PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

Escuela de Posgrado

IMPLEMENTACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA IDENTIFICAR COLORANTES EN TINTAS DE LAPICERO

Tesis para optar el grado académico de Maestro en Física Aplicada

que presenta:

Manuel Benjamín Flores Layme

Asesor:

Mg. Eder Rubén Sánchez Alcántara

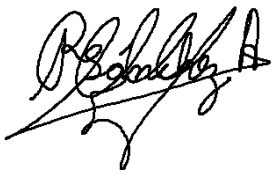
Lima, 2025

Informe de Similitud

Yo, **Eder Rubén Sánchez Alcántara,** docente de la Escuela de Posgrado de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor de la tesis titulada "Implementación y evaluación de un sistema de espectroscopía de fluorescencia para identificar colorantes en tintas de lapicero" del autor **Manuel Benjamín Flores Layme**, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 14%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 31/03/2025.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha:
San Miguel, 31 de marzo de 2025

Apellidos y nombres del asesor: Sánchez Alcántara, Eder Rubén	
DNI: 40748993	Firma 
ORCID: 0000-0002-0042-9654	

A mis padres, Aurelio y Paulina

A mi abuelita Emperatriz y mis hermanos

Víctor, Raquel, Ricardo y Pamela

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Prof. Mg. Rubén Sánchez, por los materiales utilizados para implementar un equipo de espectroscopia de fluorescencia por la ayuda de preparación de las muestras, la realización de los experimentos para la obtención de los datos analizados, y por el uso del Laboratorio de Óptica 2 y a la profesora Lic. Claudia Toledo por su enseñanza en la correcta limpieza de los materiales utilizados y por facilitar algunos solventes requeridos en este proyecto, así como por su cordialidad en el Laboratorio de Análisis Químico de la Facultad de Ingeniería de Minas de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP).

Agradezco a Dios, a mi madre, Paulina Layme, y a mis familiares, quienes estuvieron a mi lado tanto en los momentos más difíciles como en los de éxito en la elaboración de este proyecto.

Expreso mi gratitud a mi amigo, en especial a Niel Quispe, por su apoyo en diversas etapas de este proyecto, y a todos aquellos que, a lo largo de estos años, compartieron conmigo muchas dificultades, alegrías y logros. A todos los que creyeron en la posibilidad de este trabajo.

RESUMEN

En esta investigación se implementó un equipo de espectroscopía de fluorescencia para la detección de colorantes en los órdenes de ppm y ppb, su diseño y construcción se realizó en el Laboratorio de Óptica de la PUCP. Aunque el equipo no alcanzó el nivel de otros sistemas comerciales de alta complejidad, los resultados obtenidos fueron satisfactorios para el objetivo de este trabajo de tesis.

El objetivo de esta investigación fue implementar un sistema de espectroscopia de fluorescencia para detectar la composición de tintas de lapicero. Para ello, se aplicaron los principios fundamentales de absorbancia y fluorescencia, y se utilizó los espectros de absorción reportados en la bibliografía para identificar las longitudes de onda de excitación que generen mayor emisión fluorescente.

En este trabajo se realiza una descripción detallada del alineamiento óptico del equipo de espectroscopía de fluorescencia, y la técnica de medición de fluorescencia de colorantes. Se empleó el programa Origin Pro para analizar los datos de fluorescencia de Rhodamine B, Eosin Yellow, Crystal Violet, y las tintas de lapiceros. A partir del análisis de los espectros de fluorescencia, se elaboró un protocolo que permitió identificar los colorantes Eosin Y y Crystal Violet en las tintas de lapicero.

Como resultado, se logró identificar características espectrales que corresponden al Eosin Yellow en lapiceros rojos y al Crystal Violet en lapiceros azules mediante la técnica de correlación de espectros (coeficiente de correlación de Pearson). Este equipo de fluorescencia y protocolo de medición, podría usarse para diversas aplicaciones como la autentificación de documentos y billetes.

Palabras claves: Espectroscopia de fluorescencia, identificación de colorantes, tintas de lapicero, colorantes en tintas, límite de detección.

ABSTRACT

In this research, a fluorescence spectroscopy system was implemented for the detection of dyes at ppm and ppb levels. Its design and construction were carried out in the Optics Laboratory at PUCP. Although the system did not reach the level of other high-complexity commercial systems, the results obtained were satisfactory for the purpose of this thesis work.

The objective of this research was to implement a fluorescence spectroscopy system to detect the composition of pen inks. For this purpose, the fundamental principles of absorbance and fluorescence were applied, and the absorption spectra reported in the literature were used to identify the excitation wavelengths that generate the highest fluorescent emission.

This work provides a detailed description of the optical alignment of the fluorescence spectroscopy system and the fluorescence measurement technique for dyes. The software Origin Pro was used to analyze the fluorescence data of Rhodamine B, Eosin Yellow, Crystal Violet, and pen inks. Based on the analysis of the fluorescence spectra, a protocol was developed to identify the dyes Eosin Y and Crystal Violet in pen inks.

As a result, spectral characteristics corresponding to Eosin Yellow in red pens and Crystal Violet in blue pens were successfully identified using the spectral correlation technique (Pearson correlation coefficient). This fluorescence system and measurement protocol could be used for various applications, such as document and banknote authentication.

Keywords: Fluorescence spectroscopy, dye identification, ballpoint pen inks, ink dyes, detection limit

ÍNDICE GENERAL

Resumen 5
Introducción 19
Capítulo 1. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV/VIS) 22
1.1 Espectroscopia de absorción molecular ultravioleta-visible 22
1.1.1 Medición de la transmitancia 22
1.1.2 Ley de Beer 23
1.1.3 Aplicación de la ley de la Beer a las mezclas 24
1.1.4 Limitaciones a la ley de Beer 24
1.2 Fluorescencia 25
1.2.1 Teoría de la espectroscopia de fluorescencia 26
A. Descripción de la fluorescencia por el diagrama de Jablonski 26
B. Tiempos de vida del estado excitado 27
C. Rendimiento cuántico 28
D. Fluorescencia y estructura 29
E. Efecto de la rigidez estructural 29
F. Efecto de la concentración sobre la intensidad de fluorescencia 30
G. Auto aniquilación o autoquenching 31
H. Efectos Generales del Solvente 33
1.2.2 Espectroscopia de Fluorescencia 34
1.3 Fluorescencia de la Rhodamine B 34
1.3.1 La Rhodamine B como método de validación de un sistema de fluorescencia 36
1.4 La química de las tintas de lapiceros 37
1.4.1. Colorantes en lapiceros de tinta roja 37
1.4.2 Colorantes en lapiceros de tinta azul 39
Capítulo 2. IMplementacion de sistemas de espectroscopia de fluorescencia 43
2.1 Sistema de fluorescencia con luz laser de 405 nm. 43
2.1.1 Esquema del sistema óptico. 43
Laser 44
Espejo 45
Divisor de haz 45
Lente de focalización 45

Lente de recolección 45
Filtro óptico 45
Portamuestra 46
2.1.2. Procedimiento de alineamiento óptico con luz laser de 405 nm 46
Configuración de Programa Espectra Suite y ajuste del sistema de fluorescencia para 1 mW. 49
2.2 Sistema de alineamiento óptico con luz laser de 532 nm 51
2.2.1 Esquema del sistema óptico 51
2.2.2 Proceso de alineamiento óptico 51
2.3 Recomendaciones 54
Antes de la primera utilización 54
CAPÍTULO 3. ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SISTEMA DE FLUORESCENCIA EN RHODAMINE B DISUELTA EN AGUA DESTILADA O ALCOHOL ETÍLICO 56
3.1 Proceso de preparación de las soluciones de Rhodamine B diluida en agua destilada. 56
3.2. Límite de detección de fluorescencia de la Rhodamine B diluida en agua destilada. 57
3.3 Proceso de preparación de las soluciones de Rhodamine B diluida en alcohol etílico. 69
3.4 Límite de detección de fluorescencia de Rhodamine B diluida en alcohol etílico. 71
Capítulo 4. Detección de Fluorescencia de Eosin Yellow disuelto en agua destilada y Cristal Violet disuelto en glicerina 83
4.1 Proceso de preparación de las soluciones de Eosin Yellow diluida en agua destilada. 83
Crystal Violet disuelto en agua destilada, alcohol etílico y glicerina en 532nm 92
Capítulo 5. Fluorescencia en tintas de lapiceros de colores rojo y azul 103
5.1 Análisis de fluorescencia de lapiceros rojos 103
Espectro de fluorescencia normalizado de las tintas rojas y Eosin Yellow: 104
Coeficiente de Correlación de Pearson para el lapicero rojo 105
5.2 Análisis de fluorescencia de lapiceros azules 106
Espectro de fluorescencia normalizado de tintas azules y Crystal Violet: 107
Coeficiente de Correlación de Pearson para el lapicero azul 108
Capítulo 6. Conclusiones 110
Recomendaciones 111

Complicaciones.....112
Trabajo a futuros.....112
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ilustración que describe la trayectoria de la luz y las perdidas ópticas generadas por su interacción con una solución contenida en una cubeta de vidrio durante la medición de la Tramitancia..... 23

Figura 1.2. Diagrama que muestra la atenuación de la radiación desde Po a P a través de una solución absorbente con concentración c y longitud de trayectoria b.. 24

Figura 1.3. Gráfica que evidencia desviaciones de la ley de Beer debido a efetos instrumentales o concentraciones elevadas. 25

Figura 1.4. Una de las formas de diagrama de Jablonski ilustrando los procesos de absorción, relajación vibracional y emisión de fluorescencia. 27

Figura 1.5. Gráfica que muestra el decaimiento de fluorescencia con distintos tiempos de vida (τ) después de apagar la luz de excitación. El tiempo de decaimiento τ es el tiempo en el que solo se ve $1/e$ de la fluorescencia inicial, azul: $\tau = 10\ ns$, rojo: $\tau = 5\ ns$ [7]. 28

Figura 1.6. Comparación entre estructuras de la Piridina, Pirrol no fluorescen y sus correspondientes Benzoderivados fluorescentes [13]. 29

Figura 1.7. Distintas estructuras fluorescentes, donde se observa que la rigidez estructural nos da un aumento de la fluorescencia, la eficacia cuántica del fluoreno y del bifenilo que son próximas a 1 y 0.2 respectivamente [13]. 30

Figura 1.8. Diagrama de Jablonski modificado que ilustra el proceso de apagamiento por colisión y sus efectos en la desexcitación molecular. 32

Figura 1.9. Gráfica que muestra el efecto de las concentraciones en el color y los espectros de emisión de la Rhodamine 6G. Las concentraciones de R6G son 5 x 10^{-6}, 1.6 x10^{-4}, y 5.7 x 10^{-3} M evidenciando su comportamiento a distintas concentraciones [14]. 33

Figura 1.10. Espectro de emisión de fluorescencia de Rhodamine B disuelta en etanol usando una fuente de excitación de 510 nm, el rendimiento cuántico de 0,7. Datos extraídos de [18]. 35

Figura 1.11. (a) Espectro de absorción de Rhodamine B. Datos extraídos de omlc [18].(b) Fórmula estructural, utilizada como referencia para los estudios de fluorescencia [15]. 35

Figura 1.12. Curva de calibración de Rhodamine B utilizada para determinar la relación entre concentración y fluorescencia. Datos extraídos de [19]. 36

Figura 1.13. Espectro de emisión de fluorescencia de Eosin Yellow disuelta en etanol. La longitud de onda de excitación fue de 490 nm. El rendimiento cuántico de esta molécula es de 0.67. Datos extraídos de Olmc [21]. 38

Figura 1.14. (a) Espectro de absorción en 524 nm. Datos extraídos de Omlc [21] . (b) Formula estructural de Eosin Yellow, relevantes para el análisis de sus propiedades fluorescentes en soluciones de tintas [17]..... 38

Figura 1.15. Espectro de emisión de fluorescencia del Crystal Violet disuelto en glicerol. La longitud de onda de excitación fue de 550 nm. El rendimiento cuántico de esta molécula es de 0,019. Datos extraídos de [24]..... 40

Figura 1.16. (a) Espectro de absorción de Crystal en glicerina en 590 nm. Datos extraídos de Omlc [24]. (b) Fórmula estructural, relevantes para el análisis de sus propiedades fluorescentes en soluciones de tintas [23]..... 40

Figura 1.17. (a) Espectro de absorción en 587 nm. Figura estriada de Aabtio [26]. (b) Fórmula estructural de Methyl Violet 2B. Figura extraída de Pubchem [25]..... 41

Figura 1.18. (a) Espectro de absorción en 593nm. Figura extraída de Aatbio [28] (b) y fórmula estructural de Victoria Blue [27]..... 42

Figura 1.19. (a) Espectro de absorción de Victoria Pure Blue BO en 611 nm. Figura extraída de Aatbio [29]. (b) Fórmula estructural de Basic Blue 7. Figura extraída de Pubchen [30]..... 42

Figura 2.1. Esquema de la geometría del equipo espectroscopia de fluorescencia en configuración 180°..... 43

Figura 2.2. Esquema de posicionamiento de instrumentos del equipo de espectroscopia de fluorescencia..... 44

Figura 2.3. (a) Configuración de componentes ópticos para el alineamiento del láser en el plano horizontal. (b) Alineamiento con el nivel de burbuja..... 46

Figura 2.4. Configuración de componentes ópticos, incluyendo el espejo, para la alineación del láser en el plano horizontal..... 47

Figura 2.5. Dirección y alineación del haz laser en el eje horizontal con el espejo y el divisor de haz..... 47

Figura 2.6. Configuración de los componentes ópticos para alinear el láser en el eje horizontal con la lente de focalización..... 48

Figura 2.7. Configuración de los componentes ópticos para alinear el láser en el eje horizontal con la lente de recolección..... 48

Figura 2.8. Sistema experimental de un espectrómetro de fluorescencia visible con una fuente de luz láser de 405 nm..... 49

Figura 2.9. Verificación del alineamiento óptico. La fluorescencia del material y la fuente de luz laser coinciden..... 49

Figura 2.10. Colocación del autoadhesivo a una distancia focal de 25.4 mm..... 50

Figura 2.11. Espectro de Fluorescencia del autoadhesivo con tiempo de integración de 12ms y promedio 1 y 1.0 mW..... 50

Figura 2.12. Espectro de Fluorescencia del autoadhesivo de emisión 600.54 nm a diferente tiempo de integración *4ms ,5ms ,6ms, 8ms, 10ms y 12 ms.* 51

Figura 2.13. (a) Configuración de componentes ópticos para el alineamiento del láser en el plano horizontal. (b) Alineamiento con el nivel de burbuja..... 52

Figura 2.14. Dirección y alineación del haz laser en el eje horizontal con el espejo y el divisor de haz. 52

Figura 2.15. Configuración de componentes ópticos para alinear el láser en el eje horizontal con la lente de recolección. 53

Figura 2.16. Configuración de componentes ópticos para alinear el láser en el plano horizontal. 53

Figura 2.17. (a) Potenciómetro PM16-124 marca Tholabs. (b) Zona de incidencia del láser indicada por la flecha azul. 54

Figura 3.1. Preparación de solución de Rhodamine B en una concentración de 1000 ppm 56

Figura 3.2. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en agua destialda con concentraciones de 10 ppb a 100 ppb para el rango 1. 58

Figura 3.3. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en agua destilada con concentraciones de 10 ppb a 500 ppb para el rango 2. 58

Figura 3.4. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en agua destilada con concentraciones de 10 ppb a 1000 ppb para el rango 3. 59

Figura 3.5. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en agua destilada con concentraciones de 1ppm a 1000 ppm para el rango 4. 59

Figura 3.6. El gráfico muestra Rhodamine B diluido en agua destilada cómo la intensidad aumenta a medida que las concentraciones aumentan, y en el declive se observa la autoabsorción para el rango 4. 62

Figura 3.7. (a) Grafica muestra Rhodamine B diluido en agua destilada en los rangos 1,2 y 3 se muestra que conforme la concentración aumenta, los picos de fluorescencia permanecen constantes en las concentraciones más bajas. (b) Para el rango 4 se muestra que a medida que las concentraciones aumentan, los picos de fluorescencia se desplazan en dirección hacia la derecha. 62

Figura 3.8. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en agua destilada aplicando ajuste lineal. 63

Figura 3.9. Gráfico de intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en agua destilada aplicando ajuste lineal y cuadrático. 64

Figura 3.10. Gráfico de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en agua destilada aplicando ajuste lineal. 65

Figura 3.11. Gráfico de intensidad vs. concentración de Rhodamine B diluido en agua destilada aplicando ajuste cuadrático. Se observa para concentraciones de 100 ppm-1000 ppm hay una caída de fluorescencia debido a la autoabsorción. 66

Figura 3.12. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en alcohol etílico con concentraciones de 10 ppb a 100 ppb para el rango 1. 71

Figura 3.13. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en alcohol etílico con concentraciones de 10 ppb a 500 ppb para el rango 2. 72

Figura 3.14. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en alcohol etílico con concentraciones de 10 ppb a 1000 ppb para el rango 3. 72

Figura 3.15. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en alcohol etílico con concentraciones de 1 ppm a 1000 ppm para el rango 4. 72

Figura 3.16. El gráfico muestra Rhodamine B diluido en alcohol etílico cómo la intensidad aumenta a medida que las concentraciones aumentan, y en el declive se observa la autoabsorción para el rango 4. 75

Figura 3.17. (a) Gráfica muestra Rhodamine B diluido en alcohol etílico en los rangos 1,2 y 3 se muestra que conforme la concentración aumenta, los picos de fluorescencia permanecen constantes en las concentraciones más bajas. (b) Para el rango 4 se muestra que a medida que las concentraciones aumentan, los picos de fluorescencia se desplazan en dirección hacia la derecha. 75

Figura 3.18. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en alcohol etílico aplicando ajuste lineal. 76

Figura 3.19. Gráfica de intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en alcohol etílico aplicando ajuste lineal. 77

Figura 3.20. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en alcohol etílico aplicando ajuste lineal. 78

Figura 3.21. Gráfico de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B en alcohol etílico, aplicando ajuste cuadrático. Se observa para concentraciones de 400 ppm-1000 ppm hay una caída de fluorescencia debido a la autoabsorción..... 79

Figura 4.1. Espectro de fluorescencia de soluciones de Eosin Yellow diluido en agua destilada con concentraciones de 10 ppb a 200 ppb para el rango 1. 84

Figura 4.2. Espectro de fluorescencia de soluciones de Eosin Yellow diluido en agua destilada con concentraciones de 0.5 ppm a 20 ppm para el rango 2. 84

Figura 4.3. Espectro de fluorescencia de soluciones de Eosin Yellow diluido en agua destilada con concentraciones de 50 ppm a 1000 ppm para el rango 3. 85

Figura 4.4. El gráfico muestra Eosin Yellow diluido en agua destilada cómo la intensidad aumenta a medida que las concentraciones aumentan, y en el declive se observa la autoabsorción para el rango 3. 87

Figura 4.5. (a) Gráfica muestra Eosin Yellow diluido en agua destilada en el rango 1 se muestra que conforme la concentración aumenta, los picos de fluorescencia permanecen constantes en las concentraciones más bajas. (b) Para el rango 1,2 y 3 se muestra que a medida que las concentraciones aumentan, los picos de fluorescencia se desplazan en dirección hacia la derecha. 87

Figura 4.6. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Eosin Yellow diluido en agua destilada aplicando ajuste lineal. 88

Figura 4.7. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Eosin Yellow diluidos en agua destilada aplicando ajuste lineal. 89

Figura 4.8. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Eosin Yellow diluido en agua destilada. Se observa que, para concentraciones de 200 ppm – 1000 ppm, hay una caída de fluorescencia debido a la autoabsorción..... 90

Figura 4.9. (a) Gráfico que representa la fluorescencia de soluciones de Crystal Violet diluidas en agua destilada, alcohol etílico y glicerina, todas con una concentración de 100 ppm. (b) Presenta una versión ampliada del gráfico mostrado en (a). 92

Figura 4.10. Espectro de fluorescencia de soluciones de Crystal Violet diluido en glicerina con concentraciones de 1 ppb a 20 ppb para rango 1. 95

Figura 4.11. Espectro de fluorescencia de soluciones de Crystal Violet diluido en glicerina con concentraciones de 1 ppb a 1000 ppb para el rango 2. 95

Figura 4.12. Espectro de fluorescencia de soluciones de Crystal Violet diluido en glicerina con concentraciones de 1 ppm a 1000 ppm para el rango 3..... 96

Figura 4.13. El gráfico muestra Crystal Violet diluido en glicerina cómo la intensidad aumenta a medida que las concentraciones aumentan, y en el declive se observa la autoabsorción para el rango 3. 98

Figura 4.14. (a) Gráfica muestra Crystal Violet diluido en glicerina en los rangos 1 y 2 se muestra que conforme la concentración aumenta, los picos de fluorescencia permanecen constantes en las concentraciones más bajas. (b) Para el rango 3 muestra que a medida que las concentraciones aumentan, los picos de fluorescencia se desplazan en dirección hacia la derecha..... 98

Figura 4.15. Gráfica de intensidad vs. concentración de Crystal Violet diluido en glicerina aplicando ajuste lineal..... 99

Figura 4.16. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Crystal Violet diluido en glicerina. Se observa para concentraciones de 50 ppm - 1000 ppm hay una caída de fluorescencia debido a la autoabsorción. 100

Figura 5.1. Espectro de fluorescencia de soluciones de tintas de lapiceros rojos diluida con alcohol etílico, empleando diversas muestras de lapiceros rojos. 104

Figura 5.2. Espectro de fluorescencia normalizada de soluciones de tintas de lapiceros rojos y Eosin Yellow diluidas en alcohol etílico, empleando diversas muestras de lapiceros. 105

Figura 5.3. Uso del coeficiente de Correlación de Pearson aplicada al análisis de Eosin Yellow con los lapiceros Faber Castell Tri lux 032, Stabilo Liner 308, Pilot G1, Ove Tri x0.32M y Faber Castel lux 034 M. 106

Figura 5.4. Espectro de fluorescencia de soluciones de tintas de lapiceros azules diluido en glicerina, empleando diversas muestras de lapiceros azules. 107

Figura 5.5. Espectro de fluorescencia normalizada de soluciones de tintas de lapiceros azules y Crystal Violet diluida en glicerina, empleando diversas muestras de lapiceros. 108

Figura 5.6. Uso del coeficiente de Correlación de Pearson aplicada al análisis de Crystal Violet con las tintas de lapiceros Faber Castell Tri lux 032, Stabilo Liner 308, Pilot G1, Ove Tri x0.32M y Faber Castel lux 034 M. 109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Términos y símbolos utilizados en las mediciones de absorción. 22

Tabla 1.2. Datos de rendimiento y parámetros analíticos para la determinación de Rhodamine B. 37

Tabla 1.3. Listado de los principales componentes químicos presentes en tintas de lapiceros azules. Datos extraídos de Qiran Sun [22]. 39

Tabla 3.1. Concentración de la Rhodamine B con agua destilada para la calibración del sistema de fluorescencia. 57

Tabla 3.2. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10, 20, 50 y 100 ppb, comparadas con el valor de referencia [18]. . 60

