

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ARAGÓN

MEDICIÓN DE ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA A TRAVÉS DE UN SISTEMA DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER (LIF)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO MECÁNICO ELECTRICISTA. ÁREA MECÁNICA

PRESENTA:

ARTURO RONQUILLO ARVIZU



ASESOR: M. EN I. FERNANDO MACEDO CHAGOLLA

22 de septiembre de 2006.

México

Agradecimientos

Agradezco a Dios y a mis padres: Martín F. Ronquillo Nava y Evangelina Arvizu Olvera, el haberme orientado por el camino del estudio, por inculcarme el trabajo como principal herramienta en la vida y por alentarme para continuar siempre en mis proyectos.

Gracias a mi esposa Leticia Margarita Calzada García su apoyo incondicional y quien a estado siempre con migo en las buenas y en las malas. Ella es el motor que me impulsa a superarme.

Agradezco, el apoyo de todos mis hermanos; Elizabeth, Martín, Rodrigo, Rey David y Luz Maria, su preocupación por mi, mi familia y mis proyectos.

Gracias al Dr. José Manuel De La Rosa quien admiro por su dedicación y empeño en lograr sus proyectos a sabiendas de que son difíciles y a veces casi imposibles, él por su experiencia y estudio logra ver en los resultados de un análisis lo que los demás no vemos.

Gracias al Dr. Francisco Gallegos Funes por su apoyo y comprensión. Y a todos mis profesores de la maestría. Dr. Walter H. Fonseca, Dr. Roberto Linares, Dr. Argeo Vázquez, Raúl Peña Rivero, M. en C. Héctor Caltenco y Dr. Alexander Michtchenko.

Gracias al M. en I. Fernando Macedo Chagolla por todo su apoyo. Gracias al **Ing. Raúl Tecuapacho** por su apoyo.

Gracias a todos mis compañeros de la maestría en el IPN, Eduardo Cisneros, Jorge Corredor, David Diego, y todos los que me tendieron la mano en mi estancia en IPN.

Gracias a la FES Aragón que me formo como ing. Mecánico.

Gracias al IPN SEPI ESIME que me dio la oportunidad de aumentar mis conocimientos en el área de ingeniería electrónica.

Seria insuficiente una hoja para agradecer todo el apoyo que he recibido, por todos los que me rodean. Estoy conciente de toda ayuda que he recibido por familiares y amigos, y ninguna es mínima, antes bien muy valiosa para mí.

INDICE

CAPITULO 1 Fluorescencia

Pag.

1.1	Espectroscopia de fluorescencia láser	.1
1.2	Estados excitados	.3
1.3	El fenómeno de fotoluminiscencia	.5.
1.4	Procesos de desactivación	.5
1.5	Efecto de la temperatura y naturaleza del solvente en la fluorescencia.	.6
1.6	Principales propiedades de la fluorescencia molecular	.6
1.7	La técnica LIF	6
1.8	LIF Resuelta en tiempo	.7
1.9	Ventajas de la fluorescencia resuelta en tiempo	.7
1.10	La técnica LIF resuelta en tiempo con luz ultravioleta	.7
Refe	rencias del capitulo 1	.8

Capitulo 2 Arreglo experimental

2.1	Fuente de excitación	.10
2.2	Sistema óptico	.11
2.2.1	Divisor de haz	.11
2.2.2	Enfoque de la radiación sobre la muestra	.11
2.2.3	Concentración de la fluorescencia	.12
2.3	Sistema espectrométrico	.14
2.3.1	Fibra óptica	.14
2.3.2	Monocromador	.15
2.3.3	Tubo fotomultiplicador (PMT)	16
2.3.4	Configuración de conexión del tubo fotomultiplicador (PTM)	.17
2.3.4	Fotodiodo para muestreo de la radiación láser	.18
2.3.4.1	Caracterización del circuito detector	19
2.4	Registro de las señales de radiación láser y fluorescencia	.19
2.4.1	Interfase GPIB bajo la norma IEEE 488	.19
2.4.2	Tarjeta GPIB	20
2.5	Envío de señales del osciloscopio a la PC	20
2.6	Control del monocromador	21
2.7	Obtención de espectros de emisión de fluorescencia	21
2.7.1	Interfase de usuario	22
2.7.2	Operación de la interfase de usuario	23
2.7.2.1	Inicialización de comunicación entre el monocromador y la PC	24
2.7.2.2	Posicionamiento del monocromador al inicio del intervalo de barrido	24
2.7.2.3	Ejecución del barrido	24
Refere	ncias del capitulo 2	25

Capitulo 3 Espectros medidos......26

Conclusiones	
Apéndice A-1	
Apéndice A-2	
Apéndice A-3	42

Objetivo general de la tesis

Esta tesis se realizo bajo el objetivo de medir la emisión de fluorescencia inducida por láser de diferentes sustancias, para su caracterización y posterior identificación.

Tesis de Trabajo.

La emisión de fluorescencia es diferente de acuerdo a la sustancia que se trate, de tal manera que estas pueden ser identificadas a partir de su espectro.

JUSTIFICACION DEL TEMA DE TESIS.

El Presente trabajo trata esencialmente, con la medición de florescencia de líquidos inducida por láser, con lo cual es posible la identificación de las substancias que le componen.

Los fluidos pueden caracterizarse por medio de su densidad, viscosidad, temperatura etc. pero además por su constitución. Esto resulta de principal importancia, no solo en la elaboración de productos, sino además en la identificación de elementos no deseados en fluidos como los contaminantes en aguas.

El desarrollo de esta técnica ha sido posible gracias a la aplicación de los conocimientos nuevos que se van desarrollando en diferentes disciplinas como loa electrónica, la óptica, la química, la computación, la estadística, etc. Obteniendo resultados que han beneficiado el avance de la ciencia. Así hoy en día se hable de la interdisciplinariedad y flexibilidad de la ciencia que invita ha aprender e intercambiar conocimientos de diferentes disciplinas para encontrar respuestas a los diferentes y muy complejos problemas que se presentan en el conocimiento de la naturaleza.

CAPITULO 1 Fluorescencia

1.1 Espectroscopia de fluorescencia láser.

La espectroscopia óptica es una extensa rama de las ciencias físicas, que se ocupa del estudio de los espectros. Este estudio es muy amplio y comprende desde los diversos métodos para la obtención de espectros, su medida y aplicaciones, hasta su interpretación teórica mas profunda en relación con la estructura atómica-molecular de la materia.

Desde el punto de vista de la interacción de la radiación electromagnética con la materia, un espectro puede definirse [1] como una representación grafica de la distribución de intensidad de la radiación electromagnética, emitida o absorbida por una muestra de substancia, en función de la longitud de onda (o frecuencia) de dicha radiación.

Un espectro depende en principio de la separación entre los niveles de energía de la substancia.

Ahora bien, un sistema molecular puede tener diferentes niveles de energía, por ejemplo: energía de rotación, asociada al movimiento de giro o rotación de las moléculas; energía de vibración, debida a las oscilaciones periódicas o vibraciones de los átomos alrededor de sus posiciones de equilibrio; energía electrónica, que depende de las posiciones medias de los electrones respecto de los núcleos; energía nuclear, asociada con la disposición de las partículas componentes de los núcleos atómicos; energía de orientación de los espines electrónicos y nucleares respecto a un campo magnético etc.

Afortunadamente, los distintos tipos de energía de los sistemas atómicos o moleculares son de orden de magnitud bastante diferente, por lo que las transiciones entre los correspondientes niveles de energía dan lugar a emisión o absorción de radiación en zonas distintas de frecuencia. Por esto, se puede distinguir distintos tipos de espectros, según los niveles de energía que intervienen y las técnicas experimentales utilizadas para su observación.



Figura 1 emisión y absorción de radiación

Los niveles de energía de los núcleos atómicos son los de mayor energía, por lo que las transiciones entre ellos dan lugar a espectros en la región de mayor frecuencia o de menor longitud de onda. Son los espectros de rayos γ , que proporcionan información sobre la estructura nuclear, y son prácticamente independientes del entorno de los núcleos atómicos.

Los niveles energéticos asociados con los electrones internos de los átomos dan lugar a los espectros de rayos x, en la región de longitudes de onda de 0.05 a unos 10 nm. Estos espectros son característicos de cada átomo y prácticamente no dependen de los enlaces químicos, esto es, de la molécula en que se encuentran los átomos.

