



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Calibración y Verificación de Equipos Analíticos

Autor: Jesús Charro Calvo

Tutor/es: Antonio González Casado (Universidad de Granada)

Enrique Barrado Esteban

RESUMEN

El trabajo ha consistido en la calibración y verificación de dos espectrofluorímetros, uno de reciente adquisición, el modelo Hitachi F-2700 y otro que ya había, el model Shimadzu RF-1501. Para ello primero se ha estudiado la fluorescencia y la espectroscopía de fluorescencia, se ha investigado acerca de los experimentos realizados para esta calibración y verificación, se ha comprobado cuáles se podían hacer y cuáles no y se ha procedido a la realización de dichos experimentos, comparando ambos espectrofluorímetros y en algún experimento comparando los resultados con los teóricos encontrados.

ABSTRACT

The work consisted in the calibration and verification of two spectrofluorimeters, one of recent acquisition, the Hitachi F-2700 model and another one that already had, the Shimadzu RF-1501 model. For this, fluorescence and fluorescence spectroscopy were first studied, the experiments carried out for this calibration and verification were investigated, it was verified which ones could be done and which ones were not and the experiments were carried out, comparing both spectrofluorimeters and in some experiment comparing the results with the theoretical ones found.

ÍNDICE

OBJETIVOS.....	5
INTRODUCCIÓN.....	5
FACTORES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA.....	10
INSTRUMENTOS DE MEDIDA.....	13
APLICACIONES.....	16
GESTIÓN DE CALIDAD DE EQUIPOS ANALÍTICOS.....	18
CALIBRACIÓN METROLÓGICA Y ANALÍTICA.....	19
RECALIBRACIÓN.....	20
MANTENIMIENTO, VERIFICACIÓN Y AJUSTE.....	20
MANTENIMIENTO.....	20
VERIFICACIÓN.....	21
AJUSTE.....	21
APROXIMACIÓN DE LA CONFIRMACIÓN METROLÓGICA.....	21
CALIBRACIÓN.....	22
MANTENIMIENTO.....	22
VERIFICACIÓN.....	23
AJUSTE.....	23
APROXIMACIÓN DE LA CALIFICACIÓN DE EQUIPO.....	23
APROXIMACIÓN DE LA CONFIRMACIÓN METROLÓGICA VS APROXIMACIÓN DE LA CALIFICACIÓN DE EQUIPO.....	24
DEFINICIONES.....	25
GESTIÓN DE UN ESPECTROFLUORÍMETRO ANALÍTICO EN LABORATORIOS.....	28
REQUISITOS DE OPERACIÓN.....	28

CONDICIONES AMBIENTALES.....	28
PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN Y GASES.....	28
SISTEMAS EXTRACTORES.....	28
LOCALIZACIÓN DEL EQUIPO.....	29
ALMACENAMIENTO DE LOS GASES.....	29
PERSONAL.....	29
PRECAUCIONES DE SEGURIDAD.....	29
MÓDULO DE LA LÁMPARA.....	29
PELIGROS ELÉCTRICOS.....	30
OTRAS PRECAUCIONES.....	30
GESTIÓN DEL ESPECTROFLUORÍMETRO.....	30
OPERACIONES PRELIMINARES.....	31
OPERACIONES DE GESTIÓN.....	31
CONTROL DE CUBETAS.....	31
MEDIDA DE LA SENSIBILIDAD DEL EQUIPO: TEST RAMAN..	32
FUENTE DE EXCITACIÓN.....	33
MONOCROMADORES.....	33
ESTANDARIZACIÓN DE LA INTENSIDAD.....	34
CORRECCIÓN DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN.....	35
REGISTRO DE DATOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
EQUIPOS.....	37
MATERIALES DE REFERENCIA.....	39
ANTRACENO.....	40

NAFTALENO.....	42
RODAMINA B.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
TEST RAMAN DEL AGUA.....	46
CONTROL DE CUBETAS.....	57
LINEALIDAD.....	60
SULFATO DE QUININA.....	60
FLUORESCEÍNA SÓDICA.....	63
KIT DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE FLUORESCENCIA ESPECTRAL.....	67
ANÁLISIS EXPERIMENTAL.....	68
SOLUTOS Y REACTIVOS.....	68
EQUIPO.....	69
PROCEDIMIENTO.....	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
EFECTOS DEL INSTRUMENTO EN LAS SEÑALES DE FLUORESCENCIA.....	70
DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA ESPECTRAL $s(\lambda_{em})$	71
PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO.....	73
PROPIEDADES DEL KIT.....	75
EVALUACIÓN DEL KIT EN COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS.....	77
DISCUSIÓN.....	78
CONCLUSIÓN.....	79
ANEXOS.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81

OBJETIVOS

- ❖ Calibrar y verificar los espectrofluorímetros.
- ❖ Estudiar la espectroscopía de fluorescencia.
- ❖ Gestionar equipos de medida.
- ❖ Comprobar los resultados de los experimentos a realizar.

INTRODUCCIÓN

La luminiscencia es una propiedad de algunos materiales y seres vivos que se caracteriza por la emisión durante un tiempo determinado de radiación visible cuando están sometidos a determinada temperatura. Puede ser por la acción de agentes externos como campos eléctricos, reacciones químicas, radiación o ciertos rayos. Se excluye la radiación originada exclusivamente por el calor. Esta luz es visible únicamente en la oscuridad.

Cuando un sólido recibe energía procedente de una radiación incidente, ésta es absorbida por su estructura electrónica y posteriormente es emitida de nuevo cuando los electrones vuelven a su estado fundamental.

La luminiscencia se fundamenta en la excitación de los electrones de una sustancia al absorber fotones y la emisión posterior de esa energía en forma de radiación. Cuando los fotones de la radiación emitida son de la misma longitud de onda y misma energía que la absorbida, se conoce como fluorescencia de resonancia. Lo más normal es que la radiación emitida sea de longitud de onda más larga y de menor energía que la absorbida, este desplazamiento hacia longitudes de onda más largas se denomina desplazamiento de Stokes. El espectro de excitación es la relación entre la longitud de onda de excitación y la amplitud de emisión, dado que una sustancia no se excita por cualquier longitud de onda.

Hay escasos elementos puros y muy pocos compuestos sencillos que sean luminiscentes. A pesar de ello, es frecuente en especies de gran importancia biológica y farmacéutica o de interés orgánico, presentando muchas ventajas analíticas en lo que se refiere a sensibilidad, a niveles de trazas y selectividad. La mayoría de las sustancias con luminiscencia fuerte son blancas o ligeramente coloreadas.

La luminiscencia en dichas sustancias se incrementa fuertemente cuando se enfría hasta la temperatura de aire líquido, el calentamiento a un cierto límite superior destruye la fluorescencia en casi todos los casos, esta temperatura normalmente se encuentra entre 100°C y 400°C.

Para la explicación de los diferentes fenómenos luminiscentes a nivel atómico-molecular se utiliza el diagrama de Jablonsky, especialmente para la explicación de la fluorescencia y fosforescencia. Fig. 1.

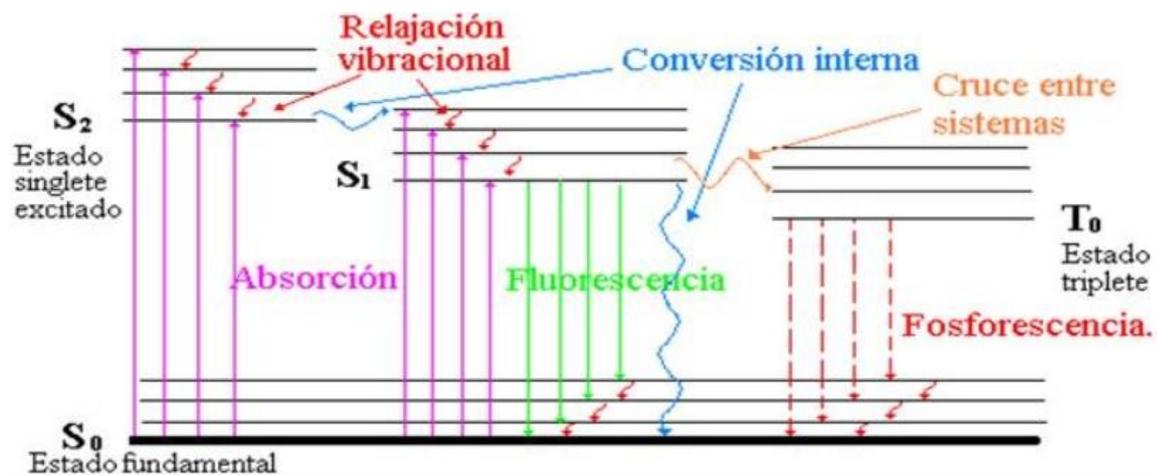


Fig. 1. Diagrama de Jablonsky

Para que suceda el fenómeno de la luminiscencia la especie tiene que absorber la radiación de la longitud de onda adecuada. Algunos electrones pasan de estados vibracionales y estados electrónicos fundamentales (S_0) a los estados excitados. Estos estados pueden ser S_1 , S_2 , ... dependiendo de la cantidad de energía absorbida. El tiempo para que los electrones pasen de un estado a otro es del orden de 10^{-15} segundos.

En la transición del estado fundamental al estado excitado, el spin del electrón no cambia, sigue apareado con el electrón no excitado, que se conoce como singlete-singlete. Se puede observar en la Fig. 2.

El tiempo de vida del electrón en el estado excitado es de $10^{-7} - 10^{-8}$ segundos y luego la molécula pierde ese exceso de energía, pudiendo o no emitir radiación.

Si esta desactivación sucede sin emisión de energía (procesos no radiantes), la pérdida de energía electrónica ocurre mediante choques o interacciones en los que la energía sucede en forma de calor.

Pueden pasar dos cosas: una desactivación por conversión interna donde la molécula pasa de un estado excitado a otro, siendo este último de menos energía; o por conversión externa donde la molécula cede su energía al disolvente o a otros solutos, estos procesos no están bien documentados, pero suelen ser muy eficaces porque son relativamente pocos los compuestos que presentan algún tipo de luminiscencia.

Otro hecho que puede ocurrir y que también se ve en la Fig. 2, es el solapamiento entre dos niveles de energía relativamente próximos. Se conoce como cruce-intersistemas y no hay emisión de radiación. Implica un cambio en el spin electrónico y en la multiplicidad de la molécula, ocurriendo una transición singlete – triplete.

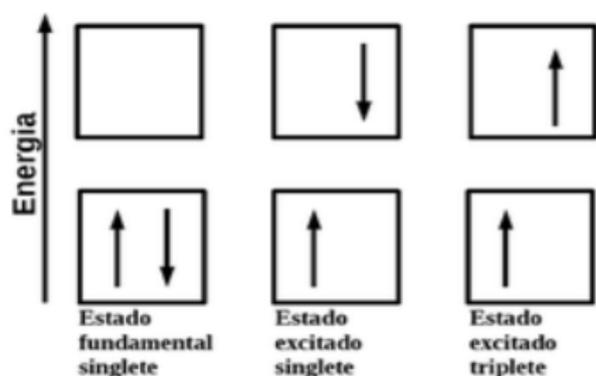


Fig. 2 Diagrama de estado singlete fundamental, estado excitado singlete y estado excitado triplete.

Dependiendo de la energía que la origina se puede hablar de diferentes tipos de luminiscencia: fotoluminiscencia que incluye la fluorescencia y fosforescencia, bioluminiscencia, sonoluminiscencia, quimioluminiscencia, triboluminiscencia, termoluminiscencia y electroluminiscencia. Se va a explicar brevemente los diferentes tipos y ya se profundizará en la fluorescencia:

- **Fotoluminiscencia:** cuando la energía activadora es de origen electromagnético: rayos X, rayos ultravioleta, rayos catódicos. Cuando una sustancia absorbe radiación VIS-UV suele perder el exceso de energía adquirido en forma de calor, mediante colisiones con otros átomos o moléculas. Esta pérdida de energía en algunos compuestos no sólo tiene lugar en forma de calor, si no que puede ser emitiendo radiación de una longitud de onda más larga. Dentro de la fotoluminiscencia se incluyen la fluorescencia y la fosforescencia, de las que se hablará más adelante.
- **Bioluminiscencia:** luz producida por una reacción química dentro de un organismo, puede ser activada por un movimiento o mecánicamente.

Es un fenómeno principalmente marino. Las luciferinas sufren oxidaciones catalizadas por enzimas formando productos en estado excitado emitiendo luz.

La enzima que interviene se llama luciferasa y la reacción sucede de esta forma: el oxígeno oxida al sustrato, que es la proteína llamada luciferina, la luciferasa acelera la reacción y el ATP proporciona la energía para la reacción, produciéndose agua y luz, la cual se nota mucho durante la noche.

- **Sonoluminiscencia:** es un fenómeno físico que se caracteriza por la emisión de luz en líquidos sometidos a ultrasonidos o sonidos intensos.

El ultrasonido genera cavidades que son burbujas que colapsan rápidamente, llegando a temperaturas muy elevadas donde los electrones se separan de los núcleos de los átomos y se genera un plasma que emite luz.

- **Quimioluminiscencia:** esta particularidad está originada por reacciones químicas, en las cuales la energía liberada no sólo se emite en forma de calor o energía química, sino también en forma de luz. Se observa cuando una especie electrónicamente excitada, producida por una reacción química a temperatura ambiente, regresa a su estado fundamental. Al bajar necesita menos energía para poder dar una vuelta alrededor del núcleo por lo que libera la energía sobrante en forma de fotones que al ser libres producen luz. El ejemplo más conocido es la oxidación de los vapores del fósforo blanco al oxígeno que emite una luz pálida y que ha dado nombre a este elemento.

La bioluminiscencia se basa en la quimioluminiscencia, uno de los casos más conocidos de bioluminiscencia son las luciérnagas.

- **Triboluminiscencia:** se da la emisión de luz posterior a una deformación o fractura vía mecánica o térmica. Ciertos minerales no metálicos y fácilmente exfoliables poseen la propiedad de emitir luz cuando son sometidos a acciones mecánicas, por ejemplo, al ser molidos, rayados, triturados, agitados o al frotar ciertas sustancias. Cualquier procedimiento que pueda romper los enlaces químicos. Parece suceder al separarse y reunificarse las cargas eléctricas.

- **Termoluminiscencia:** la presentan ciertos materiales únicamente cuando son calentados. La luz visible es inicialmente débil, acentuándose entre los 50 y 100 °C y cesando su emisión partir de los 475 °C.

La calcita, el apatito, la escapolita, la lepidolita y ciertos feldespatos son minerales termoluminiscentes. La clorofana, que es una variedad de la fluorita, por ejemplo, emite una radiación verde muy característica.

- **Electroluminiscencia:** es un fenómeno óptico y eléctrico en el que un material emite luz en respuesta a una corriente eléctrica que fluye a través de él, por causa de la fuerza de un campo eléctrico o una descarga. Los Led son un ejemplo de electroluminiscencia.

Dentro de la fotoluminiscencia se ha comentado que se encontraban la fosforescencia y la fluorescencia. Se van a presentar brevemente ambas y ya se centrará el trabajo sobre la espectroscopía de fluorescencia.

La fluorescencia se da cuando la pérdida del exceso de energía emitiendo un fotón ocurre desde el nivel vibracional más bajo del estado singlete excitado hasta cualquiera de los niveles vibraciones del estado fundamental. La fosforescencia se origina cuando se pasa del nivel vibracional más bajo del estado triplete hasta cualquiera de los niveles vibracionales del estado fundamental. La diferencia entre estos dos fenómenos luminiscentes se da en el tiempo de emisión de la radiación, siendo la fluorescencia un proceso muy rápido.

- **Fosforescencia:** es una luminiscencia que perdura una vez cortada la excitación, se considera si el tiempo característico es mayor que 10^{-8} segundos. Se denominó por primera vez fosforescencia a la propiedad de las sustancias de brillar durante un largo tiempo después de excitadas, aun después del corte del estímulo que la provoca. Las sustancias que tienen la propiedad de absorber energía, almacenarla y posteriormente emitirla en forma de radiación, esta emisión posterior se libera lenta y continuamente. A estos elementos se les conoce como foto-reactivos, requieren de luz para obtener la propiedad. Se observó en el fósforo por primera vez.

El nivel de impurezas controla la intensidad de la fosforescencia, siendo máxima a una cierta proporción de impurezas y al aumentar éstas decrece el nivel de intensidad.

Se utiliza en la fabricación de pigmentos que se añaden a los tintes translúcidos o pigmentos de luz diurna, también para tintas fluorescentes y en la fabricación de productos de plástico con fuerte efecto de luminiscencia residual.

- **Fluorescencia:** se restringe a la luminiscencia causada por rayos ultravioleta y se caracteriza por tener un tiempo característico menor que 10^{-8} segundos. Es el proceso de emisión de la luz que acompaña a la transición espontánea de una molécula desde el estado excitado hasta el nivel de menos energía.

Son las sustancias capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética, pero de longitud de onda diferentes, es la radiación UV-VIS que emiten los átomos o las moléculas que se han excitado al absorber la radiación.

Es una forma de luminiscencia en la cual, una sustancia es irradiada con luz de una longitud de onda determinada y, como consecuencia, emite luz de una longitud de onda más larga.

La energía total emitida en forma de luz es siempre menor a la energía total absorbida y la diferencia entre ambas es disipada en forma de calor. La radiación emitida tiene que estar dentro de la gama visual del espectro electromagnético. Algunos minerales presentan fluorescencia debido a su composición, otros necesitan unos activadores, donde el número de iones en una red cristalina pueden ser reemplazados por iones extraños de tamaño y valencia comparables causando el efecto de la fluorescencia. La radiación para la mayoría de los compuestos se produce por una transición $n \rightarrow \pi^*$ o $\pi \rightarrow \pi^*$, dependiendo cuál sea menos energética. El espectro de fluorescencia que se observa normalmente es el que corresponde desde el estado excitado singlete más bajo al estado singlete fundamental. Este comportamiento se conoce como regla de Kasha, es debido a que los procesos de conversión interna y de relajación vibracional entre los estados electrónicos excitados son tan rápidos, que la emisión de radiación no puede competir con ellos y queda bloqueada. Se observó por primera vez en la fluorita. [1, 2, 3, 4, 5].

FACTORES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA

Existen diferentes factores que afectan en la fluorescencia:

- **Estructura molecular:** como hemos comentado anteriormente, para que exista fluorescencia la molécula tiene que absorber radiación UV o VIS, cuanto más radiación absorba más intensa será su luminiscencia.

Un factor importante es la rigidez, las moléculas con estructuras rígidas ven favorecida la fluorescencia porque evitan otros tipos de mecanismos desactivantes. Otro aumento de la fluorescencia se da cuando ciertos agentes orgánicos forman quelatos con iones metálicos, ya que incrementa la rigidez del sistema. Otros factores estructurales que afectan al comportamiento luminiscente son: la presencia de grupos donadores, como -OH y -NH₂, favorecen la fluorescencia debido a un aumento de la probabilidad de transición entre en estado singlete de menor energía vibracional y el estado fundamental. En el caso de los grupos aceptores de electrones, como -X, -N=N-, -NO₂ y -COOH, disminuyen e incluso a veces inhiben la fluorescencia.

- **Efecto de la temperatura:** la fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura porque aumentan la frecuencia de colisiones y, por lo tanto, la probabilidad de desactivación de fenómenos no radiantes. El aumento de la temperatura también hace disminuir la viscosidad del disolvente, aumentando la probabilidad de dicha desactivación mediante colisiones.
- **Efecto del disolvente:** se reduce la fluorescencia en presencia de disolventes con átomos pesados o de solutos con dichos átomos en su estructura. Disolventes que contienen átomos pesados dan lugar a una disminución de la fluorescencia. La viscosidad del disolvente es importante, cuanto menos viscoso sea el disolvente, hay una mayor probabilidad de colisiones entre las moléculas del soluto, favoreciendo las desactivaciones no radiantes por conversión externa.
- **Efecto del pH:** cuantas más formas resonantes hay, mayor es la estabilidad del primer estado excitado y será más probable observar la fluorescencia. Esto se debe a que las formas resonantes proporcionan una mayor estabilidad al primer estado excitado, por ello se obtendrá una emisión a mayor longitud de onda. Se necesita un control minucioso del pH, pudiendo llegar a utilizarse las moléculas fluorescentes como indicadores del punto final en valoraciones ácido-base.

- **Efecto del oxígeno disuelto:** el oxígeno disuelto disminuye la fluorescencia. El papel que tiene el oxígeno en la atenuación de la fluorescencia se debe a sus propiedades oxidantes y a sus características paramagnéticas. Es consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular, favoreciendo el cruce entre sistemas y la conversión de las moléculas excitadas al estado triplete.
- **Efecto de la concentración:** la intensidad de la emisión de la fluorescencia, I_F , es proporcional a la intensidad de la radiación del haz absorbido por el sistema: $I_F = K' \cdot (I_0 - I)$, donde I_0 es la intensidad de la radiación del haz que incide sobre la disolución, I es la intensidad después de atravesar una longitud b del medio y K' es una constante que depende de la eficacia cuántica el proceso de fluorescencia.

Se considera la ley de Beer para relacionar I_F con la concentración de la especie fluorescente c : $\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c}$, donde ε es la absorptividad molar de las moléculas fluorescentes y $\varepsilon \cdot b \cdot c$ la absorbancia.

Sustituyendo los valores de esta ecuación en la anterior, obtenemos como resultado la siguiente nueva ecuación: $I_F = K' \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{\varepsilon \cdot b \cdot c})$, mediante la serie de McLaurin se puede desarrollar el término exponencial, reescribiendo la ecuación de la siguiente manera: $I_F = 2,3 \cdot K' \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c \cdot I_0$. Considerando que I_0 es constante: $I_F = K \cdot c$. Siendo la representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de la especie emisora lineal a bajas concentraciones.

Los factores de las desviaciones de dicha linealidad a elevadas concentraciones son la autoamortiguación, que es el resultado de colisiones entre las moléculas excitadas siendo dichas colisiones no radiantes y la autoabsorción, que tiene lugar cuando la longitud de onda de emisión se solapa con el pico de absorción, implica una disminución de fluorescencia ya que la radiación emitida por unas moléculas es reabsorbida por otras también fluorescentes. [6, 7].

La espectroscopía de fluorescencia o fluorimetría es un tipo de espectroscopía basada en la emisión fluorescente de una muestra.

