

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de alternativas, integración y evaluación de un instrumento prototipo para la identificación y cuantificación de hidrocarburos mediante espectroscopia de excitación-emisión

Juan Camilo Cely Garzón

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2017

Desarrollo de alternativas, integración y evaluación de un instrumento prototipo para la identificación y cuantificación de hidrocarburos mediante espectroscopia de excitación-emisión

Juan Camilo Cely Garzón

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Ambiental

Director:

Rodrigo Jiménez Pizarro, Ph.D.

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

2017

A Dios y a mi familia

Agradecimientos

Deseo agradecer a las personas e instituciones que permitieron el desarrollo de este proyecto de tesis.

De manera especial quiero agradecer a mi director de tesis, Rodrigo Jiménez Pizarro, Ph.D.; por el apoyo, paciencia y la guía brindada a lo largo de estos años. Agradezco sus enseñanzas, motivación y ejemplo de vida.

A Marcelo Raponi, Ph.D. investigador del CEILAP (CITEDEF – CONICET). Agradezco su apoyo en mi investigación durante mi estancia de entrenamiento en Buenos Aires, Argentina.

A los ingenieros Óscar Lombana y Luis Hernández, por su amistad, consejos y conocimientos compartidos.

A la Universidad Nacional de Colombia, por la beca asistente docente que me fue otorgada durante mi periodo en la maestría, lo cual posibilitó mi dedicación en tiempo completo en la investigación del proyecto.

Grupo de Investigación de Calidad del Aire. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Resumen

La contaminación de aguas residuales por hidrocarburos es un problema ambiental en el país. Es la dispersión de la contaminación de hidrocarburos en bajas concentraciones la que se constituye en el objeto de análisis de esta investigación. Esta contaminación es generada fundamentalmente por derrames de petróleo debido a ataques a la infraestructura y por derrames accidentales. Con la dispersión se llegan a generar un impacto sobre las aguas superficiales y acuíferos en la región. Estos derrames ocurren en zonas rurales apartadas de los centros urbanos, por lo que se debe comprender el monitoreo del agua como una herramienta para disminuir los efectos causados por la contaminación en la salud humana y en el equilibrio natural. El objetivo de la investigación se fundamenta en la generación de un prototipo instrumental para la medición de la contaminación de aguas por hidrocarburos in – situ como herramienta en la identificación y cuantificación de hidrocarburos en agua. Se utilizará una técnica espectrométrica con características adecuadas a los propósitos del prototipo. Es la técnica de matriz de excitación-emisión (EEMS) la que permite que el monitoreo a partir del prototipo sea rápida, multivariable, remota y para la identificación de una variedad considerable de hidrocarburos en bajas concentraciones. Para esto se realizó la caracterización del prototipo, el diseño conceptual y la mejora del montaje experimental óptico montado. También se llegó a proponer una técnica de análisis espectrométrico para la aplicación de la EEMS considerando cualquier tipo de fuente de luz. Al aplicar la técnica y el instrumento en la medición de sustancias fluorescentes proxy a los hidrocarburos se llegó a demostrar la posibilidad de la aplicación en la identificación cuantitativa de hidrocarburos comerciales y mezclas.

Palabras clave: contaminación de aguas; contaminación por hidrocarburos; fluorescencia, matriz de excitación-emisión; monitoreo; huellas de excitación emisión.

Abstract

Hydrocarbon waste water pollution is an environmental issue in the country. Is the hydrocarbon pollution at low concentration the key of the research analysis. This pollution is generated by oil spills due to terrorist attacks to the infrastructure and also by accidental pills from the industries. With the dispersion generated an environmental impact to the superficial waters and to the regional aquifers takes place. That occurred generally in rural areas far away from the urban centers, In order to understand the water monitoring as a tool for the reduction of the main effects caused by the pollution in the health and the environmental balance. The principal research objective is based in the building of an instrumental prototype for the water pollution measurement caused by hydrocarbons *in-situ* for the quantification and detection. For this reason, it was used a spectrometric technique with adequate characteristics for the prototype. Is the excitation-emission matrix spectroscopy (EEMS) technique that allows the rapid, multivariable, remote monitoring tool for the detection of several hydrocarbon bends at low concentration. For this reason, it has been made the prototype characterization, the conceptual design and the upgrade of the optical experimental arrange. In addition, the proposal of an spectrometric analysis technique for the usage of EEMS with the consideration of the emission light source. The results demonstrate the viability of the usage of the prototype in the quantitative detection of commercials hydrocarbons and bends.

Keywords: water pollution; hydrocarbon pollution; fluorescence; excitation-emission matrix spectroscopy; monitoring, EEMS fingerprint.

Contenido

	Pág.
1. Marco teórico.....	25
1.1 Fundamentos de espectrometría de fluorescencia	25
1.1.1. Introducción a la espectrometría	25
1.1.2. Interacción entre la radiación y la materia	27
1.1.3. Características de la luz.....	29
1.1.4. Elementos de la espectrometría	30
1.1.5. Fluorescencia	33
1.1.6. Diagrama de Jablonski o diagrama de las transiciones electrónicas.....	34
1.1.7. Espectroscopia de fluorescencia	36
1.2 Instrumentación para la espectroscopia de fluorescencia.....	40
1.2.1 Aplicaciones	41
1.3 Espectrometría de matriz de Excitación – Emisión (EEMS).....	42
1.3.1 Aplicaciones de la técnica de espectrometría de matriz de excitación-emisión (EEMS).	44
2. Metodología	46
2.1 Hacia un instrumento demostrativo	46
2.1.1. Diseño conceptual	48
2.1.2. Montaje experimental.....	49
2.1.3. Tabla óptica	50
2.1.4. Espectrómetro: Avantes AvaSpec 3648.....	51
2.1.5. Filtros ópticos	52

2.2.	Caracterización del prototipo	54
2.2.1.	Desarrollo en el instrumento prototipo	54
2.2.2.	Fase de automatización del sistema: Software y control hardware	55
2.2.3.	Calibración del espectrómetro	63
2.2.4.	Filtros disponibles en el montaje óptico	66
2.3.	Desarrollo del método de inversión	70
2.3.1.	Descripción del método de inversión	71
3.	Análisis y discusión de resultados	73
3.1.	Evaluación de alternativas de fuentes de luz.....	73
3.1.1.	Consideraciones para la escogencia de fuentes de luz.....	74
3.1.2.	Relación con el espectrómetro.....	76
3.1.3.	Fuentes de luz disponibles - Caracterización de las fuentes y lámparas.....	77
3.1.4.	Alternativas de fuentes y lámparas de bajo costo	80
3.1.5.	Tiempo de vida de la fuente, potencia y costo en el instrumento	81
3.1.6.	Mediciones con una fuente de luz tipo LED	84
3.1.7.	Caracterización fuente de luz de Xenón HID H4	86
3.2.	Caracterización del prototipo	98
3.2.1.	Efectos del ambiente en los espectros de emisión.....	98
3.2.2.	Dispersión de la luz	99
3.2.3.	El ruido en los sensores.....	104
3.2.4.	Pruebas de manejo térmico y electrónico al prototipo	107
3.2.5.	Ensayos de linealidad	108
3.3.	Ensayos de mezclas.	113
3.3.1.	Filtros digitales utilizados para el procesamiento espectral.....	113
3.3.2.	Fluoróforos proxy.....	115
3.3.3.	Ensayos antraceno, hexano y acetona	119
3.3.4.	Ensayos fluoróforos proxy: Quinina (Agua tónica) & Eosina	123
3.3.5.	Límite de saturación Eosina.....	127
3.3.6.	Ensayos Mezclas fluoróforos	130
3.3.7.	Matrices de excitación – emisión adquirida con el prototipo.....	134
3.4.	Diseño, empaque y ajuste de un instrumento prototipo	135

3.4.1. Prototipo fuente Xenón HID H4 y mecanización	136
3.4.2. Mecanización de la rueda de paso bandas	137
3.5. Evaluación del método de inversión	142
3.5.1. Resultados a partir de matrices sintéticas.....	142
4. Conclusiones y recomendaciones.....	146
4.1. Conclusiones.....	146
4.1.1. Preparación de muestras ambientales.....	148
4.2. Perspectivas.....	149
4.2.1. Fase III – Miniaturización y automatización del prototipo	149
Anexos	151
A. Recursos físicos:	151
B. Inventario de materiales y equipos.....	152
1) Especificaciones: Filtro pasa banda Edmund Optics - 525 nm.....	154
2) Especificaciones: Placa Arduino UNO – Diagrama <i>PinOut</i>	155
3) Montaje óptico EEMS	156
C. Especificaciones: montaje caracterización fuente HID H4	157
1) Posicionador métrico direcciones XYZ.....	157
2) Soporte adaptador para el Posicionador métrico XYZ.....	157
3) Base para Posicionador métrico XYZ – para la vinculación con una mesa óptica. Unidades en milímetros. Tomado: Edmund Optics.	158
4) Coraza de vidrio protectora en los faros halógenos.	158
5) Datos del FWHM para la lámpara de mercurio	159
D. Evaluación de alternativas de fuentes de luz.....	162
E. Espectros de absorción emisión teóricos	163
F. Ensayos de límite de detección	164
G. Ensayos mezclas – Eosina Violeta.....	165
H. Efecto del orden del filtro digital de mediana sobre los espectros adquiridos. .	167
1) Para orden N= 5 & 10	167
2) Para orden N= 15 & 20	167
3) Para orden N= 50 & 60	168
I. Compuestos y analitos:.....	169

1) Cotización analito – sulfato de quinina.....	169
Bibliografía	170

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Longitud de onda de emisión de una serie de Leds representando la fuente de excitación. Adaptado de (Obeidat et al., 2008).....	30
Figura 1-2. Rejillas de difracción de 100, 200 y 300 líneas por milímetro. Tomado de: http://www.animations.physics.unsw.edu.au/jw/light/diffraction-grating-spectroscopy.html	32
Figura 1-3. Difracción originada por la rejilla para fuentes luminosas en base a sodio, mercurio y de bombillos incandescentes y una vela común. Adaptado de “The Australian Office for Learning and Teaching / Physclips – light” (2017).	32
Figura 1-4. Excitación de una muestra en una cubeta originando la emisión de luz de diferente longitud de onda a la luz incidente. La luz incidente es de mayor energía a la luz transmitida.....	33
Figura 1-5. El espectro electromagnético como función de la longitud de onda, la frecuencia (Hz) y la energía (kcal).(Sauer & Hofkens, 2011).	33
Figura 1-6. Diagrama de Jablonski (Transiciones electrónicas). Adaptado de (Jablonski, A.,1935).....	35
Figura 1-7. Espectros de excitación y emisión de una muestra orgánica. (A) Fuente de luz Xenón, (B) espectro de excitación filtrado por un paso banda de 525nm, (C) espectro de emisión.....	38
Figura 1-8. Espectro de absorción (línea verde) y emisión de fluorescencia (línea roja) del tolueno. El solvente utilizado para la medición es ciclohexano. (Quina, 1976).	39
Figura 1-9. Gráficas de EEMS para (a) petróleo, (b) etanol, (c) diésel y (d) biodiesel. (Kumar & Mishra, 2012).	43
Figura 2-1. Montaje experimental fase I proyecto.	49
Figura 2-2. Diseño de la tabla óptica. Unidades en centímetros. (Lombana, 2016).	50
Figura 2-3. Espectrómetro AvaSpec – 3648.	51
Figura 2-4. Longitud de onda del espectro luminoso. (www.acuaristas.cl).....	52
Figura 2-5. Espectro de medición de una fuente de Xenón HID y la salida de emisión luego del paso por un filtro dicróico	54

Figura 2-6. Interfaz de usuario del Avasoft. (Avantes,2017).	56
Figura 2-7. Visualización de la GUI Avantes – MatLab. A través de esta GUI se permite la adquisición de mediciones obtenidas con el Avantes 3648 utilizando la “AS – 5216 – dll” de Avantes. Solo se permite la visualización del espectro medido.	58
Figura 2-8. Apartado del código base para la lectura de archivos binarios generados por AvaSoft para la posterior lectura e interpretación en MatLab.....	60
Figura 2-9. Placa de Arduino Uno. (www.arduino.cc)	60
Figura 2-10. Comunicación de Arduino con MatLab. (Mathworks,2017).....	63
Figura 2-11. Señal espectral obtenida a partir de la Fuente Hg – Pencil. Mediciones tomadas en modo absorción (alineación directa entre la fuente y la fibra del espectrómetro).	64
Figura 2-12. Fuente Hg – Pencil. Mediciones tomadas en modo absorción (alineación directa entre la fuente y la fibra del espectrómetro).	65
Figura 2-13. Función característica del espectrómetro FWHM para el rango de longitud de onda de 240.2512 – 261.1538 nm. Valor del FWHM = 0.70208 nm.	65
Figura 2-14. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico.	67
Figura 2-15. Ubicación según el rango en longitud de onda de los filtros del sistema óptico.	67
Figura 2-16. Intensidad de la señal que pasa a través de un dicróico a un tiempo de integración (15 ms) que llega a la celda de fluorescencia del arreglo óptico Para los filtros dicróicos de 377nm (azul) y 525nm (rojo).....	68
Figura 2-17. Intensidad de la señal que pasa a través de un dicróico a un tiempo de integración (15 ms) que llega a la celda de fluorescencia del arreglo óptico Para los filtros dicróicos de 320nm (azul) y 334nm (rojo).....	69
Figura 2-18. Intensidad de la señal que pasa a través de un dicróico a un tiempo de integración (15 ms) que llega a la celda de fluorescencia del arreglo óptico Para los filtros dicróicos de 400nm (azul) y 436nm (rojo), 568nm (negro) y 365nm (verde).	70
Figura 3-1. Intensidad de luz medida por un espectrómetro para diferentes fuentes de luz. Medición realizada con una distancia de 50cm entre el detector y la fuente de luz. (Fuente: Adaptado de (Venugopalan, 2016)).....	79
Figura 3-2. Potencia de salida de las fuentes UV, pulsadas de Xenón/continuas de Xenón, lámparas de Deuterio y fuentes de mercurio. (Fuente: Adaptado de (Venugopalan, 2016)).....	81
Figura 3-3. Tiempo de vida de las fuentes UV, pulsadas de Xenón y Xenón, lámparas de Deuterio y fuentes de mercurio. (Fuente: Adaptado de (Venugopalan, 2016)).	82
Figura 3-4. Medición emisión LED UV – 1. Tiempo de integración = 500ms.....	84

Figura 3-5. Medición emisión “LED” - infrarrojo. Región espectral del visible al infrarrojo cercano. Tiempo de integración=50 ms.....	85
Figura 3-6. Comparación medición emisión LED’s UV	86
Figura 3-7. Fuente HID - H4 con coraza metálica utilizada en el prototipo. Color 6000K. (Fuente: http://www.amazon.es/luces-xenon-centralitas-slim-6000k/dp/B00D1SVTGC). 87	87
Figura 3-8. Intensidad de la señal proveniente de la fuente HID H4 que llega a la celda de fluorescencia del arreglo óptico.	88
Figura 3-9. Ensayos Fuentes Tipo HID H4. Cada uno de las fuentes HID obtenidas está clasificada alfabéticamente y por el año de adquisición.....	89
Figura 3-10. Tiempo de estabilización fuente HID H4. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico.....	90
Figura 3-11. Tiempo de estabilización fuente HID H4. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico.....	91
Figura 3-12. Tiempo de estabilización fuente HID H4. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico.....	92
Figura 3-13. Comparación entre días HID H4. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico.....	93
Figura 3-14. Variación espectral fuente HID. Mediciones realizadas el 12 de abril de 2017 y el 14 de mayo de 2017 usando el filtro dicróico de 525nm. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico	93
Figura 3-15. Variación espectral fuente HID - Filtro 525nm	94
Figura 3-16. Posicionador XYZ (Small X-Y-Z Axis Leadscrew Drive Stage), Edmund Optics.....	95
Figura 3-17. Caracterización de la fuente HID en función a la posición relativa. Se establece un punto de origen (posición x: 0, y: 0, z: 0) para luego medir la variación de la señal adquirida por el espectrómetro en por el cambio en posiciones horizontales y verticales. No se realiza variación hacia adelante o hacia atrás. Cada una de las posiciones es un paso de 2mm.	96
Figura 3-18. Ensayos fuente HID H4 sin coraza de vidrio. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en una alineación fuente – detector a 30 cm.	97
Figura 3-19. Consideraciones en cuanto a la celda portadora de la muestra. Para las mediciones de fluorescencia se presenta el frente de absorción causado por la concentración. (Lombana, 2016).....	100
Figura 3-20. Influencia de la celda UV & H2O en la absorción – excitación filtro 525nm, tiempo de integración = 20ms.	101
Figura 3-21. Filtro dicróico 525nm.....	102

Figura 3-22. Transmitancia espejo – fuente HID H4, tiempo de integración=200ms..... 103

Figura 3-23. Transmitancia espejo – fuente HID H4, tiempo de integración=200ms..... 104

Figura 3-24. Desviación estándar para los datos Noise (ruido) con respecto al tiempo de integración (ms)..... 106

Figura 3-25. Efecto térmico – medición fuente posterior apagado/encendido..... 107

Figura 3-26. Efecto térmico – medición fuente posterior apagado/encendido..... 108

Figura 3-27. Espectro policromático fuente HID H4 – variación de la intensidad (modo absorción) en función del tiempo de integración..... 109

Figura 3-28. Espectro policromático fuente HID H4 – variación de la intensidad (modo absorción) en función del tiempo de integración..... 110

Figura 3-29. Variación de la intensidad de excitación como función del tiempo de integración – filtro 365nm. 111

Figura 3-30. Intensidad de excitación a longitud de onda constante (365.008nm) para los tiempos de integración medidos Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico. 112

Figura 3-31. Espectros filtrados con diferentes métodos. Panel superior: filtro de mediana de orden 10, panel medio: espectro sin filtrar (normal), panel inferior: espectro filtrado con Savitzky – Golay de grado 3 y marco de 45. 114

Figura 3-32. Espectros filtrados con diferentes métodos. Panel superior: filtro de mediana de orden 10, panel medio: espectro sin filtrar (normal), panel inferior: espectro filtrado con Savitzky – Golay de grado 3 y marco de 45. 115

Figura 3-33. Dilución a saturación de antraceno en Hexano. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico con un tiempo de integración=200ms y con el filtro dicróico de 377nm. 119

Figura 3-34. Señal espectral de emisión del hexano. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico con un tiempo de integración de 12000ms..... 120

Figura 3-35. Espectro de emisión de acetona pura. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. 121

Figura 3-36. Espectro de emisión de Ginger Schweppes (Lote: 2015). Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. 122

Figura 3-37. Espectro de emisión de Azúcar comercial en agua destilada. Muestra llevada a saturación. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. 123

Figura 3-38. Espectro de emisión de diferentes marcas de agua tónica. Muestra llevada a saturación. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1000ms.124

Figura 3-39. Espectro de emisión de agua tónica “Canada Dry” de diferentes lotes. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1000ms.....125

Figura 3-40. Comparación entre lotes de agua tónica. (Ejes secundarios). Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1000ms.....126

Figura 3-41. Espectro de emisión de agua tónica “Canada Dry”. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1060ms.....127

Figura 3-42. Espectro de emisión de diluciones de eosina en agua destilada. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 525nm. Medición realizada en el montaje óptico.128

Figura 3-43. Espectro de emisión de diluciones de eosina en agua destilada. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 525nm. Medición realizada en el montaje óptico.129

Figura 3-44. Emisión eosina 30ppm excitación policromática fuente HID tiempo de integración de 100ms129

Figura 3-45. Espectro de emisión eosina a 30ppm. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico.130

Figura 3-46. Emisión acetona – agua tónica “Canada Dry”. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1000ms.....131

Figura 3-47. Espectros emisión – excitación policromática. Emisión eosina – agua tónica “Canada Dry”. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 sin utilizar filtro dicróico. Medición realizada en el montaje óptico.....132

Figura 3-48. Emisión eosina – agua tónica “Canada Dry” a diferentes concentración en volumen. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 sin utilizar filtro dicróico. Medición realizada en el montaje óptico.133

Figura 3-49. Emisión eosina – agua tónica “Canada Dry” a diferentes concentración en volumen. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 utilizando el filtro de 525nm. Medición realizada en el montaje óptico.133

Figura 3-50. Panel superior: intensidad de emisión para la gasolina Extra Esso (obtenida agosto 2016) con la fuente HID filtrada con todo el arreglo de dicróicos disponible en el

montaje. Panel inferior: Huella de matriz de excitación-emisión para la gasolina Extra Esso.	134
Figura 3-51. Huella de matriz de excitación-emisión para la gasolina plus Texaco (Obtenida agosto 2016) Excitación generada con la fuente HID filtrada con todo el arreglo de dicróicos en la región de 365 a 400nm.	135
Figura 3-52. Montaje sistema óptico para técnica EEMS desarrollado en la fase I.	136
Figura 3-53. Montaje sistema óptico para técnica EEMS desarrollado. Incluye una fuente de luz de Xenón HID – H4, una rueda de filtros pasa banda, una celda de cuarzo.....	137
Figura 3-54. Sistema óptico del prototipo. (1). Rueda de filtros dicróicos de 12 posiciones Edmund Optics. (2) celda UV con muestra con porta-cubetas, (3) Mini espectrómetro Avantes 3648.	138
Figura 3-55. Módulo Arduino: Motor 28BYJ – 48 (Motor Unipolar de paso). Software utilizado: Fritzing.	139
Figura 3-56. Driver de arreglo ULN2003 Darlington.....	140
Figura 3-57. Sistema completo del motor de paso 28BYJ-48. (1) Placa de Arduino UNO, (2) driver ULN2003 Darlington, (3) motor de paso unipolar 28BYJ-48.	140
Figura 3-58. Montaje sistema óptico para técnica EEMS desarrollado incluyendo mecanización de la rueda de filtros pasa banda.	141
Figura 3-59. Planos de rueda de filtros pasa banda (bandpass) para impresión 3D.	142
Figura 3-60. Panel superior: espectro teórico de excitación policromática. Panel inferior: espectro de emisión observado.	143
Figura 3-61. Panel superior: Matriz de excitación-emisión teórica. Panel inferior: Matriz de excitación-emisión recuperada.	145

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Tipos de luminiscencia. Adaptado de (Valeur & Berberan-Santos, 2011).....	28
Tabla 3-1. Criterios para la escogencia de fuentes de luz en aplicaciones de espectrometría de fluorescencia.....	75
Tabla 3-2. Implicaciones por considerar de la fuente y su relación con el espectrómetro. (Fuente: Propia).	77
Tabla 3-3. Características de las fuentes de luz en aplicaciones espectrométricas. (Venugopalan, 2016).....	78
Tabla 3-4. Análisis del costo típico de un instrumento de medición espectrométrico. Adaptado de (Crystal IS, 2016).	83
Tabla 3-5. Regiones de excitación – emisión para hidrocarburos encontrados en la literatura.	116
Tabla 3-6. Resumen de las regiones de excitación – emisión para hidrocarburos encontrados en la literatura.	117
Tabla 3-7. Lista de fluoróforos para ser utilizados como proxy a hidrocarburos.	118

Introducción

En Colombia la industria petrolera es una de las más importantes en la economía interna. En contraste a su crecimiento, ésta se ve afectada por la problemática de la contaminación ambiental causada por los derrames de petróleo. Esto genera efectos económicos relevantes, así como de salud pública. Se estima que de los derrames de petróleo ocurridos en el país la gran mayoría corresponde a los ocasionados por voladuras de oleoductos por parte de grupos subversivos. Según cifras del gobierno, estos ataques a la infraestructura petrolera son causantes del derrame de alrededor de 4 millones de barriles de petróleo (El tiempo, 2014). El entendimiento del impacto de la contaminación en las aguas superficiales y acuíferos por hidrocarburos es hoy un asunto de importancia por los efectos en salud humana y de equilibrio ambiental (Guard & Laughlin, 1983; Samimi, Rad, & Ghanizadeh, 2009; Wang & Fingas, 1997). Se hace necesario ante esta problemática la investigación de los efectos de la contaminación por hidrocarburos y su toxicidad, como del desarrollo de acciones preventivas, de seguimiento continuo (mediciones localizadas) y de identificación de áreas críticas.

La medición de contaminación por hidrocarburos en cuerpos de agua se realiza mediante sistemas espectrométricos clásicos de laboratorio (Parker & Rees, 1962; White, 1964), entre otros. Se caracterizan por su alta sensibilidad a compuestos orgánicos, selectividad en la detección de compuestos específicos en mezclas complejas de hidrocarburos; así como la comparabilidad y precisión en condiciones de laboratorio (Turner, 1964). Para el monitoreo de contaminación en aguas, se requiere de infraestructura adecuada para adquisición de muestras, así como para garantizar la operación de estos sistemas.

Para la medición in situ se requiere de un sistema menos robusto y que permita un nivel de detección y de identificación similar a los equipos clásicos, así como unos tiempos adecuados de procesamiento de la información y que sean de bajo nivel de control. Sugiere a su vez de la utilización de fuentes de excitación apropiadas para el trabajo de campo, de fácil reemplazo, calibración y disposición. En cuanto al sistema espectrométrico se busca que éste sea miniaturizado, pero de resolución suficiente para la adquisición de señal

proveniente de la muestra de agua a estudiar. A su vez, se necesita un sistema de interpretación de información simple e indicativo de las características de composición de mezclas complejas.

La aplicación de la técnica espectrométrica de matriz de excitación-emisión ha sido utilizada para la determinar la huella de hidrocarburos en aguas marinas (Bugden, Yeung, Kepkay, & Lee, 2008), la caracterización de efluentes de materia orgánica en industrias (Esparza-Soto, Núñez-Hernández, & Fall, 2011), monitoreo de aguas residuales (Carstea, Baker, Bierozza, & Reynolds, 2010), como en el estudio de la contaminación en ríos y cuerpos de agua de contenido orgánico y biológico (Lapworth, Gooddy, Allen, & Old, 2009; Martinsen & Stedmon, 2006; Muroski, Booksh, & Myrick, 1996), como la identificación de aceites adulterados (Nikolova et al., 2013). Es mediante el análisis de huella de excitación – emisión que se puede llegar a la clasificación e identificación de productos aromáticos en mezclas complejas (Pharr, McKenzie, & Hickman, 1992).

Desarrollos previos han demostrado la viabilidad de utilización de arreglos de diodos emisores de luz (LED) para espectroscopia de fluorescencia en el monitoreo materia orgánica disuelta (Hart, 2006; Hart & JiJi, 2002a), otros de similar arreglo de fuentes de excitación en donde se utiliza la técnica de matriz de fluorescencia para la respuesta espectral de tejidos vivos (Fabila et al., 2011), como también en el análisis de la luminiscencia de vegetales (Obeidat et al., 2008). También se encuentran instrumentos portables con otros tipos de fuentes de excitación, como es el caso de las lámparas de Xenón pulsadas que son utilizadas para medición sincrónica de hidrocarburos (Alarie et al., 1993), con resultados experimentales para antraceno y para mezclas de hidrocarburos. El anterior desarrollo utiliza un complejo arreglo de fotodiodos y fotomultiplicadores para la medición de la respuesta espectral de la muestra de análisis.

Éste presente trabajo de investigación se constituye como la continuación de los avances en técnica y aplicación realizados en el proyecto de investigación “Desarrollo tecnológico y evaluación de un prototipo para el análisis de la contaminación de aguas mediante fluorescencia de matriz de excitación-emisión” (Lombana, 2016) . En el proyecto mencionado, a partir de ensayos controlados de laboratorio determinó la viabilidad de la técnica de matriz de fluorescencia para la medición y cuantificación de hidrocarburos en aguas, con productos como el establecimiento de los límites de detección del equipo espectrométrico AvaSpec 3648 (Avantes ©) y de la respuesta espectral de emisión de

fluoróforos comparables a hidrocarburos, así como en mezclas sintéticas de hidrocarburos. Ya con los avances en teoría y técnica, así como de montaje experimental se busca el desarrollo de un instrumento prototipo de laboratorio que permita una posterior medición de muestras ambientales con contaminación por hidrocarburos.

El desarrollo de sistemas de medición de contaminación por hidrocarburos es una manera eficaz de medir impactos ambientales y del desarrollo de estrategias de remediación y control. La investigación reportada en este documento se refiere al desarrollo de un instrumento prototipo en el cual se utiliza la técnica espectrométrica de matriz de excitación – emisión para la cuantificación de hidrocarburos. Se realiza la evaluación y ensayo de fuentes de luz de bajo costo con potencial de aplicación en esta técnica de medición espectral, así como el diseño e integración del prototipo y los resultados de las mediciones obtenidas en el instrumento al relacionar la respuesta espectral de la emisión de fluoróforos puros y de mezclas sintéticas sobre rangos de concentración definidos.

Por lo anterior, el objetivo general de la investigación es *desarrollar, integrar y evaluar un prototipo instrumental de laboratorio que permita detectar, identificar espectralmente y cuantificar fluoróforos, incluyendo hidrocarburos puros o diluidos mediante espectroscopia de matriz de excitación-emisión (EEMS).*

Los objetivos específicos desarrollados son:

1. *Identificar y ensayar fuentes de luz de bajo costo y evaluar su potencial para aplicaciones EEMS específicas.*
2. *Diseñar e integrar un prototipo operacional de laboratorio de características adecuadas.*
3. *Evaluar y calibrar la respuesta espectral del prototipo, incluyendo linealidad y límite de detección, con fluoróforos puros y mezclas sintéticas sobre rangos amplios de concentración a partir ensayos controlados.*

1.Marco teórico

1.1 Fundamentos de espectrometría de fluorescencia

Los sistemas de detección de la radiación de la luz son herramientas útiles para la identificación de sustancias puras y de mezclas. A través de técnicas que utilizan estos instrumentos, se ha podido avanzar en el entendimiento de la contaminación de aguas por sustancias que interactúan con la luz, de esta manera permitiendo llegar a diferentes contextos de aplicación tanto a nivel experimental como en la industria.

En este capítulo se mostrarán los conceptos básicos de la espectrometría, la fluorescencia y la introducción a la técnica y al instrumento utilizado en el desarrollo del proyecto, así como las bases para el entendimiento de las principales características asociadas a la espectrometría, así como su alcance, aplicación y diversificación.

1.1.1. Introducción a la espectrometría

La ciencia moderna utiliza una variedad de técnicas asociadas a la interacción de la luz con la materia con el fin de entender y describir fenómenos que ocurren espontáneamente. Entre los principales métodos se encuentra la espectrometría de fluorescencia. La espectrometría de fluorescencia tiene como fundamento la absorción y la emisión de luz en diferentes longitudes de onda. Una sustancia puede absorber una luz incidente en una

dirección para luego ser excitada y emitir una luz de diferente color en todas direcciones. Por lo general éste fenómeno se observa cuando una muestra es excitada con luz ultravioleta (UV) y emite luz visible¹.

El fenómeno de emisión de luz se denomina fluorescencia, y las sustancias con la propiedad de emisión de luz se denominan fluoróforos. Por lo general los fluoróforos son asociados a moléculas simples, con bajo peso molecular y son comúnmente asociadas a los hidrocarburos aromáticos.

Las sustancias fluorescentes absorben a una determinada longitud de onda y emiten a otra específica. Esta característica hace que se pueda utilizar esta propiedad para la medición de un espectro de emisión. La fluorescencia ocurre a nivel molecular y es mediante la utilización de un instrumento que utilice espectrometría que se puede llegar a la elaboración del espectro único de la sustancia o de la mezcla fluorescente. El avance tecnológico ha permitido relacionar valores de intensidad de la señal luminosa de emisión y traducirlos en unidades arbitrarias cuantificadas en el espectrómetro. Con estas mediciones se pueden detectar concentraciones de fluoróforos dispersos en soluciones homogéneas, de esta manera permitiendo identificar un amplio rango de concentraciones de sustancias fluorescentes sin importar el medio en donde se encuentren dispersos.

Por este motivo, la técnica espectrométrica permite la medición de la respuesta espectral de sustancias en medios complejos considerando las posibles interacciones que pueda tener con el medio dispersante. Es el agua uno de los medios dispersantes más significativos en la investigación científica del tema, debido a su importancia y a que es común en varias áreas de aplicación.

Particularmente la contaminación del agua es una aplicación relevante. Colombia es un país con una historia relacionada a la exploración petrolera de hidrocarburos. Cuenta con un gran potencial de explotación de crudos a lo largo de la nación, así como reservas probadas. Debido a la importancia de la industria de los hidrocarburos en el país, se hace necesario contar con instrumentos que permitan la trazabilidad de los posibles impactos ambientales del vertimiento de hidrocarburos en cuerpos de agua originados de manera

¹ Según el “Gold Book” de la IUPAC, se define la región visible como el espectro electromagnético extendido entre 400 – 760 nm. En esta región de longitud de onda el ojo humano es sensible.

accidental, así como producto de atentados a la infraestructura. Colombia es un país con un historial de derrames de petróleo importante, y se hace necesaria la identificación, así como el monitoreo de vertimientos de hidrocarburos en aguas superficiales.

Es mediante la utilización de técnicas que permitan la identificación de la presencia de hidrocarburos en bajas concentraciones que se podrá alcanzar el entendimiento del problema de contaminación por hidrocarburos en las regiones del país, así como su utilización como una posible herramienta para el control y monitoreo de vertimientos in situ para su posterior caracterización.

1.1.2. Interacción entre la radiación y la materia

La luz es una onda y una partícula. Ha sido estudiada como onda electromagnética a través de experimentos de difracción y de interferencia (Glenn Elert, n.d.).

La radiación interactúa con la materia en términos de las partículas fundamentales. De esta manera, es a través de estudios probabilísticos que se puede llegar a estimar si esta interacción se realizará con el núcleo del átomo o con los mismos electrones. Se estima que la interacción con los electrones es más probable a comparación que con los núcleos. Como efectos de la interacción de la radiación con la materia se tienen principalmente los fenómenos de excitación electrónica y la ionización.

La luz puede ser producida de dos maneras:

Incandescencia: Se relaciona con la emisión de radiación de un cuerpo caliente². Denominada también como luz fría (Valeur, 2001).

Luminiscencia: Es la emisión de luz al excitar electrones, llevándolos a un nivel superior de energía a uno inferior. Puede ser o no un cuerpo caliente.

En la luminiscencia se considera que la emisión de luz es función de la fuente de la excitación energética, de esta manera si se considera que hay una emisión de luz continua, debe haber una fuente continua exterior al sistema. Este suministro de energía está

² Un cuerpo caliente con temperatura igual o mayor a 800 K.

relacionado con partículas de alta energía o por la descarga luminosa de una fuente. También se considera en la luminiscencia la energía proveniente de una reacción química (quimioluminiscencia), la cual puede ser de origen químico o biológico (bioluminiscencia) que es cuando estas reacciones de producción energética toman lugar dentro de organismos vivos.

La luminiscencia como emisión de luz comprende los rangos espectrales desde radiación UV pasando por el espectro visible hasta la radiación infrarroja.

Tabla 1-1. Tipos de luminiscencia. Adaptado de (Valeur & Berberan-Santos, 2011)

Fenómeno	Modo de excitación
Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia)	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizante (Rayos X, alfa, beta, gamma)
Catodoluminiscencia	Rayos catódicos (Haz de electrones)
Electroluminiscencia	Campo eléctrico
Termoluminiscencia	Calentamiento posterior a un almacenamiento de energía
Quimioluminiscencia	Procesos químicos (p.e. oxidación)
Bioluminiscencia	Procesos bioquímicos
Triboluminiscencia	Fuerzas electrostáticas
Sonoluminiscencia	Ultrasonidos

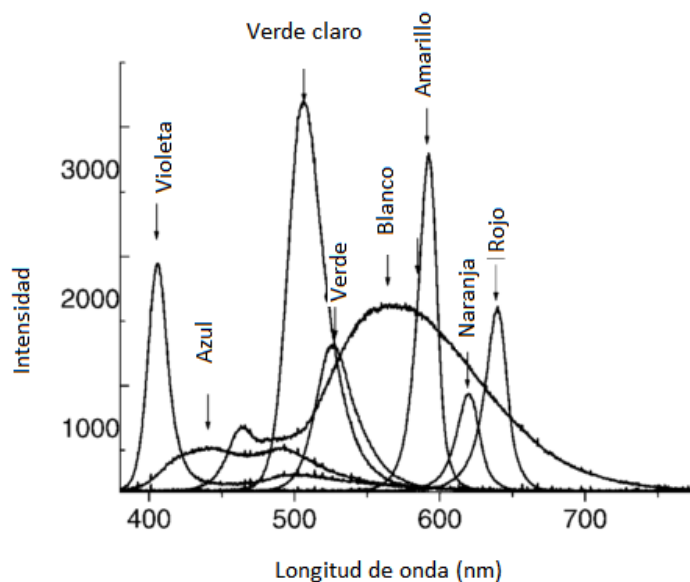
1.1.3. Características de la luz

Siendo la luz por definición una onda, las ondas de luz tienen características comunes a las ondas, como son:

- *Intensidad*: Como medida de la densidad de poder de la luz.
- *Brillo*: Definida como la intensidad relativa que es percibida por un observador.
- *Frecuencia*: La frecuencia de una onda de luz es relacionada con su color. Es definida en términos de qué tan rápido la onda vibra. Dependiendo de la frecuencia a la cual la luz es absorbida, la molécula es elevada a un nivel vibracional determinado.
- *Luz monocromática*: Es la luz con una sola frecuencia. Por ejemplo, un Láser es considerado una fuente monocromática.
- *Luz policromática*: Es la luz que se describe en términos de varias frecuencias. Se considera que casi todas las fuentes de luz son policromáticas. La luz blanca es una fuente policromática.

Al relacionar la luz en términos de su intensidad y su frecuencia se puede expresar en términos gráficos como un espectro. Un espectro de luz puede ser continuo (con un rango determinado de longitud de onda) o discreto, en donde se relaciona solamente con una frecuencia.

Figura 1-1. Longitud de onda de emisión de una serie de Leds representando la fuente de excitación. Adaptado de (Obeidat et al., 2008).



1.1.4. Elementos de la espectrometría

La espectroscopia es el estudio de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Existen tres elementos principales que se deben considerar en las mediciones espectrométricas (Ramanujam, 2000):

- Irradiación de una muestra con radiación electromagnética.
- Medición de la absorción, de la emisión espontánea en forma de fluorescencia o de fosforescencia y de la dispersión (Principalmente se considera la dispersión de Rayleigh y la dispersión inelástica de Raman).
- Análisis e interpretación de las mediciones.

La espectroscopia mide la interacción de la radiación con la materia principalmente en la región UV – visible, en la región cercana al infrarrojo “NIR” por sus siglas en inglés, en el infrarrojo (IR).

Para la adquisición de señal de respuesta espectral por un espectrómetro, se consideran los siguientes elementos fundamentales:

- Fuente Luminosa
- *Óptica dispersiva*: Constituida por la rejilla de dispersión.
- *Detectores*: pueden ser elementos fotográficos, elementos simples, sistemas multicanales
- *Imagen*: En la que cada pixel de una imagen cumple la función de adquirir información de los datos de intensidad de un espectro medido.
- Procesamiento de la señal.

Por lo general, un espectrómetro simple se constituye por una señal luminosa de ingreso, un detector y una rejilla de difracción.

Fuentes luminosas:

Las fuentes de radiación son las encargadas de generar un haz de luz que pueda ser utilizado para la excitación del analito problema. Como fuente de luz debe ser potente y estable, lo cual permite que las mediciones adquiridas por el espectrómetro sean replicables. Difieren entre sí por su cobertura espectral (rango de luz en el espectro), por la emisión de luz continua o discontinua.

Rejilla de difracción:

La rejilla de difracción es una parte fundamental del espectrómetro. Se considera que ocurre difracción³ debido a que la onda luminosa es distorsionada por las características propias del material cuyas dimensiones son cercanas a la de la longitud de onda. Una rejilla es un set de fuentes estrechas y paralelas que se utilizan para separar un haz de luz incidente con un rango de longitud de onda en uno más simple. Se encarga de la difracción y separación de la luz en haces con diferentes direcciones terminales. Las direcciones de

³ Según la IUPAC, la difracción es una modificación de la luz que se origina al pasar por los bordes de cuerpos opacos o a través de hendiduras estrechas o por ser reflejada por superficies cristalinas.

los haces de luz son función del espaciamiento de las rejillas y de la longitud de onda de la luz en donde se efectúa la dispersión.

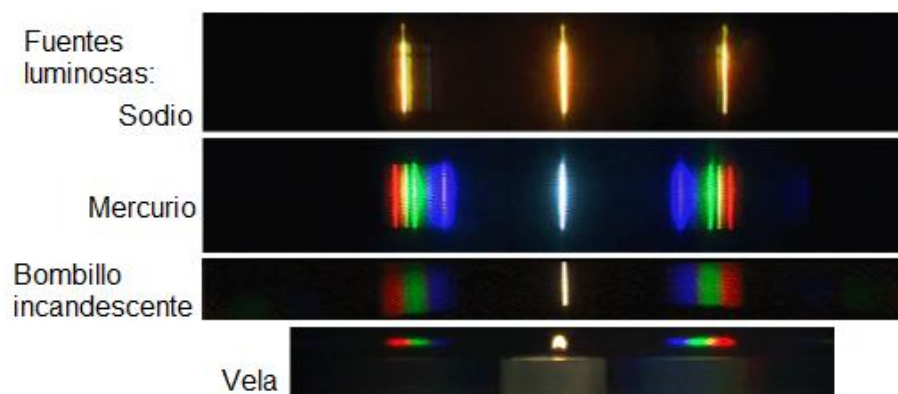
Figura 1-2. Rejillas de difracción de 100, 200 y 300 líneas por milímetro. Adaptado de: <http://www.animations.physics.unsw.edu.au/jw/light/diffraction-grating-spectroscopy.html>



La resolución de las rejillas de difracción es función de los *slits* o hendiduras presentes por milímetro en el material. De tal manera que una rejilla con cerca de 600 líneas por milímetro permite un rango espectral de cerca de un nanómetro en identificación posterior en el detector del espectrómetro.

En la siguiente figura se muestra la difracción originada por la rejilla al someterla a varios tipos de fuentes luminosas.

Figura 1-3. Difracción originada por la rejilla para fuentes luminosas en base a sodio, mercurio y de bombillos incandescentes y una vela común. Adaptado de (The Australian Office for Learning and Teaching / Physclips – light, 2017).



1.1.5. Fluorescencia

Cuando un haz de luz atraviesa un material ocurre una interacción entre el material y la energía con varios efectos. Ocurre que una parte de la energía proveniente de la luz incidente es absorbida, una parte es reflejada, otra es transmitida y una parte es dispersada.

Figura 1-4. Excitación de una muestra en una cubeta originando la emisión de luz de diferente longitud de onda a la luz incidente. La luz incidente es de mayor energía a la luz transmitida.

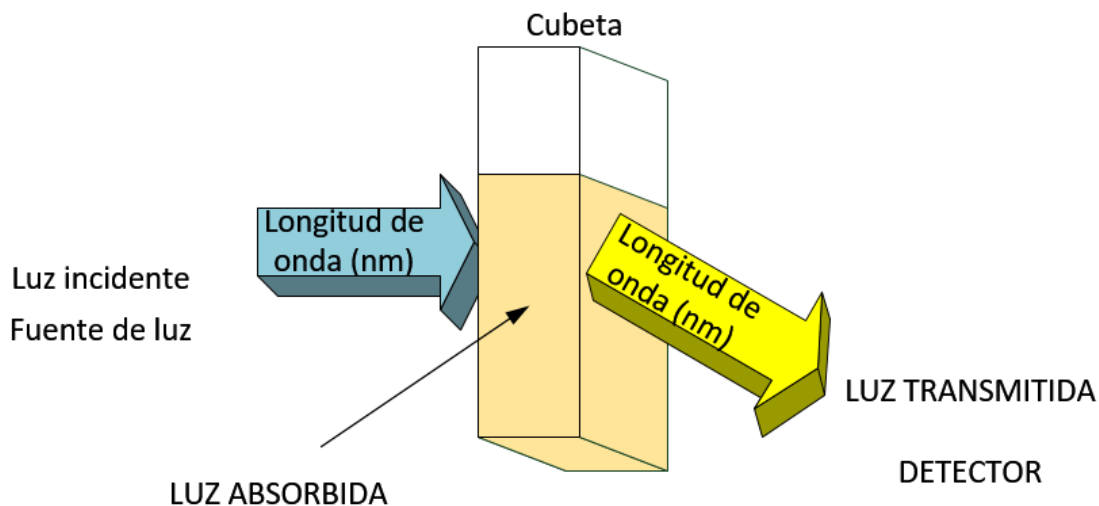
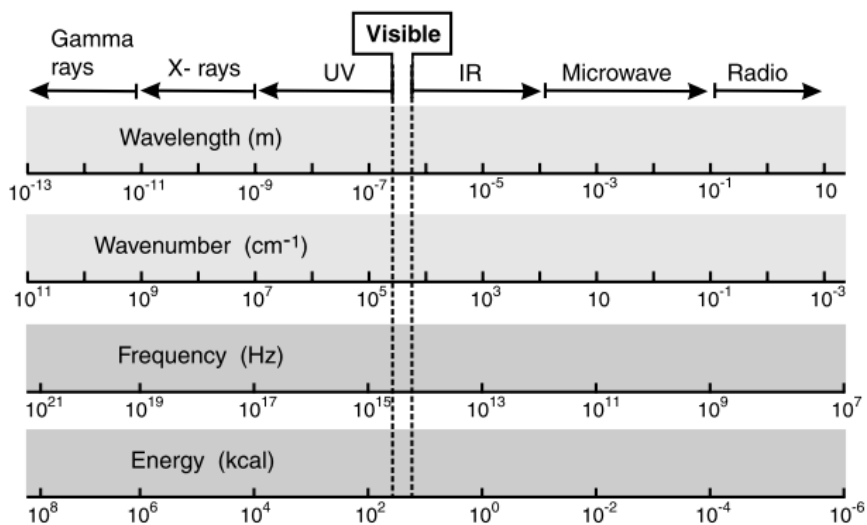


Figura 1-5. El espectro electromagnético como función de la longitud de onda, la frecuencia (Hz) y la energía (kcal). (Sauer & Hofkens, 2011).



La absorción es descrita a través del producto $h\nu$ ⁴. Considerando por ejemplo la cantidad de energía contenida en un haz de luz UV se conoce que esta cantidad es suficiente llevar una molécula de un nivel de baja energía a un estado electrónicamente excitado, en el cual la energía puede ser convertida en otras formas de energía como la rotacional, vibracional, energía cinética o en energía química, o en algunos casos parte de la energía puede ser reemitida como un producto $h\nu$ de menor nivel, como es el caso de la fluorescencia o de la fosforescencia.

La fluorescencia ocurre por lo general en tres pasos:

- a) Equilibrio térmico, el cual se alcanza rápidamente cuando el electrón realiza una transición no radiativa del nivel vibracional más bajo al primer nivel excitado.
- b) El electrón entonces realiza la transición radiativa al nivel vibracional del estado basal.
- c) El electrón realiza una transición no – radiativa al nivel vibracional más bajo

El fenómeno de la fluorescencia fue descrito por primera vez por Stokes en 1852 (Stokes, 1852). En el artículo realizado por Stokes se menciona que, a partir de observaciones de la luz del sol, y como ésta es reflejada en lentes que hacen incidir el haz de luz a un medio de vidrio coloreado, se logró observar una emisión de luz en una solución de quinina que al inicio era incolora. Análisis posteriores demostraron que la solución de quinina que utilizó Stokes en su experimento absorbe la luz en la región del ultravioleta (UV).

