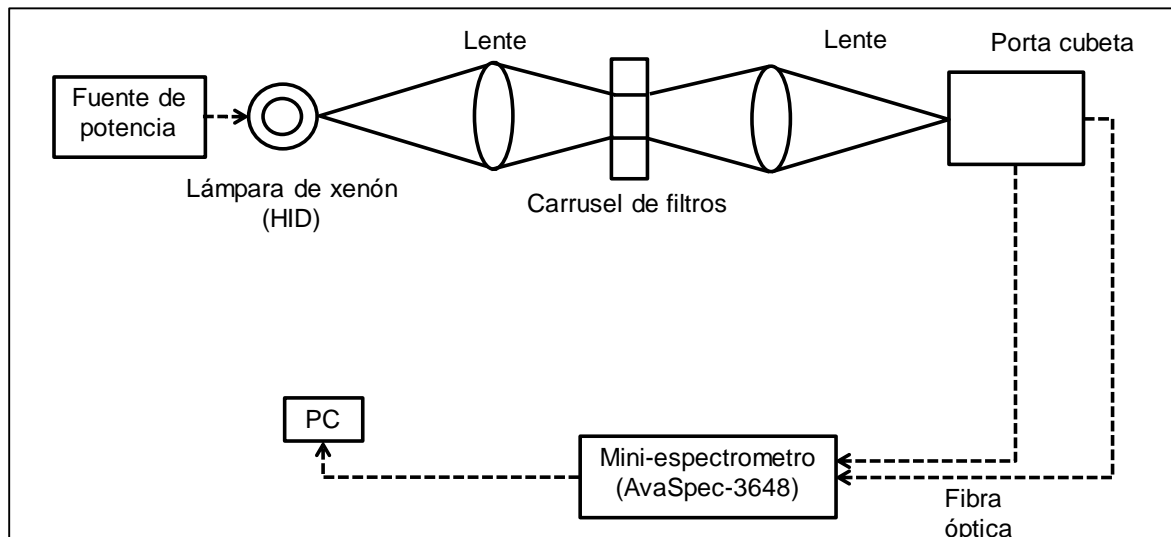


Las anteriores configuraciones, como se observa en las fotografías, tienen la particularidad que capturan la señal en el mismo lado de la celda (Celda A y Celda B), en donde se encuentra la muestra, es decir que se realiza una medición por reflexión, de modo que la probabilidad de tener contaminación en el espectro de emisión por la señal de excitación es mayor, provocando una baja relación señal a ruido (*ver sección 3.1.3 Caracterización ruido y SNR*).

Teniendo en cuenta lo anterior, y la evolución que se dio en cuanto a las celdas de fluorescencia (*ver sección 2.2.2 Celda de fluorescencia*), se usó finalmente un montaje como el mostrado en la Figura 2-4, en donde la fuente de potencia es alimentada con corriente alterna, y como fuente de luz se usa una lámpara de xenón con una descarga de alta densidad (HID-H4). Por su parte la celda usada es una celda de fluorescencia junto con el portacubetas; para focalizar la luz de entrada a esta celda fue necesario la utilización de lentes doble convexas, al igual que filtros pasa banda, de modo que se asegure una excitación cuasi monocromática. Estos lentes están montados sobre un carrusel de filtros

que permite la inyección de luz a diferentes longitudes de onda; todos estos componentes son descritos en la siguiente sección.

Figura 2-4: Esquemático del montaje experimental usado para los ensayos (Fuente: esta investigación).



2.2 Diseño y fabricación del sistema optomecánico.

El desarrollo del sistema optomecánico inicio con la construcción y/o adquisición de la tabla óptica, la celda de fluorescencia, los postes y sus soportes, la rueda de filtros, los soportes ópticos circulares, los lentes doble convexos, y los filtros pasa banda.

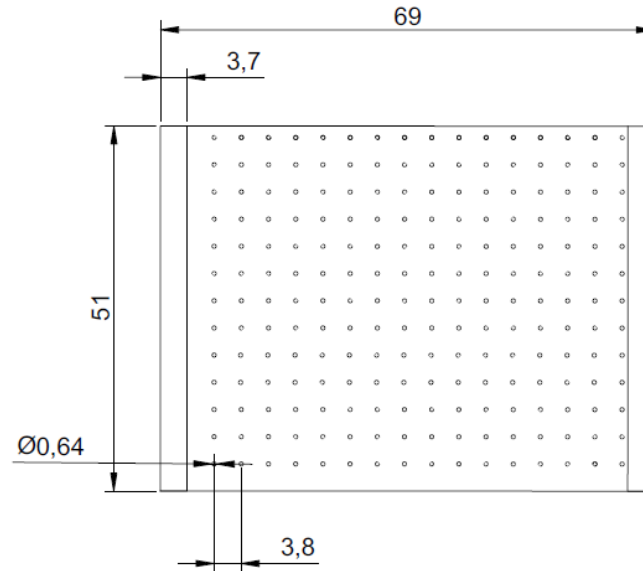
A continuación se describe cada uno de los elementos empleados en el montaje experimental.

2.2.1 Tabla óptica

Este elemento fue diseñado y elaborado en los Laboratorios de Ingeniería Mecánica de la Universidad Nacional de Colombia, en aluminio, debido a que este material presenta buenas propiedades mecánicas, térmicas, ópticas, siendo además de bajo costo y fácil mecanizado. Las medidas son 69 cm x 51 cm, entre cada orificio hay una distancia de 3,8

cm y los orificios tienen un diámetro de $\frac{1}{4}$ de pulgada (0,64 cm), como se muestra en la Figura 2-5.

Figura 2-5: Diseño de tabla óptica (Fuente: esta investigación).



Con este diseño de la tabla óptica se busca tener libertad de movimiento para desplazar todos los elementos (soportes ópticos, fuentes, filtros, entre otros) a las posiciones óptimas para capturar la señal de fluorescencia que emitan las muestras analizadas.

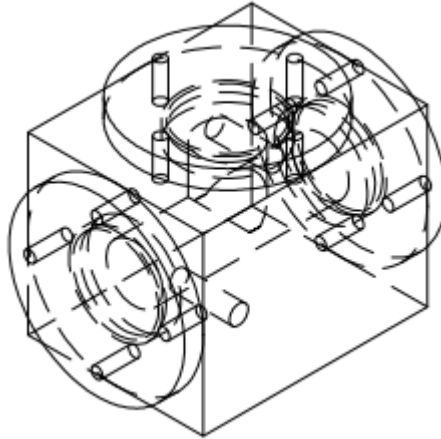
2.2.2 Celda de fluorescencia

Al igual que la tabla óptica, celdas preliminares (Celda A) también fueron diseñadas en la Universidad Nacional, en el mismo material: aluminio. Estas celdas tenían como objetivo verificar la máxima emisión de la señal de fluorescencia de las muestras (fluoresceína y gasolina comercial). Por lo cual se construyeron con una abertura en la posición perpendicular a la entrada de luz, 90° (Lakowicz, 2006; Parker & Rees, 1962). Se construyeron tres celdas, de $\frac{13}{16}$, de $\frac{1}{2}$ y de 1 pulgada, las ventanas usadas en las caras laterales eran de vidrio.

Las siguientes celdas (Celda B) fueron construidas por Fabrin Ltda., una empresa especializada en el desarrollo y fabricación piezas de gran precisión, en ella se emplearon ventanas de sílice fundida. El diámetro de los agujeros fue de 1 pulgada, y a diferencia de

las preliminares se implementó un agujero arriba y abajo con el fin de introducir con mayor facilidad la muestra dentro de la celda, como se observa en la Figura 2-6.

Figura 2-6: Celdas de fluorescencia construida por Fabrin Ltda.



Luego de algunas pruebas se pudo verificar que el camino óptico que debía recorrer tanto la luz de excitación como la señal de fluorescencia era muy largo (3 cm) y se perdía intensidad de la señal en el camino, es decir, la emisión se generaba antes de llegar al centro de la celda en donde estaba la ventana perpendicular para ser captada por la fibra, lo que obligaba a capturar la emisión por reflexión.

Por lo anterior, fue necesario reevaluar el diseño de la celda y pensar en una alternativa comercial, adquiriendo para ello una celda en cuarzo (Celda C), a la cual fue necesario acoplarle un portacubetas (marca Ocean Optics) (Figura 2-7). Este accesorio permite insertar una celda de apenas 1 cm x 1 cm, de modo que la señal generada de fluorescencia recorre un menor camino óptico y puede ser capturada su emisión de forma más sencilla, así mismo posee la ventaja que todos los lados de la celda son transparentes y permiten recoger la señal en cualquier distancia en donde se genere, a diferencia de las celdas anteriores (Celda A y B) que tenían paredes de aluminio, adicionalmente el portacubetas tiene implementados dos espejos en dos de los lados, y un lente colimado de sílice fundida (serie 74 UV) , con un diámetro de 5 mm, lo que aumenta la intensidad de la señal que es recolectada por la fibra.

Figura 2-7: Portacubetas y celda adquiridos, marca Ocean Optics.

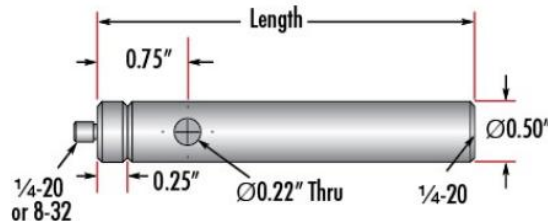


2.2.3 Postes y soportes.

Debido a que todos los elementos usados en el montaje experimental deben estar fijos y ajustados a esta, es necesario el uso de postes y sus soportes, los primeros son usados para dejar a la misma altura todos los elementos y hacer posible la alineación óptica, y los segundos para anclarlos a la tabla óptica y darle firmeza.

Al igual que en el caso de la celdas se construyeron en aluminio postes y soportes preliminares, y posteriormente se adquirieron otros para mejorar la estabilidad y manipulación (marca Edmund Optics), éstos son en acero y tienen un diámetro de $\frac{1}{2}$ pulgada y longitud de 4 pulgadas, los detalles se muestran en la Figura 2-8.

Figura 2-8: Postes adquiridos.



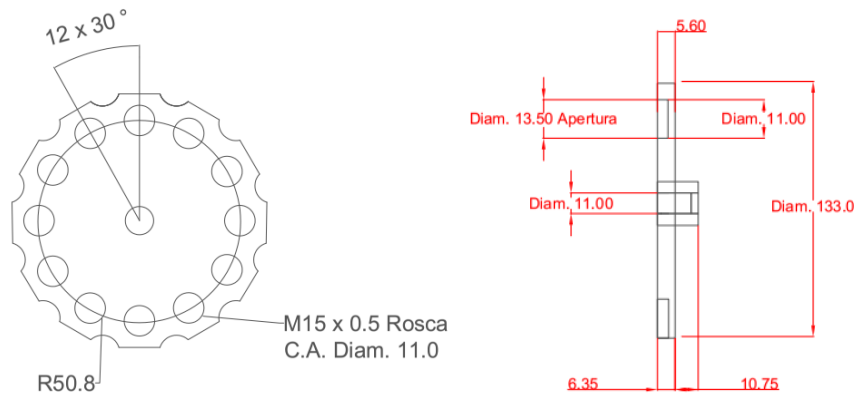
2.2.4 Fibra óptica

La fibra óptica utilizada es de $400\ \mu\text{m}$ y tiene una longitud de 2 m, con un rango entre 200 y 800 nm, FC UV400, marca Avantes.

2.2.5 Rueda de filtros

Teniendo en cuenta que se parte de una fuente policromática (PX-2 o HID-H4), es necesario el uso de filtros para dejar pasar solo ciertas longitudes de onda de interés, para lo cual es primordial la implementación en el montaje de una rueda de filtros para mejorar y hacer el cambio de filtros de forma eficaz (Figura 2-9). Este accesorio tiene la capacidad para albergar 12 filtros de $\frac{1}{2}$ pulgada, lo cual es ideal para estimular la muestra en diferentes longitudes de onda y la posterior generación de la superficie espectral.

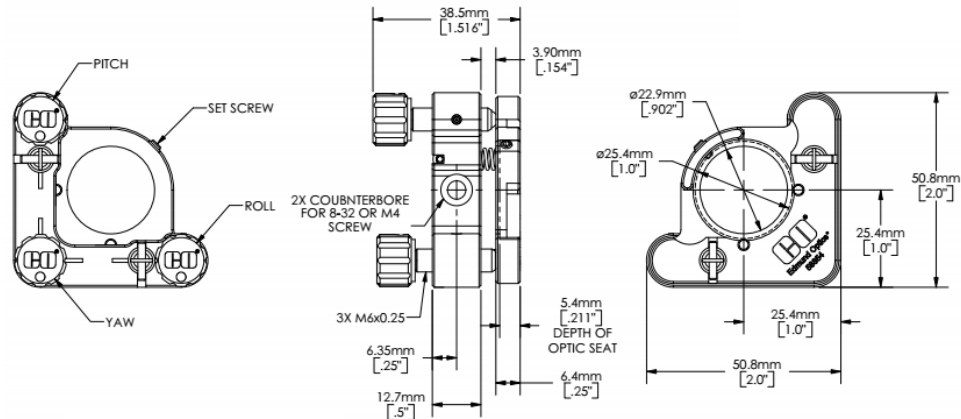
Figura 2-9: Rueda de filtros, marca Edmund Optics. Derecha: vista perfil. Izquierda: vista frontal.



2.2.6 Soportes ópticos circulares (kinematic mounts)

Los soportes ópticos para los lentes permiten ajustar y alinear fácilmente los lentes de acuerdo a la disposición del montaje experimental usado. Son compatibles con lentes de una pulgada, posee tornillos en acero inoxidable para el ajuste y placas en aluminio, las dimensiones en detalle se aprecian en la Figura 2-10.

Figura 2-10: Soportes ópticos para lentes, marca Edmund Optics.



2.3 Fuentes de luz

El diseño conceptual permitió la visualización del prototipo, encontrando diferentes dificultades que se fueron superando a medida que se empezaba a detallar cada subsistema, por ejemplo, para la fuente de luz se probaron 3 alternativas: LED, lámpara pulsada (PX-2) y lámpara de xenón (HID-H4), adicionalmente se usó una lámpara de mercurio como una fuente de calibración del mini espectrómetro, éstas fuentes son descritas a continuación.

2.3.1 Fuente LED

Un LED es un dispositivo semiconductor (diodo) que emite fotones, cuando un electrón pasa de la banda de conducción a la de valencia, cuando se polariza directamente. Este fenómeno se conoce como electroluminiscencia. Usados ampliamente en iluminación, su color depende del material semiconductor que se emplea en la construcción, se consiguen actualmente LEDs con emisión de luz de alto brillo en el infrarrojo (IRED), visible y ultravioleta (UV LED).

Inicialmente los LEDs emitían luz roja de baja intensidad, posteriormente fueron desarrollados los LEDs ultravioletas y azules, los cuales no son usados frecuentemente debido a su alto costo comparado con los más comunes (rojo, verde, amarillo e infrarrojo). Luego empresas como Nichia Corporation desarrollaron LEDs de luz blanca con una eficiencia luminosa de 150 lm/W utilizando para ello una corriente de polarización directa

de 20 miliamperios (mA), eficiencia que al ser comparada con otras fuentes de luz solamente en términos de rendimiento, es aproximadamente 1,7 veces superior a la de la lámpara fluorescente con prestaciones de color altas (90 lm/W) y aproximadamente 11,5 veces la de una lámpara incandescente (13 lm/W). Su eficiencia es incluso más alta que la de la lámpara de vapor de sodio de alta presión (132 lm/W), que está considerada como una de las fuentes de luz más eficientes (Satoshi & Nikkei Electronics, 2006; Virk, 2015).