Los niveles energéticos de los electrones externos o electrones de valencia de los átomos, iones atómicos, moléculas o iones moleculares dan lugar a espectros en la región visible y ultravioleta (de 10 a unos 800 nm) llamados también espectros electrónicos.

Los espectros de átomos aislados o iones atómicos son de aspecto muy distinto a los espectros moleculares. Los espectros atómicos consisten en líneas de emisión o absorción, muy estrechas, a determinadas frecuencias, por lo que se llaman espectros de líneas, mientras que los espectros electrónicos moleculares, debido a la influencia de los niveles de vibración y de rotación, presentan zonas de emisión o absorción a ciertos intervalos de frecuencia, mas o menos anchos, por lo que reciben el nombre de espectros de bandas.

La energía de vibración de los átomos de una molécula es bastante menor que la energía electrónica, por lo que las transiciones entre los niveles moleculares de vibración dan lugar a los llamados espectros infrarrojos, por aparecer en la región infrarroja (1µm a unas 100µm).

Debido a la influencia de los niveles de rotación, los espectros infrarrojos son también espectros de banda.

Las transiciones entre los niveles de rotación de las moléculas, de energía menor que los de vibración, origina espectros de líneas mas o menos anchas en la región de microondas (de 1000µm a unos 10 cm.) o en el infrarrojo lejano, en el caso de moléculas muy ligeras.

Por ultimo, en la región de ondas de radio y de microondas, pueden aparecer espectros, originados por transiciones entre los niveles de muy baja energía debidos a las orientaciones de los momentos magnéticos de spin nuclear y electrónico, respectivamente en presencia de un intenso campo magnético exterior. Estos espectros reciben el nombre de espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), y de resonancia magnética electrónica, llamados también de "spin" electrónico (RSE).

1.2 Estados excitados

Cuando se forma un enlace entre dos átomos en una molécula, los orbítales atómicos de cada uno de los átomos que forman el enlace generan dos orbítales: uno enlazante de baja energía y otro antienlazante de energía mucho mayor.

Cuando la molécula no está excitada, los electrones que forman un enlace específico se encuentran ocupando los orbitales enlazantes, debido a que estos son de energía menor y por lo tanto de esta manera la molécula es más estable.

Asociados a cada nivel electrónico se encuentran diferentes niveles vibracionales, por lo que cuando una molécula es irradiada con energía de cierta frecuencia o longitud de onda esta puede pasar a diferentes niveles vibracionales de alguno de los estados excitados So y S1.

SPÍN DEL ELECTRON. La mayoría de las moléculas poseen un número par de electrones. Estos dos electrones poseen diferente giro o diferente spin cuando están en el estado basal. En esta situación se dice que los electrones están apareados y el momento magnético producido por el spin es cancelado, siendo la molécula **diamagnética**. Cuando los pares electrónicos se encuentran apareados se le llama estado singulete. So y S1 son el primero y segundo estado excitado de un singulete. Otra posibilidad es que durante el proceso de transferencia del electrón del estado basal al estado excitado cambie su spin y en este caso los dos electrones tienen el mismo giro. Tal estado en espectroscopia se conoce como triplete y en este caso la molécula es **paramagnética** ya que el vector magnético creado por el giro de los dos electrones no se anula sino que se suma y da un valor neto de momento cuántico magnético de spin.

Estos estados se pueden representar como lo muestra la Fig. 1.1



Fig. 1.1 Estados excitados de los electrones

La Figura 1.2a y b es un diagrama parcial de niveles de energía para una hipotética molécula fotoluminiscente. La línea horizontal S_0 representa la energía del estado fundamental de la molécula, el cual normalmente es un estado singulete, en este nivel electrónico al igual que en los otros estados excitados se encuentran asociados varios niveles vibracionales de la molécula. A temperatura ambiente la energía electrónica de prácticamente todas las moléculas es S_0 . Las dos líneas de la izquierda representan S_1 y S_2 corresponden respectivamente primero y segundo estado singulete excitado. El de la derecha T1 corresponde al primer estado triplete excitado. Hay que señalar que el estado triplete es menos energético que el correspondiente estado excitado singulete.



Fig. 1.2a Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente.



Fig. 1.2b Transiciones radiativas entre estados singuletes de una molécula

La fluorescencia surge debido a transiciones radiativas entre estados singuletes de una molécula Como se observa en la Fig. 1.2b , mientras la fosforescencia es causada por transiciones radiativas entre estados triplete y singulete, ver Fig.1.3.

Fotolum	iniscencia
Fluorescencia	Fosforescencia
Estado excitado singulete Tiempo de vida ≈ 10 ns	Estado excitado triplete Tiempo de vida ≈ ms - min

Fig. 1.3 Tiempos de vida de la fluorescencia y fosforescencia

1.3 El fenómeno de fotoluminiscencia.

El fenómeno de fotoluminiscencia ocurre cuando una especie química es excitada por medio de radiación electromagnética y como consecuencia la especie pierde la energía adquirida reemitiendo esta en forma parcial o total. Esto es, parte de la energía adquirida por la especie química se reemite en forma de choques moleculares y parte en forma de energía luminosa o el total de la energía adquirida se reemite en forma de radiación.

La fluorescencia y la fosforescencia son dos manifestaciones diferentes del fenómeno fotoluminiscente. Estos dos efectos difieren entre sí en el mecanismo a través del cual son producidos, además del tiempo de duración de la fotoluminiscencia una vez que ha cesado de excitarse la muestra con radiación electromagnética. La fluorescencia cesa casi inmediatamente después de que a la muestra se le suspende la radiación ($\cong 10^{-9}$ seg.), mientras que la fosforescencia puede durar varios segundos o minutos en iguales circunstancias. La fluorescencia no está restringida a un estado físico determinado de la materia, esta puede existir en: gases, sólidos o líquidos.

1.4 Procesos de desactivación

Una vez que la especie ha sido excitada a niveles energéticos superiores, la desactivación o pérdida de la energía en exceso se puede efectuar a través de diferentes procesos. El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión.

En la mayor parte de las especies químicas, la desactivación por relajaciones no radiactivas (choques moleculares de la especie excitada con el solvente) es la ruta cinéticamente favorecida, ya que el número de especies fluorescentes es muy pequeña en comparación con las especies no fluorescentes. El fenómeno de fluorescencia está restringida a un número relativamente pequeño de sistemas que poseen características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de relajación o desactivación sin radiación se reduzca hasta el punto que la reacción de emisión puede competir cinéticamente .

1.5 Efecto de la temperatura y naturaleza del solvente en la fluorescencia.

El efecto de un aumento en la temperatura incrementa el número de choques moleculares, por lo que la desactivación tiende a efectuarse a través de procesos no radiativos y por lo tanto se inhibe la fluorescencia. La viscosidad del solvente tiene efectos similares, a mayor viscosidad menor número de choques moleculares y mayor intensidad de fluorescencia.

La polaridad del solvente también tiene influencia en la fluorescencia, debido al efecto hipsocrómico y batocrómico que el solvente ejerce sobre el compuesto.

1.6 Principales propiedades de la fluorescencia molecular

Debido al proceso de conversión interna y de acuerdo con la regla de Kasha la posición del espectro de fluorescencia no depende de la longitud de onda de excitación.

El espectro de fluorescencia se desplaza en dirección de longitud de onda mayor con respecto a la banda de absorción $S_0 \rightarrow S_1$ (regla de Stokes) y es aproximadamente la imagen especular de esta banda.

El número de fotones emitidos por unidad de tiempo es proporcional al número de fotones absorbidos por unidad de tiempo y a la eficiencia cuántica q.

$$I_f = I_0 (1 - 10^{-D})q$$

donde I₀ es la intensidad de la luz incidente, D es la absorbancia de la solucion, es decir, el producto del coeficiente de extinción de la molécula ξ , la concentración de la molécula c, y la longitud de la trayectoria optica I(D= ξ cl);q es la eficiencia cuantica de fluorescencia, definida como la razon del numero de cuantos emitidos desde un estado exitado entre el numero de cuántos absorbidos durante la transición al estado exicitado por unidad de tiempo. Si la concentración es baja, entonces:

$$I_1 = 2.303 \xi \text{ cll}_0 \text{q}$$

1.7 La técnica de Fluorescencia inducida por láser (LIF)

En la técnica LIF se analizan los espectros de emisión de fluorescencia que son provocados por una fuente de emisión de luz; un espectro de emisión de fluorescencia es la construcción de una gráfica de la intensidad de la fluorescencia en función de la longitud de onda. Los espectros de emisión varían ampliamente entre los materiales, éstos dependen de la estructura química del material fluorescente (fluoróporo) y del solvente en el cuál están disueltos (en el caso de líquidos).