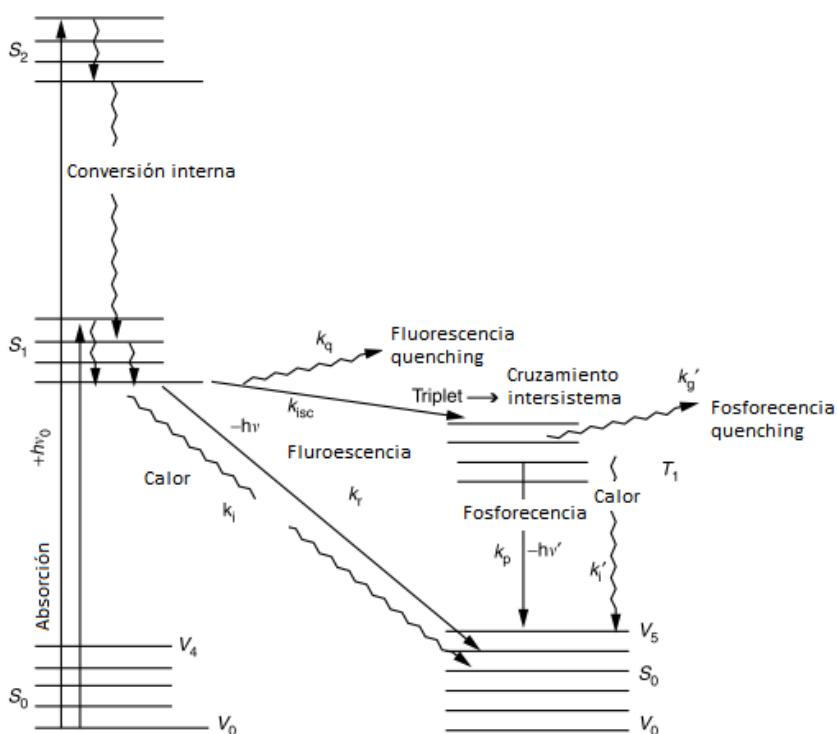
1.1.6. Diagrama de Jablonski o diagrama de las transiciones electrónicas

Los fenómenos de absorción de la luz llevan a los electrones de las moléculas a pasar de un nivel fundamental electrónico (nivel basal) a un estado excitado. Estos electrones volverán a su nivel de energía basal S_0 siguiendo dos etapas sucesivas (Albani, 2007):

⁴ Donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de la luz.

1. La molécula volverá a su estado inicial energético luego de disipar una parte de su energía en los alrededores (conversión interna).
2. A partir del estado energético excitado, la molécula volverá a alcanzar su nivel de energía basal a través de alguno de los siguientes procesos:
 - *Fluorescencia*: emisión de un fotón a una tasa radiativa constante.
 - *Calor*: parte de la energía absorbida es disipada.
 - *Quenching molecular*: las moléculas excitadas pueden liberar una parte de su energía a las moléculas próximas.
 - Cruzamiento intersistema.

Figura 1-6. Diagrama de Jablonski (Transiciones electrónicas). Adaptado de (Jablonski, A., 1935).



El diagrama de Jablonski es útil para el entendimiento de los fenómenos de absorción y emisión de luz. En este diagrama se ilustra el comportamiento molecular al ser sometido a excitación electrónica. En cada uno de los niveles energéticos, los fluoróforos pueden existir en un número determinado de niveles vibracionales V_i (Lakowicz, 2006). Las

transiciones entre estados son representadas como líneas que ilustran los procesos de absorción de luz. La absorción y la emisión ocurren a partir de moléculas con niveles bajos de energía vibracional. Para poder llevar las moléculas del nivel S_0 a uno superior se utiliza como fuente energética la luz. Al ser excitados con esta fuente, pueden ocurrir una serie de procesos. Uno de ellos es la liberación de luz de menor energía a la de la fuente lumínica de excitación, llamada fluorescencia. La emisión de la fluorescencia ocurre como consecuencia del retorno al nivel de menor energía vibracional.

En este diagrama los electrones de las sustancias que son excitadas por la fuente de luz son los responsables de las diferentes transiciones energéticas descritas. En este caso, las sustancias que emiten luz como resultado de la excitación son denominadas fluoróforos, mientras que las sustancias que absorben la energía de excitación son cromóforos. La emisión ocurre a partir del estado excitado S_1 sin importar la longitud de onda con la cual se originó. Por este motivo, la energía de la emisión es independiente de la longitud de onda de excitación.

1.1.7. Espectroscopia de fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia se constituye como el método espectroscópico óptico más utilizado para mediciones analíticas. Debido a su amplio rango de aplicación, no solamente es conocido en términos de la investigación científica sino también en la práctica industrial como una herramienta de caracterización, cuantificación, monitoreo y control de sustancias.

Un espectro de fluorescencia es la representación de la relación de la intensidad (que cuantifica los fenómenos mencionados) medida en un rango de longitud de onda de emisión y excitación. Los espectros resultantes de la excitación del fluoróforo son independientes de las características de longitud de onda de la fuente de luz. Esto es conocido como la Regla de Kasha. De esta regla se estipula que el rendimiento cuántico y se explica de manera generalizada como que los espectros de fluorescencia muestran poca dependencia con la longitud de onda de excitación.

Características

Como características sobresalientes frente a otras técnicas de medición se encuentra (Jiménez-Pizarro, 2004):

- Sensibilidad: medición a bajas concentraciones.
- Selectividad: como la capacidad de detectar y cuantificar especies en una mezcla con un instrumento.
- No destructivo del analito: Para la medición de la respuesta espectral no es necesario incurrir en un cambio químico de la sustancia, puede conservar las características iniciales. No es necesario incluir algún tipo de solvente para la mejora de la señal.
- Rapidez en la medición: definida en términos de bajo tiempo de muestreo para alcanzar la detección con un nivel aceptable de precisión.
- Ambientalmente amigable: No requiere consumibles, ni sustancias químicas para calibración.
- Amplio rango dinámico: La detección de compuestos no está limitada a una ventana espectral en específico.

Existen dos reglas principales de la espectrofluorimetría para el análisis químico:

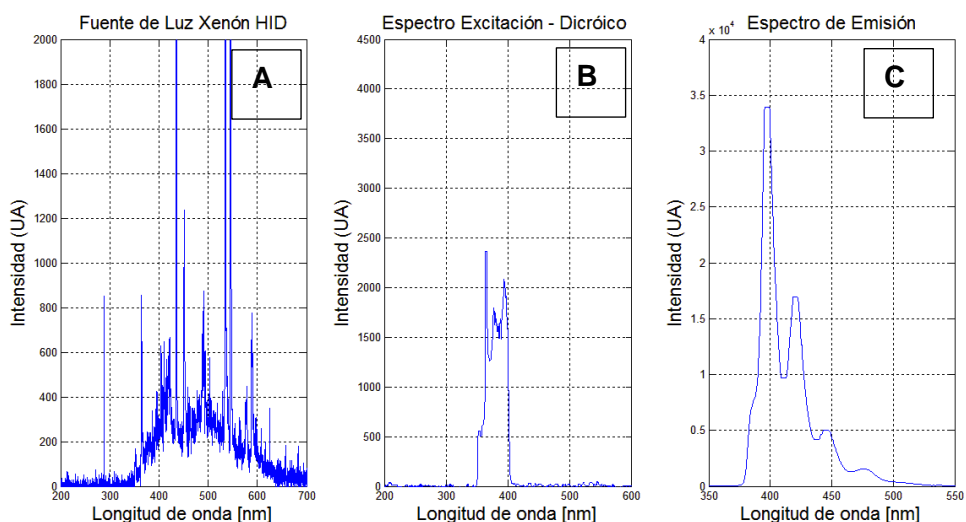
1. La forma del espectro de emisión de fluorescencia de una solución que contiene solo una especie fluorescente será independiente de la frecuencia de la luz utilizada para la excitación.
2. La forma del espectro de excitación será directamente proporcional al coeficiente de extinción molecular⁵ del soluto

⁵ El coeficiente de extinción molecular se define como la capacidad de absorción de luz a una longitud de onda específica.

Espectro de emisión de fluorescencia

El espectro de fluorescencia es la relación de la intensidad de luz adquirida por el espectrofotómetro y su disgregación en longitudes de onda. El instrumento usando una rejilla de difracción clasifica electrónicamente por longitud de onda la cantidad de fotones incidentes, para luego transcribir estos resultados en señales. Posterior a la adquisición de los datos de intensidad (en unidades arbitrarias) y de longitud de onda, se puede llegar a relacionar en un diagrama de dispersión las mediciones.

Figura 1-7. Espectros de excitación y emisión de una muestra orgánica. (A) Fuente de luz Xenón, (B) espectro de excitación filtrado por un paso banda de 525nm, (C) espectro de emisión.



Según las características de la fuente de excitación, se puede llegar a obtener un espectro de emisión de fluorescencia. En el caso de que se cuente con una fuente de luz policromática (composición de luz en un amplio rango espectral), como la relacionada en la figura anterior, el procedimiento usado en las mediciones espectrométricas es utilizar una región de este espectro policromático, asemejarlo a un espectro monocromático para por medio de un arreglo de filtros (lentes) ópticos y finalmente hacerlo incidir en la sustancia fluorescente para luego medir la respuesta de emisión de la sustancia. En el ejemplo, se utiliza una fuente de luz de Xenón (A), un filtro paso banda de 377nm (Edmund Optics), resultando el espectro de excitación (B) de menor cobertura espectral, asemejándose a una fuente monocromática. Esta luz filtrada cuenta con una intensidad, anchura de banda

espectral y con un nivel energético. El espectro resultante (C) es la señal de emisión de fluorescencia del analito adquirida por el espectrofotómetro.

Espectros moleculares

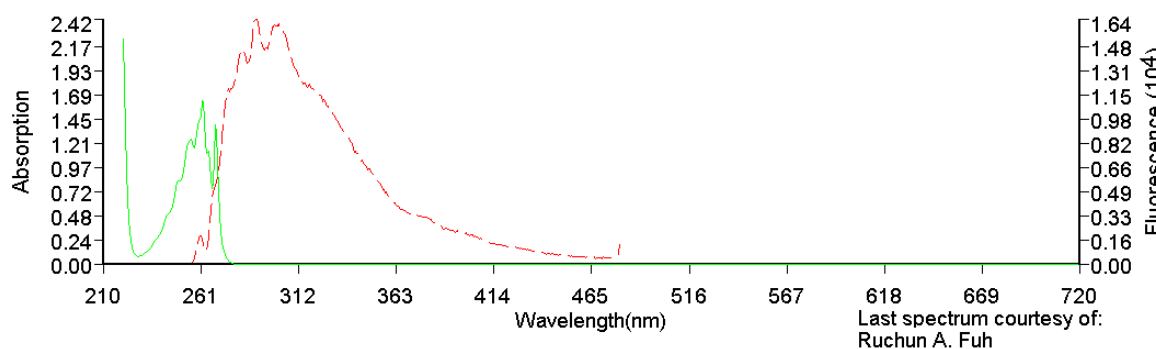
Las características de los espectros de emisión de fluorescencia son función directa de las características moleculares de la sustancia.

Los átomos al combinarse entre sí para formar moléculas cambian estructuralmente en términos de los orbitales presentes. De la combinación de átomos surgen nuevos orbitales moleculares en los cuales los electrones pueden estar presentes según las teorías de probabilidad. Por este motivo, moléculas simples poseen características únicas en cuanto a las posibles transiciones electrónicas que se puedan presentar. Al alterarse las transiciones electrónicas posibles, cambia, por lo tanto, la energía de la molécula.

Por este motivo, según la estructura molecular se obtendrá un único espectro de emisión. Las estructuras moleculares de los componentes orgánicos por lo general permiten los procesos de excitación y emisión; debido a esto, son los compuestos orgánicos el principal grupo de sustancias fluorescentes.

Además de la dependencia de la estructura atómica del fluoróforo, los espectros de emisión son afectados por las características del solvente (Martínez & Moctezuma, 2006)

Figura 1-8. Espectro de absorción (línea verde) y emisión de fluorescencia (línea roja) del tolueno. El solvente utilizado para la medición es ciclohexano. (Quina, 1976).



Los temas de aplicación de la espectroscopia de fluorescencia son diversos y por lo general de carácter interdisciplinar.

La espectroscopia de fluorescencia es comúnmente aplicada a fármacos y compuestos orgánicos presentes en matrices acuosas, como por ejemplo el agua, riles, orina, entre otros.

Eficiencia cuántica y coeficiente de extinción

Es la medición y análisis de las características de la sustancia fluorescente, tales como su eficiencia cuántica y el tiempo de vida de emisión. La eficiencia cuántica de la fluorescencia es definida como el número de fotones de fluorescencia que son emitidos por el número de fotones absorbidos, esto se relaciona con el coeficiente de extinción en el hecho de que según sea el coeficiente de extinción tendrá una mayor o menor capacidad de ser absorbido en una región de longitud de onda específica (Thermo Fisher Scientific, n.d.).

1.2 Instrumentación para la espectroscopia de fluorescencia.

Los arreglos espectrométricos contienen tres partes básicas:

- Fuente de luz
- Recolector de muestra
- Detector (Espectrofluorómetro)

La fuente de luz debe tener la cobertura espectral necesaria para que se pueda llevar a cabo la excitación de las muestras fluorescentes, por tal motivo, en el caso de que se utilice una fuente de luz no monocromática se debe realizar una manipulación de la señal de luz. La longitud de onda de la fuente de luz que va a incidir en la muestra debe ser ajustable. Esto puede llevarse a cabo a través de filtros ópticos, que permiten obtener un rango de luz limitado a partir de una excitación de ancho de banda.

Los espectrofluorómetros clásicos utilizados en las mediciones se caracterizan por tener una alta sensibilidad a la intensidad de luz. Esto se puede alcanzar con un arreglo robusto del espectrómetro. Además, los sistemas de espectrofluorimetría deben tener la posibilidad de análisis de la distribución espectral de la luz emitida por la muestra. En

instrumentos sofisticados, se utilizan monocromadores⁶ para la selección de la luz de excitación y en el análisis de la emisión de la muestra.

1.2.1 Aplicaciones

La espectrometría de fluorescencia permite el análisis de sustancias fluorescentes sin importar el medio donde se encuentren. Por tal motivo, el rango de aplicación es diverso. Principalmente se han llevado a cabo estudios relacionando la calidad del agua por la presencia de sustancias fluorescentes, como la demanda bioquímica de oxígeno (Hudson et al., 2008), demanda química de oxígeno (Esparza-Soto et al., 2011); así como el monitoreo de aguas (Ahmad & Reynolds, 1999; “Kim, Platt - 2007 - Advanced Environmental Monitoring.pdf,” n.d.), etc.

En el área de aplicaciones clínicas de la espectroscopia de fluorescencia, se tiene por ejemplo en estudio en la región espectral del UV – visible, la espectroscopia de fluorescencia ha sido explorada intensivamente como herramienta diagnóstica para la detección del cáncer en la superficie de los tejidos de diferentes órganos (Ramanujam, 2000), para la detección del Alzheimer en células del cerebro in vitro, como también en la detección de pre – cánceres en órganos. En el caso de la región NIR, la espectroscopia de fluorescencia permite la detección de sangrado en el cerebro, la oxigenación del cerebro, detección de tumores del seno, entre otros.

⁶ Un monocromador es un componente óptico usado para producir un haz de luz de un ancho de banda estrecho, con característica de luz de un solo color.

1.3 Espectrometría de matriz de Excitación – Emisión (EEMS).

Los avances tecnológicos en fuentes de luz, en instrumentos para la detección de la luz y del arreglo óptico han resultado en la generación de técnicas más específicas para la interpretación de la información. La técnica de matriz de excitación – emisión es utilizada como una técnica de reconocimiento de patrones en sistemas hidrológicos principalmente.

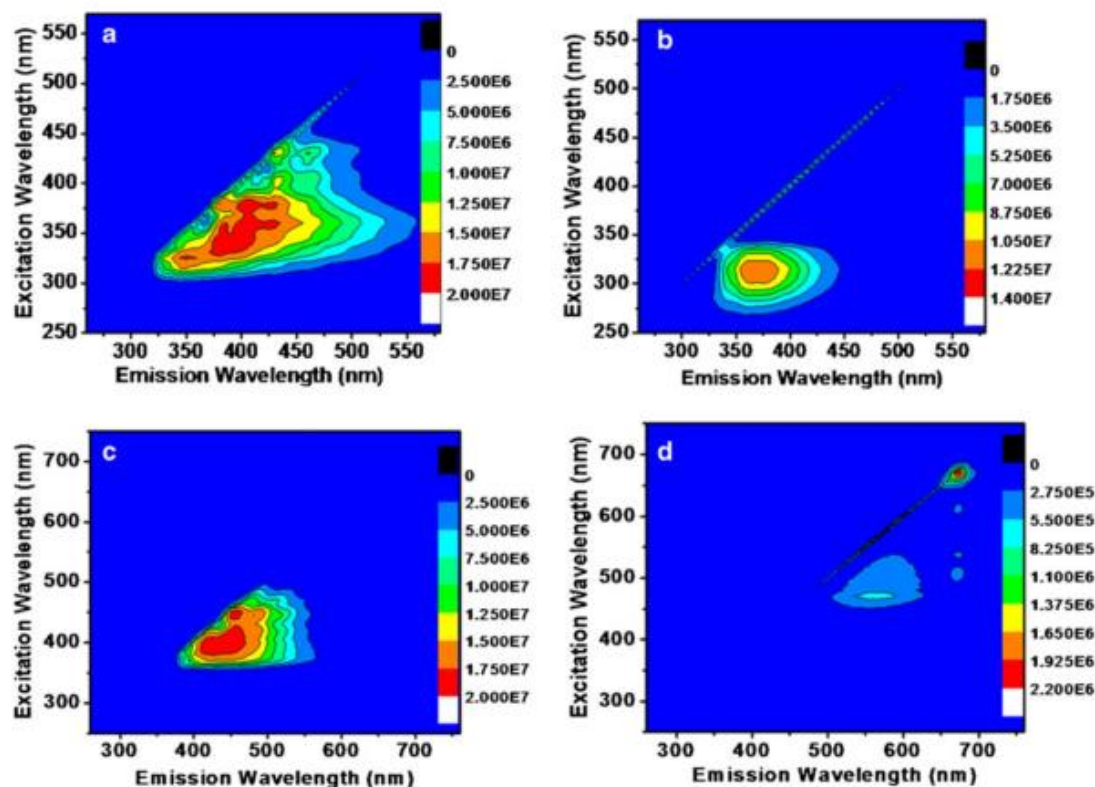
Según (Wolfbeis, 1993), la espectroscopia de fluorescencia es más selectiva que la espectroscopia de absorción debido a se deben medir las siguientes variables para caracterizar una muestra:

- La intensidad de emisión como función de la longitud de onda de excitación.
- La intensidad de emisión como función de la longitud de onda de emisión.
- El tiempo de vida del estado excitado.
- Rendimiento cuántico.

El grado de especificación en la medición es incrementado por la recolección de una matriz entera de excitación – emisión (EEMS) y por presentarla en una sola figura.

En el siguiente gráfico se muestran los resultados de mediciones espectrométricas en un arreglo de matriz de excitación – emisión.

Figura 1-9. Gráficas de EEMS para (a) petróleo, (b) etanol, (c) diésel y (d) biodiesel. (Kumar & Mishra, 2012).



Según la información expresada en las matrices, se puede relacionar que cada una de las muestras cuenta con diferentes compuestos fluorescentes activos, y que se obtiene una huella particular para cada una de las sustancias. Esta huella es única para cada componente fluorescente.

La técnica de matriz de excitación – emisión mejora de manera significativa las capacidades de la espectroscopia de fluorescencia convencional. Ofrece la posibilidad del análisis de la composición química de la muestra, así como el entendimiento de los factores que llevaron a obtener esa respuesta espectral. En las mediciones de fluorescencia convencionales, se tiene un diagrama constituido por un rango de detección, expresado en longitud de onda (en nanómetros) y su relación con la intensidad correspondiente (en unidades arbitrarias).

En las mediciones de EEMS, se relaciona el rango de excitación en longitud de onda con la emisión a través de una región de interés. Esta característica permite obtener una matriz que permite la caracterización de la muestra. Este tipo de análisis se caracteriza por ser

rápido (obtención de la matriz en cuestión de minutos), así como particular de la muestra analizada.

1.3.1 Aplicaciones de la técnica de espectrometría de matriz de excitación-emisión (EEMS).

La técnica de EEMS es una manera rápida de obtener información de la presencia y de la concentración relativa de sustancias orgánicas. No requiere de procedimientos de laboratorio para la adecuación de la muestra, ni de procesos de extracción, a diferencia de otras técnicas. Debido a esto, es utilizada como una herramienta de monitoreo de la calidad del agua.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, como también otras sustancias orgánicas aromáticas son los responsables de las propiedades ópticas y características fluorescentes de la mayoría de los fluoróforos. La existencia de estas sustancias permite el uso de la espectrometría de fluorescencia para el examen de la composición de las muestras.

Ha sido utilizada en la caracterización de crudos en aguas marítimas (Bugden et al., 2008). También para el estudio de la degradación del petróleo (Zhou, Liu, & Guo, 2013). Permite la medición de mezclas de etanol con hidrocarburos (Kumar & Mishra, 2012). Es utilizada en el monitoreo de materia orgánica en ríos y en ambientes marinos (Carstea et al., 2010), así como para el análisis de aguas residuales (Baker et al., 2004; Henderson et al., 2009; Reeves, 2000; Woitke, Kreßner, & Lepom, 2001).

Además permite el trazado de variables complementarias para el análisis de la calidad del agua como lo es la demanda bioquímica de oxígeno (Hudson et al., 2008)(Bridgeman, Baker, Carliell-Marquet, & Carstea, 2013; Namour & Jaffrezic-Renault, 2010; Reynolds & Ahmad, 1997). Se encuentran estudios de la caracterización de la composición de ácido húmico y fúlvico (Chen, Westerhoff, Leenheer, & Booksh, 2003; He et al., 2011; Xiaoli, Guixiang, Xin, Yongxia, & Youcai, 2012).

Tiene aplicaciones médicas, en la caracterización de agentes biológicos (Dartnell, Roberts, Moore, Ward, & Muller, 2013)

En la industria alimentaria, se ha utilizado las matrices de excitación-emisión para el análisis de las características de aceite de oliva así como posibles casos de adulteración

(Guimet, Boqué, & Ferré, 2004; Guimet, Ferré, Boqué, Vidal, & Garcia, 2005; Kongbonga, 2011).

Complementario a la técnica, se utilizan metodologías de análisis matemático para la determinación estadística de las concentraciones de mezclas de hidrocarburos, como lo estudio (Alostaz, Donahue, Hall, & Biggar, 2008) utilizando el análisis PARAFAC⁷, así como la clasificación de aguas según su fuente (Guo et al., 2004; Hua, Dolan, Mcghee, Clevenger, & Deng, 2007; Lapworth, Goody, Butcher, & Morris, 2008)

⁷ PARAFAC, de las siglas en inglés “Parallel Factor Analysis” es una técnica de análisis estadístico de contribución de grupos, utilizada para encontrar grupos con características comunes para un posterior análisis.

2. Metodología

2.1 Hacia un instrumento demostrativo

El monitoreo de la calidad del agua es un asunto relevante en el país. Siendo Colombia una nación con potencial de producción de hidrocarburos, el estudio de las características de las sustancias que puedan tener un efecto sobre el medio ambiente y la calidad de los cuerpos de agua cobra cada vez más importancia. Debido a la situación de orden público, se conocen episodios de vertimientos de hidrocarburos en ríos y diferentes cuerpos de agua. La necesidad de poder identificar y hacer la trazabilidad de la calidad del agua es cada vez más importante. El proyecto busca ofrecer un instrumento prototipo que permita la medición e identificación del contenido de hidrocarburos que puedan estar presentes en agua. Los lugares con la mayor afectación por vertimientos de hidrocarburos por lo general se encuentran ubicados en zonas apartadas del país, y es por eso por lo que además de la utilización de la técnica de EEMS, con cualidades en términos de sensibilidad y rapidez de procesamiento de información se debe utilizar un instrumento no convencional.

La espectroscopia de matriz de excitación – emisión (EEMS) es una técnica comúnmente obtenida a partir de espectrofluorómetros de alta resolución. Las características ópticas de estos instrumentos incluyen una fuente de luz de alta potencia (típicamente una lámpara de Xenón de alta presión, con una salida de ~10 – 150 W), un monocromador, un arreglo para la disposición de la muestra (típicamente una celda de un material de alta transmitancia) y un detector *monocanal* altamente sensible (fotomultiplicador⁸). Este

⁸ Un fotomultiplicador es un detector óptico de vacío que puede responder a niveles bajas de iluminación manteniendo un nivel de ruido aceptable permitiendo la detección de la luz con alta sensibilidad.

arreglo de instrumento permite una detección precisa y de alta resolución, pero tiene la desventaja de que el equipo se hace lento, costoso, pesado y robusto.

El diseño de un instrumento es complejo, requiere el entendimiento y caracterización de todas las posibles variables que puedan llegar a afectar el desempeño del equipo, así como la calidad de la información recopilada. De esta manera, en este proyecto se hace un análisis del sistema optoelectrónico, así como de la calidad de la información espectral recolectada.

Los sistemas espectrofluorométricos llegan a resultados muy precisos, pero esta precisión recurre a características instrumentales mencionadas, como son el costo, el tamaño (peso y robustez) así como la posibilidad de ser portable. En la investigación se relacionaron cada una de estas variables con el fin de poder obtener un prototipo portable con resultados adecuados, comparables y reproducibles.

La primera parte de la investigación busca la selección de una fuente de luz. Los sistemas fluorométricos requieren de una fuente luminosa adecuada para realizar la excitación de la muestra con sustancias fluorescentes. Estas fuentes tienen que ser lo suficientemente potentes para poder sobrepasar la limitante de la eficiencia cuántica típica de la fluorescencia, así como la limitación en términos de la capacidad del espectrómetro para poder detectar la emisión generada. Para esto, se realizó una evaluación de alternativas de fuentes de luz y su comparación con sistemas convencionales usados, como son los sistemas LED. Habiendo escogido la fuente de luz, se realizan una serie de ensayos espectrométricos con el fin de evaluar la potencia, estabilidad y de cobertura espectral.

Luego se realizó el análisis del sistema óptico y mecánico necesario para poder llevar a cabo la técnica de EEMS. En este apartado se consideran los arreglos ópticos, los soportes, la incorporación de la fuente de luz escogida, así como su caracterización. Esta parte es útil para una posterior miniaturización del arreglo óptico, así como para la priorización de variables a considerar en el ajuste.

Se realizan avances en cuanto a la mecanización del sistema óptico utilizando microcontroladores. En esta parte se busca escoger un microcontrolador que tenga la posibilidad de ser vinculado con una GUI generada por un lenguaje de programación. Se menciona la escogencia del software por sus características y posibilidades en cuanto al procesamiento de espectros (potencial estadístico y de procesamiento).

Posteriormente se estudia las posibilidades de procesamiento del sistema utilizando lenguajes de programación en términos del procesamiento de espectros, obtención de matrices, así como con la vinculación del espectrómetro y el sistema mecánico. Este apartado de software busca dar un sistema de algoritmos y de procedimientos útiles para el control total del sistema. Este software generado tiene el potencial de ser utilizado como un vínculo entre el sistema de hardware y el software.

De manera complementaria, se realiza una metodología de regresión de espectros de excitación – emisión a partir de fuentes de luz policromáticas. Este planteamiento es novedoso y corresponde a la situación propia del instrumento prototipo desarrollado. Se proyecta la estimación de la matriz de excitación – emisión por la inversión de un espectro de excitación – emisión policromática.

Finalmente se realizan ensayos con mezclas sintéticas fluorescentes. Las sustancias constituyentes de la mezcla fueron escogidas según las condiciones de excitación y de emisión de los hidrocarburos principales considerados. De tal manera estos fluoróforos son proxy de los hidrocarburos presentes en muestras ambientales. En estos ensayos experimentales se realizaron estudios de linealidad de las mediciones adquiridas por el espectrómetro, los límites de detección de mezclas fluorescentes, con el fin de conocer los alcances de las mediciones y de la versatilidad del espectrómetro utilizado, entre otros.

2.1.1. Diseño conceptual

El diseño conceptual permitió la discretización de unidades básicas a considerar en el sistema. Para esto, se agrupan las partes básicas de un sistema espectrométrico considerando la aplicación a la técnica de EEMS. Para esto se fueron evaluando alternativas para superar desafíos en términos de costo, portabilidad y sensibilidad de las mediciones. También se consideraron las variables de procesamiento de la información recolectada utilizando herramientas informáticas.

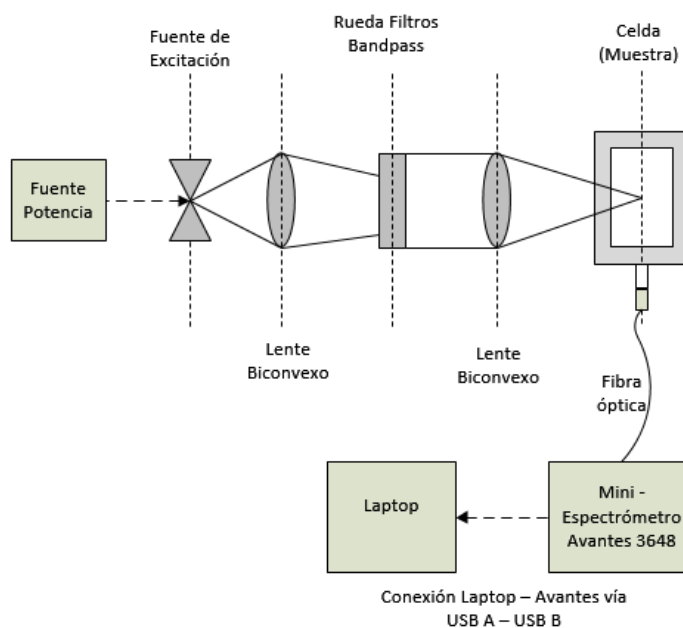
Este proyecto de investigación es la fase II de un proyecto de investigación en maestría realizado (Lombana, 2016). Por tal motivo a partir de los avances realizados que se da inicio al diseño conceptual del sistema.

2.1.2. Montaje experimental

El montaje experimental del prototipo consta de las unidades básicas del arreglo espectrométrico que fueron mencionadas anteriormente, que son la fuente de luz de excitación, un recolector de la muestra y el sistema espectrométrico.

En la figura a continuación se muestra el montaje experimental diseñado en la primera fase del proyecto. En este montaje está soportado sobre la tabla óptica diseñada también en ese periodo. Las mediciones experimentales se realizaron en el laboratorio de metrología de la facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional en Bogotá.

Figura 2-1. Montaje experimental fase I proyecto.



En la primera fase del proyecto se llevaron a cabo los siguientes avances:

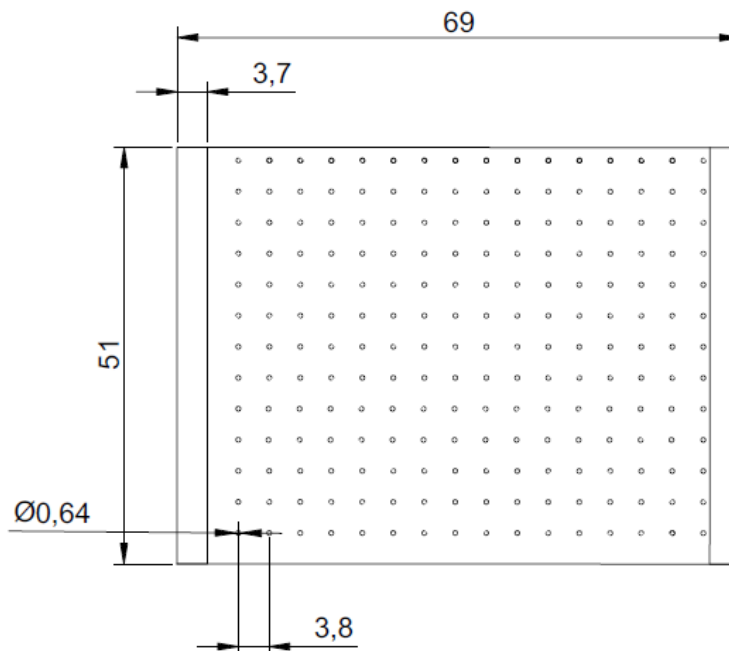
- *Estudio de la celda de recolección de muestra:* inicialmente se fabricaron varias celdas de aluminio con ventanas en sílice para la excitación de la muestra como se indica en la figura 2-1, para la recolección de la emisión de luz de la muestra por el lado lateral, sin embargo, estas celdas presentaron buen desempeño para absorción, pero no para fluorescencia debido al gran camino óptico que debe recorrer la luz, por ello finalmente se decidió usar una celda comercial acoplada al porta cubetas.

- *Elaboración de la tabla óptica:* la tabla óptica permitió que se pudieran llevar a elaborar los primeros arreglos de fuentes de luz y las mediciones.
- *Compra del espectrómetro Avantes AvaSpec 3648*
- *Cuantificaciones de emisión de fluorescencia de fluoróforos estándar:* para esto se utilizaron fuentes de Xenón pulsadas y LED.

2.1.3. Tabla óptica

La tabla óptica es un arreglo diseñado y fabricado en la fase I del presente proyecto por parte del Ingeniero Lombana. Esta tabla óptica permite fijar el tren óptico y demás accesorios a la placa superficie para poder mantener las características del ajuste óptico del sistema en el tiempo. Fue elaborada en aluminio por razones de costo y se diseñó para tener un arreglo de orificios de una distancia de 3.8 cm con un diámetro de $\frac{1}{4}$ de pulgada.

Figura 2-2. Diseño de la tabla óptica. Unidades en centímetros. (Lombana, 2016).



2.1.4. Espectrómetro: Avantes AvaSpec 3648

El espectrómetro AvaSpec 3648, utilizado en esta investigación, es multipropósito. No solamente es utilizado para mediciones de espectroscopia de fluorescencia, sino que puede ser también utilizado en cuantificaciones de calidad del aire, mediciones de absorción, DOAS⁹, entre otros. Cuenta con una fibra óptica, también de la misma empresa, de 400 y de 200 micrómetros. Esta fibra es conectada al espectrómetro, y sirve para la conducción de la luz a medir.

Figura 2-3. Espectrómetro Avantes – 3648.



El espectrómetro está basado en un diseño simétrico de *Czerny – Turner* con 3648 pixeles en un arreglo de detección tipo CCD¹⁰.

Este espectrómetro es apropiado para mediciones a alta velocidad. El tiempo de medición, conocido como el tiempo de integración relaciona el tiempo en el cual se permite la medición en el CCD.

Un “Scan” es un espectro con características en cuanto al tiempo de integración y el número de mediciones que se tomaran para efectuar un promedio y obtener un solo espectro. Para poder obtener una mejor representatividad de la medición, y de las posibles interacciones ambientales presentes, se acumulan un número de mediciones y se promedian. En el espectrómetro esto es alusivo al promedio entre scans, o “Average”.

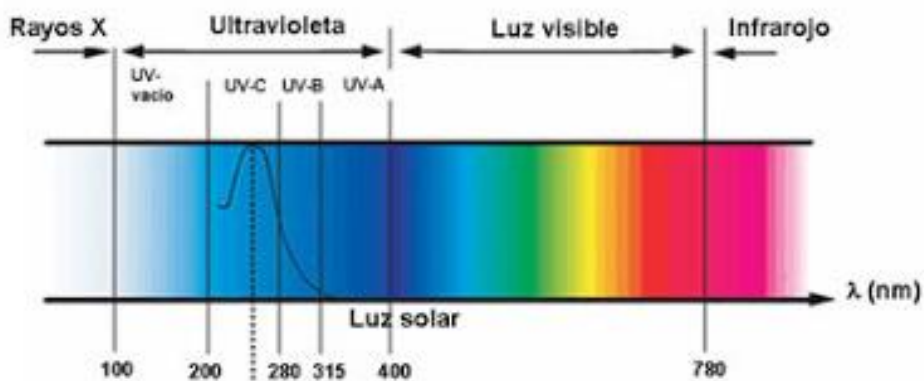
⁹ DOAS, se refiere a la sigla: *Differential Optical Absorption Spectroscopy*, el cual es un método para determinar las concentraciones en el aire de gases traza atmosféricos.

¹⁰ CCD, dispositivo de carga acoplada, en inglés Charge – coupled device (CCD).

No cuenta con un arreglo óptico propio, sino que este debe ser considerado por el usuario según la aplicación de trabajo. De esta manera el espectrómetro solamente cuenta con las conexiones a un computador personal vía USB –C y con la entrada de la fibra óptica vía conexión SMA. No cuenta con un medio de almacenamiento de datos, tipo *datalogger*. Por lo cual se hace necesario el almacenamiento de los scans obtenidos en la memoria del computador al cual esté conectado.

Los valores de longitud de onda medidos por el espectrómetro van desde 185.82 nm hasta 755.84 nm. En este rango están dispuestos 3648 pixeles, los cuales van distribuidos a lo largo de este intervalo, pero no de manera uniforme. Según ensayos realizados en la investigación, la región visible (400 – 700 nm) es la que cuenta con la mayor densidad de pixeles. Por este motivo, la aplicación directa del espectrómetro está sujeta principalmente a mediciones desde la región UV – B (280 – 315 nm) hasta 700nm.

Figura 2-4. Longitud de onda del espectro luminoso. (www.acuaristas.cl)



2.1.5. Filtros ópticos

La técnica de EEMS tiene como base conceptual la excitación de una muestra fluorescente con una fuente monocromática, para llevar los fluoróforos de la muestra a un nivel electrónico superior permitiendo la liberación de esta energía en forma de luz. De esta manera, según la excitación se originará una emisión correspondiente. Para llevar la fuente HID utilizada en el proyecto a la utilización en la técnica de EEMS se utilizaron arreglos ópticos para convertir la luz policromática a una casi monocromática.

Filtros ópticos

Un filtro óptico puede ser usado para la atenuación o la mejora de una imagen, para la transmisión o el reflejo de una longitud de onda específica, o para la división de una imagen en dos idénticas.

Las características de los filtros utilizados en el proyecto son las siguientes (Edmund Optics Inc., 2014):

- *Longitud de onda central "CWL" (Center Wavelength)*: definido como el punto medio entre las longitudes de onda donde la transmitancia es el 50% de la transmisión especificada.
- *Ancho de banda*: es un rango de longitud de onda usado para denotar una parte específica del espectro en la que pasa una cantidad de luz a través del filtro.
- *Densidad óptica*: es una especificación de la lente referida a la capacidad de transmisión de luz. Un lente con una alta densidad óptica indica una baja transmisión.
- *Filtro dicróico*: es un tipo de filtro utilizado para la transmisión o el reflejo de la luz dependiendo de la longitud de onda. Son utilizados fundamentalmente para aplicaciones de paso largo/corto de banda.

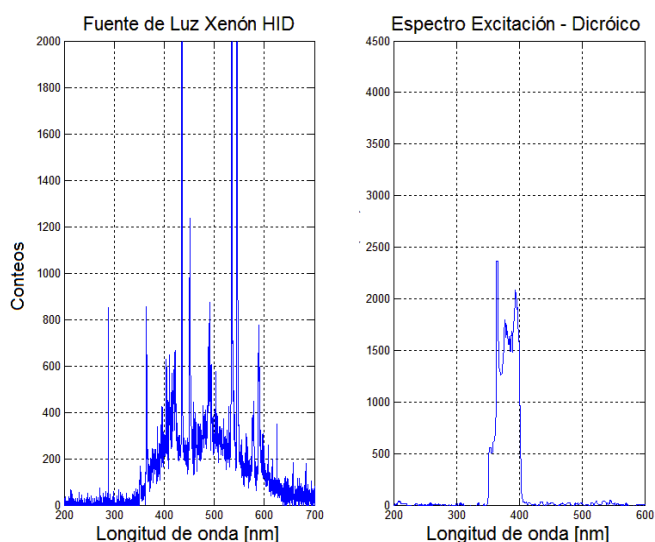
Filtros de paso banda

Este tipo de filtros son utilizados en aplicaciones ópticas en donde se necesite realizar un cambio en las características espectrales de la fuente de luz. Estos filtros tienen un ancho de banda reducido (entre 2 a 10nm) o son de banda ancha (50 a 80 nm). Son particularmente sensibles al ángulo de incidencia.

Cada filtro tiene características propias en cuanto al ancho de banda que permite el ingreso de luz cerca del valor central o característico, así como la transmitancia de la luz.

A continuación, se encuentran unos ensayos realizados a partir de la fuente de luz HID utilizada en el proyecto (policromática) para analizar la transmitancia y el ancho de banda de cada uno de los filtros utilizados en el arreglo óptico.

Figura 2-5. Espectro de medición de una fuente de Xenón HID y la salida de emisión luego del paso por un filtro dicróico



2.2. Caracterización del prototipo

2.2.1. Desarrollo en el instrumento prototipo

El prototipo por desarrollar tiene como objetivo la medición de muestras fluorescentes utilizando la técnica de matriz de excitación-emisión. Entre los principales criterios a considerar es que debe ser un instrumento prototipo que permita la medición rápida de la emisión generada, además de tener resultados comparables entre sistemas espectrofluorométricos.

Se deben tener en consideración los siguientes criterios en el prototipado de un de un instrumento:

- Automatizable
- Alto poder de resolución
- Selectividad y sensibilidad

Factores que evitar:

- Alto costo

- Manipulación compleja
- Tiempo a análisis considerable

Se han venido desarrollando instrumentos con arreglos lineales de LED en la aplicación de la metodología de EEMS (Hart & JiJi, 2002b). Estos arreglos LED pueden ser considerados como alternativas de medición de matriz de fluorescencia. No se han realizado pruebas de este instrumento en medición de hidrocarburos en aguas, sino solamente incluye las pruebas con fluoróforos como en antraceno, la rodamina B en concentraciones del orden de partes por billón. El análisis de la respuesta espectral adquirida es llevado a cabo mediante métodos numéricos de procesamiento como PARAFAC para la identificación individual de contribuciones.

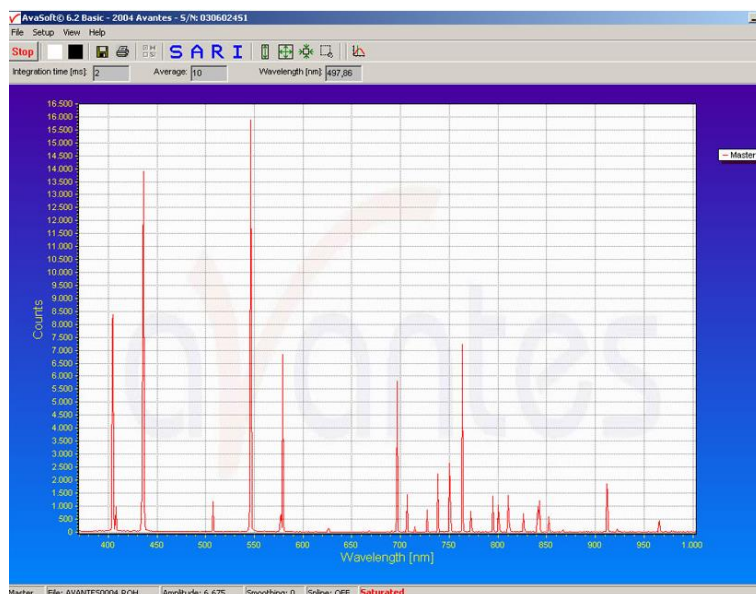
También se presentan avances en la elaboración de espectrofluorómetros de luminiscencia portables en los que se utilizan como fuente de excitación un arreglo de múltiples LED con un peso menor a 1.5kg (Obeidat et al., 2008). Se hizo la verificación del sistema en términos de límites de detección para una serie de fluoróforos. A través del desarrollo del equipo portable se generaron matrices de excitación- emisión EEMS para permitir el análisis de las muestras que contienen las mezclas de fluoróforos. La técnica de análisis utilizada fue la de análisis de componentes principales multicamino (MPCA) para dar como resultante un set de datos de tres dimensiones.

A través de mejoras instrumentales, se han generado instrumentos la determinación de espectros de fluorescencia absolutos (resolución, ajuste óptico), con el fin de llevar a cabo la determinación de la eficiencia cuántica de un material y de adquirir los espectros de emisión – excitación de manera que sea posible definir su significado físico (Turner, 1964).

2.2.2.Fase de automatización del sistema: Software y control hardware

El software utilizado para las mediciones espectrométricas utilizando el espectrómetro Avantes 3648 es el “AvaSoft 7.5”; software de visualización de mediciones propio de Avantes. La interfaz del software es simple y permite la visualización del espectro medido, relacionando longitud de onda y valores de intensidad.

Figura 2-6. Interfaz de usuario del Avasoft. (Avantes,2017).



Este software no permite la manipulación de su código fuente. Cuenta con derechos exclusivos y su licencia de código no forma parte del dominio público. De igual manera este software no permite la automatización de las mediciones, sino está limitado a un número de mediciones programadas con las mismas condiciones de tiempo de integración y promedio especificadas por el usuario. Para la elaboración de rutinas de medición más complejas se hace necesario otra interfaz.

Los archivos generados por el software de Avantes tienen terminación (.roh), son ligeros y son obtenidos por *scan* medido (a un tiempo de integración y un número de promedios de mediciones específico). Estos archivos pueden ser leídos utilizando un procesador de texto tipo Notepad ++. También existe la posibilidad de la generación de archivos vinculados con Microsoft Excel para la obtención y procesamiento de los datos.

Software de código abierto disponible

Avantes permite la manipulación de sus librerías para aplicaciones específicas a través de la adquisición de un paquete de interfaz de usuario. El paquete de interfaz de usuario,

denominado “AS – 5216 – dll” puede ser instalado únicamente en sistemas Windows. Es la interfaz desde el PC al DLL¹¹.

Estas librerías de código ejecutable contienen las principales funciones del software AvaSoft, y no está limitado a un tipo específico de espectrómetro, sino que está disponible a la gran mayoría de espectrómetros disponibles en el catálogo.

La conexión de código fuente permite el vínculo con los siguientes programas.

- C++
- Microsoft Visual C++
- Labview v.8.2
- MatLab (MathWorks), entre otros.

Entre otros softwares disponibles para la conexión del espectrómetro con el computador se encuentra el sistema Pandora. Pandora¹² es un sistema de espectrómetros portables para mediciones de sol directo, columnas de ozono atmosférico y gases traza. Además de tener un espectrómetro cuenta con un sistema de refrigeración, una rueda de filtros y un brazo robot para la automatización de la medición. El diseño de este sistema está soportado en un lenguaje de programación de código abierto “Python”, pero necesita de las .dll propias del espectrómetro para las rutinas de comandos.

Procesamiento de datos utilizando MatLab

Debido a los alcances finales del proyecto, se utilizó MatLab para el procesamiento de datos, así como para su vinculación con la rueda de filtros con interfaz con Arduino. Este lenguaje de programación permite además la vinculación del espectrómetro con una “GUI¹³” generada con el mismo lenguaje para el control de la rueda de filtros paso bandas del arreglo óptico del prototipo.