Esto involucra un haz de luz, generalmente ultravioleta, que excita a los electrones de ciertas moléculas o átomos y causa la emisión de luz visible. Es una espectroscopía basada en la fluorescencia y que sigue la explicación anterior sobre ello.

Una de las aplicaciones más llamativas de la espectroscopía de fluorescencia ha sido en la detección y cuantificación de sustancias separadas a través de la cromatografía de líquidos. Muchos sistemas bioquímicos tienen una estructura que presenta fluorescencia, o si no, se puede transformar y originar fluorescencia.

La espectroscopía de fluorescencia ayuda a detectar y cuantificar especies inorgánicas, que no han sido posible detectar mediante espectroscopía del UV-visible o por absorción atómica.

Tiene unos niveles de detección del orden de partes por billón, esa es una de las razones por la que está creciendo la importancia de la espectroscopía de fluorescencia.

INSTRUMENTOS DE MEDIDA

Para medir la fluorescencia, existen dos tipos generales de instrumentos, que son los fluorímetros de filtro, que utilizan filtros para aislar la luz incidente y la luz fluorescente, mide la capacidad de una muestra para absorber luz a una longitud de onda y emiten luz a una longitud de onda más larga y los espectrofluorímetros, los cuales utilizan monocromadores de retículo de difracción para aislar la luz incidente y la luz fluorescente. Utilizan un monocromador de excitación, que incluye una dispersión de longitud de onda, y un monocromador de emisión. La ventaja de los espectrofluorímetros es que permiten seleccionar la longitud de onda variable. La desventaja es que son más costosos que los fluorímetros de filtro y sólo pueden proporcionar sensibilidad y especificidad moderadas en comparación.

Ambos siguen el mismo esquema: la luz de una fuente de radiación pasa a través del filtro o monocromador de excitación incidiendo sobre la muestra. Una parte es absorbida por la muestra, produciendo algunas moléculas fluorescencia. Esta luz fluorescente es emitida en todas las direcciones, parte de ella pasa por un segundo filtro o monocromador de emisión llegando al detector. Este detector se encuentra a 90° con respecto al haz de luz incidente. Esto se hace para minimizar el riesgo de que la luz incidente reflejada o transmitida llegue al detector. De ahí pasa al registrador para obtener el dato medido (Fig. 3).

Una de las diferencias entre fluorímetro y espectrofluorímetro es por donde pasa el haz de radiación, pasando por un filtro en el fluorímetro y por un monocromador en el espectrofluorímetro.

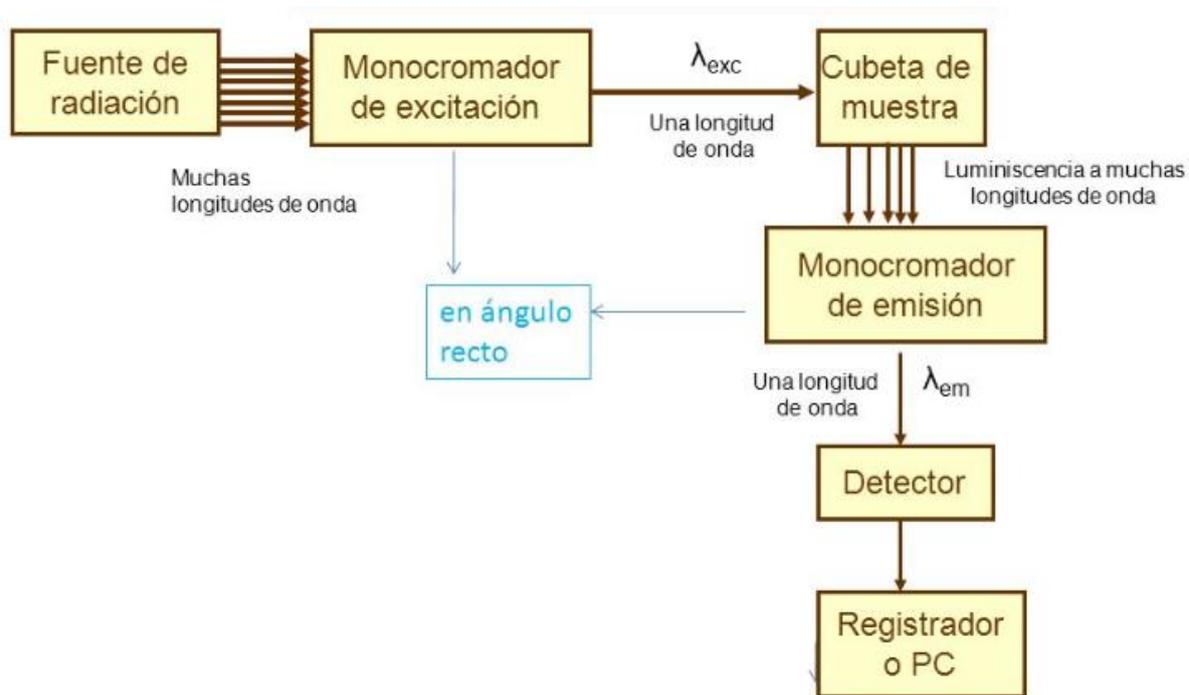


Fig. 3. Esquema de un espectrofluorímetro.

Se va a trabajar con dos espectrofluorímetros, por lo que se va a diferenciar cada parte del espectrofluorímetro:

- Fuente de radiación: como fuente de excitación, proporciona la energía que excita el compuesto de interés emitiendo luz. Pueden ser lámparas de xenón, lámparas de mercurio, láseres, LED's... La lámpara de Xenón es la más utilizada debido a su alta intensidad y a su amplio rango de longitud de onda, el espectro de esta lámpara es continua de 250nm a 600nm, con un pico de máxima intensidad a 470nm.
- Monocromador de excitación: permiten seleccionar la longitud de onda y la tolerancia. Es importante que la longitud de onda de excitación se superponga con la región de la longitud de onda de emisión. Generalmente se utilizan rejilla de difracción.
- Cubeta de muestra: lugar donde se deposita la muestra. Es diferente dependiendo del estado de la muestra a medir, ya sea sólida o líquida. En fluorescencia se utilizan celdas de vidrio común cuando la radiación es de rango visible, para ultravioleta se utiliza cuarzo o sílice.

- Monocromador de emisión: al igual que el monocromador de excitación, es un selector de la longitud de onda que ayuda a asegurar que la región de la longitud de onda de emisión no se superponga con el de la excitación. Determina a qué longitud de onda se desea terminar la fluorescencia emitida. También permite detectar bandas de fluorescencia cuando hay múltiples bandas presentes. Son importantes para el rechazo de la luz dispersa. Los más utilizados son los de rejilla.
- Detector: es el encargado de contar el flujo de fotones emitido por la muestra a la longitud de onda seleccionada. La detección del haz de excitación para monitorizarlo se realiza generalmente con un contador de contadores cuánticos o un fotodiodo antes de la muestra, donde una pequeña fracción del haz de excitación se separa del resto. [8]

Al tener dos monocromadores se pueden registrar dos tipos de espectros: el espectro de excitación y el espectro de emisión. En el espectro de excitación se ve la intensidad de fluorescencia observada en función de la longitud de onda de excitación a una determinada longitud de onda de emisión y en el espectro de emisión la intensidad de la emisión de la fluorescencia en función de la longitud de onda de emisión, a una longitud de onda de excitación determinada.

Para obtener el espectro de excitación se mantiene fija la longitud de onda de emisión y se van variando las longitudes de onda de excitación, para obtener el espectro de emisión, se mantiene constante la longitud de onda de excitación y se mide la radiación emitida a diferentes longitudes de onda de emisión.

Los espectros de emisión van a aparecer a longitudes de onda mayores que los espectros de excitación. Puede que alguna banda de mayor longitud de onda del espectro de absorción esté superpuesta con las bandas de menor longitud de onda de emisión, estas bandas se producen como consecuencia de transiciones entre niveles vibracionales cero de los estados fundamentales y primer estado singlete excitado.

En las aplicaciones analíticas se utiliza el espectro de emisión, pero al trabajar con el espectrofluorímetro primero se obtiene un espectro de excitación, con este espectro se confirma la identidad de la sustancia y se selecciona la longitud de onda óptima de excitación.

Dentro de estos espectros tenemos espectros aparentes y espectros corregidos. Los espectrofluorímetros pueden tener problemas de fluctuaciones de la fuente de radiación o inestabilidad del detector. La intensidad de la fuente de radiación como la sensibilidad de cualquier detector pueden variar con la longitud de onda. Cuando se obtiene el espectro dependiente de las características del instrumento son los espectros aparentes, el de excitación y el de emisión, aunque las distorsiones debidas a parámetros instrumentales se ven más en el espectro de excitación. Si es posible corregir este espectro aparente considerando las características de la fuente y del detector se obtiene el espectro verdadero o corregido. Esta corrección se puede realizar de forma manual si se conocen las características de la fuente y del detector. Algunos instrumentos están diseñados para llevar a cabo la corrección automática, en nuestro caso tendremos espectros aparentes. [9]

APLICACIONES

La fluorescencia tiene multitud de aplicaciones, por lo que se va a comentar las más interesantes o más comunes:

- **Sustancias inorgánicas:** pueden determinarse mediante análisis directo ya que bastantes especies presentan fluorescencia en estado sólido. En disolución no son demasiado numerosas. También se pueden determinar mediante determinaciones indirectas por medida de la disminución de la intensidad de fluorescencia de un quelato determinado. Uno de los métodos más sensibles y selectivos para determinar elementos se da con la formación de quelatos fluorescentes, se combina un ión metálico con un ligando orgánico. La mayoría de estas aplicaciones han sido desarrolladas para elementos que no son de transición, aunque muchos iones metálicos de transición forman quelatos muy estables y complejos con ligandos aromáticos, muy pocos son fluorescentes. Esto es porque muchos iones de transición son paramagnéticos, favoreciendo el cruzamiento entre sistemas y disminuyendo la probabilidad de desactivación por fluorescencia. Muchos complejos de metales energéticos poseen una gran cantidad de niveles energéticos poco espaciados, aumentando la probabilidad de desactivación por conversión interna.
- **Sustancias orgánicas:** existen muchos elementos que se pueden determinar a concentraciones muy pequeñas, a niveles inferiores a 1 ppm.

Como pueden ser la fluoresceína o la quinina, estas al ser más fluorescentes incluso a menores concentraciones. Se ha realizado el estudio de linealidad de la fluoresceína y de sulfato de quinina a concentraciones de p.p.b. y aun así el equipo no ha sido capaz de medirlo por la intensidad alta de fluorescencia.

La determinación de vitaminas se puede observar mediante este método, algunos compuestos presentan fluorescencia nativa y otros pueden convertirse en fluóforos por procedimientos sencillos.

- Química clínica: la que más análisis se realizan diariamente. Debido a la alta sensibilidad, simplicidad y bajo coste de la instalación. Se utiliza en la detección y prevención de enfermedades y comprobar que todo va correcto.
- Análisis bioquímico: es determina la secuencia de nucleótidos en el ADN, fundamental para elaborar los códigos genéticos. Se “marcan” las unidades fundamentales de terminación de cadena con grupos fluorescentes que emitan a longitudes de onda determinadas.
- Otros campos de aplicación: en análisis forense detectando huellas digitales latentes por fluorescencia láser, en fármacos y drogas por la gran sensibilidad y selectividad para distinguir entre medicamentos y sus productos metabólicos, en química agroalimentaria para evitar la degradación durante el proceso de elaboración de las grasa o aceites de los antioxidantes, que son sustancias que se añaden a los alimentos. [10]

GESTIÓN DE CALIDAD DE EQUIPOS ANALÍTICOS

Los laboratorios analíticos deben cumplir ciertos requisitos, los cuáles se deben definir y evaluar. Para ello se utilizan las normas ISO¹, por ejemplo, la ISO 9000², que define los requisitos genéricos para un sistema de gestión de calidad o la ISO 10012³, la cual define los requerimientos específicos para un sistema de gestión de calidad.

La mayoría de las definiciones generales vienen en el VIM⁴ en el cual podemos encontrar definido “sistema de medida” como el “conjunto de uno o más instrumentos de medida, y a menudo otros dispositivos, incluyendo cualquier reactivo y suministro montado y adaptado para dar información que se utiliza para generar valores cuantitativos de medida dentro de intervalos específicos para cantidades de tipos específicos”, por lo que se deduce de esta definición que los reactivos y suministros forman parte del sistema de medida.

El JCGM⁵ definió “instrumento de medida” como el “dispositivo utilizado para realizar medidas, sólo o en conjunto con uno o más dispositivos suplementarios”. Es menos específica que la anterior y no explican claro el concepto.

En las normas ISO 9000 e ISO 10012, se define “equipo de medida” como “instrumento de medida, software, norma de medida, material de referencia, o aparato auxiliar o combinación necesaria para realizar un proceso de medida”. Este término incluye al instrumento de medida y a otros elementos del laboratorio analítico.

Otro término relacionado con el equipo es el “aparato”, el cual en las directrices del OECLD.GLP⁶ se define como “aparatos que incluyen sistemas informatizados validados, utilizados para la generación, almacenamiento y recuperación de datos y para controlar los factores medioambientales relativos al estudio que deberían estar adecuadamente localizados y con un diseño apropiado y una capacidad adecuada”. En las normas ISO el término “aparato” se relaciona con los aparatos auxiliares que se utilizan para tomar medidas, pero no una medida analítica.

La guía del CITAC/EURACHEM⁷ se aproxima más a los laboratorios analíticos y aunque el término “equipo” no está definido, en dicha guía se indica que “todo el equipo usado en los laboratorios debería tener una especificación suficiente para el propósito previsto y teniendo un estado de mantenimiento y calibración consistente con su uso”.

A continuación, se da una clasificación de equipos encontrada en un laboratorio de química:

- 1) Equipo de servicio general no utilizado para tomar medidas o con mínima influencia en las medidas: agitadores, cristalería no volumétrica, calefacción de laboratorio o sistemas de ventilación.
- 2) Equipos volumétricos: frascos, pipetas y buretas.
- 3) Instrumentos de medida: densímetros, termómetros, temporizadores, espectrómetros, cromatógrafos y balanzas.
- 4) Normas de medidas físicas: pesas y termómetros de referencia.
- 5) Ordenadores y procesadores de datos.

Habiendo aclarado un poco el término “equipo de medida”, trataremos las distintas operaciones requeridas para gestionar el equipo. La ISO 12001 define “sistema de gestión de medida” como “un conjunto de elementos interrelacionados o interactuantes necesarios para lograr la confirmación metrológica y el continuo control de los procesos de medida”.

Esto implica dos objetivos: el control del proceso de la medida y la confirmación de las medidas metrológicas. También definiendo “confirmación de metrología” que es “un conjunto de operaciones necesarias para asegurar que el equipo de medida cumple los requisitos para su uso”.

CALIBRACIÓN METROLÓGICA Y ANALÍTICA

Calibración viene definida en el VIM y en el VIML⁸ como la “operación que, bajo condiciones específicas, en un primer paso establece una relación entre los valores de cantidad con las incertidumbres de medición proporcionadas por las normas de medición y las correspondientes indicaciones con incertidumbres de medida asociadas y, en un segundo paso, utiliza esta información para establecer una divulgación de resultados”.

La calibración analítica, desde un punto de vista práctico, implica la verificación o establecer la relación entre la señal de medida y la cantidad de analito. La ISO 11843-1⁹ establece que es “un conjunto completo de operaciones que estima bajo condiciones específicas la función de calibración de la observación de la variable de respuesta y, obtenida en estados de referencia”. Y además una recomendación de la IUPAC¹⁰ lo define como “la operación que determina la relación funcional entre los valores medidos, la variable y las cantidades analíticas que caracterizan los tipos de analitos y su cantidad”

La calibración metrológica implica la evaluación del rendimiento metrológico de un sistema de medida para garantizar la calidad de los resultados analíticos.

RECALIBRACIÓN

Este término no se encuentra en ninguna norma, según el diccionario de Oxford se define “recalibración” como el “proceso o acción de recalibrar un instrumento o dispositivo” y “recalibrar” como “calibrar de nuevo un instrumento o aparato o de forma diferente”.

En un laboratorio se debe recalibrar los instrumentos con una periodicidad que se puede encontrar en el documento OIML D10¹¹, este documento explica el ajuste de los intervalos de calibración de los instrumentos de medida.

MANTENIMIENTO, VERIFICACIÓN Y AJUSTE

Se describirán las confirmaciones metrológicas restantes, junto con la calibración conforman toda la gestión del equipo de medición. No son operaciones aisladas ya que algunas están interrelacionadas y otras son el resultado de las demás.

MANTENIMIENTO

La definición se da en el documento ISO / TC176 / SC1 N400¹² donde se describe “mantenimiento” como un “proceso de conservación de un sistema, servicio, edificio, etc. en buen estado, verificándolo o reparándolo regularmente”. El VIM propone una definición más específica de “mantenimiento de una medida estándar” como el “conjunto de operaciones necesarias para preservar las propiedades metrológicas del equipo de medición dentro de los límites establecidos por el usuario”. El mantenimiento incluye verificaciones internas de los equipos como externas, para verificar el entorno de trabajo.

Se distinguen el mantenimiento preventivo y correctivo. El preventivo es una acción para eliminar la causa de la no conformidad, se utiliza para evitar fallos antes de que ocurran. El correctivo se realiza cuando no se cumplen los requisitos especificados o cuando los datos muestran un patrón inaceptable.

VERIFICACIÓN

La ISO 9000 lo define como la “confirmación a través de la provisión del objetivo de evidencia que se han cumplido los requisitos específicos”. Por otra parte, el VIM lo define como la “provisión de evidencia objetiva de que un artículo dado cumple con los requisitos especificados”. Dos definiciones muy parejas. Para la VIML la “verificación de un instrumento de medida” se define como el “procedimiento de evaluación de la conformidad que da como resultado la colocación de una marca de verificación y/o la emisión de un certificado de verificación”.

La verificación externa se refiere a la limpieza del equipo de medición y la interna a la repuesta del equipo de medida mediante un estándar de verificación. Verificación no debe confundirse con calibración.

AJUSTE

El VIM y el VIML definen “ajuste de un sistema de medida” como “el conjunto de operaciones realizadas en un sistema de medida para que se proporcionen indicaciones prescritas correspondientes a los valores dados de una cantidad a medir”. No debe confundirse con calibración.

Es un malentendido muy común especialmente en balanzas y medidores de pH, ya que el fabricante incluye una opción de entrada, generalmente simbolizada por “CAL”, donde sólo se realiza un ajuste interno. Después del ajuste del equipo de medida, debe ser recalibrado. Si el operador usa el ajuste de cero después de colocar el contenedor para la muestra y después pesa la muestra, el peso del contenedor debe tenerse en cuenta junto con la muestra durante la calibración para seleccionar los pesos de calibración.

APROXIMACIÓN DE LA CONFIRMACIÓN METROLÓGICA

Se verán los requisitos que las normas principales reclaman sobre cada una de estas confirmaciones metrológicas para asegurar que el equipo sea adecuado para su propósito.

CALIBRACIÓN

La ISO 17025¹³ señala que “el programa para la calibración de los equipos debe diseñarse y operarse de forma que se garantice que las calibraciones y mediciones realizadas por el laboratorio sean rastreables al Sistema Internacional de Unidades (SI)”. Incluye el siguiente requisito: "se establecerán programas de calibración para cantidades o valores clave de los instrumentos donde estas propiedades tienen un efecto significativo en los resultados”.

La ISO 9001¹⁴ establece que “el equipo se calibrará a intervalos específicos, o antes de su uso, contra patrones de medición trazables a estándares de medición nacionales o internacionales”. También incluye el siguiente requisito: "cuando sea necesario para garantizar resultados válidos, el equipo de medida deberá calibrarse a intervalos específicos”.

Por último, las directrices GLP¹⁵ especifican que “los aparatos utilizados en un estudio deberían calibrarse periódicamente de acuerdo con los procedimientos operativos estándar. Se deben mantener registros de estas actividades. La calibración debe, en su caso, ser rastreable según las normas nacionales o internacionales de medición”.

Mientras que la ISO 9001 y GLP sólo indican que las calibraciones deben realizarse siguiendo estándares trazables a estándares de medición nacionales o internacionales, la ISO 17025 establece que la trazabilidad al SI y la incertidumbre de calibración son obligatorias.

MANTENIMIENTO

La norma ISO 9001 señala que “la organización debe garantizar que los recursos proporcionados se mantengan para garantizar su aptitud continua para su propósito”.

Las directrices GLP sólo establecen que “el aparato utilizado en un estudio debe mantenerse periódicamente”.

La ISO 17025 determina que el “laboratorio debe tener procedimientos para manejo seguro, transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento planificado de medición equipos para garantizar el funcionamiento adecuado y para evitar la contaminación o el deterioro”.

VERIFICACIÓN

La ISO 17025 no lo considera, lo reemplaza por “comprobación” y establece que “antes de ponerse en servicio, el equipo debe ser calibrado o comprobado para establecer que cumple con los requisitos de especificación del laboratorio y cumple con las especificaciones estándar pertinentes”.

La ISO 9001 señala que el equipo debe ser “verificado a intervalos específicos o antes de su uso”

Las directrices GLP establecen que “los aparatos utilizados en un equipo deben inspeccionarse periódicamente”. El término verificado vuelve a reemplazarse por “inspeccionado” en este caso.

AJUSTE

La ISO 9001 recomienda que el equipo esté "protegido contra ajustes, daños o deterioro que invalidaría el estado de calibración y los resultados de medición posteriores".

La ISO 17025, de forma muy similar, señala que “el equipo de prueba y calibración, incluidos tanto el hardware como el software, deben estar protegidos contra ajustes, lo que invalidaría los resultados de la prueba y / o calibración”.

No está establecido en laboratorios analíticos, porque los auditores generalmente no tienen en cuenta este requisito.

APROXIMACIÓN DE LA CALIFICACIÓN DE EQUIPO

Tanto la ISO 9001, como la ISO 17025 y las directrices GLP se han redactado en términos generales con la idea de que sean lo más ampliamente aplicables, sin generar problemas por detalles. Todos establecen requisitos como que “los instrumentos deben ser aptos para el propósito, mantenidos y calibrados adecuadamente según las normas nacionales o internacionales”, pero no especifican a como se debe lograr. Los laboratorios analíticos siguen sus propios criterios para cumplir con los requisitos de las normas de calidad.

La Aproximación de Calificación de Equipo (AEQ) tiene como fin cumplir con estas normas, aunque siga un esquema de gestión diferente.