Los espectros de emisión son líneas o rangos bien definidos que permiten analizar cualitativa (en función de la longitud de onda emitida) y cuantitativamente (según el grado de intensidad) un elemento. En los espectrómetros, la detección se hace por métodos fotoeléctricos como son los tubos fotomultiplicadores que son más precisos y sensibles, aunque más caros que otros fotodetectores.

El tiempo de vida (τ) de un fluoróporo es el tiempo promedio entre su excitación y el regreso a su estado base. Debido a los cortos tiempos de vida de la fluorescencia las mediciones de emisión resueltas en tiempo requieren de elementos ópticos y electrónicos sofisticados.

Los espectros de emisión varían ampliamente entre los materiales, estos dependen de la estructura química del material fluorescente (fluoroporo).

1.8 LIF Resuelta en tiempo

La fluorescencia resuelta en tiempo supera a la fluorescencia estacionaria ya que genera además del espectro de emisión fluorescente de la materia, el tiempo de vida de los estados fluorescentes.

En la fluorescencia resuelta en tiempo se utilizan fuentes de excitación pulsadas, con un ancho de los pulsos del orden de los nanosegundos o picosegundos, idealmente se pretende que la fuente de excitación sea del tipo de un impulso.

La emisión de fluorescencia es un proceso aleatorio y pocas moléculas emitirán sus fotones en un tiempo exactamente igual a τ . El tiempo de vida es un valor promedio; para un decaimiento exponencial el 63% de las moléculas se han relajado antes de t= τ y el 37% restante en t> τ . El tiempo de vida de un fluoróporo en la ausencia de procesos no radiativos es llamado tiempo de vida natural.

1.9 Ventajas de la fluorescencia resuelta en tiempo

Además del uso de la fluorescencia en la bioquímica y la biofísica, existe un gran interés de su uso en la química analítica. El uso de la fluorescencia por medios ópticos en diagnósticos clínicos es parte de un continuo alejamiento del uso de sistemas que utilizan materiales radiactivos, de esta forma se elimina el peligro y el costo de manejo de estos. La fluorescencia es ampliamente utilizada para una gran variedad de propósitos biomédicos. Por ejemplo, se utiliza para detectar fragmentos de DNA. Otra área de investigación activa ocurre en la química clínica, un ejemplo bien conocido es en el análisis de sangre para la detección de niveles de glucosa [3].

1.10 La técnica LIF resuelta en tiempo con luz ultravioleta

Existen diversas aplicaciones en donde la técnica LIF resuelta en tiempo con luz ultravioleta se puede emplear. Tiene una sensibilidad de hasta 1 p.p.m, y es capaz de detectar compuestos polinucleares aromáticos carciogénicos, vitaminas, minerales, pesticidas y colorantes entre muchas otras cosas[5].

Una de las aplicaciones mas importantes es en el análisis de productos alimenticios, farmacéuticos, muestras clínicas y productos naturales[6]. Su uso para especies inorgánicas es a menudo un complemento de la espectrofotometría como método de detección de cationes. En cuanto a sustancias orgánicas su utilidad es impresionante: adenina, aminoácidos, proteínas, guadinina, gases nerviosos, hidrocarburos, esteroides, enzimas son solo algunos ejemplos. Este tipo de métodos son de 10 a 100 veces mas sensibles que los métodos de absorción y tiene una gran selectividad. En bebidas refrescantes permite conocer la concentración de quinina, que en disolución presenta fluorescencia cuando se excita a 350nm.

En la industria láctea [7] se usa junto con la cromatografía para la detección de aflatoxinas y para el recuento de células somáticas con bromuro de etidio que aporta una fluorescencia roja a dichas células. En horticultura[7], la técnica LIF se puede aplicar a las frutas, la calidad de las frutas puede detectarse mediante esta técnica no destructiva.

Referencias.

- [1] J. Morcillo Rubio, J. M. Orza Segade, "Espectroscopia", Alambra, S. A., 1972 (Cap.1).
- [2] SKOOG, D.A.; leavy J.J.; ANÁLISIS INSTRUMENTAL, 4° ed.; Ed. McGraw-Hill (1994) Págs. 201 - 219.
- [3] Joseph R. Lakowicz, "Principles of fluorescence spectroscopy", Plenum Press, 1983.(Cap. 1).
- [4] HECHT, Eugene, "Óptica", Addison Wesley iberoamericana, 3ra edicion, Madrid, P 100-147,(2000).
- [5] StainsFile, "Fluorescein Spectral Characteristics", The Merk Index, 12 edition, USA, 2004
- [6] Product Information Sheet, "FluoSpheres[®] Fluorescent Microspheres for Blood Flow Determination", Molecular Probes, (01-1999)
- [7] ZUDE, Manuela, "Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy -Aplications in Horticulture-", resented in the International Horticultural Congress, Toronto 2002

Capitulo 2 Arreglo experimental.

El arreglo experimental que se ha utilizado para medir las emisiones de fluorescencia de los sustancias bajo estudio se muestra en la figura 2.1.



Figura 2.1 Arreglo experimental.

Para la excitación de las muestras se utilizó un láser de N_2 , el divisor de haz se utilizó para reflejar una parte de esa luz hacia un fotodiodo de referencia que sirve para disparar al osciloscopio. La mayoría de la luz que no se refleja llega a un lente biconvexo que la enfoca hacia la muestra que se este analizando, la fluorescencia emitida por esta se enfoca, utilizando un par de esferas de vidrio, a una fibra óptica que la lleva al monocromador para descomponerla en sus diferentes longitudes de onda y el PMT pueda registrar las intensidades correspondientes a cada longitud de onda en el osciloscopio.

Éste último envía las formas de onda por medio de una interfaz GPIB a una PC que se encarga de registrarlas e ir extrayendo la información para generar el espectro de emisión.

El monocromador también es controlado desde la PC por medio de un puerto serie (RS-232) y el software fue desarrollado en LabView 6 de National Instruments[®].

2.1 Fuente de excitación

La fuente de excitación es un láser de nitrógeno, que emite pulsos de luz con una longitud de onda de 337.1nm (UV) y tienen una duración de 4nS (FWHM).

El diagrama eléctrico del láser de nitrógeno se muestra en la figura 2.2 [8]



Figura 2.2 Diagrama eléctrico del láser de nitrógeno

La energía (E) promedio de los pulsos de emisión es de $1.1\mu J$ y se midió con un medidor de energía Láser precision corp. *"Energy Radiometer" RJ-7610*. De acuerdo a la energía de los pulsos y la duración de estos, la potencia promedio de los pulsos del láser esta dada por:

$$\overline{P} = \overline{E} / FWHM \qquad (Ec. 2.1)$$

Obteniéndose una potencia promedio de los pulsos de luz de 275 W.

La tasa de repetición de pulsos del láser para estas mediciones se estableció en 35 Hz aproximadamente, aunque puede variar dependiendo de su tensión de alimentación.

La forma de los pulsos emitidos por este láser se muestra en la figura 2.3



Figura 2.3 Forma de los pulsos emitidos por el láser

2.2 Sistema óptico

El sistema óptico es el encargado de adecuar la luz del láser para dividirla en:

- El haz que servirá como referencia para disparar al osciloscopio.
- El haz que será concentrado y enfocado en la muestra que se esté estudiando.

También consta de unos lentes que se encargan de concentrar la mayor cantidad de luz emitida por fluorescencia de la muestra y dirigirla a una fibra óptica.

2.2.1 Divisor de haz

Como divisor de haz se utiliza un vidrio portaobjetos, el cual tiene un índice de reflexión (n_t) de 1.5 [9] y un espesor de 1.0mm. El láser incide en él con un ángulo de 45⁰, el arreglo básico se muestra en la figura 2.4



Figura 2.4 Divisor de haz

En el divisor de haz solo entra el 90% de la luz y de este 90% que entró, solo sale el 90%, es decir, saldría el 81% de la luz, por lo cual se podría pensar que se refleja el 19% [10]

2.2.2 Enfoque de la radiación sobre la muestra

En esta etapa del sistema se utiliza un lente biconvexo de un diámetro de 3.5cm. y una longitud focal de 15cm. que se colocó después del divisor de haz con el fin de concentrar la luz trasmitida hacia la muestra.