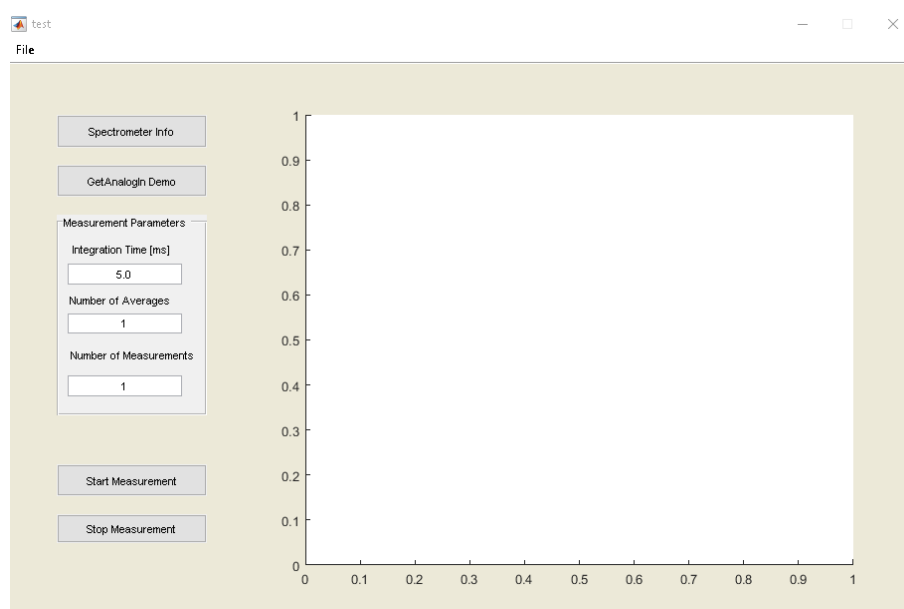
¹¹ De sus siglas en inglés, dynamic – link library. Se refiere a los archivos con código ejecutable que se cargan bajo la demanda de un programa en un sistema operativo.

¹² Descripción en <https://acd-ext.gsfc.nasa.gov/Projects/Pandora/Description.html>

¹³ GUI, de sus siglas en inglés Graphical User Interface. Traduce interfaz gráfica del usuario.

Permite también utilizar la .dll de Avantes para la generación de una GUI. Esta GUI viene como parte del paquete de la “AS – 5216 – dll”, contiene ejemplos de la visualización de las mediciones adquiridas con el espectrómetro, la modificación del tiempo de integración y el número de promedios de scan para la medición. En el proyecto se llegó a utilizar esta GUI solo con fines de la evaluación de la posibilidad de generar un sustituto al software base del espectrómetro. Se considera como una posibilidad de generación de software para fases posteriores a este proyecto.

Figura 2-7. Visualización de la GUI Avantes – MatLab. A través de esta GUI se permite la adquisición de mediciones obtenidas con el Avantes 3648 utilizando la “AS – 5216 – dll” de Avantes. Solo se permite la visualización del espectro medido.



MatLab a su vez es de fácil interpretación y traducción con códigos de fuente libre como Python. Python cuenta con librerías para la interpretación del código propio de Matlab, así como la equivalencia en funciones.

Lectura de espectros a través de los archivos binarios de Avantes usando Matlab

La información espectral es un dato físico representado en un archivo. Este archivo es generado por el software AvaSoft y contiene la información de la medición realizada en la tarea de adquisición del espectrómetro. En este archivo se recopila información de serie temporal, tiempo de integración, promedio de mediciones, nombre del archivo y los datos

obtenidos de intensidad (conteos) y longitud de onda. El procesamiento de estos archivos se puede realizar únicamente utilizando AvaSoft, y es allí donde se puede hacer la conversión de .roh a la generación de archivos tipo hoja de cálculo (.xls). Estos archivos de hoja de cálculo son de fácil interpretación y lectura para la mayoría de lenguajes de programación. Algunos, como MatLab, cuentan con funciones propias para la lectura de estos archivos, como es “*xlsread ()*”. Por medio de funciones se pueden asignar vectores numéricos y variables en MatLab para poder luego procesarlos.

Considerando la limitación de lectura de los archivos binarios generados por AvaSoft, se buscaron alternativas de interpretación y de importación. “MatLab Center” es una comunidad de usuarios de MatLab en donde se puede hacer consultas o búsquedas de soluciones a aplicaciones de MatLab. En este espacio se encuentra la sección de intercambio de archivos, en ella algunos usuarios comparten archivos generados por ellos mismos para que otros lo utilicen o puedan modificarlos. La sección de espectrometría cuenta con algunos scripts¹⁴ para el procesamiento de datos, así como para el tratamiento de archivos.

Existe un script con un set de funciones para procesar automáticamente los archivos guardados por Avantes AvaSoft. Este programa fue generado en comunicación personal (Karapetyan, 2015)¹⁵ el cual indicó, posterior a una comunicación con él sobre las posibilidades de este programa. En el proyecto se realizó la modificación del código disponible, y la estructuración para la lectura de archivos .roh y el posterior tratamiento y adecuación para aplicaciones de espectrometría EEMS.

¹⁴ Un Script es un documento que contiene instrucciones escritas en códigos de programación. Ejecuta diversas funciones en el interior del programa

¹⁵ Dr. Konstantin Karapetyan, *Senior Design Engineer (optics)*, ASML Veldhoven, Netherlands

Figura 2-8. Apartado del código base para la lectura de archivos binarios generados por AvaSoft para la posterior lectura e interpretación en MatLab.

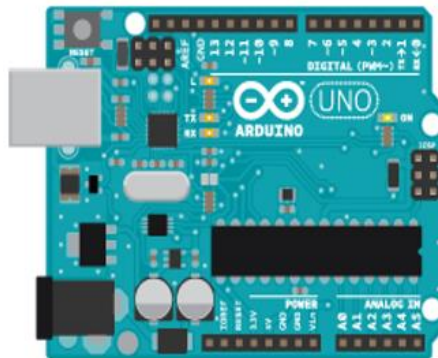
```
scans = avantesSpectrumRead;
```

```
NEW0001.RCM. 21 files to go  
NEW0001.ROH. 20 files to go  
NEW0002.RCM. 19 files to go  
NEW0002.ROH. 18 files to go  
NEW0003.RCM. 17 files to go  
NEW0003.ROH. 16 files to go  
NEW0004.RCM. 15 files to go  
NEW0004.ROH. 14 files to go  
NEW0005.RCM. 13 files to go  
NEW0005.ROH. 12 files to go  
NEW0006.RCM. 11 files to go
```

Control de hardware a partir de Arduino

Los microcontroladores Arduino son ampliamente usados por todo tipo de desarrolladores en el mundo. Su popularidad se debe a su simplicidad de uso y al gran número de sensores y librerías disponibles que hacen posible su extensión a diversas aplicaciones. Además, existe una gran comunidad que gira entorno a Arduino, con cientos de ejemplos y guías en la literatura de alto nivel. Específicamente Arduino en su sitio oficial ofrece una descripción de todas y cada una de las funciones con las que cuenta.

Figura 2-9. Placa de Arduino Uno. (www.arduino.cc)



Aunque existen muchos dispositivos comerciales en el mercado éstos por lo general están estrechamente vinculados con proveedores específicos que requieren de largos protocolos y gestiones para exportar e importar piezas y hacer mantenimientos. Arduino por su parte ofrece un sistema fácilmente modificable que se puede ajustar a las necesidades del usuario y servir de base para nuevos productos, además de ser un dispositivo económico que ofrece una instalación y un mantenimiento más sencillo. A continuación, se mencionan

algunas ventajas que Arduino ofrece sobre los otros microcontroladores y plataformas microcontroladoras:

- Ofrece un entorno de programación simple y clara, fácil de usar para principiantes, pero suficientemente flexible para que usuarios avanzados puedan aprovecharlo también, desde artistas y diseñadores hasta ingenieros de diversas áreas como industriales, electrónicos, de sistemas y telecomunicaciones entre otros.
- Se basa en código abierto y software extensible cuyo lenguaje puede ser expandido mediante librerías C++ y para aquellos que deseen mayor complejidad pueden usar el lenguaje AVR C, entorno en el cual está basado Arduino.
- No sólo el software, el hardware también es extensible. El Arduino está basado en microcontroladores ATMEGA8 y ATMEGA168 de Atmel. Los planos para los módulos están publicados bajo la licencia *Creative Commons* por lo que los usuarios pueden hacer su propia versión del módulo, extendiéndolo y mejorándolo.
- Puede trabajarse en diferentes plataformas a diferencia de los otros microcontroladores. El software de Arduino puede ejecutarse en sistemas operativos Windows, Macintosh OSX y GNU/Linux, lo que no ocurre con muchas otras placas microcontroladoras.
- Precio. Las placas Arduino son relativamente económicas comparadas con otras plataformas microcontroladoras. Vienen preensambladas y listas para funcionar, de hecho, el usuario mismo podría construirla adquiriendo los componentes por separado con lo que el precio total de placa podría ser incluso menor.
- Las placas son versátiles y reutilizables porque se pueden aprovechar para otros proyectos ya que permiten reprogramación y ofrecen varios tipos de entradas y salidas de datos, los cuales permiten capturar información de sensores y enviar señales a actuadores de múltiples formas.

Una de las cosas más importantes para resaltar es cada uno puede crear su propio Arduino. Por ejemplo, para desarrollo de software se encuentra disponible un sencillo ambiente de programación llamado Arduino IDE donde un editor de código, un compilador y una interfase serial de comunicación se encuentran todos integrados en una única aplicación java. Por su parte el lenguaje de programación se parece al lenguaje C/C++ el

cual es fácil de entender para programadores novatos, incluyendo claramente a los expertos también, compatible con muchas características propias de la programación orientada a objetos.

Arduino para proyectos de hardware

El microcontrolador de Arduino ofrece la interfaz de control Hardware – Software. Tiene una comunidad de intercambio de ideas y de proyectos de código libre, en los cuales los usuarios podrán obtener ideas y guías para el desarrollo de proyectos de ingeniería. Debido a que el enfoque del Arduino es la elaboración de prototipos, ofrece una gama de placas base con especificaciones y posibilidades de conexión según necesidades de los proyectos. La placa base y más simple de Arduino es la Arduino UNO. Esta placa tiene un precio comercial de cerca de 30 dólares. Tiene la posibilidad de interacción con el computador vía USB A. Es en el computador que el usuario podrá cargar a través de un código propio una serie de instrucciones al microcontrolador para este luego transcribirlas a través de salidas análogas o digitales. Aunque tiene una fuente de potencia propia, permite la conexión a fuentes de 12 VDC (entrada de conector) o a través de pines permite la conexión a potencia según especificación.

Cuenta a su vez con un entorno de desarrollo integrado (IDE) con librerías de unidades operacionales simples, estilo motor, LED's, etc., en los cuales a partir del código base estructurada en el IDE se permite la guía y modificación de código para el detalle de cada proyecto.

La formulación del código al microcontrolador del Arduino se puede realizar también a través de lenguajes de programación, como por ejemplo MatLab. Es por medio de este lenguaje que se puede hacer la conexión de instrucciones propias de MatLab, así como el procesamiento de información como la puesta en marcha de las rutinas de Hardware programadas.

MatLab y Arduino.

Uno de los microcontroladores más utilizados en ingeniería es Arduino. Este controlador almacena información de rutinas de hardware para prototipado. De esta manera, puede tener el ingreso de información y salida digital o analógica para el control de motores, luces,

y demás partes electrónicas. MatLab permite la comunicación directa entre el usuario y el microcontrolador por medio de los scripts creados en el lenguaje de programación.

Figura 2-10. Comunicación de Arduino con MatLab. (Mathworks, 2017).



2.2.3. Calibración del espectrómetro

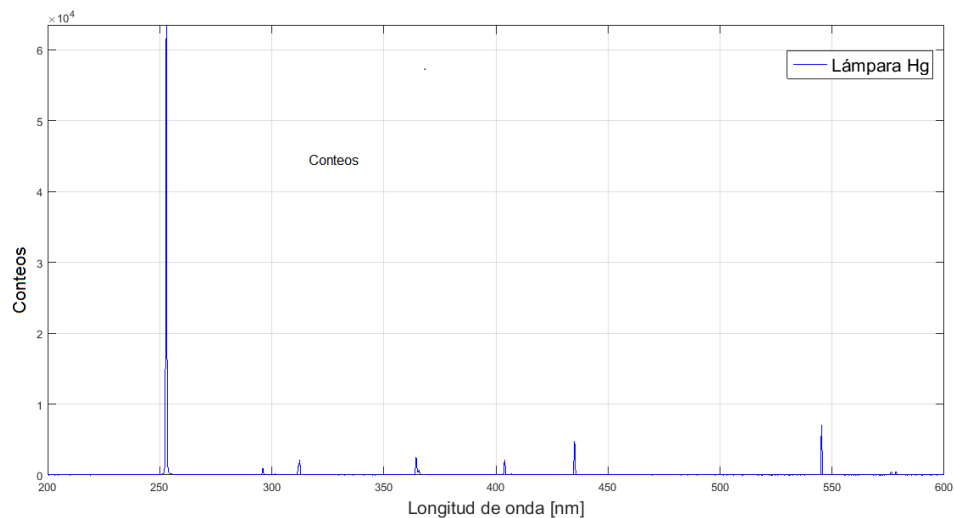
El espectrómetro utilizado en el proyecto cuenta con una calibración de fábrica. Esta calibración incluye un reporte y la estimación de un polinomio para el ajuste de los datos.

Para la investigación se utilizaron procedimientos estándar para la verificación del error relativo a las mediciones. Estos errores relacionan datos teóricos con datos medidos. La información teórica utilizada se obtiene a partir de portales de estándares en mediciones, como por ejemplo el NIST¹⁶, en donde se encuentran mediciones de fuentes de luz para lámparas de mercurio.

Las fuentes de mercurio ofrecen un espectro con líneas características a unas longitudes de onda establecidas. El procedimiento base consiste en utilizar una fuente de mercurio, realizar la medición con el espectrómetro a analizar y comparar las mediciones adquiridas con las reportadas por los estándares. De esta manera se pueden verificar la desviación de la medición con respecto a la longitud de onda y se puede verificar la resolución del espectrómetro. A continuación, se muestran el espectro adquirido. Se cuenta con una fuente de mercurio para la calibración del espectrómetro.

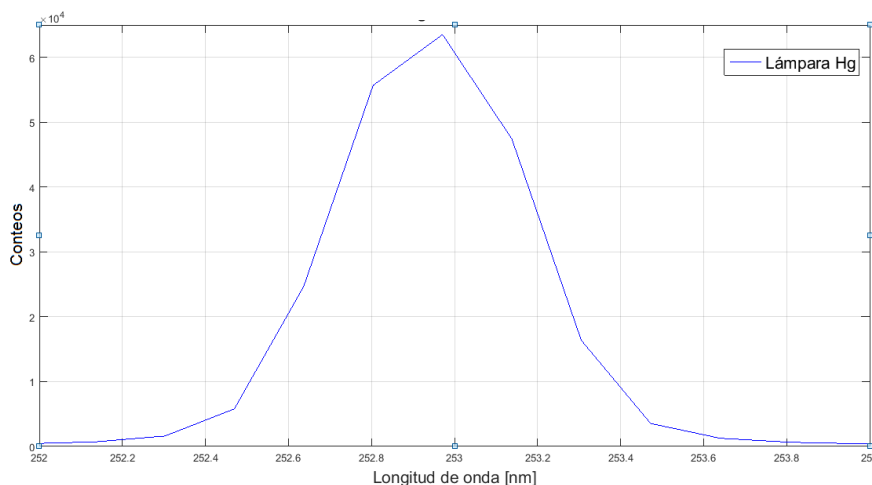
¹⁶ NIST, de las siglas en inglés, National Institute of Standards and Technology.

Figura 2-11. Señal espectral obtenida a partir de la Fuente Hg – Pencil. Mediciones tomadas en modo absorción (alineación directa entre la fuente y la fibra del espectrómetro).



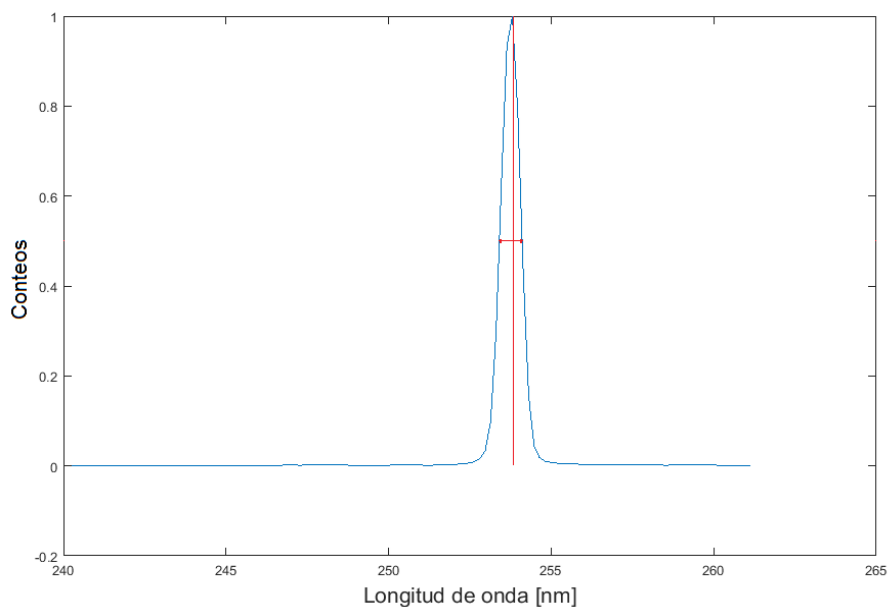
Realizando un acercamiento a un pico característico del espectro se puede relacionar el ancho espectral (resolución) y por medio del establecimiento del punto máximo de emisión (Pico de la señal) el error relativo a un espectro estándar.

Figura 2-12. Fuente Hg – Pencil. Mediciones tomadas en modo absorción (alineación directa entre la fuente y la fibra del espectrómetro).



La anchura a media altura, abreviado FWHM (del inglés *Full Width at Half Maximum*) se utiliza para la determinación de la anchura espectral de las mediciones adquiridas por espectrómetros. En la siguiente figura se muestra la función característica del espectrómetro FWHM para el rango de longitud de onda de 240.2512 – 261.1538 nm.

Figura 2-13. Función característica del espectrómetro FWHM para el rango de longitud de onda de 240.2512 – 261.1538 nm. Valor del FWHM = 0.70208 nm.



Es a partir de esta función que se pueden llegar a realizar análisis espectrales específicos y comparaciones entre mediciones con diferentes espectrómetros. A partir de los valores

de FWHM se pueden obtener representaciones sobre la resolución de sistemas específicos.

2.2.4. Filtros disponibles en el montaje óptico

En la investigación se cuenta con un sistema de filtros de paso banda en las siguientes regiones de longitud de onda:

- | | |
|----------|----------|
| - 320 nm | - 400 nm |
| - 334 nm | - 436 nm |
| - 365 nm | - 525 nm |
| - 377 nm | - 568 nm |

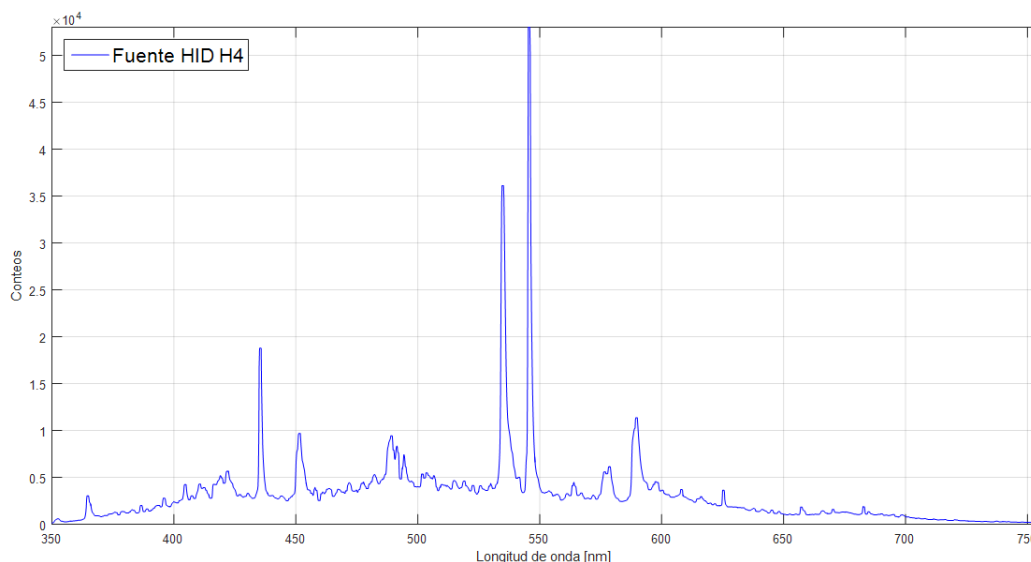
Cada uno de los filtros disponibles cuenta con unas características propias, esto en términos de variables de especificaciones del diseño óptico del filtro. Las variables más importantes para el sistema óptico tienen que ver con la región espectral a la cual el filtro permite el paso de luz, el ancho espectral de esa región y la transmitancia de cada filtro.

A continuación, se muestran los resultados de la caracterización de los filtros disponibles en el sistema óptico. Cada una de las mediciones espectrales se realizó con un tiempo de adquisición fijo (tiempo de integración) de 15 ms. Debido a los diferentes porcentajes de transmitancia de los filtros, se realiza el análisis agrupando los filtros según similitudes en la transmisión.

Como fuente de luz se utilizó una a base de Xenón. La fuente HID H4, es una lámpara de luz UV – visible, que cuenta con intensidad a lo largo del rango espectral. Debido a sus características de emisión continua, es útil para ser usada y adecuada a través de un sistema de filtros dicróicos (pasa banda) para obtener una señal de banda estrecha.

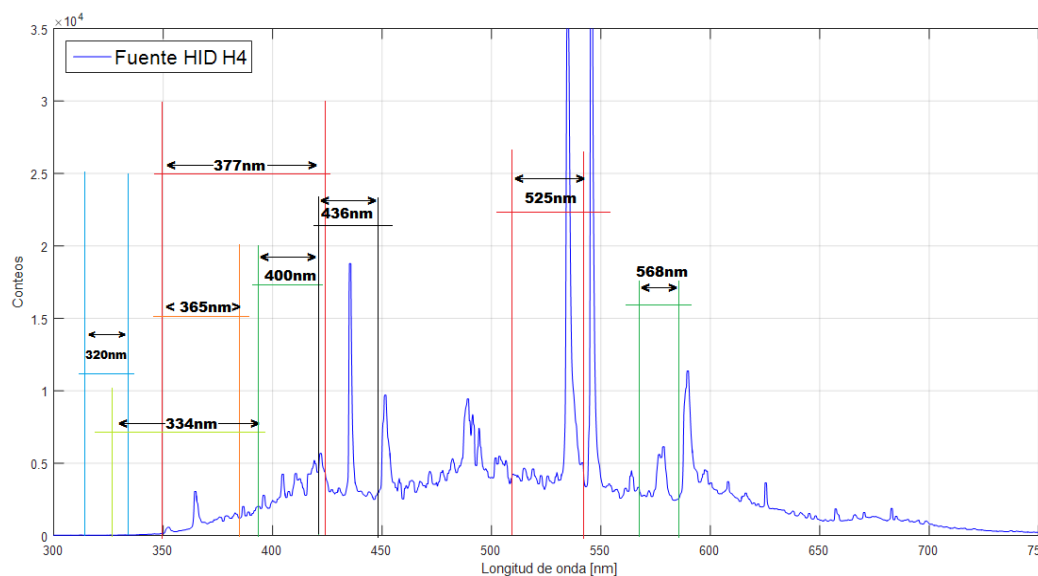
En la siguiente figura se muestra el espectro de excitación de la fuente HID H4 mencionada. Para esta medición se utilizó el montaje óptico, la cantidad de luz adquirida por el espectrómetro es la que llega a la celda de toma de muestras. Cada una de las mediciones se realizó en modo absorción, sin interponer celda UV.

Figura 2-14. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico.



En la figura 2-15 se muestra la región espectral de filtrado para para cada uno de los filtros dicróicos del sistema óptico.

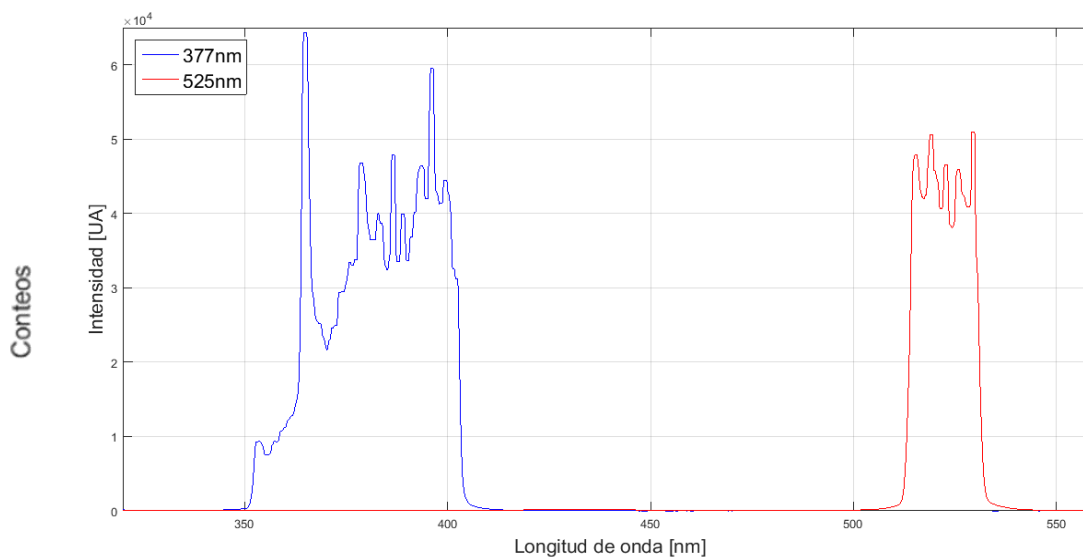
Figura 2-15. Ubicación según el rango en longitud de onda de los filtros del sistema óptico.



De esta manera, cada uno de los filtros tiene características en cuanto al ancho de banda de salida. La señal de salida del filtro dicróico conserva las características espectrales de

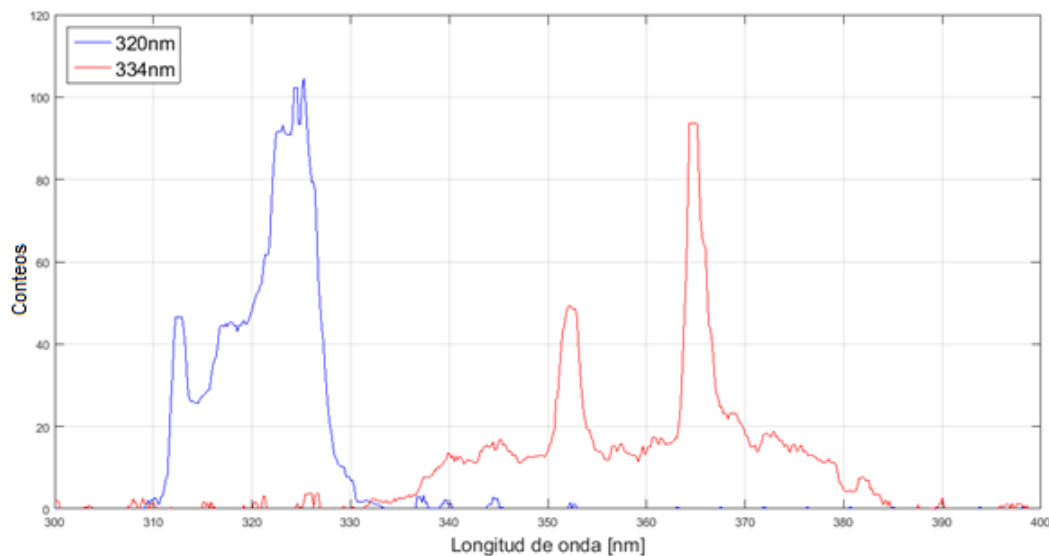
la fuente de luz, por este motivo como se mostrarán en las siguientes figuras, de ahí proviene la estructura espectral resultante. Para cada filtro referirse a la figura 2-15.

Figura 2-16. Intensidad de la señal que pasa a través de un dicróico a un tiempo de integración (15 ms) que llega a la celda de fluorescencia del arreglo óptico Para los filtros dicróicos de 377nm (azul) y 525nm (rojo).



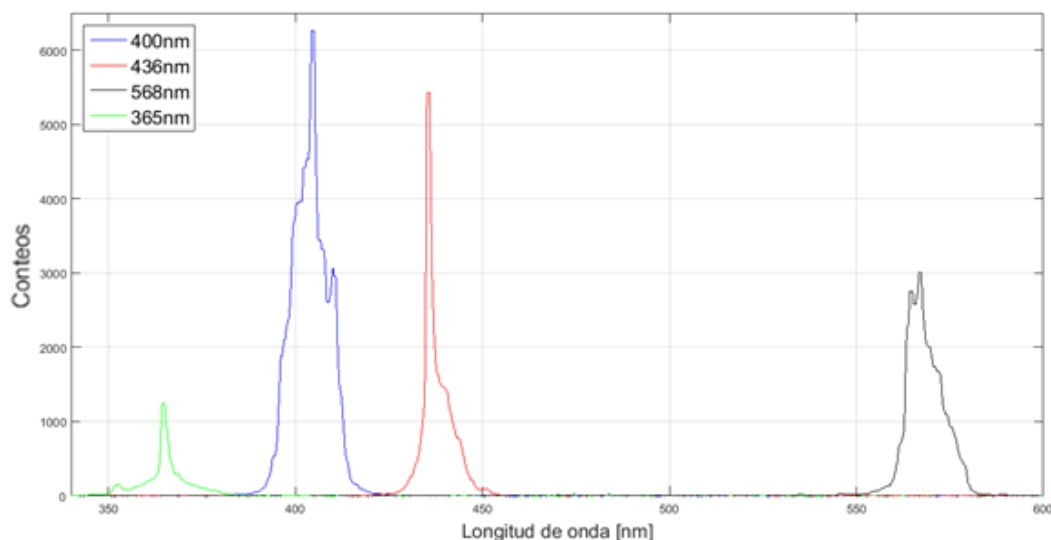
Los filtros de 377 y 525 nm son los que presentan la mayor transmitancia. Los valores de intensidad de emisión adquirida por el espectrómetro están por encima de 50000 conteos. Para las mediciones de espectrometría de fluorescencia, y más específicamente para la utilización de la técnica de EEMS se espera que el filtro pueda utilizarse para la excitación óptima de la sustancia fluorescente. Esto es a unos valores de longitud de onda específicos. Entre menor sea el ancho espectral resultante del filtrado, más adecuado es el análisis de la emisión de fluorescencia, pues ya la excitación no es tan policromática (ancho de banda). Cabe mencionar que la fluorescencia es el resultado de una probabilidad de que la molécula utilice la energía incidente del fotón proveniente de la fuente de luz para emitir luz. Por tal motivo, y como se menciona en el diseño conceptual del sistema, se prefiere que el flujo de fotones sea elevado, y que esencialmente no se presente disminución de esta cantidad ya sea por los filtros ópticos o por un desajuste en la alineación del tren óptico.

Figura 2-17. Intensidad de la señal que pasa a través de un dicróico a un tiempo de integración (15 ms) que llega a la celda de fluorescencia del arreglo óptico Para los filtros dicróicos de 320nm (azul) y 334nm (rojo).



En la figura anterior se muestra el espectro de emisión de los filtros de 320 y 334 nm. Estos filtros están ubicados en la región espectral de UV. La intensidad de luz que pasa a través de los filtros, como se observa en la figura 2.10, está relacionada a la cantidad de luz en la fuente. Para este caso, la fuente utilizada no cuenta con un número de conteos considerable en las regiones de los filtros. Estos filtros presentan el menor número de conteos de todo el sistema, con valores de intensidad cercanos a 100 conteos. Además, como es el caso del filtro de 334 nm, el ancho espectral está cercano a los 50 nm, lo cual es posiblemente indicio de la degradación del filtro.

Figura 2-18. Intensidad de la señal que pasa a través de un dicróico a un tiempo de integración (15 ms) que llega a la celda de fluorescencia del arreglo óptico Para los filtros dicróicos de 400nm (azul) y 436nm (rojo), 568nm (negro) y 365nm (verde).



Como se menciona en otros apartados del documento, la región de absorción de la gran mayoría de los hidrocarburos está por la región de 350 – 500 nm. Es en esta región en donde se debe procurar realizar la excitación de la sustancia. Son los filtros de 400 y 436 nm los que presentan el número de conteos más alto para el grupo de filtros, con una estructura espectral similar a la que ofrecen fuentes LED (monocromáticos). Para los filtros de 365 y 436nm se puede ver en la figura 2.10 que están ubicados en longitudes de onda donde la fuente de luz presenta picos de intensidad. Por este motivo se obtiene una señal de salida del dicróico con esas características.

2.3. Desarrollo del método de inversión

El espectrómetro utilizado en el proyecto es un espectrómetro portable multifuncional. El Avantes AvaSpec 3648 es un mini espectrómetro para aplicaciones en el UV-visible. Siendo un espectrómetro de arreglo simple, de resolución espectral variable (desde 0.025-20nm) con mayor número de pixeles en la región visible puede ser aplicado al campo de la técnica EEMS con limitaciones. Las limitaciones son fundamentalmente en la relación señal a ruido de 300:1, frente a los espectrofluorómetros comerciales que cuentan con relaciones superiores a 10000:1. De esta manera, se debe buscar realizar las mediciones

espectrométricas utilizando fuentes de luz de alta intensidad. En la aplicación de fluorescencia, como se mencionaba en parte teórica, la emisión del fluoróforo depende de factores como la concentración, el pH y la dispersión por material sólido, así como por la de sustancias no fluorescentes. De la radiación incidente a la muestra, es solo una pequeña cantidad de fotones las que se utilizarán para la emisión de luz (Fluorescencia). Por tal motivo, la potencia se llegará a alcanzar con fuentes de alta intensidad. Estas fuentes son esencialmente policromáticas y de espectro continuo.

Según los requerimientos técnicos del sistema, una de las maneras de poder obtener una matriz de excitación-emisión es a partir de fuentes policromáticas. Estas fuentes policromáticas son filtradas ópticamente para obtener una emisión de banda estrecha, a diferencia de la inicial. Para el caso del sistema desarrollado, se hace el estudio a partir de fuentes policromáticas de alta intensidad para sobrepasar la limitante de la relación señal a ruido del espectrómetro.

2.3.1. Descripción del método de inversión

El método de inversión (Jiménez-Pizarro, 2017), es una forma de obtener matrices de excitación-emisión a partir de fuentes de luz policromáticas. Se obtiene la función de transferencia entre el espectro de excitación y de emisión, en donde la fuente de excitación es monocromática o policromática.

Considera dos casos:

- 1) **Caso 1:** un solo fluoróforo, excitación monocromática, dispersión de luz despreciable.

La matriz de excitación emisión A es definida como:

$$A = \phi \cdot (1 - e^{(-\sigma \cdot c \cdot L)})$$

Donde ϕ es la eficiencia cuántica del fluoróforo, σ es la sección transversal de absorción, c es la concentración del fluoróforo y L el camino óptico de absorción.

En la capa límite, cuando el camino óptico (σ) es igual al coeficiente de absorción se puede asumir que el flujo total de emisión es linealmente proporcional a la concentración del fluoróforo, a su sección transversal de absorción y al camino óptico.

$$A \cong \phi \cdot \sigma \cdot c \cdot L$$

- 2) **Caso 2:** múltiples fluoróforos, excitación monocromática, dispersión de luz despreciable.

En este caso, los eventos de absorción son mutuamente independientes y dependen del flujo de fotones presente. Cuando múltiples fluoróforos están presentes, la emisión total ocurre como la suma de las emisiones de cada fluoróforo. Si se considera la misma situación de la capa límite del caso anterior, se llega a:

$$A \cong L \cdot \sum \phi \cdot \sigma \cdot c$$

3. Análisis y discusión de resultados

3.1. Evaluación de alternativas de fuentes de luz

Se busca identificar diferentes fuentes de luz de bajo costo y evaluar el potencial para aplicaciones de espectrometría de fluorescencia específica. Los criterios por considerar para la elaboración de una matriz de selección buscan priorizar la potencia en vez de la estabilidad de la fuente de luz.

La potencia en una fuente de luz se refiere a la cantidad de flujo luminoso emitido. Se relaciona a la cantidad de fotones emitidos y medidos en el espectrómetro. Debido a las mismas especificaciones de los procesos fluorescentes, entre mayor cantidad de fotones incidentes al fluoróforo, mayor es la posibilidad de que estos sean absorbidos y se emita luz.

El criterio de estabilidad de la fuente de luz hace alusión a la característica que tiene la fuente de tener un espectro de luz que sea característico y permanente. Las fuentes de luz pueden sufrir degradación en sus características espectrales. Esta degradación es causada por desgaste en los materiales, cambios en la óptica propia de la fuente, así como por la influencia de condiciones eléctricas y térmicas. Esta característica limita las condiciones de operación de la fuente de luz, haciendo que los sistemas ópticos y ambientes de medición sean cada vez más específicos. Debido a que la investigación busca el desarrollo de un instrumento prototipo que pueda ser transportado a campo, se debe tener en consideración lo robusto que pueda constituirse la fuente de luz, así como la facilidad de cambio de la misma.

En la investigación se llegó a establecer que las fuentes policromáticas cumplen con la potencia necesaria para las mediciones de fluorescencia, en particular las lámparas de

Xenón HID. Estas fuentes cuentan con emisión de luz desde 300nm (Región UV), hasta valores de longitud de onda cercanos a los 700nm. Debido a este ancho espectral, y su característica de descarga de alta intensidad fue utilizada en la investigación para la excitación de fluoróforos.

Como otro producto de la investigación se relaciona estas características espectrales de la fuente HID con un modelo de análisis matemático para la obtención de espectros de excitación - emisión a partir de cualquier tipo de fuente de luz.

3.1.1. Consideraciones para la escogencia de fuentes de luz

Para la espectrometría de fluorescencia se necesita una fuente de luz que tenga las características necesarias para que exista una excitación óptima del fluoróforo en la muestra a estudiar. Además de la cobertura espectral para la excitación se busca que la fuente tenga una serie de características de operación, estabilidad, mantenimiento. Además, se busca que los resultados que se puedan obtener a partir del sistema espectrométrico sean reproducibles y comparables. En la siguiente tabla se resumen los principales criterios considerados para la escogencia de una fuente de luz para el prototipo.

Tabla 3-1. Criterios para la escogencia de fuentes de luz en aplicaciones de espectrometría de fluorescencia.

Criterio	Importancia
Tiempo de calentamiento	Es el tiempo que tarda en establecerse la intensidad lumínica de operación. Puede deberse a factores térmicos, así como de estabilidad
Tiempo Encendido / apagado	Se refiere a los cambios que se puedan presentar en el espectro luego de encender y apagar la fuente.
Estabilidad	Se relaciona en la conservación de las características espectrales medidas. Es función del tiempo de operación.
Costo	Facilidad de obtención de repuestos. Relación inversión retorno.
Tiempo de vida	Tanto del sistema mecánico y electrónico de la fuente. Tiempo de operación en horas.
Rango / Cobertura espectral	Según el tipo de emisión: emisión continua (ancho de banda espectral) o emisión de líneas espectrales. Esto puede hacer diferencia entre los posibles usos de la fuente, p.e. calibración o fuente de excitación para fluorescencia.
Potencia	Flujo luminoso. En aplicaciones de fluorescencia puede ser indicador de la viabilidad de la utilización de una fuente.
Robustez mecánica	Capacidad de portabilidad. Conjunto electrónico necesario para que inicie la emisión por la fuente.

Cabe mencionar que según en estudios previos desarrollados en el proyecto (Lombana, 2016) se llega a la caracterización de la operación del espectrómetro utilizando fluoróforos puros (fluoresceína). Se menciona la importancia del montaje óptico para la optimización de la señal adquirida por el espectrómetro, la celda de toma de muestra y se hace énfasis en la escogencia de una fuente de luz adecuada para la aplicación de la técnica de EEMS y no solo para sustancias altamente fluorescentes, como lo es la fluoresceína.

Los procesos de fluorescencia son función directa de la capacidad y límite de detección del espectrómetro (adquisición de la señal de emisión) así como de las características de la fuente de excitación. Siendo que la aplicación del instrumento espectrométrico adquirido en el proyecto no es específica para espectrometría de fluorescencia, se busca realizar mejoras en el sistema de medición – alineación óptica y en la fuente de luz.

Uno de los objetivos del instrumento prototipo es la capacidad de ser portable y la detección de fluoróforos de origen orgánico. Se busca también que el sistema sea de bajo costo tanto en operación como en los componentes del instrumento.

De tal manera, los criterios que se dan mayor relevancia en la escogencia de la fuente son el costo, tiempo de vida de la fuente y la potencia luminosa. La potencia de la fuente puede mejorar la relación de señal adquirida por el espectrómetro sin necesidad en incurrir en modificaciones en el arreglo interno del espectrómetro.

3.1.2. Relación con el espectrómetro

La fuente puede llegar a afectar el comportamiento opto-electrónico del resto de los componentes. En este apartado se da en consideración las características de la fuente que afectan directamente el sistema espectrométrico. Se tiene en cuenta el rendimiento del sistema, la Sensitividad (relacionando la señal de emisión con la capacidad de detección del espectrómetro) y la portabilidad del conjunto, entre otras.

El sistema cuenta con el consumo de varios equipos. El espectrómetro utilizando en el proyecto se alimenta a través de puerto USB, haciendo que el consumo requerido no sea tan considerable. Diferente a lo que podrían ser los consumos energéticos de las fuentes de luz. Es ahí en donde la potencia de salida puede relacionarse con la complejidad y robustez del sistema. Además, se debe considerar los efectos térmicos consecuentes, debido a que la potencia requerida por la fuente para generar luz también, por motivos de eficiencia, termina siendo utilizada en disipación de calor. Se debe contar también en el prototipo con un sistema de refrigeración, esto es según la cantidad de calor generada por la fuente.

Tabla 3-2. Implicaciones por considerar de la fuente y su relación con el espectrómetro. (Fuente: Propia).

Criterio	Relación con el espectrómetro
Rendimiento	La adquisición espectral está relacionada a la intensidad de la fuente y a la estabilidad espectral ofrecida.
Sensitividad	La Sensitividad del instrumento puede ser expresada a partir de la relación señal a ruido del instrumento o por la cantidad mínima detectable de un componente particular en un set de condiciones.
Costo	Además del tiempo de vida del bulbo de la fuente de luz, considera el consumo de energía por frecuencia de uso.
Portabilidad	Considera el sistema espectrométrico y el suministro de electricidad de la fuente.
Huella del instrumento	La operación de la fuente puede llegar a generar materiales en desuso, baterías, consumo energético.
Operación de la batería	La batería del prototipo puede suministrar energía al sistema espectrómetro - fuente. Necesidad de baterías / sistemas de arranque.

La huella del instrumento considera la generación de materiales en desuso, el gasto de baterías y la generación consumibles. El sistema complementario a la fuente de luz debe ser simple, y de bajo consumo. Se busca que la fuente de luz sea fácilmente reemplazable y que los repuestos sean de fácil obtención en cualquier región, para que no exista una limitación en cuanto a la operatividad del sistema.

3.1.3. Fuentes de luz disponibles - Caracterización de las fuentes y lámparas

Las principales fuentes de luz para espectrometría de fluorescencia se mencionan en la siguiente tabla. Se hace una relación entre ventajas y criterios para tener en cuenta, así como las aplicaciones en la espectrometría clásica.

Tabla 3-3. Características de las fuentes de luz en aplicaciones espectrométricas. (Venugopalan, 2016)

Fuente de luz	Ventajas	Considerar	Tipo de espectroscopía
Halógena - Deuterio	Espectro continuo y suavizado en un rango amplio de longitud de onda. Presencia en UV profundo.	Tiempo de vida del bulbo y estabilidad.	Absorbancia en el UV-Visible.
Halógena	Fácil de usar para aplicaciones UV-Visible. Alta potencia. Rango espectral de cerca de 500nm.	No hay señal en el UV. Calentamiento del sistema.	Aplicaciones en el infrarrojo cercano.
Xenón	Rango espectral amplio. Presencia en UV-Visible. Alta potencia, alto tiempo de vida.	Picos intensos en el espectro. Estabilidad en fuentes pulsadas.	Reflectancia Aplicación UV-Visible.
LED	Estable. Puede ser de ancho de banda como estrecho de banda. Fácil integración. Bajo consumo (potencia). Tiempo de vida alto.	Potencia en el UV. Falta de rango espectral.	Fluorescencia en proteínas.
Láser	Cuando se necesita más potencia de la que puede ofrecer un LED.	Ancho de banda del láser. Estabilidad en longitud de onda.	Mediciones Raman.

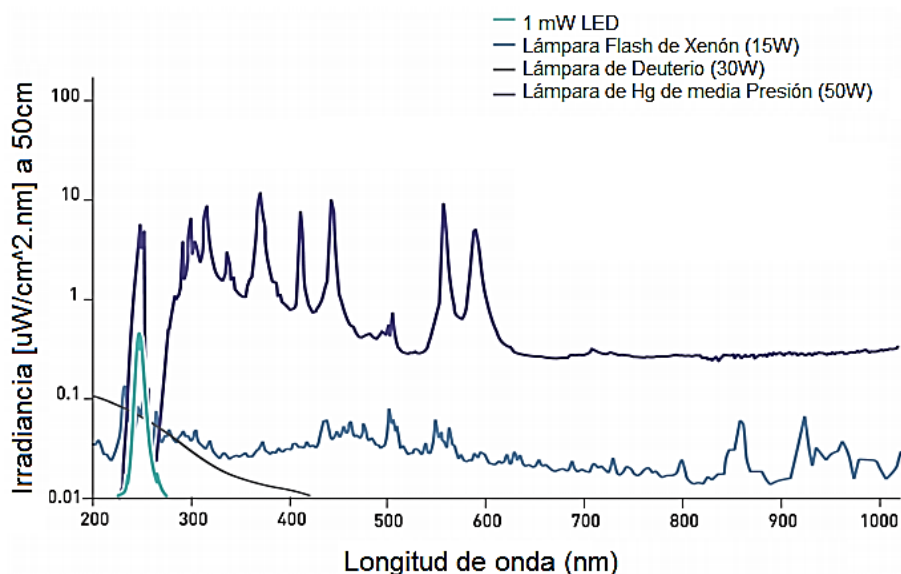
En la tabla se mencionan dos grandes grupos de fuentes: continuas o discontinuas o de líneas. Las fuentes continuas, son las que emiten radiación en un amplio rango de longitud de onda, mientras que las discontinuas o de líneas emiten un limitado número de líneas o bandas de radiación. Entre las continuas se encuentran las fuentes halógenas, de Deuterio, Xenón y LED y en las discontinuas las fuentes láser.

En la tabla no se incluyen algunas fuentes continuas debido a que son de difícil acceso, complejidad, robustez y costo. Por ejemplo, las lámparas de Wolframio ($\Delta\lambda=350-2200\text{nm}$), de Nicrom ($\Delta\lambda=750-20000$), de Nernst ($\Delta\lambda=400-20000$) y la fuente Globar ($\Delta\lambda=1200-40000$). Las fuentes con longitudes de onda (λ^{17}) con radiación por encima de 700 nm se utilizan en aplicaciones de absorción molecular IR y en aplicaciones Raman. (Universidad de Castilla - La Mancha, n.d.).

¹⁷ λ , denota longitud de onda.

En cuanto a fuentes discontinuas se tiene por ejemplo las lámparas de cátodo hueco (UV-visible), las de descarga sin electrodos (UV-visible), las de vapor metálico (UV-visible) las cuales son utilizadas en fluorescencia atómica, molecular y en Raman.

Figura 3-1. Intensidad de luz medida por un espectrómetro para diferentes fuentes de luz. Medición realizada con una distancia de 50cm entre el detector y la fuente de luz. (Fuente: Adaptado de (Venugopalan, 2016)).



Las fuentes LED UV tienen presencia en el UV (200-300nm), pero no tienen la suficiente potencia requerida en el instrumento prototipo a desarrollar. Las fuentes de Deuterio y Xenón cuentan con la suficiente cobertura espectral para aplicaciones de fluorescencia.