Tabla 3.3. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10 hasta 500 ppb. 60

Tabla 3.4. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10 hasta 1000 ppb. 61

Tabla 3.5. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 1 hasta 1000 ppm. 61

Tabla 3.6. Resume de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en agua destilada para concentraciones de 10 hasta 100 ppb. 63

Tabla 3.7. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en agua destilada para concentraciones de 10 hasta 500 ppb. 64

Tabla 3.8. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en agua destilada para concentraciones de 10 hasta 1000 ppb. 65

Tabla 3.9. Resumen de intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B para concentraciones de 10 hasta 1000 ppm. 66

Tabla 3.10. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B disuelto en agua destilada aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 100 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia. 68

Tabla 3.11. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B disuelto en agua destilada aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 1000 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia. 69

Tabla 3.12. Concentraciones de Rhodamine B disuelto en alcohol etílico para la calibración del sistema de fluorescencia. 70

Tabla 3.13. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10, 20, 50 y 100 ppb, comparadas con el valor de referencia (18). .. 73

Tabla 3.14. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10 hasta 500 ppb. 73

Tabla 3.15. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10 hasta 1000 ppb. 74

Tabla 3.16. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 1 hasta 1000 ppm. 74

Tabla 3.17. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en alcohol etílico para concentraciones de 10 hasta 100 ppb. 76

Tabla 3.18. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en alcohol etílico para concentraciones de 10 hasta 500 ppb. 77

Tabla 3.19. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en alcohol etílico para concentraciones de 10 hasta 1000 ppb. 78

Tabla 3.20. Resumen de intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B para concentraciones de 10 hasta 1000 ppm. 79

Tabla 3.21. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B diluido en alcohol etílico, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 100 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia. 80

Tabla 3.22. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B diluido en alcohol etílico, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 500 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia. 81

Tabla 3.23. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B diluido en alcohol etílico, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 1000 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia. 82

Tabla 4.1. Concentraciones de Eosin Yellow diluido agua destilada. 83

Tabla 4.2. Resumen de las longitudes de onda centrales de Eosin Yellow en concentraciones 10, 20, 50, 100 y 200 ppb, comparadas con el valor de referencia (21). 85

Tabla 4.3. Resumen de las longitudes de onda centrales de Eosin Yellow en concentraciones 0.5 hasta 20 ppm. 86

Tabla 4.4. Resumen de las longitudes de onda centrales de Eosin Yellow en concentraciones 50 hasta 1000 ppm. 86

Tabla 4.5. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Eosin Yellow diluido en agua destilada para concentraciones de 10 hasta 200 ppb. 88

Tabla 4.6. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Eosin Yellow diluido en agua destilada para concentraciones de 0.5 hasta 20 ppm. 89

Tabla 4.7. Resumen de intensidades promedio y sus errores de Eosin Yellow para concentraciones de 50 hasta 1000 ppm. 89

Tabla 4.8. Concentración e intensidad promedio de Eosin Yellow diluido en agua destilada, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración de 10 ppb a 200 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia. 91

Tabla 4.9. Concentración e intensidad promedio de Eosin Yellow diluido en agua destilada, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración de 0.5 ppm a 20 ppm. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia. 92

Tabla 4.10. Concentraciones de Crystal Violet diluido en glicerina. 94

Tabla 4.11. Resumen de las longitudes de onda centrales de Crystal Violet en concentraciones 1, 5, 10 y 20 ppb, comparadas con el valor de referencia [24]. 96

Tabla 4.12. Resumen de las longitudes de onda centrales de Crystal Violet en concentraciones 20 hasta 1000 ppb. 97

Tabla 4.13. Resumen de las longitudes de onda centrales de Crystal Violet en concentraciones 1 hasta 1000 ppm. 97

Tabla 4.14. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Crystal Violet diluido en glicerina para concentraciones de 20 hasta 1000 ppb. 99

Tabla 4.15. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Crystal Violet diluido en glicerina para concentraciones de 5 hasta 1000 ppm. 100

Tabla 4.16. Concentración e intensidad promedio de Crystal Violet con glicerina aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración de 20 ppb a 1000 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia. 101

Tabla 5.1. Masa de muestras de lapiceros rojos con alcohol etílico. 103

Tabla 5.2. Longitud de onda de emisión e Intensidad de fluorescencia de las tintas de lapiceros rojos disuelto en alcohol etílico. 104

Tabla 5.3. Valores de coeficiente de Correlación de Pearson entre los espectros de Eosin Yellow y los espectros de las tintas de lapiceros rojos. 105

Tabla 5.4. Masa de muestras de lapiceros azules con glicerina 106

Tabla 5.5. Longitud de onda de emisión e Intensidad fluorescencia de los lapiceros azules disuelto en glicerina. 107

Tabla 5.6. Valores de coeficiente de Correlación de Pearson entre los espectros de Crystal Violet. y los espectros de las tintas de lapiceros azules 108

INTRODUCCIÓN

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica analítica ampliamente utilizada para caracterizar materiales mediante la detección de compuestos fluorescentes. Su capacidad para analizar sustancias químicas de manera no destructiva y con alta precisión la ha posicionado como una herramienta esencial en diversas áreas, tales como el análisis forense, el control de calidad y la investigación científica [1]. Sin embargo, los equipos comerciales de espectroscopia de fluorescencia suelen ser costosos y requieren un nivel avanzado de operación, lo que limita su accesibilidad en laboratorios con recursos modestos. En este contexto, esta investigación aborda un problema clave: la necesidad de desarrollar sistemas accesibles y de bajo costo para el análisis de tintas de lapiceros.

El objetivo principal de este trabajo fue implementar y construir un sistema de espectroscopia de fluorescencia que permita analizar la composición de tintas de lapiceros de forma eficiente y económica. El desarrollo de un sistema de espectroscopía con materiales accesibles y configuraciones ópticas simplificadas puede lograr resultados comparables en términos de sensibilidad y precisión a los de equipos comerciales más avanzados.

El sistema se construyó utilizando una configuración óptica basada en una geometría de 180° [2]. Los instrumentos utilizados incluyeron láseres con longitudes de onda de 405 nm y 532 nm, lentes de focalización, divisores de haz y filtros ópticos, los cuales fueron montados sobre plataformas mecánicas. La metodología de esta investigación involucró un proceso detallado de alineamiento óptico para optimizar la intensidad de fluorescencia de las muestras. La correcta alineación de los componentes ópticos resultó fundamental, dado que un desalineamiento podría generar una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia emitida por la solución. Se adoptó un enfoque minucioso para garantizar que la estructura y el posicionamiento de cada componente óptico estuvieran optimizados. Este diseño permite al usuario manipular el sistema con confianza, sin riesgo de desplazar ningún componente óptico, asegurando estabilidad y reproducibilidad en las mediciones.

Para la preparación de las muestras, se consideró cuidadosamente la selección del solvente adecuado para mejorar la intensidad de emisión de fluorescencia. No todos los solventes son igualmente efectivos para este propósito, por lo que se realizó una evaluación sistemática. Se utilizó una solución de referencia en diferentes rangos de concentraciones para establecer las condiciones bajo diversos parámetros como el tiempo de integración y el promedio, las cuales el equipo podía detectar fluorescencia de manera confiable. Se probaron diferentes solventes como el agua, alcohol etílico y glicerina, con el fin de identificar las condiciones óptimas para obtener los mejores resultados sin saturar el espectrómetro.

Se prestó especial atención a la preparación de muestras que contenían Rhodamine B, Eosin Yellow y Crystal Violet. Se realizaron múltiples preparaciones y mediciones para observar los espectros de fluorescencia de los colorantes, asegurando que las muestras no se contaminaran, ya que el equipo es altamente sensible y puede detectar incluso impurezas mínimas. La reproducibilidad del método constituyó un parámetro fundamental en este estudio. Para el procesamiento y análisis de datos, se utilizó el software Origin Pro, mediante el cual se realizaron análisis de regresión lineal para establecer la relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de colorantes. La Rhodamine B se empleó para la calibración del equipo de espectroscopia, mientras que el Eosin Yellow y el Crystal Violet fueron seleccionados por ser compuestos característicos presentes en las tintas de lapiceros. En este estudio se empleó cinco marcas comerciales diferentes, cada una con dos colores distintos. Con estos resultados, se elaboró un protocolo que permitió comparar los espectros de las muestras.

Los resultados demostraron la capacidad del sistema para identificar compuestos fluorescentes como Eosin Yellow en tintas rojas y Crystal Violet en tintas azules. Se observó que los diferentes colores y marcas, incluso cuando comparten el mismo color, presentan composiciones químicas diferentes. Además, se logró cuantificar la intensidad de fluorescencia y establecer límites de detección para estas sustancias, lo que valida su eficacia en el análisis cualitativo y cuantitativo de tintas [1]. Entre los

desafíos técnicos, se destacan la necesidad de mejorar la estabilidad mecánica del sistema de espectroscopia y optimizar la preparación de las muestras para mejorar la precisión de las mediciones y garantizar la reproducibilidad de los resultados.

En conclusión, esta investigación demuestra la viabilidad de implementar sistemas de espectroscopia de fluorescencia accesibles, así como también resalta su potencial en aplicaciones prácticas como la caracterización de tintas, abriendo nuevas posibilidades para su uso en entornos con recursos limitados.

CAPÍTULO 1. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV/VIS)

1.1 Espectroscopia de absorción molecular ultravioleta-visible

La ley de Lambert, establece que la luz incidente absorbida por un medio es independiente de la intensidad de la luz [3]. Se define la ecuación:

$$\frac{P}{P_0} = T \quad (1.1)$$

donde P es la potencia radiante transmitida, P_0 es la potencia radiante incidente, y T es la transmitancia [4]. La espectroscopia de absorción molecular se conoce como la medición de la absorbancia $\boldsymbol{A}$ o transmitancia $\boldsymbol{T}$ de soluciones (soluto y solvente) contenidas en celdas transparentes que tienen una longitud de camino $\boldsymbol{b}$. Por lo general, la concentración de la sustancia absorbente está directamente relacionada con la absorbancia según lo establece la ley de Beer [5], [6].

$$A = -\log T = \log \frac{Po}{P} = \varepsilon bc \quad (1.2)$$

Todas las variables de esta ecuación son definidos en la tabla 1.1.

Términos y símbolos	Definiciones
Potencia radiante incidente, P_0 (W)	Potencia radiante en watts incidente en una muestra
Potencia radiante trasmitida, P (W)	Potencia radiante transmitida por muestra
Absorbancia, A	$\log(P_0/P)$
Tramitancia, T	P/P_0
Longitud de camino de la muestra, b *(cm)*	Longitud que recorre la luz en la muestra
Concentración del soluto, c *(mol/L)*	Concentración en unidades específicas
Absortividad Molar, ε *(L/(cm.mol))*	$A/(bc)$

Tabla 1.1. Términos y símbolos utilizados en las mediciones de absorción.

1.1.1 Medición de la transmitancia

La medición de la transmitancia, tal como se describe en la tabla 1.1, se puede realizar mediante el haz incidente sobre una celda que contiene una solución. En la solución, se producen pérdidas por reflexión y dispersión debido a las interfaces presentes en la celda de vidrio que contiene la solución. Las pérdidas por reflexión ocurren en todos

los límites que separan materiales diferentes. En este caso, la luz atraviesa las interfaces aire-vidrio, solución-vidrio y vidrio-aire, como se muestra en la figura 1.1 [7]. *Po* representa la intensidad de la radiación después de pasar por la celda que solo contiene el solvente, es decir, sin la presencia del analito. Por otro lado, *P* corresponde a la intensidad de la radiación una vez que ha atravesado la celda con la solución del analito, donde parte de la radiación puede haber sido absorbida [7].

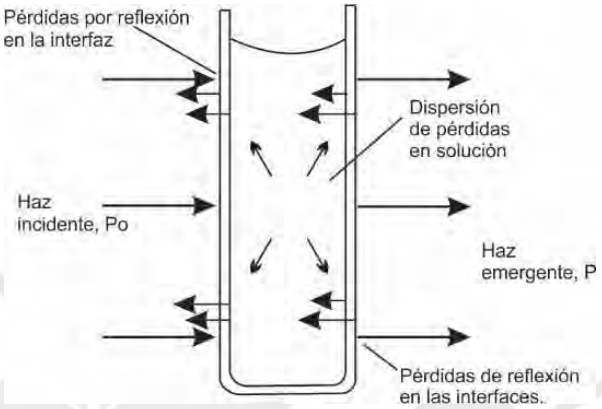


Figura 1.1. Ilustración que describe la trayectoria de la luz y las perdidas ópticas generadas por su interacción con una solución contenida en una cubeta de vidrio durante la medición de la Tramitancia.

1.1.2 Ley de Beer

la Ley de Beer, establece que la absorción de luz es directamente proporcional tanto a la concentración del medio absorbente como al grosor de dicho medio [4]. La ecuación 1.2 describe la ley de Beer, la cual puede explicarse de la siguiente manera: Se considera una muestra con forma de paralelepípedo, sobre la cual incide luz con una potencia inicial $\boldsymbol{Po}$ perpendicular a su superficie. Al atravesar una distancia $\boldsymbol{b}$ dentro de la solución, que contiene $\boldsymbol{n}$ átomos, iones o moléculas absorbentes, la potencia de la luz disminuye a $\boldsymbol{P}$ debido a la absorción. Ahora, considere una sección transversal de la muestra que tiene un área $\boldsymbol{S}$ y un grosor infinitesimal $\boldsymbol{dx}$. Dentro de esta sección hay partículas o moléculas que absorben $\boldsymbol{dn}$; Podemos imaginar una superficie asociada con cada partícula o moléculas en la que se producirá la captura de fotones. Es decir, si un fotón alcanza una de estas áreas por casualidad, será absorbido de inmediato. El área total proyectada de estas superficies de captura dentro de la sección se designa como $\boldsymbol{dS}$; la relación del **área de captura** al área total, entonces, es $\boldsymbol{dS/S}$. En esta última

expresión se define como un promedio estadístico, que representa la probabilidad de captura de fotones dentro de la sección.

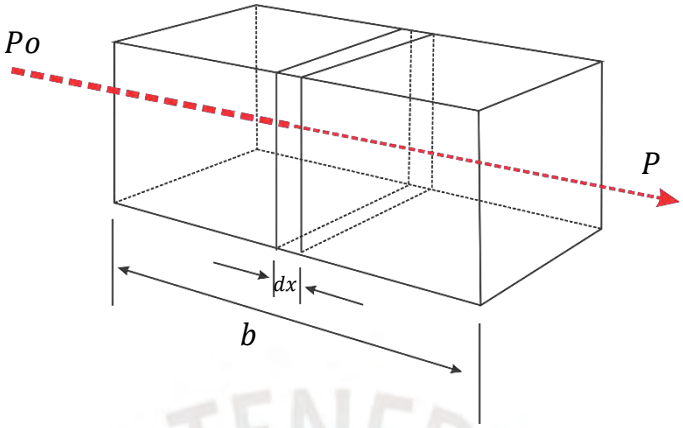


Figura 1.2. Diagrama que muestra la atenuación de la radiación desde Po a P a través de una solución absorbente con concentración c y longitud de trayectoria b.

La potencia del haz que ingresa a la sección, Px, es proporcional al número de fotones por unidad de área, y dPx representa la potencia absorbida dentro de la sección. La fracción absorbida es entonces $-dPx\,/\,Px$, y esta relación también es igual a la probabilidad promedio de captura. El término recibe un signo menos para indicar que la potencia radiante P disminuye a medida que pasa a través de la región de absorción.

1.1.3 Aplicación de la ley de la Beer a las mezclas

La ley de Beer también se aplica a un medio que contiene más de un tipo de sustancia absorbente. Siempre que las especies no interactúen, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por [7]:

$$A_{total} = A_1 + A_2 + A_3 + \cdots + A_n$$

$$A_{total} = \varepsilon_1 bc + \varepsilon_2 bc + \varepsilon_3 bc + \cdots + \varepsilon_n bc \qquad (1.3)$$

donde los subíndices se refieren a los componentes absorbentes *1, 2, . . ., n*.

1.1.4 Limitaciones a la ley de Beer

Para bajas concentraciones, la ley de Beer sugiere que una gráfica de absorbancia vs. la concentración genere una función lineal que intercepte el origen de coordenadas y

cuyo valor de pendiente es igual a εb. En algunos casos, la gráfica de la ley de Beer se desvía de este comportamiento ideal (ver figura 1.3) [8].

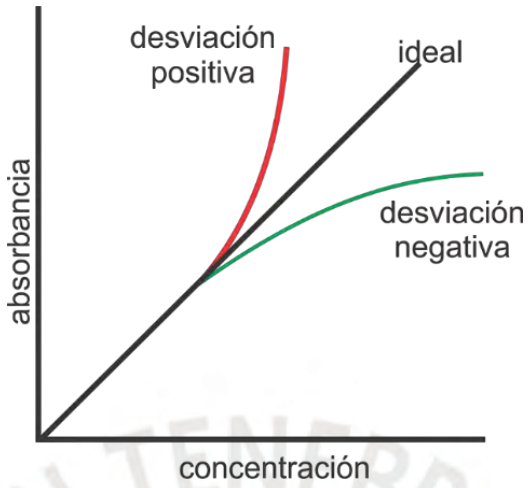


Figura 1.3. Gráfica que evidencia desviaciones de la ley de Beer debido a efetos instrumentales o concentraciones elevadas.

Esto es debido a desviaciones instrumentales o por cambios químicos que ocurren cuando la concentración es muy elevada [7].

1.2 Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el que la energía se transfiere de un nivel de energía superior a uno inferior, generando radiación. Solamente las moléculas en ciertas configuraciones son capaces de exhibir fluorescencia, y, por lo tanto, deben ser excitadas a un estado de mayor energía antes de que ocurra el proceso de emisión.

El espectro de fluorescencia de una molécula es independiente de la longitud de onda de la radiación excitante. La probabilidad de la transición del estado electrónico excitado al fundamental es proporcional a la intensidad de luz emitida, la población del estado excitado y del rendimiento cuántico [9].

La espectroscopia de luminiscencia molecular se puede utilizar para estudios fundamentales de estados moleculares excitados, así como para el análisis selectivo y sensible de muestras luminiscentes. Los procesos de luminiscencia, como la fluorescencia y la fosforescencia, son procesos de emisión y, como resultado, las técnicas de luminiscencia tienen rangos dinámicos y límites de detección que son varios órdenes de magnitud mayores que las técnicas de absorción molecular

ultravioleta-visible (UV-Vis) para compuestos altamente luminiscentes. La selectividad puede derivarse de varias fuentes. En primer lugar, solo ciertos grupos de compuestos que absorben la radiación UV-Vis pueden experimentar una desexcitación por luminiscencia. En segundo lugar, la selectividad entre las moléculas luminiscentes a menudo se puede lograr sobre la base de las características espectrales de excitación y emisión y la vida útil del estado excitado.

Las técnicas de polarización y enfriamiento selectivo pueden extenderse a compuestos no luminiscentes mediante el uso de métodos indirectos en los que el analito está involucrado en una reacción química o integración física con reactivos luminiscentes [10].

1.2.1 Teoría de la espectroscopia de fluorescencia

En esta sección se presenta una introducción a la teoría de la espectroscopia de fluorescencia, que incluye descripciones de procesos y características fundamentales, espectros y relación cuantitativa entre intensidad y concentración.

A. Descripción de la fluorescencia por el diagrama de Jablonski

Los procesos involucrados en la fotoluminiscencia molecular se muestran en la Fig. 1.4. La absorción molecular de fotones en el rango UV-Vis causa la transición electrónica desde un nivel de energía más bajo [típicamente el nivel vibratorio más bajo v_0, del estado singlete electrónico de tierra (S_0)] a un estado excitado singlete S. La molécula experimenta rápidamente relajación vibracional hasta el nivel vibratorio más bajo del estado excitado desde el cual puede ser des excitada por una de varias vías competitivas. La desexcitación directamente de regreso al estado fundamental puede ocurrir por procesos no radiactivos o por emisión de fotones. El último proceso se conoce como fluorescencia [10].

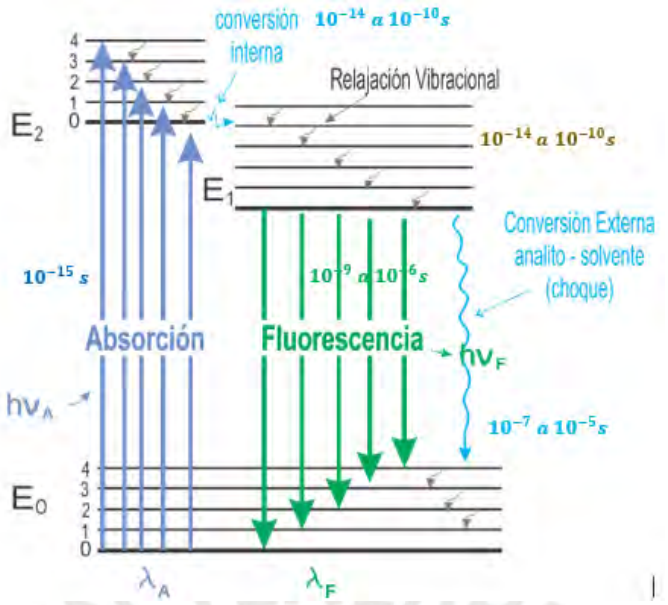


Figura 1.4. Una de las formas de diagrama de Jablonski ilustrando los procesos de absorción, relajación vibracional y emisión de fluorescencia.

B. Tiempos de vida del estado excitado

El tiempo de vida de la fluorescencia es respecto al decaimiento cinético, que es un reflejo de los tiempos de vida de sus respectivos estados excitados. Este proceso sigue una cinética de primer orden:

$$I(t) = I_0 . e^{-k.t} \qquad (1.4)$$

donde $I(t)$ es la intensidad en el tiempo t e I_0 es la intensidad inicial $[I(t)\ en\ t = 0]$. La constante de velocidad $\boldsymbol{k}$ para la desexcitación puede expresarse en términos de constantes de velocidad de desexcitación radiativa (k_R) y no radiativa (k_{NR}):

$$k = k_R + k_{NR} \qquad (1.5)$$

La vida útil de la luminiscencia t, es el tiempo requerido para que la intensidad decaiga a $1/e$ de la intensidad inicial $[t = \tau\ cuando\ I\ (t) = I_0\ /\ e]$ y es inversamente proporcional a k. Los tiempos de vida de fluorescencia, t_F, son del orden de nanosegundos a microsegundos [6].