Una característica del láser de N_2 es su alta divergencia conforme se aleja de su origen, debido a esto es necesario volver a concentrar este haz en un área lo mas pequeña posible para obtener mayores intensidades excitación y por lo tanto mayor emisión de fluorescencia.

Las dimensiones del haz una vez enfocado en la muestra son de 1.7mm x 0.9mm; Logrando con esto un área de 1.53 mm².

En el diagrama de la figura 2.5 se muestran los detalles.



Figura 2.5 Lente biconvexa para enfocar el haz en la muestra

El ángulo de incidencia al lente es 0° por lo que la reflexión es del 4%, al entrar a la lente, para un índice de refracción de 1.5 (Ver apéndice A-1 figura 4.49)

Debido a las reflexiones internas, los porcentajes de luz transmitida y reflejada son los siguientes[10]. Luz reflejada = 7.68% Luz transmitida = 92.3%

Con lo anterior, se puede conocer el porcentaje de luz total con que radiamos la muestra que es 75.5% equivalente a una energía de 0.83 µJ del total del láser.

2.2.3 Concentración de la fluorescencia

Una vez que el haz ha sido dirigido a la muestra, la fluorescencia será emitida hacia todos lados, dependiendo de la naturaleza y las dimensiones de ésta. La porción de luz detectada será determinada por la óptica de colección de la fluorescencia y los fotodetectores utilizados.

El propósito de esta etapa es captar la mayor parte de la fluorescencia provocada por el haz láser y dirigirla a un punto que puede ser directamente un fotodetector o una fibra óptica (como en este caso).

Existen distintos métodos para realizar este proceso dependiendo de la naturaleza del sistema de detección, por ejemplo, si se utiliza un solo detector o un arreglo de estos para cubrir un área mayor.

Para la realización del sistema de colección se utilizó un par de lentes esféricos (Edmund Industrial Optics L32-748) en una configuración para acoplar fibras ópticas. Estos lentes esféricos son unas excelentes herramientas para mejorar el acoplamiento de la señal entre fibras ópticas, emisores y detectores ópticos. El material de que están hechos es BK7 y el índice de refracción es 1.51, en este caso los lentes esféricos tienen un diámetro de 10mm.



Figura 2.6 Lentes esféricos BK7

A continuación se muestran dos configuraciones básicas para concentración de luz:

Configuración 1: Acoplamiento de luz a una fibra óptica

En esta configuración la luz que viene dispersa se enfoca a un punto en el cuál debe estar el inicio de la fibra óptica que llevará la luz. La longitud focal efectiva (EFL) según el fabricante, esta dada por la ecuación mostrada en la figura 2.7



Figura 2.7 Configuración para acoplamiento de luz a una fibra óptica

Configuración 2: Acoplamiento entre dos fibras ópticas

Esta configuración es utilizada para acoplar dos fibras ópticas, se utilizan dos lentes idénticas y se ponen en contacto con ambas fibras según se muestra en la figura 2.8.



Figura 2.8 Configuración para acoplamiento de dos fibras ópticas

Tomando en cuenta que el área de emisión de fluorescencia puede ser muy pequeña dependiendo del tipo de material que se esté estudiando se utiliza la configuración 2.



Figura 2.9 Arreglo de los lentes para enfocar la mayor cantidad de fluorescencia posible en la fibra óptica

En una pequeña base de aluminio están colocados los lentes esféricos en su interior para acoplar la fibra óptica. Esta base se muestra en la figura 2.10 junto con el cilindro que contiene la lente biconvexa y el divisor de haz.

Catálogo de Edmund Industrial Optics, 2001. Pág.39



Figura 2.10 Cilindro donde se encuentran integrados el divisor de haz, la lente biconvexa y las esferas concentradoras de

2.3 Sistema espectrométrico

Esta parte la componen la fibra óptica, el monocromador, el tubo Fotomultiplicador y el fotodiodo de referencia. El trabajo principal del sistema espectrométrico es tomar la muestra de fluorescencia y obtener sus componentes espectrales en función de la longitud de onda. La fibra óptica se encarga de conducir la fluorescencia inducida por el láser hacia el monocromador, mismo que la descompondrá en sus diferentes longitudes de onda, la intensidad de cada longitud de onda será convertida por el PMT a señal eléctrica y observada en un osciloscopio.

2.3.1 Fibra óptica

Las fibras ópticas son filamentos de vidrio (compuestos de cristales naturales) o plástico (cristales artificiales). Llevan mensajes en forma de haces de luz que realmente pasan a través de ellos de un extremo a otro, donde quiera que el filamento vaya (incluyendo curvas y esquinas) sin interrupción.

La misión que tiene la fibra óptica en este sistema es conducir la fluorescencia emitida por la muestra hacia el monocromador.

Las fibras ópticas utilizadas son de cuarzo, diseñadas para aplicaciones con luz UV(de Edmund Industrial Optics L38-956). La fibra L38-956 presenta fluorescencia a 245nm aproximadamente y no afectará en los espectros obtenidos por estar fuera del rango de análisis sin embargo entre 355 nm y 360 nm, 380 nm y 405 nm observamos unos pequeños picos de fluorescencia de esta fibra óptica los cuales se presentan de forma constante en nuestra mediciones y por lo tanto las podemos caracterizar y tomar en cuenta en nuestros análisis, la Fig.11 muestra la grafica de los espectros de fluorescencia de dos mediciones con diferentes aberturas de las rejillas del monocromador a $0.25 \,\mu\text{m}$ (0.25 Reg) y 0.5 μm . (0.5 Reg).

Espectro de fluorescencia de la fibra N. Reg.0.5



Fig.11 grafica de los espectros de fluorescencia de dos mediciones con diferentes aberturas de las rejillas del monocromador a 0.25 µm (0.25 Reg) y 0.5 µm. (0.5 Reg)

Esta fibra optica L38-956 tiene una cubierta de plástico que provee una máxima eficiencia en la transmitancia debido a la razón núcleo-revestimiento que es 10:1. La funda es de PVC y esta terminada con puntas de acero inoxidable (figura 2.12). Su longitud total es de 36" (92.5cm) y tiene un diámetro de 0.250" (6.0mm).



Figura 2.12 Fibra óptica de cuarzo

2.3.2 Monocromador

Un monocromador se caracteriza por presentar en su salida un haz de radiación de gran pureza espectral y permitir variar la longitud de onda de la radiación de forma continua en un amplio intervalo. Los componentes básicos de un monocromador son:

- \checkmark Una rendija de entrada que selecciona un haz de luz entrante.
- \checkmark Un elemento dispersante.
- ✓ Un prisma o red que dispersa la radiación en sus longitudes de onda individuales.
- ✓ Una rendija de salida que aísla la banda espectral deseada.

El diagrama simple del monocromador se muestra en la figura 2.13



Figura 2.13. Principio básico del monocromador

El monocromador utilizado es de la compañía Acton Research[®] modelo Spectra Pro-275 de 0.275m de longitud focal. Tiene 3 rejillas distintas que permiten seleccionar la resolución del barrido y es posible controlarlo remotamente por medio del puerto serie de una PC (RS-232).

La resolución mínima es de 0.1nm y dependiendo de la rejilla seleccionada se pueden obtener rangos de barrido de 100nm a 750nm, 100nm a 1500nm ó 100nm a 2400nm.

Debido a que la fluorescencia inducida por láser se encuentra dentro del espectro visible en su mayoría, se utiliza la rejilla 1, que es capaz de realizar un barrido desde 100nm a 750nm

2.3.3 Tubo fotomultiplicador (PMT)

En la salida del monocromador se pueden tener niveles de luz extremadamente pequeños por lo que se usó un tubo fotomultiplicador modelo R957 de Hammamatsu[®] que proporciona niveles de tensión equivalentes a la cantidad de luz en la salida del monocromador.

Ancho espectral	160 a 900 nm
Tiempo de respuesta	2.2 ns
Sensitividad	7.4x10 ⁵ A/W a 400 nm
Corriente de oscuridad	3 nA
Tensión de alimentación	1000V máx

Algunas características principales del PMT utilizado se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Principales características del PMT R955

Para revisar otras características se muestran las hojas del fabricante en el apéndice A-2

2.3.4 Configuración de conexión del tubo fotomultiplicador (PTM).

Para controlar el alto voltaje (-400 a -900V) del PMT tenemos dos opciones como lo muestra la fig. 2.14, puede ser con una fuente variable de 0 a 4 V o bien con un resistor variable de 0 a 10 K Ω , en base a los valores de uno de estos dos elementos podemos establecer la ganancia del PMT.