La potencia típica de los LEDs comerciales es de 30 a 60 mW. Otra de las ventajas de los LEDs es su larga vida útil (50.000 h) y su bajo costo (excepto para el rango UV). Para algunas aplicaciones la radiación ultravioleta es aprovechada para producir radiación visible mediante sustancias fluorescentes o fosforescentes que absorban esta radiación ultravioleta emitida por el diodo y posteriormente emitan luz visible.

El voltaje de operación va desde 1,8 hasta 3,8 voltios aproximadamente (lo que está relacionado con el material de fabricación y el color de la luz que emite) y la gama de intensidades que debe circular por él varía según su aplicación. Los valores típicos de corriente directa de polarización de un LED están comprendidos entre los 10 y los 40 mA. En general, los LEDs suelen tener mejor eficiencia cuanto menor es la corriente que circula por ellos. El primer LED que emitía en el espectro visible fue desarrollado por el ingeniero de General Electric Nick Holonyak en 1962.

Los LEDs disponibles para esta investigación fueron los siguientes: 365, 375, 380, 384, 468, 587 y 660 nm.

2.3.2 Fuente PX-2

La fuente de luz de Xenón Pulsada (PX-2) es una fuente de alta velocidad de pulso, es una lámpara de xenón de arco corto y es utilizado en aplicaciones relacionadas con la medición de absorbancia, reflexión, fluorescencia, fosforescencia y en ensayos óptica y térmicamente lábiles (Ocean Optics).

El PX-2 opera a velocidades de hasta 220 Hz, con una buena estabilidad pulso a pulso, tiene dos modos de descarga (*trigger*) para el control de la frecuencia de los pulsos, y al acoplarse a un espectrómetro puede sincronizar fácilmente el funcionamiento de la luz y el detector. Las especificaciones se muestran en la Tabla 2-1

Tabla 2-1: Especificaciones de la lámpara PX-2, marca Ocean Optics.

Especificaciones	PX-2
Fuente	Lámpara de xenón pulsada
Rango de longitud de onda:	220-750 nm
Potencia de pulso:	45 mJ/pulso (máximo)
Potencia media de salida:	9.9 Watts
Duración del pulso:	5 μ s (a 1/3 altura del pulso)
Velocidad de pulso:	Modo múltiple: hasta 220 Hz Modo único: 1 – 220 Hz
Tiempo de vida de la fuente:	10 ⁹ pulsos (alrededor de 230 días con operación continua @ 50 Hz)
Consumo de energía:	1.3 A @ 11V @ 220 Hz 100 mA @ 12V @ 10Hz
Dimensiones:	14 cm x 10.5 cm x 4 cm
Peso:	0.4 kg

2.3.3 Fuente HID-H4

Es una lámpara de xenón con una descarga de alta densidad (High density discharge - HID-). Posee un tiempo de vida considerable (>3000 h), y a diferencia de los LEDs tiene un espectro policromático (~360 a 730 nm). Su temperatura de operación es de -40°C a 85°C. Posee un cristal de cuarzo el cual bloquea los rayos UV, para proporcionar seguridad a los conductores, teniendo en cuenta que estas lámparas son usadas en motocicletas y automóviles.

2.3.4 Lámpara de mercurio (Hg).

La lámpara de mercurio (Short Wave UV Quartz Pencil Lamp, Edmund Optics 40-759) fue adquirida con la finalidad de tener una fuente estable y que sirva, no solo de comparación sino también, para calibración del espectrómetro (AvaSpec 3648), esta calibración se explica en detalle en la sección 3.1 *Calibración y caracterización del mini espectrómetro*. Las especificaciones de esta lámpara se muestran en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2. Especificaciones de la lámpara de mercurio, marca Edmund Optics.

Especificación	Valor
Densidad de potencia de salida (mW/cm ²)	4,5
Dimensiones (mm)	Diámetro tubo 6,5

Especificación	Valor
	Longitud tubo 53,0
Peso (g):	60
Longitud de onda (nm)	253,7
Longitud total (mm)	127

2.4 Otros componentes ópticos.

2.4.1 Lentes doble convexas.

Los lentes doble convexas cumplen la función de focalizar la luz en el camino óptico diseñado, por lo cual de su correcta alineación depende la luz que excita a la muestra, para posteriormente generar una emisión que pueda ser perceptible para la fibra óptica. Estos lentes están hechos en sílice fundida y tienen un diámetro de 25 mm, poseen una transmitancia del 80%, una reflectancia en promedio de 1,5% y cubren el rango UV y visible del espectro (250 a 700 nm), como se observa en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3: Especificaciones de los lentes doble convexas, marca Edmund Optics.

Especificación	Valor
Diámetro (mm)	25
Longitud focal efectiva, EFL (mm)	500
Sustrato	Sílice fundida
Rango longitud de onda (nm)	250 – 700
Especificaciones recubrimiento	$R_{\text{absorción}} \leq 1,5\% @ 250 - 700 \text{ nm}$

2.4.2 Filtros pasa banda.

A lo largo del desarrollo del proyecto y teniendo en cuenta la necesidad de buscar la respuesta espectral en varias regiones del espectro, ha sido necesario la adquisición de filtros, que como se mencionó antes, ayuden a convertir una señal policromática de las fuentes, a una cuasi-monocromática, de modo que sea más fácil observar la respuesta de emisión de las muestras ensayadas. Se tienen filtros de las siguientes longitudes de onda de 320, 334, 365, 377, 400, 436 y 568 nm, cada uno de los cuales se especifican en la Tabla 2-4.

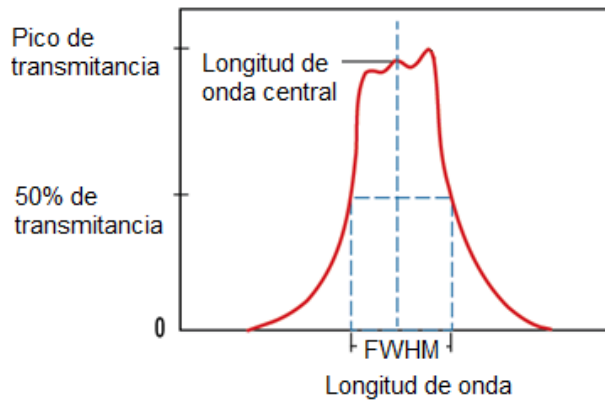
Tabla 2-4. Especificaciones de los filtros usados en el montaje experimental, marca Edmund Optics.

Especificaciones	Filtros						
	320	334	365	377	400	436	568
Longitud de onda central (nm)	320	334	365	377	400	436	568
Diámetro (mm)	12.5	12.7	12.7	12.5	12.7	12.7	12.7
Espesor de montura (mm)	6.9	9.6		3.5	4.8	9.6	7.5
Tolerancia longitud de onda central(nm)	+3.0/-0.0	±2			±2	±2	±2
FWHM* (nm)	10			54	10		
Tolerancia FWHM (nm)	±2	±2	±2		±2	±2	±2
Transmitancia mínima (%)	>25	≥25	80	85	≥30	≥40	≥45
Rango de longitud de onda bloqueado (nm)	200-10000	200-1200	250-1100		200-1200		
Densidad óptica (OD)	≥4.0	≥3.0		≥6.0	≥3.0	≥3.0	≥3.0
Temperatura (°C)	-50 a +50	-50 a +75	-50 a +75		-50 a +75	-50 a +75	-50 a +75
Construcción	Montado en el anillo negro		Sílice fundida con recubrimiento duro		Recubrimiento tradicional	Montado en el anillo negro	

* Ancho a media altura (Full Width-Half Max).

La relación entre la transmitancia y la longitud de onda se muestra en la Figura 2-11, en donde se identifican los picos de transmitancia y el ancho a media altura, abreviada FWHM (del inglés Full Width at Half Maximum).

Figura 2-11. Descripción del FWHM.



2.5 Mini espectrómetro AvaSpec 3648.

El mini espectrómetro AvaSpec-3648 cuenta con 3648 píxeles con un detector CCD. El espectrómetro tiene un conector de entrada de fibra óptica (estándar SMA), un colimador, un espejo y una rejilla difraccional. Una selección de 15 rejillas diferentes con varios ángulos de dispersión y resplandor permiten aplicaciones en el rango de 200-1100nm. El AvaSpec-3648 viene con un convertidor de 14 bits AD, y USB2.0 interfaz de alta velocidad; trabaja de forma adecuadamente en aplicaciones de alta velocidad y alta resolución, por ejemplo usando fuentes de luz pulsada.

Los puertos digitales permiten el disparo y control externos de las fuentes de luz. El AvaSpec-3648-USB2 funciona con alimentación USB y viene con AvaSoft-basic. Así mismo posee un banco óptico simétrico Czerny-Turner, con una longitud focal de 75 mm.

La longitud de onda de operación es de 200 a 1100 nm, con una sensibilidad de 12000 conteos/ μ W por ms de tiempo de integración, siendo su relación señal a ruido (SNR) de 300:1, pesa 716 g y sus dimensiones son 175 x 110 x 44 mm.

3. Análisis y discusión de resultados

3.1 Calibración y caracterización del mini espectrómetro

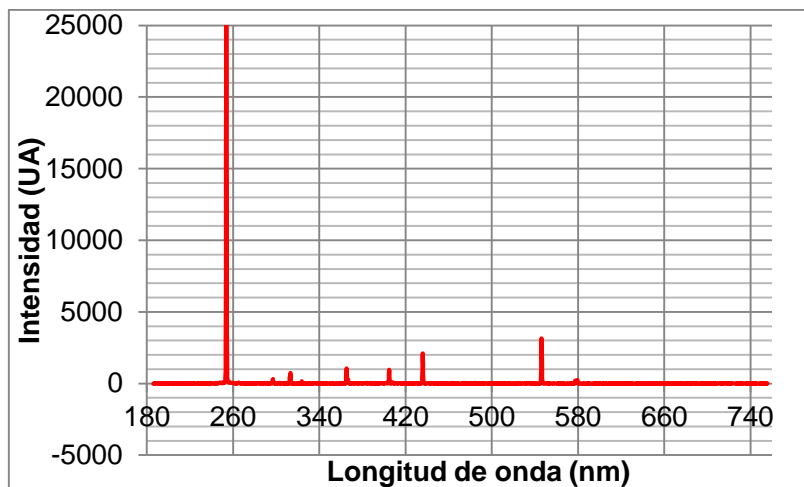
La calibración del mini espectrómetro, AvaSpec 3648, es fundamental para tener datos confiables. Se usó la lámpara de mercurio (Hg) como fuente de luz, de modo que se realizaron mediciones a diferentes tiempos de integración (1, 5, 10, 20, 30, 50, 100 y 500 ms), ubicando a una distancia de 50 cm la fibra de la fuente de luz. A cada medición de la señal del espectro se le midió el ruido que la señal genera (dark), mediante el cubrimiento de la fibra óptica, de modo que se mantenga las mismas condiciones que cuando se está capturando señal.

Se programó el AvaSpec3648 de tal forma que se tomen 10 mediciones del espectro, y cada una de estas mediciones es el promedio de 10 espectros que logra capturar el espectrómetro.

3.1.1 Caracterización de la longitud de onda (abscisa)

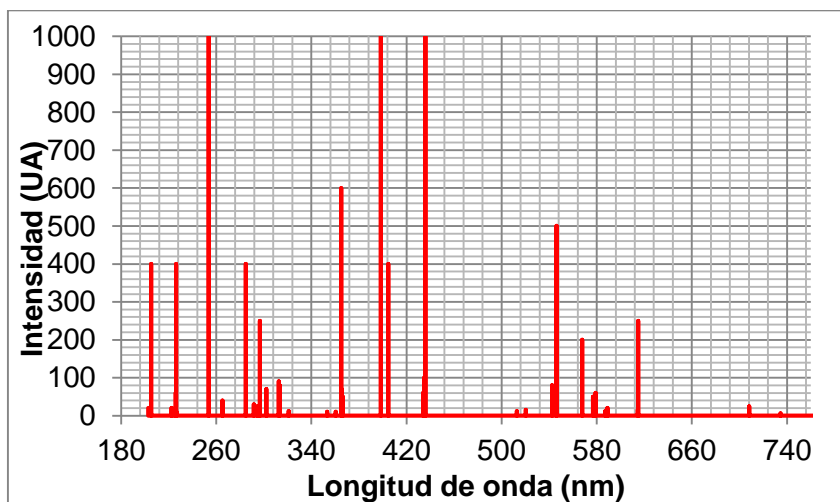
La calibración se llevó a cabo con la lámpara de mercurio disponible en el laboratorio, la cual se describió en la sección 2.3.4 *Lámpara de mercurio (Hg)*. Con esta lámpara se obtuvo el espectro mostrado en la Figura 3-1, midiendo directamente la luz de la lámpara y recibiendo la señal con la fibra sin lentes ni filtros intermedios, en posición lineal, con un tiempo de integración de 100 ms y un número de promedios de 10 espectros por cada medición. Cada medición se repitió 10 veces.

Figura 3-1: Lámpara de mercurio (Hg), Edmund Optics (Fuente: esta investigación).



Para realizar la comparación y verificación del estado del espectrómetro, se usaron los datos del NIST⁴. El espectro de mercurio (Hg) del NIST se muestra en la Figura 3-2.

Figura 3-2. Lámpara de mercurio (Hg), datos tomados de NIST.



⁴ National Institute of Standards and Technology,
<http://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/Tables/mercurytable2.htm>

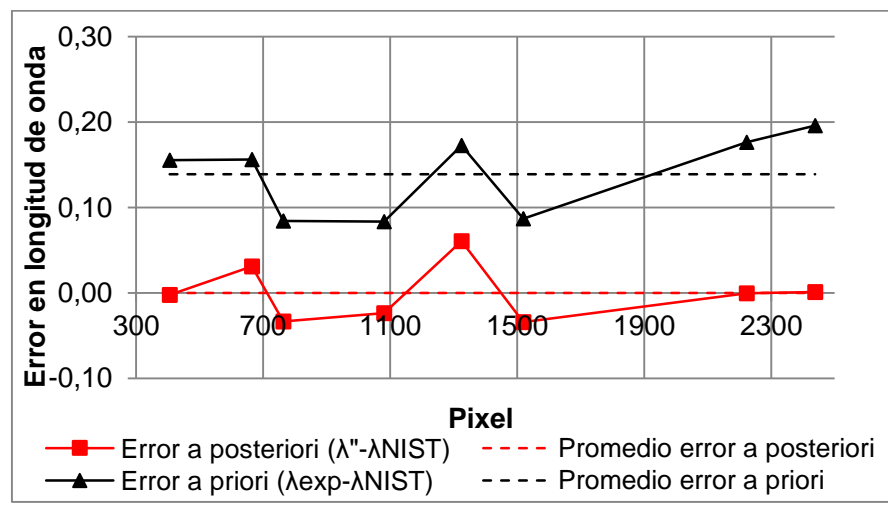
Después de esto, fue necesario identificar los picos coincidentes entre el espectro medido (λ_{exp}) y el reportado por NIST (λ_{NIST}), resultando los puntos (8) con los cuales se evaluó el estado del espectrómetro (ver Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Error a priori y a posteriori en longitud de onda del espectrómetro AvaSpec3648 (Fuente: esta investigación).