El objetivo principal era proporcionar un enfoque claro y coherente para la calificación de los instrumentos analíticos. AEQ se ha definido como: "el proceso general para garantizar que un instrumento sea apropiado para su uso previsto y que funcione de acuerdo con las especificaciones acordadas por el usuario y el proveedor". Se divide en diseño, instalación, operación y calificación de desempeño.

El primer paso, "calificación de diseño" (DQ), cubre todos los procedimientos antes de la instalación del sistema en el entorno seleccionado, definiendo las especificaciones funcionales y operativas del instrumento y describiendo las decisiones en la selección del proveedor.

El segundo paso, "calificación de la instalación" (IQ), cubre todos los procedimientos relacionados con la instalación del instrumento en el entorno seleccionado.

El tercer paso, "calificación operacional" (OQ), es el proceso de demostrar que un instrumento funcionará de acuerdo con su especificación operacional en el entorno seleccionado.

El cuarto paso, "calificación de desempeño" (PQ), es el proceso de demostración de que un instrumento funciona de manera consistente de acuerdo con una especificación apropiada para su uso rutinario.

Como esta metodología sólo se ha establecido en laboratorios que realizan evaluaciones analíticas farmacéuticas y de dispositivos médicos que corresponden al escenario de evaluación de la conformidad, la Dirección Europea de Calidad de Medicamentos y Cuidado de la Salud (EDQM) publicó una guía de calificación en 2011. Propuso cuatro niveles de calificación en lugar de los cuatro pasos anteriormente explicados.

Nivel I: selección de instrumentos y proveedores.

Nivel II: instalación y lanzamiento para su uso.

Nivel III: verificaciones de instrumentos periódicas y motivadas.

Nivel IV: verificaciones de instrumentos en uso.

APROXIMACIÓN DE LA CONFIRMACIÓN METROLÓGICA VS APROXIMACIÓN DE LA CALIFICACIÓN DE EQUIPO

Tienen el mismo objetivo, asegurar que los equipos en los laboratorios de análisis cumplan con los requisitos de calidad que se exijan.

La primera diferencia se encuentra en la estructura, en la Aproximación de Calificación (QAp) todas las etapas tienen una entrada y dos salidas, aceptación o rechazo del equipo de medida. Mientras que en la Aproximación de Confirmación Metrológica (MCAp) este camino no está documentado tan claro y se pueden encontrar dificultades para seguir los pasos.

La primera etapa, DQ, incluye específicamente la selección del proveedor e instrumento mientras que las pautas metrológicas no definen ninguna operación en particular a realizar.

En la etapa IQ, las diferentes directrices metrológicas no se tratan explícitamente en la QAp, mientras que se agrupan en “verificaciones externas”.

En la etapa OQ, en la MCAp, se agrupa en “verificaciones internas” y ajuste y por último, cuando la OQ se completa con éxito, el equipo de medición cumple con los requisitos. Las diferentes etapas del AEQ se pueden considerar como confirmaciones metrológicas.

DEFINICIONES

Se van a resumir las definiciones vistas en los apartados anteriores dentro de la gestión de calidad de equipos analíticos:

- **Sistema de medida:** conjunto de uno o más instrumentos de medida, y a menudo otros dispositivos, incluyendo cualquier reactivo y suministro montado y adaptado para dar información que se utiliza para generar valores cuantitativos de medida dentro de intervalos específicos para cantidades de tipos específicos (VIM).
- **Instrumento de medida:** dispositivo utilizado para realizar medidas, sólo o en conjunto con uno o más dispositivos suplementarios (JCGM).
- **Equipo de medida:** instrumento de medida, software, norma de medida, material de referencia, o aparato auxiliar o combinación necesaria para realizar un proceso de medida (ISO 9000 e ISO 10012).
- **Aparato:** aparatos que incluyen sistemas informatizados validados, utilizados para la generación, almacenamiento y recuperación de datos y para controlar los factores medioambientales relativos al estudio que deberían estar adecuadamente localizados y con un diseño apropiado y una capacidad adecuada (Directrices del OECLD.GLP).
- **Equipo:** todo el equipo usado en los laboratorios debería tener una especificación suficiente para el propósito previsto y teniendo un estado de mantenimiento y calibración consistente con su uso (Guía del CITAC/EURACHEM).

- **Sistema de gestión de medida:** conjunto de elementos interrelacionados o interactuantes necesarios para lograr la confirmación metrológica y el continuo control de los procesos de medida (ISO 12001).
- **Confirmación de metrología:** conjunto de operaciones necesarias para asegurar que el equipo de medida cumple los requisitos para su uso (ISO 12001).
- **Calibración:** operación que, bajo condiciones específicas, en un primer paso establece una relación entre los valores de cantidad con las incertidumbres de medición proporcionadas por las normas de medición y las correspondientes indicaciones con incertidumbres de medida asociadas y, en un segundo paso, utiliza esta información para establecer una divulgación de resultados (VIM y VIML).
- **Calibración analítica:** conjunto completo de operaciones que estima bajo condiciones específicas la función de calibración de la observación de la variable de respuesta y, obtenida en estados de referencia (ISO 11843-1).

Operación que determina la relación funcional entre los valores medidos, la variable y las cantidades analíticas que caracterizan los tipos de analitos y su cantidad (Recomendación de la IUPAC).

- **Recalibración:** proceso o acción de recalibrar un instrumento o dispositivo (Diccionario de Oxford).
- **Recalibrar:** calibrar de nuevo un instrumento o aparato o de forma diferente (Diccionario de Oxford).
- **Mantenimiento:** proceso de conservación de un sistema, servicio, edificio, etc. en buen estado, verificándolo o reparándolo regularmente (ISO / TC176 / SC1 N400).
- **Mantenimiento estándar:** conjunto de operaciones necesarias para preservar las propiedades metrológicas del equipo de medición dentro de los límites establecidos por el usuario (VIM).
- **Mantenimiento preventivo:** acción para eliminar la causa de la no conformidad, se utiliza para evitar fallos antes de que ocurran.
- **Mantenimiento correctivo:** cuando no se cumplen los requisitos especificados o cuando los datos muestran un patrón inaceptable.
- **Verificación:** confirmación a través de la provisión del objetivo de evidencia que se han cumplido los requisitos específicos (ISO 9000).

Provisión de evidencia objetiva de que un artículo dado cumple con los requisitos especificados (VIM).

- **Verificación de un instrumento de medida:** procedimiento de evaluación de la conformidad que da como resultado la colocación de una marca de verificación y/o la emisión de un certificado de verificación (VIML).
- **Verificación externa:** limpieza del equipo de medición.
- **Verificación interna:** repuesta del equipo de medida mediante un estándar de verificación.
- **Ajuste de un sistema de medida:** conjunto de operaciones realizadas en un sistema de medida para que se proporcionen indicaciones prescritas correspondientes a los valores dados de una cantidad a medir (VIM y VIML).
- **Aproximación de Calificación de Equipo (AEQ):** proceso general para garantizar que un instrumento sea apropiado para su uso previsto y que funcione de acuerdo con las especificaciones acordadas por el usuario y el proveedor. [11].

GESTIÓN DE UN ESPECTROFLUORÍMETRO ANALÍTICO EN LABORATORIOS

Se va a analizar cómo gestionar un espectrofluorímetro. Para ello se va a introducir el concepto de espectroscopía de fluorescencia y posteriormente se explicará cómo funciona y qué hay que tener en cuenta para su funcionamiento, los cuidados que hay que tener para su uso gracias a una investigación realizada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

REQUISITOS DE OPERACIÓN

Existen diferentes factores que tenemos que tener en cuenta a la hora de operar con el espectrofluorímetro.

CONDICIONES AMBIENTALES

Operar a una humedad muy baja puede provocar acumulación y descargas de electricidad estática, acortando la vida de los componentes electrónicos. Por el contrario, operar a una elevada humedad puede producir condensaciones y cortocircuitos. Para el desarrollo óptimo la temperatura ambiente del laboratorio tiene que estar entre 20 y 25 grados centígrados con un intervalo de ± 2 , se tiene que mantener constante durante todo el tiempo de medida. Los requisitos de las condiciones ambientales las indican los fabricantes en las especificaciones del instrumento. Nuestro equipo dependerá de dichas especificaciones.

PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN Y GASES

Los equipos operan en aire limpio. El laboratorio ha de estar libre de contaminantes, como el polvo, los ácidos o los vapores orgánicos.

SISTEMAS EXTRACTORES

No son necesarios, pero deberían estar instalados en el caso de analizar vapores tóxicos. Tienen que estar limpios y desbloqueados. No se han analizado vapores tóxicos.

LOCALIZACIÓN DEL EQUIPO

El equipo tiene que estar colocado en un soporte estable y fuerte, de tal manera que soporte el peso total del equipo que se va a utilizar, una mesa, por ejemplo.

También debe permitir la libre circulación de aire alrededor de cada unidad del sistema. La superficie tiene que ser impermeable y resistente a la corrosión por si se vierte alguna muestra. La mesa dónde esté situada el equipo no puede tener vibraciones.

Nuestros espectrofluorímetros estaban sobre una mesa alargada, en la cual estaban sólo los dos espectrofluorímetros con el ordenador de uno de ellos.

ALMACENAMIENTO DE LOS GASES

Para evitar accidentes, hay que asegurar con un soporte rígido dónde se vaya a poner el uso de balas portátiles de gases. En nuestro caso las muestras son sólidas y líquidas.

PERSONAL

Se requiere personal con conocimientos básicos de química, a poder ser con conocimientos especialmente de fluorescencia.

La formación debe incluir una descripción general del sistema, explicar el proceso de instalación, desinstalación y reinstalación del software, mantenimiento de rutina, diagnóstico de averías básicas, los repuestos y consumibles recomendados y las condiciones de garantía y seguridad, del equipo y de los reactivos.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Estas condiciones de seguridad se han de mantener mientras trabajemos con el equipo.

MÓDULO DE LA LÁMPARA

El módulo tiene componentes que trabajan a alto voltaje, la lámpara está dentro del módulo. Nunca hay que abrir el módulo para evitar un shock eléctrico, en el caso de que haya que abrirse, hay que utilizar gafas de seguridad certificadas para protegernos los ojos.

Mientras trabajamos, la lámpara emite luz visible y UV de alta intensidad peligrosas para los ojos. Por lo que nunca operaremos con la lámpara fuera del instrumento.

PELIGROS ELÉCTRICOS

El instrumento y algunos accesorios tienen circuitos eléctricos, mecanismos y componentes que trabajan a voltajes peligrosos. El contacto con ellos puede causar heridas serias, dolorosos shocks eléctricos e incluso la muerte.

Las coberturas del espectrofluorímetro y los accesorios tienen que ser retirados por personal cualificado de la empresa que ha suministrado el instrumento.

Debe existir una buena conexión entre la base metálica del espectrofluorímetro, los accesorios y las tres tomas de tierra. Si se aplica un voltaje equivocado, puede dar lugar a un incendio y a un potencial peligro de shock eléctrico. Todo esto puede conllevar un gran daño al equipo, accesorios y equipos auxiliares.

Al cambiar los fusibles ha de comprobarse que son iguales, los cables eléctricos rotos o sin la cubierta adecuada han de ser reemplazados.

OTRAS PRECAUCIONES

Si se utilizan disolventes y disoluciones que pueden ser inflamables, corrosivas, tóxicas..., hay que tomar las precauciones necesarias para cada caso.

Hay que trabajar con las buenas prácticas de laboratorio, con la ropa apropiada y el uso de gafas de protección.

No debe obstruirse la ventilación del equipo ni la de los accesorios.

GESTIÓN DEL ESPECTROFLUORÍMETRO

Las medidas son dependientes del instrumento con que se mide, por lo que no son comparables entre sí. Para poder comparar estos datos de fluorescencia, se requiere una caracterización adecuada entre instrumentos y laboratorios pudiendo minimizar las fuentes de error inherentes a la medida.

OPERACIONES PRELIMINARES

La selección del equipo que mejor se adapte a nuestras necesidades se puede ver en una tabla de evaluación de instrumentación analítica propuesta por el Analytical Methods Committee¹⁶.

Primero hay que comprobar que las condiciones ambientales se encuentran dentro del rango óptimo de medida. Cuando se instala el equipo se debe comprobar que los canales de ventilación no estén obstruidos. Una vez comprobado esto, se procede al encendido del instrumento.

Para que el espectrofluorímetro esté perfectamente estabilizado hay que encenderlo unas 2 horas antes de empezar a usarlo.

Hay que lavar las cubetas donde se van a realizar las medidas, evitando tocarlas con las manos.

OPERACIONES DE GESTIÓN

En este apartado se va a ver cómo tratar las diferentes partes del espectrofluorímetro para su correcto funcionamiento y diferentes experimentos de calibrado y verificación que posteriormente se llevan a cabo.

CONTROL DE CUBETAS

Las cubetas deben fabricarse de un material que no interfiera con la radiación que estamos utilizando. Si estamos el ultravioleta la cubeta deberá ser de cuarzo (por debajo de 350nm), entre 350nm y 2000nm se utilizan cubetas de vidrio de silicato. Las cubetas de plástico se pueden utilizar para el visible (400nm-800nm). El ancho más común de la cubeta es de 1 cm.

Deben ser manejadas con sumo cuidado, no puede tener arañazos en las ventanas y no se debe de tocar las superficies ópticas con los dedos. Para un mejor funcionamiento se debería de usar una única celda para una serie de mediciones, si no, asegurarse de utilizar la misma longitud de cubeta.

Al llenar las celdas se debe de enjuagar por completo con la disolución a medir y posteriormente rellenarlo, asegurándose que no haya burbujas.

Se debe seleccionar el tipo de cubeta adecuado, dependiendo del proceso:

- La forma de la cubeta: cuadrada, cilíndrica o triangular.
- El volumen: cubetas macro, semi-micro, ultra-micro.

- El paso de luz.
- El número de ventanas.
- La utilización de células con agitación o células de flujo, en el caso de ser necesario.

Hay que verificar tres aspectos de las cubetas:

- Transparencia.
- Simetría.
- Homogeneidad: si se utiliza más de una cubeta de forma indistinta.

La transparencia y la simetría de cada cubeta se establece realizando un set de 4 medidas de la fluorescencia de una misma disolución patrón, modificando la orientación de la cubeta. Los valores deberían de ser aproximadamente iguales.

La homogeneidad entre cubetas, una vez verificada su simetría, se establece haciendo la medida de la fluorescencia de una misma disolución en cada una de ellas.

Los valores registrados deberían de ser similares. Se va a realizar este experimento con una disolución patrón de sulfato de quinina.

MEDIDA DE LA SENSIBILIDAD DEL EQUIPO: TEST RAMAN

El test Raman consiste en calcular la relación señal-ruido (S/N) utilizando la señal del pico Raman del agua, que aparece a 397 nm, excitando a 350nm. El ruido se puede calcular de varias formas diferentes, no hay un convenio aceptado.

El procedimiento más común consiste en recoger la emisión desde 365 a 460 nm, excitando a 350 nm. La señal se mide a 397 nm y el ruido se mide en la región donde la señal es insignificante, generalmente entre 420-460nm. Este experimento también se ha realizado, por lo que más adelante veremos los resultados obtenidos.

Existe una serie de ventajas de la utilización de la banda Raman del agua como test estándar:

- Es fácil obtener agua purificada, es un estándar muy reproducible.
- El desplazamiento en la longitud de onda para el agua excitando a 350 nm es bastante grande, de 47nm. Por lo que hay una buena separación entre la dispersión Rayleigh y el pico Raman.

FUENTE DE EXCITACIÓN

Las más comunes son las lámparas de xenón y de mercurio. La de xenón es más versátil que la de mercurio. El espectro de la lámpara de xenón es continuo de 250 a 600nm, con un pico de máxima intensidad a 470nm. Nuestros equipos tienen lámparas de xenón.

La emisión es más fuerte en el visible que en el ultravioleta, por lo que la sensibilidad del sistema será mayor en el visible.

La lámpara de alta presión de xenón se ha de cambiar de forma puntual. Puede haber perdido el color al alcanzar la duración nominal o cuando el espectro de emisión de la lámpara se modifique notablemente. Este cambio se debe a que, con el tiempo de funcionamiento, los electrodos de la lámpara se evaporan lentamente y se depositan en la pared interior de la ampolla, a la vez que aumenta la distancia entre los electrodos.

Hay que fijarse en las indicaciones del fabricante y el tiempo de trabajo de la lámpara para cambiarla.

Cuando se cambia la lámpara hay que realizar una alineación posterior del módulo de la lámpara para optimizar el funcionamiento del instrumento. Por ejemplo, se puede caracterizar por la intensidad del pico Raman del agua, mediante ese test que hemos explicado anteriormente y que luego veremos nuestros resultados.

MONOCROMADORES

Un espectrofluorímetro consta de dos monocromadores, uno de excitación y el otro de emisión para seleccionar ambas longitudes de onda.

El monocromador de excitación permite seleccionar la longitud de onda y la tolerancia. Es importante que la longitud de onda de excitación se superponga con la región de la longitud de onda de emisión. Generalmente se utilizan rejilla de difracción.

El monocromador de emisión, al igual que el monocromador de excitación, es un selector de la longitud de onda que ayuda a asegurar que la región de la longitud de onda de emisión no se superponga con el de la excitación. Determina a qué longitud de onda se desea terminar la fluorescencia emitida.

También permite detectar bandas de fluorescencia cuando hay múltiples bandas presentes. Son importantes para el rechazo de la luz dispersa. Los más utilizados son los de rejilla.

Con una lámpara de baja presión de Hg (rango 202,5 – 894,4 nm), se asegura la precisión haciendo uso de estas líneas. Para calibrar el monocromador de excitación, se sustituye la lámpara de xenón por la de mercurio y se coloca una superficie reflectante en el lugar de la muestra, como puede ser una superficie pulida de teflón blanco. Para calibrar el monocromador de emisión se coloca la fuente en el lugar de la muestra y se comprueba que las longitudes de onda de los picos son las correctas.

Antes de esto, se debe establecer una tolerancia permitida para la desviación del pico máximo obtenido experimentalmente frente al teórico. Cuando la desviación sea menor de dicha tolerancia, el equipo será declarado conforme.

Otro estándar es el cristal DYAG, cuando se excita a longitudes de onda entre 250-450nm, emite el material una intensa fluorescencia en dos regiones: 470-500 y 570-600nm. Y una fluorescencia más débil en dos regiones a mayor longitud de onda: 650-680 y 740-770 nm.

Este experimento de cambios de lámpara no se ha realizado al tener la lámpara de xenón únicamente.

ESTANDARIZACIÓN DE LA INTENSIDAD

Las medidas de fluorescencia relacionan la concentración del analito con la intensidad de la fluorescencia. Conocemos la intensidad de fluorescencia del fluoróforo, al que llamamos patrón de intensidad de fluorescencia y se compara esta intensidad con la intensidad de fluorescencia, la cual depende de la concentración de fluoróforo, del coeficiente de extinción molar y del rendimiento cuántico.

Para conseguir que las medidas sean independientes del instrumento se han definido las unidades MESF: unidad de intensidad de fluorescencia que representa las moléculas de fluoróforo soluble equivalente.

Existen distintos tipos de patrón:

- Fluoróforos en solución: son los más sencillos.
- Fluoróforos sólidos: son un polvo seco que debe tener certificada su pureza, coeficiente de extinción molar y estar en condiciones muy específicas de rendimiento cuántico.

- Fluoróforos inmovilizados: para medidas biológicas, se ajustaría mejor al tipo de muestras.

Esta relación de concentración con intensidad se obtiene mediante una regresión lineal, se ha realizado el experimento con una disolución de sulfato de quinina y otra de fluoresceína.

CORRECCIÓN DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN

No se pueden comparar en intensidad las medidas realizadas en diferentes espectrofluorímetros porque depende mucho del instrumento utilizado. Para normalizar estas medidas se utilizan los espectros corregidos, consiste en medir un patrón de concentración e intensidad de pico conocida, de esta forma, se obtiene un factor característico de cada longitud de onda con la intensidad en nuestro nuevo instrumento. De esta manera se corrigen los espectros obtenidos con nuestro instrumento, unificándose este tipo de medidas. Para corregirlo se utilizan reactivos y disolventes de alta pureza.

Se pueden utilizar varios fluoróforos:

- Sulfato de Quinina: sulfato de quinina dihidratado, que se disuelve en 0,1M de HClO_4 y se utiliza como estándar para determinar la fluorescencia relativa de rendimiento cuántico de otros fluoróforos. Sulfato de quinina de alta pureza, >99%, que se pone en H_2SO_4 al 0,05M.
Siendo la longitud de onda de excitación 350nm y 450nm la de emisión.
- Fluoresceína: se disuelve en una disolución tamponada de borato con un pH de 9,1.
La longitud de onda de emisión es a 520nm y la de excitación a 495nm.
- Rodamina B: se disuelve en metanol, reduciendo los problemas de polarización.
La longitud de onda de emisión es de 605nm y 586nm de excitación.
- Sulforrodamina 101: en forma sólida o disuelta en etanol.
Tiene una longitud de onda de emisión de 605nm y 586nm de excitación.

Deben diluirse hasta conseguir que las absorbancias sean menores al 1% de las intensidades de fluorescencia y con un error mínimo (<0,1%) atribuido al “efecto interno del filtro”.

Para corregir los espectros de excitación se hace una función de rectificación que es verificada midiendo el espectro de emisión de los patrones de fluorescencia antes indicados. Se realiza en una célula triangular en el compartimiento de muestra, usando un filtro apropiado de longitudes de onda que deje pasar el rojo.

Esta rectificación da el espectro de emisión corregido en unidades de energía, el cual debe ser multiplicado por la longitud de onda para dar el espectro de emisión en unidades fotónicas:

$$E(\lambda) = \frac{Ep(\lambda)}{\lambda} = \frac{E(\nu)}{\lambda^2} = \frac{Ep(\nu)}{\lambda^3}$$

Donde, $E(\lambda)$ es la señal del espectro de emisión en unidades de energía para bandas en unidades de longitud de onda, $Ep(\lambda)$ es la señal del espectro de emisión en unidades fotónicas para bandas en unidades de longitud de onda y las demás designan el espectro de emisión en unidades de energía fotónica para las bandas de longitud de onda en unidades de frecuencia.

En la práctica, para corregir el espectro se utiliza un estándar de fluorescencia, suministrado por las casas comerciales en ampollas cerradas, para evitar posibles contaminaciones y evaporaciones del disolvente. La corrección del espectro se realiza de manera automática en el instrumento.