Las lámparas de mercurio y los láseres son de espectro discontinuo, y por este motivo la aplicación para excitación de muestras fluorescentes está limitada al conjunto de líneas presentes en el espectro. Los láseres son fuentes de alta potencia, pero esencialmente monocromáticos; en la técnica de EEMS se necesitan un conjunto de señales de excitación para la construcción de la matriz. Si se considera la utilización de láseres de diferentes colores para la excitación, se debe tener en cuenta que algunos de estos generan emisión utilizando gases. La excitación de los láseres es coherente (monocromática) y el arreglo óptico es robusto y requiere de sustancias para la generación de excitación (gases). No existen un gran número de láseres para una cobertura espectral, se utilizan tintes para realizar la excitación de esos tintes fluorescentes y cambiar la señal de emisión a de un color de menos energía.

3.1.4. Alternativas de fuentes y lámparas de bajo costo

Comúnmente las fuentes de luz que son utilizadas en espectrometría de fluorescencia deben tener salida de intensidad continua a lo largo del espectro o ser constituida como una serie de líneas discretas.

Esta característica hace que la fuente sea utilizada como fuente de excitación o ser utilizada como parte del sistema de calibración del instrumento. Por ejemplo, las lámparas de mercurio son las fuentes de luz que emplean líneas de emisión, y es a partir de esta propiedad que se limita el uso a la verificación de la lectura del espectrómetro con los datos relacionados con el espectro del Hg. En un primer paso del procedimiento de calibración se procede a obtener los valores teóricos en longitud de onda en donde se encuentran las líneas de emisión del mercurio y luego se sigue en la utilización del espectrómetro a calibrar para medir el espectro, se comparan la medición y los datos de las líneas teóricas y se puede establecer si el espectrómetro se encuentra midiendo de manera correspondiente a los valores reportados en la literatura.

Se debe también caracterizar las fuentes por la presencia de intensidad luminosa en la región del UV. Además de tener una parte de UV se debe verificar el rango en el visible y el espectro resultante de la fuente.

Es muy raro encontrar una fuente de luz que se adecue completamente a los valores de longitud de onda óptima de excitación de la muestra, por lo tanto, es ventajoso utilizar una fuente continua (de rango espectral de ancho de banda).

Las lámparas de Xenón son fuentes que pueden ser operadas de manera continua o pulsada. Según estudios previos realizados en el proyecto (Lombana, 2016), se utiliza una fuente pulsada de Xenón, la cual ofrece resultados de excitación – emisión para fluoróforos estándar, como lo es la fluoresceína, pero se adecuan de manera adecuada con sustancias altamente fluorescentes.

En cuanto a la estabilidad y reproducibilidad de la medición, las lámparas de Xenón de arco son más estables que las de descarga (fuentes pulsadas) (Perkin Elmer, 2000).

De esta manera la forma más adecuada para utilizar las fuentes en la espectroscopía de fluorescencia debe incluir la utilización de una sección específica del rango espectral de

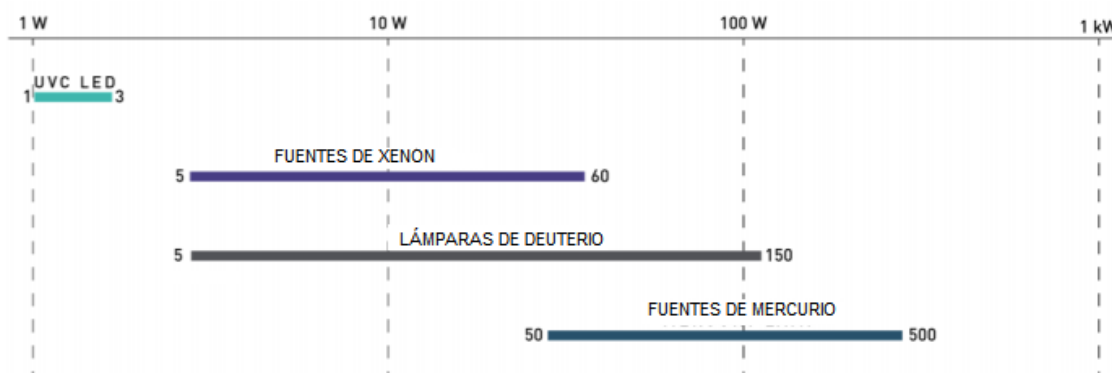
excitación producido por la fuente. Esto se puede realizar a través de la utilización de monocromadores o utilizando sistemas de filtros ópticos.

3.1.5. Tiempo de vida de la fuente, potencia y costo en el instrumento

Como se mencionaba en apartados anteriores, es la potencia de salida uno de los criterios más importantes en la escogencia de la fuente para el instrumento. La potencia, aunque relacionada con el consumo energético, puede incurrir en el cambio del detector y una posible optimización y adecuación del mismo en términos de sensibilidad y cobertura espectral. La potencia de luz en el caso particular del instrumento desarrollado está relacionada a la generación de fluorescencia. Entre mayor sea el flujo de fotones incidentes a la muestra, mayor va a ser la probabilidad de que la molécula se excite y como producto de la excitación emita luz. Dentro de las limitaciones del espectrómetro se encuentra la relación señal a ruido. El espectrómetro cuenta con una relación señal a ruido de 300:1 (Avantes, 2015), mientras que los sistemas espectrométricos clásicos tienen valores de relación señal a ruido por encima de 10000:1, permitiendo la detección de pequeños flujos de emisión. Sistemas espectrométricos de estas características tienen costos por encima de los 60000 USD, a comparación de los 3000 USD del espectrómetro del prototipo.

En la siguiente figura se muestra la potencia de salida de las fuentes de Xenón, LED, de Deuterio y las fuentes de mercurio.

Figura 3-2. Potencia de salida de las fuentes UV, pulsadas de Xenón/continuas de Xenón, lámparas de Deuterio y fuentes de mercurio. Adaptado de (Venugopalan, 2016).

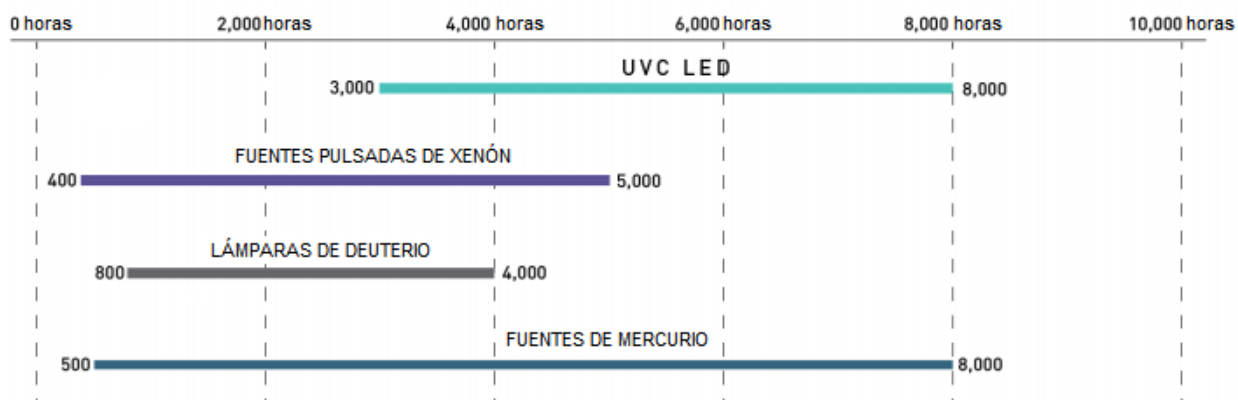


Las fuentes de Xenón ofrecen una potencia de salida intermedia, así como un rango espectral desde los 300 – 750 nm. Las fuentes LED a su vez, se caracterizan por tener la menor potencia de salida.

Existen arreglos espectrométricos novedosos en los que por un set de LED se puede llevar a cabo la excitación de muestras para la obtención de fluorescencia (Hart, 2006; Hart & JiJi, 2002b; Herman & Vecer, 2008; Nikolova et al., 2013), pero no en la técnica de EEMS ni en la aplicación específica de matrices de hidrocarburos. Sus aplicaciones están enfocadas a la detección de tintes fluorescentes (fluoróforos puros).

El tiempo de vida de la fuente está reportado como el número de horas en operación en los cuales la fuente se encuentra emitiendo luz antes de su degradación. Las fuentes LED son las que presentan el tiempo de vida más alto debido a sus condiciones térmicas, electrónicas y por la estabilidad de los materiales constituyentes. Las fuentes de Xenón y de Deuterio pueden presentar los rangos más amplios en tiempo de vida, esto es debido a la degradación que puede sufrir el bulbo en la fuente, como su opacamiento.

Figura 3-3. Tiempo de vida de las fuentes UV, pulsadas de Xenón y Xenón, lámparas de Deuterio y fuentes de mercurio. Adaptado de (Venugopalan, 2016).



El costo del instrumento incluye todas las partes necesarias para hacer la medición a partir de una fuente de luz determinada. En la siguiente tabla se relacionan diversas fuentes de luz comerciales y se incluye una lámpara comercial de Xenón, de referencia HID H4. Esta lámpara no es de aplicación espectrométrica, sino que presentan características muy similares en cuanto a cobertura espectral, intensidad, estabilidad y potencia a las fuentes de Xenón de espectrometría. Esta fuente de Xenón es utilizada comúnmente en

automóviles en los sistemas de iluminación. Es una fuente de alta potencia y es de fácil adquisición en el mercado.

Tabla 3-4. Análisis del costo típico de un instrumento de medición espectrométrico. Adaptado de (Crystal IS, 2016).

Parámetros	Lámpara de Deuterio	UVC LED	Lámpara de mercurio de 11 W	Lámpara de Xenón 35W	Lámpara Xenón HID H4
Costo del instrumento					
Lámpara	\$ 400	\$ 600	\$ 25	\$ 447	\$ 15
Socket ¹⁸	\$ 100	\$ -	\$ -	\$ 100	\$ -
Filtro	\$ -	\$ -	\$ 350	\$ -	\$ -
Monocromador	\$ 950	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Suministro de potencia	\$ 1,450	\$ 50	\$ 50	\$ 750	\$ 18
Divisor de haz de luz	\$ 200	\$ 200		\$ 200	\$ -
Detector	\$ 5	\$ 2,000	\$ 2,000	\$ 2,000	\$ 2,000
Sistema disipación calor	\$ 900	\$ -	\$ 150	\$ -	\$ -
TOTAL	\$ 4,005	\$ 2,850	\$ 2,575	\$ 3,497	\$ 2,033

Se relacionan los costos del instrumento. En el caso de que el parámetro no aplique, se toma como valor \$0. En el caso de la lámpara de Deuterio, al tener sistema de monocromador, el detector es simple.

*Los valores son reales y referenciados a dólares americanos al 2016.

** Base de cálculo: \$0.12/kWh.

De la tabla se empieza a evidenciar que en términos del costo del instrumento se debe optar por fuentes LED o de Xenón HID. Estas fuentes son las más sencillas de las opciones disponibles, además son las menos robustas, las que cuentan con la mejor cobertura espectral. No es necesario la inclusión de un sistema de disipación térmica complejo para el caso de la fuente LED, debido a su baja potencia. En el caso de las lámparas HID H4, el principio de operación es una descarga de alta potencia, en donde se obtiene un plasma en el bulbo el cual genera luz desde 300nm hasta los 750nm.

¹⁸ Socket, sistema de protección de la fuente de luz.

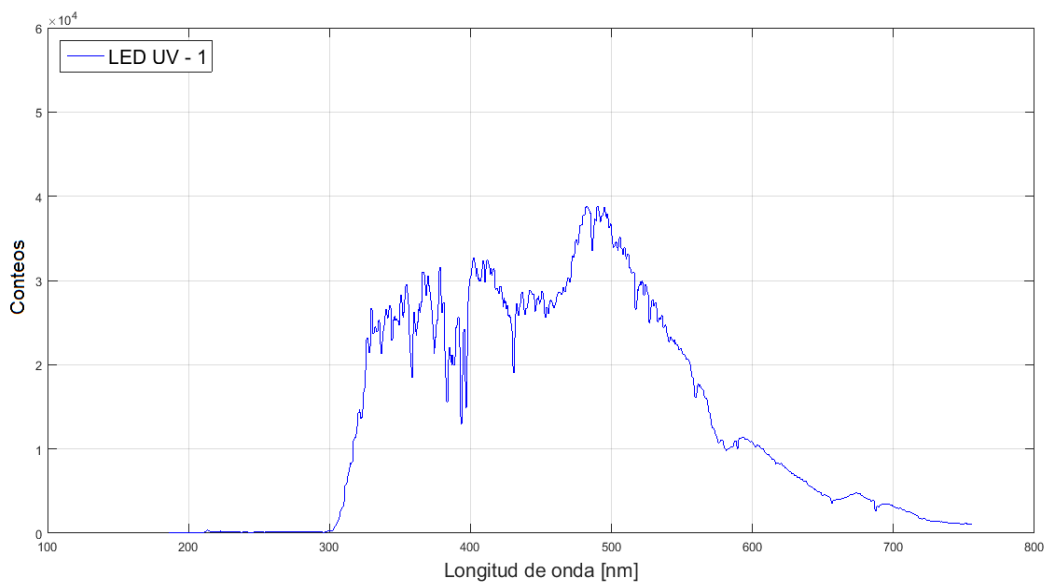
3.1.6. Mediciones con una fuente de luz tipo LED

Las fuentes LED son las de mayor proyección en el mercado. Las fuentes LED UV se utilizan no solo en espectrometría, sino que tienen aplicaciones en cuanto a la desinfección, en la medición de calidad del agua, en la estimación de fluorescencia de tejidos vivos y de proteínas entre otros. La potencia de este tipo de fuentes va desde los 100mW hasta cerca de 3W. La potencia de los LED's es baja a comparación de las fuentes mencionadas, pero tienen una alta estabilidad y alto tiempo de vida.

Se realizaron mediciones de dos LED utilizados es espectrometría. Las mediciones fueron realizadas con el espectrómetro del proyecto (Avantes 3648) y las mediciones fueron realizadas en modo directo (absorción) en una alineación de fuente – detector de cerca de 30cm.

En la figura se muestra la señal de emisión del LED UV medido. Esta medición no se interpuso ningún tipo de filtro óptico.

Figura 3-4. Medición emisión LED UV – 1. Tiempo de integración = 500ms

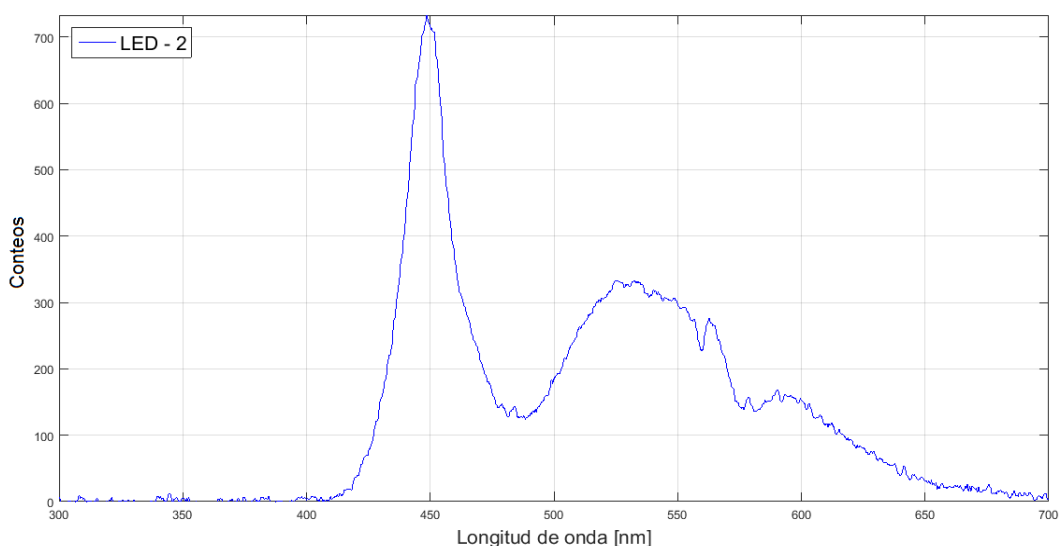


Este LED tiene una cobertura espectral UV-visible, con señal desde los 300nm (región UV) hasta infrarrojo cercano (por encima de los 700nm). La potencia de este LED es de 1W.

Debido al ancho de banda presentado en el espectro, si se utiliza este tipo de fuente, se debe interponer un sistema de filtros dicróicos para poder generar varias señales de

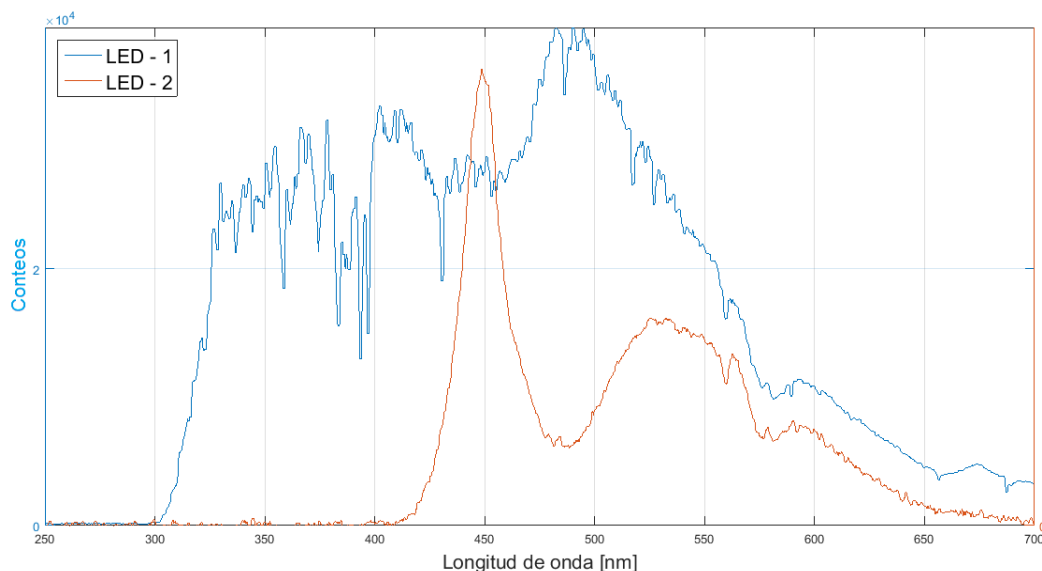
excitación monocromática. Se debe considerar que la gran mayoría de los filtros dicróicos generan una disminución en la señal de intensidad generada, por lo tanto, el resultante va a ser una señal de excitación que va a llegar a la celda con una menor potencia. En el caso de que se utilizara un espectrómetro con una mejor relación señal a ruido, es el sistema LED uno de los de mejor proyección. El precio de este bombillo LED es cerca de 300 USD (2014) y la compra debe ser por medio de importación al extranjero.

Figura 3-5. Medición emisión “LED” - infrarrojo. Región espectral del visible al infrarrojo cercano. Tiempo de integración=50 ms.



Existen otros LED's utilizados en espectrometría, estos cuentan con cobertura espectral desde el visible hasta el infrarrojo cercano. En la figura anterior se muestra un LED medido a las mismas condiciones del anterior utilizando como detector el espectrómetro Avantes 3648. Al realizar la equivalencia en términos del tiempo de adquisición de la medición (tiempo de integración) se tiene que el número de conteos presente en este segundo LED es menor que el LED UV. La potencia de este LED es de 500mW.

Figura 3-6. Comparación medición emisión LED's UV



3.1.7. Caracterización fuente de luz de Xenón HID H4¹⁹

La lámpara de Xenón HID H4 es una fuente de descarga de alta presión. La generación de luz utiliza una mezcla de gases nobles, entre ellos el Xenón. No tienen filamento tipo lámparas halógenas, sino que la generación de luz se genera por la diferencia de potencia entre dos electrodos.

Entre las principales características de la fuente de luz HID H4 se encuentra (Philips, n.d.):

- Alta luminosidad
- Bajo consumo de energía
- Distribución precisa de la luz.
- Luz blanca brillante tipo "Luz día".

¹⁹ HID, de las siglas en inglés High Intensity Discharge. Es una lámpara de luz incandescente.

La luz que se produce es consecuencia de las micro-descargas a una atmósfera de Xenón. Para esto es necesario aplicar un alto voltaje para el encendido de la lámpara. Para elevar el voltaje proveniente de una fuente regulada, se utiliza un balasto²⁰ electrónico.

Esta fuente es utilizada en automóviles debido a que incrementa la visibilidad de noche en un 300%. Tiene una vida útil más alta de las lámparas halógenas tradicionales. Debido a su uso primordial, se adecuan fácilmente a condiciones ambientales. Tanto el balasto como la fuente HID son a prueba de agua y pueden funcionar a temperaturas hasta de 120°C.

Figura 3-7. Fuente HID - H4 con coraza metálica utilizada en el prototipo. Color 6000K. (Fuente: <http://www.amazon.es/luces-xenon-centralitas-slim-6000k/dp/B00D1SVTGC>).

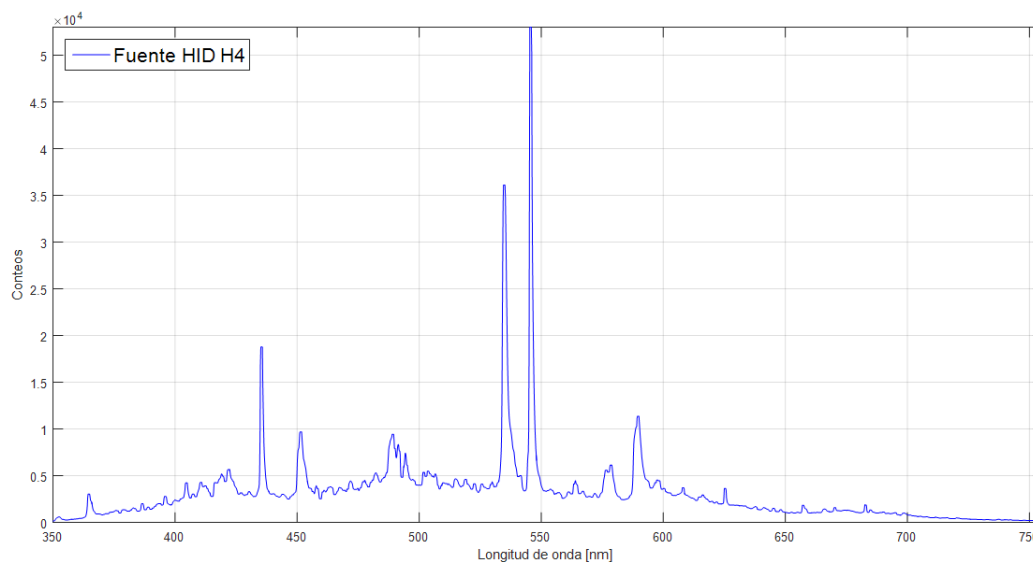


Posee una coraza metálica protectora. Esa coraza también sirve para colimar (Focalizar) el haz de luz emitido. El bulbo del bombillo HID es donde se encuentran los gases nobles (esencialmente Xenón) que son los que, al ser excitados por medio de tensión, emiten luz. El bulbo está protegido por una coraza de vidrio. La coraza de vidrio además de protección es utilizada para bloquear una parte de la radiación UV originada.

Siendo que esta fuente es la que agrupa la gran mayoría de parámetros importantes en la serie de alternativas, se decide realizar la caracterización espectral de la fuente para su evaluación en términos de la aplicación a la técnica de EEMS y al prototipo.

²⁰ Un balasto electrónico transforma los 12V (de una batería DC o una fuente regulada) a los 25000 V necesarios para el encendido durante 3 milisegundos. Luego deja la tensión en 85V.

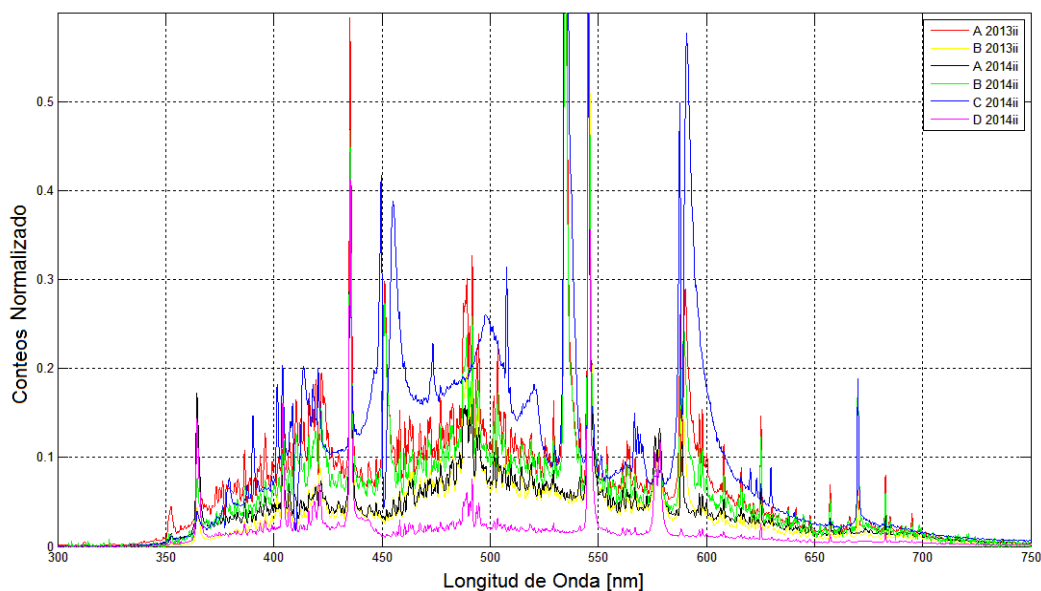
Figura 3-8. Intensidad de la señal proveniente de la fuente HID H4 que llega a la celda de fluorescencia del arreglo óptico.



El rango espectral de la fuente HID va desde valores cercanos a 300nm (UV) hasta cercanos a 750nm (infrarrojo cercano). Es un espectro continuo, con una serie de picos de intensidad, sobre todo en el rango espectral de 530 a 560nm. Cada una de las mediciones realizadas con el espectrómetro con arreglo directo (modo absorción) es realizada a distancia fuente – detector de cerca de 30cm y con valores de tiempo de integración por debajo de 1ms. Este valor de tiempo de adquisición reducido sugiere que la fuente es lo suficientemente intensa para generar saturación del CCD y una lectura incorrecta.

Se recolectaron adicionalmente 6 bombillos HID H4 para análisis. Estos fueron obtenidos luego de su uso en un sistema automotor. Las mediciones realizadas en la caracterización, ensayos de mezclas y demás fueron a partir de un bombillo HID H4 nuevo.

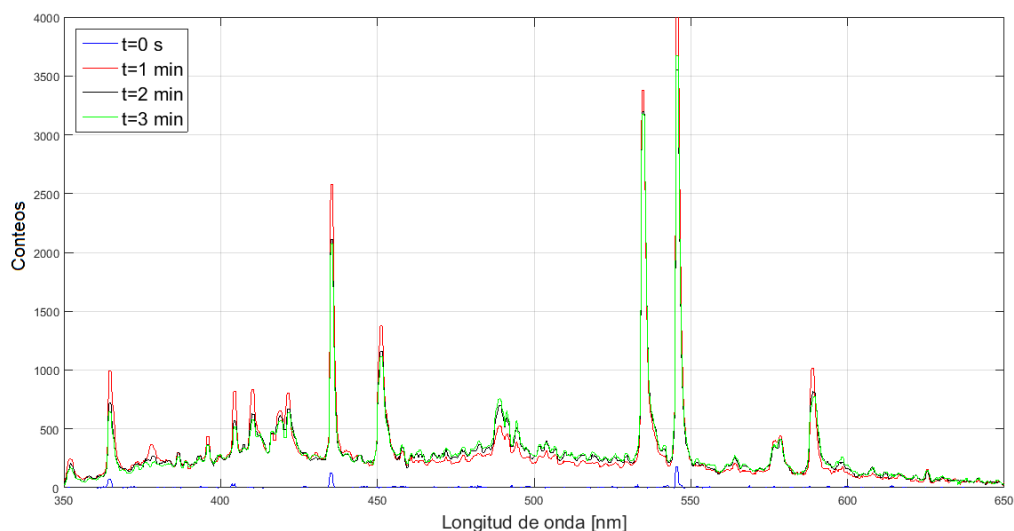
Figura 3-9. Ensayos Fuentes Tipo HID H4. Cada una de las fuentes HID obtenidas está clasificada alfabéticamente y por el año de adquisición.



En la figura anterior se relacionan los espectros directos de emisión de la fuente HID H4. Cada una de las mediciones fue normalizada para realizar la comparación entre mediciones. Se empiezan a obtener valores de intensidad cerca de 350nm sigue de manera continua hasta cerca de 750nm. Este rango es UV-visible, y es ideal para las estimaciones de espectrometría de fluorescencia. Como se pueden evidencias, según el gasto de las fuentes, se evidencia un cambio en la estructura espectral de la fuente. Existen coincidencias en cuanto a los picos de intensidad del espectro, así como en la estructura general de la fuente.

Uno de los criterios para la escogencia de la fuente de luz mencionados en secciones anteriores incluía el tiempo de calentamiento. Esta fuente, cuyo principio de operación tiene que ver la descarga producida por electrodos para originar la excitación del gas, requiere que se alcancen unas condiciones de estabilidad térmica.

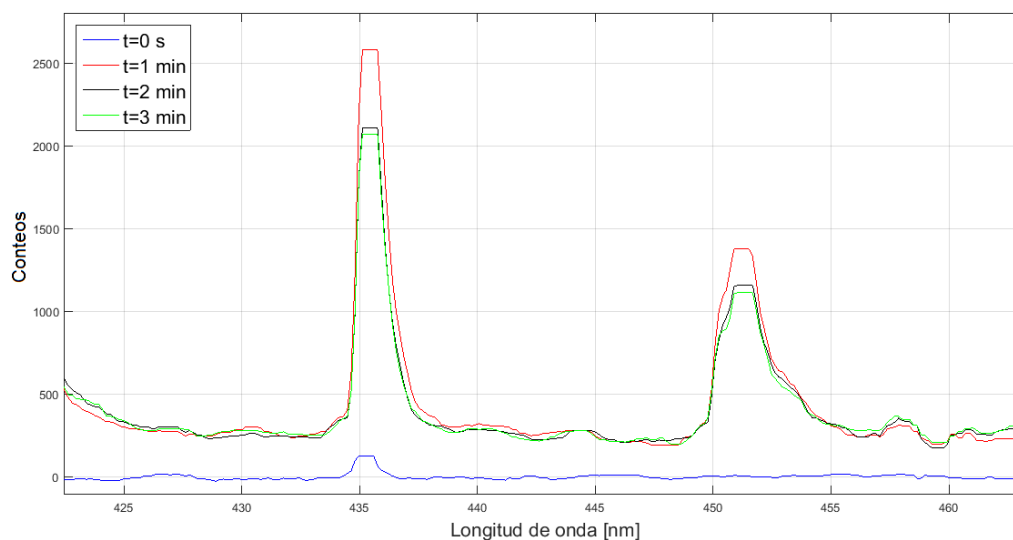
Figura 3-10. Tiempo de estabilización fuente HID H4. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico



Al realizar una medición de la señal de la fuente HID a partir de inicio en frío se obtienen los espectros de la anterior figura. Se realizaron mediciones cada segundo hasta llegar a obtener una respuesta espectral (a tiempo de integración constante) de operación. La señal se empezó a medir desde el inicio en frío y se ve que posterior al encendido empieza a crecer en intensidad hasta un valor máximo cerca del minuto de medición (línea roja). Luego la intensidad de la fuente de luz empieza a disminuir y luego de los tres minutos de operación se observa que no empiezan a verse variaciones en cuanto al número de conteos (intensidad) medida en el espectrómetro.

En la siguiente figura se toma un rango espectral menor y se elige un pico de emisión para observar la variación de las mediciones. Es importante mencionar que la adquisición, aunque fue cada segundo, se realizó un promedio de mediciones para llegar un valor lo menos ruidoso que se pueda obtener.

Figura 3-11. Tiempo de estabilización fuente HID H4. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico



En el pico de 436nm se puede observar la variación en términos de intensidad de la respuesta adquirida como función del tiempo. Se recomienda realizar la toma de mediciones de fluorescencia luego de 3 minutos de encendido de la lámpara desde su inicio en frío.

La estabilidad de la fuente HID es función del uso y de la degradación del bulbo. Existen condiciones de manejo de la fuente que pueden llevar a que se aumente el desgaste, esto debido a choques o a una incorrecta manipulación del bombillo. En este proyecto la manipulación mecánica de la fuente HID fue baja debido a que se realizó el montaje de la fuente sobre la tabla óptica asegurando de esta manera su estabilidad en la alineación óptica del sistema.

Figura 3-12. Tiempo de estabilización fuente HID H4. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico

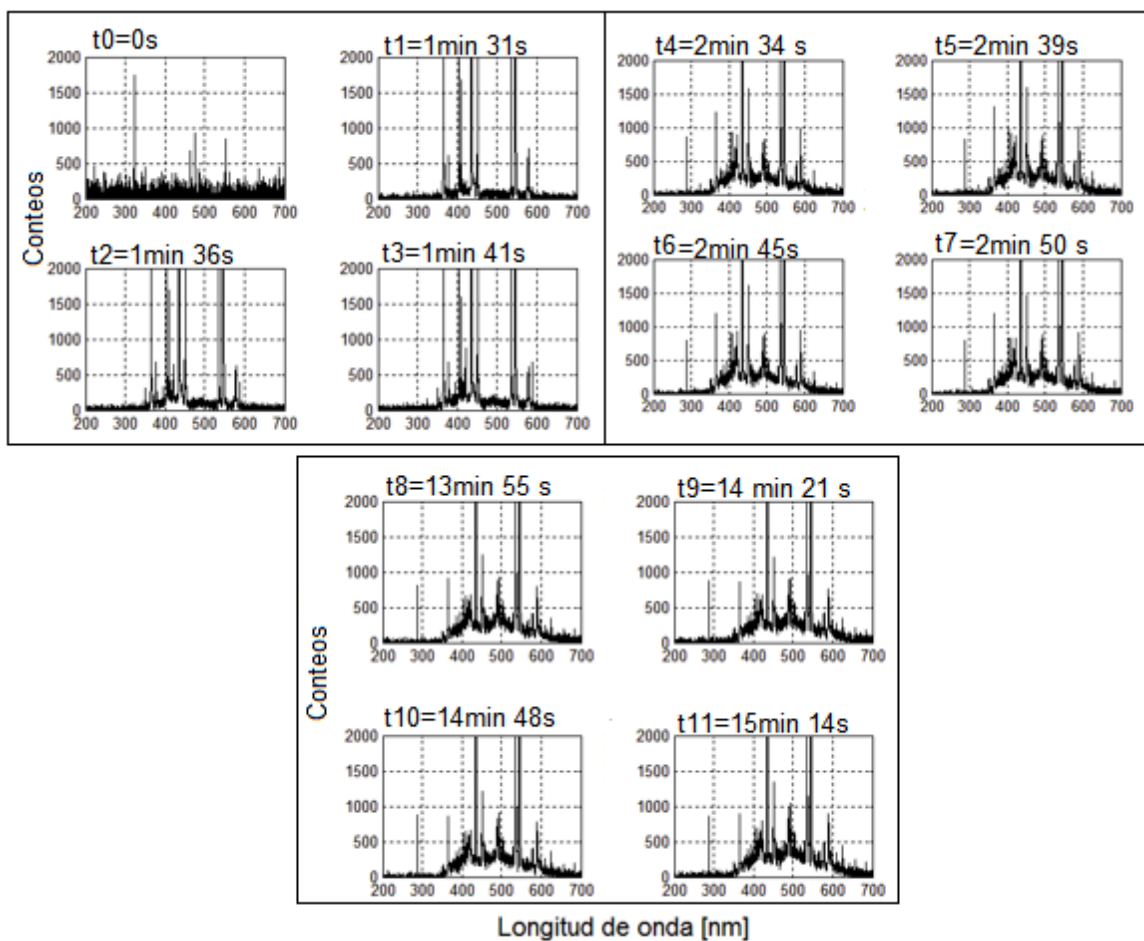
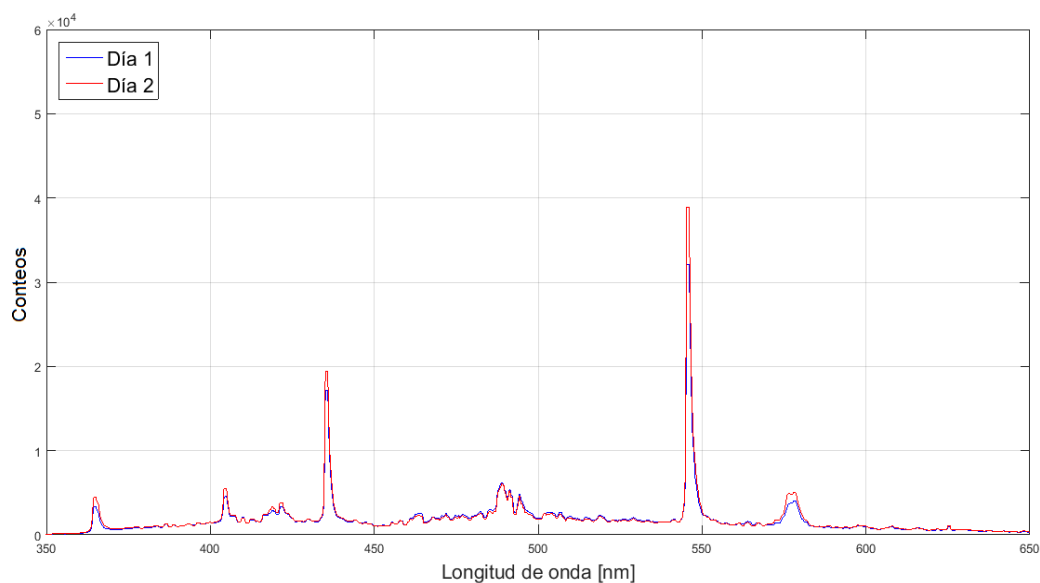
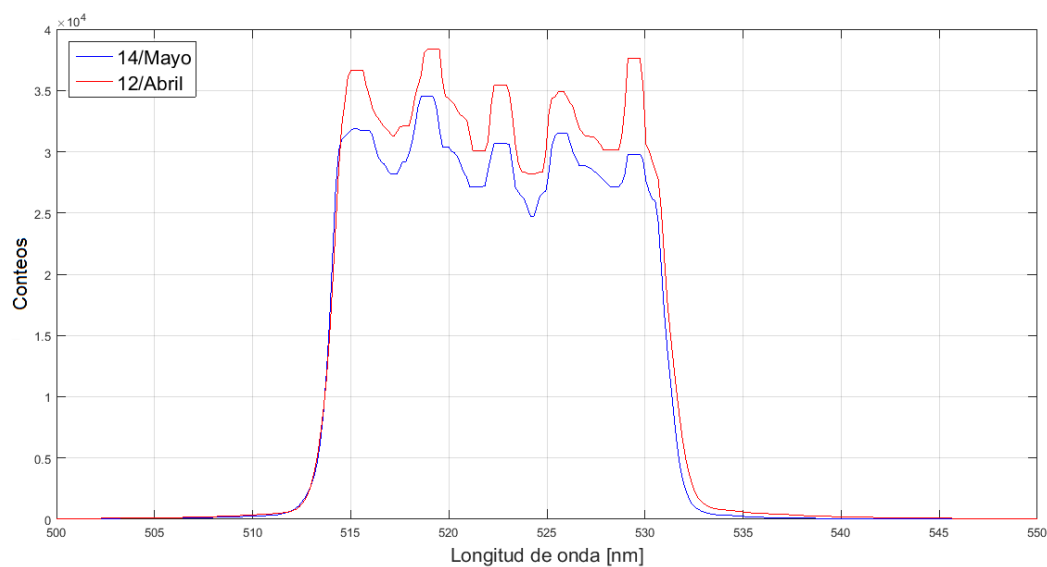


Figura 3-13. Comparación entre días HID H4. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico



El cambio de estructura espectral entre días es mínimo. Empieza a evidenciarse un cambio en la estructura pasados 3 meses de uso de la fuente.

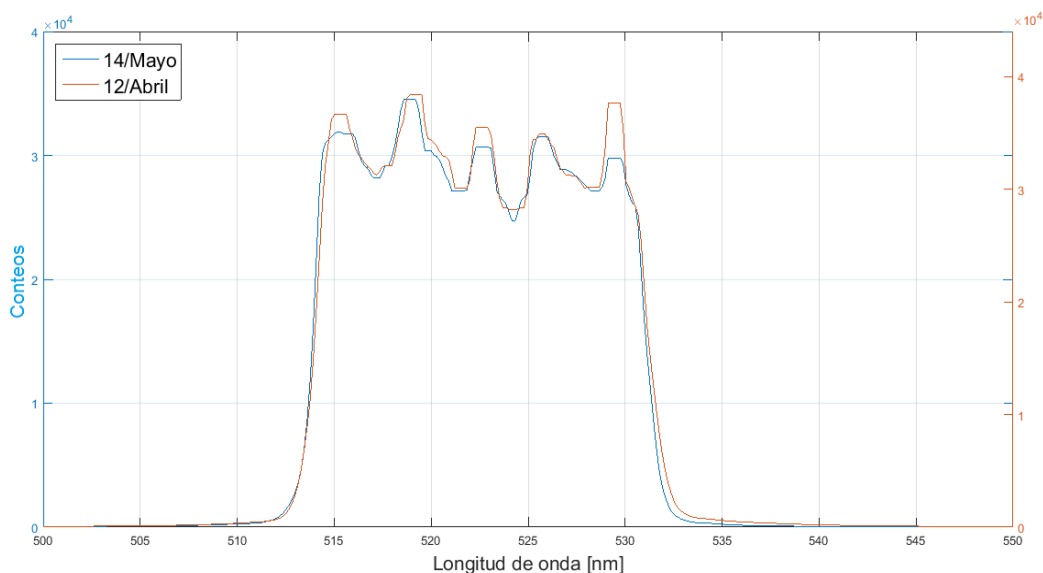
Figura 3-14. Variación espectral fuente HID. Mediciones realizadas el 12 de abril de 2017 y el 14 de mayo de 2017 usando el filtro dicróico de 525nm. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico



La medición realizada en la figura anterior demuestra que se conserva la estructura espectral de la fuente luego de meses, aunque exista una disminución en la intensidad recolectada. Esto es causado por la pérdida de la vida útil de la fuente.

Al relacionar las dos mediciones espectrales, igualando las intensidades se puede realizar una comparación en las estructuras espectrales particulares de la fuente. La estructura espectral de la fuente no se pierde de manera homogénea, pues existen picos de intensidad, como por ejemplo el de 530nm (Figura 3-14) el cual disminuye más rápidamente a comparación del resto.

Figura 3-15. Variación espectral fuente HID - Filtro 525nm



Siendo que la luz es emitida por una cavidad contenedora de la carga del gas y de los electrodos, de esta manera la imagen de la fuente es alargada según la representación de la cavidad con esa misma forma.

Al hacer la optimización del tren óptico (fuente – lentes – filtros – celda – espectrómetro) se debe llegar a optimizar la cantidad de luz originada en la fuente para que pueda incidir en los lentes biconvexos a máxima intensidad. De esta manera se debe focalizar la intensidad de la fuente, siendo que esta tiene la forma de la bombilla, no es simétrica en los ejes.

Alineación montaje óptico

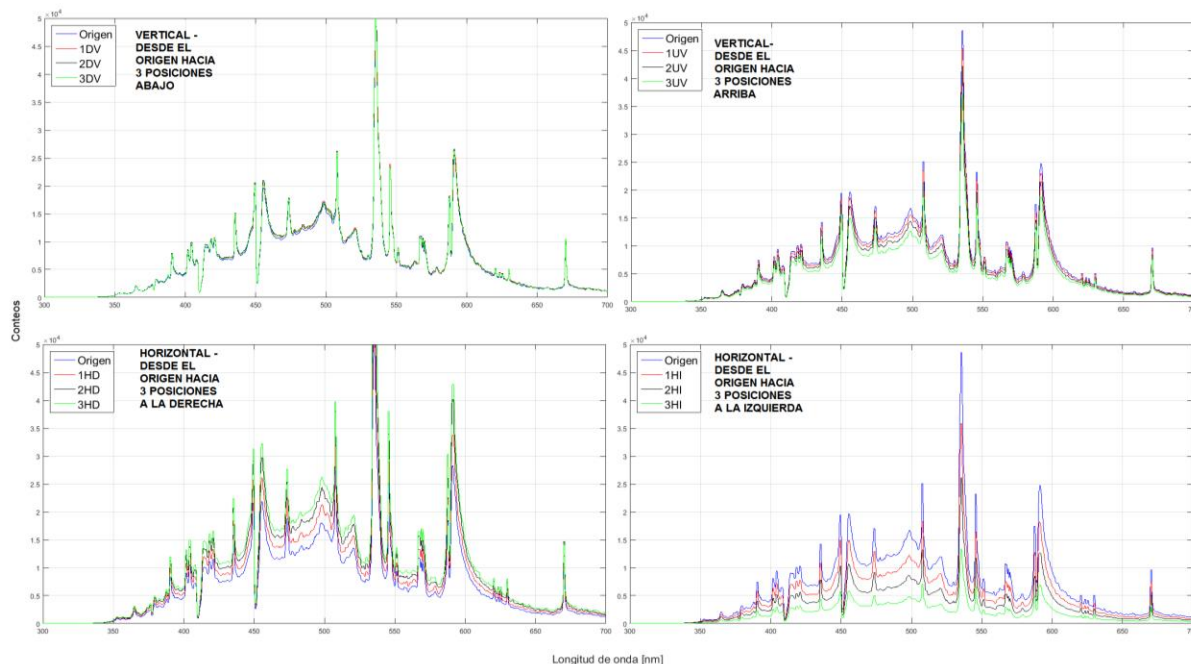
Para llegar a caracterizar el grado de sensibilidad de la alineación óptica con los cambios en ubicación de la fuente de luz, se utilizó un Posicionador XYZ.

Figura 3-16. Posicionador XYZ (*Small X-Y-Z Axis Leadscrew Drive Stage*), Edmund Optics.



El Posicionador XYZ es ideal para posicionamiento fino. Cada una de las posiciones permite el aseguramiento de la posición alcanzada.

Figura 3-17. Caracterización de la fuente HID en función a la posición relativa. Se establece un punto de origen (posición x: 0, y: 0, z: 0) para luego medir la variación de la señal adquirida por el espectrómetro en por el cambio en posiciones horizontales y verticales. No se realiza variación hacia adelante o hacia atrás. Cada una de las posiciones es un paso de 2mm.



Considerando la estructura de la imagen proyectada por la fuente (bulbo), y estableciendo como posición la orientación vertical del bombillo se observan los resultados en términos de variación de la intensidad y de las condiciones térmicas de la fuente.