Pixel (i)	λ_{NIST}	λ_{exp}	Error a priori ($\lambda_{exp}-\lambda_{NIST}$)	$\lambda'' = P(i)$	Error a posteriori ($\lambda''-\lambda_{NIST}$)
405	253,652	253,807	0,155	253,650	-0,002
664	296,728	296,884	0,156	296,759	0,031
763	313,155	313,239	0,084	313,122	-0,033
1081	365,249	365,333	0,084	365,226	-0,023
1325	404,656	404,829	0,173	404,717	0,061
1519	435,833	435,920	0,087	435,799	-0,034
2223	546,074	546,250	0,177	546,073	0,000
2439	579,066	579,262	0,196	579,068	0,001

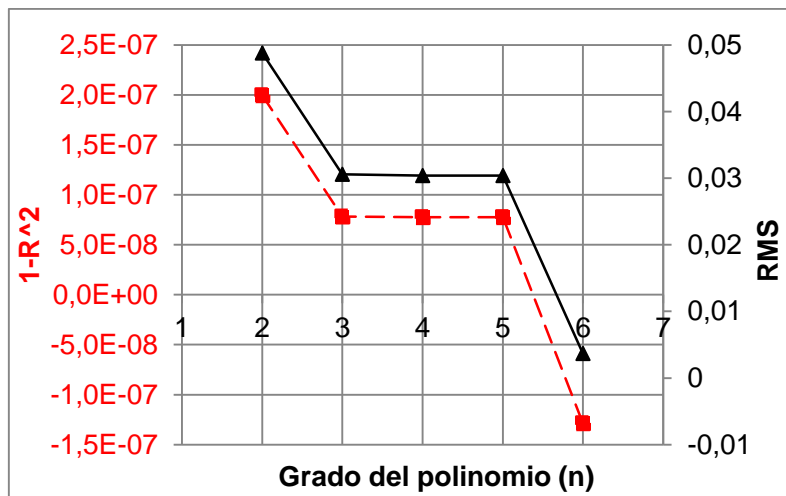
Con lo anterior, es posible obtener el error a priori ($\lambda_{exp}-\lambda_{NIST}$), y después una correlación entre la longitud de onda y los pixeles ($\lambda''=P(i)$) permite obtener el error a posteriori ($\lambda''-\lambda_{NIST}$), como se muestra en la Figura 3-3.

Figura 3-3. Error a priori y error a posteriori (Fuente: esta investigación).



La función $\lambda''=P(i)$ es un polinomio de orden 3, este se seleccionó después de analizar cuál es el grado (n) que mejor representa los datos. Para ello se graficó (Figura 3-4) el residual del coeficiente de correlación ($1-R^2$) en el eje izquierdo, y el valor cuadrático medio del error (root mean square, RMS) en el eje derecho, con ellos se puede observar que pasar de un grado de polinomio 2 a 3 tiene un gran impacto en la reducción del residual del coeficiente de correlación, pasando de $1,9E-07$ a $7,8E-08$; mientras que pasar de un grado de polinomio 3 a 4 o a 5, no es significativo, diferencia entre $n=3$ y $n=5$ de $8,5E-10$. Finalmente, se consigue un beneficio usando el grado 6, sin embargo este tipo de polinomios no están bien condicionados debido al comportamiento erróneo para el resto de datos no conocidos ($R^2 > 1$).

Figura 3-4: Análisis del grado de polinomio (n) para la función $\lambda''=P(i)$ (Fuente: esta investigación).



3.1.2 Caracterización de la señal (ordenada)

Al igual que la longitud de onda es necesaria una evaluación de la intensidad de la señal, es decir la cantidad de fotones que detecta el mini espectrómetro en cada medición, como se muestra en la Figura 3-5. Las longitudes de onda seleccionadas son las de los picos del espectro de la lámpara de mercurio (Figura 3-1).

- Intensidad de la señal en función del tiempo de integración

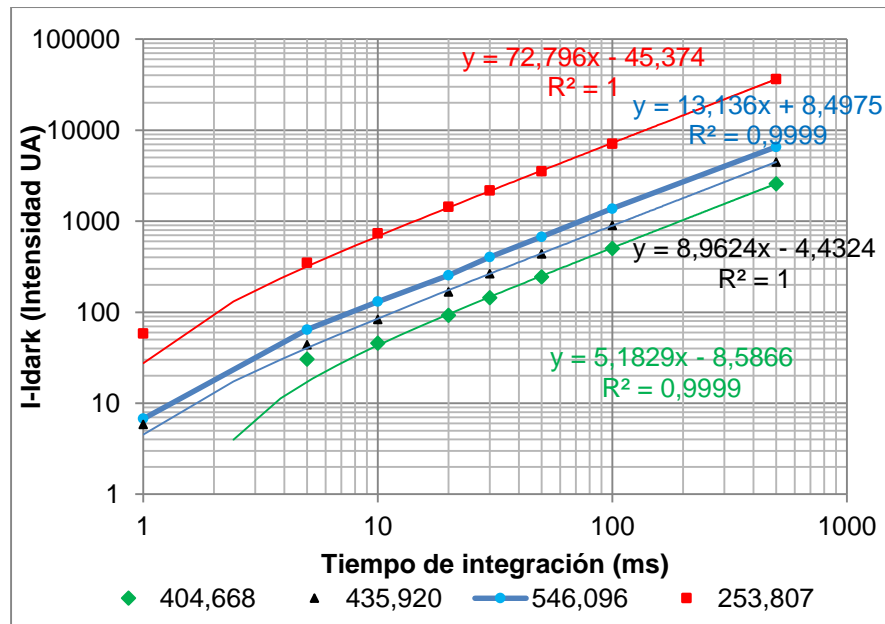
Cuando se lleva a cabo una medición, se tiene un ruido asociado (ruido blanco o *dark*), que depende de factores como la estabilidad opto mecánica del montaje, la parte electrónica del equipo usado, entre otras; es por ello que se debe medir esta variación en la medición de modo que sea tenida en cuenta en el momento de hacer los análisis sobre los espectros generados, considerando que cero incertidumbre en las mediciones no es alcanzable (Jiménez, 2004).

Se debe tener en cuenta que cuando se realiza una medición, la intensidad de la medición (I) es igual a la sumatoria de una intensidad del *dark* (I_{dark}) más una constante del sistema (k) por la tasa de flujo (φ), es decir el número de fotones por segundo (#/s) en un tiempo de integración definido, así:

$$I = I_{dark} + k * \varphi * t_{int}$$

Ahora bien, si la expresión anterior es representada en una gráfica como $(I - I_{dark})$ en función del t_{int} se obtiene una serie de líneas de la forma $y = mx + b$. Si $b = 0$, la pendiente (m) representa la tasa de conteos por segundo para cada longitud de onda.

Figura 3-5: Intensidad de la señal (lámpara de Hg) en función del tiempo de integración (Fuente: esta investigación).



Para el caso de la longitud de onda menor (253,807 nm) la tasa de conteos por milisegundo es de 72,67; lo que significa que con tiempos de integración de 5 ms, y si el *dark* tuviese 100 conteos, la relación señal a ruido sería aproximadamente de 3,5.

3.1.3 Caracterización del ruido y razón señal a ruido (SNR)

- Análisis del comportamiento del ruido

Cuando se realizan mediciones del *dark*, en función del tiempo de integración, se debe tener en cuenta que esta señal es la sumatoria del promedio de las mediciones más el residual de la señal, $I_{dark} = D_{promedio} + D_{residual}$. De lo anterior se conoce el *dark* promedio ($D_{promedio}$) y la intensidad del *dark* (I_{dark}), de modo que se puede calcular el *dark* residual ($D_{residual}$).

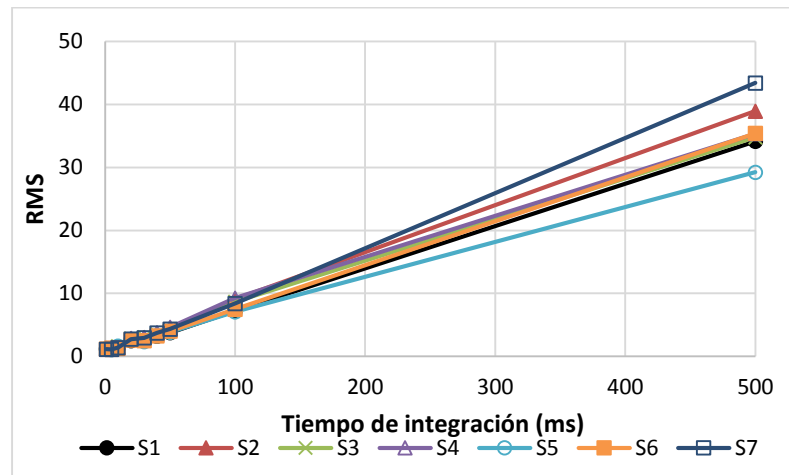
Para verificar el comportamiento del $D_{residual}$ en función del tiempo de integración se calculó el *RMS* de cada conjunto de mediciones y se dividió la longitud de onda en 7 segmentos. Teniendo en cuenta que la longitud de onda que mide el AvaSpec3648 va desde 185,822 nm a 755,846 nm, el tamaño de cada segmento longitud de onda debería ser de 81,432 nm, sin embargo como se tienen únicamente 3648 pixeles la longitud de onda no corresponde exactamente en los valores deseados, por lo que se buscó el valor más cercano de modo que el tamaño de cada segmento sea muy similar, como se muestra en la Tabla 3-2

Tabla 3-2: Calculo de los segmentos de longitud de onda para análisis de ruido (Fuente: esta investigación).

Segmento	Pixeles asociados		Intervalos reales (nm)		Diferencia (nm)	Intervalos ideales (nm)	
S1	1	485	185,822	267,156	81,334	185,822	267,254
S2	486	979	267,323	348,698	81,375	267,254	348,686
S3	980	1483	348,862	430,172	81,310	348,686	430,118
S4	1484	1999	430,331	511,587	81,256	430,118	511,550
S5	2000	2530	511,743	593,045	81,302	511,550	592,982
S6	2531	3078	593,196	674,402	81,207	592,982	674,414
S7	3079	3648	674,548	755,846	81,298	674,414	755,846

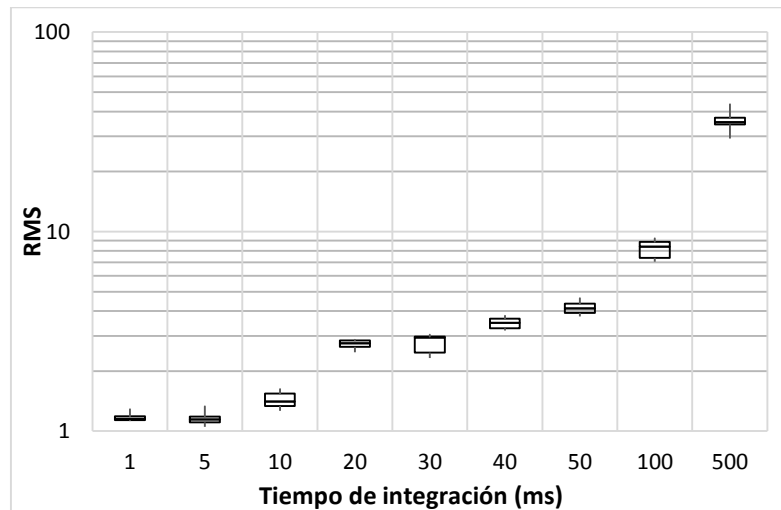
En la Figura 3-6, se observa que a medida que aumenta el tiempo de integración el $D_{residual}$ también crece y su comportamiento es lineal. La tasa de crecimiento promedio es de $0,0726*t$ ($R^2=0,9941$). Es decir que para un valor de 500 ms el $D_{residual}$ presenta un RMS de aproximadamente 36.

Figura 3-6: RMS del $D_{residual}$ en función del tiempo de integración (Fuente: esta investigación).



Si el resultado anterior se presenta en barras de error se obtiene la Figura 3-7, en donde se observa que la mayor dispersión se presenta en los tiempos de integración 10, 30, 100 ms para el primer orden de magnitud, y en 500 ms para el segundo orden de magnitud.

Figura 3-7: Barras de error del RMS del $D_{residual}$ (Fuente: esta investigación).



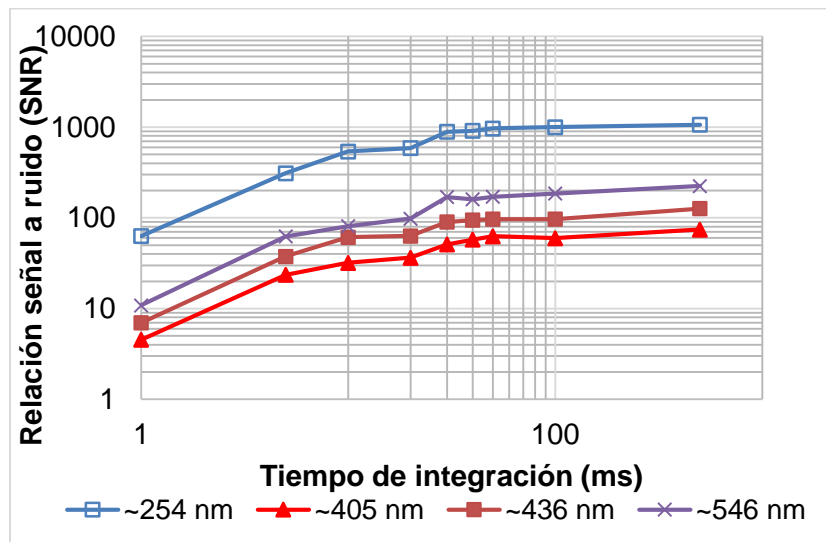
- Relación señal a ruido en las mediciones (SNR).

La determinación de la relación señal a ruido (SNR por sus siglas en inglés) es importante para conocer la capacidad de los instrumentos de medición en cuanto al límite de detección se refiere. Se busca en los equipos (espectrómetros) que la SNR sea lo más grande posible de modo que en el momento que se detecte una molécula del compuesto de interés, su señal debe ser mayor a la del ruido instrumental (Lakowicz, 2006).

De acuerdo con lo anterior, los ensayos realizados en esta investigación no son la excepción, y se consiguió, mejorar la SNR a través de una alineación óptica y un buen soporte mecánico de todos los componentes, al igual que una preparación adecuada de las muestras analizadas.

La relación SNR para el AvaSpec3648 se calculó a partir de la señal de las mediciones ($k * \varphi * t_{int} = \alpha * t_{int}$) con la lámpara de Hg, y su respectiva señal del ruido ($D_{residual}$) que se determinaron en la sección anterior (*Análisis del comportamiento del ruido*). En la Figura 3-8, se observa que para tiempos pequeños de integración (hasta 50 ms) la SNR crece rápidamente, luego para tiempos mayores a 100 ms la SNR permanece casi constante, de modo tal que según estos resultados la mejor opción es operar el sistema a 100 ms, y volver a medir, obteniéndose mayor cantidad de datos para análisis.