Para la corrección de la intensidad relativa, recientemente, el NIST ha desarrollado dos nuevos materiales de referencia:

- SMR 2940, emisión naranja: longitud de onda de emisión desde 500 a 800nm excitando a 412nm.
- SMR 2941, emisión verde: longitud de onda de emisión desde 450 a 650nm excitando a 427nm.

REGISTRO DE DATOS

Los datos quedan recogidos en el espectrofluorímetro. En el caso del Shimadzu también quedan recogidos en el software del programa, en el ordenador. En el Hitachi aun no ese tiene software del equipo. [12].

MATERIALES Y MÉTODOS

Se va a analizar los equipos utilizados y materiales de referencia, con los cuáles se realiza un experimento.

EQUIPOS

Los equipos utilizados han sido el Hitachi F-2700 y el Shimadzu RF-1501. El espectrofluorímetro Shimadzu ha sido de reciente adquisición.

❖ SHIMADZU RF-1501



Fig. 4. Espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 en dos perspectivas

• Especificaciones del equipo:

- Sensibilidad: la relación Señal/Ruido para el pico del agua destilada es de 300 en las siguientes condiciones: longitud de onda de excitación a 350 nm, longitud de onda de emisión obtenida con el espectro de excitación, anchura de banda de 10 nm y respuesta de 2 segundos.
- Fuente de luz: lámpara de Xenon de 150 W.
- Rango de medida de la longitud de onda: 220 nm a 750 nm.
- Exactitud de la longitud de onda: ± 5 nm.
- Velocidad de escaneo de la longitud de onda: Seleccionable entre Super (3700 nm/min), rápido, medio y lento.
- Radio de respuesta: de 0 a 98%. 0,02, 0,03, 0,1, 0,25, 0,5, 2 y 8 segundos.
- Velocidad de propagación de la longitud de onda: aproximadamente 30000 nm/min.
- Ancho de rendija (de excitación y de emisión): 10 y 20 nm.

- Dimensiones: 500 x 400 x 255 milímetros.
- Peso: 23 kilogramos.
- Temperatura ambiente y humedad: desde 10 a 35°C y del 45 al 80%.
- Fuente de alimentación: 100, 120, 220 y 240V
- Consumo de energía: 400 Vatios.
- Software: conectado al ordenador mediante el programa del equipo. [13].

❖ **HITACHI F-2700**



Fig. 5. Espectrofluorímetro Hitachi F-2700

• **Especificaciones del equipo:**

- Sensibilidad: Relación Señal/Ruido 800 o más, la mayor detección de sensibilidad de su clase.
- Mínima cantidad de muestra: 0,6 mL con el uso estándar de una celda rectangular de 10 mm.
- Principio fotométrico: cálculo del radio de la luz monocromática monitorizada.
- Fuente de luz: lámpara de Xenon de 150 W.
- Espectómetro: rejilla de difracción cóncava.
- Rango de medida de la longitud de onda: 220 nm a 730 nm. Se puede expandir a 800 nm con un detector opcional.
- Exactitud de la longitud de onda: ± 3 nm.
- Velocidad de escaneo de la longitud de onda: 60, 300, 1500, 3000 y 12000 nm/min. Esta última sólo bajo control de ordenador.
- Radio de respuesta: de 0 a 98%. 0,04, 0,08, 0,4 y 2 segundos.

- Velocidad de propagación de la longitud de onda: 12000 nm/min.
- Ancho de rendija (de excitación y de emisión): 2,5, 5, 10 y 20 nm.
- Rango del valor fotométrico: desde -9999 a 9999.
- Dimensiones: 600 x 503 x 343 milímetros.
- Peso: aproximadamente 41 kilogramos.
- Temperatura ambiente y humedad: desde 15 a 35°C y del 25 al 80%.
- Fuente de alimentación: 100, 115, 220, 230 y 240V
- Consumo de energía: 400 Vatios.
- Software: No se ha adquirido aún. [14].

MATERIALES DE REFERENCIA

Es un experimento realizado con materiales de referencia, tenemos dos cubetas, una de Rodamina B y otra con antraceno y naftaleno.

Estos tres materiales de referencia para la espectroscopía molecular de fluorescencia son muy estables y con un buen trato pueden ser reutilizados durante muchos años. Los materiales fluorescentes se han disuelto en metilmetacrilato y la disolución resultante se polimeriza para producir un polimetil metacrilato (PMMA) estable para el medioambiente. De esta manera, siendo sólidos, no pueden evaporarse los solutos ni que se produzca una fotodescomposición, que es la disociación de moléculas por efecto de la luz y se define como la interacción de uno o más fotones con una molécula objetivo, fenómeno en el que se basa la fotosíntesis, del material. Esto significa una mayor estabilidad a largo plazo. Y es por eso, que alguna variación que se observe en las lecturas se debe a la variación instrumental, no es debido a efectos químicos o físicos que pudiesen afectar al estándar de fluorescencia líquida. Además de la no fotodescomposición, la no evaporación y la estabilidad a largo plazo, los materiales de referencia sólidos también son beneficiosos por su fácil almacenaje, por sus bajos costos generales y porque no utiliza químicos para mezclar y diluir.

Nosotros tenemos dos bloques poliméricos que contienen tres componentes fluorescentes donde el espectro cubre un rango espectral de emisión máxima desde 330 nm, para el naftaleno, 402 nm para el antraceno hasta 573 nm para la Rodamina B y de excitación máxima desde 290 nm para el naftaleno, 360 nm para el antraceno hasta 562nm de la Rodamina B.

Cada bloque ha sido producido con superficies planas pulidas ópticamente en seis lados, con dimensiones de 12,5 x 12,5 x 45 mm.

Se han realizado cuatro medidas por cada cubeta y por cada espectro, de emisión y de excitación, anotando la longitud de onda a la que aparece el pico o los picos, dependiendo del elemento. Se ha obtenido el espectro haciendo el barrido con las longitudes de onda de excitación y de emisión que vemos a continuación y con los rangos anteriormente descritos. Después comparamos con los datos teóricos que tenemos si obtenemos los mismos resultados. Sabemos que La precisión de la longitud de onda en el Shimadzu es de ± 5 y en el Hitachi de ± 3 . Vamos a comparar las medidas teóricas y experimentales. [15].

	Concentración mola aproximada	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
Antraceno	1×10^{-5}	360	402
Naftaleno	6×10^{-5}	290	330
Rodamina B	2×10^{-7}	562	573

ANTRACENO

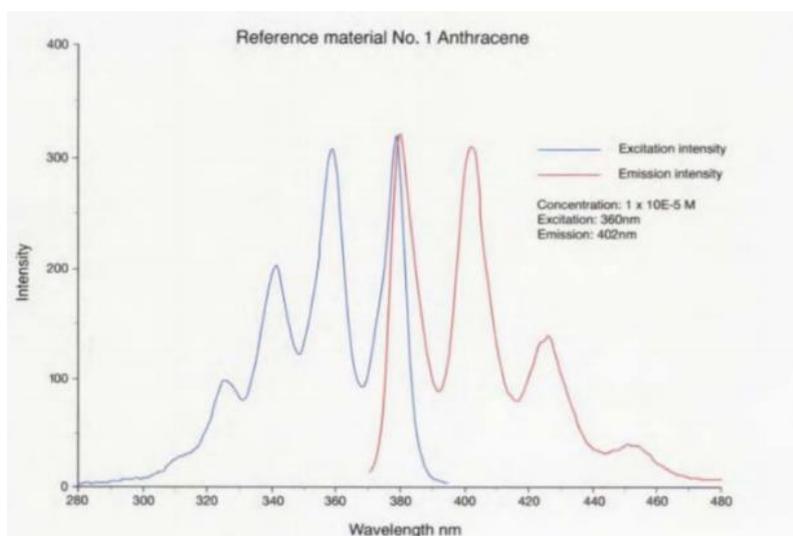
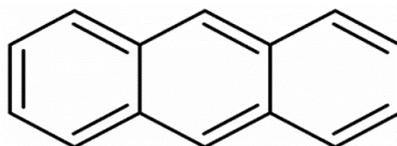


Fig.6 Espectro de emisión y de excitación del Antraceno y molécula

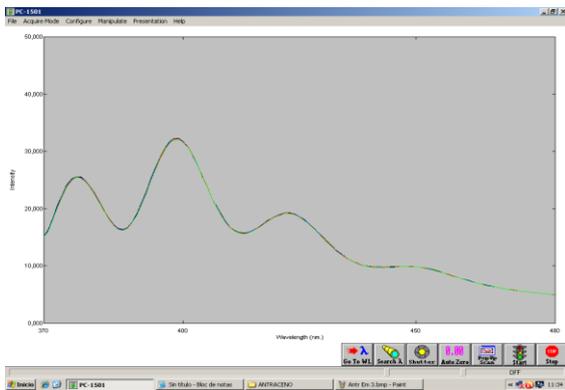
En la Fig. 6 se observa el espectro que se debería obtener, se ven 4 picos de excitación y 3 picos de emisión:

Excitación: Se observan 4 picos a: 325 nm, 339 nm, 356 nm y 375 nm.

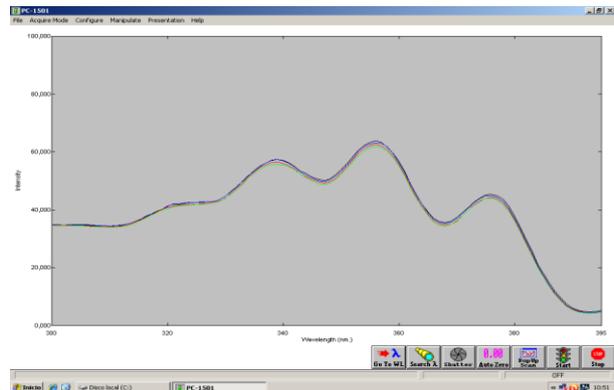
Emisión: Se tienen 3 picos a: 384 nm, 405 nm y 428 nm.

- En primer lugar, con el equipo Shimadzu se han obtenido cuatro espectros en una imagen superpuestos:

Emisión

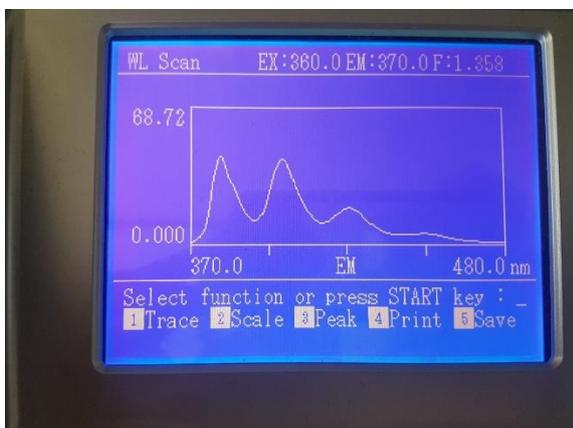


Excitación



- Posteriormente, se efectuó el mismo procedimiento con el Hitachi F-2700, al no tener software y por tanto equipo conectado, no se pueden superponer las cuatro medidas por lo que se va a visualizar una única foto, obteniendo el siguiente espectro:

Emisión



Excitación



Se obtienen los siguientes resultados:

		ANTRACENO							
		TEÓRICO (nm)	EXPERIMENTAL (nm)						
			SHIMADZU RF-1501			HITACHI F-2700			
Excitación	325	326	326	326,5	326,5	320	320	320	320
	339	341,5	341,5	341,5	342	339	339	339	339
	356	359	359	359	359	356	356	356	356
	375	378	378	378	378	376	376	376	376
Emisión	384	380	380	380	380	377	377	377	377
	405	402,5	402	402	402	398	399	398	398
	428	426	426	426	425,5	422	423	422	422

En este primer caso tenemos los valores teóricos de excitación a 325 nm, 339 nm, 356 nm y 375 nm y los resultados experimentales, haciendo la media de las cuatro medidas, para el Shimadzu es de 326,25 nm, 341,625 nm, 359 nm y 378 nm, mientras que para el Hitachi las medias son 320 nm, 339 nm, 356 nm y 376 nm. Se observa que entran dentro de la precisión de ambos equipos salvo la medida de 320 nm que se aleja a +5.

Para los valores de emisión, tenemos como valores teóricos a 384 nm, 405 nm y 428 nm, las medias de las medidas del Shimadzu son de 380 nm, 402 nm y 425,875 y para el Hitachi tenemos los picos a 377 nm, 398,25 nm y 422,25 nm. En este segundo caso se vuelven a alejar los valores del Hitachi.

NAFTALENO

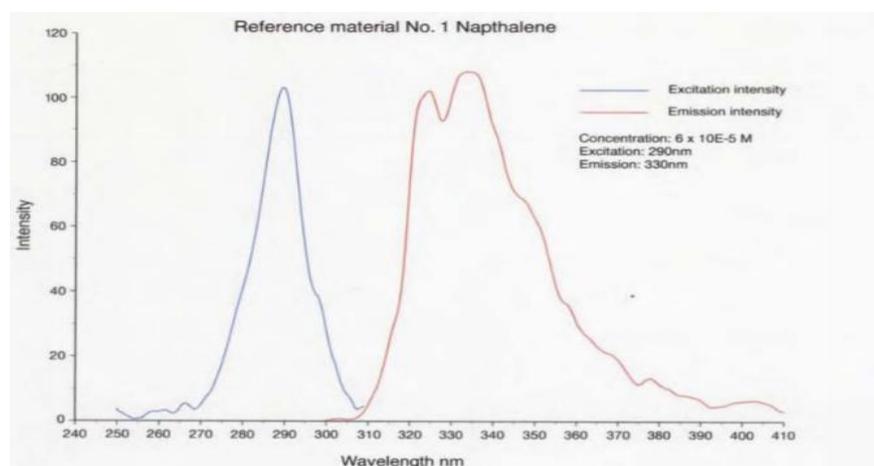
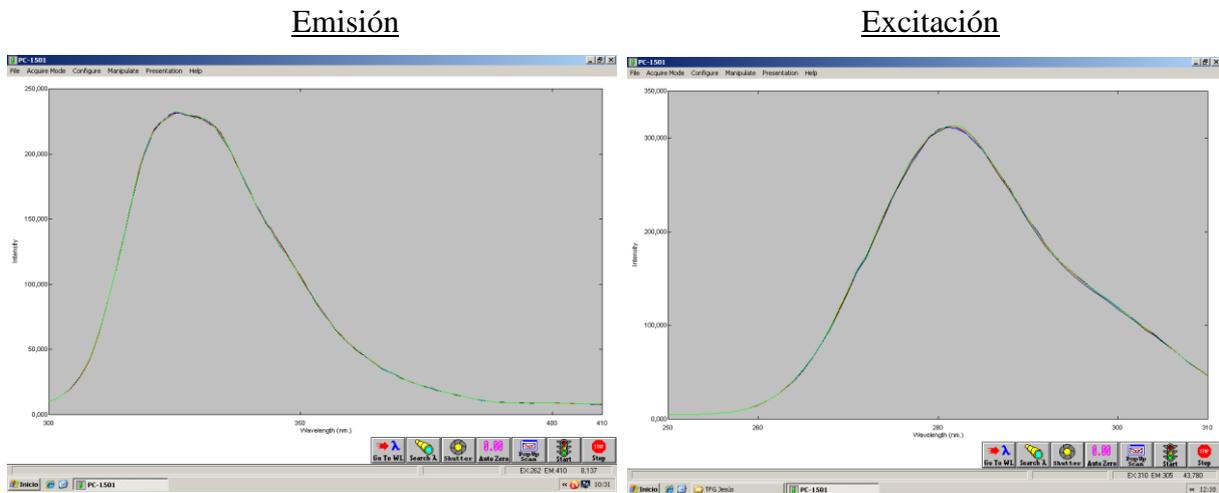


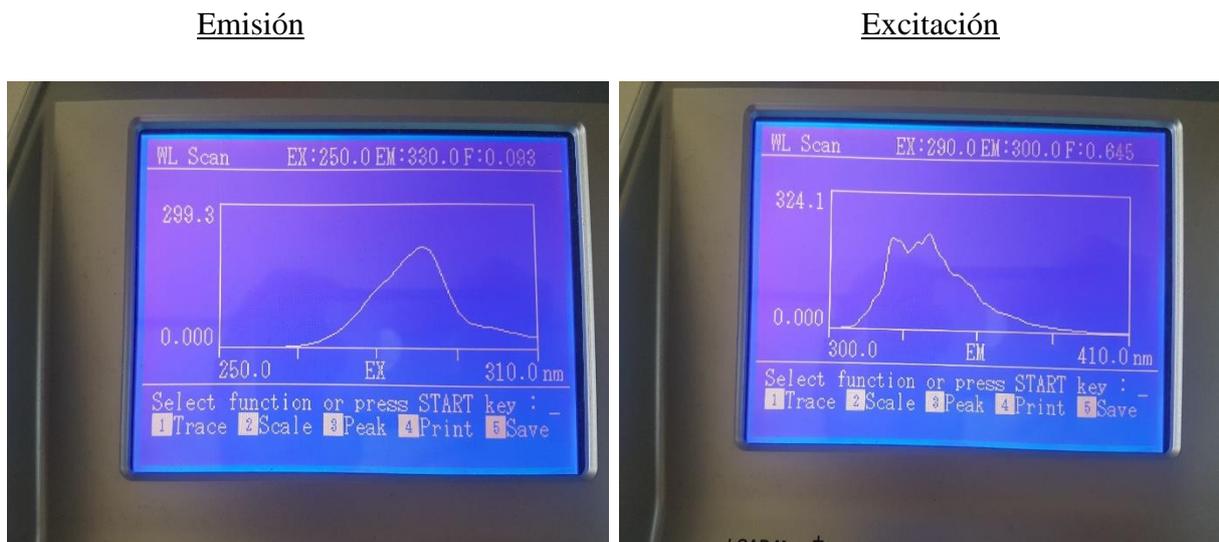
Fig. 7. Espectro de emisión y excitación del Naftaleno y molécula

En la Fig, 7 se observa el valor de excitación a 289 nm y los de emisión a 324 nm y 336 nm.

- En el equipo Shimadzu RF-1501 se observan los siguientes espectros:



- Con el equipo Hitachi F-2700 se obtiene el siguiente espectro:



Se obtienen los siguientes resultados:

		NAFTALENO							
		TEÓRICO (nm)	EXPERIMENTAL (nm)						
			SHIMADZU RF-1501				HITACHI F-2700		
Excitación	289	282	281	281	282	289	289	289	289
	324	326	325	326	325	323	323	323	323
Emisión	336	332	331	332	331	336	336,5	336,5	336,5

El valor teórico del pico de excitación aparece a 289 nm, para el Shimadzu haciendo la media de las cuatro medidas nos saldría a 281,5 y en el Hitachi a 289. El Hitachi vemos que coincide perfectamente mientras que, en este caso, es el Shimadzu el que se aleja de la medida.

Los picos de emisión aparecen a 324 nm y 336 nm, en el equipo Shimadzu los tenemos a 325,5 nm y 331,5 nm y en el Hitachi a 323 nm y 336,375 nm. En este caso los dos están dentro de los márgenes marcados por los equipos.

RODAMINA B

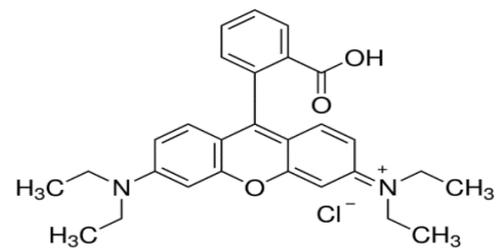
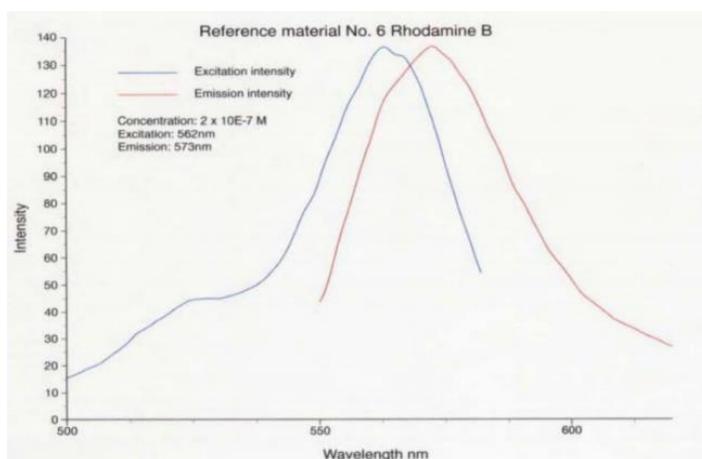
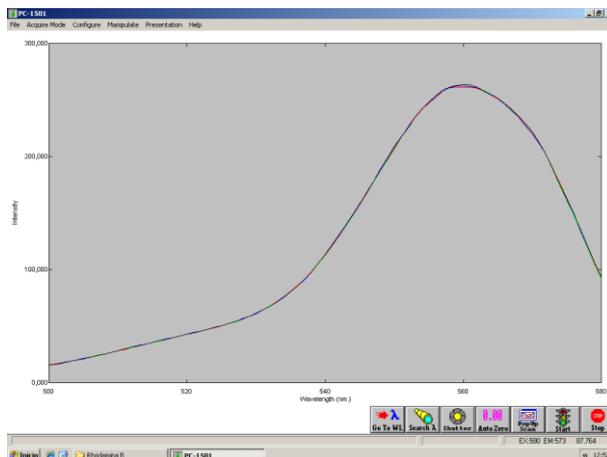


Fig 8. Espectro de emisión y de excitación de la Rodamina B y molécula.

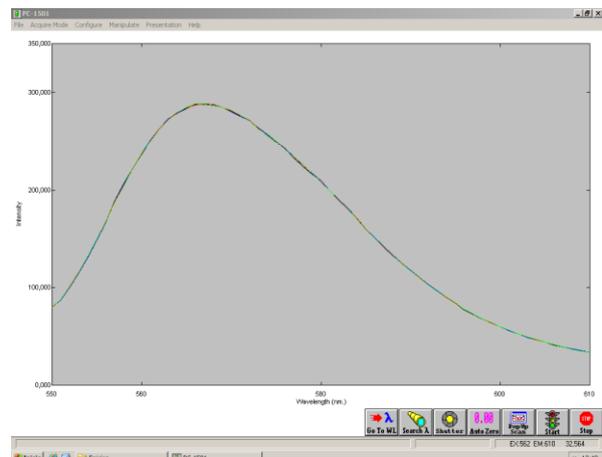
En la Fig. 8. Se observa la señal de excitación a 562 nm y la de emisión a 575 nm.