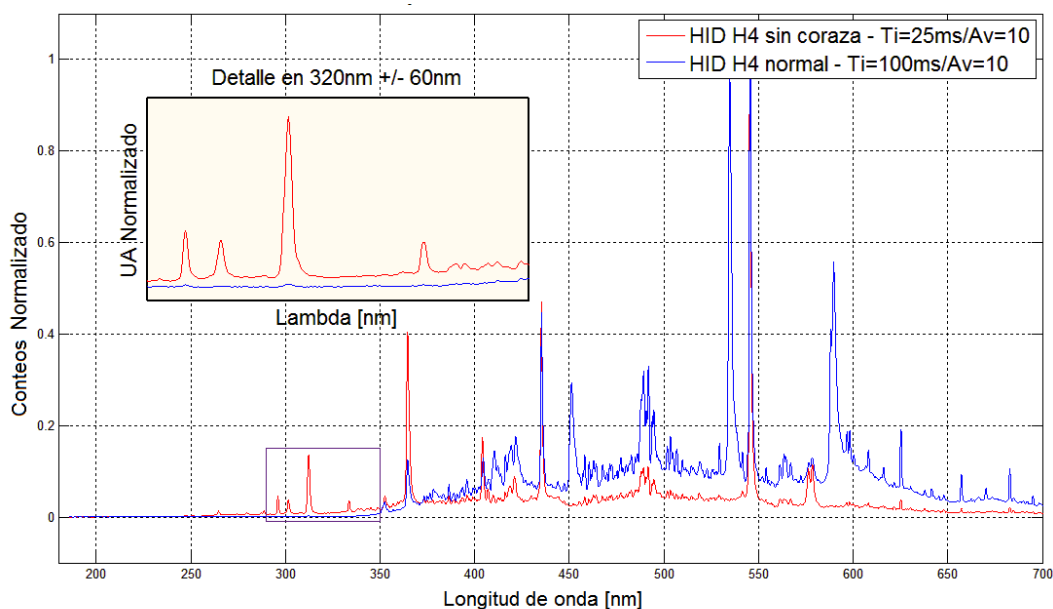
Los cambios verticales hacia arriba y hacia abajo no son tan significativos. Realizar cambios milimétricos en posición axial (horizontalmente) puede afectar el reporte de intensidad cerca de 1000 conteos en la longitud de onda de 500nm. En valores límites, se tiene que no existe una variación considerable, esto puede ser explicado en términos de las características térmicas de la fuente, en donde la máxima temperatura es originada en el centro del bulbo, que es el lugar en donde se produce la excitación del gas contenido.

No se presenta variación en la estructura espectral de la fuente HID sino solo en términos de la intensidad relativa.

Fuente HID sin coraza de vidrio

Utilizando una de las fuentes HID disponibles, se procedió a analizar el efecto sobre la intensidad y estructura espectral originado por el recubrimiento el vidrio al bulbo de la fuente HID. Para esto, primero se hizo la medición del espectro de emisión de la fuente con coraza de vidrio en modo absorción. Luego se procedió a quitar la coraza de vidrio y se realizó la medición directa.

Figura 3-18. Ensayos fuente HID H4 sin coraza de vidrio. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en una alineación fuente – detector a 30 cm.



Al quitar la coraza de vidrio se obtiene un cambio en la estructura espectral de la fuente HID. En la figura anterior se muestra, por ejemplo, el detalle en el rango de 300 a 350nm que se obtiene un pico de emisión al quitar la coraza. Esta cantidad de UV es cortada por la coraza de vidrio. Se presenta un cambio en la estructura espectral de la fuente HID. Al comparar los espectros de emisión se obtiene que la fuente HID sin coraza no presenta los picos de intensidad característicos de la fuente, y aparecen unos más cerca de la región UV.

Una de las posibles explicaciones está relacionada a la fluorescencia que puede generarse en la coraza de vidrio. Por comunicación personal (Quel, 2016)²¹ explica que los materiales de los filtros ópticos y de las celdas de muestras pueden cambiar la estructura espectral de emisión de una fuente. En este caso, el vidrio es excitado y genera fluorescencia; por tal motivo, el espectro característico tiene los picos de emisión en longitudes de onda superiores (530,550nm), mientras que sin la coraza no se efectúa este proceso de fluorescencia y por lo tanto los picos de intensidad son los que se originan en la excitación en el bulbo.

3.2. Caracterización del prototipo

En este apartado se consideran una serie de ensayos en cuanto a la capacidad que tiene el sistema espectrométrico de ser aplicado en especificaciones de espectrometría de fluorescencia. Para esto, se realizan ensayos relativos a la fuente de luz (HID), a la sensibilidad del espectrómetro frente a concentraciones de fluoróforos, al límite de detección propio del espectrómetro y a consideraciones del ambiente de medición.

3.2.1. Efectos del ambiente en los espectros de emisión

Las mediciones espectrales pueden ser afectadas por factores externos a las sustancias analizadas (emisión de los fluoróforos) y las fuentes luminosas. Esta serie de perturbaciones en la medición es explicado por lo general por factores ambientales, tales como la temperatura, estabilidad electrónica de los dispositivos y por la luz de fondo o de “background” del sitio en donde se encuentra el instrumento.

Por este motivo se realizaron una serie de ensayos controlados con el fin de analizar la mayor cantidad de variables que puedan afectar la respuesta obtenida por el espectrómetro.

²¹ Eduardo Quel, Ph.D. CITEDEF, BsAs. Argentina.

3.2.2. Dispersión de la luz

El instrumento prototipo busca sobrepasar una serie de dificultades asociadas al muestreo, a la portabilidad y al procesamiento espectral. Hay un tema que es transversal a estas dificultades y es la dispersión o *Scattering*. La radiación de luz incidente no es completamente absorbida o transmitida a la muestra, sino que interacciona con el medio y con material sólido suspendido. Esta interacción genera que la luz que entra a la celda no sea utilizada para la excitación de fluoróforos, sino dispersada. Al medir la señal de salida de la celda de muestra se obtiene un espectro con características de la fuente de luz (excitación) y no de la emisión de fluorescencia.

La dispersión puede ser causada por moléculas (Dispersión de Rayleigh²²) o causada por la suspensión de partículas en un medio coloidal (Dispersión de Tyndall). La dispersión se traduce en la disminución de la luz incidente que puede ser convertida en fluorescencia y por lo tanto recolectada en el espectrómetro. La dispersión no solamente puede causar una disminución en la intensidad de la radiación medida, sino también en resultados inadecuados.

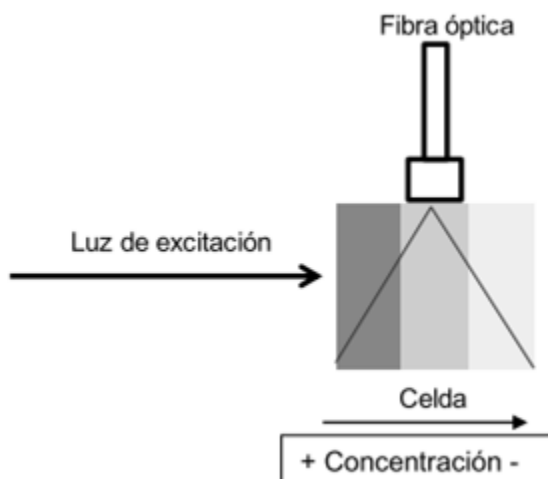
En la siguiente figura se considera la influencia del medio. El medio, en los ensayos de fluorescencia tiene que ver con lo que puede estar en el camino óptico y que no hace parte de la mezcla fluorescente.

El primer objeto que se considera es la celda. La celda es el recipiente contenedor de la muestra. Todos los métodos espectrométricos incluyen un recipiente. De avances de la primera fase del proyecto se llegó a la conclusión de que se debe evitar que la celda contenedora de la muestra tenga un camino óptico largo. Esto es, entre menor el camino óptico, menor es la interacción con el medio. De esta investigación se presentan evidencias de que, a altas concentraciones en la muestra, se puede presentar efectos de saturación en donde la fluorescencia es reabsorbida por las moléculas de la sustancia, lo cual genera que no se pueda obtener una señal de fluorescencia de intensidad.

²² La dispersión de Rayleigh es la dispersión de la luz por partículas de tamaño menor a la longitud de onda de los fotones dispersados.

Para esta investigación se analizan los efectos de saturación, así como la relación del material de la celda y la señal que llega a la mezcla fluorescente.

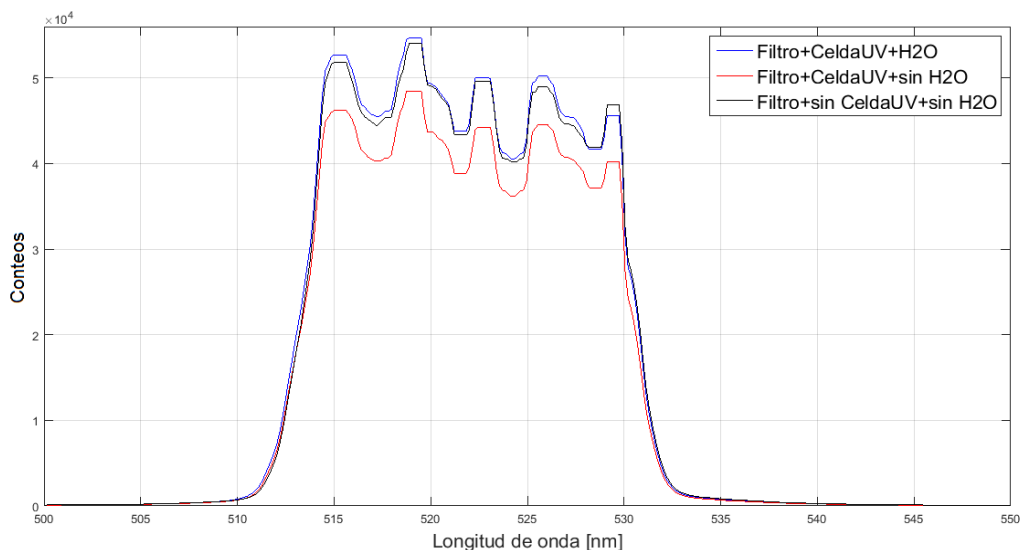
Figura 3-19. Consideraciones en cuanto a la celda portadora de la muestra. Para las mediciones de fluorescencia se presenta el frente de absorción causado por la concentración. (Lombana, 2016)



Además de la celda, en el medio se encuentran una variedad de solventes. Estos solventes, que no cuentan con fluoróforos en su estructura, presentan interacción con la señal de excitación. Esta interacción puede repercutir en un aumento en la señal de excitación que llega a la molécula, así como en la disminución de la intensidad incidente a la muestra. Debido a que la investigación se centra en estudios de fluoróforos provenientes de hidrocarburos dispersos en agua, el análisis de la influencia del agua en la celda de la muestra debe ser considerado. No es recomendable realizar algún tipo de operación unitaria para quitar el agua de la muestra recolectada, pues esto ocasionaría que la concentración del soluto sea afectada, además una de las virtudes de la técnica de EEMS es que no es necesario hacer algún tipo de adecuación a la muestra ni purificación o adición de solventes arrastradores.

En la figura que se encuentra a continuación se analiza el efecto del material de la celda y la dispersión originada por el agua.

Figura 3-20. Influencia de la celda UV & H₂O en la absorción – excitación filtro 525nm, tiempo de integración = 20ms.

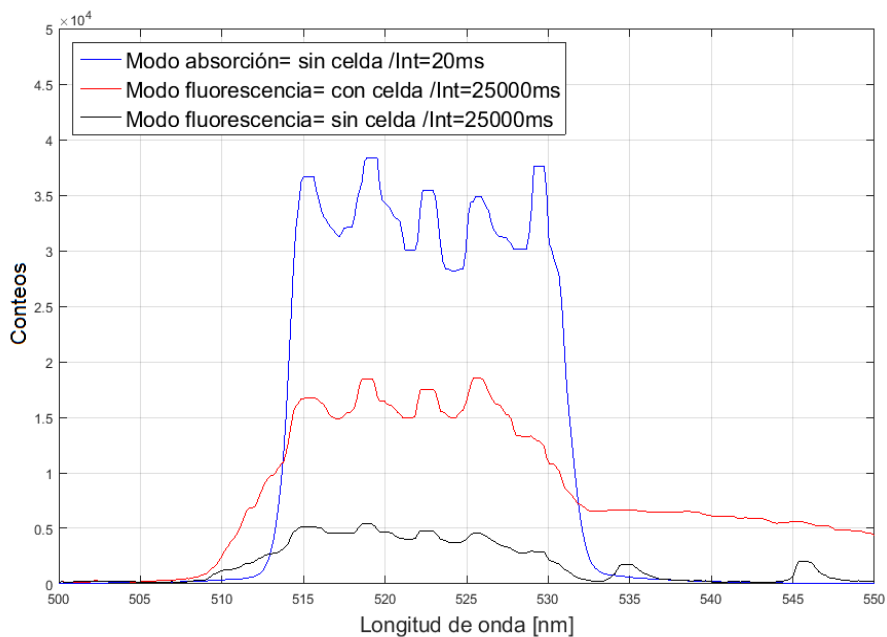


Se relaciona la intensidad que llega al punto central de la celda en el arreglo óptico. Cada una de las mediciones presentadas en la figura anterior fue realizada en modo absorción (medición directa). La medición que debería tener la mayor intensidad es la que no incluye en su arreglo la celda UV ni el solvente (agua). Al comparar los resultados de los ensayos, se puede concluir que la celda UV reduce la intensidad de luz que llega a la muestra. A pesar de que esta celda es de cuarzo, material que permite que la radiación UV no sea dispersada, por el mismo material se presenta una disminución de la intensidad. La transmitancia de la celda no es del 100%.

Al agregar agua destilada a la muestra, se llega a alcanzar los valores de intensidad del arreglo en donde no se tiene celda ni solvente; esto indica que el agua actúa como generador de Scattering. Este Scattering hace que la señal de la fuente de luz quede contenida en la celda y ampliada, por tal motivo la intensidad aumenta.

De este primer ensayo se puede concluir que el efecto de Scattering originado por el agua (aumento de la intensidad medida por el espectrómetro) es contrarrestado por la transmitancia de la celda UV.

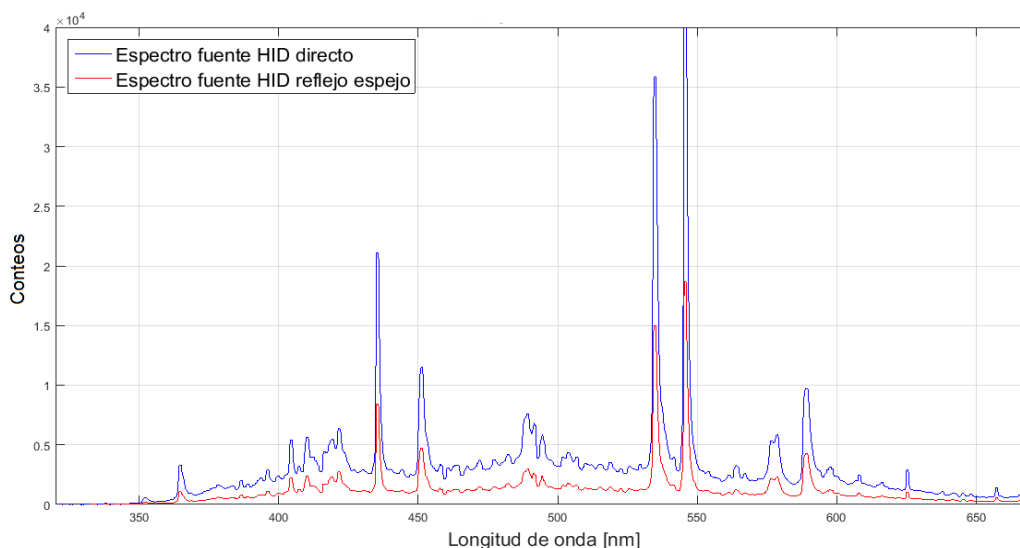
Al considerar mediciones en modo fluorescencia (medición no directa sino en ángulo recto/cruzado con la dirección de emisión de la fuente) se presenta una disminución de la intensidad medida por el detector. Al considerar el modo fluorescencia, no se puede contar con el Scattering del agua para el aumento de la intensidad.

Figura 3-21. Filtro dicróico 525nm

En la técnica de EEMS se necesita medir emisión de fluorescencia y la excitación de la fuente. Esta señal de excitación proveniente de la fuente de luz no se puede obtener a partir de un blanco. Un blanco, en este caso sería la celda UV con agua y sin la mezcla fluorescente. Esta medición no representaría las características de la intensidad y estructura espectral que incide en la celda. De la figura se observa que hay una disminución considerable entre la medición de la fuente en modo absorción y la medición de la fuente con la celda y el solvente. En la medición en modo fluorescencia con el sistema celda y solvente se genera una señal adicional. Se observa que existe señal luego de los 532 nm. Esta señal se explica como un efecto de luz proveniente del ambiente y de la dispersión causada en el mismo filtro dicróico.

Considerando lo anterior, se busca poder obtener de manera adecuada en el instrumento prototipo la señal de excitación. Para esto se realiza una medición directa del espectro de la fuente HID y luego se compara con el reflejo de un espejo común.

Figura 3-22. Transmitancia espejo – fuente HID H4, tiempo de integración=200ms.

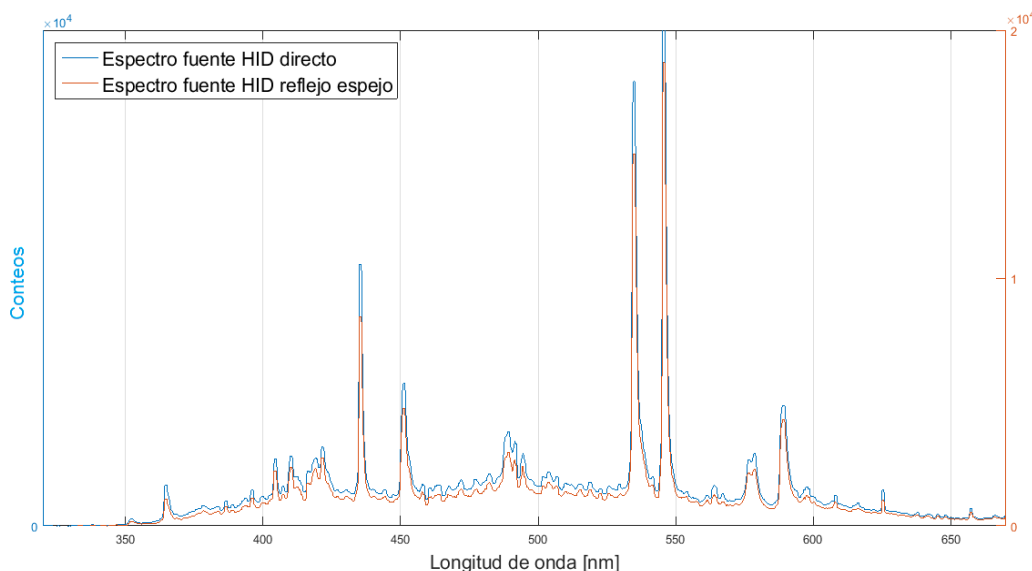


En la figura se encuentran las mediciones directas de la fuente HID. El arreglo óptico solo incluye la fuente y el detector separados por una distancia de 30 cm. El tiempo de integración fue fijado para evitar que se presentara saturación en la detección. Se ubica a 30 cm de la fuente la fibra del espectrómetro y se realiza la medición del espectro HID, luego a esa misma distancia, en vez de ubicar la fibra óptica se ubica un espejo, y a una distancia del espejo se ubica la fibra. Se comparan las mediciones para observar si el espectro medido de manera indirecta, utilizando un espejo para reflejar la fuente y hacerla incidir al detector puede cambiar de alguna manera las características espectrales y/o causar una disminución en la intensidad de la luz.

Como resultado se obtiene que no se presenta un cambio en la estructura espectral de la fuente HID. El único efecto es el de la disminución de la intensidad de luz medida en el espectrómetro. La utilización de una superficie que refleje la luz de la fuente puede llevar a que se pueda obtener de manera adecuada el espectro de excitación y así poder construir la matriz de excitación-emisión adecuadamente.

El espejo utilizado para la medición de la fuente de excitación debe ser caracterizado en términos de transmitancia y forma.

Figura 3-23. Transmitancia espejo – fuente HID H4, tiempo de integración=200ms.



Por tal motivo se recomienda en fases posteriores del proyecto de prototipado utilizar un espejo que refleje parte de la excitación generada por la fuente y que esta señal de luz sea medida frecuentemente para poder tener un espectro de excitación que considere los posibles cambios en estructura y en intensidad que se puedan presentar en la fuente HID por el uso y la operación en el sistema.

3.2.3.El ruido en los sensores

El ruido en la espectrometría es la variación de la señal adquirida por el instrumento. Los cambios en la intensidad entre mediciones son comunes en los espectrómetros. Se debe por lo tanto asegurar que la cantidad de ruido sea mínima para que el nivel de señal sea considerable y la medición sea de calidad. Para esto existe el criterio de medición y de caracterización técnica llamado relación señal a ruido. Esta relación determina la calidad de la medición y del funcionamiento del sistema. De esta manera, la medición adquirida es una combinación de señal de emisión y de las contribuciones del ruido al espectrómetro. Los tres principales componentes del ruido en un sistema de medición espectrométrica son:

- Contribuciones de fondo (*Background*)
- Ruido oscuro (*Dark*)

- Ruido de lectura (*Noise*)

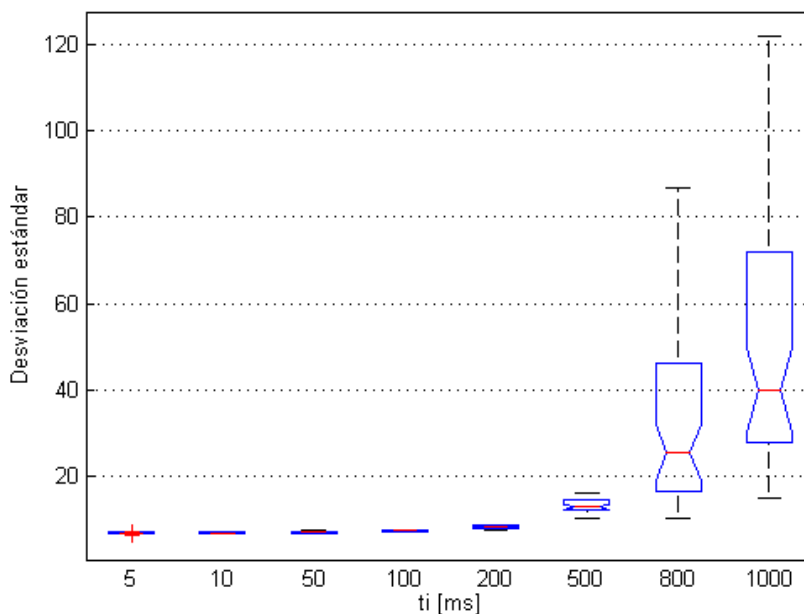
Las contribuciones de fondo (background) recolectadas por CCD tienen que ver con la luz ambiente que llega a sumarse a la señal de emisión. Esta contribución afecta directamente la calidad de las mediciones debido a que puede llegar a significar un aumento de intensidad en el total de la medición o en el cambio de características espectrales.

El ruido oscuro (*Dark*) surge de la variación estadística del número de electrones que se generan térmicamente en el CCD. El Dark (ruido oscuro) es independiente de la señal inducida por los fotones, y es función de las condiciones electrónicas y térmicas del sistema de medición. En este apartado se consideran las variaciones posibles en la lectura causadas por cambios en el ambiente térmico y electrónico del instrumento.

El ruido de lectura (*Noise*) está referido a las variaciones estadísticas propias de la llegada de fotones al CCD. Esta magnitud puede llegar a fluctuar aleatoriamente con la incidencia de fotones al CCD.

En el caso del dark, este dark está presente en las mediciones así no se encuentre la fibra óptica abierta y permitiendo el flujo de luz. Este tipo de ruido reúne las contribuciones térmicas y electrónicas del sistema. Hay una relación entre el tiempo de integración, que es el tiempo en el que se permite la entrada de fotoelectrones al CCD con el ruido dark. En la siguiente figura se relacionan diferentes valores de tiempo de integración y el cambio que se puede obtener entre scans a una longitud de onda fija. Para este ensayo se obtuvieron un mismo número de scans a diferentes tiempos de integración y una misma longitud de onda.

Figura 3-24. Desviación estándar para los datos Noise (ruido) con respecto al tiempo de integración (ms).



El tiempo de integración contribuye al aumento de la señal adquirida por el instrumento. Es de esta manera, que en condiciones en donde existe poca señal de fluorescencia se recomienda aumentar el tiempo de integración para permitir que se recolecte la mayor cantidad de fotoelectrones y aumentar la intensidad de la medición. Este aumento del tiempo de integración, como se muestra en la figura, origina que exista una variación en la intensidad entre espectros adquiridos. Por lo tanto, es recomendable hacer mediciones a tiempos de integración menores a un segundo, pues valores mayores en el tiempo de integración pueden originar desviación entre mediciones.

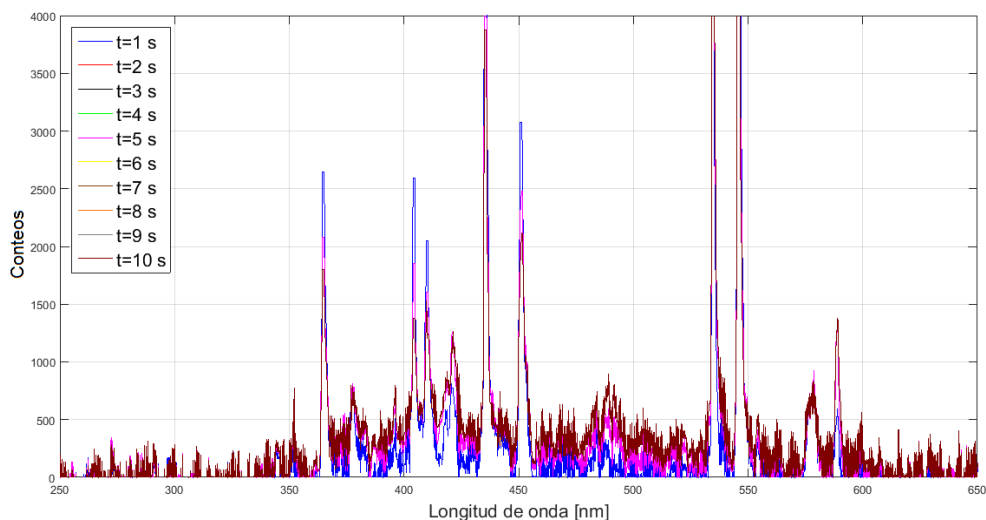
El tiempo de integración también debe ser considerado para poder hacer la medición más rápida. El tiempo de integración es función de las características de procesamiento del computador en el cual se adquiera la información. El tiempo que demora una medición es el producto del tiempo de integración y del número de promedios "scans" que se realice. Este tiempo de procesamiento va aumentando considerablemente en valores por encima de los 10000 ms. Por ejemplo, una medición de 25000ms y 20 promedios puede demorar cerca de 45 minutos. Se recomienda un estándar de tiempo de integración de 1 segundo para las mediciones.

3.2.4. Pruebas de manejo térmico y electrónico al prototipo

La fuente de luz HID H4, por su principio de operación necesita que se genere una descarga de alta intensidad en el bulbo para la excitación del gas noble y generar así emisión de luz. Esta descarga genera un aumento en la temperatura de la fuente. Como se había mencionado en la sección de caracterización de la fuente HID, existe un tiempo de calentamiento necesario para que la luz emitida por la fuente se estabilice.

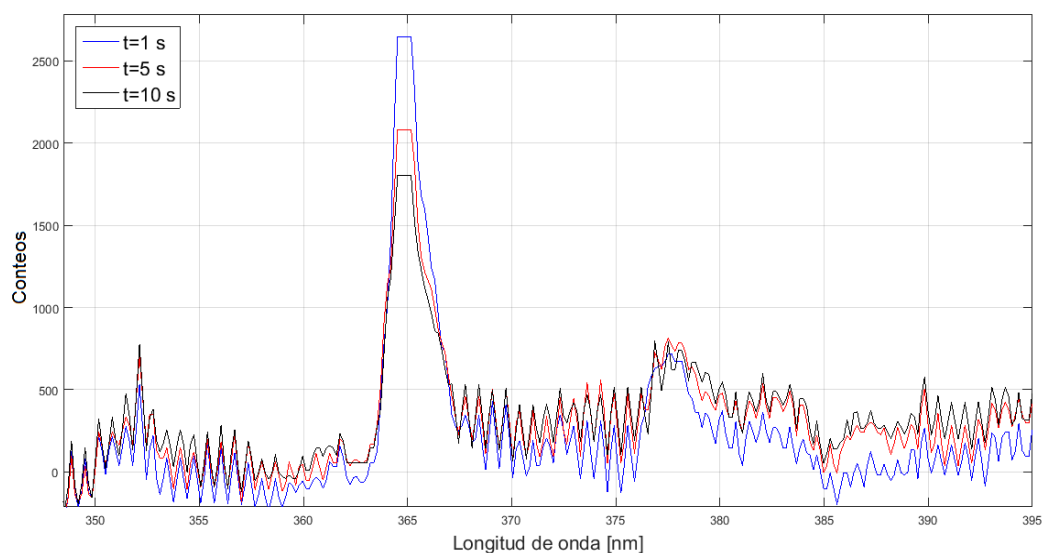
En el siguiente ensayo se consideró la variación de la intensidad de la señal de luz de la fuente HID y el encendido y apagado del sistema.

Figura 3-25. Efecto térmico – medición fuente posterior apagado/encendido.



Para esta medición se inició en frío la fuente HID, se permitió que llegara a la estabilización de emisión de luz (tiempo mayor a 3 minutos) y luego se procedió a apagar la fuente durante 2 segundos para luego encender la fuente y medir cada segundo la señal.

Figura 3-26. Efecto térmico – medición fuente posterior apagado/encendido



Se concluye en la operación de la fuente HID, el encendido genera la máxima señal de intensidad emitida por la fuente. Esta intensidad disminuye rápidamente para estabilizarse luego de 10 segundos. Este es otro criterio en cuanto a la elaboración de la rutina de adquisición de espectros. Es recomendable no estar encendiendo y apagando la fuente de luz entre mediciones, sino que esta se debe mantener encendida en todo el tiempo que el instrumento este activado. Esto permite que se tenga una intensidad de operación permanente y no se tenga que considerar un retraso para cada uno de los pasos entre filtros dicróicos.

En la rueda de filtros dicróicos se sugiere tener un shutter (obturador), esto es para poder hacer mediciones del dark (mediciones tomadas por el espectrómetro sin fuente de luz) las cuales consideran el ambiente térmico del sistema (fuente HID encendida) y las contribuciones electrónicas del arreglo espectrómetro – PC.

3.2.5. Ensayos de linealidad

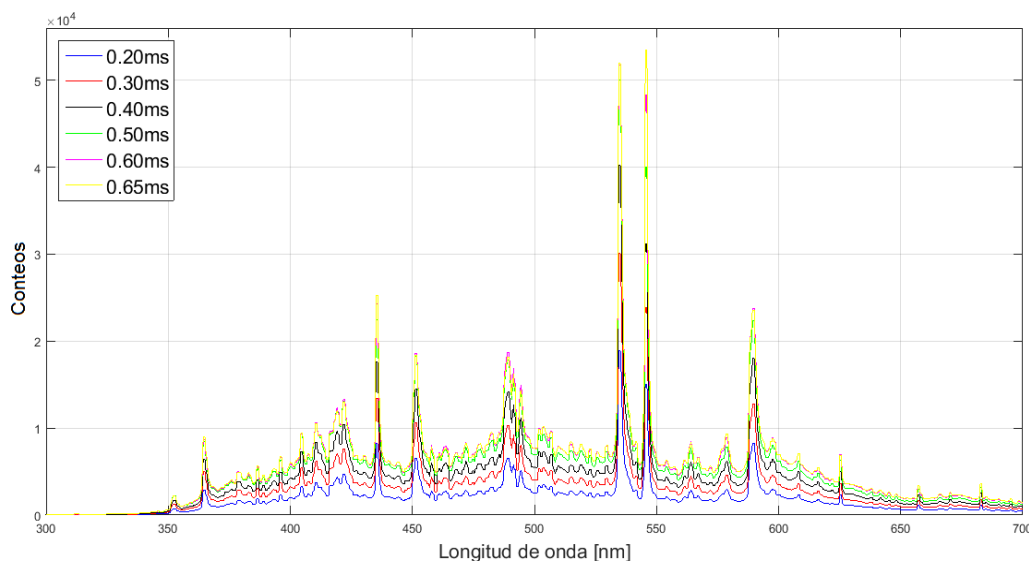
La técnica de matriz de excitación-emisión se caracteriza por que el procesamiento espectral es rápido y los resultados relacionan información que permite la caracterización de una muestra con fluoróforos. Como se mencionaba, el tiempo de integración (tiempo en el que el espectrómetro permite la entrada de fotoelectrones al CCD) afecta directamente

el tiempo total de procesamiento. En lo posible se busca tener una medición rápida y con una buena relación señal a ruido. El tiempo de integración en una medición da lugar a un valor de intensidad adquirida por el espectrómetro. Teóricamente se establece que entre mayor sea el tiempo de integración especificado, mayor va a ser la señal obtenida.

En este apartado de la investigación se busca relacionar el tiempo de integración con la intensidad medida. Para esto, se realizó en el montaje óptico la medición del espectro policromático de la fuente HID. Debido a que la medición es realizada en modo absorción y por la potencia de la fuente, el tiempo de integración utilizado va desde 0.20 – 0.65 ms, esto con el fin de evitar la saturación en la medición. El número de conteos máximo permitido en la medición con el espectrómetro es de 65000. Si, por ejemplo, un pico de intensidad llegara a superar este valor, AvaSoft reporta que la medición es saturada. Hay un fenómeno que se presenta en estas condiciones, y es el rebosamiento. Un pico de intensidad a un determinado rango de longitud de onda afecta el reporte de intensidad reportado en los valores de intensidad de las longitudes de onda en cercanías.

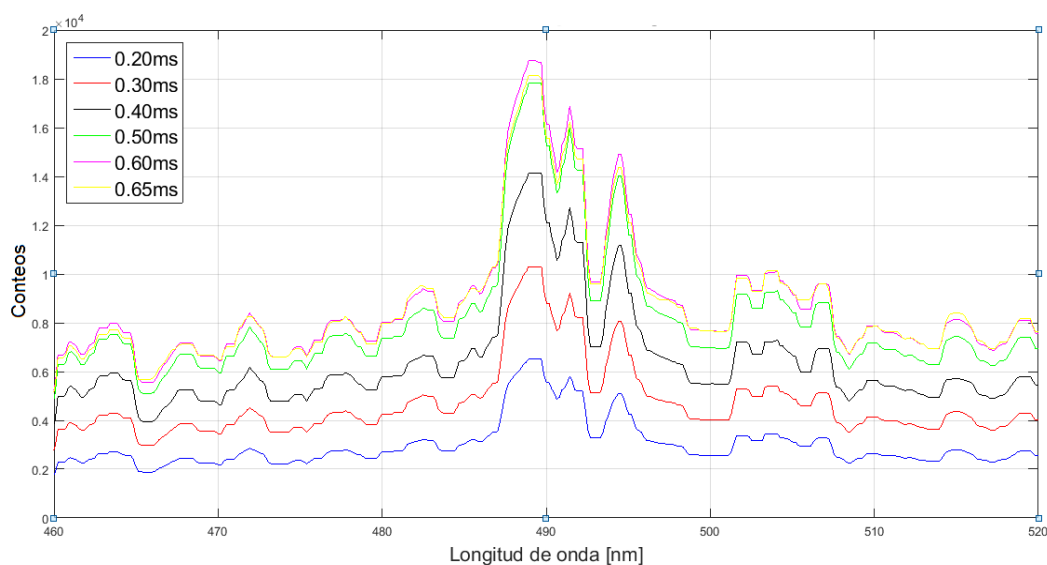
El efecto inmediato del aumento del tiempo de integración en la medición directa de la fuente HID es el esperado. A mayores tiempos de integración aumenta la intensidad.

Figura 3-27. Espectro policromático fuente HID H4 – variación de la intensidad (modo absorción) en función del tiempo de integración.



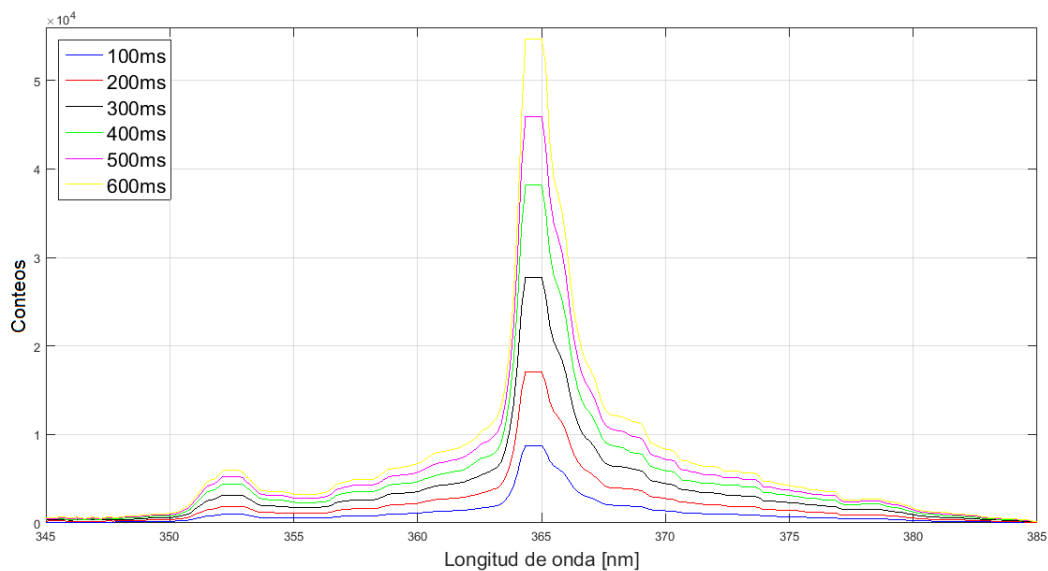
Esta proporcionalidad es evidente en la gran mayoría del rango espectral. Pero, por ejemplo, en los valores de longitud de onda cercanos a 300 nm o superiores a 650nm la variación es menor.

Figura 3-28. Espectro policromático fuente HID H4 – variación de la intensidad (modo absorción) en función del tiempo de integración.



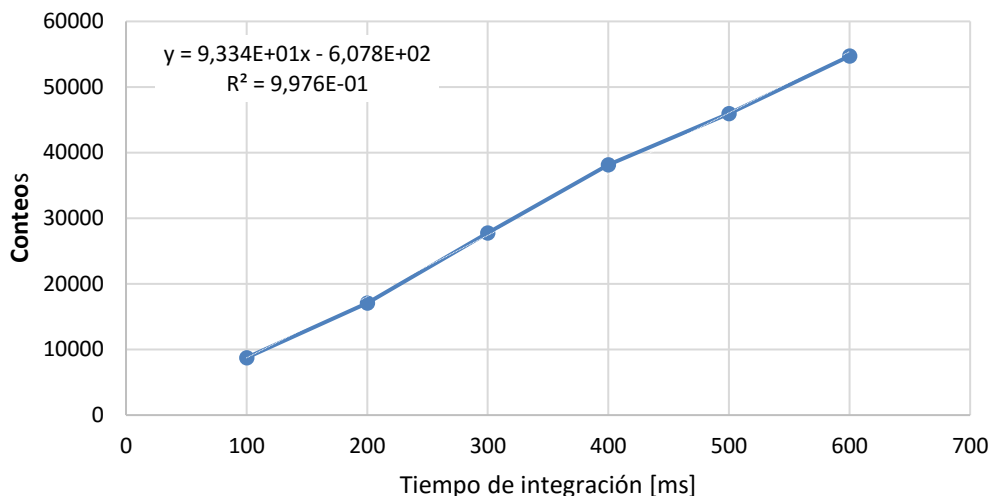
Al analizar un pico de intensidad específico, por ejemplo, el de 490nm, se empieza a evidenciar que existe una relación lineal entre el aumento del tiempo de integración y la intensidad medida.

Figura 3-29. Variación de la intensidad de excitación como función del tiempo de integración – filtro 365nm.



Al realizar un análisis con tiempos de integración más altos, esto es valores por encima de los 100ms se tienen el mismo comportamiento. Para este ensayo se realiza la medición de la fuente HID, pero esta vez interponiendo un filtro dicróico. El filtro dicróico permite que se puede llegar a utilizar unos tiempos de integración mayores.

Figura 3-30. Intensidad de excitación a longitud de onda constante (365.008nm) para los tiempos de integración medidos Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico.



En la figura anterior se relacionan las mediciones realizadas de la fuente HID en el montaje óptico con el filtrado del dicróico de 365 nm. Se recopila la información para cada una de las mediciones a diferentes tiempos de integración, desde 100 ms hasta 600ms con un aumento de 100 unidades, para luego escoger el pixel correspondiente a la longitud de onda de 365.008nm. En cada medición a diferentes tiempos de integración se elige el mismo pixel y se agrupan los valores de intensidad reportados. Como se puede ver existe una tendencia lineal entre el aumento del tiempo de integración y la intensidad medida con el espectrómetro.

Esta relación entre tiempo de integración y valores de intensidad permite hacer relaciones espectrales a diferentes tiempos de integración, escalamiento de mediciones espectrales y realizar la equivalencia en otro tiempo de integración del espectro a comparar. Una aplicación inmediata, puede ser, por ejemplo, en el caso de la obtención del espectro de excitación de la fuente HID por medio de una superficie reflectora (espejo) poder llegar a hacer escalamientos entre valores medidos de intensidad.

3.3. Ensayos de mezclas.

En esta sección se muestran una serie de ensayos cuantitativos utilizando el prototipo con fluoróforos con características de excitación y emisión que presentarían hidrocarburos, así como ensayos de mezclas de fluoróforos. En la última parte de la sección se muestran algunas matrices de excitación-emisión obtenidas con el instrumento prototipo.

3.3.1. Filtros digitales utilizados para el procesamiento espectral

La espectrometría de fluorescencia no necesita que la información espectral obtenida sea completamente estructurada. En ella no se analiza cambios de intensidades medidas en valores cercanos de longitud de onda sino la tendencia de la línea espectral. Por este motivo, una manera de procesar los espectros recopilados es utilizar herramientas digitales de suavizado de los espectros. Como introducción a la sección de ensayos de mezclas se muestran los procedimientos para el filtrado digital de espectros.

Los filtros digitales recomendados para el procesamiento espectral son el filtro de mediana²³ (Median Filter) y el filtro de Savitzky – Golay²⁴. Como se mencionaba en el diseño conceptual, MatLab es una herramienta de programación que permite el procesamiento de señales. Cuenta con módulos específicos para ello, y en este caso cuenta con funciones incorporadas para el manejo y procesamiento de señales. Los análisis de filtros digitales se realizaron a través de esta herramienta de cómputo.

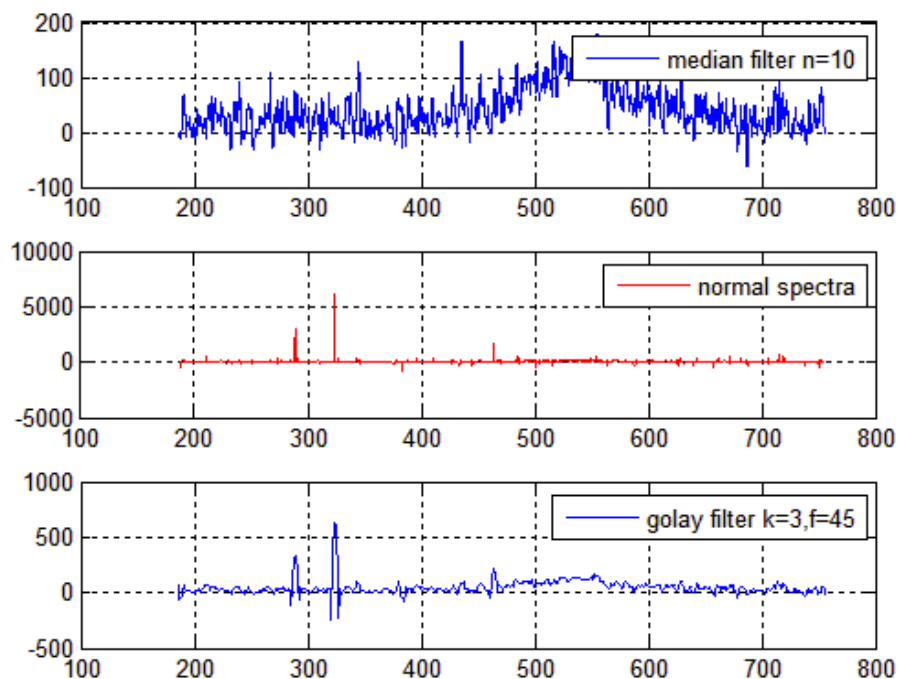
Es común obtener en las mediciones espectrales valores atípicos. Estos valores se muestran en la tendencia mostrada en la figura que está a continuación. La medición espectral medida corresponde a una medición de fluorescencia. La fluorescencia se encuentra en la región de 400 a 700nm. En valores cercanos a 320nm se presenta un pico de intensidad. Esta medición no se atribuye a contribuciones de fuentes de luz, sino la degradación misma del espectrómetro. Este pico de intensidad se denomina un pixel

²³ El filtro de mediana es una técnica de filtrado usada para la remoción de ruido. La base conceptual del filtro es reemplazar la tendencia de datos con la mediana de los datos vecinos.

²⁴ El filtro de Savitzky – Golay se basa en el cálculo de una regresión polinomial de grado k para la determinación del nuevo valor de cada punto.

caliente. No existe intensidad generada por fotones, sino que es un error instrumental en un pixel específico.

Figura 3-31. Espectros filtrados con diferentes métodos. Panel superior: filtro de mediana de orden 10, panel medio: espectro sin filtrar (normal), panel inferior: espectro filtrado con Savitzky – Golay de grado 3 y marco de 45.

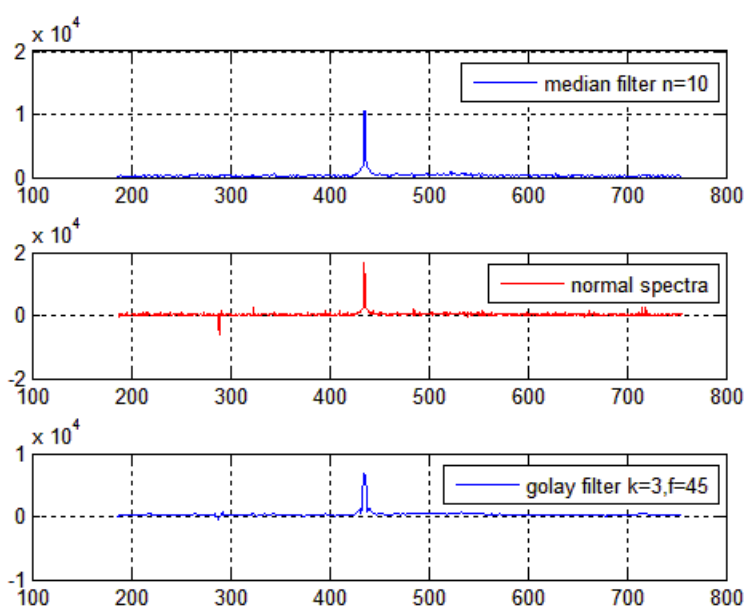


Debido a la presencia de este pixel caliente, el cual no tiene que ver con la medición de fluorescencia obtenida, se debe realizar un suavizado del espectro. Este suavizado debe quitar la tendencia atípica (pixel caliente) sin llegar a afectar de alguna manera la medición de fluorescencia. De la utilización de los filtros se puede ver en la figura que en el caso del filtro de Savitzky – Golay, el pixel caliente es disminuido en intensidad de un valor de 5000 conteos a cerca de 500 conteos. El filtro de mediana, en cambio, como considera la tendencia de datos cercanos, es útil para quitar los pixeles calientes, y esto se demuestra en el gráfico del panel superior, en donde solo se observa que el espectro resultante corresponde a la señal de fluorescencia.

En la siguiente figura se presenta un caso similar. El espectro al cual se le va a realizar el filtrado digital corresponde a una señal proveniente de un filtro dicróico. En este caso, la señal filtrada por el dicróico tiene una intensidad de cerca de 20000 conteos. También se

presenta cerca a 300nm un pixel caliente. Al utilizar el filtro digital de Savitzky – Golay se crea una reducción en la intensidad de la señal de luz filtrada por el dicróico. Pasa de ser de 20000 conteos a menos de 10000 conteos. En cambio, al utilizar el filtro digital de filtro de mediana se pierde el pixel caliente y la señal de luz filtrada proveniente de la fuente HID conserva la intensidad de 20000 conteos.