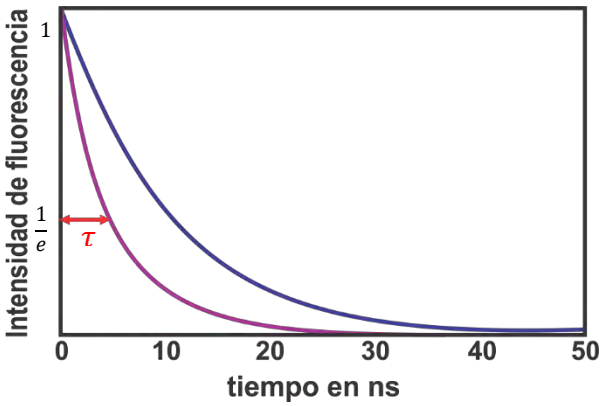


Figura 1.5. Gráfica que muestra el decaimiento de fluorescencia con distintos tiempos de vida (τ) después de apagar la luz de excitación. El tiempo de decaimiento τ es el tiempo en el que solo se ve $1/e$ de la fluorescencia inicial, azul: $\tau = 10\ ns$, rojo: $\tau = 5\ ns$ [7].

C. Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico, o eficiencia cuántica, para fluorescencia o fosforescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas luminiscentes y número total de moléculas excitadas. Para una molécula altamente fluorescente como la fluoresceína, la eficiencia cuántica se acerca a la unidad en algunas condiciones. Las especies químicas que no fluorescente apreciablemente tienen eficiencias cercanas a cero.

La figura 1.4 y nuestra discusión sobre los procesos de desactivación sugieren que el rendimiento cuántico de fluorescencia ø para un compuesto está determinado por las constantes de velocidad relativa k_x para los procesos mediante los cuales se desactiva el estado singlete excitado más bajo. Estos procesos son fluorescencia (k_f), conversión externa (k_{ec}), conversión interna (k_{ic}). Podemos expresar esta relación es por la ecuación.

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ec} + k_{ic}} \qquad (1.6)$$

Donde los términos k son la constante de velocidad respectiva para los diversos procesos de desactivación.

La ecuación 1.6 permite una interpretación cualitativa de muchos de los factores estructurales y ambientales que influyen en la intensidad fluorescente. Las variables

que conducen a valores altos para la tasa de fluorescencia constante k_f y valores bajos para los otros términos k_x que mejoran la fluorescencia [11], [12].

D. Fluorescencia y estructura

La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presenta los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de baja energía.
Los compuestos que contienen grupos carbonilo conjugados en estructuras alifáticas también pueden presentar fluorescencia. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución.
Gran parte de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, normalmente la eficiencia cuántica se incrementa a mayor número de anillos y con su grado de condensación. Los heterociclos sencillos tales como la piridina y el pirrol, no presentan fluorescencia, pero en cambio los benzoderivados sí que la suelen presentar [13].

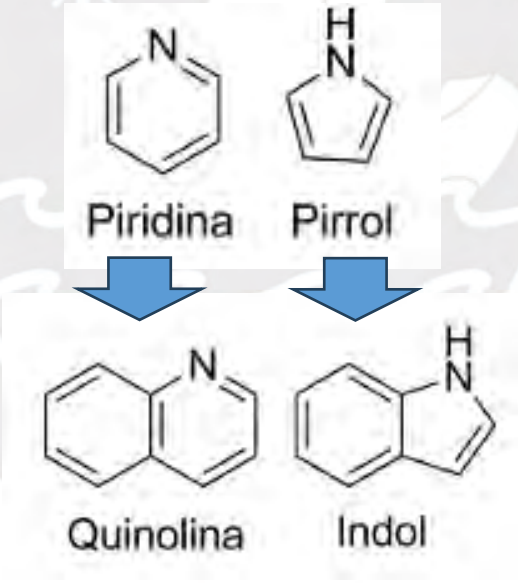


Figura 1.6. Comparación entre estructuras de la Piridina, Pirrol no fluorescen y sus correspondientes Benzoderivados fluorescentes [13].

E. Efecto de la rigidez estructural

Empíricamente se encuentra que la fluorescencia se ve particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. Por ejemplo, en el siguiente caso

compararemos la eficacia cuántica del fluoreno y del bifenilo que son próximas a 1 y 0.2 respectivamente, bajo condiciones de medida similares. La diferencia en el comportamiento parece ser, en gran medida, el resultado de un aumento en la rigidez proporcionado por el puente que forma el grupo metileno en el fluoreno.

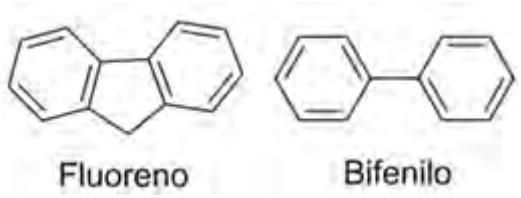


Figura 1.7. Distintas estructuras fluorescentes, donde se observa que la rigidez estructural nos da un aumento de la fluorescencia, la eficacia cuántica del fluoreno y del bifenilo que son próximas a 1 y 0.2 respectivamente [13].

También se ha recurrido a la influencia de la rigidez estructural para explicar el aumento de la fluorescencia de ciertos agentes quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico [13].

F. Efecto de la concentración sobre la intensidad de fluorescencia

El poder de la emisión de fluorescencia F es proporcional al poder radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema. Es decir,

$$F = \phi_f \, K''(P_0 - P) = K'(P_0 - P) \quad (1.7)$$

Donde P_0 es la potencia del haz incidente en la solución, P es su potencia después de atravesar una longitud b del medio, $(P_0 - P)$ es la potencia absorbida por el material, ϕ_f es la eficiencia cuántica del proceso de fluorescencia y también depende de la temperatura y K'' es la dependencia de la estructura geométrica, la cual se refiere a cómo la disposición de los átomos en una molécula influye en su capacidad para emitir fluorescencia y cómo esto está relacionado con las propiedades ópticas y espectroscópicas de la molécula. La eficiencia cuántica de la fluorescencia es una constante para un sistema determinado, por lo que el producto $\phi_f K''$ se agrupa en una nueva constante K' en el lado derecho de la ecuación 1.7. Para relacionar F con la concentración c de las especies fluorescentes, escribimos la ley de Beer en la forma.

$$\frac{P}{P_o} = 10^{-\varepsilon bc} \quad (1.8)$$

Donde ε es la capacidad de absorción molar de las moléculas fluorescentes y εbc es la absorbancia A. Al sustituir la ecuación (1.8) en la ecuación 1.6, obtenemos.

$$F = K'P_0(1 - 10^{-\varepsilon bc}) \qquad (1.9)$$

El término exponencial en la ecuación 1.9 puede expandirse como una serie de Maclaurin para.

$$F = K'P_0\left(\ 2.303ebc - \frac{(2.303ebc)^2}{2!} + \frac{(2.303ebc)^3}{3!} + \cdots \right) \quad (1.10)$$

Siempre que $2.303\varepsilon bc = A < 0.05$, todos los términos posteriores entre paréntesis son pequeños con respecto al primer término. Por lo tanto, podemos escribir

$$F = 2.303\ K'\varepsilon bcP_0 \quad (1.11)$$

O, a constante P_0.

$$F = Kc = 2.303\ K'\varepsilon bcP_0 \ = \ 2.303\phi\ K''\varepsilon bcP_0 \quad (1.12)$$

Cuando c llega a ser lo suficientemente grande como para que la absorbancia sea mayor que aproximadamente 0.05, los términos de mayor orden en la ecuación 1.10 se vuelven importantes y se pierde la linealidad; F entonces se encuentra debajo de una extrapolación de la gráfica de línea recta. Esta absorción excesiva se conoce como *absorción primaria*.

Otro factor responsable de las desviaciones negativas de la linealidad a alta concentración es la absorción secundaria. La absorción secundaria ocurre cuando la longitud de onda de emisión se superpone a una banda de absorción. Luego, la fluorescencia disminuye a medida que la emisión atraviesa la solución y otras moléculas en la solución lo reabsorben. Los efectos de estos fenómenos son tales que una gráfica de fluorescencia versus concentración puede exhibir un máximo. Los efectos de absorción a menudo se denominan efectos de *filtro interno* [5].

G. Auto aniquilación o autoquenching

La fluorescencia es un fenómeno en el que ciertas moléculas, llamadas fluoróforos, absorben energía lumínica y luego la emiten como luz de menor energía y longitud de onda más larga. La intensidad de la fluorescencia es la luminosidad de esta luz emitida. Sin embargo, existen procesos que pueden disminuir la intensidad de la fluorescencia, y esta disminución se llama apagamiento o quenching.

Uno de los mecanismos de apagamiento se llama apagamiento por colisión. Esto ocurre cuando un fluoróforo en estado excitado, entra en contacto con otra molécula en la solución (que se llama el "apagador" o quencher). Durante la colisión, el fluoróforo transfiere su energía al apagador, lo que provoca que el fluoróforo regrese a su estado fundamental (su estado normal y no excitado) sin emitir luz.

Este proceso de apagamiento por colisión se puede ilustrar utilizando un diagrama de Jablonski modificado. La figura 1.18 se muestra cómo cambian los niveles de energía a medida que el fluoróforo transita de su estado excitado a su estado fundamental durante su integración con el apagador [11].

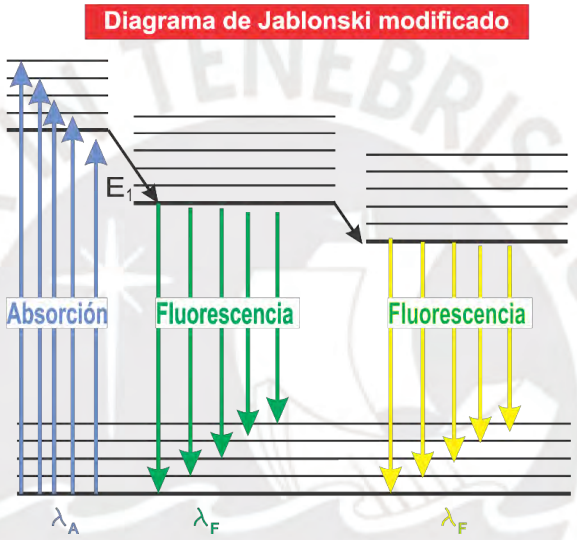


Figura 1.8. Diagrama de Jablonski modificado que ilustra el proceso de apagamiento por colisión y sus efectos en la desexcitación molecular.

En este diagrama, se muestra cómo cambian los niveles de energía a medida que el fluoróforo transita de su estado excitado a su estado fundamental durante su integración con el apagador. Como resultado, no emite la fluorescencia que emitiría si permaneciera en su estado excitado.

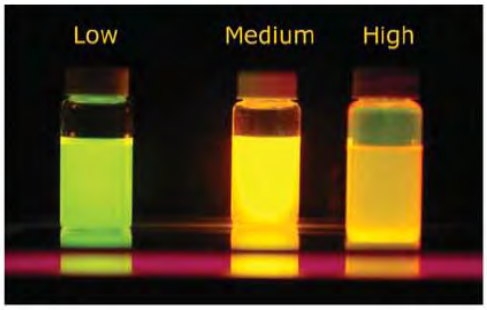


Figura 1.9. Gráfica que muestra el efecto de las concentraciones en el color y los espectros de emisión de la Rhodamine 6G. Las concentraciones de R6G son 5 x 10^{-6}, 1.6 x10^{-4}, y 5.7 x 10^{-3} M evidenciando su comportamiento a distintas concentraciones [14].

H. Efectos Generales del Solvente

La polaridad del solvente y el entorno local tienen efectos profundos en las propiedades espectrales de emisión de los fluoróforos. Los efectos de la polaridad del solvente son una de las causas del corrimiento de Stokes, que es una de las primeras observaciones en fluorescencia. Los espectros de emisión se pueden medir fácilmente, lo que resulta en numerosas publicaciones sobre los espectros de emisión de fluoróforos en diferentes solventes y cuando están unidos a proteínas, membranas y ácidos nucleicos. Un uso común de los efectos del solvente es determinar la polaridad del sitio de unión de la sonda en la macromolécula. Esto se logra mediante la comparación de los espectros de emisión y/o los rendimientos cuánticos cuando el fluoróforo está unido a la macromolécula o disuelto en solventes de diferente polaridad. Sin embargo, existen muchas otras instancias en las que se utilizan los efectos del solvente. Supongamos que un ligando fluorescente se une a una proteína o membrana. La unión suele ir acompañada de un cambio en el espectro o en el rendimiento cuántico debido al entorno diferente para el ligando unido. Alternativamente, el ligando puede inducir un cambio en el espectro de fluorescencia intrínseca o extrínseca de la proteína. En ambos casos, los cambios espectrales se pueden utilizar para medir la extensión de la unión.

Los efectos del solvente y el entorno en los espectros de fluorescencia son complejos y se deben a varios factores además de la polaridad del solvente. Los factores que afectan los espectros de emisión de fluorescencia y los rendimientos cuánticos incluyen: rigidez del entorno local, polaridad y viscosidad del solvente, tasa de relajación del

solvente, cambios en las tasas de decaimiento radiativo y no radiativo, cambios en la conformación de la sonda, transferencia de carga interna, transferencia de protones y reacciones en estados excitados y interacciones sonda-sonda. Estos efectos múltiples brindan muchas oportunidades para explorar el entorno local que rodea a un fluoróforo. Sin embargo, puede ser difícil saber cuál de estos efectos es dominante en un sistema experimental particular, y típicamente más de un efecto afectará simultáneamente al fluoróforo. Al considerar los efectos ambientales, la polaridad del solvente suele ser el primer tema. Sin embargo, los efectos ambientales son complejos, e incluso la polaridad del solvente no se puede describir con una sola teoría. La ecuación de Lippert explica parcialmente el efecto de la polaridad del solvente, pero no tiene en cuenta otros efectos, como la formación de enlaces de hidrógeno con el fluoróforo o la transferencia de carga interna que depende de la polaridad del solvente. En este capítulo, comenzaremos con una descripción de los efectos generales del solvente y luego describiremos los otros mecanismos que afectan los máximos de emisión y los rendimientos cuánticos [14].

1.2.2 Espectroscopia de Fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica analítica que se utiliza para estudiar las propiedades de las sustancias que emiten luz (fluorescencia) cuando son excitadas por radiación de una longitud de onda específica, generalmente ultravioleta o visible.

Para medir la fluorescencia, se utiliza un espectrómetro de fluorescencia, el cual está compuesto por varios elementos: una fuente de luz (como una lámpara de xenón o un láser) que emite la radiación excitadora hacia una muestra que contiene la solución a analizar. Esta muestra emite fluorescencia, la cual es captada y registrada por el espectrómetro, generando el espectro correspondiente.

1.3 Fluorescencia de la Rhodamine B

La rodamina es una clase de derivados del xanteno con propiedades fluorescentes que se utilizan como colorantes trazadores en una amplia variedad de aplicaciones industriales y de laboratorio [15].

Sinónimos:

Basic Violet 10, Brilliant Pink B, Rhodamine O, Tetraethylrhodamine

Fórmula empírica: $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ [15].

Frmula Estructural de Rhodamine B en Ethanol:

La longitud de onda de excitación de Rhodamine B disuelta Ethanol se activa con luz verde (510 nm) y emite en rojo (565 nm) (figura 1.10), siendo eficaz a bajas concentraciones, fácilmente detectable en equipos fluorometros y microscopios ([16], [17]).

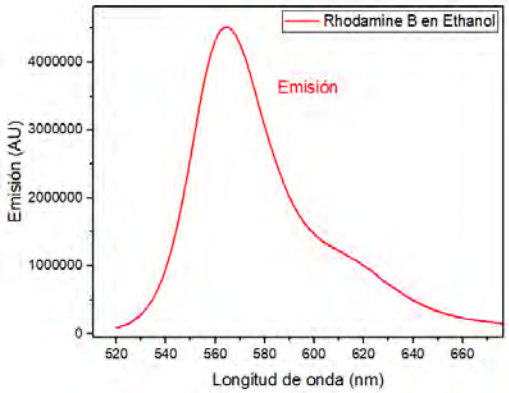


Figura 1.10. Espectro de emisión de fluorescencia de Rhodamine B disuelta en etanol usando una fuente de excitación de 510 nm, el rendimiento cuántico de 0,7. Datos extraídos de [18].

Los valores de absorción se recopilaron utilizando un ancho de banda espectral de 1.0 nm, un tiempo de promedio de señal de 133 ms, un intervalo de datos de 0.25 nm y una velocidad de escaneo de 112.5 nm/min.

Estas mediciones se ajustaron para que el coeficiente de extinción molar coincidiera con el valor de 106,000 cm^{-1}/M a 542.8 nm [18].

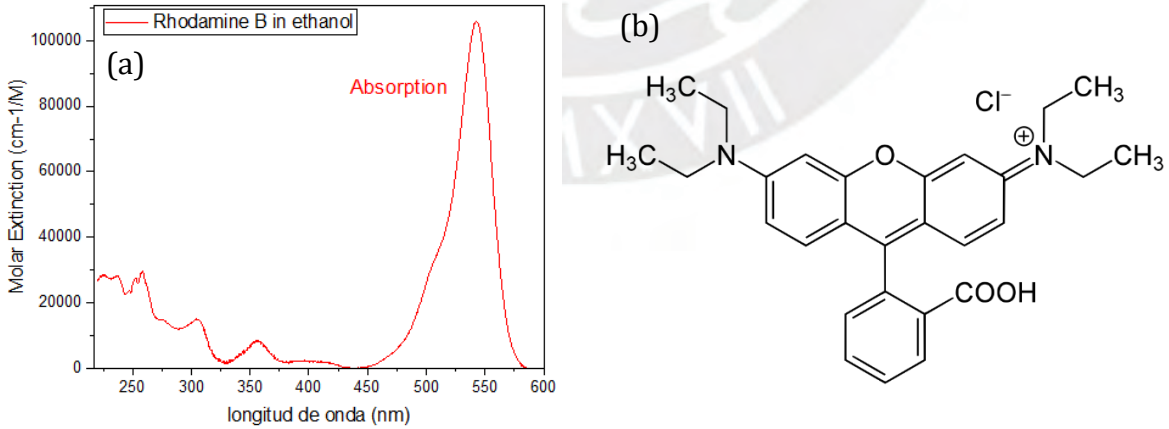


Figura 1.11. (a) Espectro de absorción de Rhodamine B. Datos extraídos de omlc [18].(b) Fórmula estructural, utilizada como referencia para los estudios de fluorescencia [15].

Se informa que el rendimiento de fluorescencia es de 0,65 en etanol básico, 0,49 en etanol, 1,0 y 0,68 en etanol al 94 %. El rendimiento de fluorescencia depende de la temperatura [18].

1.3.1 La Rhodamine B como método de validación de un sistema de fluorescencia

La eficacia del método se evalúa siguiendo las pautas del ICH (Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos para Uso Humano), donde se examinan varios parámetros de validación como la linealidad y el rango. Se analiza la Rhodamine B disuelta en agua destilada, metanol y etanol, y se mide la intensidad de fluorescencia. Por último, se lleva a cabo el cálculo de la regresión lineal de los datos, y se obtiene una gráfica de intensidad de fluorescencia versus concentración, lo cual es lineal en el intervalo de 0.5 a 2.5 µg/ml. En nuestro caso, se obtuvo una curva de calibración de Rhodamine B en etanol, mostrando una linealidad de coeficiente de correlación 0.9975, la cual se muestra en la Figura 1.12. La tabla 1.2 presenta el resumen de los parámetros de la regresión lineal calculada [19].

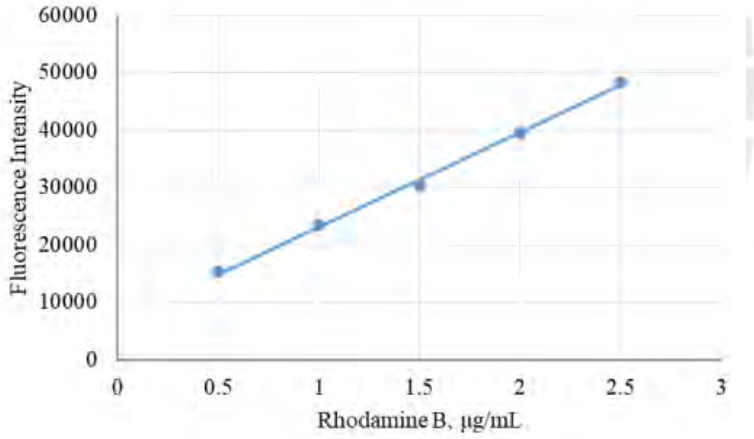


Figura 1.12. Curva de calibración de Rhodamine B utilizada para determinar la relación entre concentración y fluorescencia. Datos extraídos de [19].

Parámetro	Valor
Rango de concentración	0.5- 2.5 µg/ml
pendiente	16413
Intercepción	6772.2

Límite de detección	0.1436 µg/ml
Límite de cuantificación	0.4787 µg/ml

Tabla 1.2. Datos de rendimiento y parámetros analíticos para la determinación de Rhodamine B.

1.4 La química de las tintas de lapiceros

En la actualidad se fabrican miles de millones de lapiceros cada año, y una mezcla de productos químicos determina el color y el flujo de su tinta.

C&EN menciona que los colores de las tintas se obtienen de pigmentos, que son compuestos insolubles suspendidos en un solvente, o de tintes solubles. En el caso de las tintas de lapiceros es común usar tintes debido a que los pigmentos pueden obstruir la punta de los lapiceros.

Las tintas negras usan carbón o una mezcla de compuestos coloreados. La tinta azul generalmente obtiene su tono de los tintes de trifenilmetano o **Cristal Violet**, y la tinta roja a menudo se basa en el tinte de **Eosin Yellow** [20].

1.4.1. Colorantes en lapiceros de tinta roja

De C&EN buscaremos los espectros de absorción y de emisión de Eosin Yellow presentes en los lapiceros rojos.

Eosin Yellow

Colorante rojo versátil que se utiliza en cosmética, productos farmacéuticos, textiles, etc., y como colorante de tejidos, colorante vital y colorante de contraste con HEMATOXILINA. También se utiliza en medios de cultivo especiales [17].

Sinónimos:

Eosin, Eosin Yellow, Bronze Bromo, Certiqual Eosine, Aizen eosine GH.

Fórmula empírica (notación de Hill): $C_{20}H_8Br_4NaO_5^+$ [17]

Formula Estructural Eosin Yellow in basic ethanol. La longitud de onda de excitación de Eosin Yellow disuelto en etanol se activa con luz azul-verde (490 nm) y emite en verde (542 nm), siendo eficaz a bajas concentraciones, detectable en equipos fluorometros.

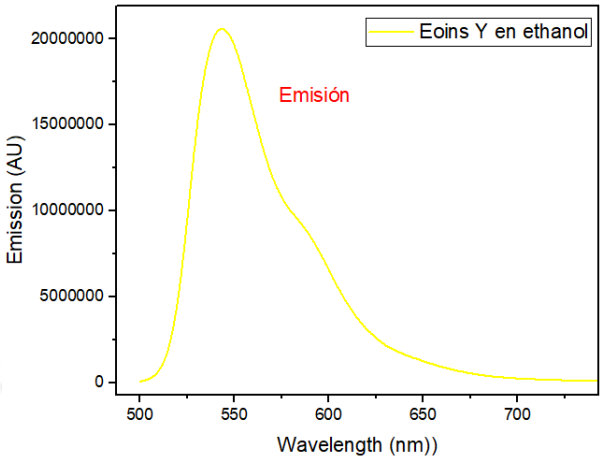


Figura 1.13. Espectro de emisión de fluorescencia de Eosin Yellow disuelta en etanol. La longitud de onda de excitación fue de 490 nm. El rendimiento cuántico de esta molécula es de 0.67. Datos extraídos de Olmc [21].