Fig. 2.14 configuracion para el control del alto voltaje del PMT

La relación entre los dos diferentes tipos de control del voltaje y el alto voltaje se muestran en la figura 2.15. En esta misma grafica podemos observar la ganancia del PMT.



Fig. 2.15 La relación entre los dos diferentes tipos de control del voltaje y el alto voltaje

2.3.4 Fotodiodo para muestreo de la radiación láser

El fotodiodo para muestreo de la radiación láser es un MRD500 de Motorota[®], es utilizado para disparar al osciloscopio y de esta manera asegurar la captura de la señal del PMT. El uso de este dispositivo es de gran importancia ya que la señal fluorescente obtenida depende de la muestra que se esta analizando y, de acuerdo a la naturaleza de dicha muestra se pueden obtener niveles tan pequeños de señal que no sean capaces de disparar el osciloscopio. El fotodiodo recibe una intensidad de luz láser casi constante proveniente del divisor de haz lo suficientemente grande como para que sea captada por la electrónica de disparo del osciloscopio.

Las características principales del fotodiodo utilizado se muestran en la tabla 2.2.

Acho espectral	300 a 1150 nm
Tiempo de respuesta	1 nS
Sensitividad (S)	$1.2 - 6.6 \mu\text{A/mW/cm}^2 a 800 \text{nm}$
Corriente de oscuridad	14 nA
Área de detección	0.1225 cm^2

 Tabla 2.2 Principales características del fotodetector MRD500

La gráfica mostrada en la figura 2.16 muestra la curva de respuesta espectral relativa del fotodiodo. Esta curva es útil para conocer la respuesta real de éste en función de la longitud de onda de la luz incidente. Para este caso, la longitud de onda de la luz UV del láser de nitrógeno es 337.1nm y su tensión de salida será el 10% de la tensión obtenida si se excitara con luz de una longitud de onda de 800nm (respuesta máxima).



Figura 2.16 Respuesta espectral relativa del fotodetector MRD500

Para revisar otras características de este fotodiodo se muestran las hojas del fabricante en el apéndice A-3

2.3.4.1 Caracterización del circuito detector

En la figura 2.17 se observa el circuito eléctrico utilizado. La salida tiene una impedancia de 50.



Figura 2.17 Circuito eléctrico del detector

2.4 Registro de las señales de radiación láser y fluorescencia

Las señales de la radiación láser y la fluorescencia proporcionadas por los fotodetectores son registradas en un osciloscopio digital Tektronix[®] 2440 con una tasa máxima de digitalización de 500 MS/S lo que proporciona un ancho de banda máximo de 200Mhz.

El osciloscopio utilizado cuenta con una interfase de comunicación GPIB con el estándar IEEE 488 que le permitirá comunicarse con una PC para transferir todas las señales que se requieran en un tiempo considerablemente corto.

2.4.1 Interfase GPIB bajo la norma IEEE 488

Utilizando una interfase estándar, se pueden diseñar instrumentos que tengan un nivel básico de compatibilidad con otros instrumentos que cumplan con la norma.

La norma IEEE 488 define tres aspectos de la interfase de un instrumento:

- Mecánica. El conector y el cable
- Eléctrica. Los niveles eléctricos para las señales lógicas y como las señales con enviadas y recibidas
- Funcional. Las tareas que la interfase de un instrumento puede realizar tales como, enviar datos o recibirlos.

El conector GPIB tiene 24 pines, 16 asignados a señales específicas y 8 para tierras. Los instrumentos pueden conectarse en una configuración lineal, de estrella o una combinación de ambas. La forma lineal es donde el cable GPIB estará conectado de un instrumento al siguiente. En la configuración de estrella, todos los cables de los instrumentos están conectados a un punto en común.

Para mantener las características eléctricas de potencia en el bus, un dispositivo debe estar conectado mediante un cable de 2 metros de longitud como máximo y al menos dos terceras partes de los instrumentos conectados al bus deben estar encendidos.

Las tensiones requeridas en todos los conectores del bus se basan en la tecnología TTL.

Un "1" lógico corresponde a tensiones > 2 volts y < 5.2 volts Un "0" lógico corresponde a tensiones > 0 volts y < 0.8 volts

Cada instrumento conectado al bus tiene una única dirección primaria. Se puede asignar una dirección primaria a cada instrumento en el rango de 0 a 31. Con esto se observa que un solo bus es capaz de controlar hasta 32 instrumentos.

2.4.2 Tarjeta GPIB

Para poder establecer la comunicación entre la PC y el osciloscopio por medio de la interfase GPIB es necesario contar con una tarjeta que nos permita realizar este proceso de control.

Se utilizó una tarjeta GPIB de *National Instruments*[®] AT-GPIB/TNT con el fin de manejar los instrumentos por medio de una PC.

Algunas características de esta tarjeta son las siguientes:

- Transferencia máxima de datos de 1.5 MBytes/s, normalmente 1 MB/s
- Compatible con sistemas Windows 95/98/ME
- Control simultáneo de hasta 32 instrumentos
- Conexión a la PC en las ranuras de expansión ISA

2.5 Envío de señales del osciloscopio a la PC

El osciloscopio es capaz de enviar la señal registrada a una PC en forma de gráfico o como una lista de datos que corresponden a las variaciones de amplitud con el tiempo de la señal.

Para este caso las señales son enviadas a la PC como un arreglo de datos numéricos que tiene una longitud de 1024 elementos. Esta es una gran ventaja porque de esta manera se pueden obtener los niveles de tensión correspondientes a cada instante de tiempo sin necesidad de *adivinarlos* en una gráfica. Otra ventaja es la facilidad con que se pueden realizar operaciones matemáticas entre dos o mas señales.

El tiempo de transferencia de los datos del osciloscopio (de una sola señal) a la PC es de aproximadamente 10ms según lo siguiente:

Tasa de transferencia de datos:1 Mb/seg = 1024 Kb/segTamaño de los datos enviados:10 bytes por punto (1 de inicio, 8 del dato, 1 de cola)Número de puntos enviados:1024 para toda la forma de ondaTotal de información enviada:10240 bytes = 10Kb

Entonces, si en 1 segundo se pueden enviar 1024Kb de información, para enviar 10 Kb de información se requerirán 9.76ms (aproximadamente 10ms)

2.6 Control del monocromador

El monocromador Spectra Pro 275 es controlado por medio de la PC haciendo uso de la interfaz serie RS-232. La PC se encarga únicamente de enviarle los comandos necesarios al monocromador para que el mecanismo interno de éste permita el paso de luz correspondiente a la longitud de onda deseada.

La sintaxis para el envío de este comando es la siguiente:

337.1 GOTO

En este caso, el monocromador responde colocando sus espejos de tal manera que solo pase la luz UV generada por un láser de N_2 (correspondiente a la longitud de onda de 337.1nm)

El proceso general para obtener los espectros de emisión es realizar un barrido en un intervalo de longitudes de onda deseado por lo que únicamente es necesaria esta instrucción de posicionamiento.

2.7 Obtención de espectros de emisión de fluorescencia

El proceso de obtención de espectros de emisión de fluorescencia se realiza de una forma programada de acuerdo al diagrama de flujo presentado en la figura 2.18



Figura 2.18 Diagrama de flujo para la obtención de espectros de emisión de fluorescencia

Algunas de las abreviaciones utilizadas en el diagrama de flujo se definen a continuación.

L_ONDA INICIAL: Es la longitud de onda inicial en donde el monocromador comenzará el barrido para obtener el espectro. Este valor lo define el usuario en el programa.

V/DIV: Coloca las escalas de tensión de los canales del osciloscopio, Este valor también lo define el usuario mediante los controles que aparecen en el programa.

SEC/DIV: Aquí se define la escala de tiempo del osciloscopio. Se define en el programa de usuario

VMAX CH1?, VMAX CH2?: La PC le pide los valores de tensión pico al osciloscopio correspondientes a la señal presente en los canales 1 y 2 respectivamente.

PROMEDIO DE 256 SEÑALES: En el osciloscopio se realiza el promedio de 256 señales consecutivas con el fin de reducir el ruido aleatorio y enviar una sola señal que represente el promedio de éstas. Con esto se reduce también el tiempo de transmisión de información entre el osciloscopio y la PC. Los pulsos de un láser de N₂, por generarse a través de una descarga eléctrica, varían su amplitud dentro de un intervalo por lo que el proceso de promediación es necesario para obtener señales mas estables. Este proceso es el mas largo de todos (4 segundos si el láser opera a una frecuencia de 60Hz aproximadamente).