Figura 3-32. Espectros filtrados con diferentes métodos. Panel superior: filtro de mediana de orden 10, panel medio: espectro sin filtrar (normal), panel inferior: espectro filtrado con Savitzky – Golay de grado 3 y marco de 45.



De lo anterior se concluye que la mejor manera de disminuir el ruido en los espectros, así como para realizar el suavizado de la tendencia de datos y para evitar la presencia de pixeles calientes es el filtro digital de mediana. Cada una de las mediciones espectrales presentadas en la investigación tiene un suavizado por medio de este filtro digital. En los anexos se recopila información sobre el análisis del orden del polinomio utilizado en el filtro de mediana. Se establece que es de orden 10 luego de unos ensayos similares con diferentes valores del grado del polinomio.

3.3.2. Fluoróforos proxy

Siendo que la aplicación del instrumento prototipo radica en la medición de sustancias fluorescentes con origen en los hidrocarburos, se necesita encontrar una sustancia

fluorescente que tenga características similares en comportamiento de un gran número de sustancias orgánicas.

En la siguiente tabla se recopila información de una cantidad de hidrocarburos clasificados según sus composiciones y propiedades físicas. Los tres grandes grupos incluyen petróleo, aceites y combustibles.

Tabla 3-5. Regiones de excitación – emisión para hidrocarburos encontrados en la literatura.

TIPO	SUSTANCIA	EXCITACIÓN [nm]	MAX. EMISIÓN [nm]	Referencias
CRUDE OIL	CRUDE OIL (<50cP) Scotian	260 - 280	300 - 350	(Bugden et al., 2008)
	CRUDE OIL (<50cP) Federated	240 - 340	400 - 490	
	CRUDE OIL (<50cP) Brent Blend	240 - 320	400 - 500	
	CRUDE OIL (<50cP) Gulfaks	240 - 320	400 - 500	
	ARABIAN MEDIUM CRUDE OIL	355	450 - 600	(Karpicz et al., 2005)
	BASRA CRUDE OIL	355	450 - 600	
	GERMAN CRUDE OIL	355	475 - 600	
	NIHIAN CRUDE OIL	355	425 - 550	(Kumar & Mishra, 2012)
	CRUDE OIL	325 - 375	375 - 425	
Aceites (OIL)	ACEITE DE MOTOR	355	375 - 425	(Karpicz et al., 2005)
	SHELL DIALA OIL	355	375 - 425	
	OIL SAE 30	355	375 - 425	
	BUNKER FUEL OIL	355	500 - 600	
COMBUSTIBLES	GASOLINA	275 - 350	325 - 375	(Alostaz et al., 2008)
	DIESEL	350 - 450	400 - 500	
	ETANOL	275 - 325	350 - 400	(Kumar & Mishra, 2012)
	DIESEL	325 - 425	400 - 460	
	BIODIESEL	650	675	

De cada uno de los grupos se obtiene información experimental publicada en artículos sobre huellas de matriz de excitación-emisión. se agrupan en rango en donde se genera la excitación y los rangos en longitud de onda en donde estas sustancias emiten fluorescencia.

Tabla 3-6. Resumen de las regiones de excitación – emisión para hidrocarburos encontrados en la literatura.

Hidrocarburos	Rangos medios de excitación [nm]	Rangos medios de emisión [nm]
Crudos	240 - 340	350 - 500
Aceites	355	375 - 500
Combustibles	275 - 425	325 - 450
Biodiesel	650	675
Gasolina (Urbano)	365 - 400	400 - 600

En la tabla anterior se hace una síntesis de los rangos predominantes de excitación y de emisión de estos hidrocarburos. Luego teniendo esta información se procede a encontrar un fluoróforo que pueda tener la mayor cantidad de coincidencias entre los grupos mencionados. Cada uno de estos fluoróforos de origen orgánico debe ser estudiado en términos de la representatividad que pueda dar a la gran mayoría de compuestos, pero también en su relación con el medio. El medio o solvente en las estimaciones va a ser agua. De esta manera se busca que la sustancia tenga afinidad con el medio. Además, se consideran las implicaciones de manejo de las sustancias, como la toxicidad y los posibles riesgos en los que se pueda incurrir en la manipulación.

Luego de obtener el fluoróforo proxy de las sustancias orgánicas, se analiza la combinación con otro fluoróforo que tenga una región de absorción y emisión de fluorescencia diferente. Esta región debe estar en el UV- visible que es en donde el espectrómetro puede adquirir información. Siendo que una gran cantidad de hidrocarburos tiene un óptimo de absorción en el UV, se procura que esta segunda sustancia fluorescente se encuentre en niveles energéticos menores (mayor longitud de onda).

Tabla 3-7. Lista de fluoróforos para ser utilizados como proxy a hidrocarburos.

Hidrocarburos	Crudos	Aceites	Combustibles	Gasolina (Urbano)	Biodiesel	Solubilidad en agua ²⁵	Toxicidad / Riesgos Seguridad	Suma Coincidencias
<i>Antraceno</i>	X	X	X	X		Insoluble	Alta	4
<i>1,6 - Difenil hexatrieno</i>	X	X		X		Baja	Alta	3
<i>Pireno</i>	X	X				Insoluble	Alta	2
<i>P -Terpenil</i>			X			Insoluble	Alta	1
<i>Sulfato de Quinina / Quinina</i>	X	X	X			Alta	Baja	3
<i>TetrafenilButadieno</i>			X			Insoluble	Alta	1
<i>Perileno</i>			X			Insoluble	Baja	1
<i>Naftaleno</i>			X			Insoluble	Muy Alta	1
<i>P - cuaterfenil</i>				X		N.D.	Baja	1
<i>Eosina</i>					X	Alta	Media	1

²⁵ Tomado de la base de datos de <https://www.alfa.com/es/catalog/L08162/>

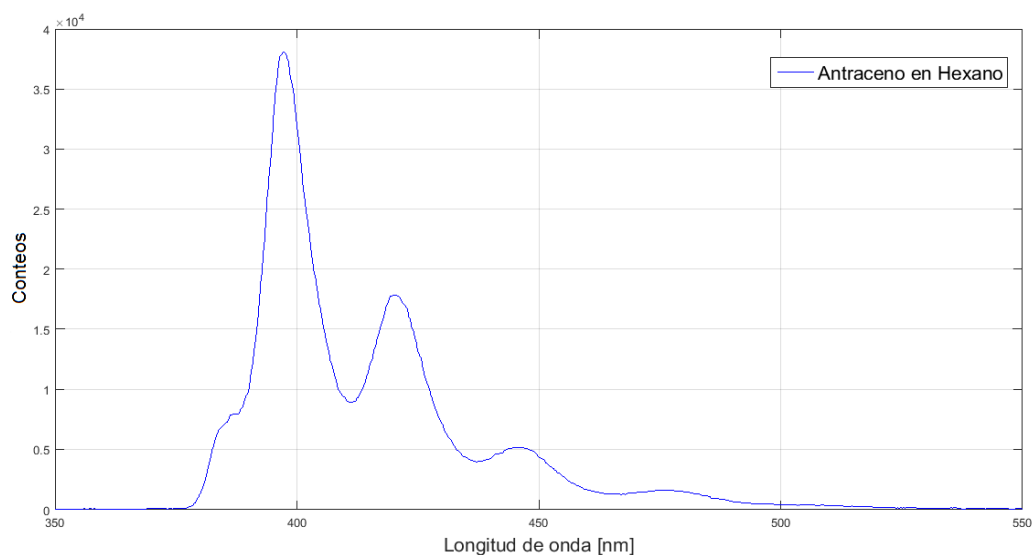
En la tabla anterior se relacionan una lista de sustancias fluorescentes que cuentan con emisión-excitación según grupo de componentes analizado. Para los grupos de componentes se realiza una suma de coincidencias y se establece también como criterio de decisión de escogencia del fluoróforo la solubilidad en el agua, su riesgo y toxicidad.

Cabe mencionar que la lista de sustancias fluorescentes es mucho mayor, pero se hizo el análisis únicamente de sustancias disponibles en el catálogo de compuestos manejados en los laboratorios de química de la Facultad de Química de la Universidad Nacional, así como de otras de fácil obtención.

3.3.3. Ensayos antraceno, hexano y acetona

De la tabla se tiene que el antraceno es el fluoróforo con mayor número de coincidencias entre grupos de hidrocarburos. El antraceno es un compuesto altamente reactivo y puede sufrir degradación al ser expuesto ante radiación solar. Además, tiene poca solubilidad en el agua. Figura se muestra el espectro de emisión de fluorescencia del antraceno (sólido) diluido en hexano.

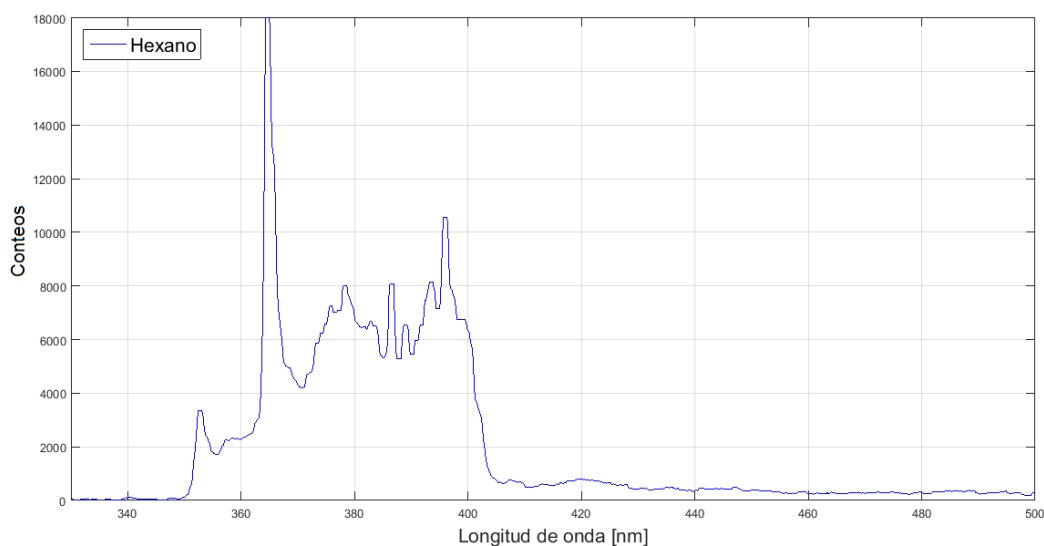
Figura 3-33. Dilución a saturación de antraceno en Hexano. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4. Medición realizada en el montaje óptico con un tiempo de integración=200ms y con el filtro dicróico de 377nm.



Siendo este espectro de emisión de fluorescencia una mezcla de dos sustancias se procede a caracterizar espectralmente el hexano únicamente. El hexano es una sustancia

orgánica combustible en la cual el antraceno se disuelve. En la figura que se encuentra a continuación se realiza la medición del hexano ante una excitación por medio de la fuente HID filtrada con el dicróico de 377nm.

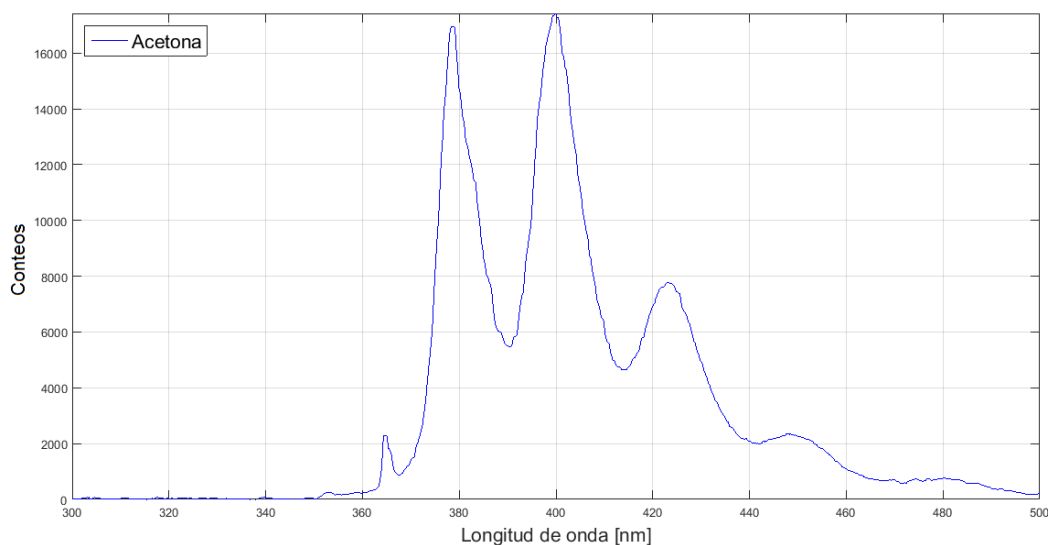
Figura 3-34. Señal espectral de emisión del hexano. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico con un tiempo de integración de 12000ms.



De la figura anterior se puede observar que se la señal obtenida es fundamentalmente dispersión de la fuente HID filtrada con el dicróico de 377nm. Conserva la estructura de la señal de salida del filtro dicróico y la medición solo correspondería a dispersión y la intensidad luego de 420nm se atribuye a efectos de paso de luz del dicróico. De esta manera, el efecto neto del solvente (hexano) en la señal de emisión de fluorescencia del antraceno solo es en términos de dispersión (Scattering) de la fuente de luz.

En los posibles solventes utilizados como segundo fluoróforo proxy se encuentra la acetona. La acetona es soluble en agua, en etanol y en tolueno. Debido a la disponibilidad de la sustancia, se realiza también el análisis de la respuesta espectral.

Figura 3-35. Espectro de emisión de acetona pura. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico.

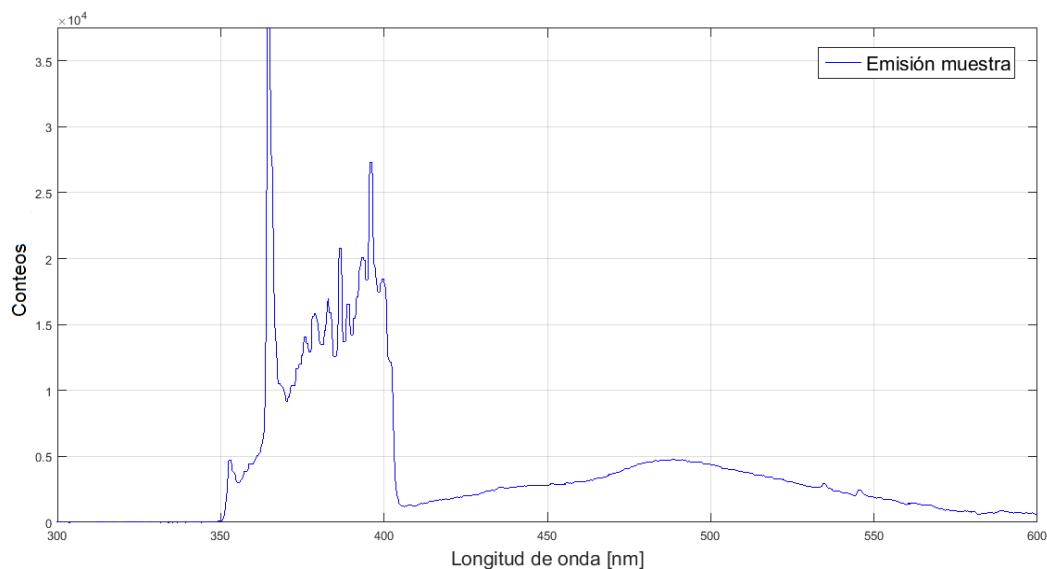


La acetona al ser excitada por la fuente HID filtrada con el dicróico de 377nm muestra fluorescencia a partir de 360nm. El espectro de fluorescencia es estructurado, presenta dos modos principales (pico intensidad a 380nm y 400nm).

Debido a la dificultad de obtener quinina o sulfato de quinina, y por su elevado costo (ver anexos), se procede a realizar ensayos exploratorios con bebidas comerciales. Cada una de las bebidas utilizadas fue caracterizada espectralmente con el fin de poder obtener un fluoróforo proxy para los ensayos de mezclas.

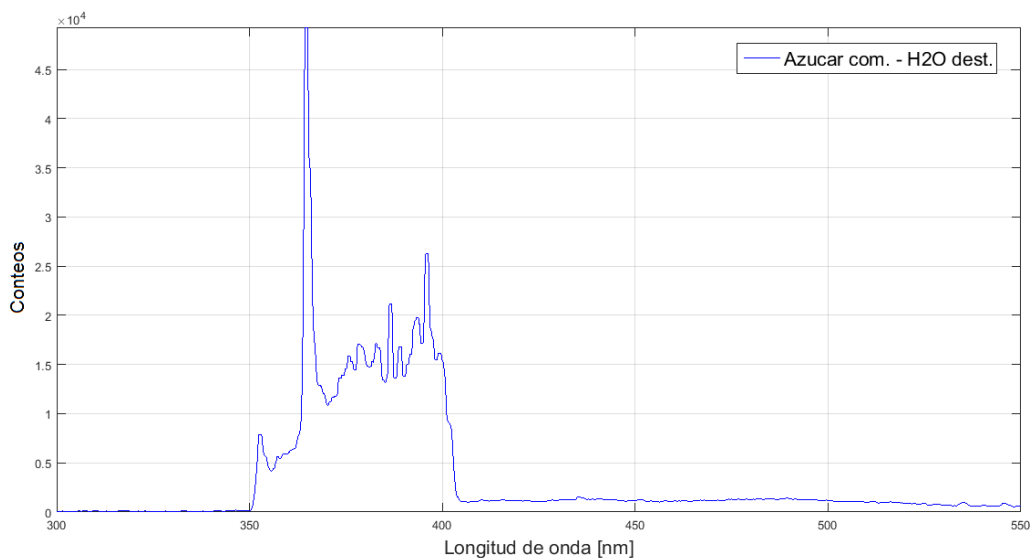
La primera bebida analizada es la Ginger Schweppes. Se realiza la excitación de una alícuota de 2mL de la bebida luego de dejarla reposar durante un tiempo, evitando que se tenga burbujas presentes en la celda UV. Luego de este tiempo se procede a medir la señal espectral luego de la excitación originada por la fuente HID filtrada con el dicróico de 377nm.

Figura 3-36. Espectro de emisión de Ginger Schweppes (Lote: 2015). Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico.



La Bebida Ginger Schweppes presenta un modo de emisión en el rango de 400 a 600nm. Debido a que la bebida es una mezcla de sustancias, se realiza una medición del componente que podría explicar el modo de emisión. En la siguiente figura se muestra el espectro de emisión originado por una mezcla de azúcar comercial en agua destilada. Debido a la escasa solubilidad del azúcar en el agua, se lleva la mezcla a saturación y agitación para luego tomar una alícuota de la misma y medirla en la celda. Se aseguró en el diseño experimental que la muestra contenida en la celda no se evidenciara sólidos suspendidos, sino que fuera homogénea.

Figura 3-37. Espectro de emisión de Azúcar comercial en agua destilada. Muestra llevada a saturación. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico.



De la figura anterior, en el ensayo de caracterización espectral de azúcar comercial en agua destilada se puede observar que se la señal obtenida es fundamentalmente dispersión de la fuente HID filtrada con el dicróico de 377nm. Conserva la estructura de la señal de salida del filtro dicróico y la medición solo correspondería a dispersión y la intensidad luego de 420nm se atribuye a efectos de paso de luz del dicróico. El efecto en la señal de fluorescencia medida de la bebida comercial medida correspondería a otros componentes exceptuando el azúcar.

3.3.4. Ensayos fluoróforos proxy: Quinina (Agua tónica) & Eosina

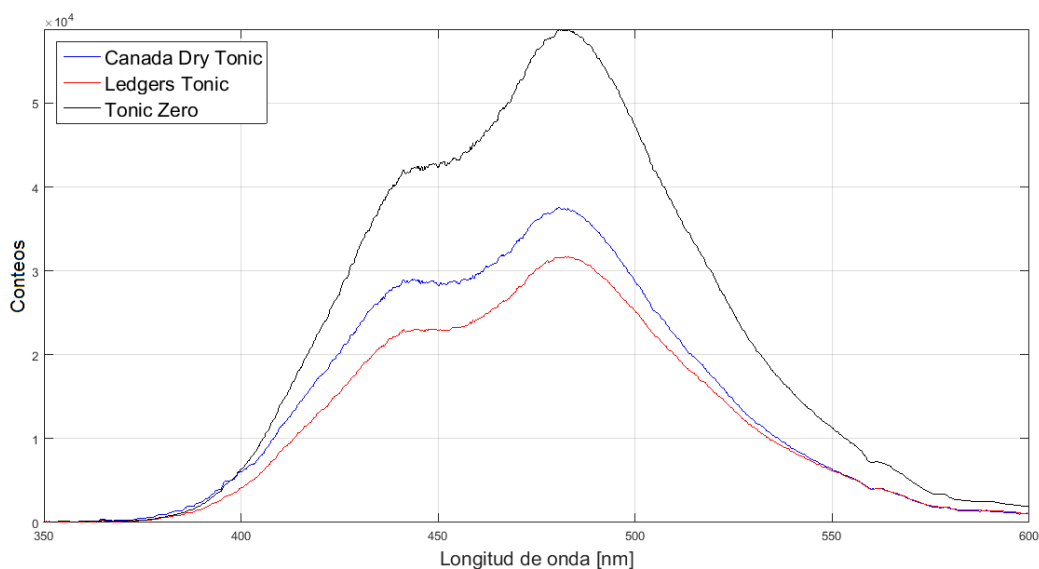
El sulfato de quinina y la quinina son los compuestos orgánicos que más se adecuan a los grupos de hidrocarburos representativos. Estos compuestos tienen una alta solubilidad en el agua y no son reactivos. Se hizo la inclusión de la quinina en la lista de componentes debido a que es un compuesto conocido comercialmente y por su potencial de aplicación en espectrometría de fluorescencia.

La quinina es una sustancia de origen natural, con propiedades analgésicas y antipalúdicas. Es utilizada como saborizante en bebidas para potenciar el sabor. Son las aguas tónicas las que fundamentalmente lo contienen. Puede generar efectos secundarios en altas dosis, por lo que la FDA estadounidense fijó una concentración máxima de 83 ppm

en bebidas. El agua tónica utiliza a la quinina como aditivo para conservar el sabor. La quinina utilizada en las bebidas no es la misma de la versión natural, sino que es una forma cristalina del alcaloide. Algunos de los pasos de obtención de la quinina utilizada en las bebidas tónicas incluyen el remojo en soluciones de hidróxido de potasio, y extracción utilizando acetona, acidificación con ácido clorhídrico y el ajuste de pH con amoníaco (Santoro, 2015).

En el mercado se encuentran tres marcas de agua tónica. El agua tónica de “*Canada Dry*” es la que más se encuentra en los establecimientos. Se analizó también otras marcas como lo son “*Ledgers Tonic*” y el agua tónica “*Tonic Zero*”.

Figura 3-38. Espectro de emisión de diferentes marcas de agua tónica. Muestra llevada a saturación. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1000ms.

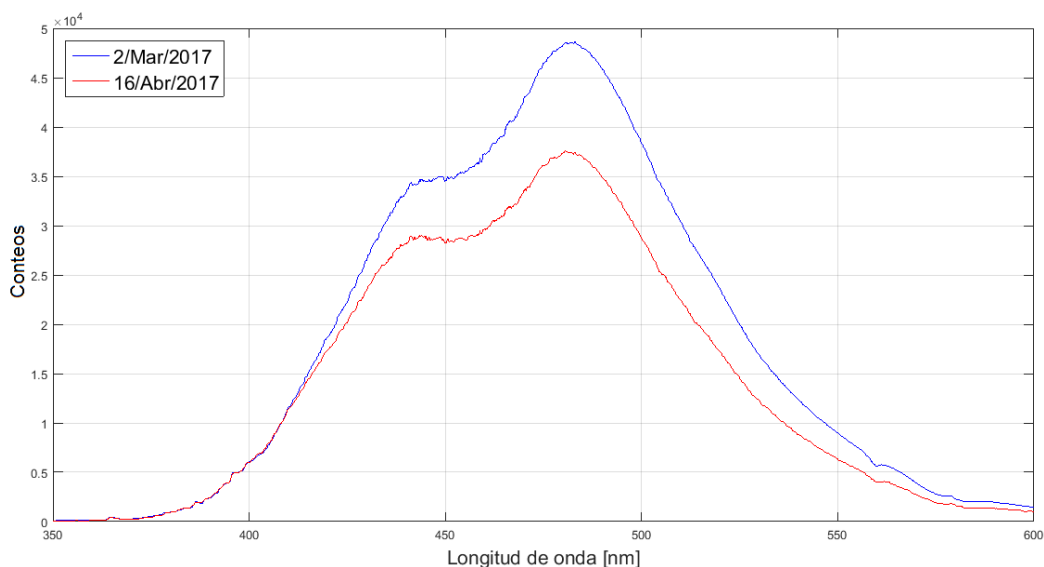


Con un tiempo de integración de 1000ms se obtiene una respuesta espectral de emisión por encima de los 30000 conteos para cada una de las marcas. Esto sugiere que la utilización del agua tónica para el proxy de fluoróforos presenta ventajas en términos de la relación de señal a ruido obtenida, como la disponibilidad del analito. Una botella de un cuarto de litro tiene un costo de menos de 1 USD.

El agua tónica que presenta la mayor señal de fluorescencia a partir de una excitación de 377nm es el agua “*Tonic Zero*”. Esta marca de bebida no es de fácil obtención comercialmente. Sigue en intensidad la marca “*Canada Dry Tonic*”. Debido sus resultados

en términos de emisión y a la facilidad de encontrar en el mercado, se realizan los ensayos de mezclas con esa marca en específico. Se realiza la comparación de la respuesta espectral obtenida entre diferentes lotes de bebida. En la siguiente figura diferentes lotes adquiridos.

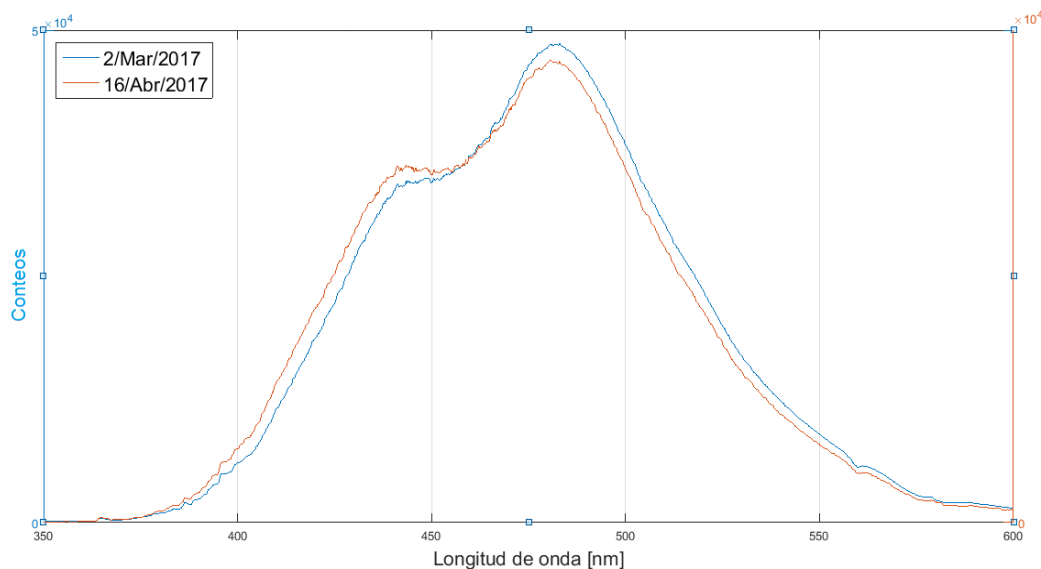
Figura 3-39. Espectro de emisión de agua tónica “Canada Dry” de diferentes lotes. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1000ms.



De la medición realizada se observa un cambio en la intensidad de emisión entre lotes. Se conserva la estructura espectral, lo cual es un indicio de que no se presenta variación en términos de ingredientes. Por información recopilada, se conoce que la concentración de quinina añadida a una bebida de agua tónica no sobrepasa las 40 ppmv²⁶.

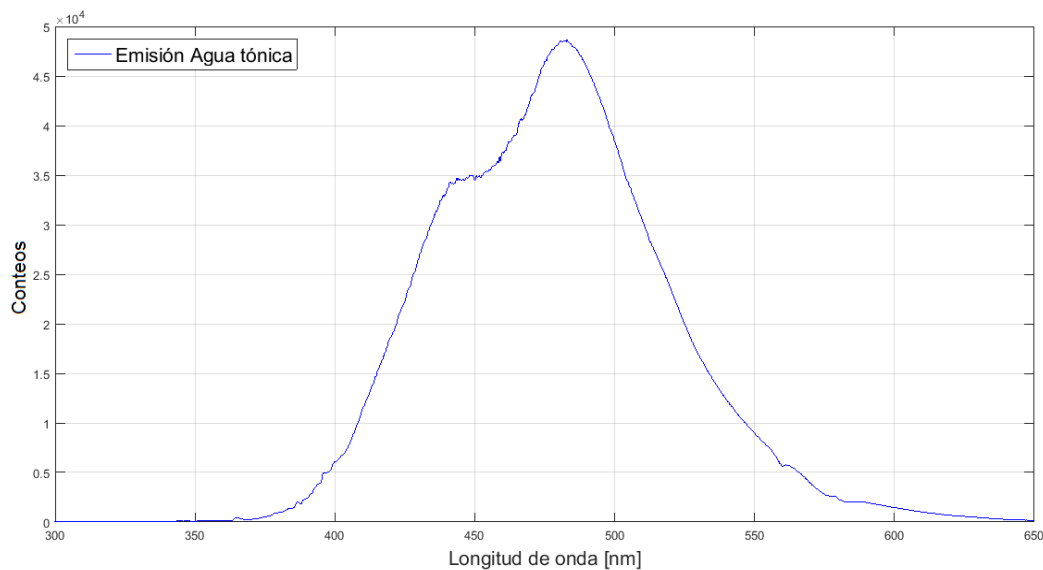
²⁶ Unidad de concentración: ppmv, partes por millón en volumen.

Figura 3-40. Comparación entre lotes de agua tónica. (Ejes secundarios). Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1000ms.



Debido a los resultados espectrométricos ofrecidos utilizando bebidas comerciales con fluoróforos proxy, se decide realizar los ensayos de mezclas a partir de la base de agua tónica con un segundo fluoróforos proxy, que como se explicaba anteriormente, debe encontrarse en una región de excitación-emisión diferente a la quinina.

Figura 3-41. Espectro de emisión de agua tónica “Canada Dry”. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1060ms.



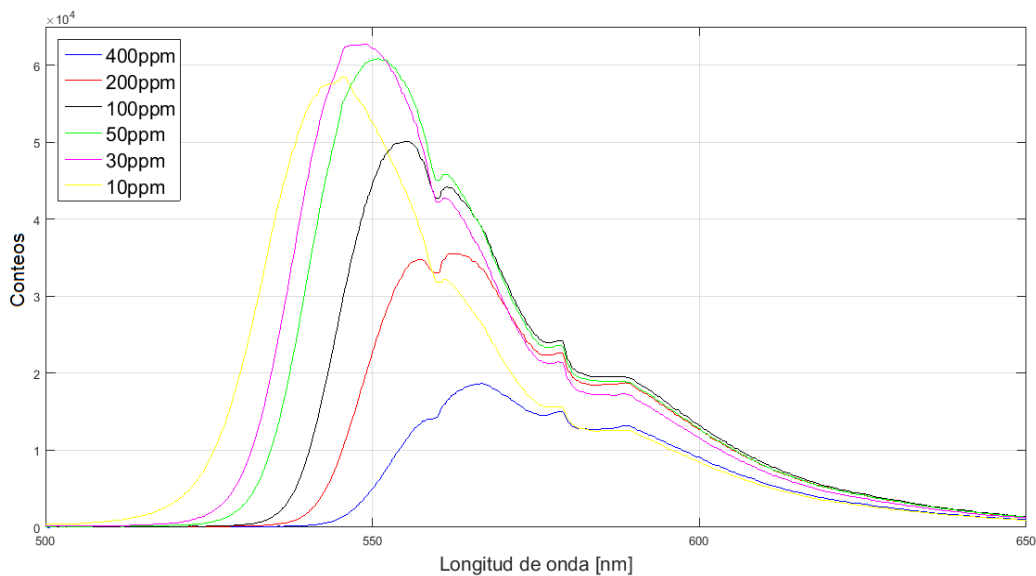
3.3.5. Límite de saturación Eosina

La eosina es un colorante con propiedades antisépticas. Es soluble en agua y en otros solventes. Según la tabla 3-7, cuenta con propiedades de excitación y emisión similares al biodiesel. Debido a su fácil acceso, a su solubilidad en agua y baja toxicidad se utilizará en el análisis de mezclas.

Al realizar el diseño del experimento de caracterización espectral de la eosina, se empezó a diluir una base de concentración de 1000ppm. Esta muestra a esta concentración, aunque no presenta sólidos suspendidos, se puede ver que la transmitancia de luz es baja.

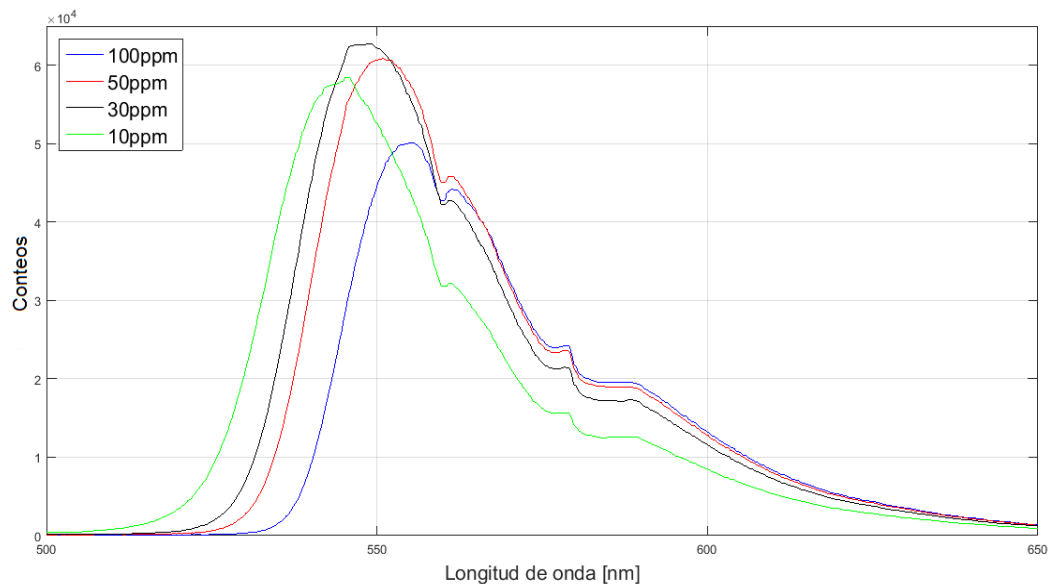
De los estudios realizados en la fase I del proyecto (Lombana, 2016) analiza los efectos de la concentración de una muestra fluorescente con respecto a la medición de intensidad recolectada por el espectrómetro. Establece que a concentraciones altas se presenta un efecto de saturación en donde la fluorescencia es reabsorbida por las mismas moléculas. Por lo tanto, antes de utilizar una sustancia fluorescente para ensayos de mezclas se debe establecer la concentración en la cual dará el máximo de emisión.

Figura 3-42. Espectro de emisión de diluciones de eosina en agua destilada. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 525nm. Medición realizada en el montaje óptico.



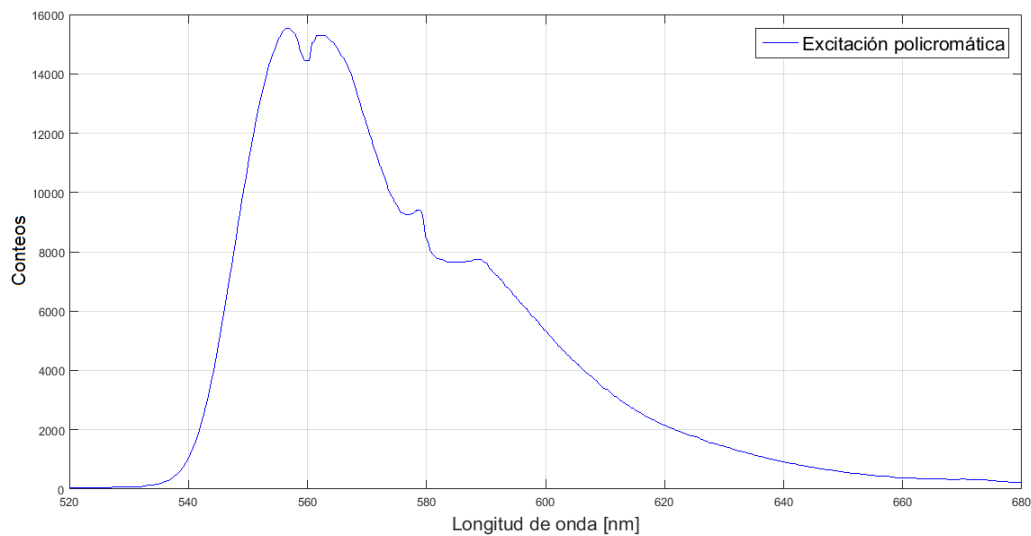
A partir de la base de concentración se procedió a realizar mediciones espectrométricas de las diluciones. En la figura anterior se toma el rango de concentración de eosina en agua desde 10ppm hasta 400ppm. De los ensayos se observa que desde 400ppm, al ir disminuyendo la concentración se presenta un aumento en la intensidad medida por el espectrómetro, confirmando lo establecido según el frente de concentración. El valor más alto de intensidad se llega a alcanzar con una concentración de 30ppm de eosina en agua. Es a esta concentración que se obtienen la máxima intensidad de emisión a una excitación de 525nm.

Figura 3-43. Espectro de emisión de diluciones de eosina en agua destilada. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 525nm. Medición realizada en el montaje óptico.



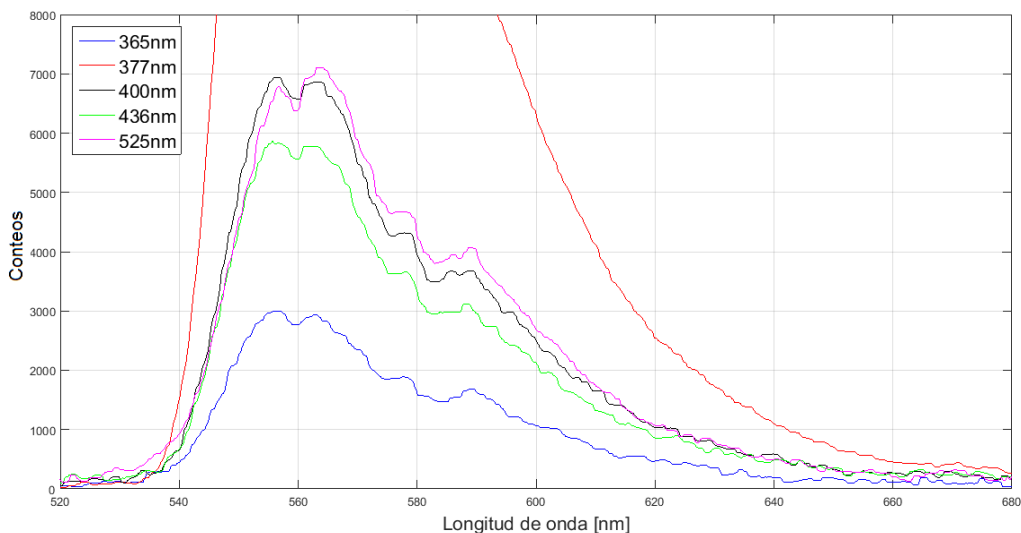
De tal manera, habiendo establecido la concentración a la cual se encuentra el límite de saturación (30ppm) se procede a realizar los ensayos de mezclas de fluoróforos proxy.

Figura 3-44. Emisión eosina 30ppm excitación policromática fuente HID tiempo de integración de 100ms



Obtenido el valor de concentración de 30ppm de eosina en agua, se realiza ahora la caracterización de la señal de fluorescencia de la eosina con excitaciones provenientes de diferentes filtros dicróicos.

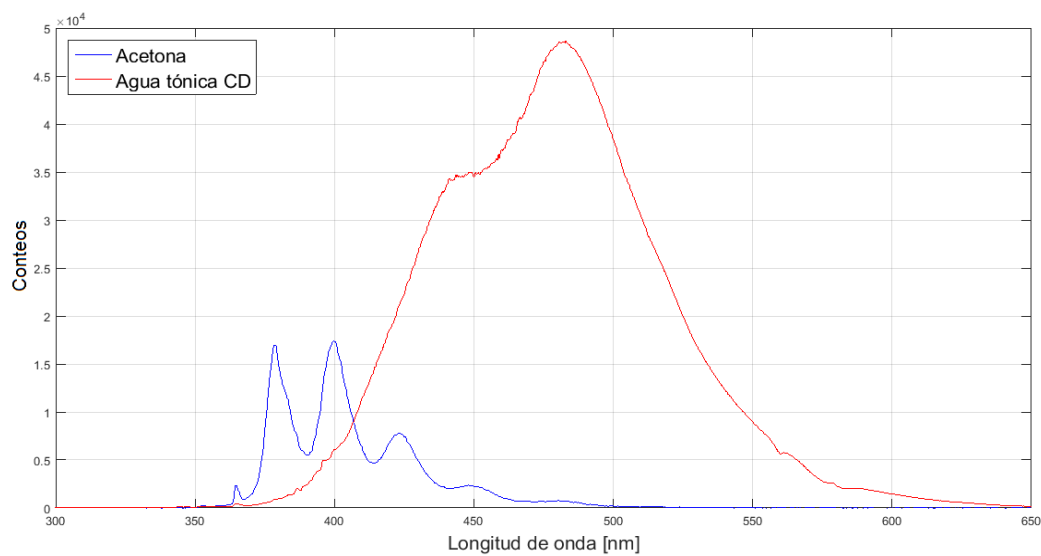
Figura 3-45. Espectro de emisión eosina a 30ppm. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico.



3.3.6. Ensayos Mezclas fluoróforos

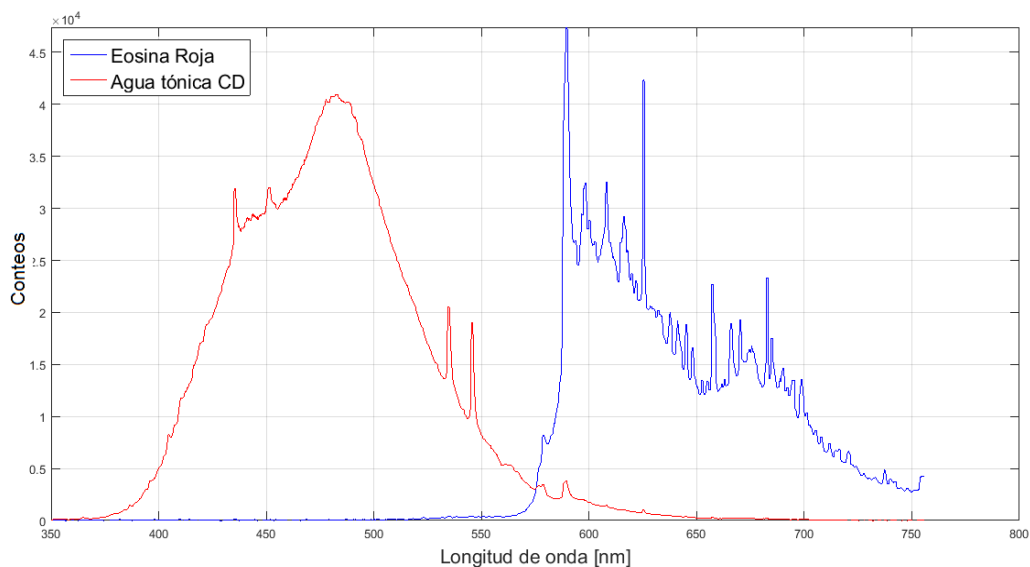
El primer solvente considerado para fluoróforo proxy complementario a la eosina es la acetona. De la caracterización espectral de la emisión proveniente de la acetona, se evidenciaba que presentaba una estructura con varios modos de emisión. Si se relacionan las mediciones de acetona y las de agua tónica se puede concluir que, si se llega a diluir la acetona, esta puede pasar a ser indetectable en la mezcla.

Figura 3-46. Emisión acetona – agua tónica “Canada Dry”. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 filtrada con el dicróico de 377nm. Medición realizada en el montaje óptico. Tiempo de integración de 1000ms.



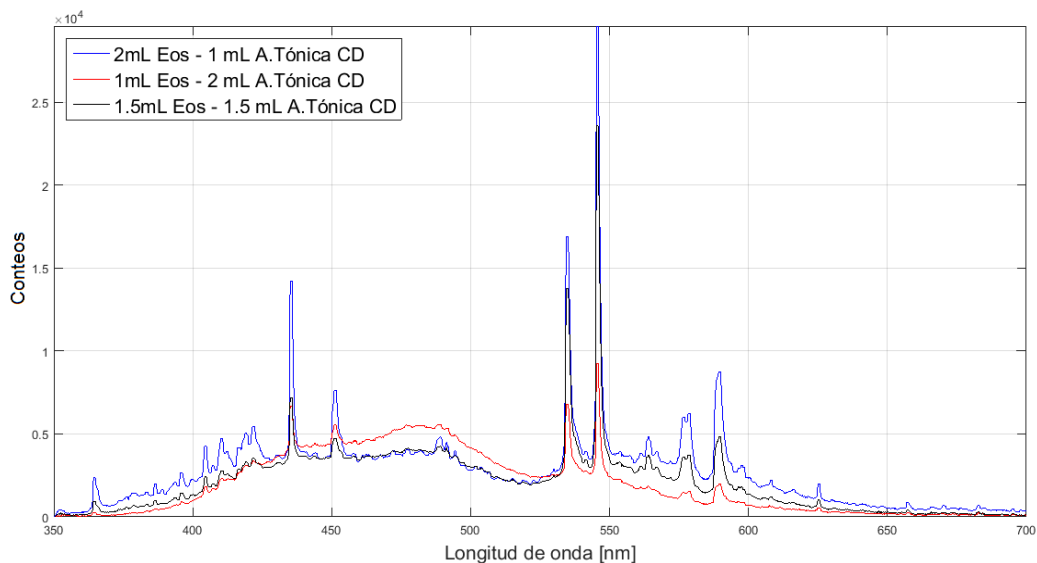
En cambio, al relacionar la eosina con el agua tónica se observa que las dos sustancias son comparables en términos de la intensidad de la emisión de fluorescencia. En la siguiente figura se muestran los espectros de emisión de la eosina y del agua tónica con excitación policromática.

Figura 3-47. Espectros emisión – excitación policromática. Emisión eosina – agua tónica “Canada Dry”. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 sin utilizar filtro dicróico. Medición realizada en el montaje óptico.