Los valores de absorción se recopilaron utilizando un ancho de banda espectral de 1.0 nm, un tiempo de promedio de señal de 0.133 segundos, un intervalo de datos de 0.25 nm y una velocidad de escaneo de 112.5 nm/min.

Estas mediciones se ajustaron para que el coeficiente de extinción molar coincidiera con el valor de 112,000 cm^{-1}/M a 524.8 nm [21].

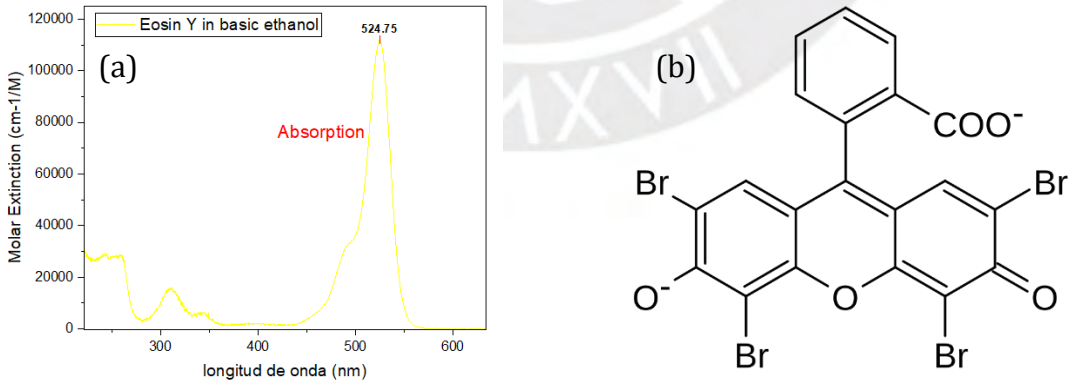


Figura 1.14. (a) Espectro de absorción en 524 nm. Datos extraídos de Omlc [21] . (b) Formula estructural de Eosin Yellow, relevantes para el análisis de sus propiedades fluorescentes en soluciones de tintas [17].

1.4.2 Colorantes en lapiceros de tinta azul

Qiran Sun [22] presenta 20 tipos de lapiceros de color azul. Se han seleccionado únicamente 3 lapiceros cuya información es reportada en la tabla 1.3.

Muestras	Crystal Violet ng/ml	Methyl Violet 2B	Victoria Blue B ng/ml	Basic Blue 7 ng/ml
Pilot	28	226	+	885
Mitsubishi SA-A	128	837	1082	ND
BIC Cristal grip assorted	84	447	+	ND

+=Detectado, pero no cuantificado, debido a la falta de sustancia de referencia o a una baja concentración.

ND=No detectado.

Tabla 1.3. Listado de los principales componentes químicos presentes en tintas de lapiceros azules. Datos extraídos de Qiran Sun [22].

La tabla 1.3, muestra información sobre los colorantes Crystal Violet, Methyl Violet 2B, Victoria Blue y Basis Blue 7, incluyendo sus concentraciones.

Crystal Violet

El violeta cristal es una sal de cloruro orgánico que es la sal monocloruro del catión violeta cristal. Se ha utilizado en cremas para el tratamiento tópico de infecciones bacterianas y fúngicas, siendo eficaz contra algunas bacterias grampositivas (en particular, especies de Staphylococcus) y algunos hongos patógenos (incluidas las especies de Candida), pero su uso disminuyó tras los informes de carcinogenicidad en animales. También se ha utilizado para teñir madera, seda y papel, así como como tinte histológico. Tiene un papel como colorante histológico, fármaco antiséptico, agente antibacteriano, agente antifúngico y fármaco antihelmíntico. Contiene un catión violeta cristal [23].

Sinónimos:

Crystal Violet, Gentian Violet, Basic Violet 3, Methylrosaniline Chloride.

Fórmula empírica (notación de Hill): $C_{25}H_{30}ClN_3$ [23]

Formula Estructural Crystal Violet in Glycerol

La longitud de onda de excitación de Crystal Violet Y disuelto en Glicerina se activa con luz verde (550 nm) y emite en rojo (635 nm), siendo eficaz a bajas concentraciones, detectable en equipos fluorometros.

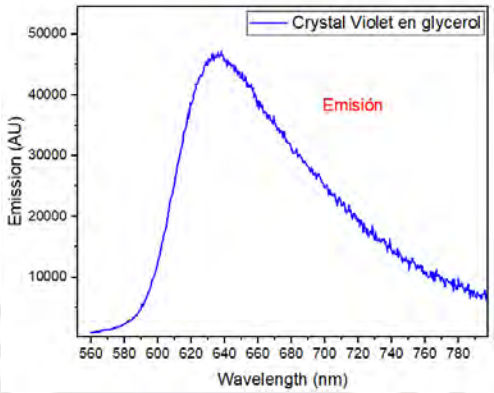


Figura 1.15. Espectro de emisión de fluorescencia del Crystal Violet disuelto en glicerol. La longitud de onda de excitación fue de 550 nm. El rendimiento cuántico de esta molécula es de 0,019. Datos extraídos de [24].

Los valores de absorción se recopilaron utilizando un ancho de banda espectral de 1.0 nm, un tiempo de promedio de señal de 0.133 segundos, un intervalo de datos de 0.25 nm y una velocidad de escaneo de 112.5 nm/min.

Estas mediciones se ajustaron para que el coeficiente de extinción molar coincidiera con el valor de 112,000 cm^{-1}/M a 590.2 nm [24].

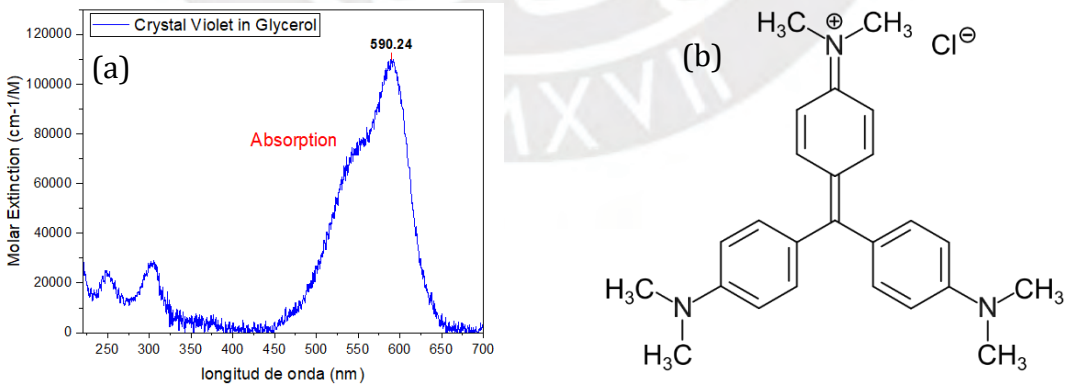


Figura 1.16. (a) Espectro de absorción de Crystal en glicerina en 590 nm. Datos extraídos de Omlc [24]. (b) Fórmula estructural, relevantes para el análisis de sus propiedades fluorescentes en soluciones de tintas [23].

Methyl Violet 2B

El Methyl Violet 2B es un compuesto de colorante compuesto por rosanilinas violetas con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias [25].

Sinónimo:

Methyl violet, Gentian Violet B, Pentamethyl pararosaniline chloride, Methyl Violet 2BN200.

Fórmula empírica (notación de Hill): $C_{24}H_{28}ClN_3$ [25].

Formula Estructural Methyl Violel 2B

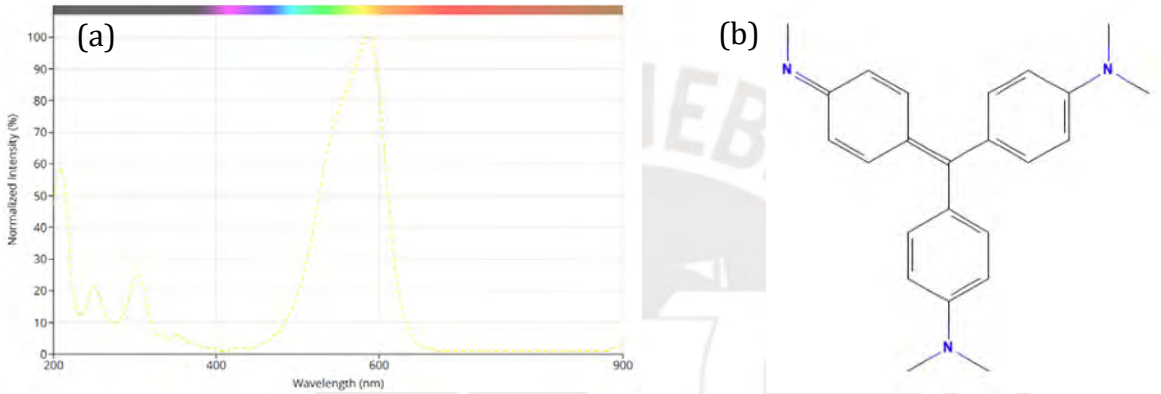


Figura 1.17. (a) Espectro de absorción en 587 nm. Figura estriada de Aabtio [26]. (b) Fórmula estructural de Methyl Violet 2B. Figura extraída de Pubchem [25].

Victoria Blue B

Se une a los ácidos nucleicos y se puede utilizar en técnicas de tinción estandarizadas adecuadas para el reconocimiento automático de patrones celulares. Tiene una función como colorante histológico y como fluorocromo [27].

Sinónimo:

Basic blue 26, Calcozine Blue B, Tertrophene Blue.

Fórmula empírica (notación de Hill): $C_{33}H_{32}ClN_3$ [27]

Formula Estructural Victoria Blue B

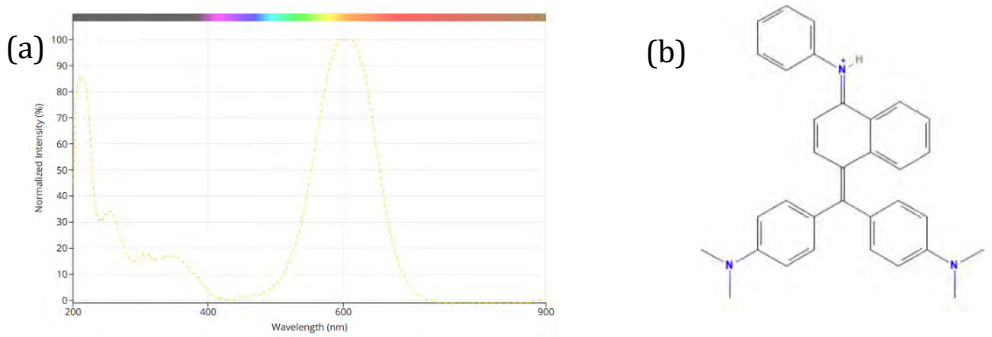


Figura 1.18. (a) Espectro de absorción en 593nm. Figura extraída de Aatbio [28] (b) y fórmula estructural de Victoria Blue [27].

Basic Blue 7

El Azul Victoria BO se utiliza para teñir sustratos aniónicos, por ejemplo: lana, seda, nailon y acrílicos, donde se requiere un teñido brillante. También se aplica en microscopía, utilizado para teñir mitocondrias.

Sinónimos:

Victoria Pure Blue BO, Victoria blue BO.

Fórmula empírica (notación de Hill): $C_{33}H_{40}ClN_3$

Formula Estructural Basic Blue 7

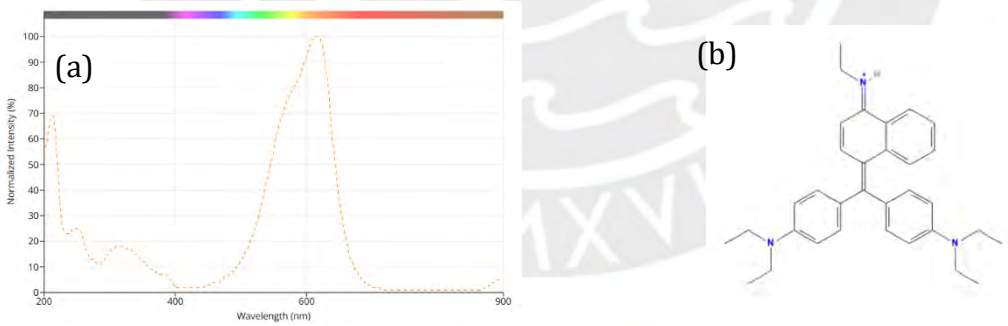


Figura 1.19. (a) Espectro de absorción de Victoria Pure Blue BO en 611 nm. Figura extraída de Aatbio [29]. (b) Fórmula estructural de Basic Blue 7. Figura extraída de Pubchen [30].

CAPÍTULO 2. IMPLEMENTACION DE SISTEMAS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

2.1 Sistema de fluorescencia con luz laser de 405 nm.

2.1.1 Esquema del sistema óptico.

En un sistema de espectroscopía de fluorescencia, el láser es dividido en dos haces de igual intensidad (50:50) mediante un divisor de haz. Luego, uno de los haces interactúa con la muestra y genera fluorescencia. Posteriormente, ambos haces se recombinan en el mismo divisor de haz. Finalmente, un detector ubicado a la salida del sistema capta la señal fluorescente emitida por la muestra y genera el espectro de fluorescencia.

El sistema óptico fue alineado con una geometría 180° en plano horizontal, como se muestra en la figura 2.1.

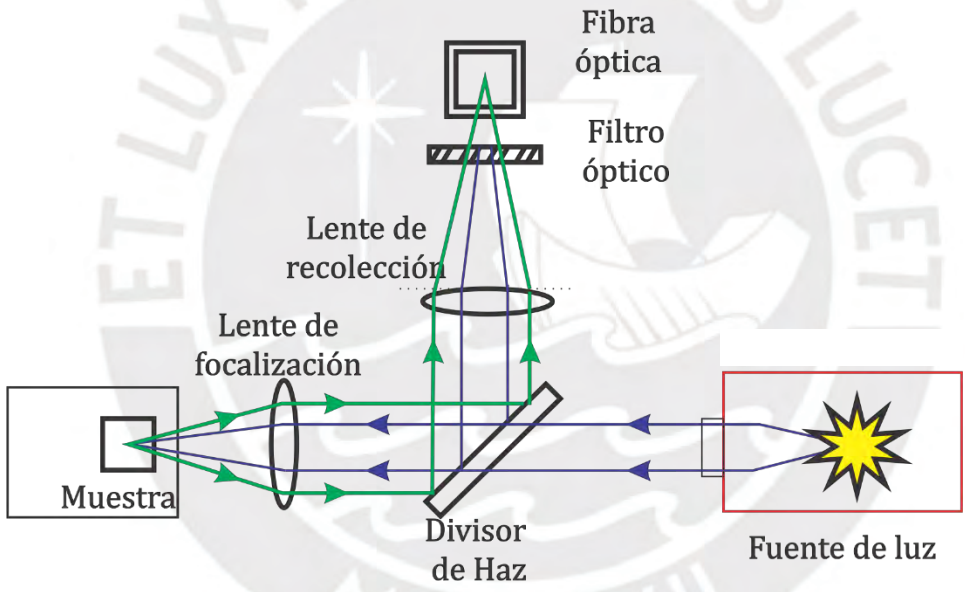


Figura 2.1. Esquema de la geometría del equipo espectroscopia de fluorescencia en configuración 180°.

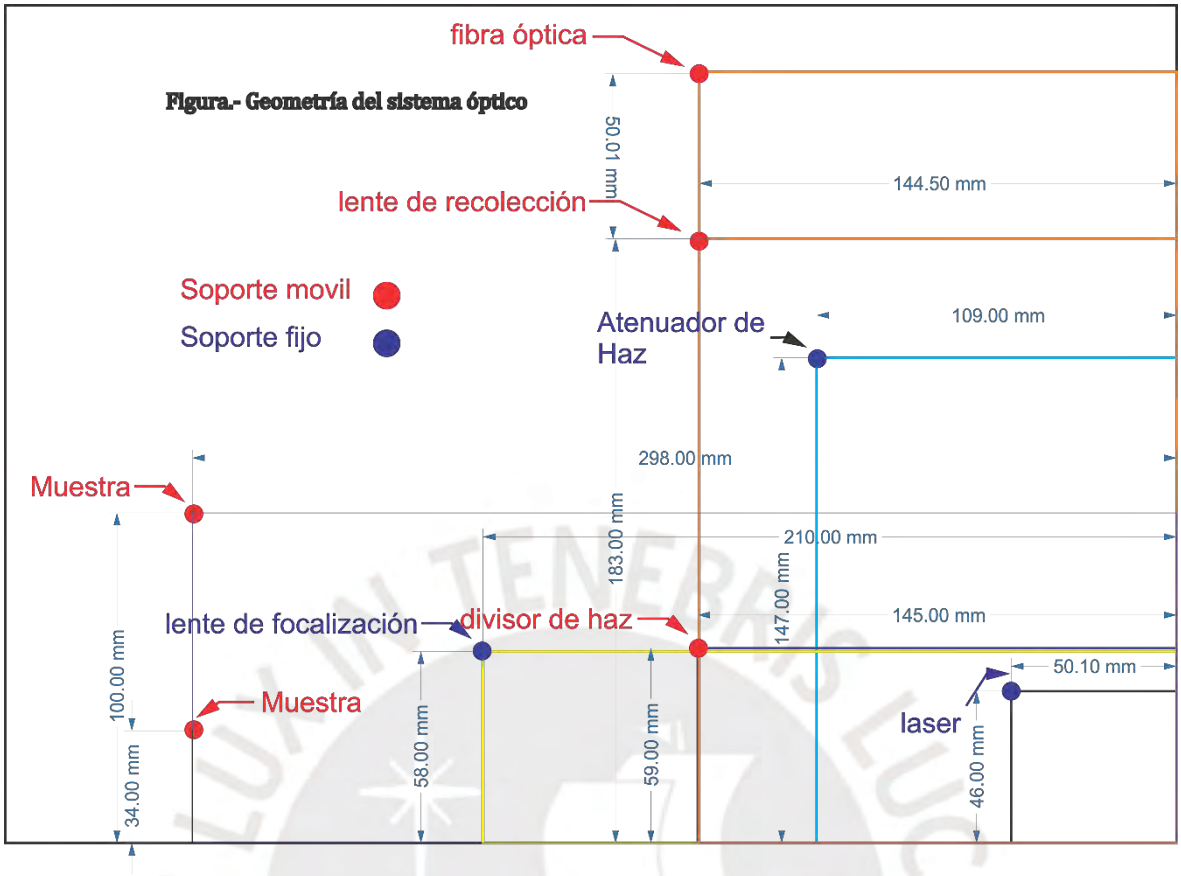


Figura 2.2. Esquema de posicionamiento de instrumentos del equipo de espectroscopia de fluorescencia.

La figura 2.1 muestra la geometría de los elementos ópticos empleados en la alineación del haz láser. De derecha a izquierda se tiene un láser de longitud de onda de 405 nm, dos lentes de longitud focal de 50 mm y un divisor de haz 50:50. Cada elemento óptico se encuentra soportado sobre monturas mecánicas que permiten movimientos de traslación y rotación hasta en 3 grados de libertad.

Descripción de elementos que conforma el sistema

Laser

Descripcion

CR-10 Laser violeta azul 12V, 400-450 nm, Clase 3B con montaje KM100.

Espejo

Descripcion

Espejo BB1-E01, diametro interior de Ø = 25,4 mm.

Marca: Thorlabs.

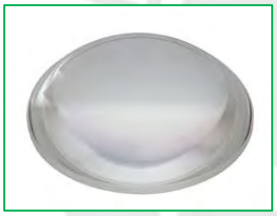
Divisor de haz

Descripcion

Divisor de haz BSW16 400-700nm , diametro interior Ø = 30mm, 50% transmision, 50% reflexion.

Marca: Thorlabs.

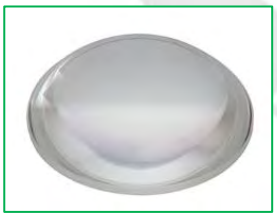
Lente de focalización



Descripcion

Lente plano-convexo, diametro interior Ø 25.4mm , f = 50mm,. Marca: Thorlabs.

Lente de recolección



Descripcion

Lente plano-convexo, diametro interior Ø 25.4mm , f = 50mm Marca: Thorlabs.

Filtro óptico

Descripcion

Filtro pasa altos 450nm FEL0450, diametro interior Ø 25.0mm.

Marca Thorlabs.

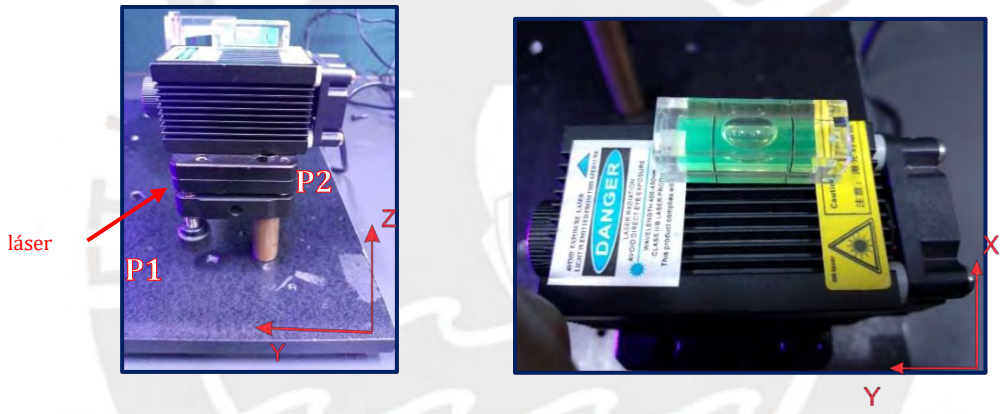
Portamuestra

Descripcion Porta-muestra para una cubeta de 1x1 cm, diseñado en laboratorio.

2.1.2. Procedimiento de alineamiento óptico con luz laser de 405 nm

Este procedimiento se llevó a cabo mediante el método de reflexión de la luz, el cual incluye los siguientes pasos:

1.- Nivelar el láser en la posición horizontal (Eje Y) usando un nivel de burbuja, como se muestra en las figuras 2.3.a y 2.3.b.



(a) **(b)**

Figura 2.3. (a) Configuración de componentes ópticos para el alineamiento del láser en el plano horizontal. (b) Alineamiento con el nivel de burbuja.

- Girar las perillas de nivelación P1 y P2 de soporte del láser (Figura 2.3a), hasta que la burbuja quede nivelada del nivel (figura 2.3b).

2.- Ajustar la luz del láser para que regrese por el mismo camino óptico y se mantenga paralelo al eje 'y', tomando como referencia la base plana de la mesa. Para ello se colocó un espejo plano para que la luz láser regrese por el mismo camino óptico como se observa en la figura 2.4.

- Girar los pies de nivelación (perillas giratorias P3 y P4) (ver Figura 2.4). del espejo, hasta que la luz del láser regrese por el mismo camino óptico.