PEDIR FORMA DE ONDA: Aquí se realiza el proceso de adquisición de los datos numéricos de la forma de onda presente en cada canal.

GRABAR VMAX1, VMAX2, LONDA: Se guardan los valores correspondientes en una hoja de cálculo de Microsoft Excel para su posterior graficación.

L_ACT: Es la longitud de onda en que esta posicionado el osciloscopio.

INC L_ACT: Se incrementa la longitud de onda actual de acuerdo a los pasos incrementales definidos por el usuario en el programa para continuar el barrido.

L_FIN: Longitud de onda final definida también en el programa de usuario.

En el archivo de Excel generado se guarda en la primer columna el valor de la longitud de onda, después el valor de la tensión pico del canal 1 (pulso de referencia), en la tercer columna se guarda el valor de tensión pico en el canal 2 (señal del PMT) y por último el tiempo de defasamiento entre los picos de las señales del canal 1 y 2 que, aunque en este caso no se utiliza, puede servir para obtener distancias entre los objetos que se estén midiendo.

El espectro de emisión se obtiene graficando la intensidad correspondiente (tensión en el PMT) a cada longitud de onda incluida en el intervalo de barrido.

2.7.1 Interfase de usuario

Con el software desarrollado en LabView de National Instruments[®] se pueden seleccionar las condiciones de operación del sistema para la obtención de los espectros de emisión.

En la figura 2.19 se muestra esta interfase editada y posteriormente se da una pequeña descripción de la función de los controles e indicadores marcados por un número.



Figura 2.19 Interfase de usuario programado en LabView 6i

Los nombres de los controles de la figura anterior son los siguientes:

- 1. Barra de selección de escala de tiempo
- 2. Escala de tensión del canal 1
- 3. Escala de tensión del canal 2
- 6. Longitud de onda inicial del barrido
- 7. Incremento o resolución
- 8. Longitud de onda final del barrido
- 9. Puerto serial donde se encuentra conectado el monocromador
- 10. Nombre del archivo en donde se guardarán los datos para graficar el espectro
- 11. Palanca de selección para la función que se desea realizar
- 13. Ejecución del proceso

Y los indicadores son los siguientes:

- 4. Pantalla para desplegado de las señales en el tiempo
- 5. Barra de progreso en el barrido
- 12. Pantalla de espectro

2.7.2 Operación de la interfase de usuario

Se deben seguir tres pasos para poner en marcha el programa de generación de espectros.

2.7.2.1 Inicialización de comunicación entre el monocromador y la PC

Para ejecutar el programa, el monocromador debe inicializarse solamente la primera vez, después de esto, no es necesario repetir el proceso a menos que la PC o el monocromador se apaguen.

Para realizar esta operación, la palanca de selección (11) debe colocarse en la primera posición (Iniciar Monocromador) y presionar la flecha que corra el proceso (13).

Encender el monocromador y esperar unos segundos. El programa responderá presentando una pequeña ventana pidiendo que se verifique la leyenda "COMPUTER CONTROL" en el display del monocromador, si este mensaje aparece, el monocromador ha iniciado su comunicación correctamente con la PC, si no es así, se debe repetir el proceso o verificar la conexión al puerto serie, ver figura 2.20.



Figura 2.20 Mensaje de verificación de inicialización del monocromador

2.7.2.2 Posicionamiento del monocromador al inicio del intervalo de barrido

Una vez iniciada la comunicación entre el monocromador y la PC éste se debe posicionar al inicio del rango en el cual se desea hacer el barrido. Para realizar esto la palanca de selección (11) debe recorrerse hasta la función llamada "Posición Inicial" y presionar la flecha que corra el proceso (13). El monocromador, ya inicializado, deberá responder recorriéndose a la posición que el usuario haya definido en el control 6 de la figura 2.19.

2.7.2.3 Ejecución del barrido

Antes de ejecutar el barrido se debe escribir el nombre de un archivo, en formato Excel[®], en donde se guardarán los puntos del espectro obtenido.

Ahora solo resta cambiar la palanca de función a la segunda posición (Barrido) y presionar la flecha de ejecución del proceso (13). A continuación comenzará el proceso de barrido mostrándose en la barra de progreso (5) el avance parcial de éste.

Conforme avanza el proceso, en la pantalla de espectro (12) se irá mostrando parcialmente el espectro obtenido.

El proceso puede interrumpirse en cualquier momento, si así se desea presionando el botón de stop situado a un costado de la flecha de ejecución de 💿 proceso, ver figura 2.19.

- [8] J. de la Rosa, R. Valencia, A. Vázquez, "Studies of the Electrical Behavior of a Blumlein Type Nitrogen Laser" in *Instrument & Development* from Journal of the Mexican Society of Instrumentation Vol.3, nr.8. P 39-44 (1997)
- [9] HECHT, Eugene, "Óptica", Addison Wesley Iberoamericana, 3ra. Edición, Madrid, P100-147, (2000)
- [10] Francisco Javier Bautista Díaz "Sistema para Medición de Fluorescencia Inducida por Láser (LIF) Resuelta en Tiempo"

Capitulo 3 Espectros medidos

En base a el arreglo experimental del capitulo anterior, se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de algunas sustancias, todas estas mediciones se han realizado en el intervalo de 330 nm a 700 nm, debido a que se exita con 337.1 nm (UV) y se espera la emisión de fluorescencia a longitudes de onda mayores (menor energía).

La fig. 3.1 muestra los espectros de fluorescencia de las fibras ópticas utilizadas, se observa tres picos cuya magnitud depende de los parámetros del sistema, como pueden ser la ganancia del fotomultiplicador, la abertura de las rejillas del monocromador, así como la intensidad del láser, este ultimo parámetro se mantiene casi constante como se observa en la misma grafica. Estos espectros se obtuvieron con las mismas condiciones que con cualquier muestra, En este caso la luz del láser (337.1nm) excita directamente la fibra óptica.



E spectros de emisión de fluorescencia de las fibras opticas

Fig. 3.1 Espectros de fluorescencia de las fibras ópticas utilizadas

Los picos de fluorescencia debidos a la fibra óptica se visualizan en casi todas las mediciones y pueden variar en magnitud debido a que dependiendo de la muestra que se este analizando esta permitirá pasar mas o menos UV ala fibra óptica y de esta manera excitarla con diferente intensidad.

Con las muestras muy densas no se observan estos picos de fluorescencia, ya que la muestra no permite el paso de UV a la fibra óptica.

Todas las mediciones en muestras liquidas se realizaron en tubos de ensayo, mismos que se analizaron en el sistema, para observar su comportamiento al ser expuestos a la luz del láser, en dichas mediciones no se aprecio ningún valor de fluorescencia dentro del rango de trabajo (330 nm – 700 nm). La figura 3.2 muestra una grafica del análisis de los tubos de ensayo utilizados, en los cuales solo se observa el láser (337.1 nm) y su armónico, también se aprecian los tres picos de fluorescencia de la fibra óptica.



Figura 3.2 Gráfica del análisis de los tubos de ensayo utilizados.

El análisis de diferentes muestras de agua, (potable y de garrafón) muestra que esta no fluoresce, tal como lo muestra la figura 3.3.



Fig. 3.3 Gráfica del análisis de emisión de fluorescencia del agua limpia.

Del análisis anterior concluimos que podemos utilizar el agua para disolver cualquier muestra sin que nos interfiera en la medición.

Se tomo como objeto de estudio los jugos de algunos cítricos como los que se muestran en la figura 3.4, en donde se muestran los espectros del limón y mandarina, por separado, así como la mezcla en igual proporción de ambos jugos.



Figura 3.4 Espectros de emisión de fluorescencia de los jugos de limón, mandarina y de la mezcla.

En un intento por interpretar el comportamiento de los espectros se han sumado uno a uno los datos de los espectros de el limón y mandarina, es decir los valores del limón y mandarina correspondientes a una misma longitud de onda, obteniendo como resultado al graficar estos valores contra su respectiva longitud de onda el espectro mas grande que se encuentra en la figura 3.5. El espectro de color amarillo se obtuvo dividiendo cada valor de los espectros de la mandarina y el limón entre dos y después sumándolos uno a uno, se observa que el espectro obtenido matemáticamente no coinciden con el espectro medido, por lo que los espectros de las mezclas de dos o mas componentes no se puede obtener sumando o restando los espectros de los componentes de la mezcla.