- El espectro obtenido por el Shimadzu RF-1501:

Excitación



Emisión



- Con el Hitachi F-2700 se obtienen los siguientes espectros:

Emisión

Excitación



Obtenemos los siguientes resultados:

RODAMINA B									
	TEÓRICO (nm)	EXPERIMENTAL (nm)							
		SHIMADZU RF-1501				HITACHI F-2700			
Excitación	562	560	560	559	560	564,5	564,5	564,5	564,5
Emisión	575	567	567	567	567	571	571	571	571

Para la Rodamina B, tenemos un valor teórico de excitación a 562 nm, obteniendo unos valores de 559,75 y 564,5 en el Shimadzu RF-1501 y en el Hitachi F-2700, respectivamente. Se ve que entran dentro de los valores esperados

En el caso de la emisión, el valor teórico es de 575 nm y nuestros valores experimentales aparecen en el Shimadzu RF-1501, a 567 nm y en el Hitachi F-2700 a 571. Un poco alejados ambos del valor teórico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se va a proceder a realizar los experimentos de los que se habló anteriormente, el Test Raman del Agua, Control de Cubetas y Linealidad con Sulfato de Quinina y con Fluoresceína.

TEST RAMAN DEL AGUA

El test Raman del agua es una buena medida de sensibilidad relativa entre diferentes instrumentos, siempre y cuando las condiciones experimentales comparando sistemas sean las mismas. Es un método de validación muy sencillo, consiste en calcular la relación Señal/Ruido (S/N) del pico Raman del agua. Es la combinación de un valor para la sensibilidad del sistema, una señal, con un valor para el ruido del sistema, mostrando el rendimiento general del instrumento. Hay varias maneras de manejar estos datos, todos válidos, pero darán resultados diferentes, por lo que es importante saber cómo se miden los valores de la señal y del ruido y cómo se trataron los datos y hacerlo igual. La señal aparece sobre 397 nm cuando excitamos a 350 nm. Esta relación se utiliza para especificar la sensibilidad, por lo que hay que definir como se mide el ruido que se puede calcular de varias formas diferentes.

El procedimiento a seguir ha consistido en recoger la emisión desde 365 nm a 460 nm excitando a 350 nm. El pico máximo obtenido sobre 397 nm es nuestra señal y el ruido se mide entre 420-460 nm, se van cogiendo máximos y mínimos de los picos que tenemos con la intención de hacer el ruido lo más lineal posible. En esta región no debería haber señal Raman, por lo que lo ideal sería un valor de señal cero de ruido.

En estas condiciones de medida deberíamos de obtener el espectro de la siguiente forma:

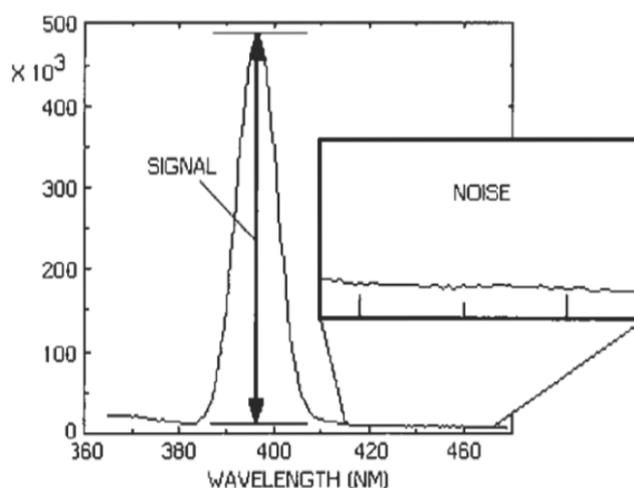


Fig. 9. Señal del Pico Raman del Agua y del ruido excitando a 350 nm.

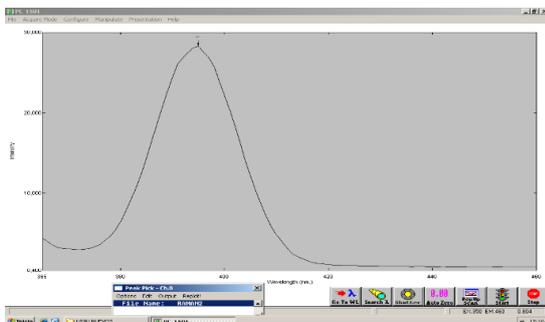
Una de las ventajas de este test radica en la facilidad de obtener agua purificada para su medida, es un estándar muy reproducible. Otra ventaja es que el desplazamiento en la longitud de onda para el agua excitando a 350 nm es bastante grande, de 47 nm. Por lo que hay una buena separación entre la dispersión Rayleigh y el pico Raman.

Para el tratamiento del resultado final obtenido de la señal respecto del ruido (S/N) se ha realizado de la siguiente forma: se ha obtenido la señal y posteriormente en la región comentada, se ha medido el ruido, midiendo máximos y mínimos, intentando obtener una señal del ruido lineal. [12, 16].

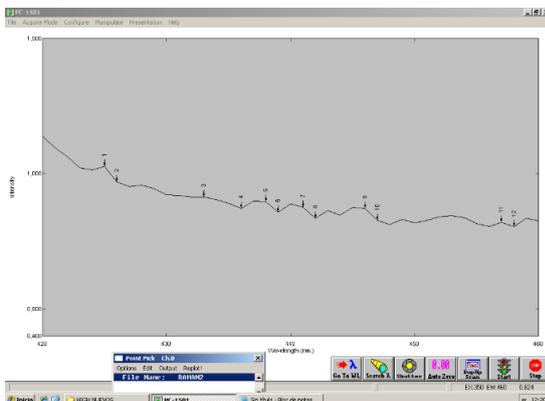
Realizamos cuatro pruebas por equipo calculando la relación señal/ruido (S/N) en cada prueba:

- **Shimadzu RF-1501:**

o Primera prueba:



Al obtener el espectro, se observa que la señal aparece a 395 nm con una intensidad de 28,287.



En la zona ampliada del ruido, como se ha comentado anteriormente, ponemos máximos y mínimos con la intención de hacer lineal la señal del ruido, siguiendo estas pautas se han elegido los siguientes datos:

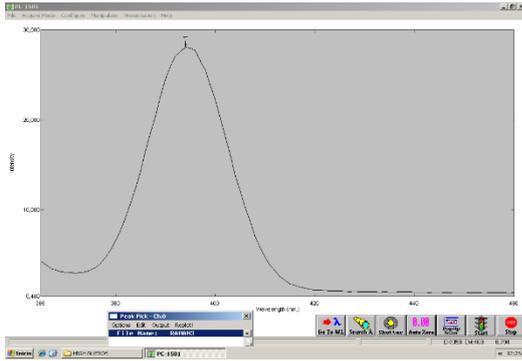
Nº	λ (nm)	I
1	425	1,027
2	426	0,970
3	433	0,915
4	436	0,873
5	438	0,898
6	439	0,859
7	441	0,876
8	442	0,836

9	446	0,873	10	447	0,829
11	457	0,821	12	458	0,805

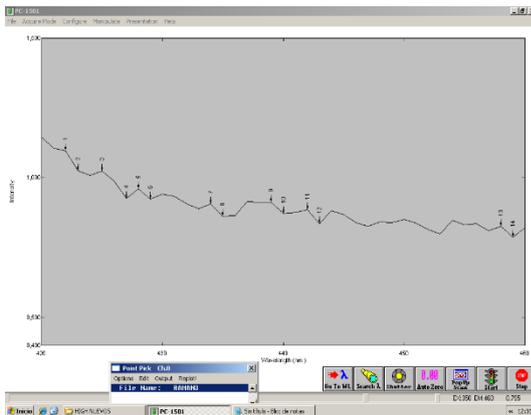
Se obtiene una media de la intensidad de la señal del ruido de 0,882.

$$\text{Relación } \frac{\text{Señal}}{\text{Ruido}} = \frac{28,287}{0,882} = 32,684$$

○ Segunda prueba:



Al obtener el espectro, se obtiene la señal a 394 nm con una intensidad de 28,110.



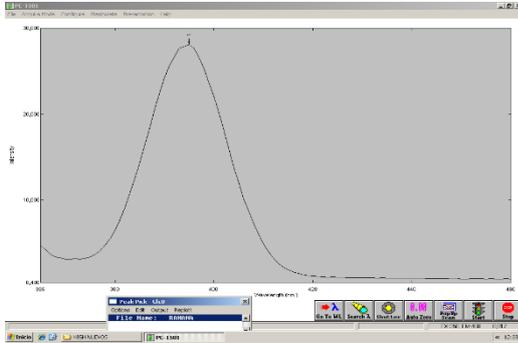
Los puntos elegidos para calcular la señal del ruido han sido los siguientes:

Nº	λ (nm)	I
1	422	1,096
2	423	1,026
3	425	1,023
4	427	0,926
5	428	0,961
6	429	0,924
7	434	0,907
8	435	0,862
9	439	0,913
10	440	0,873
11	442	0,885
12	443	0,835
13	458	0,826
14	459	0,787

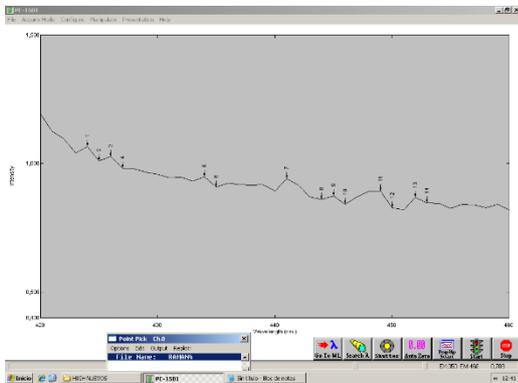
Se obtiene una media de la intensidad de la señal del ruido de 0,917.

$$\text{Relación } \frac{\text{Señal}}{\text{Ruido}} = \frac{28,110}{0,917} = 30,654$$

○ Tercera prueba:



La señal aparece a 395 nm con una intensidad de 28,099.



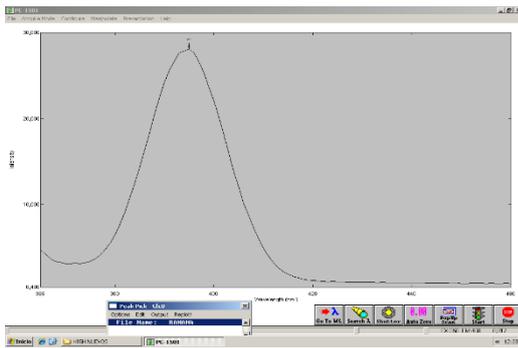
Los datos elegidos para buscar la linealidad del ruido han sido los siguientes:

Nº	λ (nm)	I
1	424	1,066
2	425	1,011
3	426	1,027
4	427	0,981
5	434	0,961
6	435	0,909
7	441	0,907
8	444	0,861
9	445	0,913
10	446	0,841
11	449	0,885
12	450	0,828
13	452	0,826
14	453	0,848

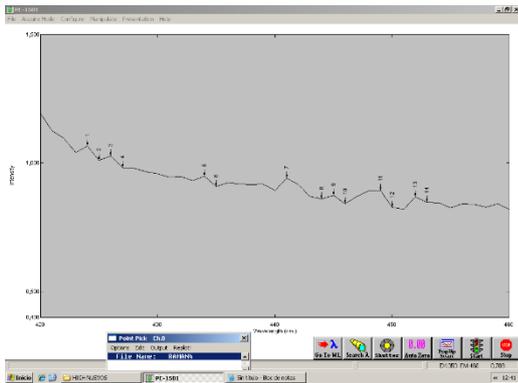
Se obtiene una media de la intensidad de la señal del ruido de 0,921.

$$\text{Relación } \frac{\text{Señal}}{\text{Ruido}} = \frac{28,099}{0,921} = 30,509$$

○ Cuarta prueba:



La señal aparece a 395 nm con una intensidad de 28,099.



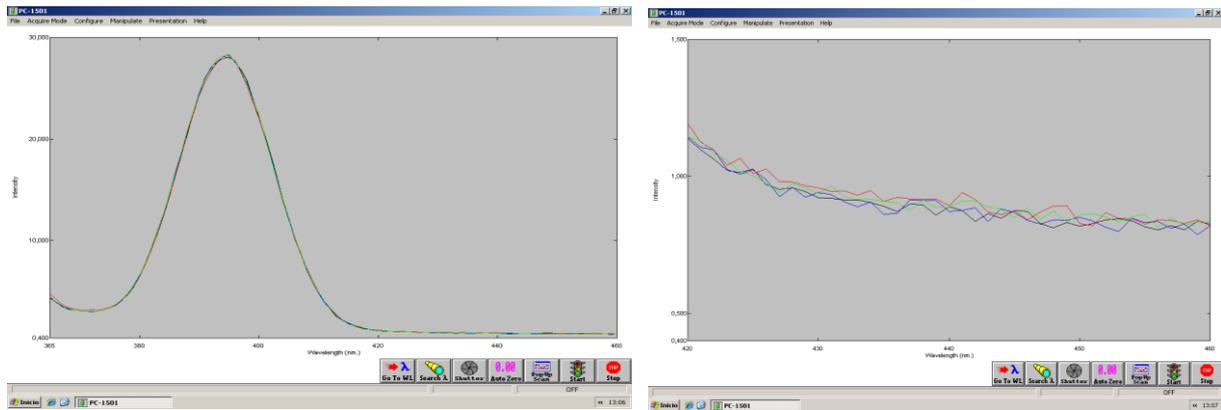
Los datos elegidos del ruido son los siguientes:

Nº	λ (nm)	I
1	428	0,974
2	430	0,937
3	431	0,967
4	433	0,916
5	438	0,915
6	439	0,888
7	446	0,886
8	447	0,844
9	448	0,874
10	449	0,834
11	455	0,862
12	4556	0,815
13	457	0,849
14	458	0,822

Se obtiene una media de la intensidad de la señal del ruido de 0,921.

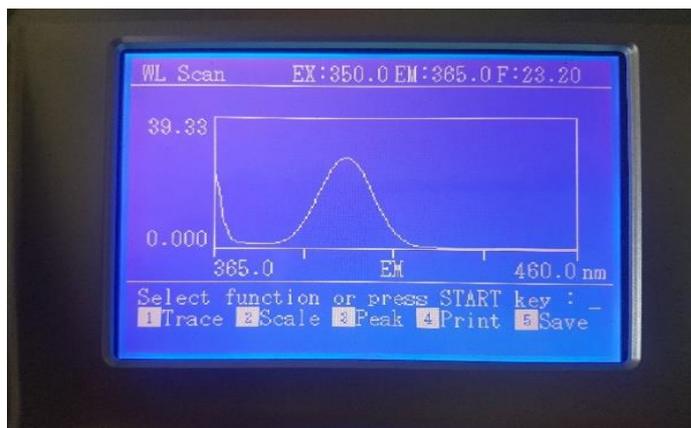
$$\text{Relación } \frac{\text{Señal}}{\text{Ruido}} = \frac{28,099}{0,921} = 30,509$$

A continuación, se muestran los cuatro espectros superpuestos, incluyendo la señal del ruido desde más cerca:



- **Hitachi F-2700:**

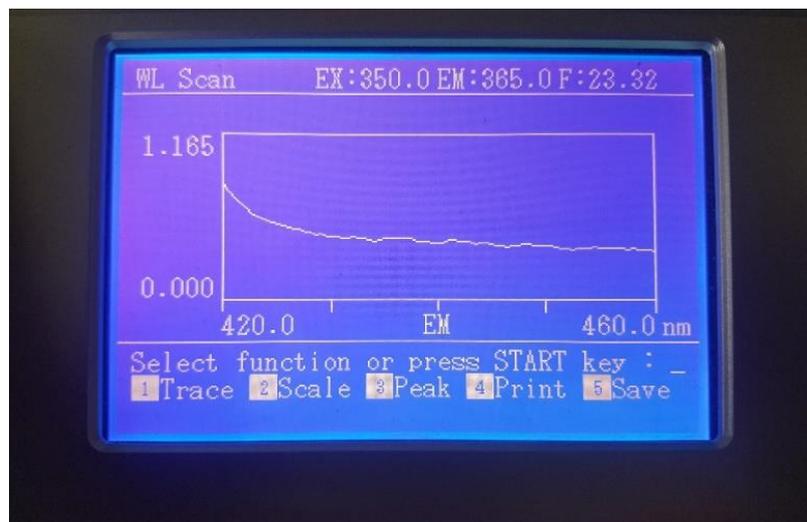
- o Primera prueba:



La señal del pico aparece a 400 nm con una intensidad de 27.70.

Las señales del ruido elegidas han sido las siguientes:

λ (nm)	I
429,5	0,451
433	0,433
434	0,416
437	0,438
438	0,416

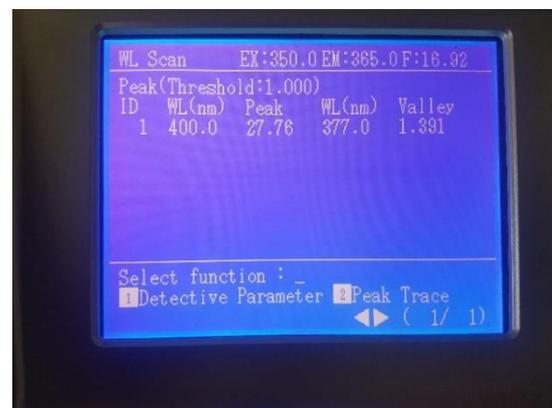
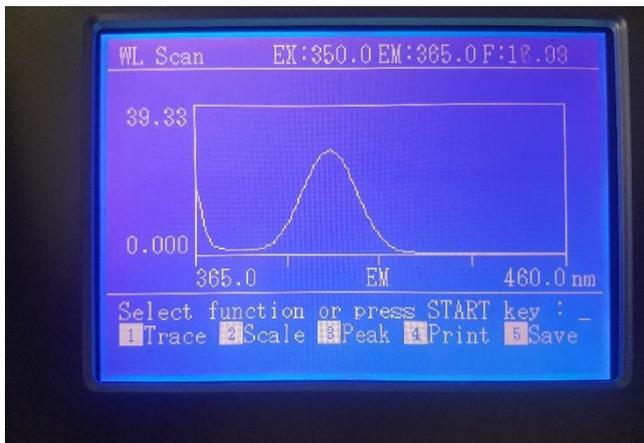


441,5	0,424
442	0,415
445,5	0,386
446,5	0,373
452	0,361
452,5	0,349
454,5	0,368
455	0,355
458,5	0,352
459	0,344

La señal media del ruido nos sale un valor de 0,393.

$$\text{Relación } \frac{\text{Señal}}{\text{Ruido}} = \frac{27,70}{0,393} = 70,483$$

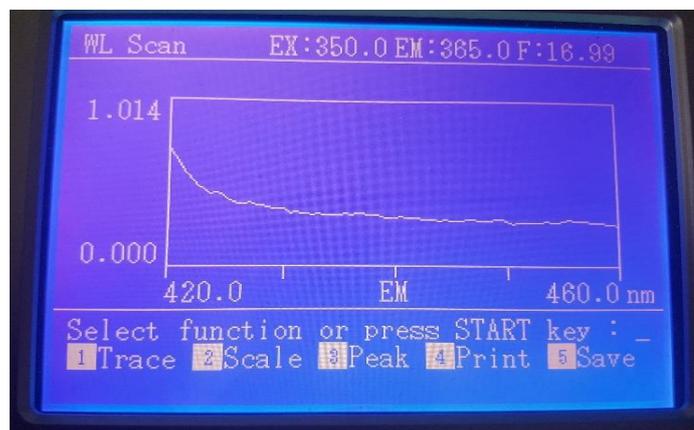
○ Segunda prueba:



La señal del pico está en 400 nm con una intensidad de 27.76.

Las señales del ruido elegidas son:

λ (nm)	I
423,5	0,440
424	0,443
426	0,381
430	0,346



430,5 0,325

432 0,326

432,5 0,317

437 0,321

437,5 0,311

438,5 0,309

439 0,298

444,5 0,284

445,5 0,277

449,5 0,286

450 0,276

450,5 0,251

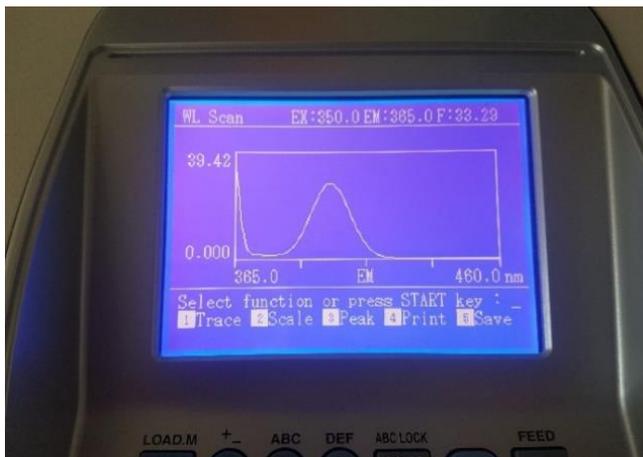
459 0,260

460 0,249

El valor medio de la señal del ruido es de 0,317.

$$\text{Relación} \frac{\text{Señal}}{\text{Ruido}} = \frac{27,76}{0,317} = 87,571$$

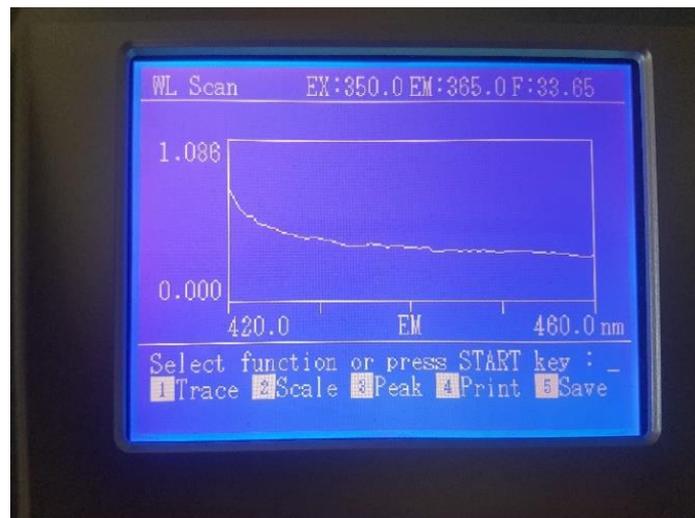
- Tercera prueba



Se obtiene la señal del pico a 399,5 nm con una intensidad de 27.78.