Figura 3-8: Comportamiento de la SNR en función del tiempo de integración (t_{int})
(Fuente: esta investigación).



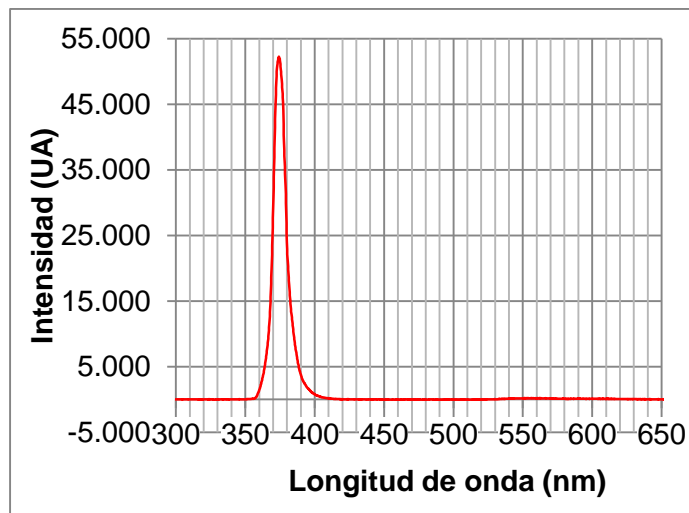
3.2 Espectros de excitación y emisión.

A continuación se muestran los espectros de las fuentes usadas, estos espectros de excitación se midieron directamente desde la fuente a la fibra óptica. Por su parte para el caso de la medición de los espectros de emisión se usaron los diferentes montajes que serán descritos de acuerdo a la fuente de luz usada, para estos ensayos se empleó fluoresceína sódica.

3.2.1 Pruebas con LEDs

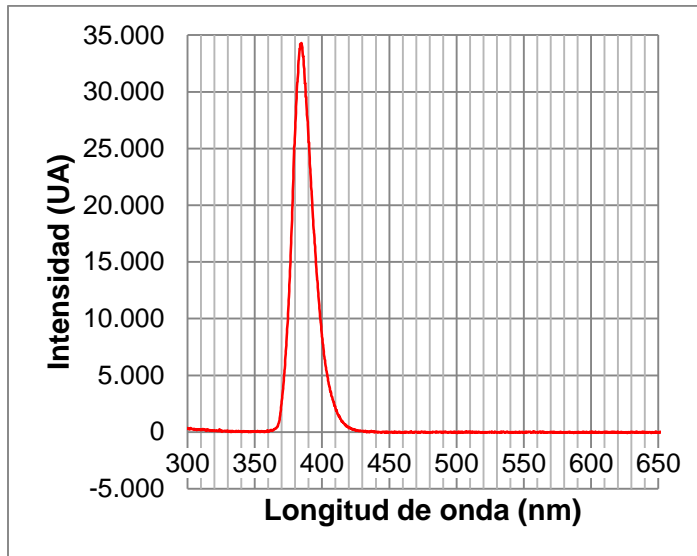
Como se mencionó en la sección de metodología (2.3.1 Fuente LED), se disponen de algunos LEDs para la generación del espectro de fluorescencia. Se usaron LEDs con una longitud de onda de 375 nm y 384 nm, los espectros de emisión son mostrados en la Figura 3-9 y Figura 3-10, respectivamente.

Figura 3-9: Espectro LED 375 nm (Fuente: esta investigación).



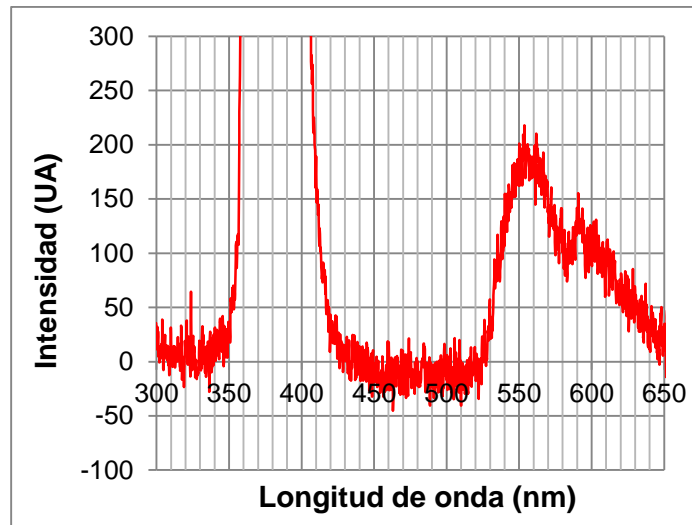
Es importante resaltar que los ensayos con LEDs arrojaron espectros de emisión con una muy buena monocromaticidad, siendo su FWHM de ~10 nm y ~20 nm para los LEDs de 375 y 384 nm, respectivamente. Este comportamiento es deseable toda vez que no se hace necesario el uso de filtros para cortar las longitudes de onda de interés, además de que a menor FWHM el detector puede diferenciar de mejor forma dos señales que se generan simultáneamente.

Figura 3-10 : Espectro LED 384 nm (Fuente: esta investigación).



El espectro de emisión de fluoresceína usando el LED de 375 nm es mostrado en la Figura 3-11, en el cual también se observa parte del espectro de la luz de excitación. Este ensayo fue realizado siguiendo el primer montaje experimental descrito en la Figura 2-2, en donde la medición de la emisión se realiza por reflexión y se obtiene contaminación de la fuente de luz, en este caso de los LEDs. Por su parte, para el LED de 384 nm no fue posible captar la señal de emisión de la fluorescencia debido posiblemente a dos factores: 1) baja intensidad de luz que llega a la muestra (fluoresceína), provocando que los fotones incidentes no sean los suficientes para excitar las moléculas de la muestra y generar una señal fuerte de emisión que supere el ruido, es decir que la señal de emisión sea mayor al ruido generado por la medición (razón señal a ruido -SNR-); o 2) la región de longitud de onda, en donde se está excitando la muestra, no es la adecuada y por ello no genera emisión.

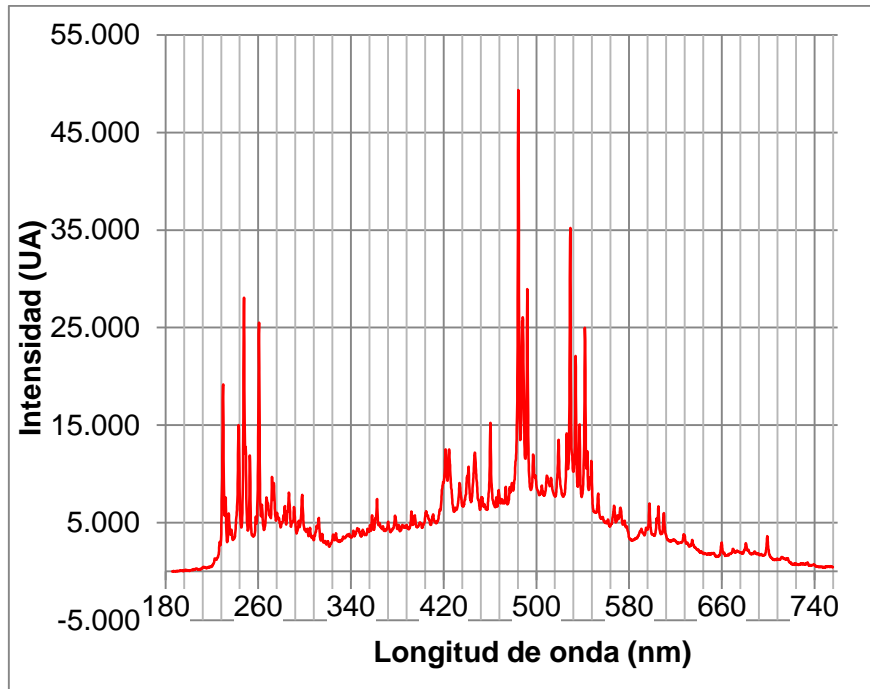
Figura 3-11: Espectro de emisión de fluoresceína con LED 375nm (Fuente: esta investigación).



3.2.2 Pruebas con PX-2:

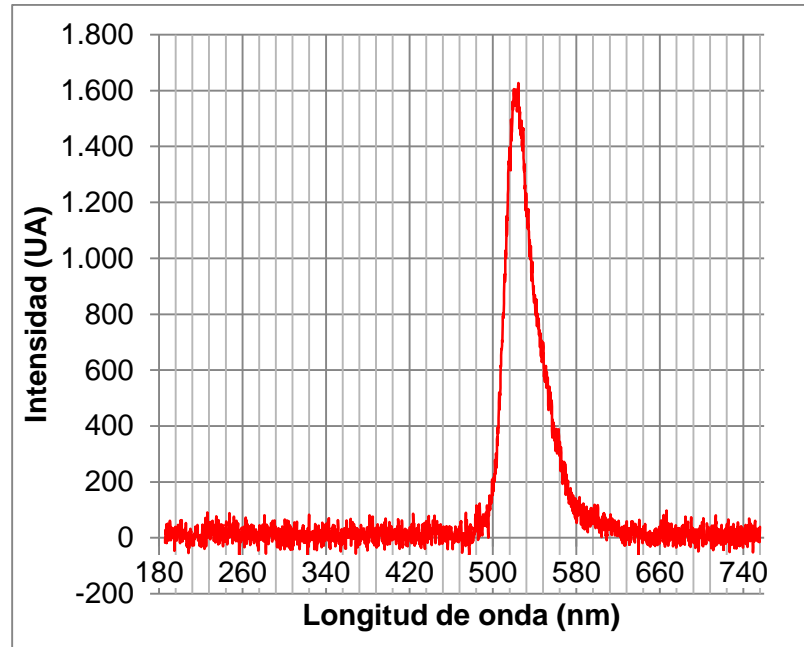
Al igual que con los LEDs, se midió el espectro de excitación de la lámpara PX-2, este espectro es mostrado en la Figura 3-12, de modo que se tenga caracterizada esta fuente. La longitud de onda que abarca el espectro de esta fuente policromática va desde 220 a 750 nm, con tres picos máximos: 1) entre 250 a 260 nm (región ultravioleta), 2) entre 490 a 500 nm (región visible) y 3) alrededor de 520 a 550 nm (región visible).

Figura 3-12: Espectro lámpara PX-2 (Fuente: esta investigación).



Luego, las pruebas con la lámpara PX-2, se realizaron sobre el montaje experimental mostrado en la Figura 2-3, mediante medición por reflexión, en donde se capturo la señal de emisión gracias al uso de un lente doble convexo que focalizan la luz a la fibra óptica, esto se realizó en la celda de aluminio (Celda B), ver Figura 3-13. Este espectro es el resultado de la absorción de la fuente policromática y su posterior emisión de un espectro con una estructura simétrica en la región visible, siendo la intensidad de la señal inferior (alrededor de 1600 conteos) frente a la luz de excitación (alrededor de 50000 conteos). Sin embargo para asegurar que esta emisión no está contaminada por la luz de excitación es necesario el uso de filtros y mejoramiento de la alineación óptica, como se explicara en las siguientes secciones.

Figura 3-13: Espectro de emisión de fluoresceína con lámpara PX-2 (Fuente: esta investigación).



3.2.3 Pruebas con HID-H4

Los ensayos con la lámpara HID-H4 se basaron en el montaje experimental de la Figura 2-4. Los espectros de excitación y emisión se obtuvieron empleando el filtro de 377 nm, y son mostrados en la Figura 3-14 y Figura 3-15, respectivamente.

El espectro de emisión de la fuente HID-H4 es policromática, al igual que el de la PX-2, aunque cubriendo un rango de longitud de onda menor, desde aproximadamente 360 hasta 730 nm. La diferencia primordial entre las fuentes HID-H4 con respecto a la PX-2, es que su elevada intensidad (espectro de emisión de hasta 50000 conteos) permite el uso de filtros pasa banda y detección perpendicular apropiadamente alejada de la fuente de emisión. Esto evita que los espectros de fluorescencia estén severamente contaminados con luz de excitación.

Figura 3-14: Espectro de la lámpara HID-H4 (Fuente: esta investigación).

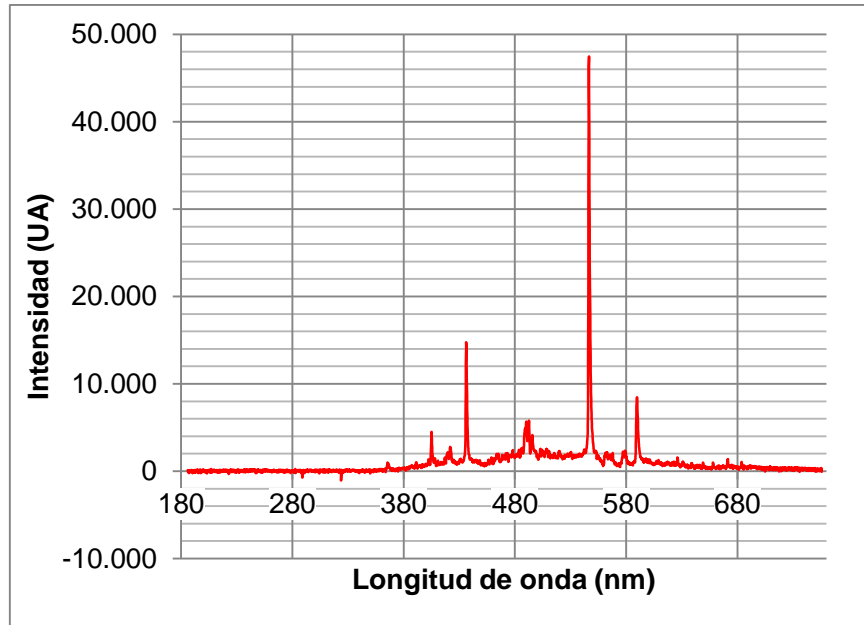
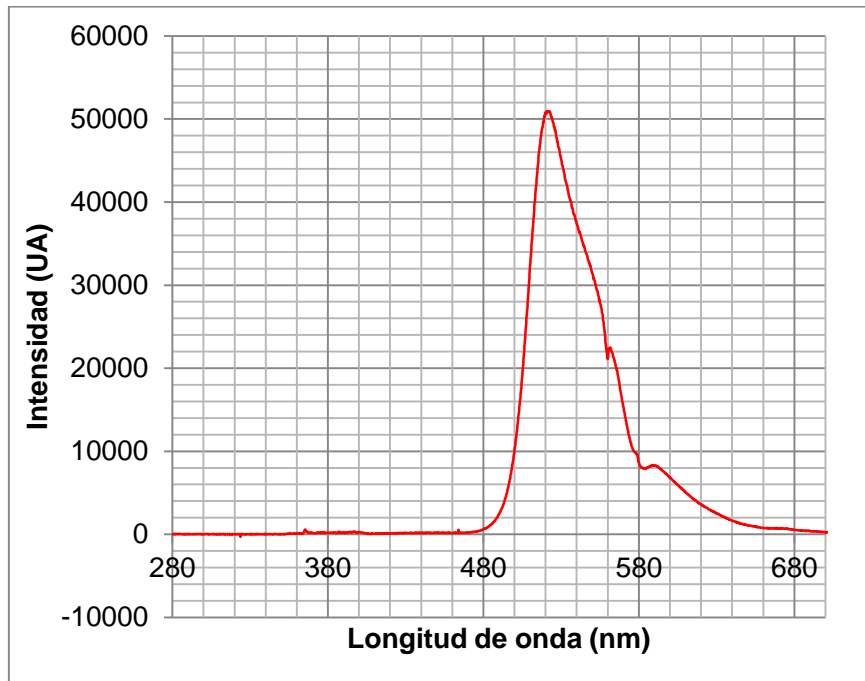


Figura 3-15: Espectro de emisión de fluoresceína con lámpara HID-H4, usando filtro banpass de 377 nm (Fuente: esta investigación).