Figura 3.5 Espectros de emisión de fluorescencia de los jugos de limón, mandarina y de la mezcla, así como los espectros de la suma del limón y mandarina y la suma del limón y mandarina divididos entre dos previamente.

Otro objeto de estudio a sido el tequila, en la figura 3.6 se muestran los espectros de fluorescencia de diferentes marcas de tequila, los cuales nos pueden ayudar a reconocer un tequila desconocido o identificar si un tequila determinado realmente es el que se indica



Figura 3.6 Espectros de fluorescencia de varios tequilas.

Observamos en la figura 3.6 que los espectros de los tequilas oro azul y gimador son muy parecidos, y mas aun lo son los espectros de los tequilas sublime, corralejo triple destilado y cuatro vientos, observamos también que los espectros de los tequilas corralejo reposado, casco viejo y tequila santa fe tienen también un parecido. Seria un poco difícil tratar de reconocer estos espectros a simple vista. Por lo que se precisa para un trabajo a futuro hacer un análisis de datos multivariantes con el fin de clasificar y reconocer estos espectros.

Líneas celulares de cáncer cervical, proporcionadas por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB IPN), también han sido un objeto de estudio mas. Las líneas celulares analizadas son las C33 H, CaLo H, HeLa H y SiHa H, de las cuales se han obtenido los espectro de fluorescencia mostrados en la figura 3.7, con el fin de caracterizarlas y poder determinar el tipo de células cancerigenas en una muestra dada.



Fig. 3.7 Espectros de emisión de fluorescencia de las cuatro líneas celulares y SiHa H,

C33 H, CaLo H, HeLa H

y 5111a 11

La figura 3.8 es el resultado de haber realizado varias pruebas para cada línea celular y promediarlas de forma individual esto con el fin de obtener espectros más precisos.



Fig. 3.8 Promedio de varias pruebas de cada línea celular.

Al trabajar con algunos hidrocarburos, se han obtenido los espectros de las gasolinas Magna, Premium, Gasolina Blanca y petróleo de tlapalería. Cabe mencionar que del petróleo crudo (MAYA) no se pudo obtener el espectro de emisión de fluorescencia, quizás por su alta densidad y viscosidad, así como por su color negro. las figuras 3.9 y 3.10 muestran los espectros de las gasolinas Premium y magna respectivamente.



Fig. 3.9 Espectro de emisión de fluorescencia de la gasolina Premium.



Fig. 3.10 Espectro de emisión de fluorescencia de la gasolina Magna.

Al comprar los espectros de las gasolinas Magna y Premium observamos que los espectros de emisión de fluorescencia son muy parecidos como se muestra en la figura 3.11.



Fig. 3.11 Espectros de emisión de fluorescencia de las gasolinas Magna y Premium

Obtuvimos el espectro de la mezcla de las gasolinas Magna y Premium con el fin de observar el espectro de la mezcla y compararlo con los componentes de la mezcla.



Fig. 3.12 Espectro de emisión de fluorescencia de la mezcla de las gasolinas Magna y Premium

Hemos observado que algunas sustancias transparentes, tales como el alcohol metilico, el etílico y el agua no fluorescen, en la gasolina blanca a pesar de su transparencia fluoresce como se observa en la Fig.3.13



Fig. 3.13 Espectro de emisión de fluorescencia de la gasolina Blanca.

La fluorescencia del petróleo comercial (de venta en tlapalerías) se muestra en la Fig. 3.14



Fig. 3.14 Espectro de emisión de fluorescencia del petróleo de tlapalería.

La mezcla de las gasolinas Magna, Premium, blanca y petróleo de tlapalería produce el espectro de fluorescencia que se muestra en la figura 3.15.



Fig. 3.15 Espectro de emisión de fluorescencia de la mezcla de las gasolinas magna, Premium, Blanca así como del petróleo de tlapalería.

Al comparar el espectro de la mezcla de las gasolinas Magna y Premium contra los espectros de las mismas gasolinas, se observa que el espectro de la mezcla esta por encima de los espectros de las gasolinas aisladas como se observa en la figura 3.16.



Fig. 3.16 Espectro de emisión de fluorescencia de la mezcla de las gasolinas magna y Premium, así como los espectros de las gasolinas Magna y Premium en forma individual.

Finalmente al comparar la grafica de la figura 3.15, con los espectros de cada uno de los componentes de la mezcla, figura 3.17, se observa que el comportamiento del espectro de la mezcla no esta por encima de todos los componentes como se esperaba.



Fig. 3.17 comparación del espectro de la mezcla contra los espectros de los componentes de dicha mezcla.

Conclusiones

Al finalizar las mediciones podemos llegar a las siguientes conclusiones.

El espectro de emisión de fluorescencia de una mezcla no tiene un comportamiento sencillo, que se pueda explicar en función de los espectros de los componentes, es decir se esperaría que al mezclar dos o mas componentes el espectro de dicha mezcla sea mucho mayor que los espectros de los componentes, lo cual no sucede así y se precisa de análisis de datos multivariantes para determinar el comportamiento de estos espectros.

Al haber trabajado con diferentes sustancias hemos encontrado que la mayoría de las sustancias incoloras, como el caso del agua, alcohol etílico, tequila blanco, etc. No fluorescen.

En sustancias muy densas como en el caso del petróleo crudo (crudo maya) no se puede medir la fluorescencia.

Apéndice A-1



Gráficas de reflectancia y transmitancia en un cristal

En la figura 4.47 Se muestran las gráficas de reflectancia y transmitancia en función del ángulo con que incide el haz.

FIGURA 4.48 Reflexión casi normal en una pila de portaobjetos de microscopio. Puede verse la imagen de la cámara con la que se

tomó la fotografía. (Foto de E.H.)

10

 $(n_i = 1, 0)$ en una interfaz única.

Índice de refracción (n,)