Las medidas del ruido:

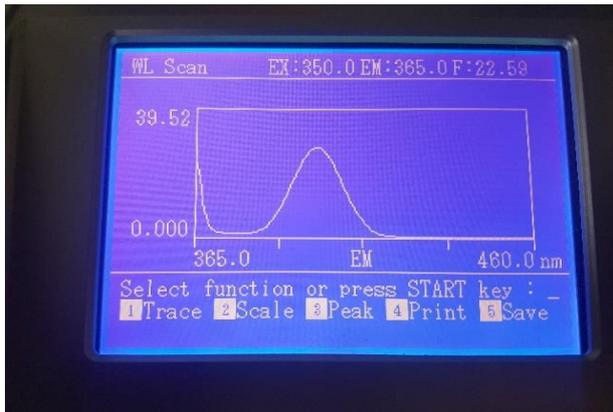
422,5	0,574
423	0,541
427	0,456
427,5	0,441
431	0,421
431,5	0,403
436,5	0,383
437,5	0,366
442	0,363
442,5	0,337
445	0,347
445,5	0,347
448	0,349
448,5	0,332
454	0,329
455	0,318
458	0,305
458,5	0,293



La media de la señal del ruido es de 0,364

$$\text{Relación } \frac{\text{Señal}}{\text{Ruido}} = \frac{27,78}{0,364} = 76,319$$

○ Cuarta prueba:



La señal del pico aparece a 400 nm con una intensidad de 27.83.

Las señales del ruido:

λ (nm)	I
424,5	0,424
425	0,405
426	0,404
426,5	0,386
427,5	0,365
428	0,351
430	0,335
430,5	0,324
432	0,335
432,5	0,322
444,5	0,301
445,5	0,284
446	0,264
456,0	0,262
457,0	0,248



La media de la señal del ruido es de 0,334.

$$\text{Relación} \frac{\text{Señal}}{\text{Ruido}} = \frac{27,83}{0,334} = 83,323$$

Se van a recopilar todos los datos juntos en la siguiente tabla:

Shimadzu RF-150		
Señal (nm)	Ruido	S/N
395	0,882	32,684
394	0,917	30,654
395	0,921	30,509
395	0,884	31,906
Hitachi F-2700		
400	0,393	70,483
400	0,317	87,571
399,5	0,364	76,319
400	0,334	83,323

Según las especificaciones de los equipos, el Shimadzu RF-1501 tiene una precisión en la medida de la longitud de onda de ± 5 y el Hitachi F-2700 de ± 3 . El pico de la señal debería aparecer a 397 nm por lo que el Shimadzu estaría dentro de los límites y el Hitachi se quedaría a las puertas por 0,5 y 1 nm.

La señal del ruido se ve que es la mitad la del Hitachi en comparación con la del Shimadzu. Cuanto más ruido menor repetibilidad y sensibilidad y mayor límite de detección. Existen muchas fuentes de ruido: puede ser electrostático/electromagnético de 50Hz, esto es debido a cables mal blindados, malas conexiones de tierra, transformadores en las cercanías del equipo, cercanías de emisores de radio como puede ser el móvil o por no usar jaulas de Faraday en el sistema a medir. También puede venir por una mala regulación de las fuentes de alimentación, algunos equipos de bajo coste no regulan bien los voltajes internos y aparecen en las mediciones, por lo que habría que modificar o cambiar el equipo por otro. Otra causa que puede afectar son los mismos componentes electrónicos, incluso en un equipo de buena calidad, la naturaleza discreta de los electrones y la tecnología de fabricación de los semiconductores producen un ruido de fondo que siempre está, aunque se va perfeccionando con las nuevas tecnologías.

La relación señal ruido en el Shimadzu es muy parecido debido a que se va aproximando a 1 pero en comparación la señal del ruido es el doble, por lo que hay bastante diferencia.

En el Hitachi varía más, pero tenemos datos muy parecidos, el objetivo de toda medición es minimizar el ruido para poder medir más precisamente la señal. La relación señal-ruido tiene un valor de entre 250 y 300, sería el dato que se obtendría si el ruido se minimizase a menos de 0,1, por lo que se comprueba que la señal, aunque no salga tan exacta como nos gustaría, si no tuviesen ese ruido los equipos, nos daría el dato esperado.

CONTROL DE CUBETAS

Para el control de cubetas necesitamos utilizar la misma cubeta para todas las medidas, se debe verificar la transparencia y la simetría.

El objetivo de este experimento es registrar unos valores aproximadamente iguales de medidas de dispersión. Para ello se realiza un set de 4 medidas de la fluorescencia de una disolución patrón, que es sulfato de quinina de 500 ppb, y se ha modificado la orientación de la cubeta, se han realizado 5 medidas por cada posición, es decir, 20 medidas en total. Posteriormente se ha hecho la misma prueba con una disolución de sulfato de quinina de 100 ppb, diluyendo la anterior.

Se hace el experimento con una longitud de excitación de 348 nm y de emisión de 448 nm, estas longitudes de onda han sido seleccionadas por una práctica de sulfato de quinina en agua tónica que se realiza en la Universidad de Granada.

Se va a proceder a calcular la desviación típica como medida de dispersión utilizando la siguiente fórmula: [12]

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}}$$

Se han obtenido los siguientes valores para la solución patrón de sulfato de quinina de 500 ppb:

Shimadzu RF-1501

	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4
	6,448	6,660	6,662	6,683
	6,483	6,651	6,667	6,669
	6,495	6,656	6,666	6,666
	6,506	6,659	6,654	6,688
	6,505	6,657	6,652	6,681
Media	6,487	6,656	6,660	6,677
Desviación estándar	0,024	0,003	0,007	0,009

Hitachi F-2700

	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4
	5,808	5,826	5,952	5,968
	5,809	5,823	5,950	5,966
	5,804	5,821	5,952	5,968
	5,798	5,817	5,952	5,969
	5,794	5,823	5,955	5,965
Media	5,803	5,822	5,952	5,967
Desviación estándar	0,006	0,003	0,002	0,002

Para la disolución a 100 ppb de sulfato de quinina, se ha diluido la disolución patrón de 500 ppb añadiéndole 5 ml de H₂SO₄ y enrasando con agua.

Shimadzu RF-1501

	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4
	6,687	6,710	6,728	6,747
	6,687	6,709	6,726	6,746
	6,688	6,713	6,721	6,747
	6,688	6,713	6,727	6,747
	6,685	6,710	6,724	6,744
Media	6,683	6,711	6,725	6,746
Desviación estándar	0,001	0,002	0,003	0,001

Hitachi F-2700

	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4
	1,333	1,334	1,344	1,325
	1,333	1,336	1,341	1,326
	1,333	1,334	1,338	1,328
	1,335	1,334	1,341	1,324
	1,336	1,332	1,341	1,327
Media	1,334	1,334	1,341	1,326
Desviación estándar	0,001	0,001	0,002	0,002

Primero obtenemos el valor de la media que es el valor esperado y, posteriormente, la desviación típica, que es lo que varían los datos reales obtenidos del valor esperado. Cuanta menor desviación típica más preciso es el equipo.

Los equipos tienen una sensibilidad de $\pm 0,001$.

Comparando resultados podemos observar que para valores de concentraciones más pequeñas los resultados son mejores, existe una diferencia entre la disolución de 500 ppb y la disolución de 100 ppb, obteniendo mejores resultados de la disolución de menor concentración, aunque vemos que los resultados del equipo nuevo en la disolución de 500 ppb, salen ya muy próximos a los de la disolución de 100 ppb.

En el caso de la solución patrón de 500 ppb se observa una mayor diferencia entre el equipo antiguo y el equipo nuevo. Esto se debe al ser una concentración “alta” para la medida.

En la disolución ya diluida de 100 ppb se ve que los resultados están más próximos en su valor de desviación típica, aunque siguen saliendo más precisas las mediciones con el equipo nuevo.

LINEALIDAD

La linealidad es un método analítico capaz de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado.

Es la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta del método en un rango de concentraciones. El ensayo de linealidad lo hemos realizado en concentraciones crecientes del analito. Este procedimiento se conoce como curva de calibración o curva de calibrado. Se ha realizado con sulfato de quinina y con fluoresceína. Se van a realizar cinco medidas con cada concentración.

SULFATO DE QUININA



A partir de una disolución de 500 ppb de sulfato de quinina preparamos cinco disoluciones, un patrón, es decir, de 0 ppb, una de 20 ppb, una de 40 ppb, una de 60 ppb y una de 80 ppb.

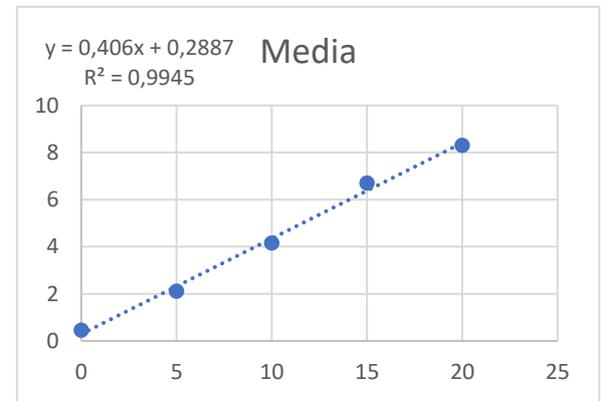
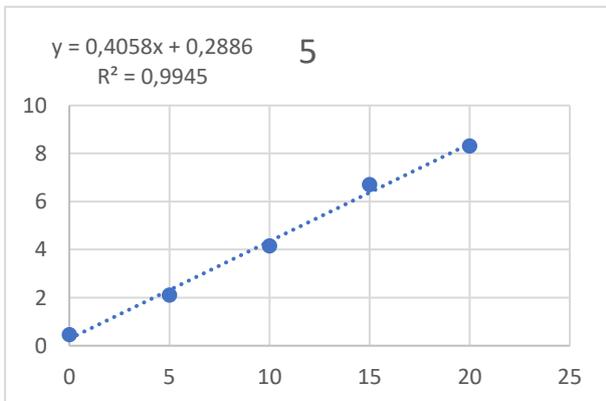
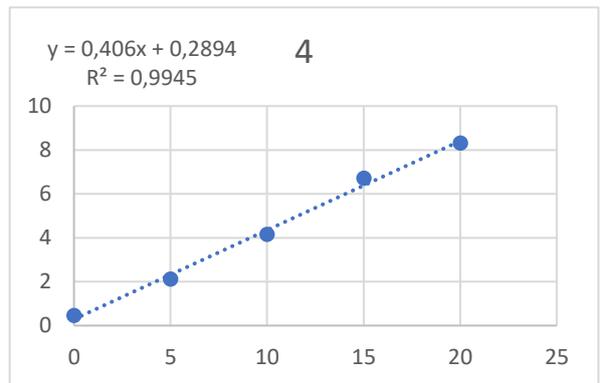
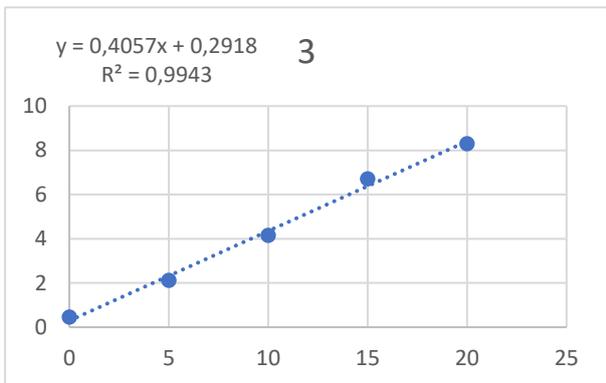
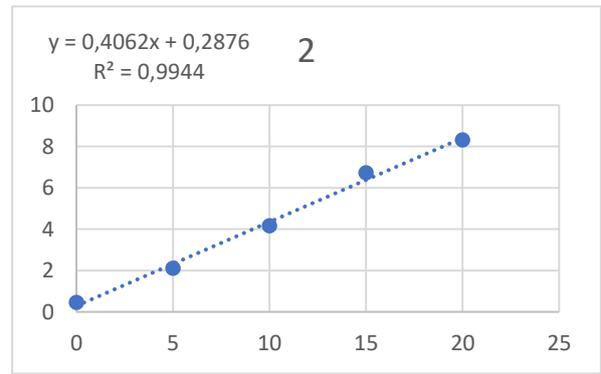
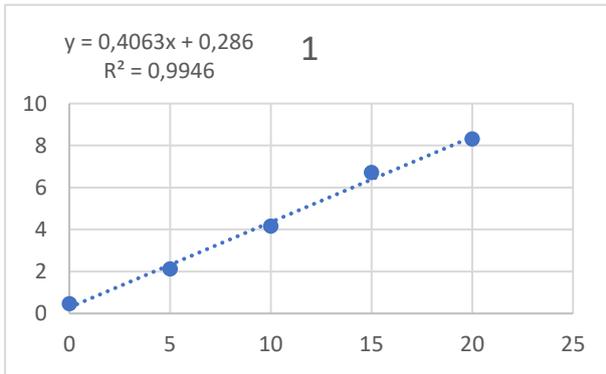
Se utilizó una longitud de onda de excitación a 348 nm y de emisión a 448 nm, datos extraídos de una práctica realizada en la Universidad de Granada sobre análisis de quinina en tónica.

Fig. 10. Cubeta con la disolución de sulfato de Quinina en el Hitachi F-2700

- **Shimadzu RF-1501**

Concentración (ppb)	1	2	3	4	5	Media
0	0,454	0,457	0,459	0,457	0,458	0,457
5	2,114	2,112	2,119	2,113	2,11	2,1136
10	4,155	4,153	4,148	4,158	4,155	4,1538
15	6,707	6,717	6,716	6,712	6,704	6,7112
20	8,315	8,31	8,304	8,308	8,306	8,3086

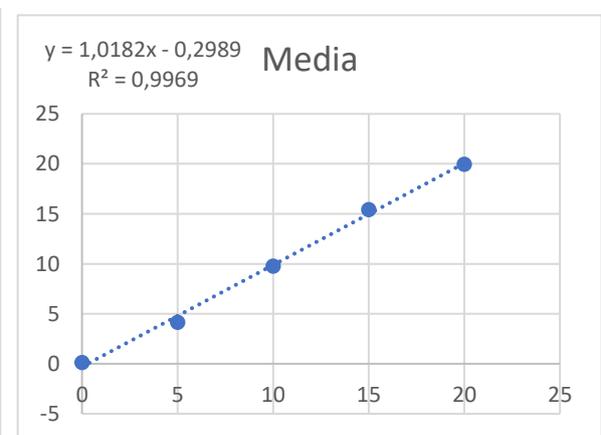
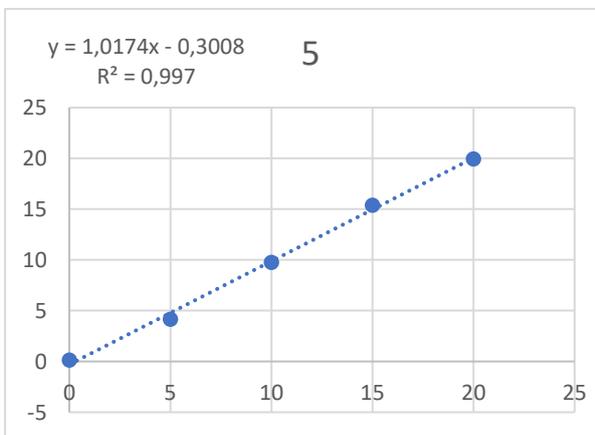
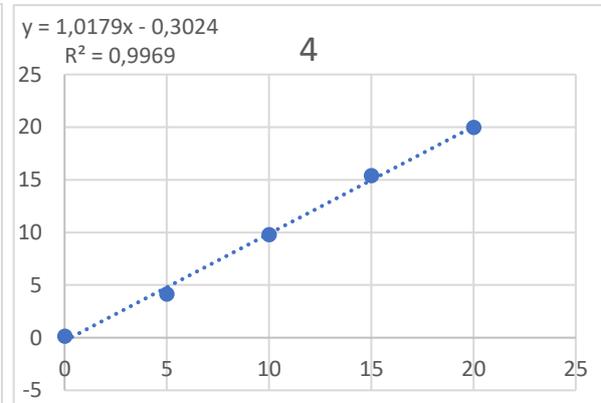
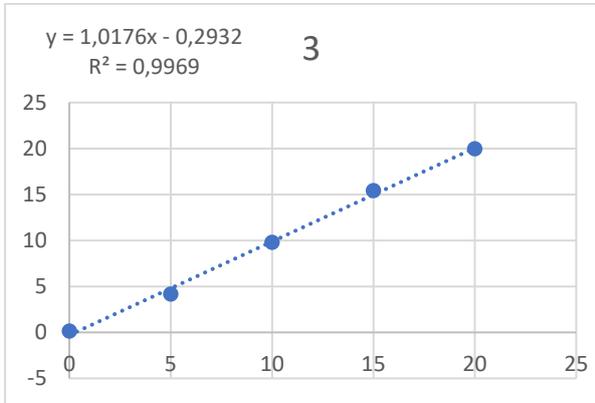
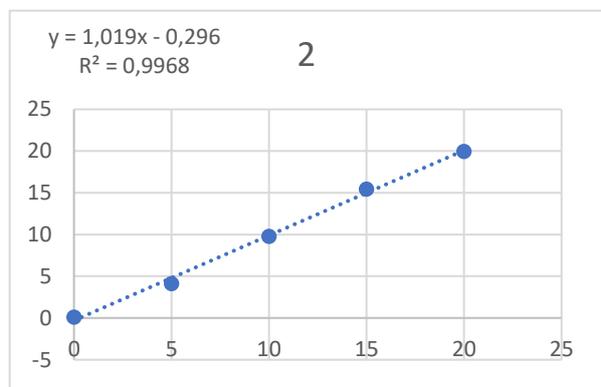
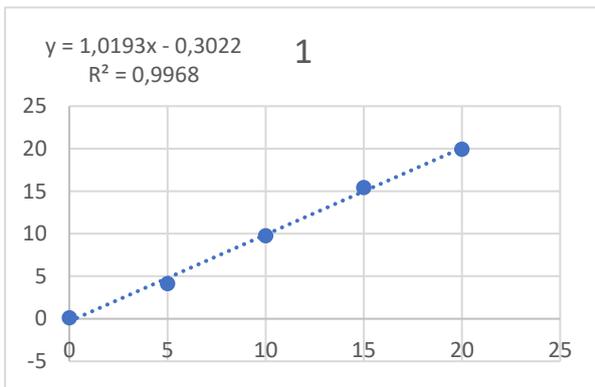
Realizamos las curvas de calibrado:



- **Hitachi F-2700**

Concentración (ppb)	1	2	3	4	5	Media
0	0,126	0,129	0,126	0,125	0,128	0,1268
5	4,142	4,154	4,158	4,147	4,153	4,1508
10	9,787	9,785	9,78	9,769	9,756	9,7754
15	15,44	15,44	15,41	15,39	15,38	15,412
20	19,96	19,96	19,94	19,95	19,95	19,952

Las rectas de calibrado:



Viendo las rectas de los experimentos en ambos equipos se ve el valor de r^2 , para ser una relación lineal exacta tiene que ser el valor igual a 1, si la recta es creciente, o -1 si la recta es decreciente. Si el valor de r es igual a 0 indica que no existe relación lineal. Cuanto más cercano sea el valor a 1 tendrá una relación lineal más fuerte.

En nuestro caso obtenemos con ambos equipos una regresión de 0,99 por lo que se aproxima a 1 y podemos dar por válidos los resultados obtenidos. Sale 0,997 en el equipo nuevo salen los resultados un poco mejores, vemos por ejemplo la señal del ruido, en el equipo nuevo sale a 0,127 y en el equipo viejo a 0,457. Se puede ver que hay una reducción amplia de la señal del ruido, mejorando los resultados del equipo.

FLUORESCÉINA SÓDICA



La fluoresceína sólida se ha disuelto en etanol 96% para obtener las siguientes concentraciones: 0 ppb (blanco), 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb y 20 ppb.

En primer lugar, se realizó el espectro de emisión excitando a 498 nm y obteniendo el espectro de emisión en el rango entre 350 y 670 nm, con el fin de obtener el valor de la emisión máxima, el cual nos aparece a 520,5 nm.