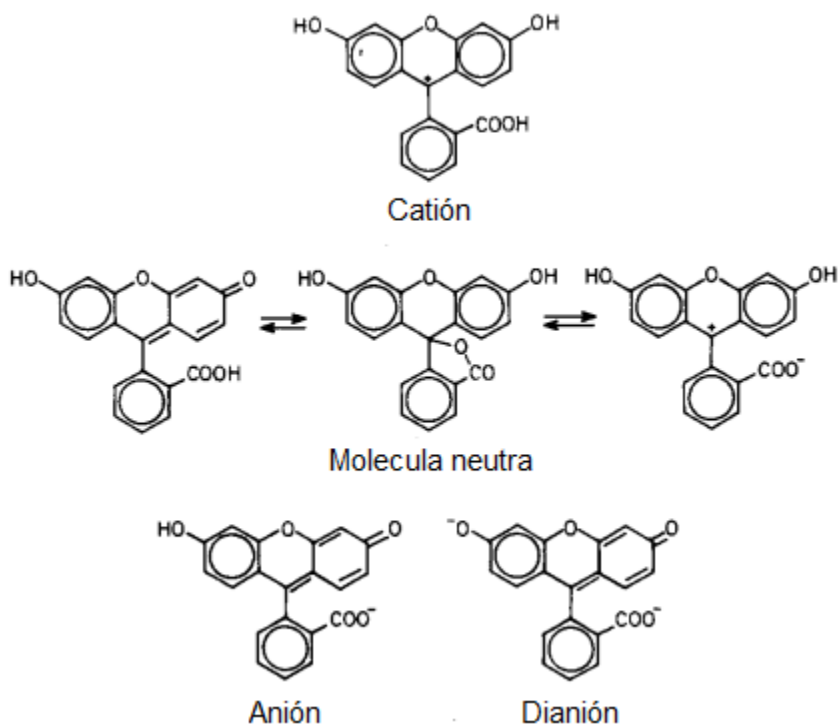


Como se observa en las diferentes fuentes usadas, la de mejor desempeño en cuanto a la intensidad generada en la emisión de los espectros es la HID-H4, cabe resaltar que en este punto se contaba con una mejor alineación óptica y con accesorios que ayudaron en el aumento de la intensidad de la señal de emisión capturada.

3.3 Ensayos con fluoróforo estándar.

Para evaluar el desempeño del espectrómetro AvaSpec 3648 se decidió usar fluoresceína (3',6'-dihidroxiestero[2-benzofuran-3,9'-xanten]-1-ona). Este es un colorante orgánico que emite fluorescencia al ser excitado con luz en cierta longitud de onda. En soluciones acuosas este compuesto se presenta en forma catiónica, neutra, aniónica y dianiónica, dependiendo del pH de la solución, como se muestra en la Figura 3-16 (Hart & JiJi, 2002).

Figura 3-16: Estructura química de la fluoresceína.



Se realizaron varios ensayos con el fin de alinear correctamente el montaje y determinar el límite de detección del espectrómetro para esta sustancia, así mismo se analizó la dependencia de este fluoróforo con el pH y con la concentración. Se usó fluoresceína sódica al 10%, la cual es comercial y de bajo costo, empleada en el sector oftalmológico.

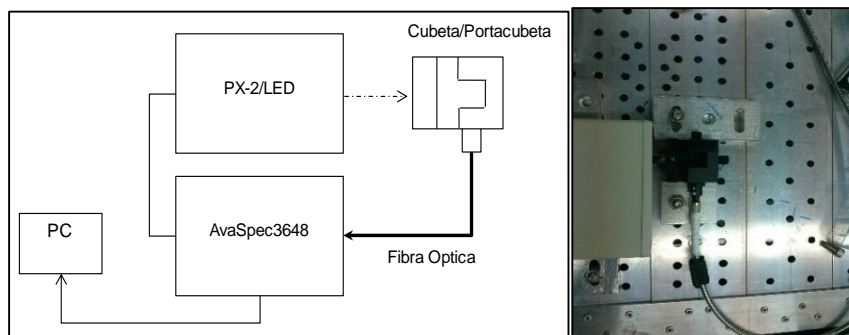
A partir de esta fluoresceína, inicialmente se diluyeron 13 concentraciones que se muestran en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Concentraciones de fluoresceína usada para caya ensayo (Fuente: esta investigación).

Concentración de fluoresceína		
%	ppmv	ppbv
2,5E-01	2,5E+03	2,5E+06
1,3E-01	1,3E+03	1,3E+06
6,3E-02	6,3E+02	6,3E+05
3,1E-02	3,1E+02	3,1E+05
1,6E-02	1,6E+02	1,6E+05
7,8E-03	7,8E+01	7,8E+04
3,9E-03	3,9E+01	3,9E+04
2,0E-03	2,0E+01	2,0E+04
9,8E-04	9,8E+00	9,8E+03
1,0E-04	1,0E+00	1,0E+03
1,0E-05	1,0E-01	1,0E+02
1,0E-06	1,0E-02	1,0E+01
1,0E-07	1,0E-03	1,0E+00

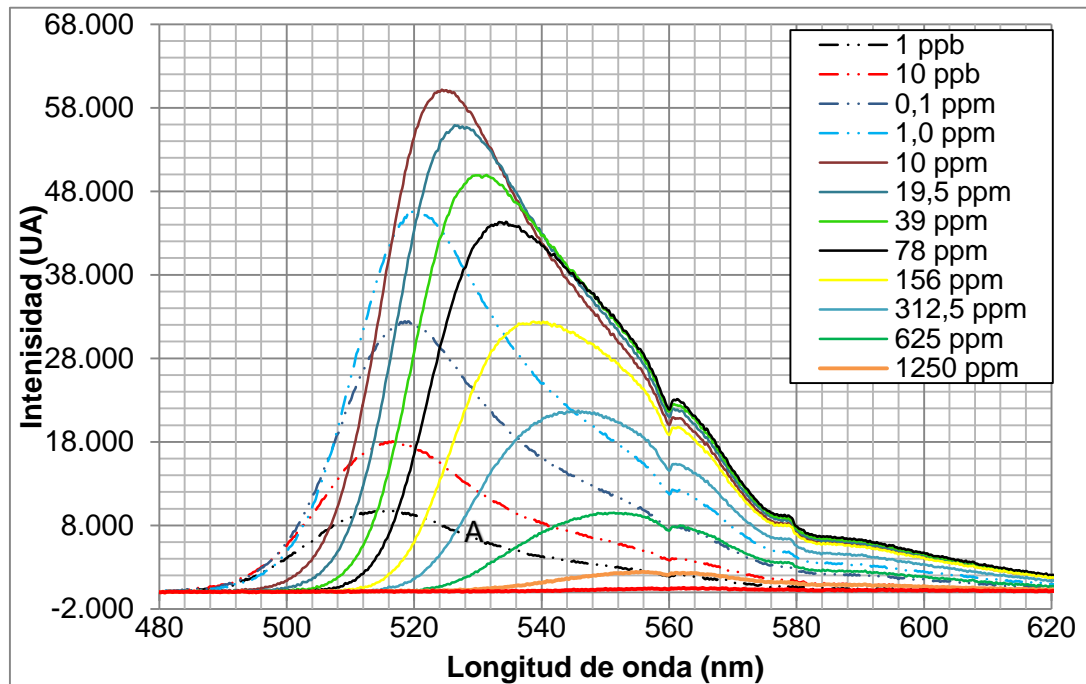
La fluoresceína fue medida inyectando directamente luz policromática (fuente PX-2), a la celda en donde estaba la muestra de interés, luego se capturó en un ángulo recto la señal de la fluorescencia generada, con ayuda de la fibra óptica, como se muestra en la Figura 3-17.

Figura 3-17: Montaje experimental para evaluar fluoresceína, izquierda: esquemático; y derecha: fotografía (Fuente: esta investigación).



Los espectros resultantes tienen un crecimiento en la intensidad de la señal a medida que se diluye la muestra, es decir de mayor a menor concentración (empezando en 2500 ppm –línea roja-), luego se alcanza un máximo (10 ppm -línea vinotinto-) y después decrece nuevamente hasta la menor concentración (1 ppb –línea negra punteada-), como se observa en la Figura 3-18.

Figura 3-18: Espectros de emisión de fluoresceína a diferentes concentraciones (Fuente: esta investigación).



Al modificar la concentración, y teniendo en cuenta la fuerte dependencia con el pH, se puede observar que a medida que la solución está menos concentrada, es decir un pH más ácido, el espectro se desplaza hacia el lado izquierdo (región UV), y en sentido contrario cuando el pH es más básico (región IR). Para corroborar esta dependencia de la fluoresceína con el pH se realizaron ensayos adicionales en donde se midió este parámetro, antes y después de la adición de hidróxido de sodio (NaOH), como se describe en la siguiente sección.

Finalmente es importante mencionar que este resultado muestra que sin la detección multicanal el sistema no es analítico, porque con una medición a una sola longitud de onda no sería posible distinguir entre los extremos de concentración (concentraciones altas y

concentraciones bajas), por ejemplo, como se observa en el punto A de la Figura 3-18, al hacer una detección alrededor de 535 nm y obtener 5000 conteos, no es posible saber con certeza si se está detectando la parte decreciente de 1 ppb o la parte creciente de 625 ppm, sin embargo este problema en realidad no es relevante para el método que se está usando de EEMs porque la excitación es policromática compleja, y la detección es multicanal, por lo tanto el sistema no es unívoco pero no hay problema real.

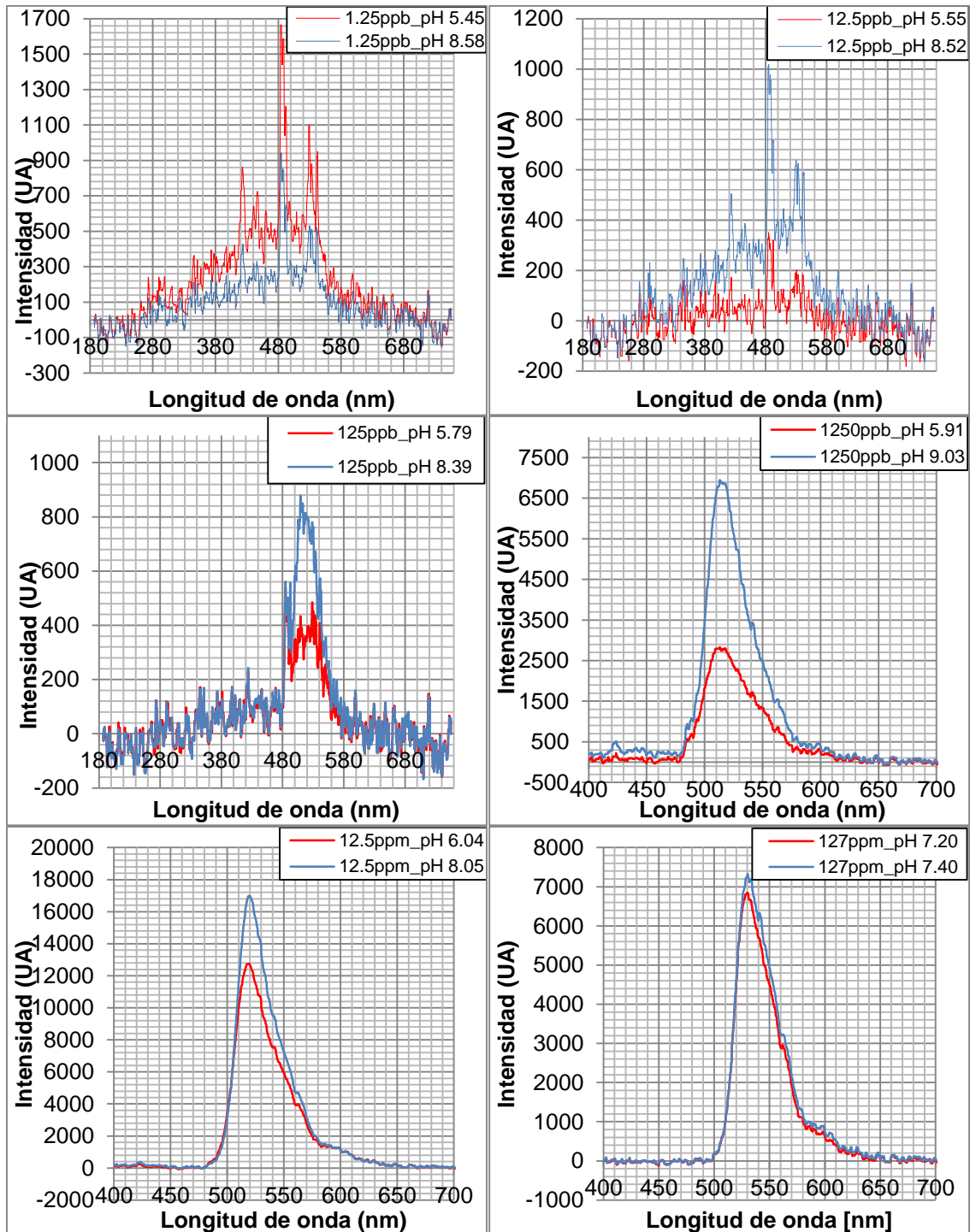
3.3.1 Dependencia de la fluoresceína con el pH.

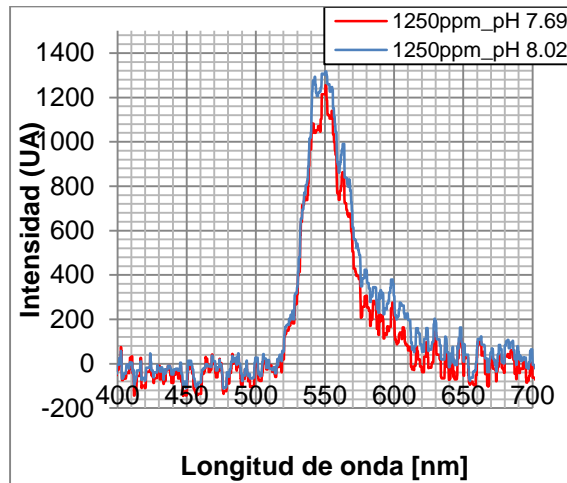
Para comprobar la dependencia de la fluoresceína con el pH se prepararon 7 soluciones a diferentes concentraciones, a las cuales una vez medido su pH inicial, se le adicionó NaOH 0,1 M, de modo que todas las concentraciones sean llevadas a un pH casi constante (pH final entre 7,4 y 9,0), como se observa en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4: Concentraciones de fluoresceína teniendo en cuenta el pH (Fuente: esta investigación).