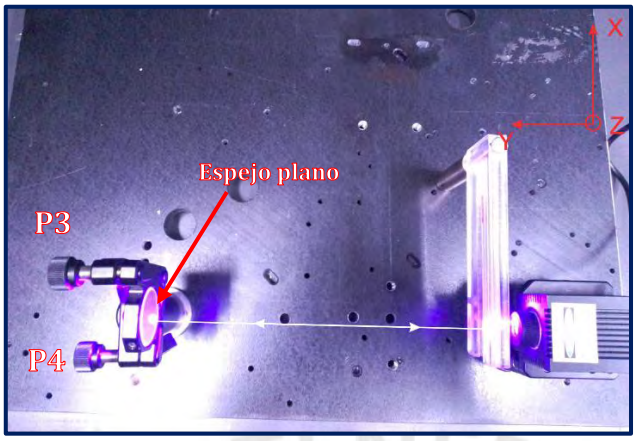


Figura 2.4. Configuración de componentes ópticos, incluyendo el espejo, para la alineación del láser en el plano horizontal.

Una vez que la luz láser regrese por el mismo camino óptico del láser, colocar el divisor de haz entre el láser y el espejo plano como se muestra en la figura 2.5, girar el divisor de haz con un ángulo de inclinación 135° con respecto al eje y, y luego hacer que la luz del láser pase por el centro del divisor de haz como se muestra en la figura 2.5.

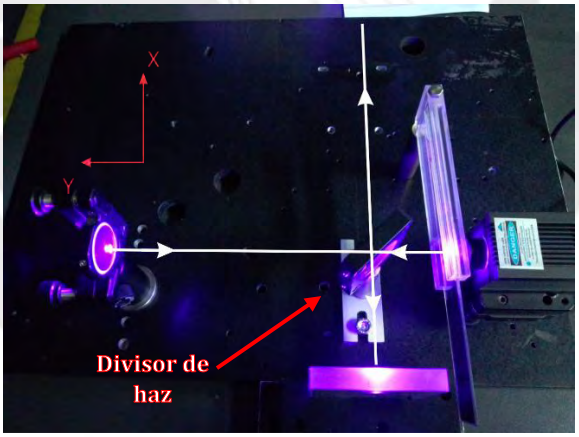


Figura 2.5. Dirección y alineación del haz laser en el eje horizontal con el espejo y el divisor de haz.

3.- Colocar la lente de focalización (f = 50 mm) entre espejo y el divisor de haz (se observa en la figura 2.6), asegurando que la luz del láser pase por el centro del lente de focalización y paralelo al eje y.

- Girar las perillas P5 y P6 de la base de la lente de focalización (ver figura 2.6) hasta que la luz del láser se centre en punto medio del espejo plano.

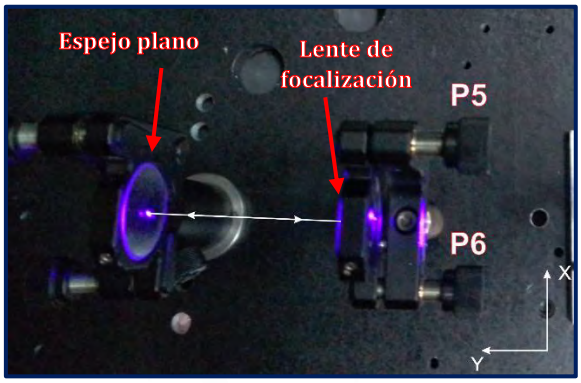


Figura 2.6. Configuración de los componentes ópticos para alinear el láser en el eje horizontal con la lente de focalización.

4.-Colocar la lente de recolección (f = 50 mm) entre el divisor del haz y la fibra óptica, habiendo colocado previamente la fibra óptica junto con el filtro óptico como se muestra en la figura 2.7. Es importante asegurar que la luz láser atraviese por el centro del lente de recolección, pase a través de la fibra óptica y paralelo al eje x.

- Girar las perillas P7 y P8 de la base de lente hasta que la luz del láser se centre en punto medio del filtro óptico (ver figura 2.7).

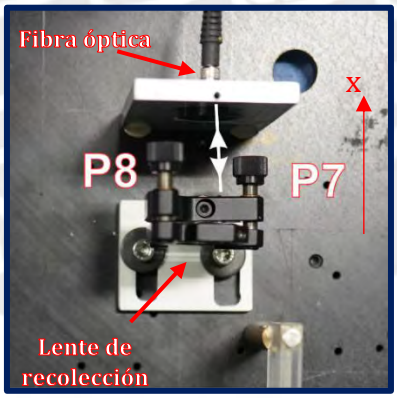


Figura 2.7. Configuración de los componentes ópticos para alinear el láser en el eje horizontal con la lente de recolección.

5.-Retirar el espejo plano y colocar la portamuestra y, por último, agregar un atenuador de luz delante del láser asegurándose que esté perpendicular al eje y como se muestra en la figura 2.8.

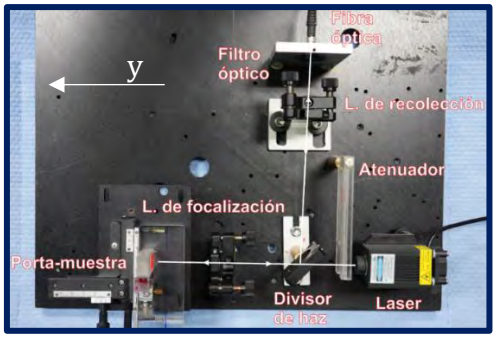


Figura 2.8. Sistema experimental de un espectrómetro de fluorescencia visible con una fuente de luz láser de 405 nm.

6.- Finalmente, para verificar un alineamiento óptico adecuado, se recomienda colocar un papel blanco con un orificio en la trayectoria del láser, preferiblemente entre la lente de focalización y el divisor de haz. Esto permite que el haz atraviese el orificio en ambos sentidos. Si los haces de ida y vuelta permanecen centrados y superpuestos, se confirma que el alineamiento es correcto, como se muestra en la Figura 2.9.

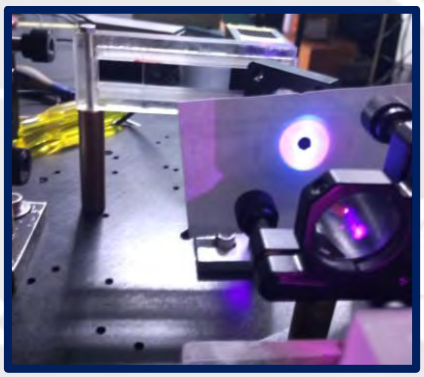


Figura 2.9. Verificación del alineamiento óptico. La fluorescencia del material y la fuente de luz laser coinciden.

Configuración de Programa Espectra Suite y ajuste del sistema de fluorescencia para 1 mW.

En esta fase, se busca detectar la radiación emitida por una muestra altamente fluorescente. Para ello, se colocó la muestra en la porta muestra y se ajustaron las condiciones del láser a una potencia de 1mW, en el programa **Espectra Suite** las condiciones fueron 4ms y un promedio de 1 espectro. Para evitar la saturación del espectrómetro y obtener mediciones precisas, se utilizó papel autoadhesivo que emite en 605 nm y se redujo la intensidad del láser mediante un atenuador de diferentes

densidades. La muestra fluorescente se posicionó en la distancia focal del objetivo, tal como se muestra en la figura 2.10.

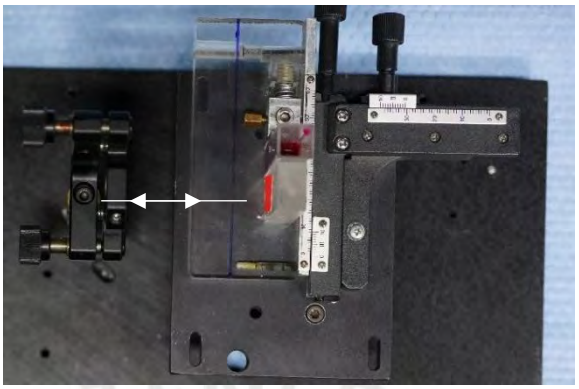


Figura 2.10. Colocación del autoadhesivo a una distancia focal de 25.4 mm.

El proceso de alineación del haz en el espectrómetro de fluorescencia comienza colocando la muestra en la distancia focal del objeto. El programa **Espectra Suite** mostrará el registro del espectro de fluorescencia (ver figura 2.11) y se utilizarán las perillas de ajuste fino para optimizar la posición hasta que se obtenga un espectro con intensidad máxima que pueda detectar el equipo alrededor de 60000 u.a.

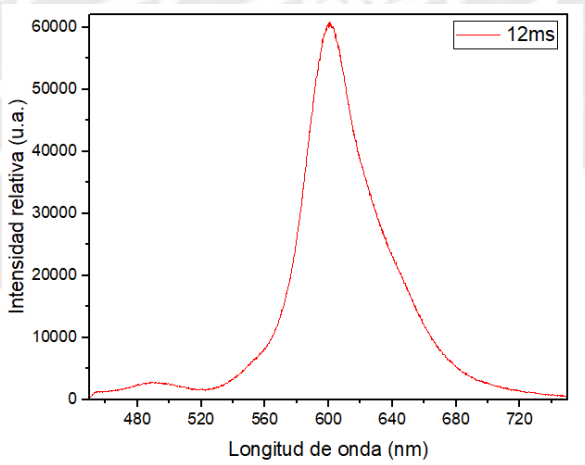


Figura 2.11. Espectro de Fluorescencia del autoadhesivo con tiempo de integración de 12ms y promedio 1 y 1.0 mW.

Luego con la misma potencia de 1 mW, promedio 1 espectro y cambiamos el tiempo de integración *4ms, 5ms, 6ms, 8ms, 10ms y 12ms.*

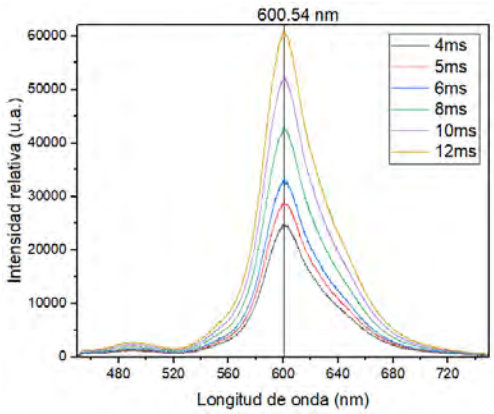


Figura 2.12. Espectro de Fluorescencia del autoadhesivo de emisión 600.54 nm a diferente tiempo de integración *4ms ,5ms ,6ms, 8ms, 10ms y 12 ms.*

2.2 Sistema de alineamiento óptico con luz laser de 532 nm

2.2.1 Esquema del sistema óptico

En este espectrómetro, el láser es dividido en 60:40 por el divisor de haz, los haces divididos luego se reflejan por la muestra y es recombinado en el divisor de haz. A la salida se colocará un detector donde nos mostrará el espectro de fluorescencia de la muestra.

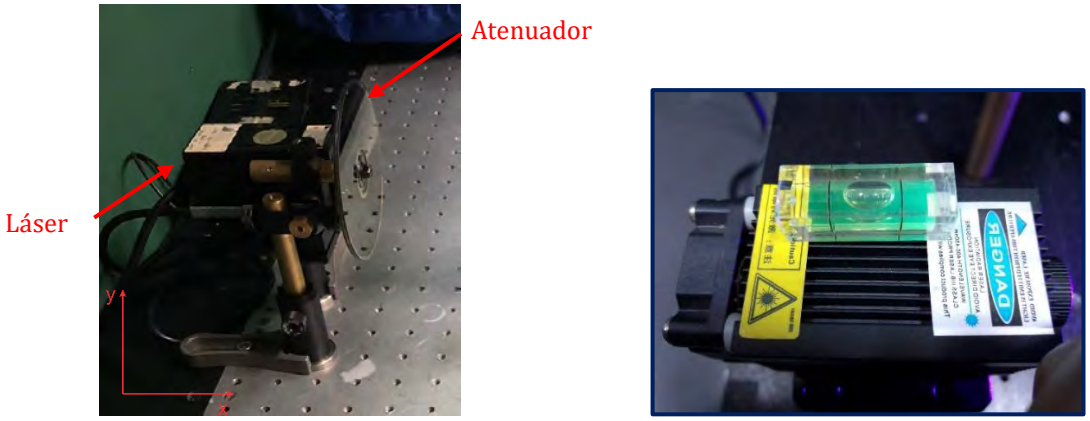
El sistema óptico fue alineado con una geometría 180° en plano horizontal como se muestra en la figura 2.1.

La figura 2.1 muestra la geometría de los elementos ópticos empleados en la alineación del haz láser. De derecha a izquierda se tiene un láser de longitud de onda de 532 nm, dos lentes (foco de 50 mm) y un semi-espejo de haz 60:40. Cada elemento óptico se encuentra soportado en monturas mecánicas y cinemáticas que permiten movimientos de traslación y rotación hasta en 3 grados de libertad.

2.2.2 Proceso de alineamiento óptico

Este procedimiento se llevó a cabo mediante método de reflexión de la luz, el cual incluye los siguientes pasos:

1.-Nivelar el láser en la posición horizontal (Eje X) usando un nivel de burbuja, como se muestra en la figura 2.13.b.



(a) **(b)**

Figura 2.13. (a) Configuración de componentes ópticos para el alineamiento del láser en el plano horizontal. (b) Alineamiento con el nivel de burbuja.

2.- Ajustar la luz del láser para que regrese por el mismo camino óptico y se mantenga paralelo al eje 'x', tomando como referencia la base plana de la mesa. Para ello se colocó un espejo plano para que la luz láser regrese por el mismo camino óptico tomando como referencia la figura 2.4.

Una vez que la luz láser regrese por el mismo camino óptico del láser, colocar el divisor de haz entre el láser y el espejo plano tomando como referencia la figura 2.5, girar el divisor de haz con un ángulo de inclinación 135° con respecto al eje z, del plano xz, y luego hacer que la luz del láser pase por el centro del divisor de haz como se muestra en la figura 2.14.

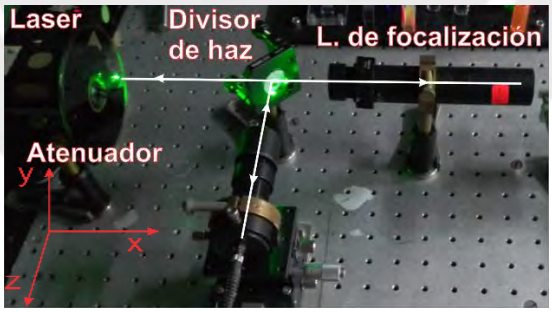


Figura 2.14. Dirección y alineación del haz laser en el eje horizontal con el espejo y el divisor de haz.

3.- Colocar el lente de focalización (f = 50 mm) entre espejo y el divisor de haz (se toma como referencia la figura 2.6), asegurando que la luz del láser pase por el centro del lente de focalización y paralelo al eje y.

4.- Colocar la lente de recolección (f = 50 mm) entre el divisor del haz y la fibra óptica, habiendo colocado previamente la fibra óptica junto con el filtro óptico como se muestra en la figura 2.15. Es importante asegurar que la luz láser atraviese por el centro del lente de recolección, pase a través de la fibra óptica y paralelo al eje z.

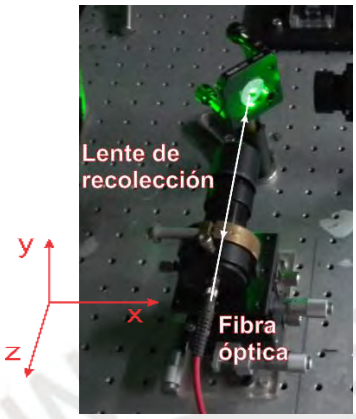


Figura 2.15. Configuración de componentes ópticos para alinear el láser en el eje horizontal con la lente de recolección.

5.- Retirar el espejo plano y colocar la portamuestra y, por último, agregar un atenuador de luz delante del láser asegurándose que esté perpendicular al eje x como se muestra en la figura 2.16.

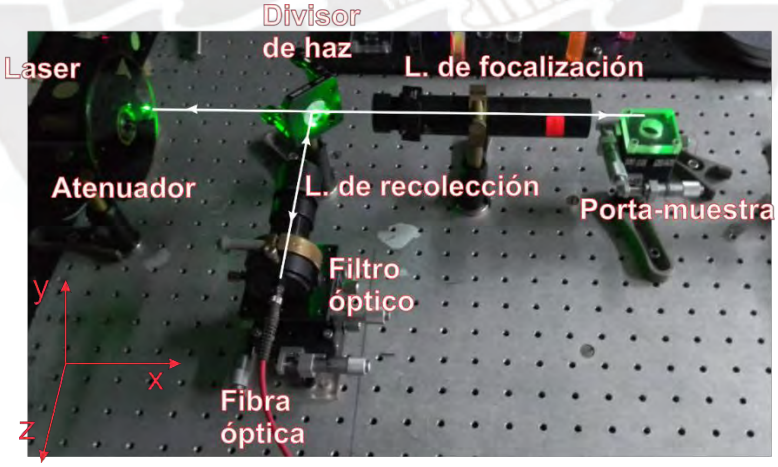


Figura 2.16. Configuración de componentes ópticos para alinear el láser en el plano horizontal.

2.3 Recomendaciones

- Evitar golpes, vibraciones, descargas eléctricas o contacto con sustancias químicas que podrían causar un mal funcionamiento del sistema o generar resultados incorrectos.

- Para obtener mediciones cualitativas precisas, usar el sistema de espectroscopia bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa en cada experimento.

Antes de la primera utilización

1. Encender la fuente de luz láser y conectar el espectrómetro al puerto USB de la Pc.

- Conecte el espectrómetro mediante un cable USB y una fibra óptica.

2. Medir la potencia luminosa de la luz laser que incide sobre la muestra con un potenciómetro (medidor de potencia).

- Abrir el programa Optical Power Monitor para controlar el potenciómetro.

- Después, posicionar la parte delantera del potenciómetro (como se muestra en la figura 2.17.b) frente al láser para realizar la medición. Esto se realiza a la misma altura que el porta muestras, midiendo la cantidad de mV que emite el láser. Si es necesario, se pueden ajustar estos valores utilizando el atenuador.

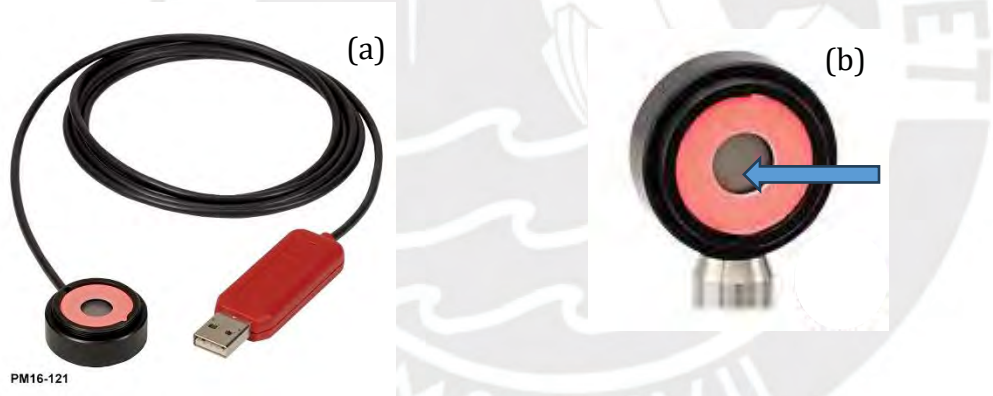


Figura 2.17. (a) Potenciómetro PM16-124 marca Tholabs. (b) Zona de incidencia del láser indicada por la flecha azul.

3. Abril el programa Sofware Spectrasuite del espectrómetro para el muestreo de la sustancia.

4. Cubrir la entrada de la fibra óptica que está conectada al espectrómetro para medir el nivel de referencia con el software Spectrasuite.

5. Finalmente, en el programa Spectrasuite, será necesario ajustar los parámetros de tiempo de integración (el intervalo durante el cual el detector recopila fotones antes de

enviarlos al software) y el promedio de señal (que optimiza la relación señal-ruido al reducir el ruido visible en el gráfico). Estos ajustes facilitarán una adquisición de datos más precisa según las necesidades de la investigación.

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SISTEMA DE FLUORESCENCIA EN RHODAMINE B DISUELTA EN AGUA DESTILADA O ALCOHOL ETÍLICO

Una vez concluido el diseño y construcción del sistema de fluorescencia, se requiere establecer el límite de detección con Rhodamine B. Se usó Rhodamine B por su alto rendimiento cuántico de fluorescencia 0.913 [19].

3.1 Proceso de preparación de las soluciones de Rhodamine B diluida en agua destilada.

Se prepararon soluciones con concentraciones de Rhodamine B desde 10 ppb hasta 1000 ppm. A continuación, se describe el proceso de preparación:

i. En un frasco de vidrio se agregarán 10 ml de agua destilada y 10 mg de polvo de Rhodamine B, obteniendo una concentración de 1000 ppm, como se muestra en la figura 3.1.

Figura 3.1. Preparación de solución de Rhodamine B en una concentración de 1000 ppm

ii. Después, se elaboran soluciones con distintas concentraciones mediante la dilución en agua destilada de una solución de Rhodamine B a 1000 ppm. En la tabla 3.1 se presentan las cantidades requeridas para la preparación de las soluciones, las cuales se establecieron en rangos con el fin de optimizar la curva de calibración lineal.

	Rhodamine B (mg)	H2O (ml)	Concentración
Rango 1	0.0001	10	10 ppb
	0.0002		20 ppb
	0.0005		50 ppb
	0.001		100 ppb

Rango 2	0.0001		10 ppb
	0.0002		20 ppb
	0.0005		50 ppb
	0.001		100 ppb
	0.002		200 ppb
	0.003		300 ppb
	0.004		400 ppb
	0.005		500 ppb
Rango 3	0.0001		10 ppb
	0.0002		20 ppb
	0.0005		50 ppb
	0.001		100 ppb
	0.002		200 ppb
	0.003		300 ppb
	0.004		400 ppb
	0.005		500 ppb
	0.01		1000 ppb
Rango 4	0.01		1 ppm
	0.05		5 ppm
	0.1		10 ppm
	0.2		20 ppm
	0.30		30 ppm
	0.5		50 ppm
	0.75		75 ppm
	1		100 ppm
	2		200 ppm
	4		400 ppm
	5		500 ppm
	7.5		750 ppm
	10		1 000 ppm

Tabla 3.1. Concentración de la Rhodamine B con agua destilada para la calibración del sistema de fluorescencia.

3.2. Límite de detección de fluorescencia de la Rhodamine B diluida en agua destilada.

Se estableció el límite de detección, se refiere a la menor concentración de un analito que el método puede identificar y distinguir del ruido, pero no necesariamente puede ser cuantificado. Se asocia a un nivel de confianza de 95% [31], del sistema de fluorescencia para determinar la longitud de onda con la máxima emisión de fluorescencia de la Rhodamine B diluida en agua destilada. Se emplea una potencia de

láser variando el tiempo de integración con el objetivo de optimizar la intensidad de fluorescencia en cada espectro y promedio para mejorar la relación señal/ruido en distintos rangos. En la calibración, se tomó el espectro de las muestras de Rhodamine B a diferentes concentraciones y se comparó con bandas referenciales. Se identificaron diferentes picos de fluorescencia como se muestras en la figura 3.2.