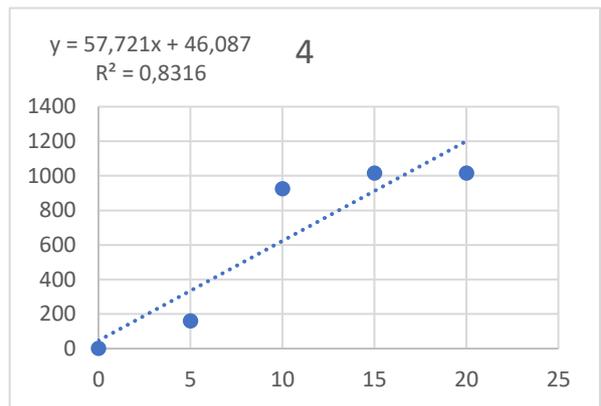
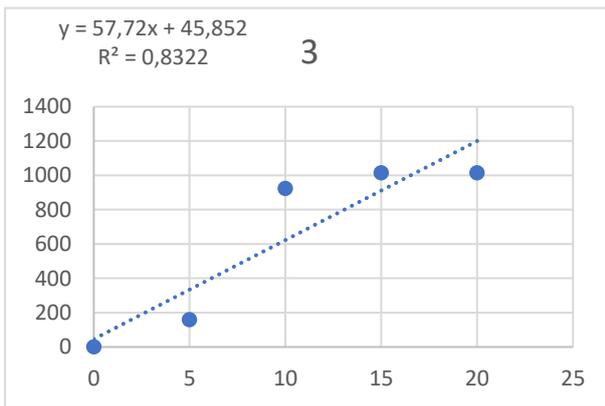
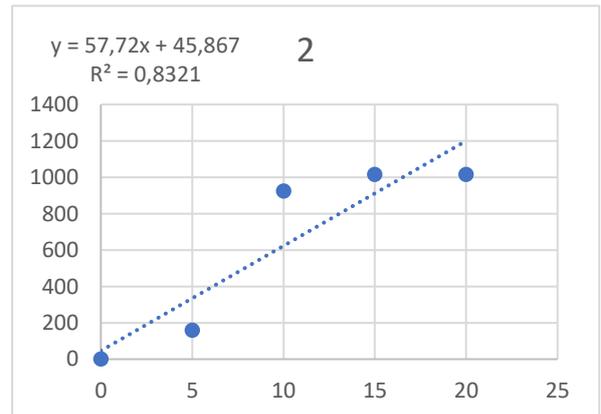
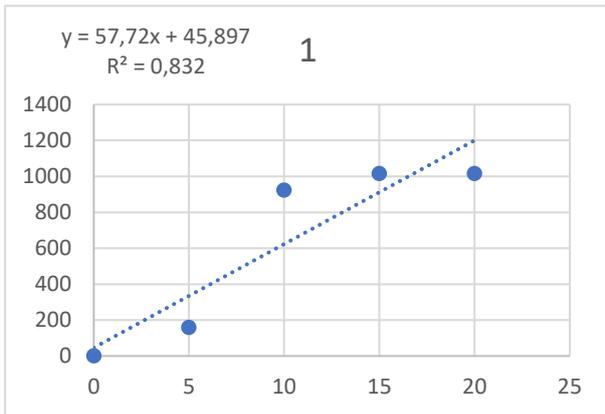
Fig. 11. Disoluciones de fluoresceína sódica

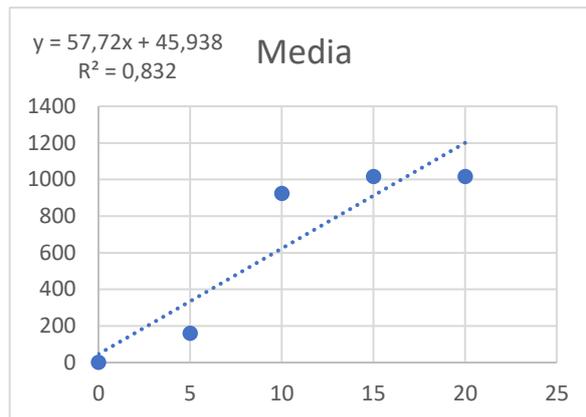
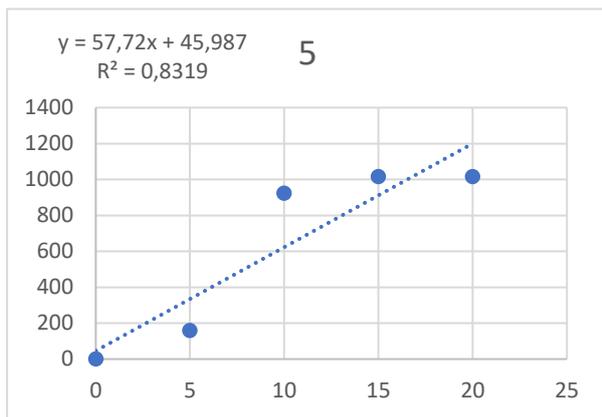
Después, sabiendo el valor de emisión máxima, se realizó el espectro de excitación con el valor de la emisión a 520,5 nm obtenido anteriormente, y los valores de la excitación para la obtención del espectro en el rango de 350 a 670 nm. Se obtiene la excitación máxima a 498,5 nm. Una vez comprobados estos dos valores y viendo que coincidían son los que se han utilizado para el experimento.

- **Shimadzu RF-1501:**

Concentración (ppb)	1	2	3	4	5	Media
0	0,407	0,408	0,408	0,41	0,408	0,4082
5	159,834	159,849	159,872	159,819	159,857	159,8462
10	924,152	923,975	923,848	925,126	924,549	924,33
15	1015,556	1015,552	1015,564	1015,557	1015,551	1015,556
20	1015,558	1015,56	1015,558	1015,558	1015,552	1015,5572

Se obtienen las siguientes curvas de calibrado:

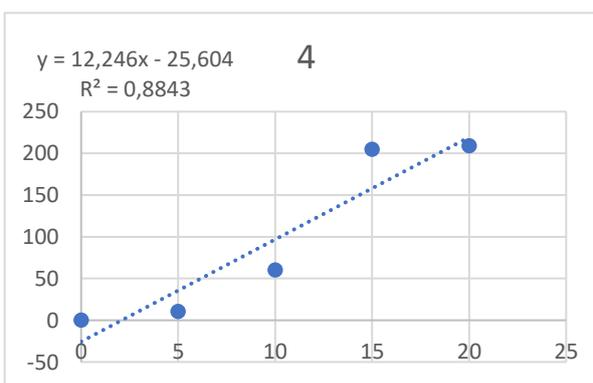
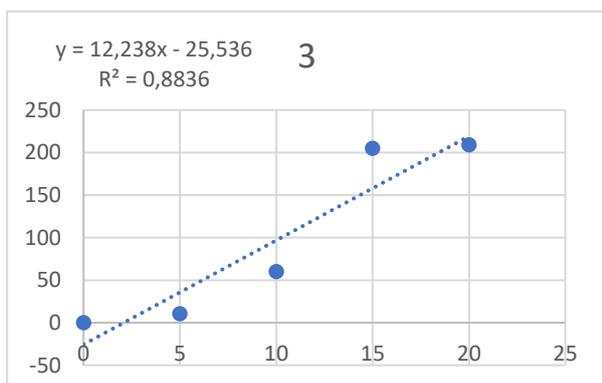
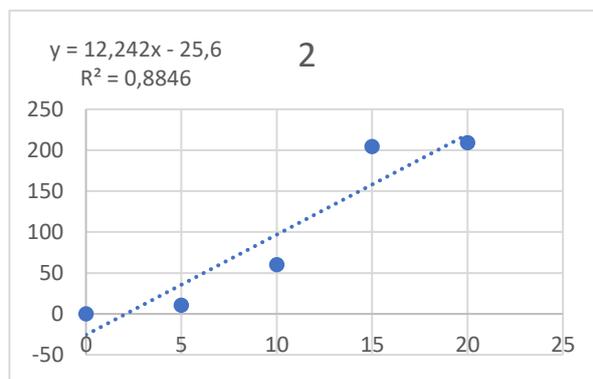
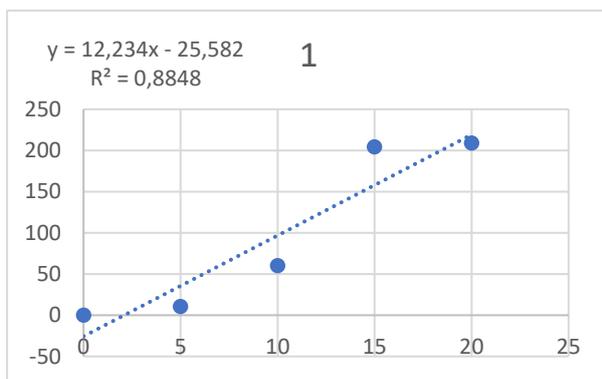


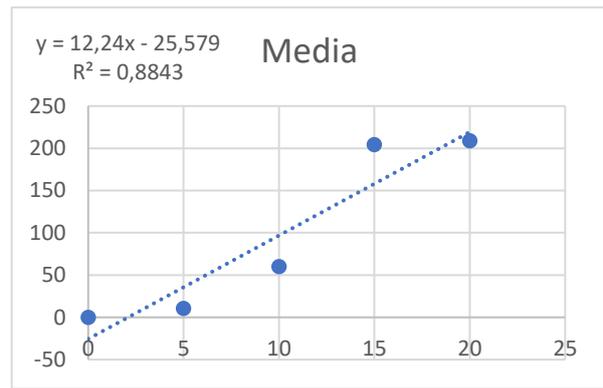
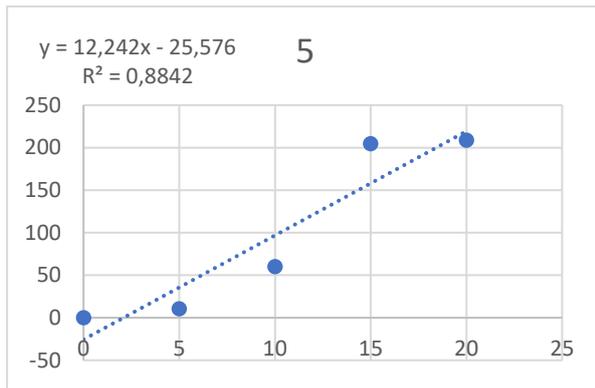


- **Hitachi F-2700:**

Concentración (ppb)	1	2	3	4	5	Media
0	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,0038
5	10,5	10,49	10,5	10,48	10,5	10,494
10	60,08	60,11	60,11	60,11	60,11	60,104
15	204,2	204,4	204,8	204,6	204,6	204,52
20	209	209,1	208,8	209,1	209	209

Se obtienen las siguientes curvas de calibrado:





En ambos equipos se observa que cuando la concentración es de 15 ppb y 20 ppb, no tienen suficiente potencia los equipos para medir la intensidad de fluorescencia de la disolución. La disolución de fluoresceína pasada esa concentración de ppb, se necesitaría un equipo que midiese una intensidad más potente.

Por lo que se comprueba que el equipo es correcto para medidas a bajas concentraciones, a altas concentraciones (dependiendo el producto y su fluorescencia) no se podrían dar resultados con garantías.

KIT DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE FLUORESCENCIA ESPECTRAL

Se va a comentar acerca de una herramienta simple y certificada para normalizar las características espectrales de los instrumentos de fluorescencia, es un experimento que no se pudo realizar al adquirir el Bam F-005, pero no tener el software para hacerlo funcionar.

Con el KIT del BAM-F001 – BAM-F005, han conseguido desarrollar una herramienta simple para caracterizar la respuesta espectral relativa y la estabilidad a largo plazo del canal de emisión de los instrumentos de fluorescencia. Este método se da en unas condiciones de medida rutinarias. Se proporciona una base para una mejor comparabilidad de las medidas de fluorescencia y de la estandarización. Estos patrones de fluorescencia trazables, que unen medidas de fluorescencia a la escala de radiación espectral en el rango de 300-770 nm y que se han optimizado para espectrofluorímetros, se pueden emplear para diferentes medidas geométricas y pueden ser adaptados para diferentes técnicas de fluorescencia, siempre y cuando cumplan adecuadamente con los principios de medida.

Las técnicas de luminiscencia que son usadas en las ciencias de la vida y de los de materiales, como en análisis medioambientales, han necesitado obtener una mejora en los datos, mejorando fiabilidad y comparabilidad, como en la cuantificación y también en la normalización. Estos datos son necesarios para aplicaciones en áreas reguladas e importantes como pueden ser para diagnósticos médicos, en los cuáles hay que tener exactitud.

Para descartar la instrumentación como una fuente de variabilidad y mejorar la comparabilidad de las medidas de fluorescencia entre los instrumentos y en el tiempo, se necesitan unos estándares para combinarlos con protocolos ya probados para caracterizar los instrumentos y validar el rendimiento. Como un primer paso, hacia las herramientas de calibración simples y multifuncionales de instrumentos de fluorescencia que unen mediciones de luminiscencia a unidades radiométricas, se desarrolla el Kit de Calibración Estándar de Fluorescencia Espectral BAM F-001 – BAM-F005, donde se incluye el software LINKCORR.

Este Kit permite la determinación de la respuesta espectral relativa, $s(\lambda)$, y de la estabilidad a largo plazo del canal de emisión de los instrumentos de fluorescencia en el rango espectral de 300-770nm. De esta manera se proporciona una base para la corrección espectral, es decir, espectros de emisión independientes del instrumento.

Esta herramienta de calibración fue probada en una comparación entre los laboratorios de los Institutos Metrológicos Nacionales NIST, NRC, PTB y BAM¹⁷ Siendo certificada en 2006.

A continuación, se va a explicar el principio del funcionamiento del Kit de BAM-F001 – BAM-F005 y los criterios para el diseño de este Kit de Calibración. También se van a explicar las propiedades relevantes para la aplicación del Kit.

ANÁLISIS EXPERIMENTAL

En este apartado se van a ver los solutos y reactivos utilizados, el instrumento que fue el CARY 5000, el procedimiento y los resultados del análisis del Kit.

SOLUTOS Y REACTIVOS

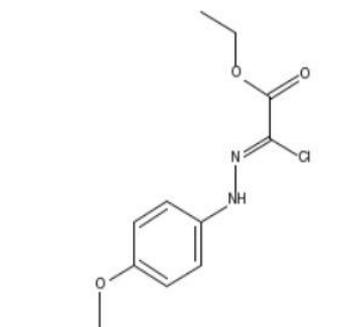
El Kit incluye las cinco botellas de muestras con el BAM-F001 hasta el BAM-F005, también contiene una botella de disolvente etanol y el software LINKCORR para la evaluación de los datos.

Nosotros hemos adquirido el BAM-F005 que es el Etil 2-cloro-2-(2-(4-metoxifenil) hidrazona) acetato que vemos en la Fig.12.

Este software LINKCORR, fue desarrollado por BAM, para el cálculo de la respuesta espectral relativa (inversa) de los instrumentos de fluorescencia que ellos certificaron corrigiendo el espectro de emisión de los colorantes del Kit y los espectros de fluorescencia no corregidos que se habían medido con el instrumento calibrado. El software Linkcorr ha sido probado con éxito en diferentes instrumentos de fluorescencia y en diferentes sistemas de exposición, así como por diferentes operadores y usuarios.

Para la curva de corrección de la emisión de humedad se han utilizado los colorantes X, Y y el sulfato dihidratado de quinina (QS). Los espectros de emisión de fluorescencia corregidos son de la mayor pureza disponible. Fueron obtenidos de Sigma-Aldrich GmbH y del NIST.

Los disolventes etanol, acetonitrilo y ácido perclórico utilizados para los colorantes X,Y y QS, respectivamente, tenían la mayor pureza posible y fueron obtenidos el etanol y el acetonitrilo de Sigma-Aldrich GmbH y de Merck.



*Fig. 12. BAM-F005.
Etil 2-cloro-2-(2-(4-metoxifenil) hidrazona) acetato.*

EQUIPO

El fotómetro usado fue el CARY 5000 de Varian Inc. y registró los espectros de absorción. Los espectros corregidos de emisión del BAM-F001 – BAM-F005 se obtuvieron tras una previa medida con el espectrofluorímetro Spectronics Instruments 8100. La longitud de onda y la polarización, dependientes de la respuesta espectral (λ) de dicho fluorímetro, fueron determinados con un estándar de transferencia de radiación espectral de tipo esférico, una lámpara de halógeno de cuarzo colocada dentro de una esfera integrante, Gigahertz-Optik GmbH.

Ambos estándares de transferencia fueron calibrados por el Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB).

PROCEDIMIENTO

Todas las medidas de absorción y emisión fueron medidas a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Las disoluciones de colorante usadas tenían unas absorbancias (A) de $0,04 \pm 0,02$ con respecto a la longitud de onda de excitación equivalente al máximo de absorción máxima usada, certificada por el BAM. Los espectros de emisión corregidos certificados del BAM-F001 – BAM-F005 fueron medidos en etanol a 25°C con tres diferentes bandas espectrales de emisión del monocromador de emisión del fluorímetro, que fueron a 1, 4 y 8 nm. (Fig. 13.).

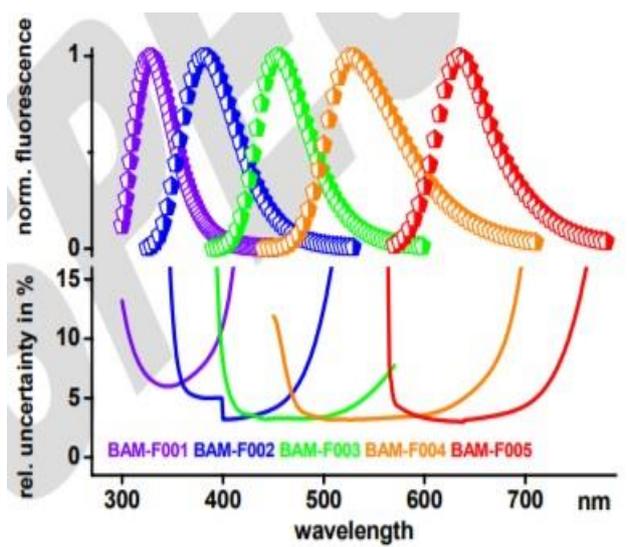


Fig. 13. Emisión de los espectros de emisión corregidos de BAM-F001 – BAM-F005 en la parte superior. En la parte inferior se ven las incertidumbres relativas ampliadas, utilizando un factor de expansión de $k=2$ correspondiente a un intervalo de confianza de aproximadamente 95%. Medido con el espectrofluorímetro SLM 8100.

Previo a la corrección de la respuesta espectral relativa $s(\lambda)$ del canal de emisión, se obtuvo un espectro de fondo $[I_b(\lambda_{em})]$, obtenido en las mismas condiciones para una muestra del blanco del disolvente, del espectro medido $[I_m(\lambda_{em})]$, eliminando la dispersión, la fluorescencia del disolvente y la oscuridad del detector. La corrección de los espectros de emisión no corregidos $[I_u(\lambda_{em}) = I_m(\lambda_{em}) - I_b(\lambda_{em})]$ para $s(\lambda)$ fue obtenida por la división de $I_u(\lambda_{em})$ entre la relativa respuesta espectral del canal de emisión obtenido con estándares de transferencia física (PTS). Los resultados de los espectros de emisión de fluorescencia corregidos $[I_c(\lambda_{em})]$, que han sido basados en los PTS y certificados por el BAM, son trazables a la escala de radiación espectral.

La caracterización del instrumento con BAM-F001 – BAM-F005 y el software LINKCORR siempre da la respuesta inversa espectral relativa del instrumento: $\frac{1}{s(\lambda)}$, denominada curva de corrección de emisión. En el caso de una corrección de emisión basada en un colorante del kit, los espectros de emisión corregida son obtenidos mediante una multiplicación de $[I_u(\lambda_{em})]$ por $\frac{1}{s(\lambda)}$. Estos espectros son trazables a la escala de radiación espectral.

Como se ha comentado anteriormente, la respuesta específica de los instrumentos de fluorescencia del software LINKCORR es recíproco a la salida, es decir, $\frac{1}{s(\lambda)}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EFFECTOS DEL INSTRUMENTO EN LAS SEÑALES DE FLUORESCENCIA

Las técnicas de luminiscencia siempre producen señales $I_u(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ que contienen contribuciones específicas del instrumento y de la muestra:

$$I_u(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \alpha(\lambda_{ex}) F_\lambda(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) E_{ex, \lambda}(\lambda_{ex}) s(\lambda_{em})$$

Las propiedades relevantes del analito para la señal son la absorbancia del cromóforo en la excitación de la longitud de onda, $\alpha(\lambda_{ex})$, y su fluorescencia espectral $F_\lambda(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$. Los efectos específicos del instrumento incluyen la irradiancia espectral en la posición de muestra, $E_{ex, \lambda}(\lambda_{ex})$, y la respuesta espectral del canal de emisión $s(\lambda_{em})$ ¹⁸.

Ambas son dependientes de la longitud de onda, de la polarización y del tiempo y reflejan la radiación espectral de la fuente de excitación de la luz, la transmitancia de componentes ópticos como pueden ser lentes, espejos, filtros, rejillas monocromatizadoras y polarizadores en el canal de emisión de excitación, y la respuesta espectral del sistema de detección del respectivo instrumento de fluorescencia.

Los datos comparables de fluorescencia en instrumentos como también el uso de espectros de fluorescencia para la identificación de analitos y la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia, se basan en el conocimiento y la corrección de $s(\lambda_{em})$ y su dependencia del tiempo cambia al considerar también el envejecimiento de los componentes del instrumento.

Desde el punto de la emisión, la determinación de la respuesta espectral relativa del instrumento es suficiente para la eliminación de la longitud de onda específica del instrumento y la dependencia de la polarización, en la mayoría de los casos. Esto es más sencillo que la medida absoluta de esta cantidad. La consideración de los cambios que dependen del tiempo de $s(\lambda)$ hace que su determinación regular sea obligatoria. Comprende a la vez una elegante herramienta para validar el rendimiento del instrumento y su estabilidad a largo plazo.

DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA ESPECTRAL $s(\lambda_{em})$

La respuesta espectral $s(\lambda_{em})$ puede ser obtenida con una fuente que emite un espectro conocido y amplio en la región del UV / VIS / NIR¹⁹.

Su determinación es la base para la corrección espectral de los espectros de emisión, no sólo requiere control, también, si fuese necesario, requiere la consideración de la precisión de longitud de onda de su canal de emisión, el funcionamiento del sistema de detección dentro de su rango lineal, la consideración de las muestras a ser corregidas y las condiciones de medición normalmente empleadas. Esto incluye la medida de la geometría, el formato de la muestra y las configuraciones de los instrumentos. Las lámparas de cinta de tungsteno y los estándares integrales de transferencia de radiación espectral de tipo esfera se pueden trazar, pero son un fastidio a la hora de alinear, pueden imponer restricciones en la geometría de medición, necesitan calibraciones regulares y de un alto coste y a veces no encajan en los instrumentos de fluorescencia compactos.

Además, sus radiaciones espectrales o las intensidades de emisión exceden las de las muestras fluorescentes normales de unos cuatro (la lámpara de cinta de tungsteno) a dos (radiador de esfera integrante) órdenes de magnitud. (Fig. 14.)

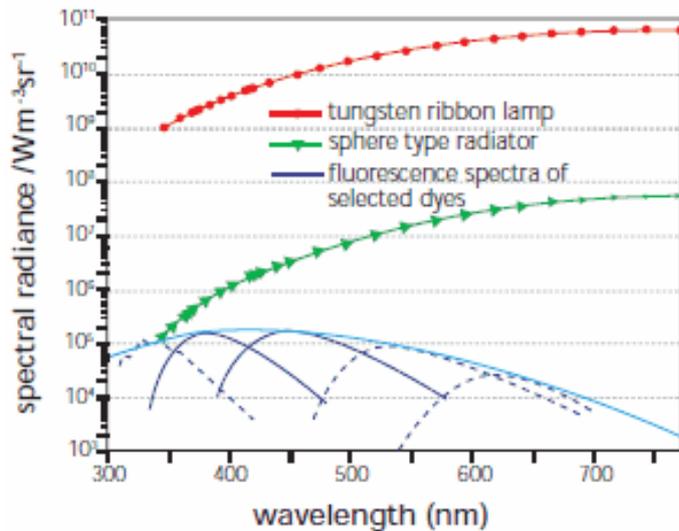


Fig. 14. Comparación de las radiaciones espectrales de una lámpara de tungsteno (rojo), del radiador de tipo esfera (verde) y de los colorantes seleccionados.