Concentración		pH	
ppmv	ppbv	pH inicial	pH final
1,25E-03	1,25E+00	5,5	8,6
1,25E-02	1,25E+01	5,6	8,5
1,25E-01	1,25E+02	5,8	8,4
1,25E+00	1,25E+03	5,9	9,0
1,25E+01	1,25E+04	6,4	8,1
1,25E+02	1,25E+05	7,2	7,4
1,25E+03	1,25E+06	7,7	8,0

El comportamiento de los espectros es similar al mostrado en la Figura 3-18. Para entender la variación en intensidad de señal debido al cambio de pH se muestra un conjunto de espectros (procesados por el software AvasSoft) después de aplicar un filtro digital (mediana) para eliminar la mayor cantidad de ruido (Figura 3-19).

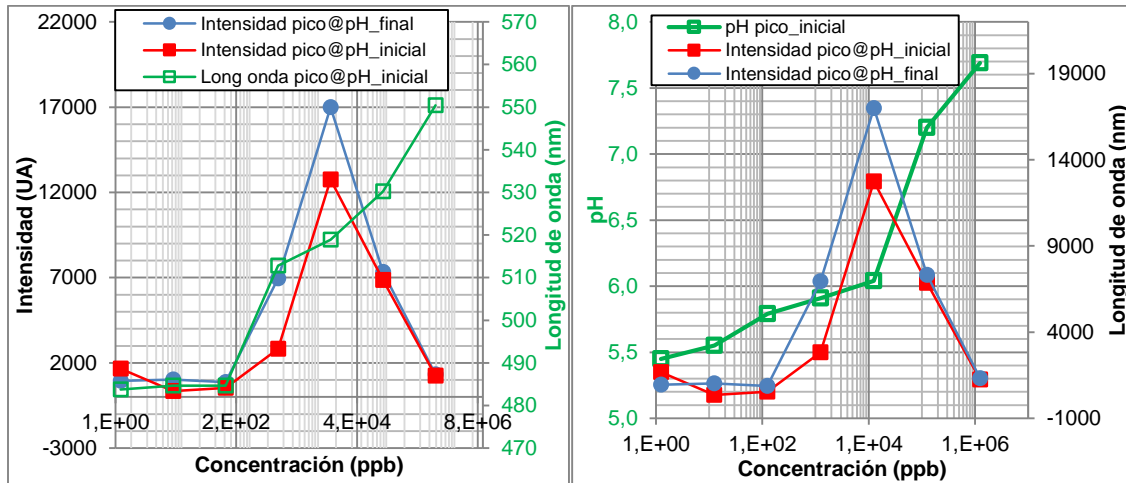
Figura 3-19: Espectros de emisión a pHs diferentes aplicando *Median filter* (Fuente: esta investigación).



Lo anterior muestra que a pHs mayores (línea azul), debido a la adición de NaOH, la intensidad de la emisión crece, generando un pico de intensidad alrededor de 12 ppm, tanto a pH inicial como a pH final, y luego vuelve a descender a medida que la concentración disminuye. Cabe resaltar que en las concentraciones máximas y mínimas de los ensayos mostrados se evidencia la importancia de la relación señal a ruido (SNR), es decir siempre que la señal crezca más rápido que el ruido la estructura de los espectros es más definida, lo que significa que el detector es capaz de diferenciar entre la señal de la muestra de interés y el ruido.

En la Figura 3-20 (izquierda) también se observa que a medida que la concentración aumenta, el máximo de intensidad se mueve hacia el infrarrojo (mayor longitud de onda), de forma similar se comporta el pH, el cual aumenta en función de la concentración (derecha).

Figura 3-20: Comportamiento de la intensidad y la longitud de onda en función de la concentración (izquierda) y de la intensidad y el pH en función de la concentración (derecha).

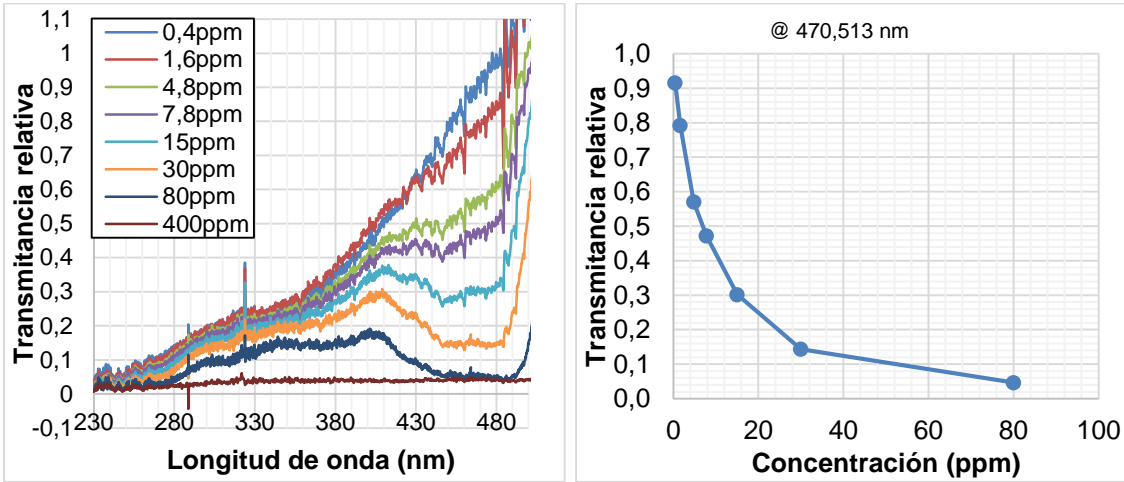


Como se mencionó al inicio de esta sección la fluoresceína presenta varias formas dependiendo básicamente del pH de la solución; según Martin & Lindqvist (1975) y Sjöback, Nygren, & Kubista (1995) a bajos valores de pH (< 6,0) se presenta principalmente el anión de la fluoresceína, con algunas estructuras del dianión, y en pH > 6 predomina el dianión con algunas estructuras menos intensas del anión.

Para corroborar lo expresado por estos autores, es decir evaluar si con los ensayos realizados, y el montaje dispuesto (Figura 3-17), el sistema logra detectar las diferentes especies de la fluoresceína; se procede a evaluar la transmitancia y la absorbancia a diferentes concentraciones.

Los espectros de transmitancia medidos (I) se dividen sobre el espectro de la fuente del PX-2 (I_0), de modo que se obtiene que $T = I/I_0$, luego se normalizan y esto en función de la concentración permite observar el comportamiento de transmitancia relativa de la fluoresceína a diferentes concentraciones, ver Figura 3-21.

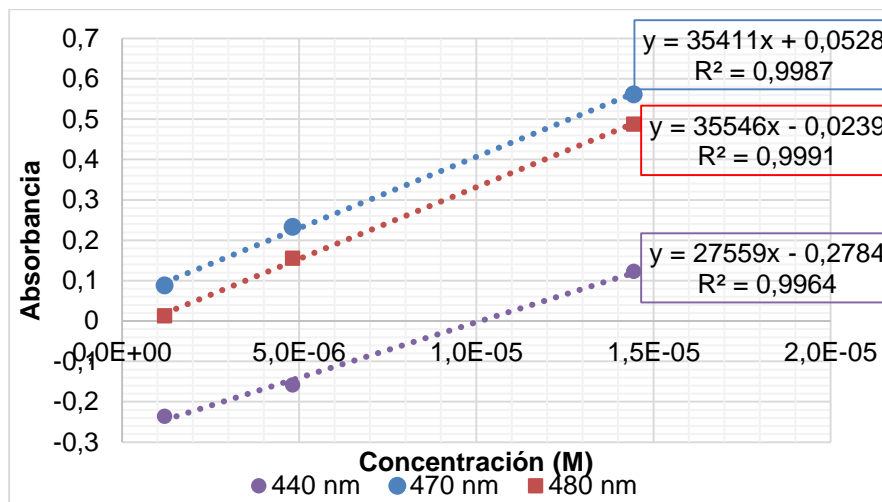
Figura 3-21: Transmitancia relativa de fluoresceína a diferentes longitudes de onda (izquierda) y diferentes concentraciones para 470,513 nm (derecha).



Lo anterior muestra que a mayores concentraciones la transmitancia es menor, es decir hay mayor absorción por parte de la muestra cuando la concentración aumenta (derecha), de igual forma se observa que existe una mayor absorción en la parte inicial del espectro (izquierda), es decir en la parte del UV (aproximadamente hasta 330 nm), luego disminuye en la parte del UV-VIS (alrededor de 330 a 400 nm), y vuelve a aumentar en la última región VIS analizada (hasta 480 nm).

Luego, teniendo en cuenta que $\ln(T) = \ln(I/I_0) + \ln(k)$, y la relación entre absorbancia y transmitancia es $A = -\ln(T)$, además que la absorbancia es igual a la longitud del camino óptico (L) por coeficiente de extinción (ϵ) y la concentración (C) de la sustancia de interés ($A = \epsilon CL$), para estimar el coeficiente de absorción la ecuación se puede dejar de la forma $\epsilon CL = -\ln(I/I_0) - \ln(k)$, en donde la pendiente corresponde a ϵL , como se observa en la Figura 3-22 (Ley de Beer-Lambert).

Figura 3-22: Comportamiento de la absorbancia en función de la concentración.



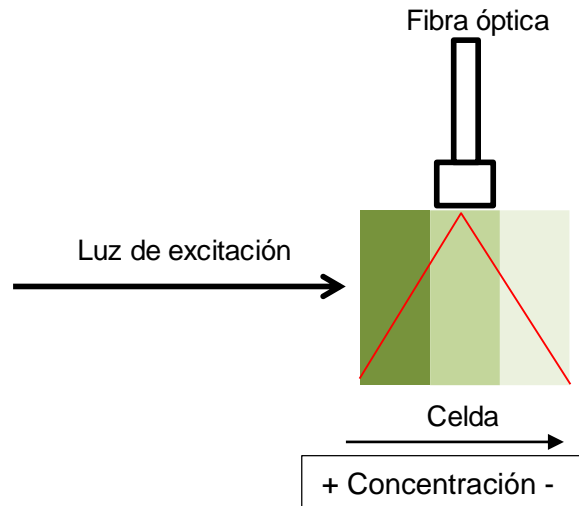
El coeficiente de absorción se encuentra en el mismo orden de magnitud según lo reportado por la literatura (Martin & Lindqvist, 1975), para el caso de 440 nm el $\epsilon = 35411 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, teniendo en cuenta que la celda es de 1 cm.

Lo anterior, además de tener en cuenta lo concerniente a la dependencia de las estructuras químicas de la fluoresceína, puede estar relacionado con una hipótesis de trabajo (producto de esta investigación) denominado “frente de absorción”, en el cual la sustancia de interés se ve afectada por la geometría y la potencia de la luz que es inyectada, de modo que se alcanza el óptimo cuando estas dos variables están alineadas, es decir cuando el fluoróforo estándar está a una concentración determinada (para esta investigación alrededor de 10 ppm), provocando que la mayoría de fotones que ingresan a la celda exciten las moléculas del fluoróforo; y por su parte, la fibra óptica se encuentre en la posición correcta (90°) para capturar la emisión en un instante dado (tiempo de integración).

Por tanto, el frente de trabajo se va moviendo a medida que se diluye la solución de fluorescencia hasta llegar al punto exacto del detector (fibra óptica), lo cual no implica que en las demás posiciones no se genere fluorescencia, sino que el detector es estático y no es capaz de capturar la emisión, de igual forma a altas concentraciones posiblemente se presentan efectos de saturación en donde la fluorescencia es reabsorbida por las

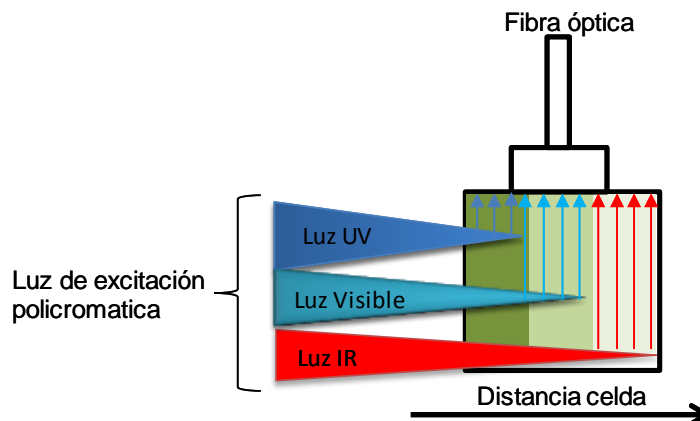
moléculas de la sustancia de interés haciendo que la luz no pueda pasar la primera etapa de absorción (ver Figura 3-23).

Figura 3-23: Representación de la hipótesis de trabajo “frente de absorción”.



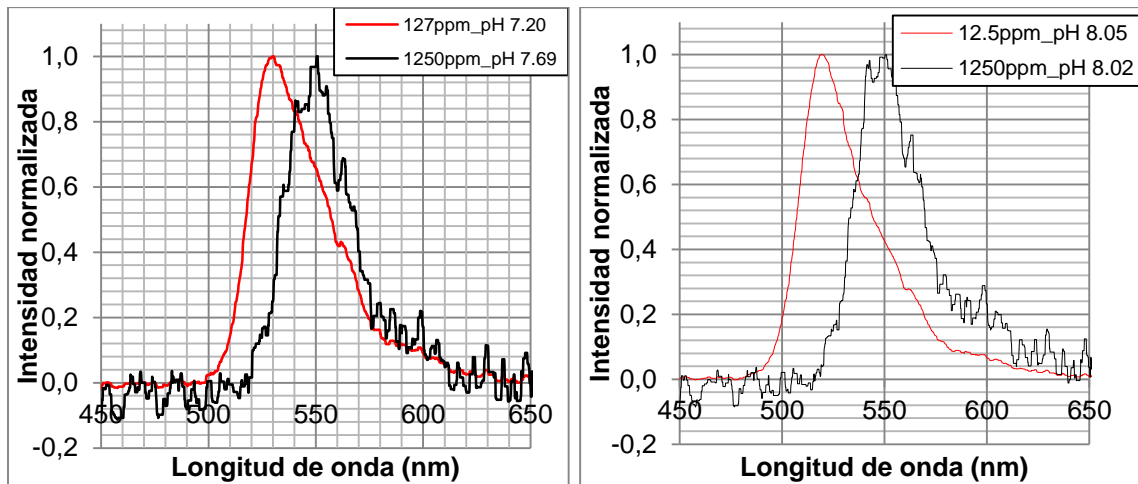
Finalmente, y teniendo en cuenta el comportamiento de absorbanza de la fluoresceína se plantea otra hipótesis de trabajo denominada “filtrado espacial”, lo cual significa que a media que la luz policromática es inyectada en una solución concentrada (aproximadamente > 10 ppm), la absorción ocurre mayoritariamente en la parte del UV, dejando pasar el visible y el infrarrojo, y estos generan a su vez emisión en longitudes de onda mayor (menor energía). La representación de este fenómeno se muestra mediante la Figura 3-24.

Figura 3-24: Representación de la hipótesis de trabajo “filtrado espacial”.



La anterior hipótesis se confirma con los espectros mostrados en la Figura 3-19, en donde el incremento en la intensidad puede ser explicado por el “frente de absorción”, y el corrimiento en longitud de onda se explica por el “filtrado espacial”, debido a que en un mismo pH se debería generar el mismo espectro de emisión, pero el filtrado provoca que se exciten las moléculas por secciones, es decir UV, visible e IR, como se observa en la

Figura 3-25: Variación de los espectros en función de la concentración a alrededor de 7 (izquierda) y 8 (derecha).