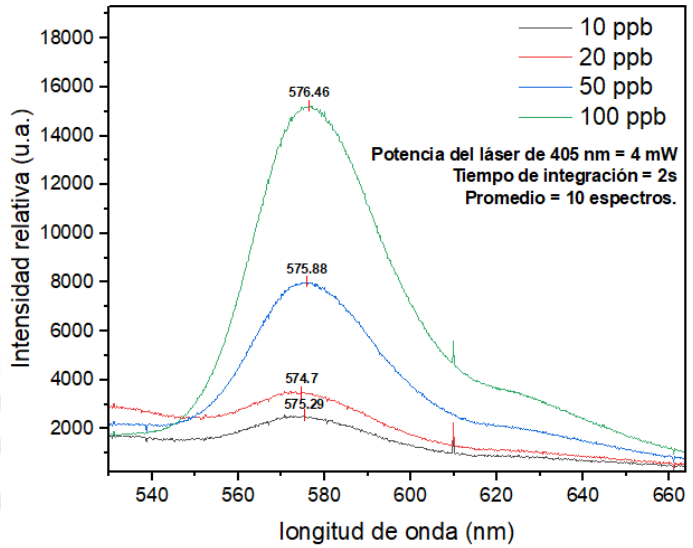


Figura 3.2. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en agua destialda con concentraciones de 10 ppb a 100 ppb para el rango 1.

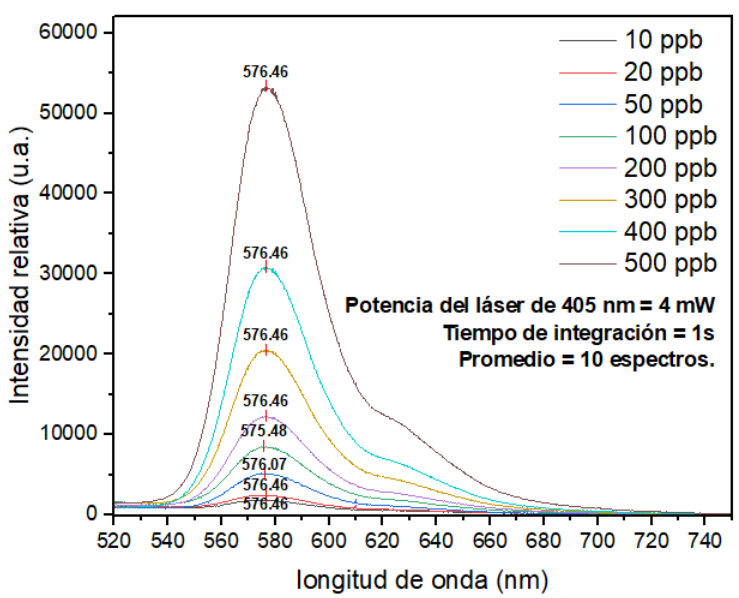


Figura 3.3. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en agua destilada con concentraciones de 10 ppb a 500 ppb para el rango 2.

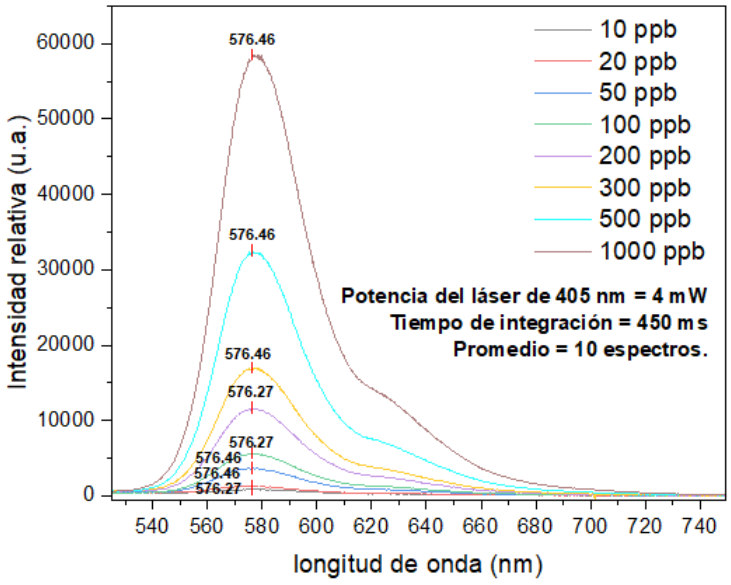


Figura 3.4. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en agua destilada con concentraciones de 10 ppb a 1000 ppb para el rango 3.

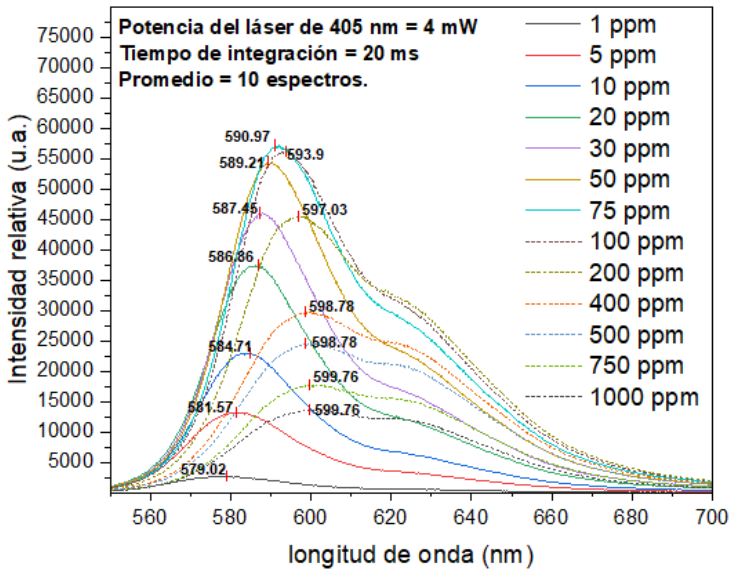


Figura 3.5. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en agua destilada con concentraciones de 1ppm a 1000 ppm para el rango 4.

El límite de detección del sistema de fluorescencia utilizando Rhodamine B con agua destilada se realizó mediante la elaboración de tablas, presentadas a continuación.

Rango de concentración 1

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (s)
4	10	Rhodamine B	566	10	575.2	2
				20	574.7	
				50	575.8	
				100	576.4	

Tabla 3.2. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10, 20, 50 y 100 ppb, comparadas con el valor de referencia [18].

Rango de concentración 2

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (s)
4	10	Rhodamine B	566	10	576.4	1
				20	576.4	
				50	576.0	
				100	575.4	
				200	576.4	
				300	576.4	
				400	576.4	
				500	576.4	

Tabla 3.3. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10 hasta 500 ppb.

Rango de concentración 3

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (ms)
4	10	Rhodamine B	566	10	576.2	450
				20	576.4	
				50	576.4	
				100	576.2	
				200	576.2	
				300	576.4	
				500	576.4	
				1000	576.4	

Tabla 3.4. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10 hasta 1000 ppb.

Rango de concentración 4

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppm)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (ms)
4	10	Rhodamine B	566	1	579.0	20
				5	581.5	
				10	584.7	
				20	586.8	
				30	587.4	
				50	589.2	
				75	590.9	
				100	593.9	
				200	597.0	
				400	598.7	
				500	598.7	
				750	599.7	
				1000	599.7	

Tabla 3.5. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 1 hasta 1000 ppm.

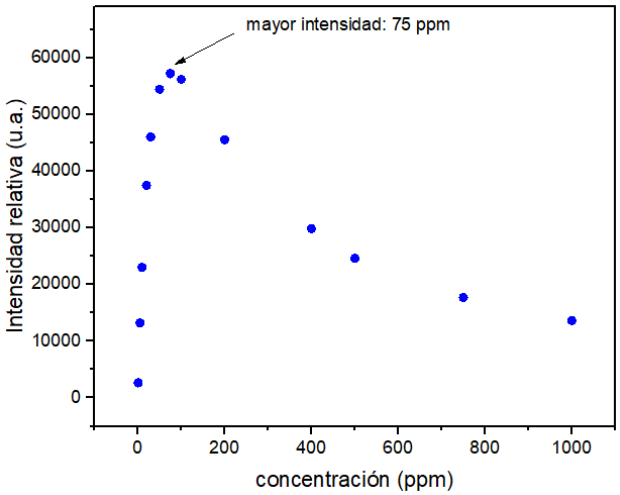


Figura 3.6. El gráfico muestra Rhodamine B diluido en agua destilada cómo la intensidad aumenta a medida que las concentraciones aumentan, y en el declive se observa la autoabsorción para el rango 4.

Concentración vs. longitud de onda de la Rhodamine B con agua destilada en los rangos 1,2,3 y 4

Al examinar y analizar los datos, notamos un desplazamiento en la posición de los picos máximos, atribuible a la influencia del solvente y soluto que modifica los niveles de energía de la solución. Este fenómeno se conoce como desplazamiento espectral.

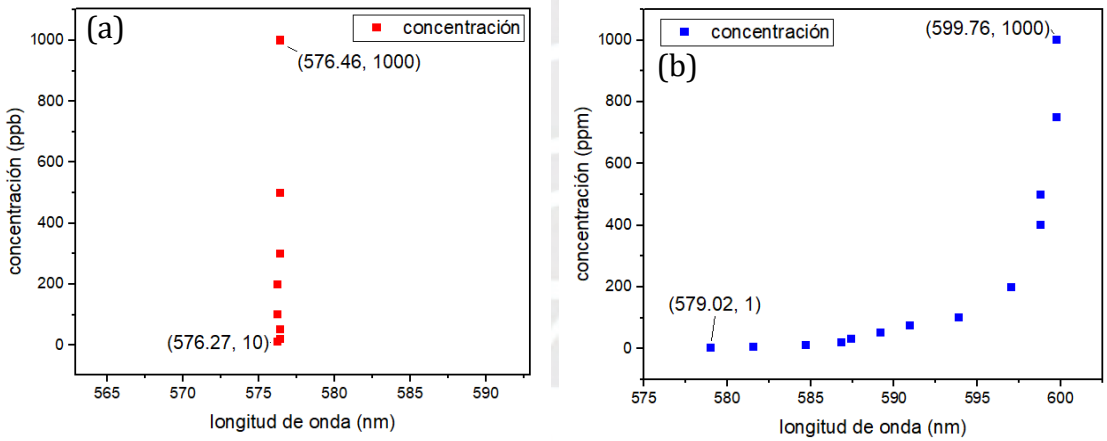


Figura 3.7. (a) Grafica muestra Rhodamine B diluido en agua destilada en los rangos 1,2 y 3 se muestra que conforme la concentración aumenta, los picos de fluorescencia permanecen constantes en las concentraciones más bajas. (b) Para el rango 4 se muestra que a medida que las concentraciones aumentan, los picos de fluorescencia se desplazan en dirección hacia la derecha.

Error de Intensidad de Rhodamine B con agua destilada rango 1

Se realizaron mediciones de intensidad relativa de la fluorescencia de cada rango de todas las muestras, y se calculó el promedio de cinco mediciones y su respectiva incertidumbre estándar en la cual lo llamaremos error de intensidad.

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
10	2541	29
20	3509	36
50	7991	26
100	15312	90

Tabla 3.6. Resume de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en agua destilada para concentraciones de 10 hasta 100 ppb.

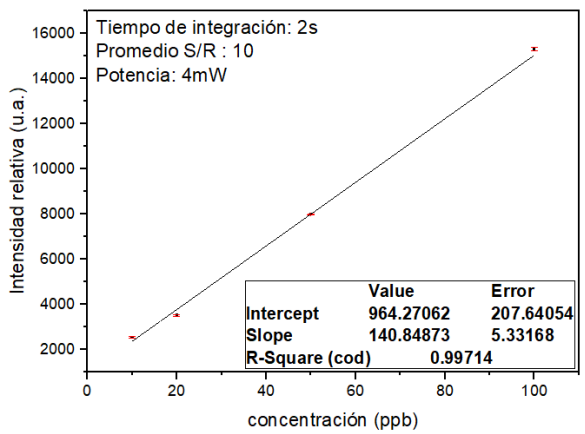


Figura 3.8. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en agua destilada aplicando ajuste lineal.

En la figura 3.8 se observa para bajas concentraciones, entre 10 ppb a 100 ppb, se obtiene un ajuste lineal resultando una ecuación de $I = 140.84C + 964.27$ con un coeficiente R^2 de 0.99 lo que demuestra la relación lineal de Intensidad de fluorescencia con la concentración para el rango 1, con un límite de detección de 4.42 ppb.

.

Error de Intensidad de Rhodamine B con agua destilada Rango 2

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
10	1844	67
20	2472	8
50	5115	27
100	8504	80
200	12417	48
300	20488	58
400	30906	83
500	53356	41

Tabla 3.7. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en agua destilada para concentraciones de 10 hasta 500 ppb.

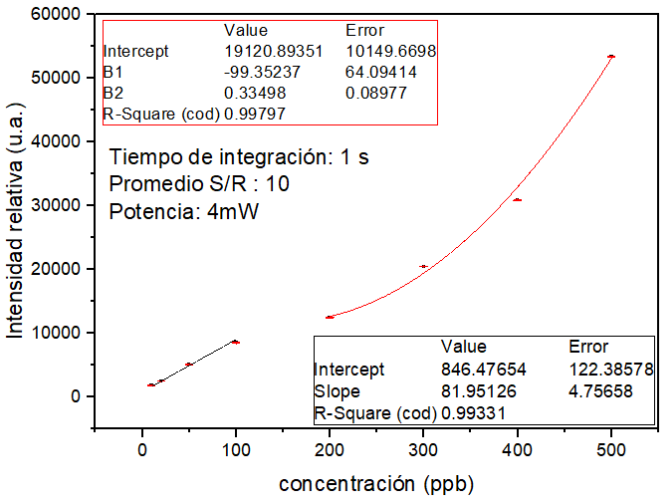


Figura 3.9. Gráfico de intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en agua destilada aplicando ajuste lineal y cuadrático.

En la figura 3.9 se observa para bajas concentraciones, entre 10 ppb a 100 ppb, se obtiene un ajuste lineal resultando una ecuación de $I = 81.95C + 846.48$ con un coeficiente R^2 de 0.99 lo que demuestra la relación lineal para el rango 2 , con un límite de detección de 4.48 ppb y de 200 a 500 ppb es un ajuste cuadrático.

Error de Intensidad de Rhodamine B con agua destilada Rango 3

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
10	875	22
20	1291	6
50	3687	14
100	5589	11
200	11618	10
300	17086	51
500	32659	57
1000	58449	83

Tabla 3.8. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en agua destilada para concentraciones de 10 hasta 1000 ppb.

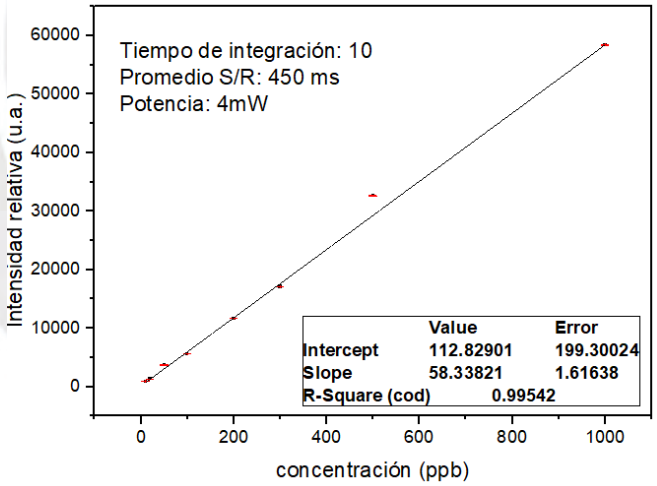


Figura 3.10. Gráfico de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en agua destilada aplicando ajuste lineal.

En la figura 3.10 se observa para bajas concentraciones, entre 10 ppb a 1000 ppb, se obtiene un ajuste lineal resultando una ecuación lineal de $I = 58.34C + 112.83$ con un coeficiente R^2 de 0.99 lo que demuestra la relación lineal de Intensidad de fluorescencia con la concentración para el rango 3, con un límite de detección de 10.25 ppb.

Error de Intensidad de Rhodamine B con agua destilada Rango 4

Concentración (ppm)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
1	2629	16
5	13227	14
10	22893	34
20	37317	75
30	45944	54
50	54422	42
75	57062	53
100	56135	135
200	45566	48
400	29713	39
500	24584	103
750	17436	270
1000	13614	19

Tabla 3.9. Resumen de intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B para concentraciones de 10 hasta 1000 ppm.

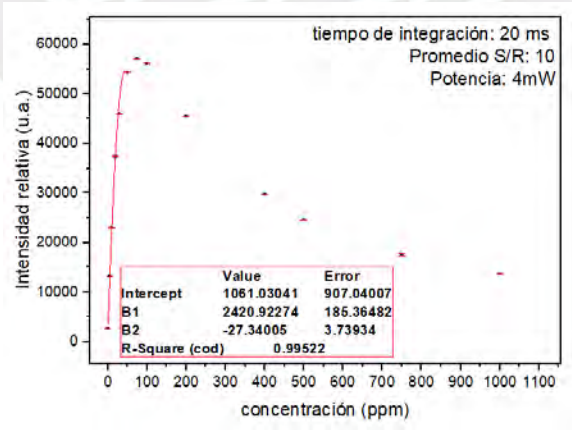


Figura 3.11. Gráfico de intensidad vs. concentración de Rhodamine B diluido en agua destilada aplicando ajuste cuadrático. Se observa para concentraciones de 100 ppm-1000 ppm hay una caída de fluorescencia debido a la autoabsorción.

Se observa en la figura 3.11 para concentraciones de 1 ppm a 50 ppm se da un ajuste cuadrático lo que demuestra que hay una caída de fluorescencia por auto absorción.

A continuación, se estimará la incertidumbre de la concentración mediante diferentes rangos de concentración de Rhodamine B en agua destilada; en este caso, iniciaremos con el rango 1 y 3 por ser ecuaciones lineales y aplicaremos la ecuación correspondiente:

$$I_C = mC + b \quad (3.1)$$

$$C = \frac{I_C - b}{m} \quad (3.2)$$

Donde:

C es la concentración.

I_C es la intensidad relativa de la fluorescencia.

b es la intersección de la línea de calibración.

m es la pendiente de la línea de calibración.

Y dado que se quiere calcular la incertidumbre estándar, primero necesitas calcular la desviación estándar σ [32].

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{Ic\ -\ b}{m}\right)^2 * \left(\frac{\Delta m}{m}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{m}\right)^2 + \left(\frac{\Delta I_C}{m}\right)^2} \quad (3.3)$$

Δm es la incertidumbre de la pendiente m.

Δb es la incertidumbre de la intersección b.

ΔI_C es la incertidumbre de la intensidad relativa de la fluorescencia I_C.

Una vez calculado σ, se calculó la incertidumbre estándar σ_C de la concentración C utilizando la fórmula:

$$\sigma_C = \frac{\sigma}{\sqrt{5}} \quad (3.4)$$

Sustituyendo estos valores en la fórmula 3.3 y luego dividir σ entre $\sqrt{5}$ para obtener la incertidumbre estándar σ_C de la concentración C.

Mediante la ecuación 1.23 se realizaron mediciones de intensidad relativa de la fluorescencia de cada rango de todas las muestras, y se calculó el promedio de cinco

mediciones y su respectiva incertidumbre estándar. Estos resultados se utilizaron como referencia para calibrar el sistema de fluorescencia.

La tabla 3.10 presenta los valores de longitud de onda de alrededor de 575nm, donde para el rango 1 la longitud de onda es estable y lineal como es visto en la tabla 3.2. En promedio (dentro del rango 1), se pudo observar que estas intensidades presentaron una desviación como se muestra en la tabla 3.6.

En este paso, se llevó a cabo la tarea de identificar las intensidades de fluorescencia asociadas a cada pico en longitud de onda. Luego, se realizó el cálculo del promedio de 5 mediciones y se estimó su desviación estándar. Los resultados obtenidos se utilizaron como una referencia para calibrar el sistema de fluorescencia.

Rango de concentración 1

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad (u.a.)	Error de concentración (ppb)	Error porcentual de concentración (%)
10	2540	29	0.69	7.1
20	3509	36	0.73	3.8
50	7991	26	1.07	2.1
100	15312	90	1.86	1.9

Tabla 3.10. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B disuelto en agua destilada aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 100 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia.

La tabla 3.11. presenta los valores de longitud de onda de alrededor de 575 nm, donde para el rango 3 la longitud de onda es estable y lineal como es visto en la tabla 3.4. En promedio (dentro del rango 3), se pudo observar que estas intensidades presentaron una desviación como se muestra en la tabla 3.8.

Rango de concentración 3

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad (u.a.)	Error de concentración (ppb)	Error porcentual de concentración (%)
10	875	22	1.54	15.4
20	1291	6	1.54	7.7
50	3687	14.	1.70	3.4
100	5589	11	1.92	1.9
200	11618	10	2.88	1.4
300	17086	51	3.93	1.3
500	32659	57	7.09	1.4
1000	58449	83	12.50	1.2

Tabla 3.11. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B disuelto en agua destilada aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 1000 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia.

Respecto al rango 3, al medir concentraciones bajas alrededor de 10 ppb, se presenta dificultades y un margen de error mayor al 10 %, al utilizar Rhodamine B en agua destilada. Para reducir este margen de error y mejorar la eficiencia de fluorescencia, optaremos por trabajar con Rhodamine B en alcohol etílico.

3.3 Proceso de preparación de las soluciones de Rhodamine B diluida en alcohol etílico.

Se prepararon soluciones con concentraciones de Rhodamine B desde 10 ppb hasta 1000 ppm. A continuación, se describe el proceso de preparación:

i. En un frasco de vidrio se agregarán 10 ml de alcohol etílico y 10 mg de polvo de Rhodamine B, obteniendo una concentración de 1000 ppm.

ii. Después, se elaboran soluciones con distintas concentraciones mediante la dilución en alcohol etílico de una solución de Rhodamine B a 1000 ppm. En la tabla 3.12 se

presentan las cantidades requeridas para la preparación de las soluciones, las cuales se establecieron en rangos con el fin de optimizar la curva de calibración lineal.

	Rhodamine B (mg)	Alcohol Etílico (ml)	Concentración
Rango 1	0.0001	10	10 ppb
	0.0002		20 ppb
	0.0005		50 ppb
	0.001		100 ppb
Rango 2	0.0001		10 ppb
	0.0002		20 ppb
	0.0005		50 ppb
	0.001		100 ppb
	0.002		200 ppb
	0.003		300 ppb
	0.004		400 ppb
	0.005		500 ppb
Rango 3	0.0001		10 ppb
	0.0002		20 ppb
	0.0005		50 ppb
	0.001		100 ppb
	0.002		200 ppb
	0.003		300 ppb
	0.004		400 ppb
	0.005		500 ppb
	0.01		1000 ppb
Rango 4	0.01		1 ppm
	0.05		5 ppm
	0.1		10 ppm
	0.2		20 ppm
	0.30		30 ppm
	0.5		50 ppm
	0.75		75 ppm
	1		100 ppm
	2		200 ppm
	4		400 ppm
	5		500 ppm
	7.5		750 ppm
	10		1 000 ppm

Tabla 3.12. Concentraciones de Rhodamine B disuelto en alcohol etílico para la calibración del sistema de fluorescencia.