Según esto que hemos comentado, su uso requiere un procedimiento que no introduce efectos espectrales adicionales, de esta manera se evitan errores debidos a operaciones de detección del sistema en su rango no lineal. En el caso de los instrumentos que registran el cociente de la señal de la emisión y el canal de referencia, pueden ser operados dentro de su rango lineal.

Por el contrario, los estándares de fluorescencia que se basan en cromóforos son fáciles de operar. En especial los líquidos, como son el BAM-F001 – BAM-F005 que ofrecen una flexibilidad única con respecto a la geometría de medición, al formato, al tipo de contenedor y al tipo de instrumento a calibrar. Los estándares de fluorescencia pueden medirse en condiciones típicas debido a la coincidencia cercana entre sus radiaciones espectrales y las intensidades de luminiscencia y el tamaño y la forma de su volumen de radiación con el de las muestras más analizadas. Muchas fuentes de error sistemático inherentes a la calibración del instrumento con las normas de transferencia física se pueden eludir, pero los espectros de transferencia de radiación, comparados con los espectros de transferencia de radiancia espectral, los espectros de emisión de cromóforos orgánicos e inorgánicos requieren la combinación de diferentes estándares de fluorescencia para un conjunto que cubra el UV / VIS /NIR.

Aparte de la correcta elección y de la combinación de los materiales, los requisitos más importantes para la confianza de los estándares de fluorescencia espectral son la medición precisa y trazable de sus espectros de emisión corregidos con una incertidumbre informada y una caracterización adecuada del instrumento y la caracterización de sus propiedades relevantes según EN ISO / IEC 17025 y las guías ISO 34 y 35.

Para permitir que los usuarios de estos estándares juzguen su calidad y fiabilidad, además de las propiedades relevantes de calibración de estos materiales de referencia, hay que describir el tipo y diseño del instrumento de fluorescencia utilizado para la caracterización estándar, las estrategias de calibración empleadas y las normas de transferencia.

PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO

En un primer paso para la estandarización de las características espectrales de los instrumentos de fluorescencia en un nivel amplio, se ha desarrollado el Kit de Calibración de Estándares de Fluorescencia Espectral que cubren la región espectral de 300 a 770 nm. Este Kit consiste en los 5 estándares de fluorescencia espectral BAM-F001 – BAM-F005 con los espectros de emisión corregidos normalizados, el disolvente que es etanol y el software LINKCORR. En la *Img 4*, se ve el funcionamiento principal del Kit. Se añaden 10 ml de etanol a cada componente del kit, ya que vienen en estado sólido y embotellados, se consiguen soluciones con absorbancias de unos 0,04 el máximo de la banda de absorción de energía más baja de cada tinte. Para medir estas soluciones se utiliza el instrumento que se va a calibrar en condiciones de medida de las que se desea la respuesta espectral relativa (inversa) y los espectros de emisión corregidos. La evaluación de los datos debe ser realizado con el software del BAM, que es el LINKCORR que viene con el kit. Lo que hace es calcular los cocientes $Q^{F00x}(\lambda_{em})$ del espectro de emisión corregido del certificado BAM $I_c(\lambda_{em})$ y la medida del espectro de emisión no corregido $I_u(\lambda_{em})$ para cada colorante.

Los datos certificados que se miden en intervalos de 1nm, se suministran en CD con el kit, en un formato legible por LINKCORR. Las combinaciones de las proporciones

$Q^{F00x}(\lambda_{em}) = \frac{I_c^{F00x}(\lambda_{em})}{I_u^{F00x}(\lambda_{em})}$ se realizan por un procedimiento de ponderación estadística, implementado en LINKCORR, con la curva de corrección de emisión global resultante $\frac{1}{s(\lambda)}$ que es la salida de LINKCORR.

Su recíproco produce la respuesta espectral relativa del instrumento de fluorescencia.

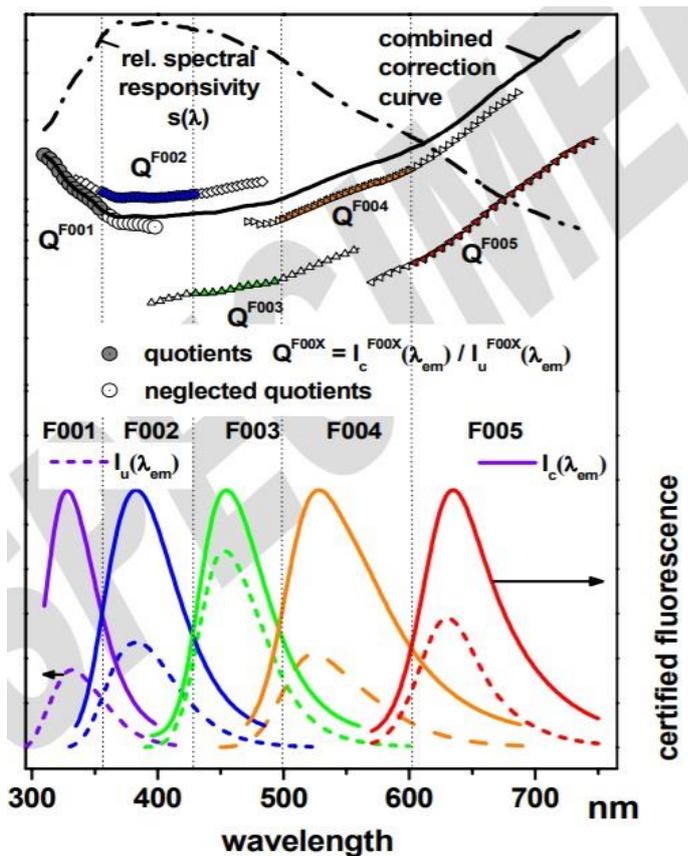


Fig. 15. Determinación de la respuesta espectral relativa $s(\lambda)$. En la parte inferior está el espectro de emisión corregido. Las líneas sólidas son $I_c(\lambda_{em})$ y las discontinuas $I_u(\lambda_{em})$.

En el centro vienen los cocientes individuales calculados con el software.

En la parte superior se ve la curva de emisión corregida igual a la inversa de la respuesta espectral relativa $\frac{1}{s(\lambda)}$, en línea continua y su recíproco $s(\lambda)$ en línea discontinua.

Los datos independientes del instrumento se obtuvieron por multiplicación de la medida de los espectros con la curva de corrección de la emisión $\frac{1}{s(\lambda)}$. Estos espectros corregidos se pueden comparar gracias a los instrumentos y son trazables a la escala de radiancia espectral.

Para determinar los rendimientos cuánticos de fluorescencia relativa, los espectros corregidos tienen que ser multiplicados por la longitud de onda antes de la integración en una escala de longitud de onda, porque el rendimiento cuántico de la fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos y no una relación de flujos irradiados.

La determinación de la curva de corrección en intervalos regulares, generalmente cada 6 meses, según lo que recomienda BAM, proporciona una herramienta muy simple de control y consideración de la estabilidad a largo plazo del canal de emisión y a su vez, para datos de fluorescencia independientes del tiempo.

PROPIEDADES DEL KIT

Las guías ISO 34 y 35 son con las que se ha desarrollado el espectro de emisión corregido de las propiedades certificadas de los materiales de referencia BAM-F001 y BAM-F005. Son trazables a la escala de radiación espectral.

Las incertidumbres relativas de los espectros de emisión corregidos dependientes de la longitud de onda combinan las incertidumbres relativas de la calibración del fluorímetro BAM, el cual se usa para certificar, y las incertidumbres relativas de las medidas de los espectros de emisión, también con este equipo como las incertidumbres relacionadas con el material derivadas de la homogeneidad y de los estudios de estabilidad según la Guía 35 de la ISO. La propagación de estas incertidumbres relativas ha sido determinada según la Guía para la Expresión de la Incertidumbre (GUM) y la Guía ISO 35.

Se siguieron los siguientes criterios para la elección del kit:

- Los espectros de emisión no estructurados y amplios minimizan la dependencia de la forma de los espectros en la resolución al paso de la banda espectral del instrumento. Homogeneidad del perfil espectral del espectro de emisión de las botellas ya preparadas y estabilidad térmica de las mismas.
- El paso, en los rendimientos cuánticos de fluorescencia de moderado a fuerte, aumentan la relación señal-ruido y reducen fuertemente la influencia de la luz de dispersión, la emisión de solventes y las impurezas fluorescentes en los espectros de emisión.
- Para diseñar un conjunto normalizado, la fluorescencia de los espectros cromóforos vecinos deben cruzarse en puntos de intensidad con una fluorescencia suficiente, como podría ser al menos el 20% de la fluorescencia máxima relativa.
- La mínima superposición espectral entre la emisión y la absorción dentro del kit da como resultado una influencia moderada de la concentración de colorante y la medida geométrica en la forma espectral de los espectros de emisión de los estándares de fluorescencia.
- En la mayoría de los casos en los que existe una dependencia moderada de la forma espectral de los espectros de emisión de los colorantes en la longitud de onda de excitación, proporciona una cierta flexibilidad de las longitudes de onda de excitación que se van a usar.

- La anisotropía (r) de la fluorescencia pequeña de los colorantes, los que tengan una anisotropía $r < 0,05$ a temperatura ambiente produce una fluorescencia isotrópica prácticamente. Este hecho evita los efectos de polarización adicionales minimizando las incertidumbres del uso de los estándares de fluorescencia en condiciones de medición que pueden prescindir de instrumentos que no tengan polarizadores.
- La estabilidad fotoquímica y térmica de los componentes del kit ha sido probada en estado sólido y en disolución de etanol bajo unas condiciones de aplicación relevantes para garantizar la estabilidad suficiente de los materiales de referencia y definir la vida útil y las condiciones de almacenamiento del kit.

Como se describe en el certificado, las botellas ya preparadas de BAM-F001, BAM-F002, BAM-F003, BAM-F004 y BAM-F005, se pueden almacenar en el frigorífico a 4°C durante 6 meses sin que se produzca ningún cambio en sus propiedades certificadas. Las disoluciones de estos colorantes pueden ser usadas sólo durante una semana, en el caso de que se almacenen en la oscuridad a 4°C en recipientes bien cerrados. La absorción de agua se debe minimizar para evitar cambios espectrales en los espectros de emisión de los componentes del kit y sus desviaciones de las propiedades.

- La pureza de los colorantes fue determinada mediante varias técnicas analíticas como la cromatografía líquida con detección de absorción y fluorescencia, cromatografía de gases y RMN cuantitativo. Esto garantiza la reproducibilidad de los componentes del kit en el caso de que el material en stock se acabe.
- Con el suplemento del etanol con el kit, se minimizan los efectos del microambiente sobre los espectros de emisión de los colorantes. El cumplimiento total de estos requisitos hace que los Estándares de Fluorescencia Espectral del Kit de Calibración no sólo sirvan para la calibración de fluorímetros espectrales en geometría de medida de 0°/90° empleando celdas de 1cm, también para usar en otras medidas de geometría y en otros recipientes de muestra.

Proporciona la base para la adaptación del Kit de Calibración para la caracterización de una amplia variedad de diferentes tipos de instrumentos de fluorescencia que van desde fluorímetros espectrales sobre lectores de microplacas hasta sistemas de imágenes espectrales.

En la siguiente tabla se resumen algunas condiciones de medida y sus límites:

Condiciones de medida	Región / Límite
Excitación de la longitud de onda λ_{ex}	$\lambda_{ex} \pm 2$
Temperatura	$(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$
Paso de banda de la emisión espectral del monocromador del instrumento a calibrar	1nm - 15 nm espectros de emisión certificados proporcionados para los pasos de banda espectrales del monocromador de emisión de 1, 4 y 8 nm
Escaneo de la emisión del ancho de paso	0,1; 0,2; 0,5; 1,0 (valor usado para la certificación); 1,5; 2,0; 2,5; 5;0

EVALUACIÓN DEL KIT EN COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS

Tanto los espectros de emisión de BAM-F001 – BAM- F005 como la determinación de una curva de corrección de emisión a base de colorante con el Kit BAM y el software LINKCORR se han evaluado y han sido confirmados en una comparación entre laboratorios de los Institutos Nacionales de Metrología NIST, NRC, PTB y BAM.

Esta comparación incluye la medida de los espectros de emisión corregidos de los tintes en dos geometrías de medición, es decir $0^\circ/90^\circ$ y $45^\circ/0^\circ$ y en dos concentraciones diferentes con cuatro instrumentos de fluorescencia de diseño diferente que se han trazado con diferentes estándares físicos de transferencia (PTS) que emplean esquemas de calibración basados en una fuente y un detector.

También, se comparan los espectros de emisión corregidos de los tres colorantes de prueba X, QS e Y obtenidos con una corrección espectral basada en los PTS y el colorante corregido basado en el Kit (Fig. 16.). En todos los casos, el acuerdo de los espectros es excelente.

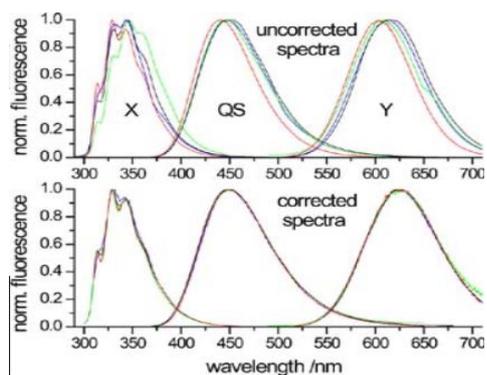


Fig. 16. En la parte de arriba de la imagen tenemos los colorantes X, QS e Y basados en el Kit del espectro de emisión no corregido.

En la parte inferior están los colorantes X, QS e Y corregidos, comparados con 4 fluorímetros diferentes.

Se obtuvo una comparabilidad superior al 10%.

Además, esta herramienta de calibración se ha probado con éxito con varios tipos de fluorímetros espectrales comunes por usuarios seleccionados de ciertos sectores.

De acuerdo con la Fig. 16., la comparabilidad de los espectros de fluorescencia corregidos basados en colorantes de kit es mejor que el 10%. Esto es similar a lo que puede lograrse con los estándares de transferencia física en un laboratorio de expertos, pero con un procedimiento mucho más tedioso y lento y más restricciones de geometría.

DISCUSIÓN

A modo de conclusión cabe decir que, con los estándares de fluorescencia espectral del kit de calibración BAM-F001-BAM-F005, se desarrolla una herramienta simple, flexible y rastreable para la caracterización y el control a largo plazo de la capacidad de respuesta espectral relativa de los instrumentos de fluorescencia, y también para la determinación de la corrección, es decir, datos de emisiones independientes del instrumento.

Lo que esto supone es la base para una mejor confiabilidad y comparabilidad de los datos de emisión a través de los instrumentos a lo largo del tiempo en un nivel muy amplio y presenta un primer paso hacia la estandarización de las técnicas de fluorescencia.

Este Kit que ha sido optimizado para espectrofluorímetros, en una geometría de medición de celdas de $0^\circ / 90^\circ$ y 1 cm, se puede utilizar para una amplia variedad de geometrías de medición y diferentes formatos o contenedores de muestras.

Dado que las propiedades únicas de sus componentes, BAM-F001-BAM-F005, se pueden adaptar a la calibración de otros tipos de instrumentos de fluorescencia tales como lectores de microplacas y sistemas de imágenes espectrales con la consideración adecuada de los principios de medición subyacentes.

Por último, tanto el potencial como las limitaciones del kit están siendo investigados actualmente. [17, 18].

CONCLUSIÓN

Tras la realización de este trabajo se puede concluir que la espectroscopía de fluorescencia es una técnica muy útil y sencilla para la determinación de compuestos y análisis de los mismos.

Como se ha explicado en el trabajo hay una gran variedad de aplicaciones en diversos campos de estudio. Con el calibrado y verificación de ambos equipos se espera que dichas aplicaciones puedan ser utilizadas en posteriores estudios de la Universidad de Granada.

Se ha comprobado que los experimentos realizados dan resultados dentro de lo esperado y por ello, los equipos pueden ser usados con éxito. En algunos experimentos los resultados no han dado lo esperado del todo, pero también puede ser por factores externos y en el caso del equipo más antiguo, el Shimadzu RF-1501, también puede ser por los años de uso. La adquisición del equipo nuevo, el Hitachi F-2700, ha sido un éxito a la hora de mejorar en esta faceta, ya que se ha mostrado una mejoría en los resultados en comparación con el antiguo.

Este equipo va a ser utilizado por el laboratorio de Química Analítica para analizar diferentes compuestos que son enviados por el resto de las facultades de Granada, y también por algunos laboratorios externos, por lo que es muy importante que el equipo esté en perfectas condiciones para su uso.

Personalmente, me he sentido muy cómodo manipulando los dos equipos y realizando los diferentes experimentos. La realización de los experimentos ha sido relativamente sencilla una vez que se eligieron los parámetros adecuados de los equipos para realizar las mediciones.

Por último, me gustaría terminar el trabajo agradeciendo a mi tutor su predisposición y disponibilidad ya que, para cualquier duda o problema que me surgía estaba siempre para resolverlo y ayudarme.

ANEXOS

1. ISO: Organización Internacional de Estandarización.
2. ISO 9000: Sistemas de Gestión de la Calidad – Fundamentos y Vocabulario (2000)
3. ISO 10012: Sistemas de Gestión de Medida – Requisitos para Procesos y Equipos de Medida (2003).
4. VIM: Vocabulario Internacional de Medida. (2007)
5. JCGM: Comité Conjunto de Guías en Metrología.
6. OECLD-GLP: Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica – Buenas Prácticas de Laboratorio (1998).
7. CITAC/EURACHEM GUIDE: Guía para Calidad en Química Analítica (2002).
8. VIML: Vocabulario Internacional de Términos Legales (2013).
9. ISO 11843-1: Capacidad de Detección – Parte 1: Términos y Definiciones (1997).
10. Recomendación de la IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada. Guía para la Calibración en Química Analítica. Parte 1: Fundamentos y Componentes Singulares de Calibración (1998).
11. OIML D10: Guía para Determinar los Intervalos de Calibración de los Instrumentos de Medida (2007).
12. ISO / TC176 / SC1 N400: Paquete de Introducción y Soporte: Orientación Sobre Algunas de las Palabras de Uso Frecuente que se Encuentran en la Familia de Normas ISO 9000 (2012).
13. ISO 17025: Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Prueba y Calibración (2005).
14. ISO 9001: Sistemas de Gestión de Calidad: Requisitos (2001).
15. Directrices GLP: Buenas Prácticas de Laboratorio (1997).
16. Analytical Methods Committee. Evaluation of analytical instrumentation PART XI: http://www.rsc.org/images/partxi_tcm18-25966.pdf.
17. NIST: National Institute of Standards and Technology, USA.
NRC: National Research Council, Canada.
PTB: Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Germany.
BAM: Federal Institute for Materials Research and Testing, Germany.
18. Debido a la convención radiométrica, $s(\lambda)$ siempre implica $s_\lambda(\lambda)$
19. Ultravioleta / Visible / Infrarrojo cercano

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Luminiscencia: fenomeno de iluminacion en la oscuridad Fenomeno Fisico [Internet]. Historiaybiografias.com. 2014 [cited 4 February 2018]. Available from: <https://historiaybiografias.com/luminiscencia/>.
- [2] [Internet]. Cientificosaficionados.com. [cited 10 February 2018]. Available from: <http://www.cientificosaficionados.com/fluorescencia/fluorescencia1.html>.
- [3] LUMINISCENCIA, FLUORESCENCIA Y FOSFORESCENCIA [Internet]. prezi.com. 2016 [cited 10 February 2018]. Available from: <https://prezi.com/vgdfc6a8-y9e/luminiscencia-fluorescencia-y-fosforescencia/>.
- [4] TÉCNICAS LUMINISCENTES - ppt video online descargar [Internet]. Slideplayer.es. 2013 [cited 9 February 2018]. Available from: <http://slideplayer.es/slide/3295175/>.
- [5] Guerra Martínez C. Fluorómetro basado en un LED, un monocromador y un tubo fotomultiplicador [Posgrado]. Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica; 2008.
- [6] González Pérez C. Métodos Luminiscentes [Internet]. Salamanca; [cited 8 February 2018]. Available from: http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_4.pdf.
- [7] Espectroscopía de Fluorescencia Molecular [Internet]. Granada; [cited 9 February 2018]. Available from: <http://www.ugr.es/~decacien/Planes/Quimica/Plan%201997/temarios/671111d-archivos/fundamentos/SEMINARIO%203.PDF>.
- [8] Pérez G. Espectrometría de fluorescencia [Internet]. Espectrometria.com. [cited 12 February 2018]. Available from: https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_fluorescencia.
- [9] Designs T. An Introduction to Fluorescence Measures [Internet]. 2018 [cited 5 February 2018]. Available from: <https://www.turnerdesigns.com/t2/doc/appnotes/998-0050.pdf>.

- [10] García Suárez A. Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por métodos indirectos. [Máster]. Universidad de Oviedo; 2015.
- [11] Cuadros Rodríguez L, González Casado A, Ruiz Samblás C, Bagur González M. Evolution of the Quality Concept in Analytical Laboratories. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons; 2017.
- [12] Megía Fernández A, Roldán Muñoz O, Cuadros Rodríguez L. Guía para la gestión de un espectrofluorímetro analítico en laboratorios. Cuarto Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. 2017. p. 59 - 64.
- [13] Shimadzu Corporation. RF-1501 Shimadzu Spectrofluorophotometer.
- [14] Hitachi High-Technologies Corporation. F-2700 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer.
- [15] Starna Cells, Inc. Reference materials for Molecular Fluorescence Spectrophotometry [Internet]. Available from: <http://http://www.starnacells.com>
- [16] Lawaetz A, Stedmon C. Fluorescence Intensity Calibration Using the Raman Scatter Peak of Water.
- [17] Pfeifer D, Hoffmann K, Hoffmann A, Monte C, Resch-Genger U. The Calibration Kit Spectral Fluorescence Standards - A Simple and Certified Tool for the Standardization of the Spectral Characteristics of Fluorescence Instruments. 2006.
- [18] Federal Institute for Materials Research and Testing. Certified Reference Materials BAM F-001, BAM F-002, BAM F-003, BAM F-004 y BAM F-005. Calibration Kit Spectral Fluorescence Standards for the Determination of Relative Spectral Responsivity of Fluorescence Instruments.