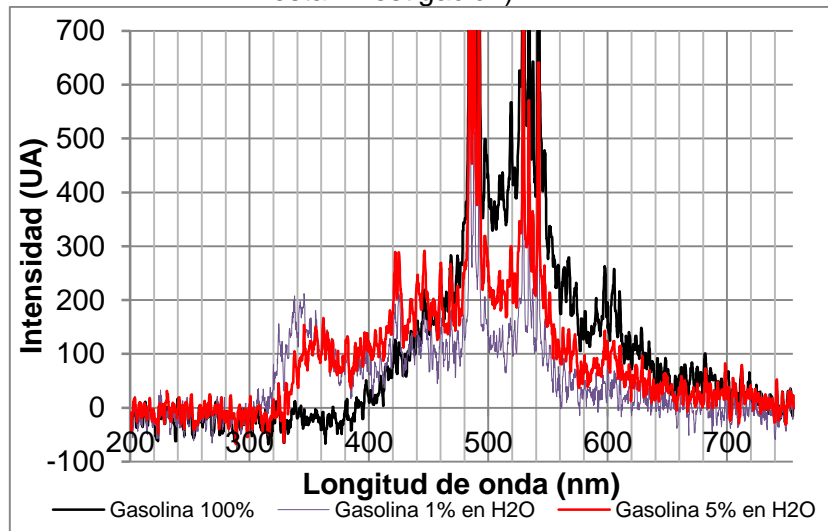


De acuerdo al análisis anterior se concluye que el sistema no es capaz de visualizar la diferencia entre las formas de fluoresceína debido principalmente a los efectos de “frente de absorción” y “filtrado espacial”, se debe trabajar con soluciones mas diluidas, y con una diferencia de pH mayor.

3.2 Pruebas con combustibles.

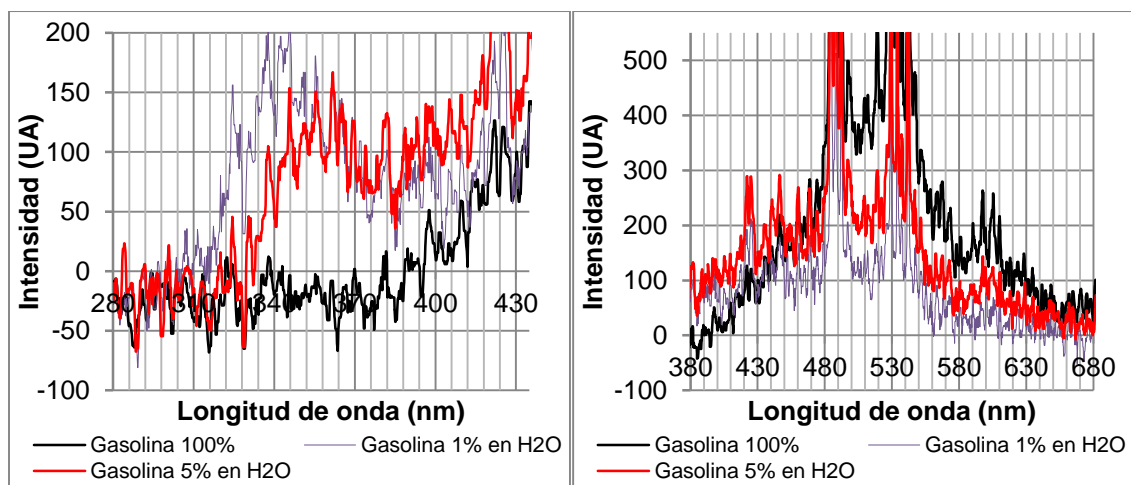
Al igual que con la fluoresceína, y siguiendo el montaje óptico descrito en la Figura 2-3, se realizaron ensayos con muestras de gasolina a diferentes concentraciones (diluida en agua): pura 100%, 5%, y 1%, ver Figura 3-26.

Figura 3-26: Espectros de emisión de gasolina a diferentes concentraciones (Fuente: esta investigación).



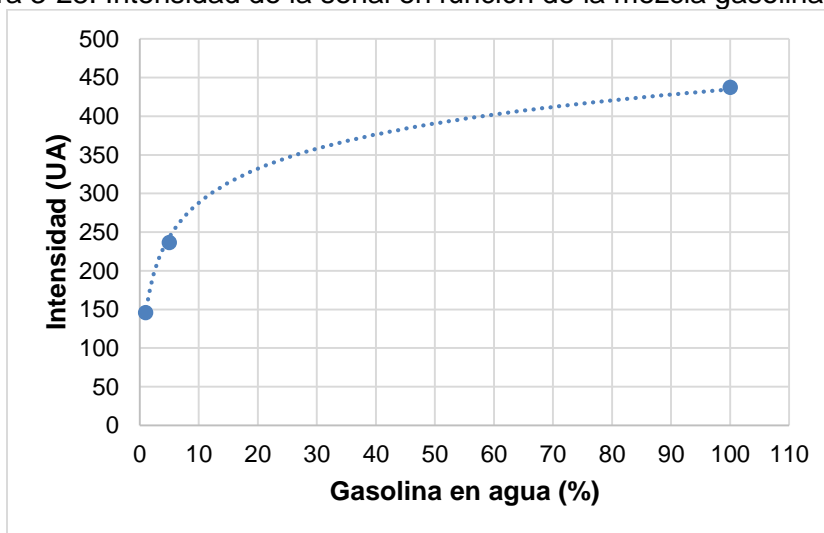
De lo anterior se puede hacer un análisis sobre dos aspectos: 1) el efecto por concentración que se observa en el incremento en la intensidad, desde 385 nm en adelante, y 2) el efecto provocado por el filtrado espacial, que es extrapolado y válido para los espectros de gasolina, teniendo en cuenta que también se ha usado la fuente policromática, evidenciado en la región 330 a 385 nm (ver Figura 3-27).

Figura 3-27: Variación de espectros de gasolina por efectos de filtrado espacial (izquierda) y por concentración (derecha) (Fuente: esta investigación).



Finalmente, en la Figura 3-28 se muestra el comportamiento de la intensidad de la fluorescencia en función al porcentaje de gasolina en agua a 512 nm; longitud de onda que se encuentra en una región no influenciada por reflexión de la fuente usada (PX-2), ni tampoco por el efecto de filtrado espacial. Se observa que el crecimiento de la intensidad no es lineal debido muy posiblemente a la policromaticidad de la fuente usada, generando efectos de segundo orden que no son analizados en esta investigación.

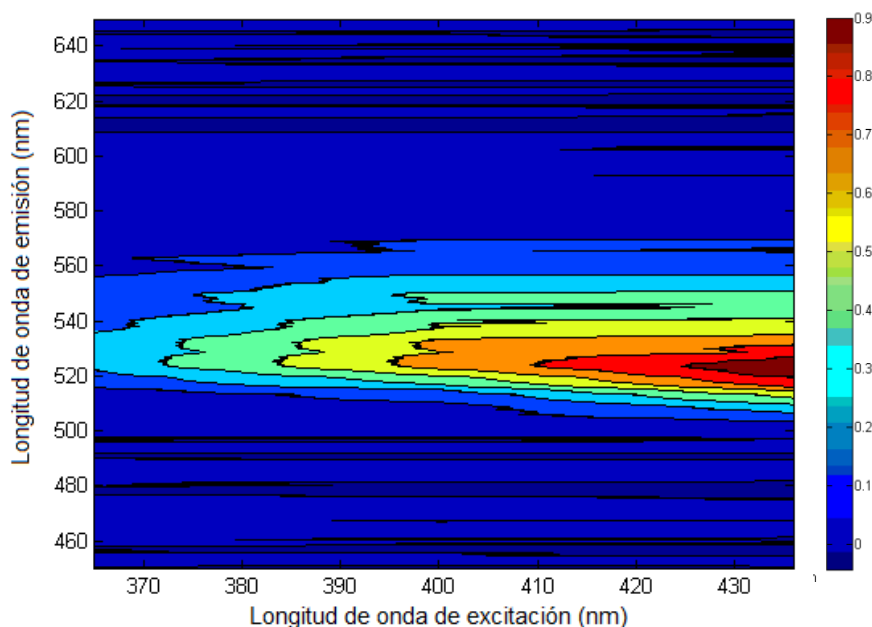
Figura 3-28: Intensidad de la señal en función de la mezcla gasolina-agua.



3.2.1 Generación de EEMs para fluoróforos puros.

Finalmente se logró generar la superficie espectral para fluoresceína, la cual fue excitada con una lámpara policromática (PX-2), como se describió en la sección 2.3.2 *Fuente PX-2*. A partir de los datos obtenidos de los espectros de excitación y los de emisión es posible generar la superficie de EEMs, como se muestra en la Figura 3-29.

Figura 3-29. EEMs preliminar obtenida para la fluoresceína (Fuente: esta investigación).



Con la obtención de la huella EEMs del fluoróforo estándar se evidencia la viabilidad del sistema para la identificación de diferentes concentraciones de un fluoróforo, de modo que el reto es extrapolarlo a combustibles y llegar a detectar la mínima cantidad de contaminante como sea posible (ppb o ppt), y esto servirá de control y monitoreo de contaminantes en cuerpos de agua afectados.

3.2.2 Protocolo propuesto de calibración.

Para llevar a cabo las mediciones de fluorescencia con el sistema desarrollado se debe seguir el siguiente protocolo, de forma tal que se obtengan datos confiables:

1. Calibración espectral Hg, en donde se busca compara la posición estándar contra la medición actual del sistema, tal y como se explicó en la sección 3.1 *Calibración y caracterización del mini espectrómetro*.
2. Revisión transmitancia de los filtros, usando fuente estándar estable por ejemplo LEDs.
3. Solución con fluoróforo estándar, por ejemplo, fluoresceína, en este caso se debe medir con una fuente estable (LEDs), y llevar a cabo la medición de la fluorescencia.
4. Tratamiento de datos.

4. Conclusiones y recomendaciones

En este trabajo se realizó el desarrollo experimental y evaluación de un prototipo instrumental de laboratorio, usando fluoresceína sódica (10%) como fluoróforo trazados, con el cual se desarrolló y alineo el montaje óptico, usando como fuentes de luz LEDs, Lámpara pulsada de Xe (PX-2) y lámpara HID-H4, siendo esta ultima la mejor en términos de costo beneficio, aunque se vea implicada la perdida de monocromaticidad. Es importante resaltar que para buenos resultados de fluorescencia, la fluoresceína debe ser usada en forma diluida para no tener efectos como el frente de absorción y el filtrado espacial en la emisión.

Con el diseño preliminar, se logró detectar emisión del fluoróforo estándar al igual que emisión de gasolina en diferentes concentraciones. Estos ensayos fueron ratificados luego con un sistema: luz policromática seguido de un conjunto de filtros pasa banda que permite excitar en una sola longitud de onda. Se identificó que la intensidad de la emisión de la gasolina a diferentes concentraciones no es lineal, presentando efectos de segundo orden, causados muy probablemente por la policromaticidad de la fuente.

Se logró reconstruir la EEMs del fluoróforo estándar con lo cual se espera mejorar en cuanto al diseño y alineación óptica, de modo que se evite perder luz generada por la fuente.

De igual forma, se logró un desarrollo importante en términos de instrumentación, y si bien el equipo aún no está listo para mediciones en campo, se avanzó en el funcionamiento de la técnica y su viabilidad para una miniaturización posterior.

Asimismo, una calibración del espectrómetro AvaSpec demostró que se puede hacer un ajuste de los parámetros, ya que tiene un error, el cual puede ser subsanado fácilmente. Por el paso del tiempo también se han detectado algunos pixeles “calientes” que detectan

señal en donde no existe, los cuales han sido removidos para los cálculos y análisis realizados.

La razón señal a ruido (SNR) del equipo se comporta bien a pequeños tiempos de integración, y se deteriora a tiempos de integración mayores a 100 ms, es importante hacer un análisis más profundo en este sentido y determinar si el ruido es dependiente de la longitud de onda.

De igual forma se han realizado ensayos con gasolina a diferentes concentraciones, y el diseño experimental actual ha permitido detectar la fluorescencia generada por estos hidrocarburos.

Finalmente, se recomienda para trabajos futuros realizar un seguimiento riguroso al posible decaimiento de la fuente en función del tiempo, debido a que esto impacta los resultados y la reproducibilidad de los ensayos.

Bibliografía

- Alarie, J. P., Vo-Dinh, T., Miller, G., Ericson, M. N., Maddox, S. R., Watts, W., ... Dominguez, M. (1993). Development of a battery-operated portable synchronous luminescence spectrofluorometer. *Review of Scientific Instruments*, 64, 2541–2546. doi:10.1063/1.1143916
- Alostaz, M., Donahue, R., Hall, G., & Biggar, K. W. (2008). Soil type effects on petroleum contamination characterization using ultraviolet induced fluorescence excitation-emission matrices (EEMs) and parallel factor analysis (PARAFAC). *Journal of Environmental Engineering and Science*, 7(6), 661–675. doi:10.1139/S08-037
- Araki, T. and Misawa, H. (1995). Light emitting diode-based nanosecond ultraviolet light source for fluorescence lifetime measurements. *Rev. Sci. Instrum.* 66 (12): 5469-5472.
- Baker, A. (2001). Fluorescence excitation-emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers. *Environmental Science & Technology*, 35(5), 948–53.
- Baker, A. (2002). Fluorescence properties of some farm wastes: Implications for water quality monitoring. *Water Research*, 36(1), 189–195. doi:10.1016/S0043-1354(01)00210-X
- Baker, A., Ward, D., Lieten, S. H., Periera, R., Simpson, E. C., & Slater, M. (2004). Measurement of protein-like fluorescence in river and waste water using a handheld spectrophotometer. *Water Research*, 38(12), 2934–2938. doi:10.1016/j.watres.2004.04.023
- Bierozza, M., Baker, A., & Bridgeman, J. (2012). Exploratory analysis of excitation–emission matrix fluorescence spectra with self-organizing maps—A tutorial. *Education for Chemical Engineers*, 7(1), e22–e31. doi:10.1016/j.ece.2011.10.002
- Booksh, K. S., Muroski, A. R., & Myrick, M. L. (1996). Single-Measurement Excitation/Emission Matrix Spectrofluorometer for Determination of Hydrocarbons in Ocean Water. 2. Calibration and Quantitation of Naphthalene and Styrene. *Analytical Chemistry*, 68(20), 3539–3544. doi:10.1021/ac9602534
- Brown, C.E. and Fingas, M.F. Review of the development of laser fluorosensors for oil spill application. *Marine Pollut. Bulletin* 47: 477-484, 2003