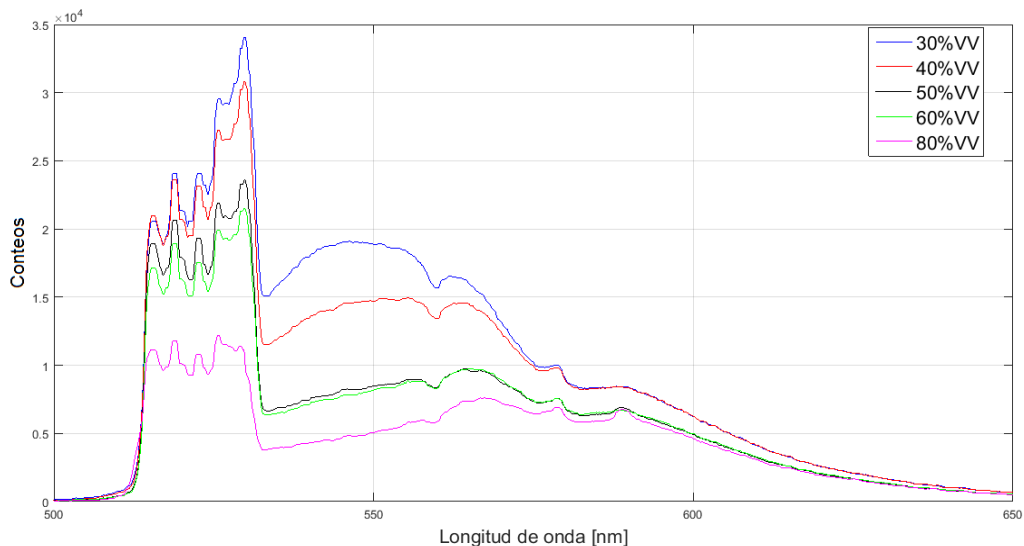
Al realizar el mezclado de eosina con agua tónica, se empieza a ver la relación del comportamiento espectral de cada componente. De esta manera, en una excitación policromática (fuente HID) se llega a obtener una variación en la región en donde se encuentra la emisión de fluorescencia. A mayores concentraciones de eosina se presenta un aumento en la región de emisión de fluorescencia como fluoróforo proxy (eosina en agua destilada a 30ppm).

Figura 3-48. Emisión eosina – agua tónica “Canada Dry” a diferentes concentraciones en volumen. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 sin utilizar filtro dicróico. Medición realizada en el montaje óptico.



En el caso de excitación monocromática (filtro de 525nm) el comportamiento de la mezcla es diferente, en donde al aumentar la concentración volumen eosina con respecto al volumen total de la mezcla, se presenta una disminución en la señal de emisión en la región de la eosina. Esto es, a la mayor concentración de eosina en agua tónica 80%VV (volumen/volumen) se obtienen la menor intensidad.

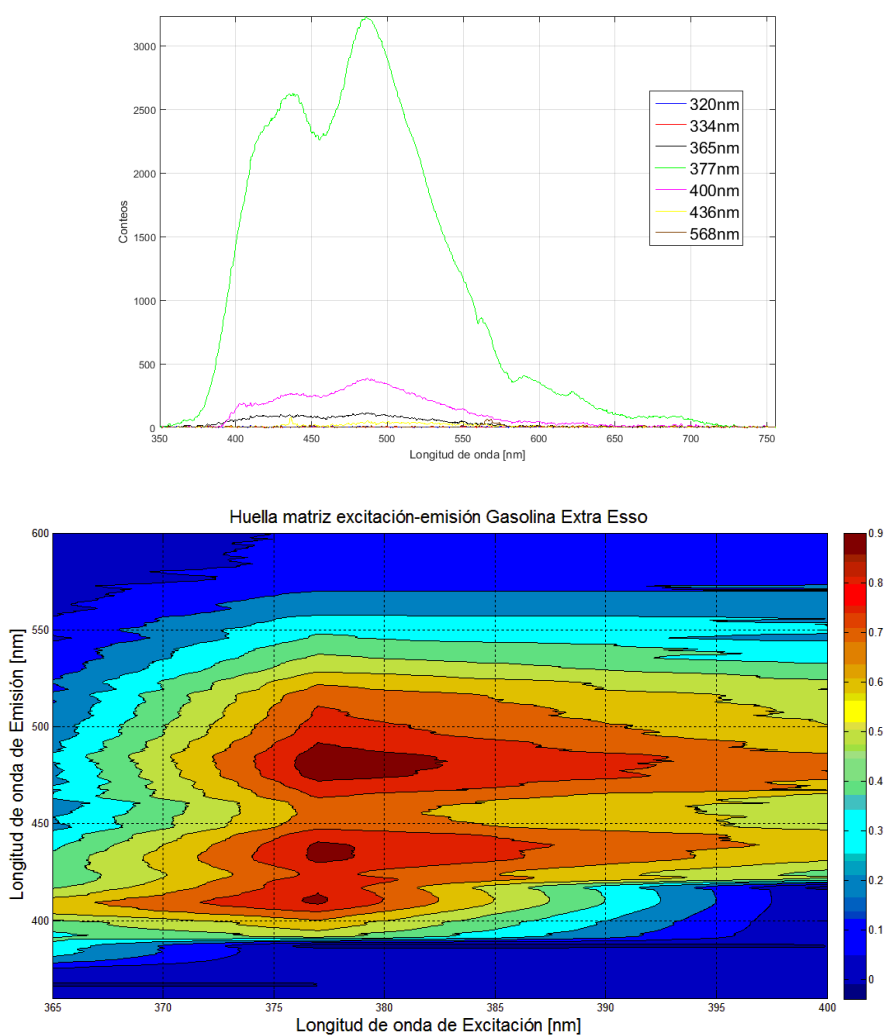
Figura 3-49. Emisión eosina – agua tónica “Canada Dry” a diferentes concentraciones en volumen. Señal espectral obtenida a partir de la fuente HID H4 utilizando el filtro de 525nm. Medición realizada en el montaje óptico.



3.3.7. Matrices de excitación – emisión adquirida con el prototipo.

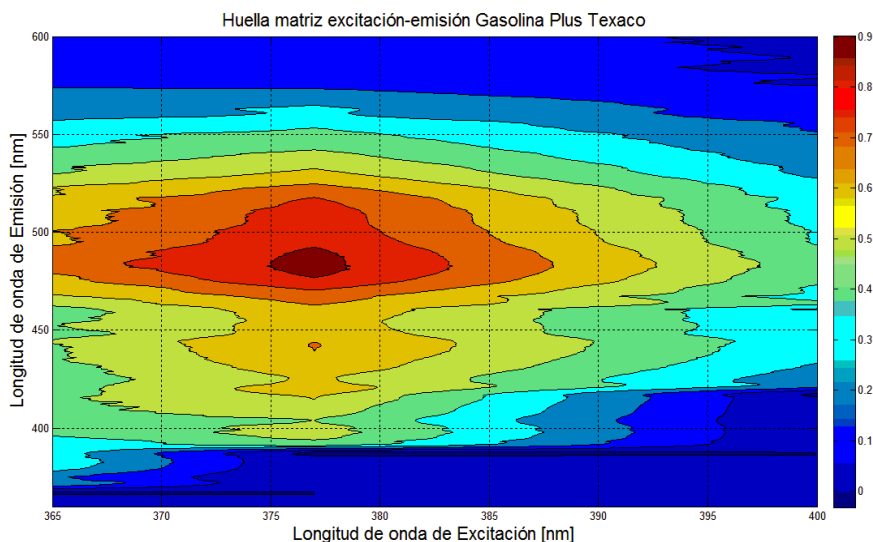
Ya habiendo caracterizado las implicaciones de realizar mezclas de sustancias fluorescentes se procede a elaborar matrices de excitación-emisión. Estas matrices son construidas a partir de varias excitaciones monocromáticas. Según el detalle de caracterización se debe incluir un mayor número de excitaciones monocromáticas según se permita en la región de absorción de la sustancia.

Figura 3-50. Panel superior: intensidad de emisión para la gasolina Extra Esso (obtenida agosto 2016) con la fuente HID filtrada con todo el arreglo de dicróicos disponible en el montaje. Panel inferior: Huella de matriz de excitación-emisión para la gasolina Extra Esso.



De la matriz de excitación-emisión se puede ver que para el caso particular de este tipo de gasolina comercial se cuentan con tres modos de intensidad. Cada uno de estos modos se puede identificar en la figura del panel superior y corresponde a los diferentes picos de intensidad originados por cada excitación monocromática. Estos picos de intensidad de la matriz son distintivos y pueden ser utilizados para la caracterización de este componente.

Figura 3-51. Huella de matriz de excitación-emisión para la gasolina plus Texaco (Obtenida agosto 2016) Excitación generada con la fuente HID filtrada con todo el arreglo de dicróicos en la región de 365 a 400nm.



En esta matriz se realiza la caracterización espectral de la gasolina Texaco comercial (Urbana). Se conoce que esta gasolina cuenta con una serie de aditivos (Techron) los cuales pueden explicar los cambios en los picos de intensidad presentes en la huella obtenida.

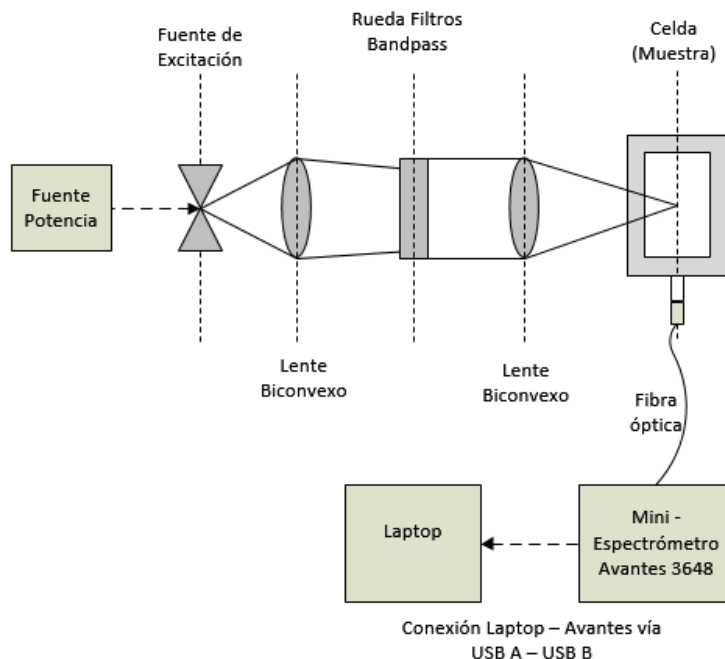
3.4. Diseño, empaque y ajuste de un instrumento prototipo

Luego de escoger la fuente de luz para las mediciones, realizar la identificación espectral de la fuente y la caracterización del prototipo en términos de dispersión de la luz y linealidad se procede a hacer el ajuste del instrumento prototipo. Tomando como punto de inicio los avances en el sistema realizado en la primera fase del proyecto, se añade al montaje la

fuentes de luz HID H4 con el balasto, la fuente de potencia (12VDC) y los dispositivos utilizados para la mecanización de la rueda de filtros dicróticos.

3.4.1. Prototipo fuente Xenón HID H4 y mecanización

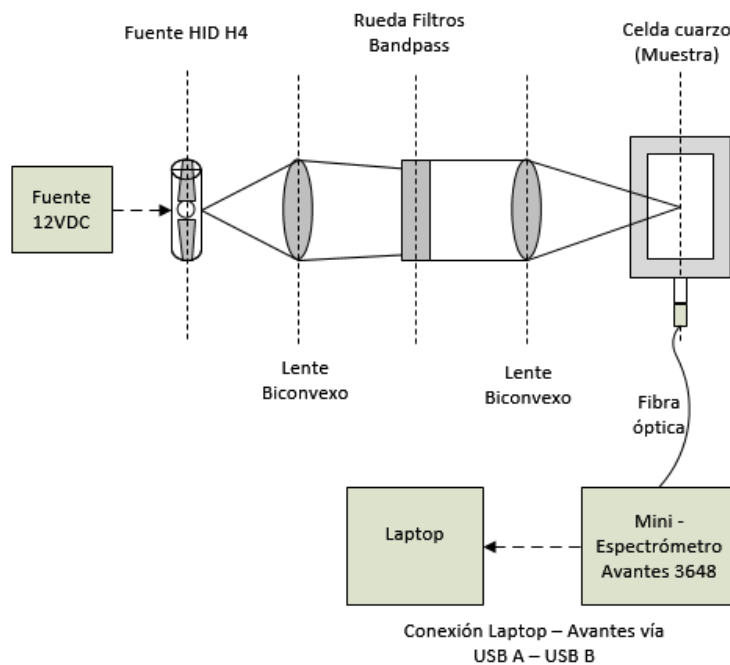
Figura 3-52. Montaje sistema óptico para técnica EEMS desarrollado en la fase I.



En la figura se muestra el montaje del instrumento prototipo desarrollado en la fase I del proyecto.

A este montaje luego de la evaluación de alternativas de fuentes de luz se incluye en el arreglo óptico una fuente de excitación tipo HID H4 de Xenón, además de una celda UV, La celda UV es la que mejor se adecua al sistema de medición de espectrometría de fluorescencia, además por las características mismas del material, permite el paso de la luz incidente a la muestra que proviene de la fuente. Esta celda tiene la característica de permitir el paso de radiación UV.

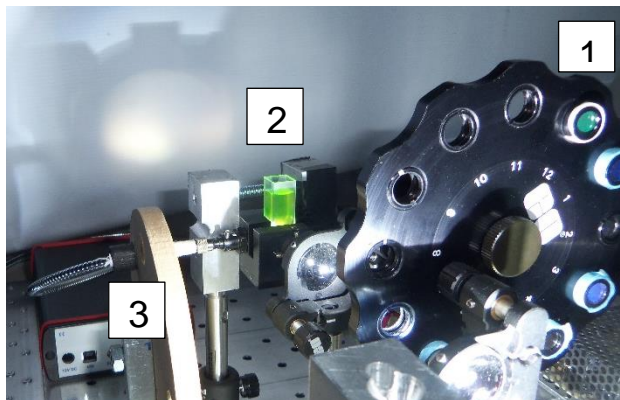
Figura 3-53. Montaje sistema óptico para técnica EEMS desarrollado. Incluye una fuente de luz de Xenón HID – H4, una rueda de filtros pasa banda, una celda de cuarzo.



3.4.2. Mecanización de la rueda de paso bandas.

Para la construcción de la matriz de excitación-emisión se requiere de varios espectros de excitación. Estos espectros de excitación provenientes del filtrado óptico de la señal de la fuente HID llegarán a la celda con la muestra y generarán emisión de fluorescencia. En la rutina de generación de la matriz, hay que efectuar el filtrado de la señal de la fuente utilizando los dicróicos.

Figura 3-54. Sistema óptico del prototipo. (1). Rueda de filtros dicróicos de 12 posiciones Edmund Optics. (2) celda UV con muestra con porta-cubetas, (3) Mini espectrómetro Avantes 3648.



Estos filtros dicróicos están ubicados en una rueda de filtros en cada una de las posiciones. Se busca realizar la automatización de la rueda de dicróicos y su vinculación con una rutina de software controlada por el usuario utilizando un PC.

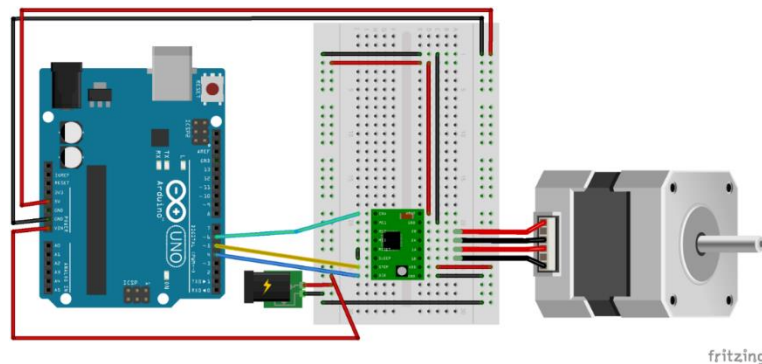
Como se mencionaba en la metodología, es a partir de un lenguaje de programación que permita la vinculación hardware – software que se podrá obtener un prototipo de fácil uso para cualquier usuario. MatLab permite la conexión del espectrómetro con el computador por medio de la librería de AvaSoft. Esta interfaz es simple y permite la visualización de los espectros medidos con el espectrómetro, y por medio de las rutinas incluidas en la “.dll” el control de las mediciones.

La rutina de medición del sistema prototipo requiere que la rueda de dicróicos esté vinculada a cada etapa de medición. Es por este motivo que se requiere que la rueda de filtros dicróicos esté vinculada en la adquisición de espectros, y sea controlada por el usuario.

Antes del surgimiento de plataformas abiertas, el prototipado de hardware y software era complejo y costoso. Esto motivó a que varias universidades y centros de investigación comenzaran a desarrollar alternativas más baratas y sencillas. Sin embargo, dichas soluciones no eran tan versátiles y generales como se esperaban. Fue hasta 2005 en Italia donde nació Arduino, una familia de plataformas micro computarizadas y tarjetas con diferentes procesadores, tamaños y características de conectividad que las convierte en un hardware prominente dentro de aquellas que trabajan con código abierto (*open-source hardware*).

Luego de realizar un análisis de posibilidades de mecanización utilizando Arduino, se elige como base la utilización de un motor de paso. Los motores de paso permiten la operación fina de la rueda y cuentan con el torque necesario para llevar a cabo la tarea. Arduino cuenta con un módulo de un motor de paso y un driver. El esquema del motor unipolar de paso, la conexión utilizada en la placa del Arduino se muestra a continuación.

Figura 3-55. Módulo Arduino: Motor 28BYJ – 48 (Motor Unipolar de paso). Software utilizado: Fritzing.



Es necesario mencionar que este motor no puede ser alimentado a partir de Arduino, por este motivo se debe incluir una fuente de potencia. Para este desarrollo se adaptó la salida de un puerto USB de PC a la protoboard para poder generar la potencia complementaria requerida para la operación del motor de paso.

Un motor de paso es controlado por una serie de bobinas electromagnéticas. El centro del motor consiste en una serie de imanes montados y las bobinas que están alrededor están recibiendo electricidad. Existen dos tipos de motores para proyectos de prototipado. Los unipolares y los bipolares.

El motor utilizado en el prototipo es un motor unipolar de paso 28-BY J48. Los motores de paso requieren de un Driver para el control por medio de impulsos de las bobinas.

Para generar movimiento, se debe energizar las fases del motor en una secuencia determinada en un tiempo específico para generar que el motor gire. Esto se puede lograr a partir del Driver.

En este motor hay 4 bobinas las cuales deben ser excitadas en de determinada manera a través del driver para dar el número de pasos especificados.

Figura 3-56. Driver de arreglo ULN2003 Darlington.

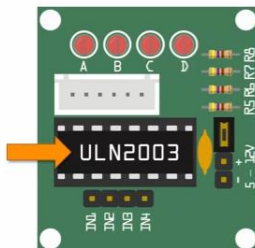
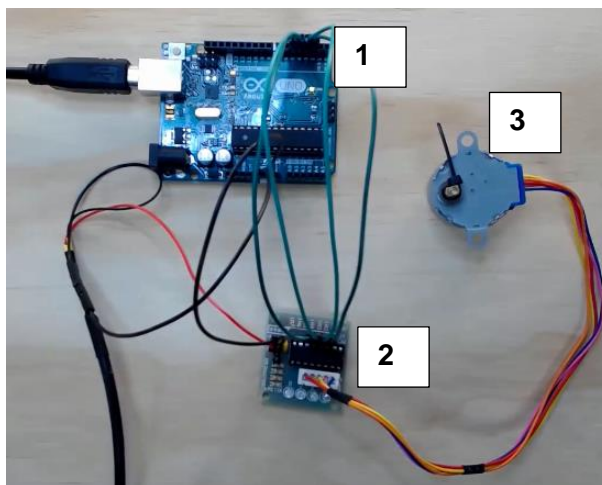


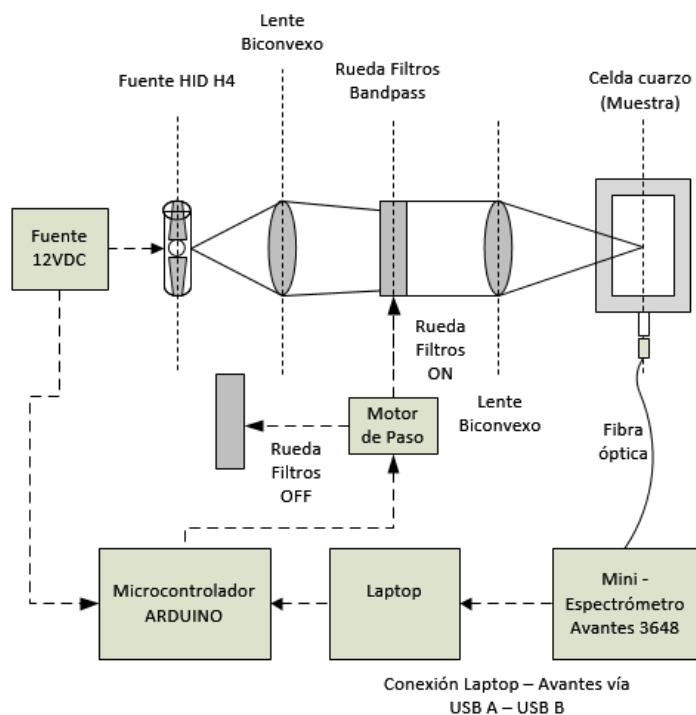
Figura 3-57. Sistema completo del motor de paso 28BYJ-48. (1) Placa de Arduino UNO, (2) driver ULN2003 Darlington, (3) motor de paso unipolar 28BYJ-48.



Posteriormente en el proyecto se adaptó la rueda de filtros dicróicos a un sistema de mecanización utilizando el microcontrolador Arduino. Este microcontrolador permite a su vez la interfaz con lenguajes de programación como MatLab.

En la figura siguiente se encuentra la representación del sistema óptico y mecánico del instrumento prototipo desarrollado en esta fase del proyecto.

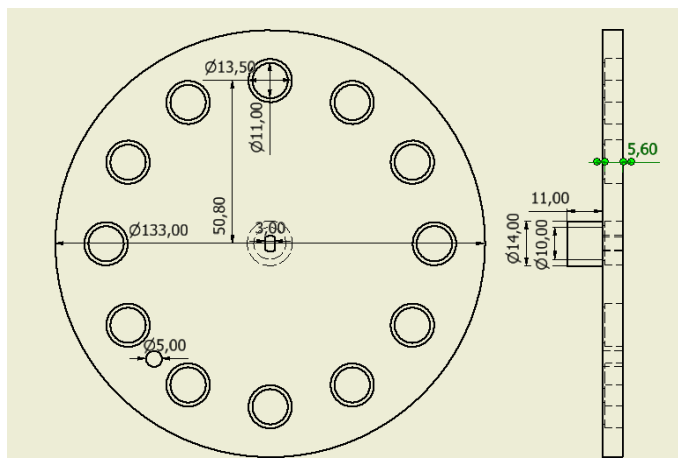
Figura 3-58. Montaje sistema óptico para técnica EEMS desarrollado incluyendo mecanización de la rueda de filtros pasa banda.



Con respecto a la fase anterior se llegaron a los siguientes avances en el prototipo:

- Establecimiento de fuente de luz de Xenón HID H4.
- Caracterización de la fuente de luz y optimización del sistema óptico.
- Celda UV para mediciones con fluoróforos puros y para hidrocarburos.
- Sistema de mecanización de la rueda de filtros dicróicos.
- Rutinas de lectura de datos y vinculación hardware – software
- Rutinas de filtrado digital de espectros
- Establecimiento de linealidad en las mediciones espectrométricas.

Figura 3-59. Planos de rueda de filtros pasa banda (bandpass) para impresión 3D.



3.5. Evaluación del método de inversión

El método de inversión es un procedimiento de obtención de matrices de excitación-emisión a partir de fuentes de luz policromáticas. Pueden ser obtenidas en dos casos, el primero en donde se tiene un solo fluoróforo y el segundo caso en donde se tiene múltiples fluoróforos.

3.5.1. Resultados a partir de matrices sintéticas.

En la figura que se muestra a continuación se tiene un espectro de excitación policromático. Cada uno de los espectros tiene un rango de excitación predominante (ancho de banda), y se presenta entrecruzamiento entre los diferentes espectros. De esta manera.

La relación entre los espectros resultantes de fluorescencia Y y la matriz de los espectros de las fuentes de excitación X está dada según:

$$Y = A \times X$$

Donde A es la matriz de excitación-emisión. De esta manera hay un espectro de emisión por cada espectro de excitación. De manera extendida, n_1 corresponde a la longitud de onda del número de espectros de emisión, n_2 corresponde a la longitud de onda del

número de espectros de emisión. Se tiene en cuenta el número de fuentes de excitación, denotado por n_s .

La matriz de excitación-emisión A relaciona de esta manera $(n_1 \times n_2)$, la excitación X a $(n_1 \times n_s)$ y la emisión Y a $(n_2 \times n_s)$.

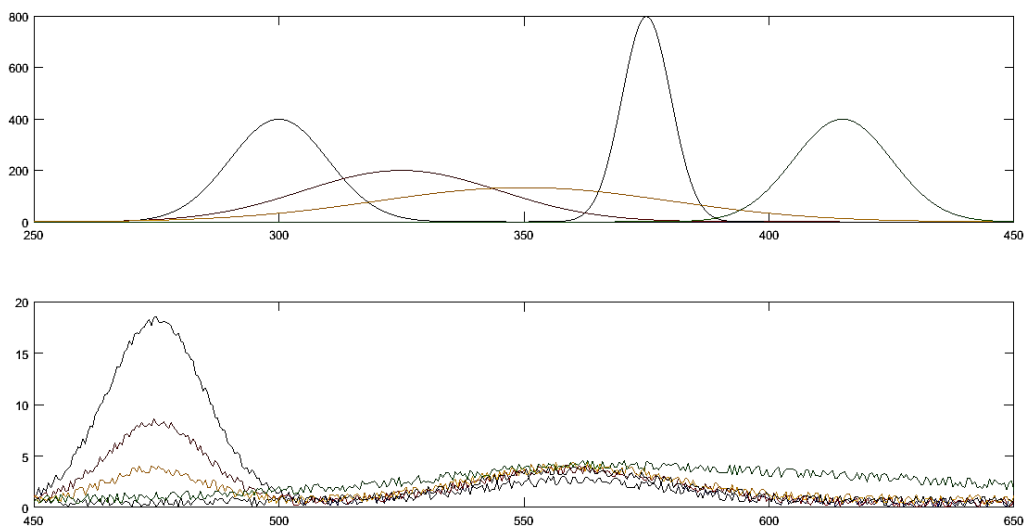
$$Y = A \times X$$

$$(n_2 \times n_s) = (n_1 \times n_2) \times (n_1 \times n_s)$$

Este método de inversión fue desarrollado a través de SciLab con la función $y = a \times x$ y aunque inicialmente se presentó la dificultad de recuperar $(n_1 \times n_2)$ a partir de $(n_1 \times n_s)$, los ensayos con muestras sintéticas sugieren que el método computacionalmente estable.

Se parte de una matriz teórica, y se busca recuperar los espectros de emisión. En la figura se tienen cinco espectros de excitación no colineales.

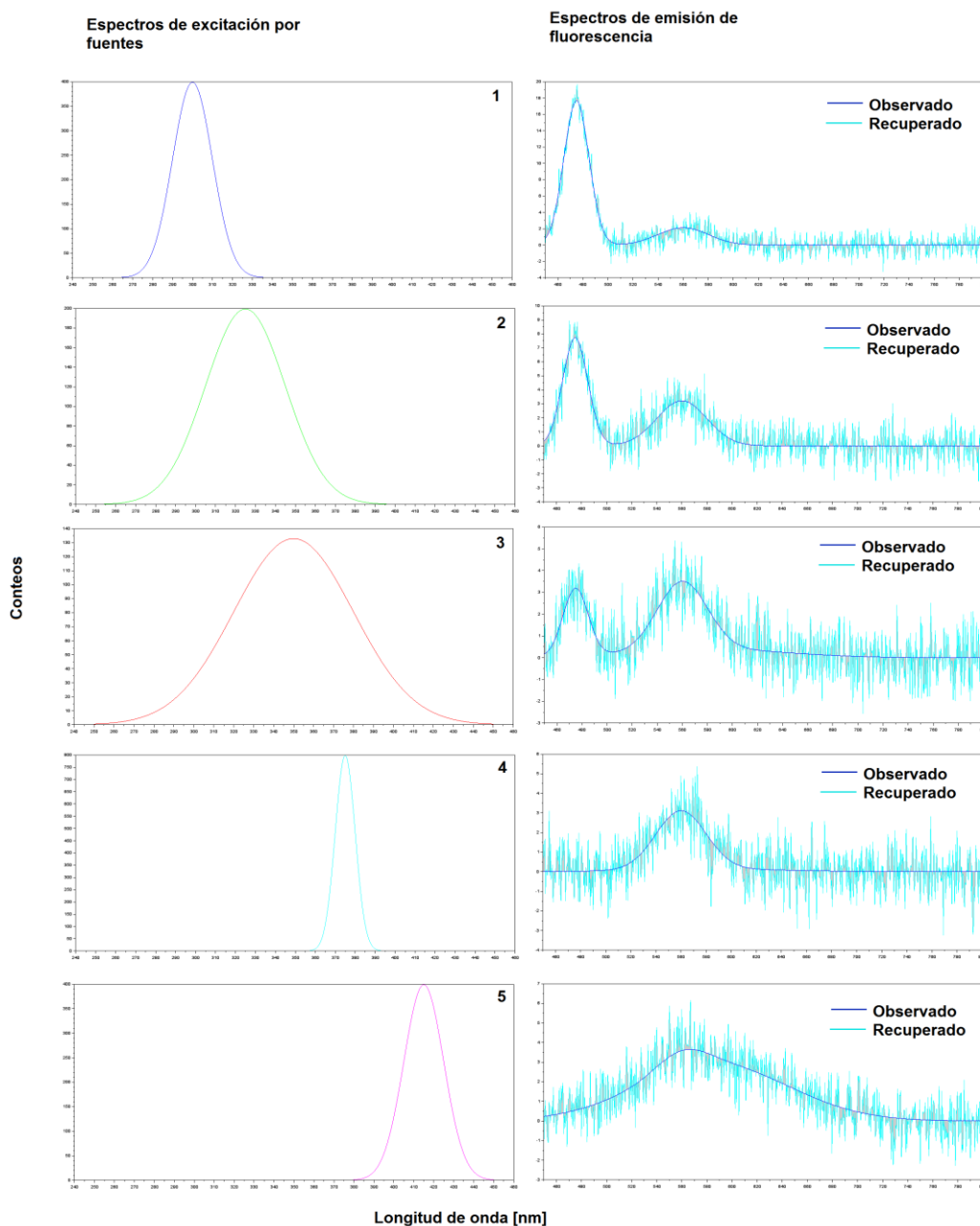
Figura 3-60. Panel superior: espectro teórico de excitación policromática. Panel inferior: espectro de emisión observado.



Considerando las anteriores relaciones mencionadas, se tiene que para una serie de espectros de excitación determinados se puede recuperar el espectro de emisión correspondiente. En la figura 3-60 se tienen cinco espectros de excitación que generan el espectro de fluorescencia del panel inferior. Con el método computacional, se puede llegar

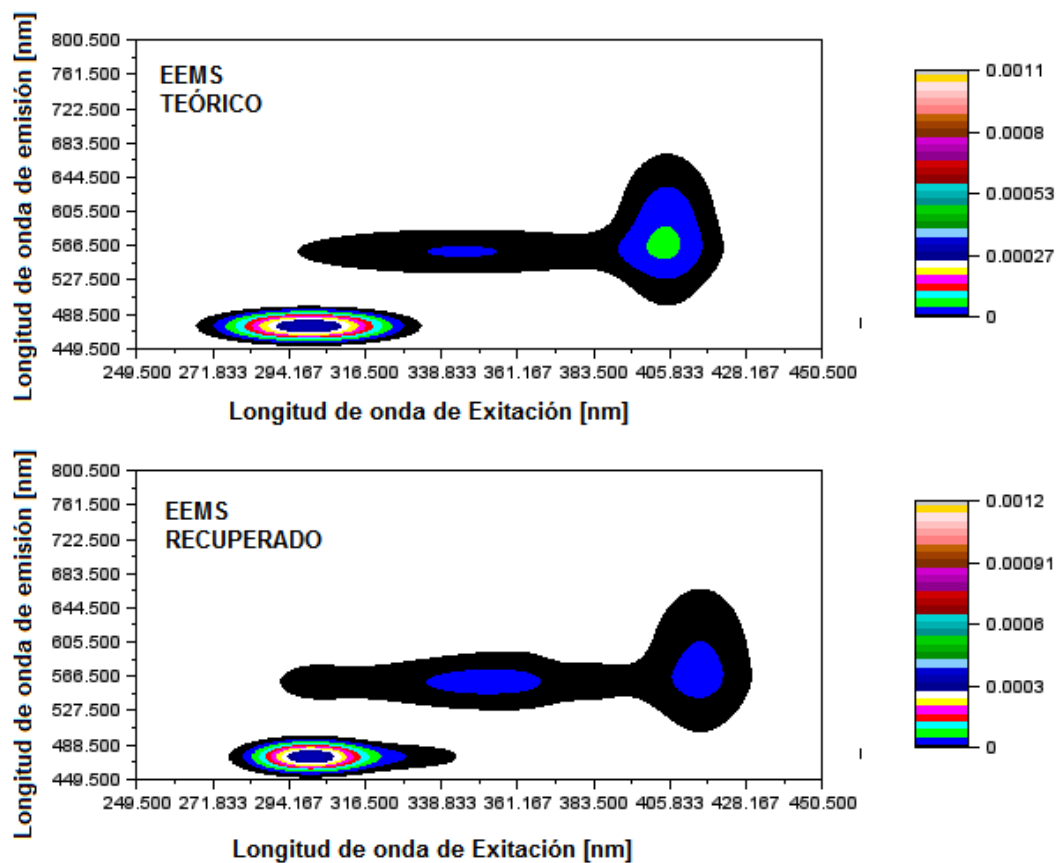
a obtener espectros de emisión de fluorescencia recuperados a partir de la matriz de excitación-emisión. En la siguiente figura se relacionan los espectros de excitación y los espectros de emisión observados (datos experimentales sintéticos) y los espectros de emisión recuperados a través del método.

Figura 3-61. Panel izquierdo: espectros de excitación por fuentes. Panel derecho: espectro de emisión de fluorescencia.



Se relacionan finalmente las matrices de excitación-emisión teórica (observada) y la matriz de excitación-emisión recuperada a partir del método de inversión.

Figura 3-62. Panel superior: Matriz de excitación-emisión teórica. Panel inferior: Matriz de excitación-emisión recuperada.



En la figura anterior se muestran las matrices de excitación-emisión recuperada y teórica. La matriz de excitación-emisión recuperada muestra la capacidad del método de realizar recuperaciones espectrales a partir de mediciones bajo condiciones de ruido espectral.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

En esta investigación se realizó el desarrollo de alternativas, integración y evaluación de un instrumento prototipo instrumental para la identificación de hidrocarburos utilizando la técnica de matriz de excitación-emisión.

Se establecieron los criterios más importantes para la operación del prototipo considerando cada una de las partes fundamentales (fuente – muestra – detector).

Se realizó la caracterización de los filtros dicróicos disponibles en el montaje óptico de la fase anterior. Se añade un filtro a 525nm debido a que en esa región se realiza el análisis de las mediciones con fluoróforos que representan el comportamiento de los hidrocarburos en la excitación y emisión.

Se realizó un plan de alternativas de fuentes de luz para aplicaciones de espectrometría de fluorescencia, donde se encontró que las fuentes continuas de Xenón ofrecen las mejores características para la aplicación de la técnica. De las posibles fuentes se escoge una fuente comercial de bajo costo y que cuenta con los requisitos necesarios para la utilización en el prototipo a desarrollar. La fuente de luz de Xenón HID H4 presenta la mejor relación costo beneficio.

Posteriormente se llegó a caracterizar la fuente según estabilidad, estructura espectral, intensidad de emisión de luz y pruebas de manejo térmico. Se llegaron a conclusiones a considerar en la rutina de operación del instrumento, como lo es el tiempo de calentamiento

de la fuente (3 minutos) así como la posibilidad de utilizar una superficie reflectora para la medición del espectro de excitación.

Considerando la fuente escogida, se realizaron mediciones con el espectrómetro con el fin de evaluar su comportamiento. Se consideraron los efectos de dispersión de la luz causados por el medio, así como también las dispersiones originadas por la muestra y por el solvente. Se realizaron otras pruebas de manejo térmico y para la caracterización del comportamiento del espectrómetro se llegó a determinar que se presenta una linealidad entre el tiempo de adquisición de señal de luz (tiempo de integración) y la intensidad reportada por el espectrómetro. De esta manera, además de comprobar la relación entre tiempo de integración e intensidad, se llegó a establecer un estándar de tiempo de 1000ms para la adquisición de datos en el espectrómetro, siendo que se puede llegar a escalar mediciones a diferentes tiempos.

Se llegó a determinar el procedimiento adecuado en la rutina de medición para disminuir el ruido de las mediciones. Esto se logra mediante el uso de un filtro digital. Luego del análisis de señal de varios espectros con características en la estructura espectral, se establece que el filtro de mediana es el más adecuado para las mediciones de matriz de excitación emisión.

Se escogen dos fluoróforos para la representación del comportamiento de excitación y emisión ante fuentes de luz. Es la quinina y la eosina los fluoróforos que fueron utilizados para los ensayos de mezclas. En estos ensayos se llegó a verificar la existencia de un límite de concentración en el cual se tiene la máxima intensidad de emisión en un fluoróforo. Además de poder relacionar el comportamiento de dos fluoróforos en mezcla a diferente razón de concentración.

Se llegaron a obtener utilizando el instrumento prototipo matrices de excitación-emisión para combustibles urbanos. Luego de construir la matriz se pueden observar características distintivas en la huella obtenida, permitiendo por medio de la técnica y del instrumento la identificación de hidrocarburos y la diferenciación según la composición de cada uno de ellos.

4.1.1. Preparación de muestras ambientales

La toma de muestras ambientales sugiere un desafío tanto procedimental como del diseño de experimento. Por tal motivo y según los alcances del proyecto se realizaron muestras sintéticas que tuvieran fluoróforos representativos. Estos fluoróforos proxy, con características similares de excitación y a la emisión de fluorescencia a hidrocarburos representativos son los que fueron utilizados en la investigación. Estas mezclas sintéticas tienen la característica de asemejarse al comportamiento de fluoróforos provenientes de hidrocarburos que puedan estar presentes en cuerpos de agua. Las muestras ambientales además de la presencia de fluoróforos cuentan con material suspendido, con sustancias biológicas que, según investigaciones de calidad del agua, pueden también emitir fluorescencia.

En estudios realizados se ha logrado identificar las principales sustancias de origen biológico con propiedades fluorescentes. Uno de los principales desafíos a la fase siguiente del proyecto de investigación tiene que ver con la consideración de este tipo de variables.

En la presente investigación se realizó un estudio preliminar de este problema. Para lo cual se vinculó un estudiante de pregrado en ingeniería química, el cual desarrollo juntamente con el equipo el trabajo de grado “Desarrollo de procedimientos para acondicionamiento de muestras de hidrocarburos en aguas”²⁷, en el cual se empezó a estudiar el efecto de solidos suspendidos en una mezcla con componentes fluorescentes y el análisis del efecto de Scattering del material sobre el espectro resultante.

Este proyecto fue el primer acercamiento a un sistema que pueda representar muestras ambientales. Por este motivo se analizaron como material solido suspendido los más representativos en aguas continentales, como lo son la arena, el limo y la arcilla. Se realizó un análisis de los diferentes tamaños de partículas de estos componentes y su relación final sobre el espectro de emisión analizado. También se pudo llegar a hacer estudios sobre el efecto de realizar un filtrado y como este filtrado, que evitaría el problema del Scattering podría resultar en una disminución en la señal de emisión final. Según el tamaño del poro del filtro se encontraba una disminución en la calidad e intensidad de la señal de

²⁷ Tesis de pregrado en ingeniería química “Desarrollo de procedimientos para acondicionamiento de muestras de hidrocarburos en aguas.” realizada por el Ing. Javier Ramírez.

fluorescencia obtenida. De tal manera, se decide a través de los resultados de este proyecto que es necesario hacer un filtrado para material sólido de gran tamaño. Otro de los principales resultados de este trabajo investigativo realizado dentro de la presente investigación tiene que ver con la toma de muestras.

Siendo el prototipo por desarrollar un instrumento portable, se debe hacer un estudio sobre la toma de muestras *in situ*. La discusión en el trabajo de grado tiene que ver con el planteamiento de alternativas de toma de muestras, procurando que no se incurra en el uso de solventes o sustancias adicionales, lo cual sería contraproducente en las ventajas características de la técnica EEMS, que tiene que ver con la escasa adecuación necesaria a la muestra problema. Se realizó un diseño de alternativas y de sistemas de bombeo para asemejar el muestreo a un sistema continuo de medición y monitoreo.

4.2. Perspectivas

4.2.1. Fase III – Miniaturización y automatización del prototipo

- Siendo el alcance del proyecto el análisis de las características más importantes en el desarrollo del prototipo, esta tercera fase del proyecto continuará con la parte del desarrollo de software utilizando un lenguaje de programación de código libre, así como la mejora y reestructuración de las rutinas de mecanización de la rueda de paso bandas. En esta investigación se llegó a concluir que el número de filtros paso bandas necesarias para la generación de la huella incluyen mínimo seis espacios en la rueda, sin contar con los espacios encargados de la medición dark y de la excitación de la fuente (espacio sin filtro paso banda, posiblemente con un filtro *neutral density*) el cual evitará la saturación de la medición adquirida por el espectrómetro.
- Se busca en esta fase también la toma de muestras ambientales no sintéticas, para su estudio y análisis espectral. Para esto, y en base a proyectos de grados dirigidos

en el marco de este proyecto se analizó preliminarmente la relación del material sólido suspendido en las muestras de agua y su relación con el Scattering adquirido por la medición espectrométrica. Para esto se realizaron unos ensayos de filtración y su relación con los cambios en la huella de EEMS.

Anexos

A. Recursos físicos:

El equipamiento necesario con el que se cuenta incluye:

- 1 mini-espectrómetro UV-Visible (AvaSpec-3648, Avantes)
- Lámpara de Xe pulsada (PX2, Ocean Optics)
- LED's UV-Visibles: 365, 375, 380, 384, 468 y 587 nm
- Filtros band pass: 320, 334, 365, 377, 400, 436 y 568 nm
- Montajes cinemáticos (Edmund Optics)
- Ajustadores de montajes cinemáticos (Edmund Optics)
- Fibra óptica de 200 y 400nm (Avantes)
- Ventanas de Sílice (Edmund Optics)
- Lámpara de mercurio (Edmund Optics)
- Lente doble convexos UV-VIS (Edmund Optics)
- Tabla óptica
- Celda de fluorescencia en aluminio
- Celda de fluorescencia de material plástico
- Celda de fluorescencia de cuarzo

- Postes para soportar los lentes, las ventanas, la fibra y la celda
- Rueda de filtros (Oceans Optics)
- Fuente de Luz de Xenón HID - H4
- Balastro para la fuente de Luz de Xenón HID – H4
- Fuente de potencia regulada de 12VDC – 11 Amperios.

Las actividades de investigación se realizarán en el Laboratorio de Metrología – IEI (adscrito al Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica – Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá).

B. Inventario de materiales y equipos

Cantidad	Detalles	Proveedor/ fabricante	Precio unitario	Precio Total
Equipos/materiales antes del proyecto				
1	Mini espectrómetro	Avantes		
2	Holderes	Talleres Unal		
2	Postes (h=10 cm)	Talleres Unal		
2	Fibra óptica (200 y 400 nm)	Avantes		
Equipos/materiales durante el proyecto				
1	Drivers (DLL para Labview y Matlab) para Avantes 3648		522,000.0	522,000.0
3	Fused Silica Windows (EO NT45-311, 25mm diámetro)	Edmund Optics	301,600.0	904,800.0
1	Short Wave UV Quartz Pencil Lamp (EO NT40-759)	Edmund Optics	974,400.0	974,400.0
1	0.3 Optical Density UV-VIS ND Filter (EO NT46-618, 12.5mm)	Edmund Optics	301,600.0	301,600.0
1	0.5 Optical Density UV-VIS ND Filter (EO NT46-618, 12.5mm)	Edmund Optics	301,600.0	301,600.0
3	1 Inch Diameter Kinematic Mount, 3-Screws (EO NT 58-854)	Edmund Optics	406,000.0	1,218,000.0
1	UV QUARTZ PENCIL LAMP POWER SUPPLY, 115V, 60HZ (EO NT70-298)	Edmund Optics	649,600.0	649,600.0
1	PULSED XENON LAMP (Oc. Op 220 HZ, 220-750 NM, 5500 HRS AT 50 HZ)	Ocean Optics	2,900,000.0	2,900,000.0

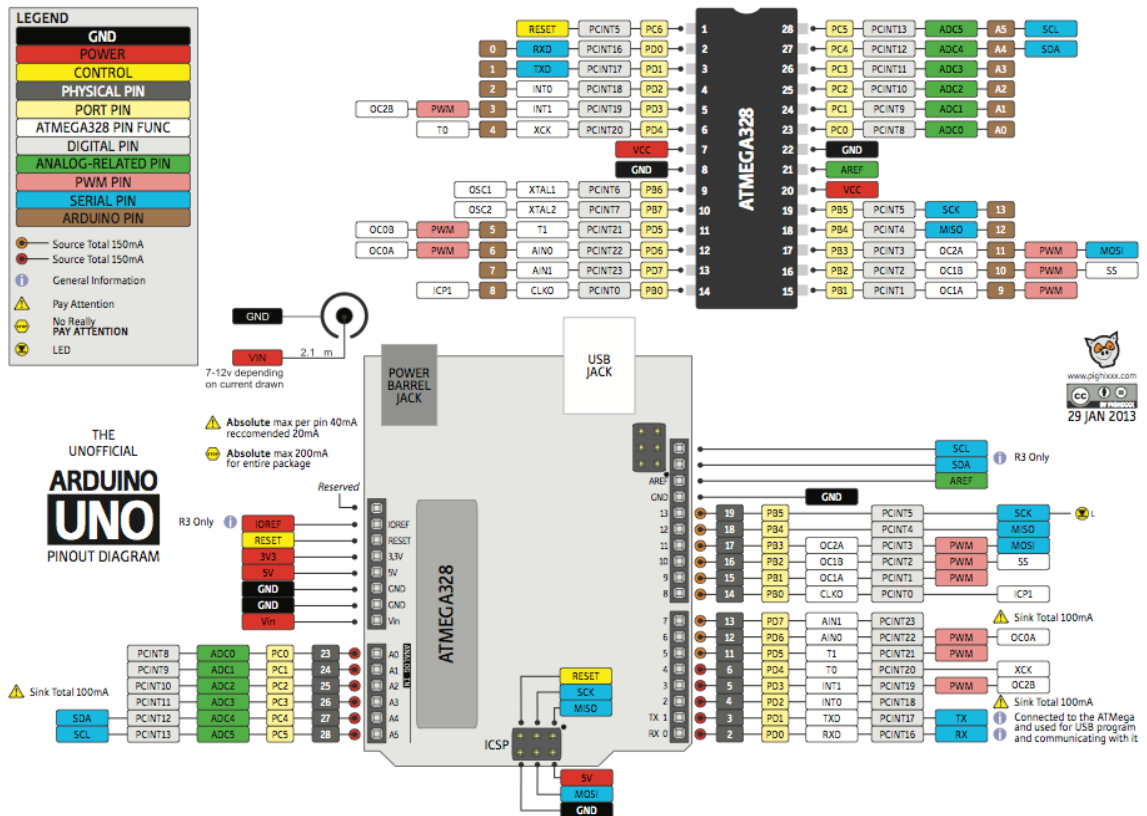
1	334NM CWL, 10NM BANDWIDTH (EO NT62-069, 12.7MM MOUNTED)	Edmund Optics	162,400.0	162,400.0
1	365NM CWL, 10NM BANDWIDTH (EO NT62-072, 12.7MM MOUNTED)	Edmund Optics	162,400.0	162,400.0
1	400NM CWL, 10NM BANDWIDTH (EO NT62-074, 12.7MM MOUNTED)	Edmund Optics	162,400.0	162,400.0
1	436NM CWL, 10NM BANDWIDTH (EO NT62-080, 12.7MM MOUNTED)	Edmund Optics	127,600.0	127,600.0
1	568NM CWL, 10NM BANDWIDTH (EO NT62-102, 12.7MM MOUNTED)	Edmund Optics	127,600.0	127,600.0
1	CELDA DE FLUORESCENCIA CON VENTANAS (MAT. ALUMINIO 1")	Fabrin	255,200.0	255,200.0
1	CELDA DE FLUORESCENCIA CON VENTANAS (MAT. ALUMINIO 3/4")	Fabrin	255,200.0	255,200.0
8	Postes	Fabrin	15,000.0	120,000.0
2	Macho de 26 pines Alta Densidad	Redes y computadores	11,987.4	23,974.9
2	Conector DB 15 Soldar Macho	Redes y computadores	1,392.0	2,784.0
2	Cable 14 Hilos gris	Redes y computadores	3,400.0	6,799.9
2	Carcaza 26 Pines Gris TW	Redes y computadores	1,160.0	2,320.0
2	Carcaza 15 Pines 2H	Redes y computadores	5,220.0	10,440.0
1	Fucsina Básica solución x 120 ml	Roda químicos	2,999.8	2,999.8
1	Anaranjado de metilo x 60 ml	Roda químicos	2,499.8	2,499.8
1	Fluoresceína	Oftalquimicos		16,400.0
	Total	\$COP	7,653,259.0	9,213,018.4

1) Especificaciones: Filtro pasa banda Edmund Optics - 525 nm.