FIGURA 4.49 Reflectancia con incidencia normal en el aire

Apéndice A-2 Hojas de datos del fotodetector MRD500

Photo Detectors biode Output	lemodulation, tion encoders, ultra high-spe (MRD510) fo d Mounting ectral Range fr ability	detection of v switching and ed, and stable r Design Flexi or Wide Appli	isible I logic I bility cation	PH 2	ARDS ARDS DIODE OUT PIN SILIC 550 MILLIW 100 VOL	CTORS TPUT ON IATTS TS
Additional Structure for Stability and Relia	lemodulation, tion encoders, ultra high-spe (MRD510) fo d Mounting ectral Range fr ability	detection of v switching and ed, and stable r Design Flexi or Wide Appli	isible I logic I bility cation		IOTO DETE DIODE OUT PIN SILIC 250 MILLIW 100 VOL	CTORS TPUT ON ATTS TS
A designed for application in laser detection, light of nd near infrared light-emitting diodes, shaft or posi rcuits, or any design requiring radiation sensitivity, haracteristics. Ultra Fast Response — (<1 ns Typ) High Sensitivity — MRD500 (1.2 μA/mW/cm ² Min) MRD510 (0.3 μA/mW/cm ² Min) Available With Convex Lens (MRD500) or Flat Glas Popular TO-18 Type Package for Easy Handling an Sensitive Throughout Visible and Near Infrared Sp Annular Passivated Structure for Stability and Reli	lemodulation, tion encoders, ultra high-spe (MRD510) fo d Mounting tectral Range fr ability	detection of v switching and ed, and stable r Design Flexi or Wide Appli	isible d logic n bility cation	2 2	IOTO DETE DIODE OUT PIN SILIC 250 MILLIW 100 VOL	CTORS TPUT ON (ATTS TS
MRD510 (0.3 µA/mW/cm ² Min) MRD510 (0.3 µA/mW/cm ² Min) Available With Convex Lens (MRD500) or Flat Glas Popular TO-18 Type Package for Easy Handling an Sensitive Throughout Visible and Near Infrared Sr Annular Passivated Structure for Stability and Reli	is (MRD510) fo d Mounting jectral Range fi ability	r Design Flexi or Wide Appli	bility cation		1	9
AXIMUM RATINGS (T _A = 25°C unless otherwise noted					CASE 209 MRD50 (CONVEX L	-01 0 ENS)
Detler)	I		1.20	S	17
Rating	Symbol	Value	Unit	-	18	3
Reverse Voltage Total Power Dissipation @ T _A = 25°C	PD	100 250 2.27	mW mW/°C		/	
Operating Temperature Banga	TA	-55 to +125	°C		CASE 210 MRD51	0
Storage Temperature Bange	Tsta	- 65 to + 150	°C	-	(FLAT GLA	ASS)
TATIC ELECTRICAL CHARACTERISTICS (TA = 25°C L	nless otherwise	noted)	1			
Characteristic	Fig. No.	Symbol	Min	Түр	Max	Unit
Dark Current (V _R = 20 V, R _L = 1 megohm) Note 2 $T_A = 25^{\circ}C$ $T_A = 100^{\circ}C$	2 and 3	ID	-	 14	2	nA
Reverse Breakdown Voltage (In = 10 #A)	_	V(BB)B	100 .	200		Volt
Forward Voltage (IF = 50 mA)	-	VF	-	-	1.1	Volt
Series Resistance (IF = 50 mA)	-	Rs	-	-	10	Ohm
Total Capacitance (VR = 20 V, f = 1 MHz)	5	CT	-	-	4	pF
PTICAL CHARACTERISTICS (TA = 25°C unless otherw	ise noted)	10 85	1	200		
Light Current MRD500 (V _R = 20 V) Note 1 MRD510	1	ΙL	6 1.5	• 9 2.1	=	μΑ
Sensitivity at 0.8 μm MRD500 (V _R = 20 V) Note 3 MRD510	-	$S_{(\lambda = 0.8 \ \mu m)}$	=	6.6 1.5	=	μA/m cm ²
Response Time (VR = 20 V, RL = 50 Ohms)	-	t(resp)	-	1	-	ns
Wavelength of Peak Spectral Response	5	λς	-	0.8	-	μm
Reverse Breakdown Voltage (I _R = 10 μ A) Forward Voltage (I _F = 50 mA) Series Resistance (I _F = 50 mA) Total Capacitance (V _R = 20 V, f = 1 MHz) DPTICAL CHARACTERISTICS (T _A = 25°C unless otherwidted to the term of the term of the term of the term of ter		$V(BR)R$ VF R_{S} CT IL $S(\lambda = 0.8 \ \mu m)$ $t(resp)$ λ_{S} urce at a color ter	100 	200 		





Apéndie	ce A-3
Hojas de datos del foto	omultiplicador R955
HAMAMATSU	PHOTOMULTIPLIER TUBES R928, R955
Extended Red, High Sensitivi 28mm (1-1/8 Inch) Diam	ity, Multialkali Photocathode eter, 9-Stage, Side-On
FEATURES	
 Wide Spectral Response R928	
The R928 and R955 feature extremely high quantum efficiency, high current amplification, good S/N ratio and wide spectral re- sponse fromUV to near infrared. The R928 employs a UV glass envelope and the R955 has a fused silica envelope for UV sen- sitivity extension. The R928 and R955 are well suited for use in broad-band spec- trophotometers, atomic absorption spectrophotometers, emis- sion spectrophotometers and other precision photometric in-	

GENERAL

struments.

Parameter	Description/Value	Unit
Spectral Response	2)	S
R928	185 to 900	nm
R965	160 to 900	nm
Wavelength of Maximum Response	400	nm
Photocathode	00.14.12.00.2.04	2000
Material	Muttalkali	<u></u> _
Minimum Effective Area	8 24	mm
Window Material	32963-57	
R928	UV glass	20 04
R965	Fused slica	
Dynode	1. it	ia in
Secondary Emitting Surface	Multialkali	2
Structure	Circular-cage	-
Number of Stages	9	-
Direct Interelectrode Capacitances	22	39
Anode to Last Dynode	Approx. 4	DF
Anode to All Other Electrodes	Approx. 6	pF
Base	11-pin base JEDEC No. B11-88	3776
Weight	Approx. 45	g
Sultable Socket	E678-11A (option)	2 2 2
Suitable Socket Assembly	E717-21 (option)	in e n?

Figure 1: Typical Spectral Response



Subject to local technical requirements and requilations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office. Information turnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or ommissions. Specifications are subject to change without notice. No patent right are granted to any of the circuits described herein. (2) 1997 Hamamatsu Photonics K.K.

PHOTOMULTIPLIER TUBES R928, R955

MAXIMUM RATINGS (Absolute Maximum Values)

Parameter	Value	Unit
Supply Voltage		
Behween Anode and Cathode	1250	Vdc
Behween Anode and Last Dynode	250	Vdc
Average Anode Current	0.1	mA
Ambient Temperature	-80 to +50	t

CHARACTERISTICS (at 25°C)

Parameter	Min.	R928 Typ.	Max.	Min.	R955 Typ.	Max.	Unit
Calhode Sensthilty Quantum Efficiency at Peak Wavelength	1000	25.4 (at 260nm)	30=	1000	29.0 (at 220nm)	. –	%
Luminous ^a	140	250	37 <u>-</u>	140	250	_33	A A/Im
Radiant at 194nm	0.000	18	3 <u>—</u>	<u></u>	43	_33	mA/W
254nm		52		1.000 A	56		mA/W
400nm	-	74	_	-	74		mAAW
633nm		41	<u> </u>		41	-31	mAAW
862nm		3.5	<u></u>		3.5	_235	mA/W
Red/White Ratio ©	0.2	0.3		02	0.3		
Blue ^o		8	<u>8</u> —		8	3	β .A/Im-b
Anode Sensitivity	050			1104		23	
Luminous =	400	2500	8. 	400	2500	-320	A/Im
Radiant at 194nm		1.8 105	_		4.3 105		AAV
254nm		5.2×105	<u> </u>		5.6×10 ^s	-3.2	AAV
400nm	0.000	7.4 ×10 ^s	3. C	0350	7.4 × 10 ⁴	- 102	AAV
633nm		4.1 × 10 ⁵	_		4.1 × 10 ⁵	-33	AAV
852nm	-	3.5 \$ 104	8 —	-	3.5 \$ 104	-89	A/W
Gain≖	1	1.0 🗙 107	8 . [1	1.0 ¥107	-89	
Anode Dark Current * After 30 minute Storage in the darkness	-	3	50	-	3	50	nA
ENI(Equivalent Noise Input) H	5.000	1.3 🗙 10-18		3753	1.3 🗙 10-18	- -	W
Time Response *		2525	8		7.4%	23	20572
Anode Pulse Rise Time 1	0.000	22	0.0	0350	22	- 102	ns
Electron Transit Time 4	-	22	_	-	22	-23	ns
Transit Time Spread (TTS) K	-	12	- s	_	12	-89	ns
Anode Current Stability -		64.000			21.329		1000
Current Hysteresis	10000	0.1		1.000	0.1		%
Voltage Hysteresis	-	1.0	_	-	1.0		%

NOTES

- A: Averaged over any interval of 30 seconds maximum.
- B: The light source is a tungsten filament lamp operated at a distribution temperature of 2856K. Supply voltage is 100 volts between the cathode and all other electrodes connected together as anode.
- C:Red/White ratio is the quotient of the cathode current measured using a red filter(Toshiba R-68) interposed between the light source and the tube by the cathode current measured with the filter removed under the same conditions as Note B.
- D: The value is cathode output current when a blue filter(Corning CS-5-58 polished to 1/2 stock thickness) is interposed between the light source and the tube under the same condition as Note B.
- E: Measured with the same light source as Note B and with the voltage distri-bution ratio shown in Table 1 below.

Table 1: Voltage Distribution Ratio

Distribution		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
rwansz.	-	_	-	 	10	-	- 12	_	_		

F: Measured with the same supply voltage and voltage distribution ratio as Note E after removal of light.

- G Measured at a supply voltage adjusted to provide an anode sensitivity of 100 A/Im.
- H:ENI is an indication of the photon-limited signal-to-noise ratio. It refers to the amount of light in watts to produce a signal-to-noise ratio of unity in the output of a photomultiplier tube.

S

- where q = Electronic charge (1.60 ×10⁻¹⁰ coulomb). Idb = Anode dark current(after 30 minute storage) in amperes. G = Gain.

 - Af = Bandwidth of the system in hertz. 1 hertz is used.
- S = Anode radiant sensitivity in amperes per watt at the wave-length of peak response. 1: The rise time is the time for the output pulse to rise from 10% to 90% of the
- peak amplitude when the entire photocathode is illuminated by a delta function light pulse.