- Bugden, J. B. C., Yeung, C. W., Kepkay, P. E., & Lee, K. (2008). Application of ultraviolet fluorometry and excitation-emission matrix spectroscopy (EEMS) to fingerprint oil and chemically dispersed oil in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 56, 677–685. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.12.022
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. a., & Booksh, K. (2003). Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 37, 5701–5710. doi:10.1021/es034354c
- Chung, Y. G., Schwartz, J., Gardner, C., Sawaya, R., Jacques, S. L., & Anderson, M. D. (1994). Flavin metabolic activity * Time. *SPIE*, 2135.
- Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51(4), 325–346. doi:10.1016/0304-4203(95)00062-3
- DaCosta, R. S., Andersson, H., & Wilson, B. C. (2003). Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 78(4), 384–392. doi:Doi 10.1562/0031-8655(2003)078<0384:Mfemrt>2.0.Co;2
- Dartnell, L. R., Roberts, T. a., Moore, G., Ward, J. M., & Muller, J. P. (2013). Fluorescence Characterization of Clinically-Important Bacteria. *PLoS ONE*, 8(9), 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0075270
- Ecopetrol (2015), Reporte integrado de gestión sostenible 2015. Recuperado de http://www.ecopetrol.com.co/documentos/Ecopetrol_IA_2015_29marzo.pdf
- Escandar, G. M., Olivieri, A. C., Faber, N. (Klaas) M., Goicoechea, H. C., Mu??oz de la Pe??a, A., & Poppi, R. J. (2007). Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(7), 752–765. doi:10.1016/j.trac.2007.04.006
- Esparza-Soto, M., Núñez-Hernández, S., & Fall, C. (2011). Spectrometric characterization of effluent organic matter of a sequencing batch reactor operated at three sludge retention times. *Water Research*, 45, 6555–6563. doi:10.1016/j.watres.2011.09.057
- Fabila, D. A., De La Rosa, J. M., Stolik, S., Moreno, E., Dominguez, J., Mercado, S. M., ... Soto, J. L. (2011). Portable system for measuring fluorescence signals of biological tissue. *IEEE Latin America Transactions*, 9(7), 1012–1017. doi:10.1109/TLA.2011.6129696
- Gatto, E., Malik, M. a, Di Natale, C., Paolesse, R., D'Amico, A., Lundström, I., & Filippini, D. (2008). Polychromatic fingerprinting of excitation emission matrices. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 14(20), 6057–60. doi:10.1002/chem.200800590

- Goldman, J. H., Rounds, S. a., & Needoba, J. a. (2012). Applications of fluorescence spectroscopy for predicting percent wastewater in an urban stream. *Environmental Science and Technology*, 46(8), 4374–4381. doi:10.1021/es2041114
- Gu, Y., Ni, Y., & Kokot, S. (2012). Solid Phase Excitation – Emission Fluorescence Method for the Classification of Complex Substances : Cortex Phellodendri and Other Traditional Chinese Medicines as Examples. *The Journal of Physical Chemistry*, 116, 8949 – 8958.
- Guimet, F., Boqué, R., & Ferré, J. (2004). Cluster analysis applied to the exploratory analysis of commercial Spanish olive oils by means of excitation-emission fluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6673–6679. doi:10.1021/jf040169m
- Guimet, F., Ferré, J., & Boqué, R. (2005). Study of oils from the protected denomination of origin “Siurana” using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis. *Grasas Y Aceites*, 56(4), 292–297. doi:10.3989/gya.2005.v56.i4.95
- Guimet, F., Ferré, J., Boqué, R., Vidal, M., & Garcia, J. (2005). Excitation - emission fluorescence spectroscopy combined with three-way methods of analysis as a complementary technique for olive oil characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9319–9328. doi:10.1021/jf051237n
- Guo, W., Xu, J., Wang, J., Wen, Y., Zhuo, J., & Yan, Y. (2010). Characterization of dissolved organic matter in urban sewage using excitation emission matrix fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *Journal of Environmental Sciences*, 22(11), 1728–1734. doi:10.1016/S1001-0742(09)60312-0
- Hambly, a. C., Henderson, R. K., Storey, M. V., Baker, a., Stuetz, R. M., & Khan, S. J. (2010). Fluorescence monitoring at a recycled water treatment plant and associated dual distribution system - Implications for cross-connection detection. *Water Research*, 44(18), 5323–5333. doi:10.1016/j.watres.2010.06.003
- Hart, S. J., & JiJi, R. D. (2002). Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *The Analyst*, 127, 1693–1699. doi:10.1039/b207660h
- Harvey, E. N. (1957). *A History of Luminescence. From the Earliest Times Until 1900* (p. 692). Philadelphia, United States of America: The American Philosophical Society. doi:10.5962/bhl.title.14249
- Henderson, R. K., Baker, a., Murphy, K. R., Hambly, a., Stuetz, R. M., & Khan, S. J. (2009). Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review. *Water Research*, 43(4), 863–881. doi:10.1016/j.watres.2008.11.027

- Hershberger, L. W., Callis, J. B., & Christian, G. D. (1981). Liquid Chromatography with Real-Time Video Fluorometric Monitoring of Effluents. *Analytical Chemistry*, 53(1), 971–975.
- Hua, B., Dolan, F., Mcghee, C., Clevenger, T. E., & Deng, B. (2007). Water-source characterization and classification with fluorescence EEM spectroscopy: PARAFAC analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87(2), 135–147. doi:10.1080/03067310600922154
- Hudson, N., Baker, A., Ward, D., Reynolds, D. M., Brunson, C., Carliell-Marquet, C., & Browning, S. (2008). Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment? An example from South West England. *The Science of the Total Environment*, 391(1), 149–58. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.10.054
- Jakubíková, M., Sádecká, J., & Májek, P. (2015). Determination of adulterants in adulterant-fruit spirit blends using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy. *Acta Chimica Slovaca*, 8(1), 52–58. doi:10.1515/acs-2015-0010
- Jiménez, R. (2004). *Development and application of uv-visible and MID-IR differential absorption spectroscopy techniques for pollutant trace gas monitoring*. École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL). Retrieved from <http://infoscience.epfl.ch/record/33419>; retrieved 2014-03-24
- Kallir, A. J. (1986). *Total luminescence spectroscopy*. Swiss Federal Institute of Technology.
- Kellerman, A. M., Kothawala, D. N., Dittmar, T., & Tranvik, L. J. (2015). Persistence of dissolved organic matter in lakes related to its molecular characteristics. *Nature Geoscience*, (May). doi:10.1038/ngeo2440
- Kongbonga, Y. G. M. (2011). Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. *Food and Nutrition Sciences*, 02(07), 692–699. doi:10.4236/fns.2011.27095
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp. 1–954). doi:10.1007/978-0-387-46312-4
- Lapworth, D. J., Gooddy, D. C., Butcher, a. S., & Morris, B. L. (2008). Tracing groundwater flow and sources of organic carbon in sandstone aquifers using fluorescence properties of dissolved organic matter (DOM). *Applied Geochemistry*, 23, 3384–3390. doi:10.1016/j.apgeochem.2008.07.011
- Lapworth, D. J. J., Gooddy, D. C. C., Allen, D., & Old, G. H. H. (2009). Understanding groundwater, surface water, and hyporheic zone biogeochemical processes in a Chalk catchment using fluorescence properties of dissolved and colloidal organic matter. *Journal of Geophysical Research*, 114, G00F02. doi:10.1029/2009JG000921

- Lapworth, D. J., & Kinniburgh, D. G. (2009). An R script for visualising and analysing fluorescence excitation–emission matrices (EEMs). *Computers & Geosciences*, 35(10), 2160–2163. doi:10.1016/j.cageo.2008.10.013
- Lozano, V. a., Muñoz de la Peña, A., Durán-Merás, I., Espinosa Mansilla, A., & Escandar, G. M. (2013). Four-way multivariate calibration using ultra-fast high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation–emission detection. Application to the direct analysis of chlorophylls a and b and pheophytins a and b in olive oils. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 125, 121–131. doi:10.1016/j.chemolab.2013.04.005
- Malik, M. A., Gatto, E., Macken, S., DiNatale, C., Paolesse, R., D'Amico, A., ... Filippini, D. (2009). Imaging fingerprinting of excitation emission matrices. *Analytica Chimica Acta*, 635, 196–201. doi:10.1016/j.aca.2009.01.018
- Martin, M. M., & Lindqvist, L. (1975). The pH dependence of fluorescein fluorescence. *Journal of Luminescence*, 10, 381–390. doi:10.1016/0022-2313(75)90003-4
- Martínez, M. T., & Moctezuma, C. L. (2006). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. Espectrofluorimetría. Retrieved February 20, 2016, from <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrofluorimetria.pdf>
- Mason, R. P., & Kerley, G. I. H. (1988). Identification of spilled oils by fluorescence spectroscopy. *Oil and Chemical Pollution*, 4(1), 57–70. doi:10.1016/S0269-8579(88)80010-8
- Muroski, A. R., Booksh, K. S., & Myrick, M. L. (1996). Single-Measurement Excitation/Emission Matrix Spectrofluorometer for Determination of Hydrocarbons in Ocean Water. 1. Instrumentation and Background Correction. *Analytical Chemistry*, 68(20), 3534–3538. doi:10.1021/ac960252b
- Neves, A. C. D. O., Fernandes de Araújo, R., Luiza Cabral de Sá Leitão Oliveira, A., Antunes de Araújo, A., & de Lima, K. M. G. (2014). The use of EEM fluorescence data and OPLS/UPLS-DA algorithm to discriminate between normal and cancer cell lines: a feasibility study. *The Analyst*, 139(10), 2423–31. doi:10.1039/c4an00296b
- Nikolova, K., Zlatanov, M., Eftimov, T., Brabant, D., Yosifova, S., Halil, E., ... Angelova, M. (2013). Fluorescence Spectra from Vegetable Oils Using Violet and Blue LD/LED Excitation and an Optical Fiber Spectrometer. *International Journal of Food Properties*, (November), 131017104116000. doi:10.1080/10942912.2012.700536
- Obeidat, S., Baolong, B., Rayson, G. D., Anderson, D. M., Puscheck, A. D., Landau, S. Y., & Glasser, T. (2008). A multi-source portable light emitting diode spectrofluorometer. *Applied Spectroscopy*, 62(3), 327–332. doi:10.1366/000370208783759722

- Ocean Optics. (n.d.). PX-2 Pulsed Xenon Light Source. Dunedin, FL (USA): Halma Group Company. Retrieved from <http://oceanoptics.com/wp-content/uploads/px-2.pdf>
- Parker, C. A., & Rees, W. T. (1962). Fluorescence Spectrometry. A Review. *Analyst*, 87, 83–111. doi:10.1039/AN9628700083
- Patra, D., & Mishra, a. K. (2001a). Investigation on simultaneous analysis of multicomponent polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in water samples: A simple synchronous fluorimetric method. *Talanta*, 55(1), 143–153. doi:10.1016/S0039-9140(01)00404-0
- Patra, D., & Mishra, A. . (2001b). Study of diesel fuel contamination by excitation emission matrix spectral subtraction fluorescence. *Analytica Chimica Acta*, 454(2), 209–215. doi:10.1016/S0003-2670(01)01568-9
- Patra, D., & Mishra, a. K. (2002). Total synchronous fluorescence scan spectra of petroleum products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(4-5), 304–309. doi:10.1007/s00216-002-1330-y
- Pharr, D. Y., McKenzie, J. K. and Hickman, A. B. (1992), Fingerprinting Petroleum Contamination Using Synchronous Scanning Fluorescence Spectroscopy. *Ground Water*, 30: 484–489. doi:10.1111/j.1745-6584.1992.tb01523.x
- Pingqing, F., Fengchang, W., & Congqiang, L. (2004). Fluorescence excitation-emission matrix characterization of a commercial humic acid. *Chinese Journal of Geochemistry*, 23(4), 309–318. doi:10.1007/BF02871302
- Ramanujam, N. (2000). Fluorescence spectroscopy in vivo. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 20–56. doi:10.1002/9780470027318.a0102.pub2
- Richards-kortum, R. (1995). Fluorescence Spectroscopy of Turbid Media, 667–707.
- Sairof, F. N., & Hamza, M. A. (2013). Prepared of Olive Oil Doped SiO₂ via Sol-Gel Technique, 2013(September), 239–243.
- Satoshi, O., & Nikkei Electronics. (2006). Nichia Unveils White LED with 150 lm/W Luminous Efficiency. Retrieved May 24, 2016, from http://techon.nikkeibp.co.jp/english/NEWS_EN/20061221/125713/
- Sjöback, R., Nygren, J., & Kubista, M. (1995). Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51(6), L7–L21. doi:10.1016/0584-8539(95)01421-P
- Stokes, G. G. (1852). On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 143(January), 463–562. doi:10.1098/rstl.1853.0016
- Stokes, T. (2007). OEM spectrometer module shrinks to inch-cube size. *Photonics Showcase* 17-18.

- Stubbins, a, Lapierre, J.-F., Berggren, M., Prairie, Y. T., Dittmar, T., & Del Giorgio, P. a. (2014). What's in an EEM? Molecular Signatures Associated with Dissolved Organic Fluorescence in Boreal Canada. *Environmental Science & Technology*, 48, 10598–10606. doi:10.1021/es502086e
- Tanaka, K., Kuma, K., Hamasaki, K., & Yamashita, Y. (2014). Accumulation of humic-like fluorescent dissolved organic matter in the Japan Sea. *Scientific Reports*, 4, 5292. doi:10.1038/srep05292
- Taniyasu, Y., Kasu, M. and Makimoto, T. (2006). An aluminium nitride light-emitting diode with a wavelength of 210 nanometres. *Nature* 441: 325-328.
- Thoss, V., Baird, M. S., & Lock, M. a. (2000). The development of a chemical “fingerprint” to characterise dissolved organic matter in natural waters. *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, 2(5), 398–403. doi:10.1039/b002935I
- Turner, G. K. (1964). An absolute Spectrofluorometer. *American Association for the Advancement of Science*, 146(3641), 183–189.
- Valeur, B. (2001). *Related Titles from WILEY-VCH Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas Handbook of Analytical Techniques Single-Molecule Detection in Solution . Methods and Applications. Methods* (Vol. 8, pp. 84–86). doi:10.1002/3527600248
- Virk, H. S. (2015). History of Luminescence from Ancient to Modern Times. *Defect and Diffusion Forum*, 361(January 2015), 1–13. doi:10.4028/www.scientific.net/DDF.361.1
- Wallace, J. (2006). Deep-UV LEDs appear on the market. *Laser Focus World* 42 (5): 36-37.
- Wu, B., Gayen, S. K., & Xu, M. (2014). Fluorescence spectroscopy using excitation and emission matrix for quantification of tissue native fluorophores and cancer diagnosis, 8926, 89261M. doi:10.1117/12.2040985
- Xiao, N., Chen, Y., Chen, A., & Feng, L. (2014). Enhanced Bio-hydrogen Production from Protein Wastewater by Altering Protein Structure and Amino Acids Acidification Type. *Scientific Reports*, 4, 1–9. doi:10.1038/srep03992
- Ziegmann, M., Abert, M., Müller, M., & Frimmel, F. H. (2010). Use of fluorescence fingerprints for the estimation of bloom formation and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, 44(1), 195–204. doi:10.1016/j.watres.2009.09.035
- Zhou, Z., Guo, L., Shiller, A. M., Lohrenz, S. E., Asper, V. L., & Osburn, C. L. (2013). Characterization of oil components from the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico using fluorescence EEM and PARAFAC techniques. *Marine Chemistry*, 148, 10–21. doi:10.1016/j.marchem.2012.10.003

Zhou, Z., Liu, Z., & Guo, L. (2013). Chemical evolution of Macondo crude oil during laboratory degradation as characterized by fluorescence EEMs and hydrocarbon composition. *Marine Pollution Bulletin*, 66(1-2), 164–175.
doi:10.1016/j.marpolbul.2012.09.028