3.4 Límite de detección de fluorescencia de Rhodamine B diluida en alcohol etílico.

Se estableció el límite de detección del sistema de fluorescencia para determinar la longitud de onda con la máxima emisión de la Rhodamine B diluida en alcohol etílico. Se usó una potencia de láser con diferente tiempo de integración y promedio para diferentes rangos. En la calibración, se tomó el espectro de muestras de Rhodamine B a diferentes concentraciones y se comparó con bandas referenciales. Se identificaron diferentes picos de fluorescencia como se muestras en la figura 3.12.

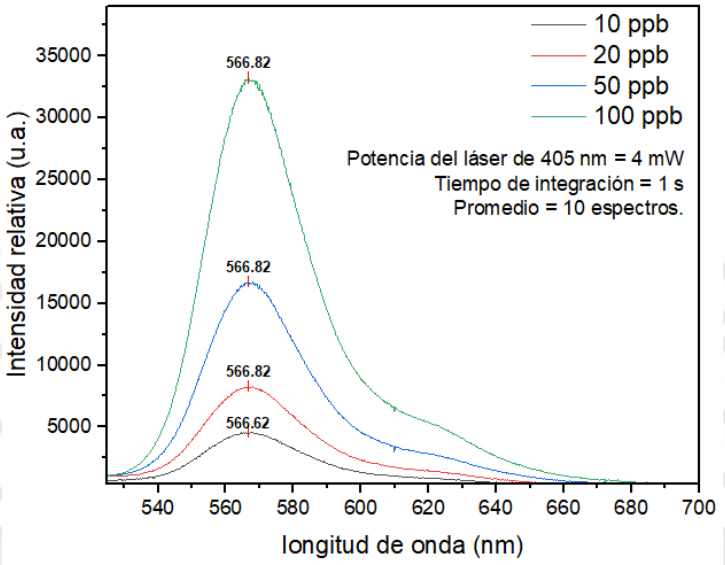


Figura 3.12. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en alcohol etílico con concentraciones de 10 ppb a 100 ppb para el rango 1.

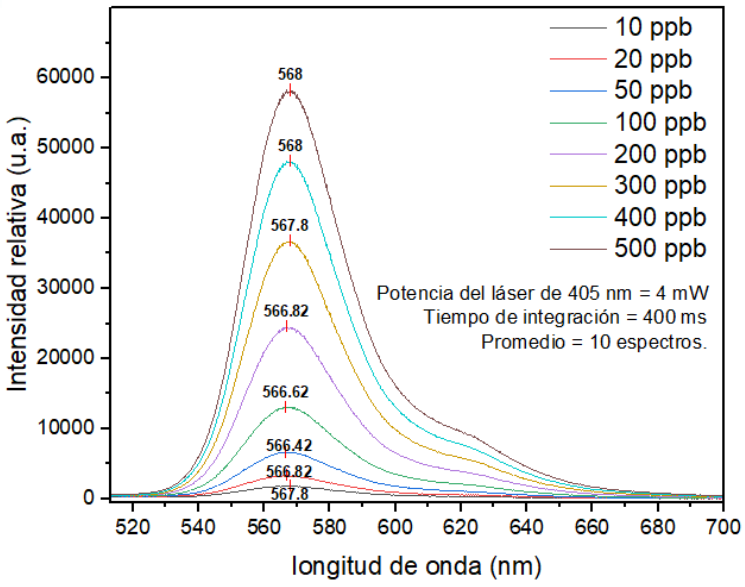


Figura 3.13. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en alcohol etílico con concentraciones de 10 ppb a 500 ppb para el rango 2.

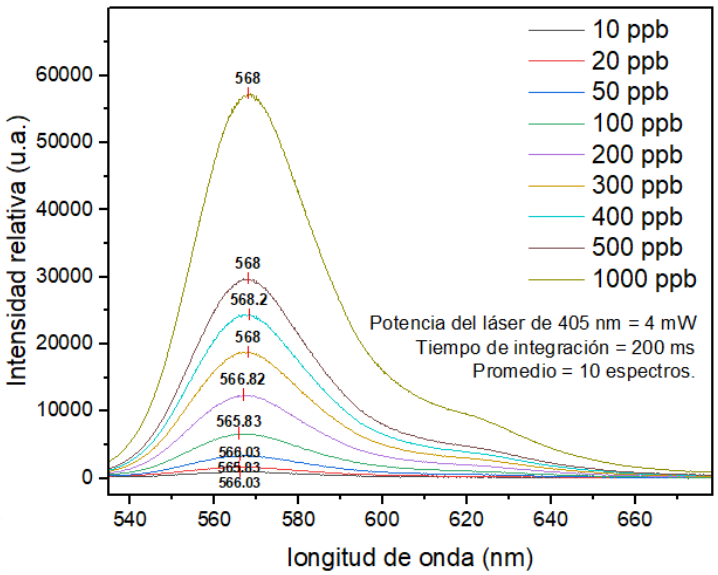


Figura 3.14. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en alcohol etílico con concentraciones de 10 ppb a 1000 ppb para el rango 3.

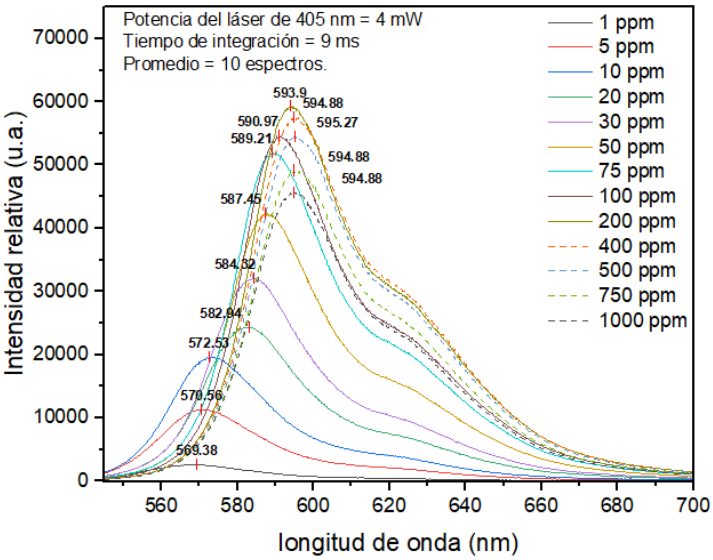


Figura 3.15. Espectro de fluorescencia de soluciones de Rhodamine B diluido en alcohol etílico con concentraciones de 1 ppm a 1000 ppm para el rango 4.

El límite de detección del sistema de fluorescencia utilizando Rhodamine B con alcohol etílico se realizó mediante la elaboración de tablas, presentadas a continuación.

Rango de concentración 1

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (s)
4	10	Rhodamine B	565	10	566.6	1
				20	566.8	
				50	566.8	
				100	566.8	

Tabla 3.13. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10, 20, 50 y 100 ppb, comparadas con el valor de referencia (18).

Rango de concentración 2

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (ms)
4	10	Rhodamine B	565	10	567.8	400
				20	566.8	
				50	566.4	
				100	566.6	
				200	566.8	
				300	567.8	
				400	568	
				500	568	

Tabla 3.14. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10 hasta 500 ppb.

Rango de concentración 3

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (ms)
4	10	Rhodamine B	565	10	566.0	200
				20	565.8	
				50	566.0	
				100	565.8	
				200	566.8	
				300	568	
				400	568.2	
				500	568	
				1000	568	

Tabla 3.15. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 10 hasta 1000 ppb.

Rango de concentración 4

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppm)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (ms)
4	10	Rhodamine B	565	1	569.3	9
				5	570.5	
				10	572.5	
				20	582.9	
				30	584.3	
				50	587.4	
				75	589.2	
				100	590.9	
				200	593.9	
				400	594.8	
				500	595.2	
				750	594.8	
				1000	594.8	

Tabla 3.16. Resumen de las longitudes de onda centrales de Rhodamine B en concentraciones 1 hasta 1000 ppm.

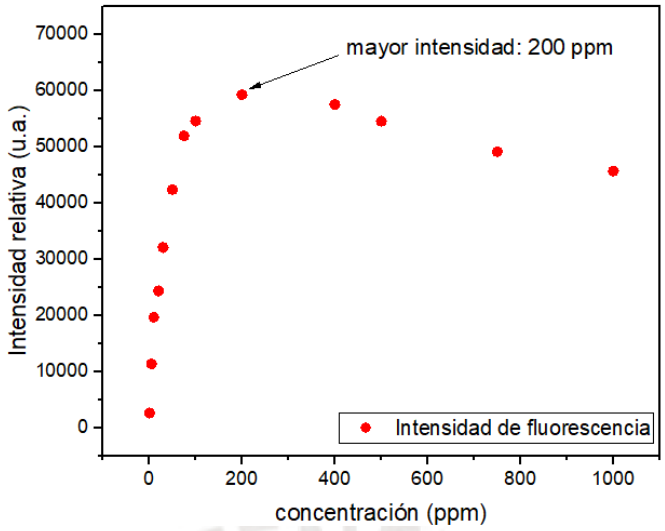


Figura 3.16. El gráfico muestra Rhodamine B diluido en alcohol etílico cómo la intensidad aumenta a medida que las concentraciones aumentan, y en el declive se observa la autoabsorción para el rango 4.

Concentración vs. longitud de onda Rhodamine B con alcohol etílico en los rangos 1,2,3 y 4

Al examinar y analizar los datos, notamos un desplazamiento en la posición de los picos máximos, atribuible a la influencia del solvente y soluto que modifica los niveles de energía de la solución. Este fenómeno se conoce como desplazamiento espectral.

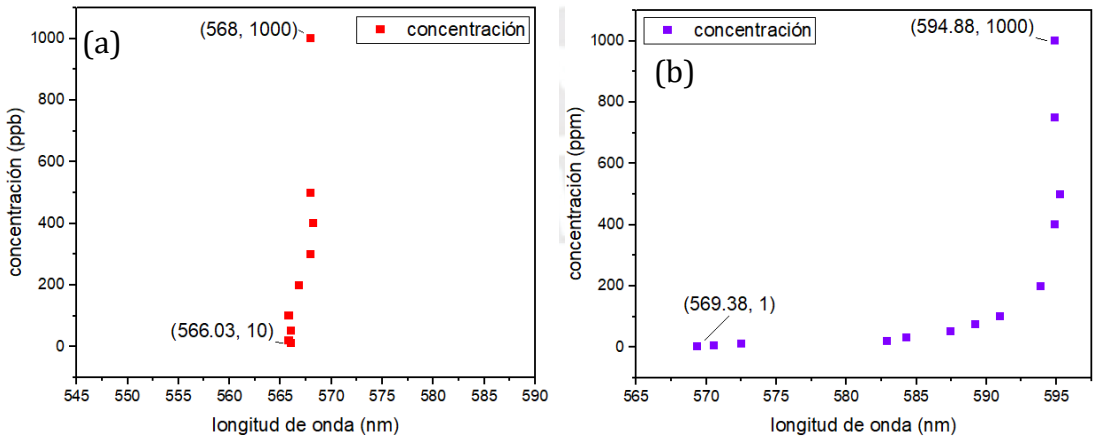


Figura 3.17. (a) Gráfica muestra Rhodamine B diluido en alcohol etílico en los rangos 1,2 y 3 se muestra que conforme la concentración aumenta, los picos de fluorescencia permanecen constantes en las concentraciones más bajas. (b) Para el rango 4 se muestra que a medida que las concentraciones aumentan, los picos de fluorescencia se desplazan en dirección hacia la derecha.

Error de Intensidad de Rhodamine B con alcohol etílico rango 1

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
10	4609	28
20	8289	8
50	16710	20
100	33067	58

Tabla 3.17. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en alcohol etílico para concentraciones de 10 hasta 100 ppb.

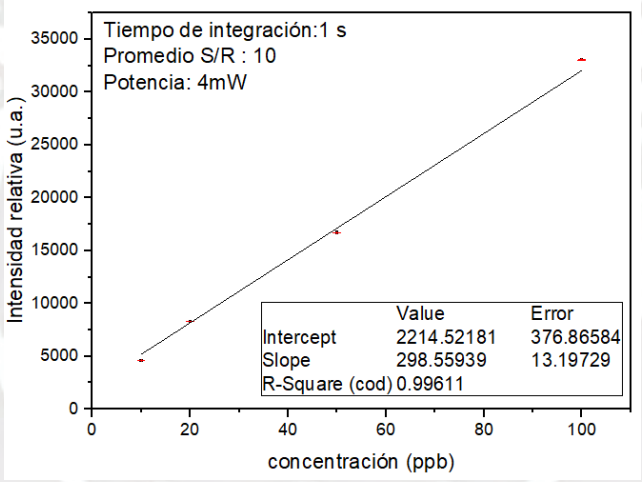


Figura 3.18. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en alcohol etílico aplicando ajuste lineal.

En la figura 3.18 se observa para bajas concentraciones, entre 10 ppb a 100 ppb, se obtiene un ajuste lineal resultando una ecuación de $I = 298.56C + 2214.52$ con un coeficiente R^2 de 0.99 lo que demuestra la relación lineal de Intensidad de fluorescencia con la concentración para el rango 1, con un límite de detección de 3.78 ppb.

Error de Intensidad de Rhodamine B con alcohol etílico rango 2

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
10	1843	7
20	3320	12
50	6626	11
100	13072	11
200	24519	33
300	36745	47
400	48105	46
500	58298	15

Tabla 3.18. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en alcohol etílico para concentraciones de 10 hasta 500 ppb.

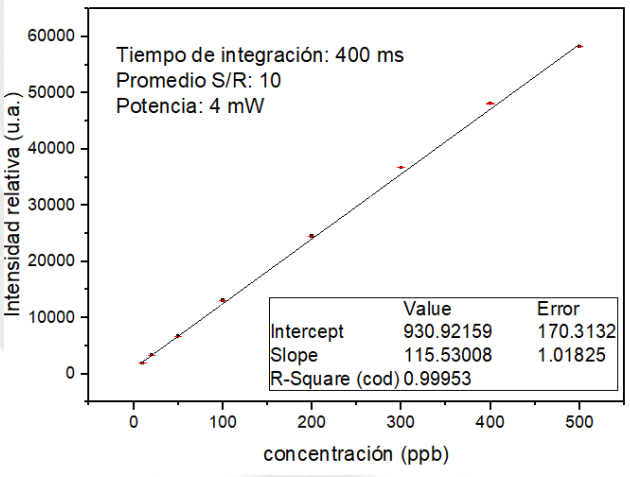


Figura 3.19. Gráfica de intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en alcohol etílico aplicando ajuste lineal.

En la figura 3.19 se observa para bajas concentraciones, entre 10 ppb a 500 ppb, se obtiene un ajuste lineal resultando una ecuación de $I = 115.53C + 930.92$ con un coeficiente R^2 de 0.99 lo que demuestra la relación lineal de Intensidad de fluorescencia con la concentración para el rango 2, con un límite de detección de 4.42 ppb.

Error de Intensidad de Rhodamine B con alcohol etílico rango 3

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
10	940	10
20	1665	9
50	3351	11
100	6627	21
200	12344	20
300	18801	24
400	24320	41
500	29697	58
1000	57251	101

Tabla 3.19. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B diluido en alcohol etílico para concentraciones de 10 hasta 1000 ppb.

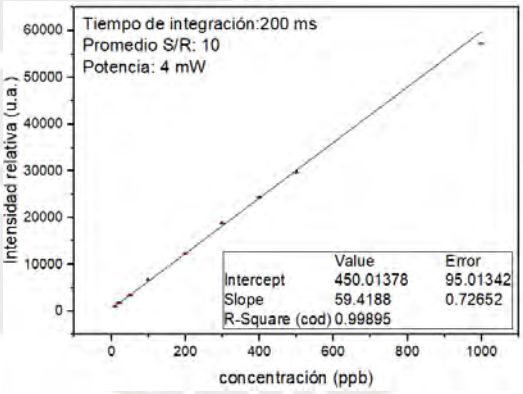


Figura 3.20. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B diluido en alcohol etílico aplicando ajuste lineal.

En la figura 3.20 se observa para bajas concentraciones, entre 10 ppb a 1000 ppb, obtiene un ajuste lineal resultando una ecuación de $I = 59.42C + 450.01$ con un coeficiente R^2 de 0.99 lo que demuestra la relación lineal de Intensidad de fluorescencia con la concentración para el rango 3, con un límite de detección de 4.8 ppb.

Error de Intensidad de Rhodamine B con alcohol etílico Rango 4

Concentración (ppm)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
1	2576	12
5	11309	16
10	19609	29
20	24399	34
30	31961	39
50	42426	15
75	51942	73
100	54804	95
200	59095	63
400	57642	45
500	54706	84
750	49445	177
1000	45833	108

Tabla 3.20. Resumen de intensidades promedio y sus errores de Rhodamine B para concentraciones de 10 hasta 1000 ppm.

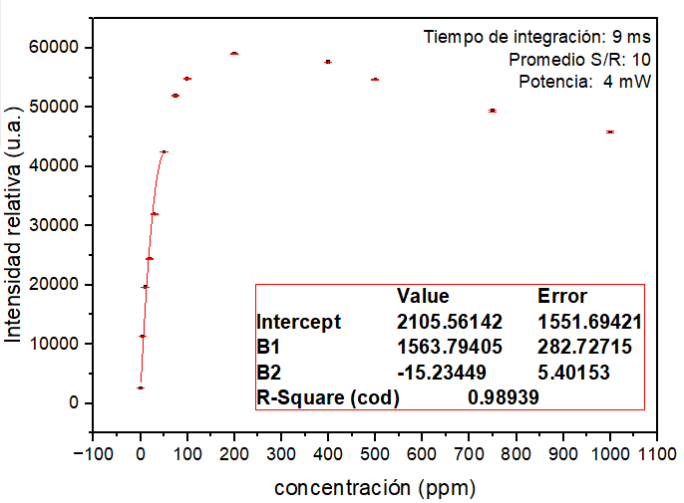


Figura 3.21. Gráfico de Intensidad vs. Concentración de Rhodamine B en alcohol etílico, aplicando ajuste cuadrático. Se observa para concentraciones de 400 ppm- 1000 ppm hay una caída de fluorescencia debido a la autoabsorción.

Se observa en la figura 3.21 para concentraciones de 1 ppm a 50 ppm se da un ajuste cuadrático resultando lo que muestra que hay una caída de fluorescencia debido a la auto absorción.

A continuación, se estimará la incertidumbre de la concentración de Rhodamine B con alcohol etílico en el Rango 1 utilizaremos las ecuaciones: 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4.
La tabla 3.21 presenta los valores de longitud de aproximadamente de 566 nm, donde para el rango 1 la longitud de onda es estable y lineal como es visto en la tabla 3.13. En promedio (dentro del rango 1), se pudo observar que estas intensidades presentaron una desviación como se muestra en la tabla 3.17.
En este paso, se llevó a cabo la tarea de identificar las intensidades de fluorescencia asociadas a cada pico en longitud de onda. Luego, se realizó el cálculo del promedio de 5 mediciones y se estimó su desviación estándar. Los resultados obtenidos se utilizaron como una referencia para calibrar el sistema de fluorescencia.

Rango de concentración 1

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad (u.a.)	Error de concentración (ppb)	Error porcentual de concentración (%)
10	4609	28	0.58	5.8
20	8289	8	0.69	3.4
50	16710	20	1.11	2.2
100	33067	58	2.12	2.1

Tabla 3.21. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B diluido en alcohol etílico, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 100 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia.

La tabla 3.22 presenta los valores de longitud onda de alrededor de 566 nm, donde para el rango 2 la longitud de onda es estable y lineal como es visto en la tabla 3.14. En promedio (dentro del rango 2), se pudo observar que estas intensidades presentaron una desviación como se muestra en la tabla 3.18.

Rango de concentración 2

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad promedio (u.a.)	Error de concentración (ppb)	Error porcentual de concentración (%)
10	1843	7	0.66	6.63
20	3320	12	0.67	3.36
50	6626	11	0.69	1.38
100	13072	11	0.78	0.78
200	24519	33	1.07	0.53
300	36745	47	1.44	0.48
400	48105	46	1.78	0.44
500	58298	15	2.06	0.41

Tabla 3.22. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B diluido en alcohol etílico, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 500 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia.

La tabla 3.23 presenta los valores de longitud de onda de alrededor de 566 nm, donde para el rango 1 la longitud de onda es estable y lineal como es visto en la tabla 3.15. En promedio (dentro del rango 3), se pudo observar que estas intensidades presentaron una desviación como se muestra en la tabla 3.19.

Rango 3

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad promedio (u.a.)	Error de concentración (ppb)	Error porcentual de concentración (%)
10	940	10	0.72	7.2
20	1665	9	0.72	3.6
50	3351	11	0.76	1.5
100	6627	21	0.92	0.9

200	12344	20	1.31	0.6
300	18801	24	1.84	0.6
400	24320	41	2.33	0.5
500	29697	58	2.81	0.5
1000	57251	101	5.33	0.5

Tabla 3.23. Concentración e intensidad promedio de Rhodamine B diluido en alcohol etílico, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración, de 10 ppb a 1000 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia.

Se concluye que es preferible calibrar el equipo de espectroscopia de fluorescencia utilizando Rhodamine B en alcohol etílico, ya que en los rangos 1, 2 y 3 muestra un porcentaje de error de concentración inferior al 10 %.

CAPÍTULO 4. DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA DE EOSIN YELLOW DISUELTO EN AGUA DESTILADA Y CRISTAL VIOLET DISUELTO EN GLICERINA

4.1 Proceso de preparación de las soluciones de Eosin Yellow diluida en agua destilada.

Se prepararon soluciones con concentraciones de Eosin Yellow desde 10 ppb hasta 1000 ppm. A continuación, se describe el proceso de preparación:

i. En un frasco de vidrio se agregarán 10 ml de agua destilada y 10 mg de polvo de Eosin Yellow, obteniendo una concentración de 1000 ppm.

ii. Después, se elaboran soluciones con distintas concentraciones mediante la dilución en agua destilada de una solución de Eosin Yellow a 1000 ppm. En la tabla 4.1 se presentan las cantidades requeridas para la preparación de las soluciones, las cuales se establecieron en rangos con el fin de optimizar la curva de calibración lineal.