Specifications

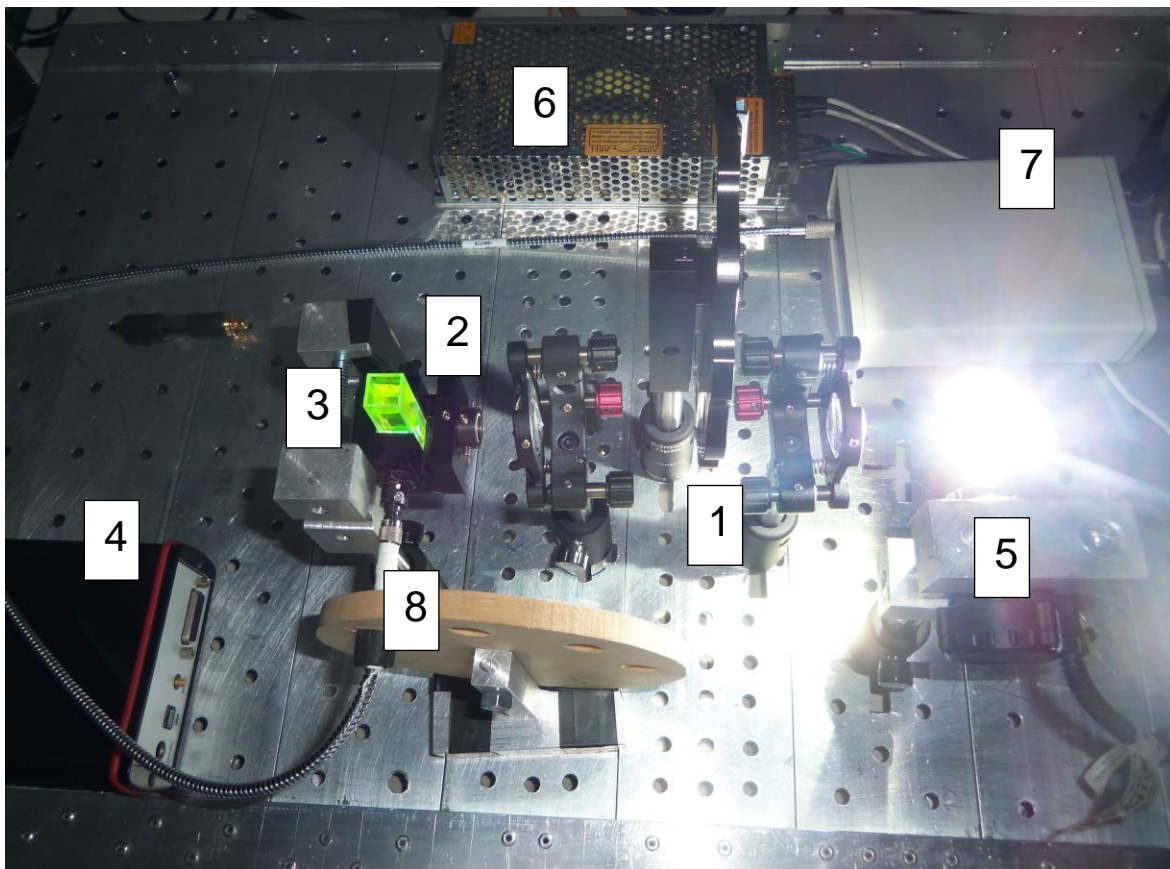
Center Wavelength CWL (nm)	525
Bandwidth (nm)	15
Transmission (%)	>93
Full Width-Half Max FWHM (nm)	18
Optical Density OD	≥6.0
OD 6 Blocking Wavelength Range (nm)	403 - 455
Blocking Wavelength Range (nm)	250 - 1100
Diameter (mm)	12.5
Diameter Tolerance (mm)	+0.00/+0.10
Mount Thickness (mm)	3.5
Thickness (mm)	3.5
Thickness Tolerance (mm)	±0.1
Manufacturer	EO
Clear Aperture CA (mm)	8.8
Transmitted Wavefront, RMS	$\lambda/4$
Surface Quality	60-40
Angle of Incidence (°)	0
Angle of Incidence Tolerance (°)	±5.0
Substrate	UV Grade Fused Silica
Typical Applications	Qdot® 525 Emission
Type	Bandpass Filter
Coating	Hard Coated
RoHS	C

2) Especificaciones: Placa Arduino UNO – Diagrama PinOut



3) Montaje óptico EEMS

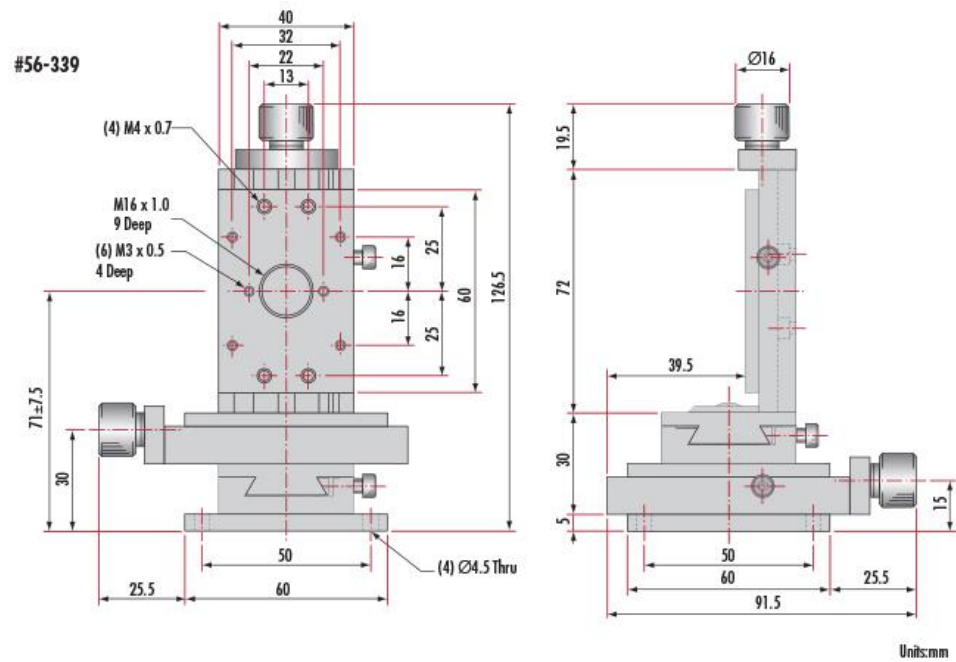
Montaje óptico del instrumento prototipo: (1) rueda de para filtros dicróicos de 12 posiciones (Edmund Optics), (2) porta cubetas (Edmund Optics), (3) celda UV, (4) Mini Espectrómetro Avantes 3648, (5) fuente de luz de Xenón HID H4, (6) fuente regulada 12VDC, (7) fuente pulsada de Xenón Ocean Optics, (8) fibra óptica de 400um Avantes.



C. Especificaciones: montaje caracterización fuente HID H4

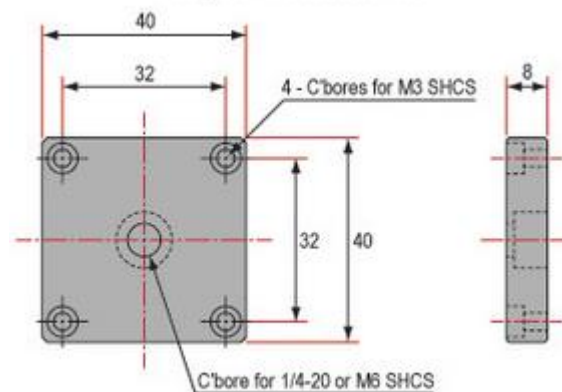
1) Posicionador métrico direcciones XYZ.

- (Fuente: Edmund Optics)



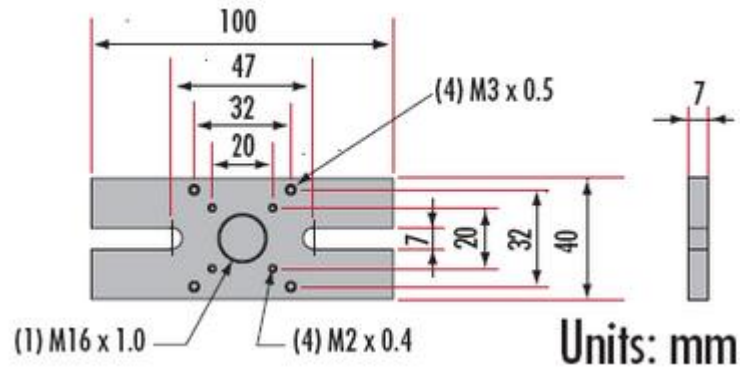
2) Soporte adaptador para el Posicionador métrico XYZ

- (Fuente: Edmund Optics)



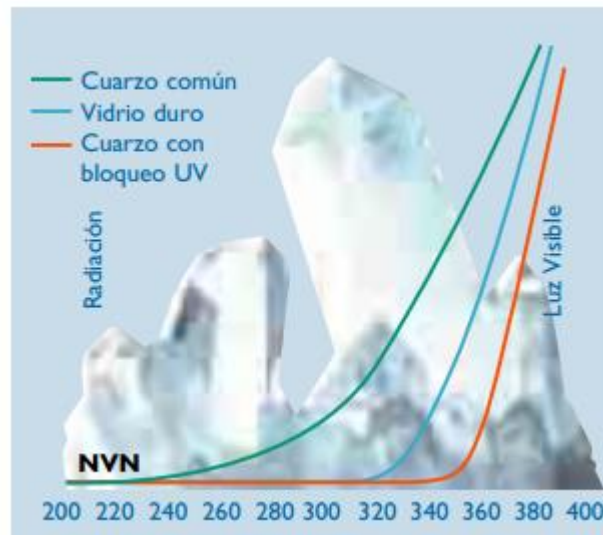
3) Base para Posicionador métrico XYZ – para la vinculación con una mesa óptica. Unidades en milímetros. Tomado: Edmund Optics.

- (Fuente: Edmund Optics)



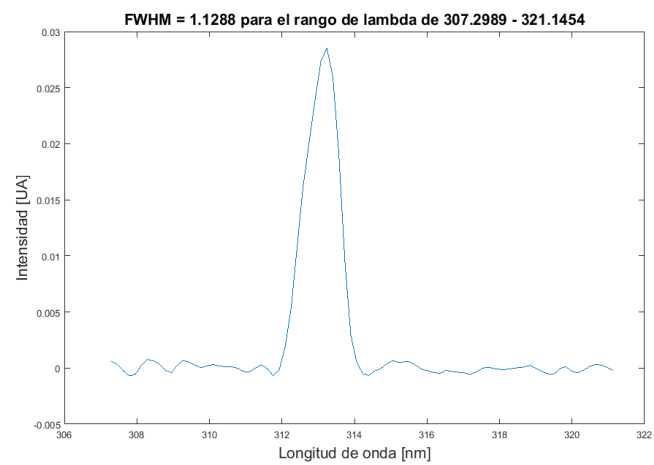
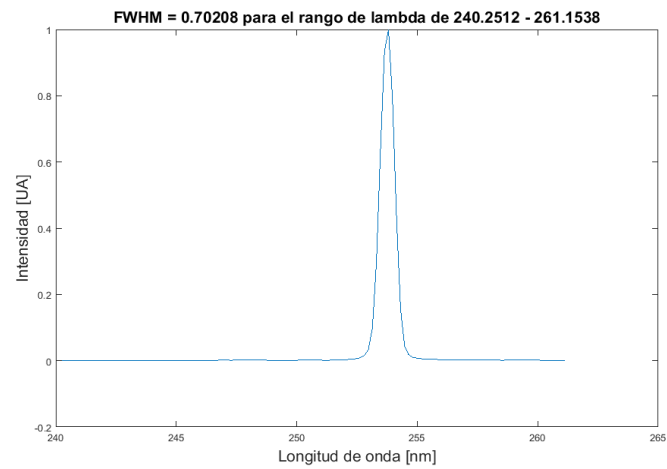
4) Coraza de vidrio protectora en los faros halógenos.

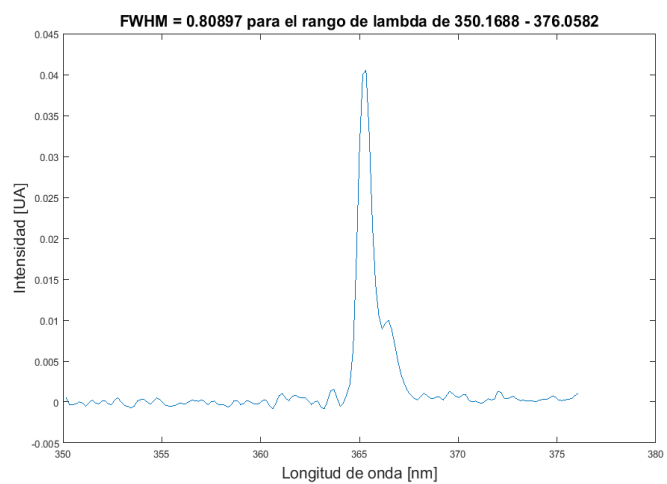
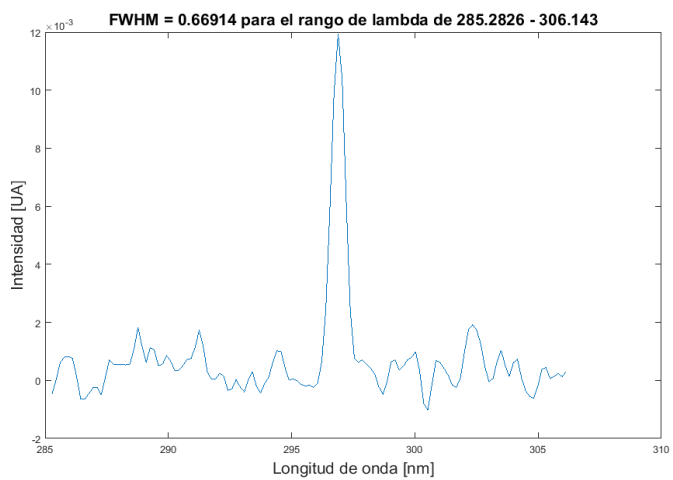
- Bloqueo de rayos UV en los faros halógenos. (Fuente: Catálogo de lámparas para automotores, Philips).

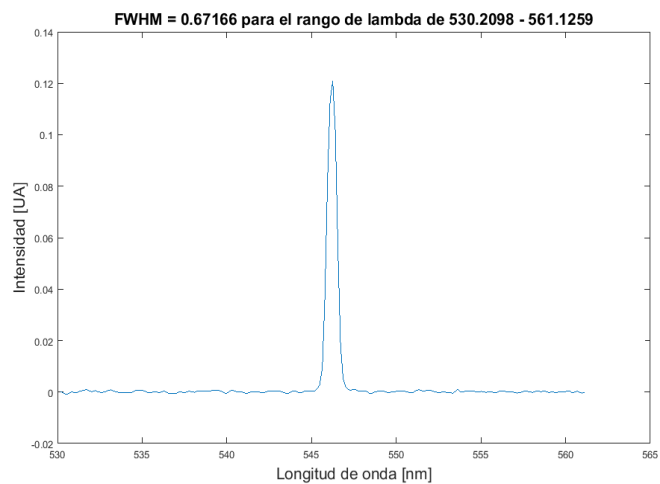
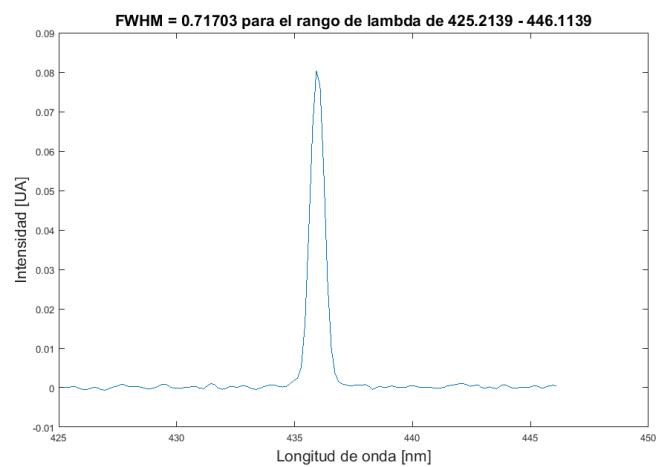
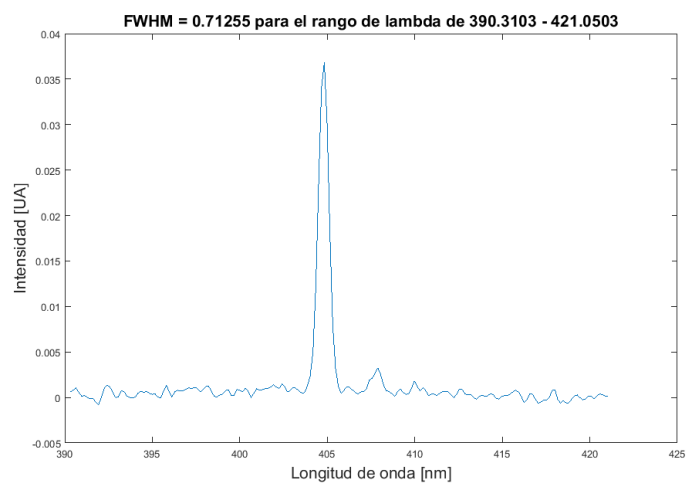


5) Datos del FWHM para la lámpara de mercurio

(Valores reportados en nanómetros).







D. Evaluación de alternativas de fuentes de luz.

- Características generales de la fuente UV LED & Lámpara Hg. (Fuente: Hecht DeepUV LED's, 2014)

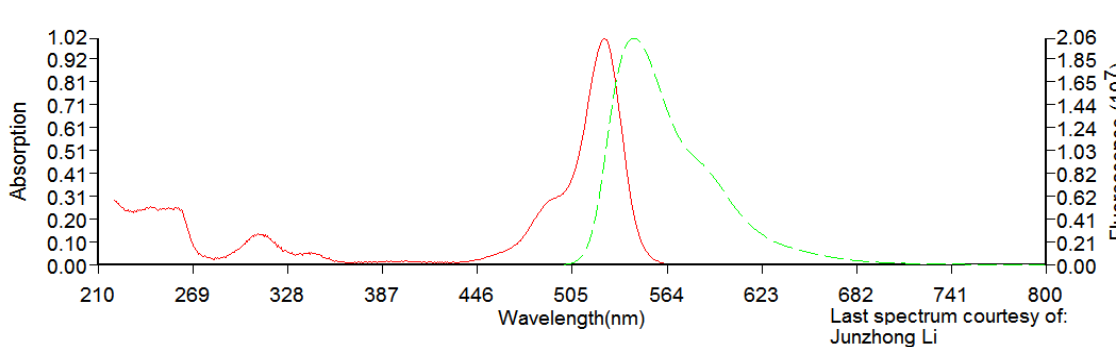
Atributo	UV LED	Lámpara Hg
Tiempo de vida del bulbo	50,000 h	10,000
Tiempo de calentamiento	Instantaneo	2 - 15 min
Ciclos ON/OFF	No se degrada	Degradación
Arquitectura de flujo	Ajustable	Tubo cilíndrico
Circuito de conducción	Simple & compacto	Complejo
Voltaje	6 - 30 VDC	110 - 240 VAC
λ Emisión	Ajustable	Policromático ajustado
Robustez	Resistente a impactos	Tubo de Vidrio
Metales pesados	Ninguno	Hg (20 - 200 mg)

- Lámparas de UV profundo. (Fuente: Hecht DeepUV LED's, 2014)

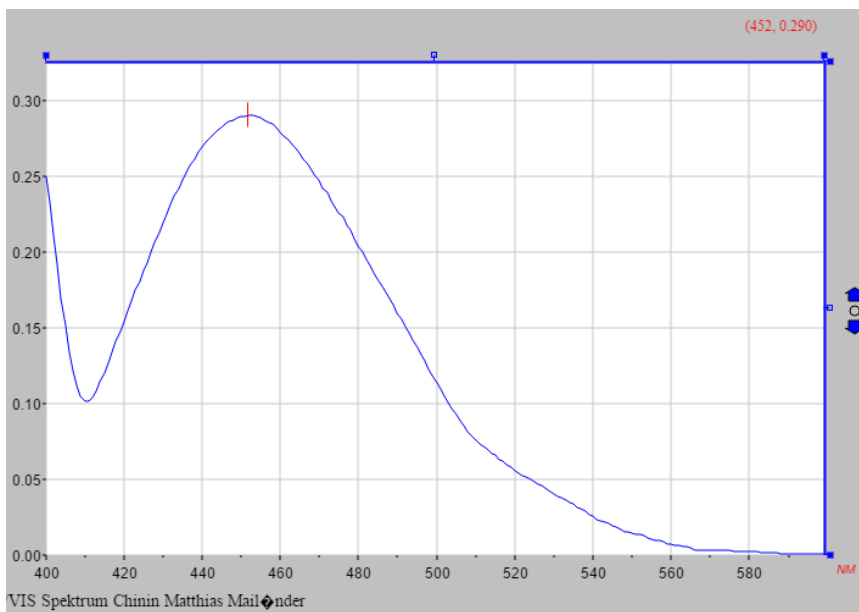
Tipo	Longitud de onda [nm]	Potencia input	Eficiencia	Precio	Vida [h]
Excímeros de Xenón	172	8 - 40 W	~40%	Alto	2500
Mercurio	254	5 - 160 W	~40%	~100USD	10,000
Mercurio	184, 254	5 - 160 W	~40%	~100USD	10,000
Deuterio	190 - 330	30 W		300 - 500 USD	2000
Xenón Flash	300 - 400	Pulsada			
Xenón - Mercurio	184 - 400	50 - 500 W			1000 - 3000

E. Espectros de absorción emisión teóricos

- Eosina Y

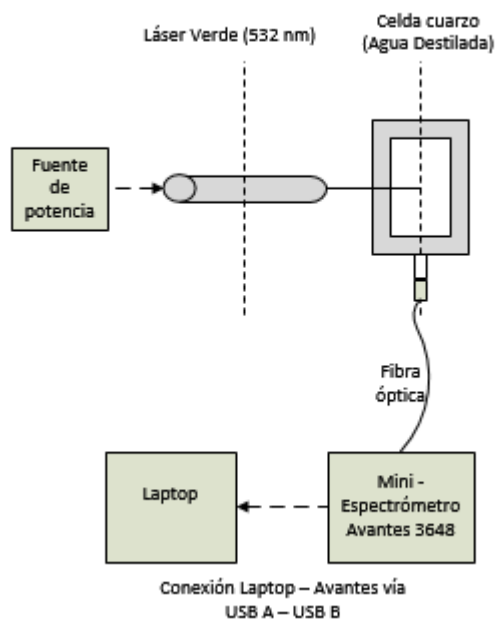


- Espectro de emisión de quinina grado analítico. Excitación a 400nm. Instrumento utilizado para la medición: Fluorímetro Bio – Tek Kontron SF 25M²⁸. (Fuente: Matthias M.).

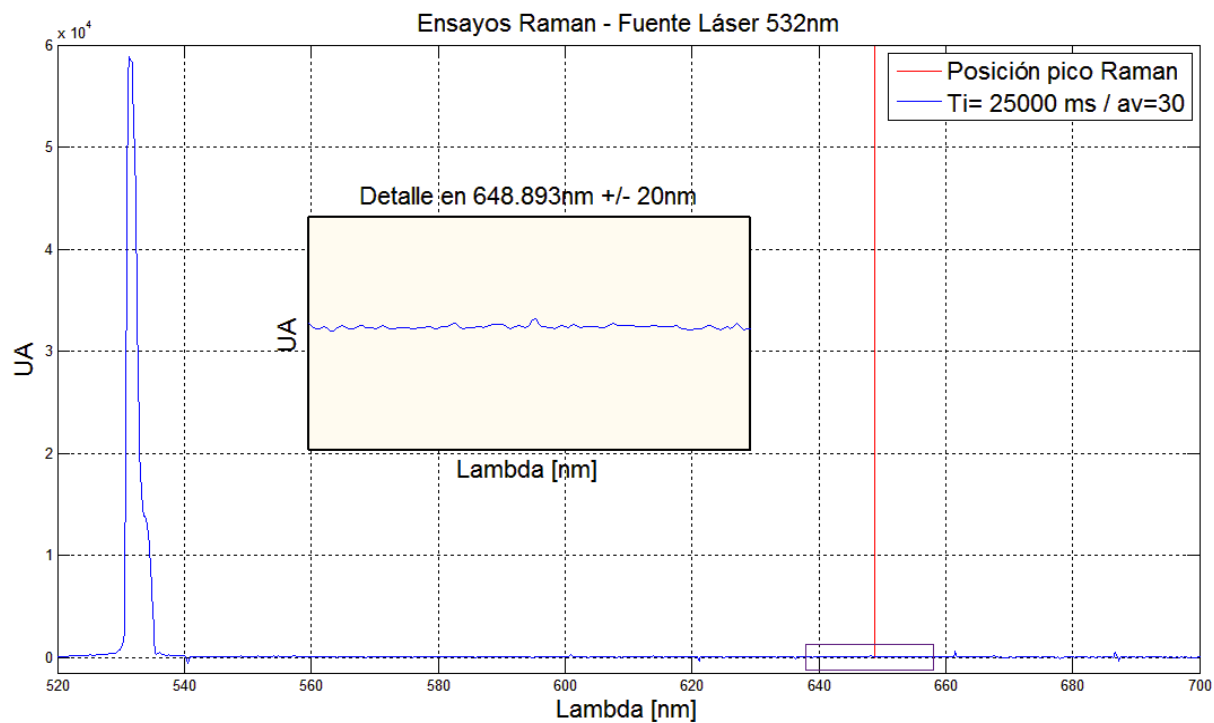


²⁸ Tomado de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.84989.html?rid=70afcf3-4d1f-4d89-988f-e10901d2b36b>.

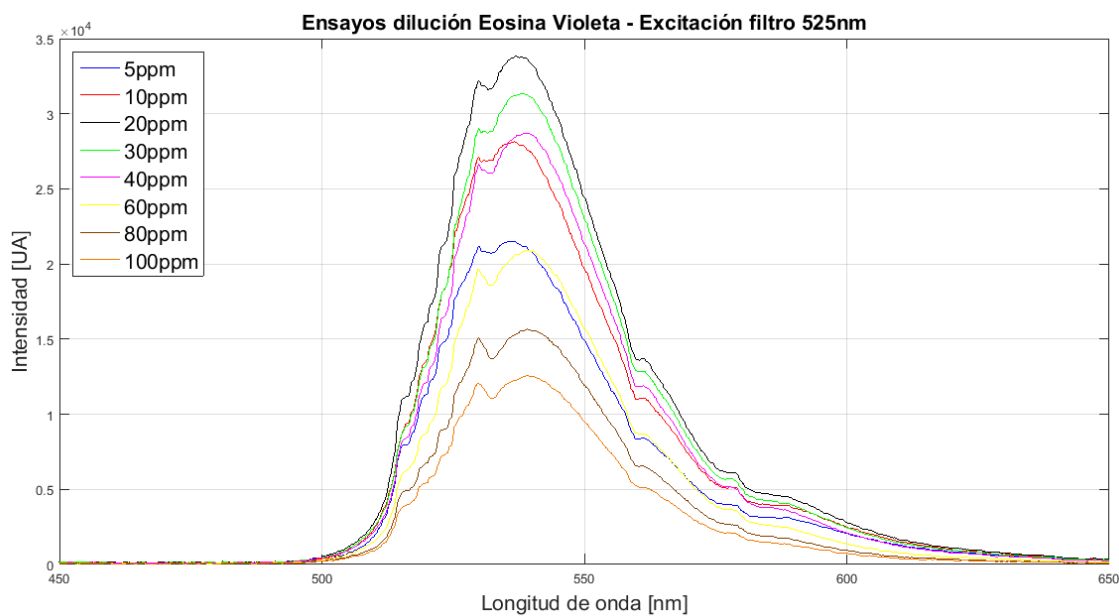
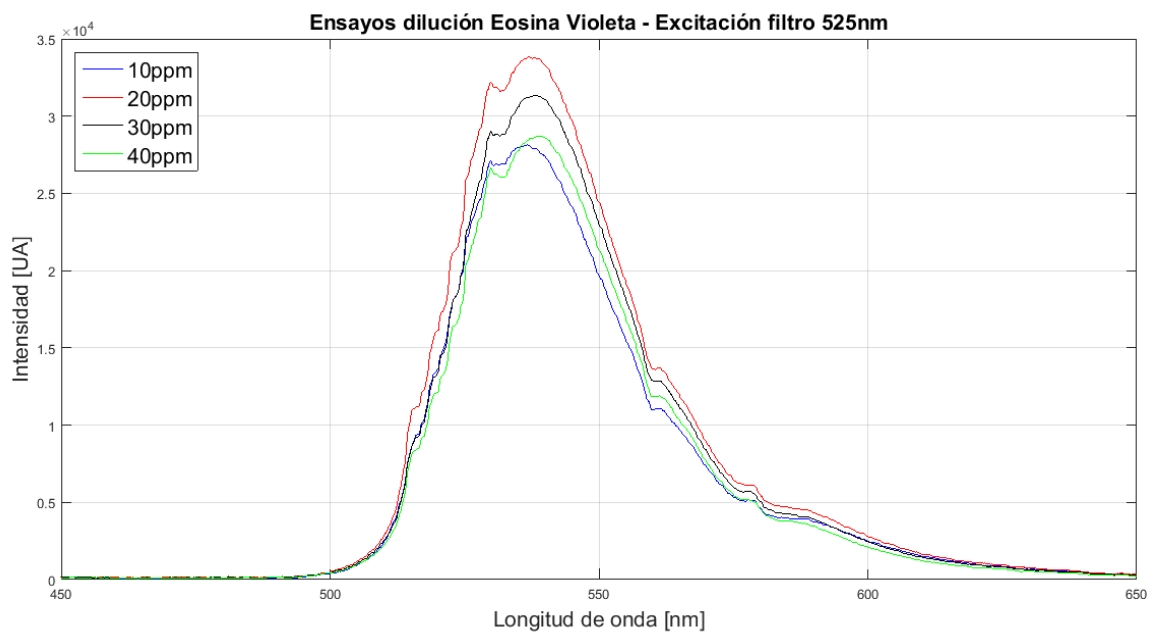
F. Ensayos de límite de detección



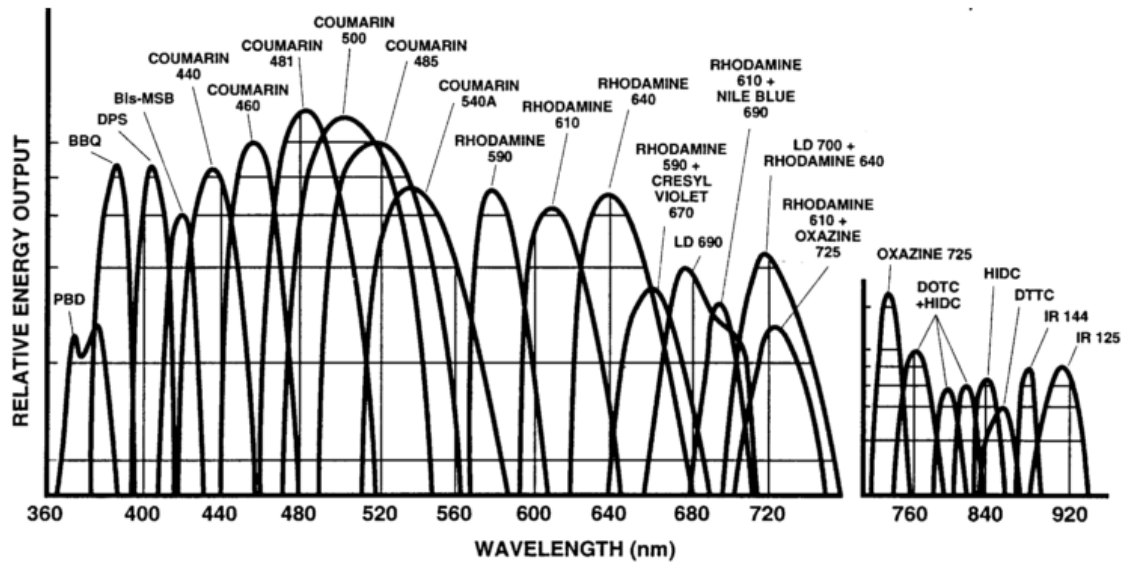
Ensayos Raman – fuente láser 532nm.



G. Ensayos mezclas – Eosina Violeta

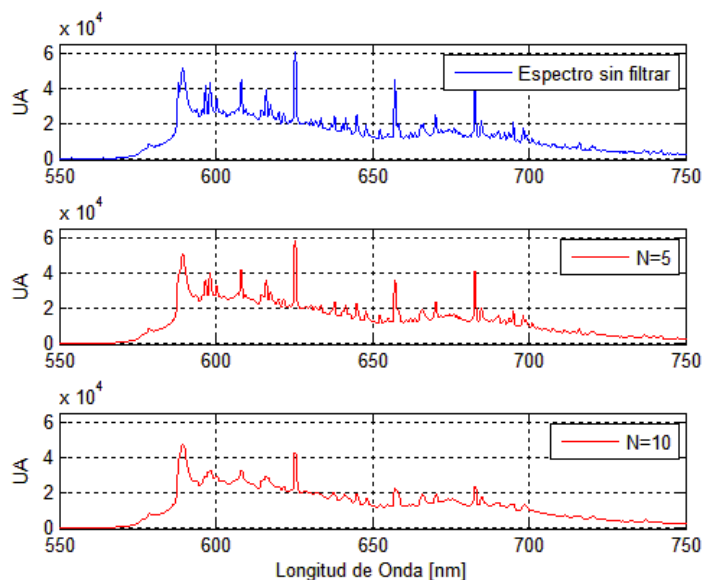


Región espectral de emisión de fluorescencia de diferentes tintes comerciales. (Fuente: Laser Photonics).

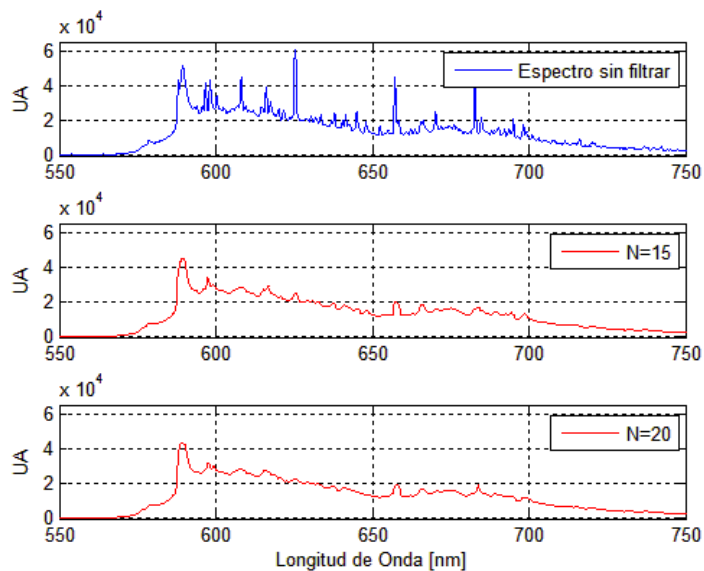


H. Efecto del orden del filtro digital de mediana sobre los espectros adquiridos.

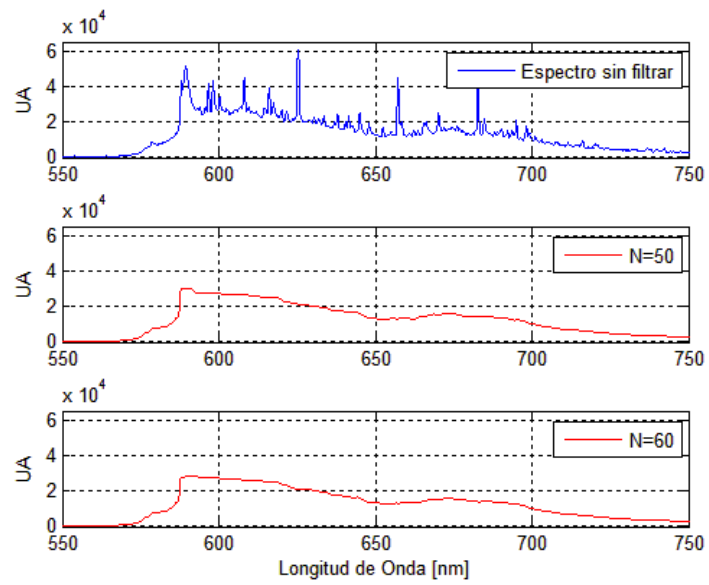
1) Para orden N= 5 & 10



2) Para orden N= 15 & 20



3) Para orden N= 50 & 60



I. Compuestos y analitos:

1) Cotización analito – sulfato de quinina.

Señores
Universidad Nacional de Colombia
Atn. Javier Ramírez
 Facultad de Ingeniería Química
 Email: jlr Ramirez@unal.edu.co
 Cel: 3043286493
 Bogotá D.C.



NIT 900.376.857-3

Julio 08 de 2015

Cotización GQ15-072394

Cotización

Ítem	Referencia	Descripción	Entrega Días*	Cant	Valor Unitario	IVA 16%	Valor Total IVA Incluido
1	0688	Quinine hydrochloride (ALKALOID family) 100 mg Extrasynthese	30 - 45	1	314.000	50.240	364.240
2	0690	Quinine sulfate salt hydrate (ALKALOID family) 100 mg Extrasynthese	30 - 45	1	314.000	50.240	364.240
3	EH-C16707000	Quinine monohydrochloride dihydrate 100 mg Dr. Ehrestofer LGC Certified	30 - 45	1	259.000	41.440	300.440

Bibliografía

- Ahmad, S. R., & Reynolds, D. M. (1999). Monitoring of water quality using fluorescence technique: prospect of on-line process control. *Water Research*, 33(9), 2069–2074. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00435-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00435-7)
- 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(9), 2541. <https://doi.org/10.1063/1.1143916>
- Albani, J. R. (2007). *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. <https://doi.org/10.1002/9780470692059>
- 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. <https://doi.org/10.1139/S08-037>
- Avantes. (2015). AvaSpec-2048 Fiber Optic Spectrometer, 1–2.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.023>
- Bridgeman, J., Baker, A., Carliell-Marquet, C., & Carstea, E. (2013). Determination of changes in wastewater quality through a treatment works using fluorescence spectroscopy. *Environmental Technology*, 34(23). <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.803131>
- 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(4), 677–85. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.12.022>
- Carstea, E. M., Baker, A., Bieroza, M., & Reynolds, D. (2010). Continuous fluorescence excitation-emission matrix monitoring of river organic matter. *Water Research*,

-
- 44(18), 5356–66. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.036>
- 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 & Technology*, 37(24), 5701–5710. <https://doi.org/10.1021/es034354c>
- Crystal IS. (2016). *The Case for UVC LEDs in Spectroscopic Instrumentation : Advantages of Developing Instruments with UVC LEDs.*
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075270>
- Edmund Optics Inc. (2014). *Optical filters* (Vol. 44).
- 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(19), 6555–63. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.057>
- Fabila, D. A., Rosa, J. M. De, Stolik, S., Moreno, E., Domínguez, J., Mercado, S. M., ... Soto, J. L. (2011). Portable System for Measuring Fluorescence Signals of Biological Tissue, 9(7), 1012–1017.
- Glenn Elert. (n.d.). The Nature of Light – The Physics Hypertextbook. Retrieved March 20, 2017, from <http://physics.info/light/>
- Guard, H., & Laughlin, R. (1983). *Characterization of gasolines, diesel fuels & their water soluble fractions.*
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf040169m>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf051237n>
- Guo, H., Wang, T., Simpson, I. ., Blake, D. ., Yu, X. ., Kwok, Y. ., & Li, Y. . (2004). Source contributions to ambient VOCs and CO at a rural site in eastern China. *Atmospheric Environment*, 38(27), 4551–4560. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.05.004>
- Hart, S. J. (2006). Light emitting diode (LED) array for excitation emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy.
- Hart, S. J., & JiJi, R. D. (2002a). Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *The Analyst*, 127(12), 1693–1699. <https://doi.org/10.1039/b207660h>

- Hart, S. J., & JiJi, R. D. (2002b). Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *The Analyst*, 127(12), 1693–1699. <https://doi.org/10.1039/b207660h>
- He, X.-S., Xi, B.-D., Wei, Z.-M., Jiang, Y.-H., Yang, Y., An, D., ... Liu, H.-L. (2011). Fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy with regional integration analysis for characterizing composition and transformation of dissolved organic matter in landfill leachates. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1–3), 293–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.047>
- 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), 863–81. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.027>
- Herman, P., & Vecer, J. (2008). Frequency domain fluorometry with pulsed light-emitting diodes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1130, 56–61. <https://doi.org/10.1196/annals.1430.026>
- 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. <https://doi.org/10.1080/03067310600922154>
- Hudson, N., Baker, A., Ward, D., Reynolds, D. M., Brunsdon, 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.054>
- Jiménez-Pizarro, 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.
- Jiménez-Pizarro, R. (2017). *Excitation-emission matrix spectroscopy (EEMS) (total luminescence spectrometry) fundamentals*.
- Karpicz, R., Dementjev, A., Kuprionis, Z., Pakalnis, S., Westphal, R., Reuter, R., & Gulbinas, V. (2005). Laser fluorosensor for oil spot detection. *Lithuanian Journal of Physics*, 45(3), 213–218. <https://doi.org/10.3952/lithjphys.45309>
- Kim, Platt - 2007 - Advanced Environmental Monitoring.pdf. (n.d.).
- Kongbonga, Y. G. M. (2011). Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. *Food and Nutrition Sciences*, 2(7), 692–699. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.27095>
- Kumar, K., & Mishra, A. K. (2012). Quantification of ethanol in ethanol-petrol and biodiesel in biodiesel-diesel blends using fluorescence spectroscopy and multivariate methods. *Journal of Fluorescence*, 22(1), 339–347. <https://doi.org/10.1007/s10895-011-0964-6>

- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.
- Lapworth, D. J., Gooddy, D. C., Allen, D., & Old, G. 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. <https://doi.org/10.1029/2009JG000921>
- 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(12), 3384–3390. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.07.011>
- Lombana, Ó. (2016). *Desarrollo tecnológico y evaluación de un prototipo para el análisis de la contaminación de aguas mediante fluorescencia de matriz de excitación-emisión*.
- Martínez, M., & Moctezuma, C. (2006). *Espectrofluorometría*.
- Martinsen, W., & Stedmon, C. A. (2006). The fluorescence of dissolved organic matter in aquatic ecosystems A spectral database for comparison with known compounds.
- 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. <https://doi.org/10.1021/ac960252b>
- Namour, P., & Jaffrezic-Renault, N. (2010). Sensors for measuring biodegradable and total organic matter in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(8), 848–857. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.04.013>
- 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. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.700536>
- Obeidat, S., Bai, B., Rayson, G. D., Anderson, D. M., Puscheck, A. D., Landau, S. Y., & Glasser, T. (2008). A Multi-Source Portable Light Emitting Diode Spectrofluorometer, 62(3), 327–332.
- Parker, C. A., & Rees, W. T. (1962). *Fluorescence Spectrometry*.
- Perkin Elmer. (2000). An Introduction to Fluorescence Spectroscopy. Retrieved from <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Fluorescence Spectroscopy.pdf>
- Pharr, D. ., McKenzie, J. K., & Hickman, A. B. (1992). Fingerprint petroleum contamination using synchronus scanning fluorescence spectroscopy. *Ground Water*, 30(4), 484–489.
- Philips. (n.d.). Catálogo de lámparas para automotores.

-
- Ramanujam, N. (2000). Fluorescence Spectroscopy In Vivo. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 20–56). John Wiley & Sons Ltd.
- Reeves, B. G. (2000). Understanding and Monitoring Hydrocarbons in Water, 1–4.
- Reynolds, D. M., & Ahmad, S. R. (1997). Rapid and direct determination of wastewater bod values using a fluorescence technique. *Water Research*, 31(8), 2012–2018.
- Samimi, S. V, Rad, R. A., & Ghanizadeh, F. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination leveles in collected samples from vicinity of a highway. *Journal of Environmental Health*, 6(1), 47–52.
- Sauer, M., & Hofkens, J. (2011). *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging*. Wiley - VCH.
- Stokes, G. G. (1852). On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142(0), 385–396.
<https://doi.org/10.1098/rstl.1853.0016>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). Fluorescence Fundamentals. Retrieved March 20, 2017, from <https://www.thermofisher.com/co/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>
- Turner, G. K. (1964). An absolute Spectrofluorometer. *American Association for the Advancement of Science*, 146(3641), 183–189.
- Universidad de Castilla - La Mancha. (n.d.). Análisis instrumental 1.
- Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Methods* (Vol. 8).
<https://doi.org/10.1002/3527600248>
- Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. (2011). A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. *Journal of Chemical Education*, 88(6), 731–738. <https://doi.org/10.1021/ed100182h>
- Venugopalan, H. (2016). Spectroscopy with UVC LEDs in Environmental Monitoring & Life Sciences.
- Wang, Z., & Fingas, M. (1997). Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 774(1–2), 51–78.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00270-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00270-7)
- White, C. E. (1964). Fluorometric Analysis. *Analytical Chemistry*, 36(5), 116–129.
- Woitke, P., Kreßner, R., & Lepom, P. (2001). Determination of hydrocarbons in water – interlaboratory method validation before routine monitoring. *Accreditation and Quality Assurance*, 6(4–5), 173–177. <https://doi.org/10.1007/PL00013516>
- Wolfbeis, O. S. (1993). *Fluorescence spectroscopy*. (S.- Verlag, Ed.).
- Xiaoli, C., Guixiang, L., Xin, Z., Yongxia, H., & Youcai, Z. (2012). Fluorescence excitation-emission matrix combined with regional integration analysis to characterize the

composition and transformation of humic and fulvic acids from landfill at different stabilization stages. *Waste Management (New York, N. Y.)*, 32(3), 438–47.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.10.011>

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.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.09.028>