	Eosin Yellow (mg)	H2O (ml)	Concentración
Rango 1	0.0001	10	10 ppb
	0.0002		20 ppb
	0.0005		50 ppb
	0.001		100 ppb
	0.002		200 ppb
Rango 2	0.005		0.5 ppm
	0.01		1 ppm
	0.05		5 ppm
	0.1		10 ppm
	0.2		20 ppm
Rango 3	0.5		50 ppm
	1		100 ppm
	2		200 ppm
	5		500 ppm
	10		1 000 ppm

Tabla 4.1. Concentraciones de Eosin Yellow diluido agua destilada.

iii. Se estableció la detección del sistema de fluorescencia para determinar la longitud de onda con la máxima emisión de Eosin Yellow diluida en agua destilada. Se usó una potencia de láser con diferente tiempo de integración y promedio para diferentes

rangos. En la calibración, se tomó el espectro de muestras de Eosin Yellow a diferentes concentraciones y se comparó con bandas referenciales. Se identificaron diferentes picos de fluorescencia como se muestra en la figura 4.1.

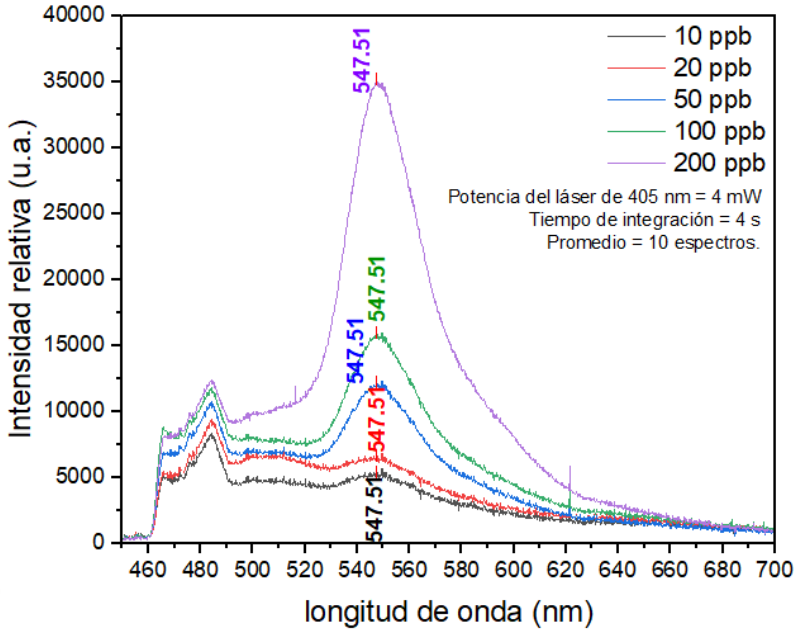


Figura 4.1. Espectro de fluorescencia de soluciones de Eosin Yellow diluido en agua destilada con concentraciones de 10 ppb a 200 ppb para el rango 1.

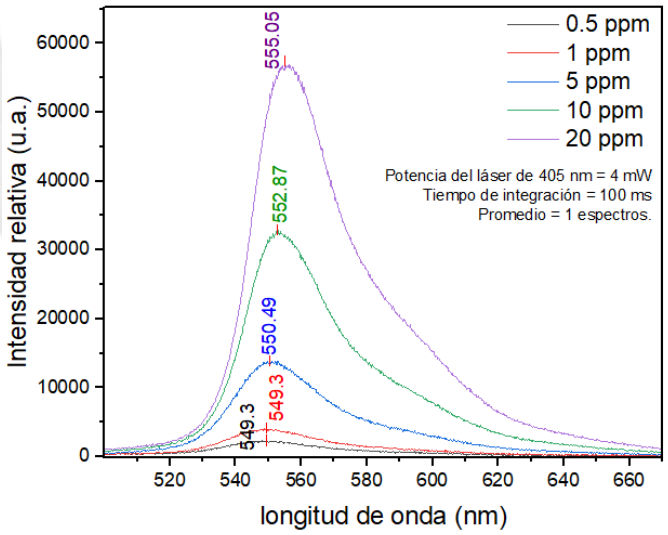


Figura 4.2. Espectro de fluorescencia de soluciones de Eosin Yellow diluido en agua destilada con concentraciones de 0.5 ppm a 20 ppm para el rango 2.

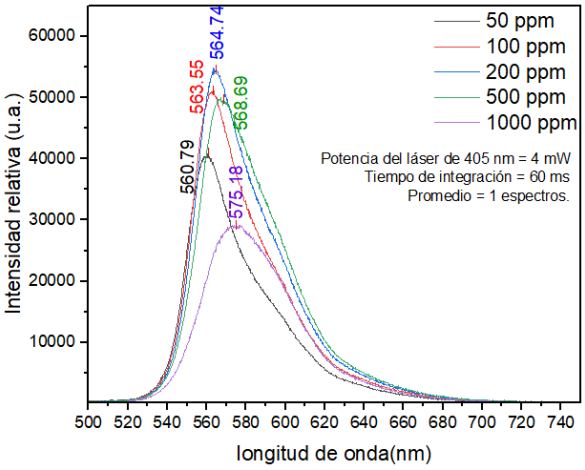


Figura 4.3. Espectro de fluorescencia de soluciones de Eosin Yellow diluido en agua destilada con concentraciones de 50 ppm a 1000 ppm para el rango 3.

iv. Luego, se requiere determinar la detección del equipo de fluorescencia utilizando Eosin Yellow lo cual se realizará mediante la elaboración de tablas 4.2, 4.3 y 4.4, presentada a continuación.

Rango de concentración 1

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (s)
4	10	Eosin Yellow	542 nm	10	547.5	4
				20	547.5	
				50	547.5	
				100	547.5	
				200	547.5	

Tabla 4.2. Resumen de las longitudes de onda centrales de Eosin Yellow en concentraciones 10, 20, 50, 100 y 200 ppb, comparadas con el valor de referencia (21).

Rango de concentración 2

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppm)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (ms)
4	1	Eosin Yellow	542 nm	0.5	549.3	100
				1	549.3	
				5	550.5	
				10	552.9	
				20	555.0	

Tabla 4.3. Resumen de las longitudes de onda centrales de Eosin Yellow en concentraciones 0.5 hasta 20 ppm.

Rango de concentración 3

Laser (mW)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppm)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (ms)
2	1	Eosin Yellow	542 nm	50	560.8	60
				100	563.6	
				200	564.7	
				500	568.7	
				1000	570.6	

Tabla 4.4. Resumen de las longitudes de onda centrales de Eosin Yellow en concentraciones 50 hasta 1000 ppm.

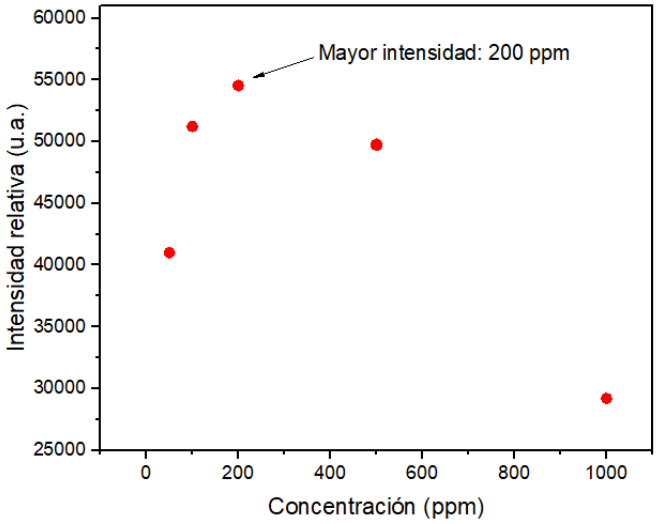


Figura 4.4. El gráfico muestra Eosin Yellow diluido en agua destilada cómo la intensidad aumenta a medida que las concentraciones aumentan, y en el declive se observa la autoabsorción para el rango 3.

Concentración vs. longitud de onda Eosin Yellow con agua destilada en los rangos 1,2 y 3

Al examinar y analizar los datos, notamos un desplazamiento en la posición de los picos máximos, atribuible a la influencia del solvente y soluto que modifica los niveles de energía de la solución. Este fenómeno se conoce como desplazamiento espectral.

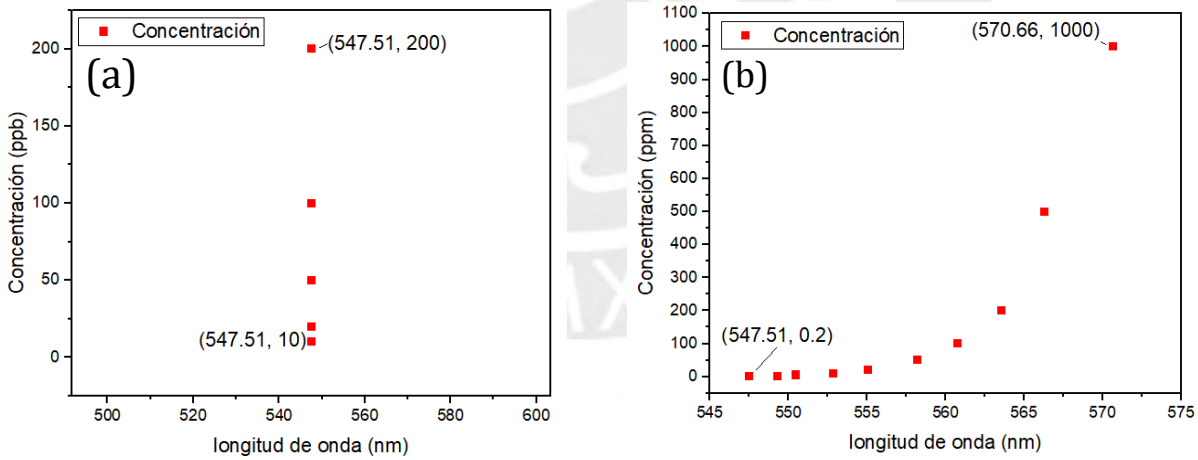


Figura 4.5. (a) Gráfica muestra Eosin Yellow diluido en agua destilada en el rango 1 se muestra que conforme la concentración aumenta, los picos de fluorescencia permanecen constantes en las concentraciones más bajas. (b) Para el rango 1,2 y 3 se muestra que a medida que las concentraciones aumentan, los picos de fluorescencia se desplazan en dirección hacia la derecha.

Error de Intensidad de Eosin Y con agua destilada rango 1

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
10	4905	56
20	5605	80
50	11242	135
100	15831	156
200	34989	324

Tabla 4.5. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Eosin Yellow diluido en agua destilada para concentraciones de 10 hasta 200 ppb.

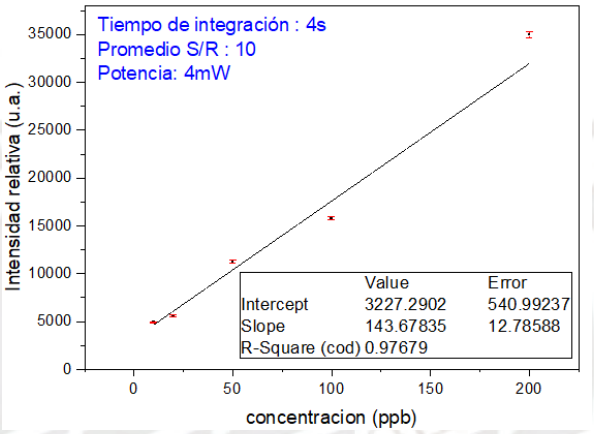


Figura 4.6. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Eosin Yellow diluido en agua destilada aplicando ajuste lineal.

En la figura 4.6 se observa para bajas concentraciones, entre de 10 ppb a 200 ppb, se da un ajuste lineal resultando una ecuación de $I = 143.68C + 3227.3$ con un coeficiente R^2 de 0.98 lo que demuestra la relación lineal de Intensidad de fluorescencia con la concentración para el rango 1

Error de Intensidad de Eosin Yellow con agua destilada Rango 2

Concentración (ppm)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
0.5	2179	16
1	3869	34

5	13426	82
10	31693	131
20	50162	137

Tabla 4.6. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Eosin Yellow diluido en agua destilada para concentraciones de 0.5 hasta 20 ppm.

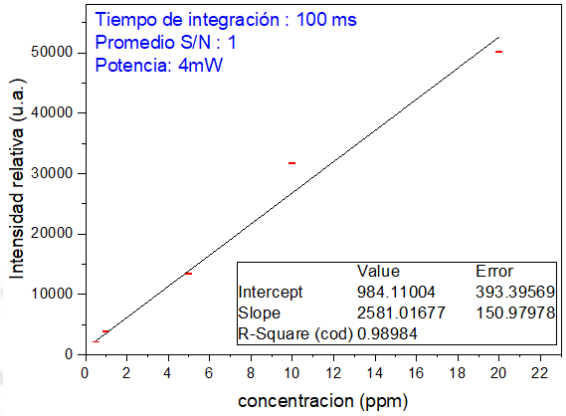


Figura 4.7. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Eosin Yellow diluidos en agua destilada aplicando ajuste lineal.

En la figura 4.7 se observa para bajas concentraciones, entre 0.5 ppm a 20 ppm, se obtiene un ajuste lineal resultando una ecuación de $I = 2581C + 984.1$ con un coeficiente R^2 de 0.99 lo que demuestra la relación lineal de Intensidad de fluorescencia con la concentración para el rango 2.

Error de Intensidad de Eosin Yellow con agua destilada rango 3

Concentración (ppm)	**Intensidad promedio (u.a.)**	**Error de intensidad**
50	41576	226
100	48793	134
200	49240	248
500	49083	213
1000	29141	66

Tabla 4.7. Resumen de intensidades promedio y sus errores de Eosin Yellow para concentraciones de 50 hasta 1000 ppm.

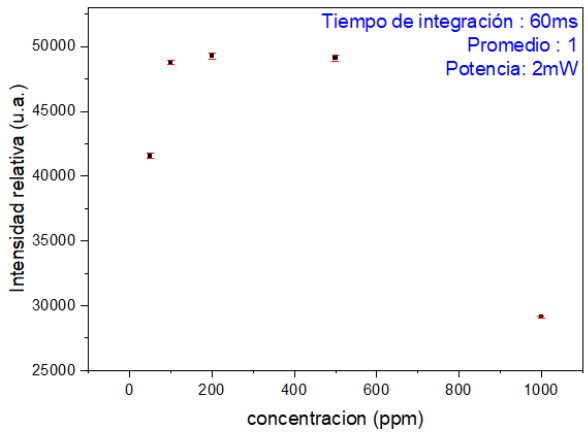


Figura 4.8. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Eosin Yellow diluido en agua destilada. Se observa que, para concentraciones de 200 ppm – 1000 ppm, hay una caída de fluorescencia debido a la autoabsorción.

Fluorescencia de Eosin Yellow diluido en agua destilada para el rango 3 de 50 ppm – 1000 ppm de la figura 4.8. No elaboramos una curva de ajuste ni tabla de error de concentración porque no existe una curva que se ajuste a los datos. Se observa en la figura 4.8 para concentraciones de 200 - 1000 ppm hay una caída de fluorescencia debido a la auto absorción.

Por otro lado, para calcular la incertidumbre de la concentración de Eosin Yellow disuelta en agua destilada para el rango 1 utilizaremos las ecuaciones: 3.1, 3.2,3.3 y 3.4. La tabla 4.8 presenta los valores de longitud de aproximadamente de 547 nm, debido a que en el rango 1 la longitud de onda es estable y lineal visto en la tabla 4.2, la intensidad de fluorescencia para la muestra de Eosin Yellow con agua destilada. En promedio (dentro del rango 1), se pudo observar que estas intensidades presentaron una desviación como se muestra en la tabla 4.5.

En este paso, se llevó a cabo la tarea de identificar las intensidades de fluorescencia asociadas a cada pico en longitud de onda. Luego, se realizó el cálculo del promedio de 10 mediciones y se estimó su desviación estándar. Los resultados obtenidos se utilizaron como una referencia para calibrar el sistema de fluorescencia.

Rango de concentración 1

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad (u.a.)	Error de concentración (ppb)	Error porcentual de concentración (%)
10	4905	54	1.04	10.4
20	5605	80	1.29	6.4
50	11242	135	1.99	3.9
100	15831	156	2.76	2.7
200	34989	324	6.37	3.1

Tabla 4.8. Concentración e intensidad promedio de Eosin Yellow diluido en agua destilada, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración de 10 ppb a 200 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia.

De la tabla 4.8 se observa que para el rango 1 es posible encontrar la concentración de una muestra desconocida de Eosin Yellow disuelto en agua destilada en el rango de 10 ppb-200 ppb teniendo un error en concentración menor al 10 %.

Por otro lado, la tabla 4.9 presenta los valores de longitud de aproximadamente de 550 nm, debido a que en el rango 2 la longitud de onda es estable y lineal visto en la tabla 4.3, la intensidad de fluorescencia para la muestra de Eosin Yellow con agua destilada. En promedio (dentro del rango 2), se pudo observar que estas intensidades presentaron una desviación como se muestra en la tabla 4.6.

Rango de concentración 2

Concentración (ppm)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad (u.a.)	Error de concentración (ppm)	Error porcentual de concentración (%)
0.5	2179	16	0.04	9.7
1	3869	34	0.05	5.2
5	13426	82	0.10	2.0
10	31693	131	0.22	2.2
20	50162	137	0.35	1.7

Tabla 4.9. Concentración e intensidad promedio de Eosin Yellow diluido en agua destilada, aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración de 0.5 ppm a 20 ppm. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia.

De la tabla 4.9 se observa que para el rango 2 es posible encontrar la concentración de una muestra desconocida de Eosin Yellow disuelto en agua destilada en el rango de 0.5 ppb-20 ppm teniendo un error en concentración menor al 10 %.

Crystal Violet disuelto en agua destilada, alcohol etílico y glicerina en 532nm

Un factor importante a tener en cuenta es el uso de Crystal Violet diluido en glicerina en láser de 532 nm, en comparación con otros disolventes como agua destilada o alcohol etílico como se muestra en la figura 4.10.

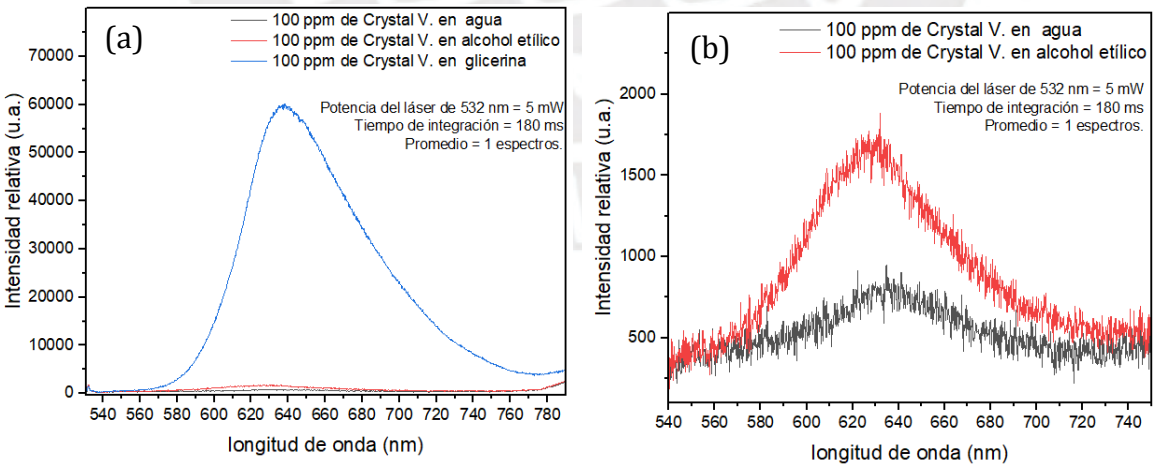


Figura 4.9. (a) Gráfico que representa la fluorescencia de soluciones de Crystal Violet diluidas en agua destilada, alcohol etílico y glicerina, todas con una concentración de 100 ppm. (b) Presenta una versión ampliada del gráfico mostrado en (a).

En la figura 4.9 (a) se aprecia que el Crystal Violet diluido en glicerina presenta una fluorescencia más intensa en comparación con su dilución en agua destilada o alcohol etílico. Por otro lado, en la figura 4.10 (b) indica que el Crystal Violet diluido en alcohol etílico exhibe una fluorescencia ligeramente superior en comparación con el agua destilada. Esto evidencia la relevancia del disolvente empleado en el proceso, ya que influye significativamente en la eficiencia de la sustancia y en el aumento de la intensidad de su fluorescencia.

4.2 Proceso de preparación de las soluciones de Crystal Violet diluido en glicerina

El Crystal Violet no es comúnmente disuelto en glicerina, se puede proporcionar una guía general para mezclar estos dos componentes:

1. **Preparación de los ingredientes**:
   - **Glicerina líquida**: Asegúrate de tener glicerina de buena calidad.
   - **Polvo de Crystal Violet**: Utilice la cantidad necesaria de polvo de Crystal Violet.
2. **Medición del polvo de Crystal Violet**:
   - Medir la masa deseada de polvo de Crystal Violet utilizando una balanza de laboratorio como se muestran en la tabla 4.10.
3. **Disolución en glicerina**:
   - En un matraz o tubo de ensayo limpio, agregar 10 ml de glicerina líquida.
   - Agregar lentamente el polvo de Crystal Violet al matraz o tubo de ensayo y agitar suavemente. Continuar hasta que el polvo esté completamente disuelto en la glicerina.
4. **Homogeneización**:
   - Agitar la mezcla vigorosamente para asegurarte de que el colorante se distribuya uniformemente en la glicerina.
5. **Almacenamiento**:
   - Vierta la solución en un recipiente adecuado y etiquetar claramente con la concentración exacta.
   - Almacenar la solución en un lugar fresco para evitar la vaporización de la solución.

i. En un frasco de vidrio se agregarán 10 ml de glicerina y 10 mg de polvo de Crystal Violet, obteniendo una concentración de 1000 ppm.

ii. Después, se elaborarán soluciones con distintas concentraciones mediante la dilución de glicerina de una solución de Crystal Violet a 1000 ppm. En la tabla 4.10 se presentan las cantidades requeridas para la preparación de las soluciones, las cuales se establecieron en rangos con el fin de optimizar la curva de calibración lineal.

	Crystal Violet (g)	Glicerina (ml)	Concentración
Rango 1	0.00001	10	1 ppb
	0.00005		5 ppb
	0.0001		10 ppb
	0.0002		20 ppb
Rango 2	0.00001		1 ppb
	0.00005		5 ppb
	0.0001		10 ppb
	0.0002		20 ppb
	0.0005		50 ppb
	0.001		100 ppb
	0.002		200 ppb
	0.005		500 ppb
	0.01		1000 ppb
Rango 3	0.01		1 ppm
	0.05		5 ppm
	0.1		10 ppm
	0.2		20 ppm
	0.5		50 ppm
	1		100 ppm
	2		200 ppm
	5		500 ppm
	10		1 000 ppm

Tabla 4.10. Concentraciones de Crystal Violet diluido en glicerina.

iii. Se estableció la detección del sistema de fluorescencia para determinar la longitud de onda con la máxima emisión de Crystal Violet diluida en glicerina. Se usó una potencia de láser con diferente tiempo de integración y promedio para diferentes rangos. En la calibración, se tomó el espectro de muestras de Crystal Violet a diferentes concentraciones y se comparó con bandas referenciales. Se identificaron diferentes picos de fluorescencia como se muestra en la figura 4.10.

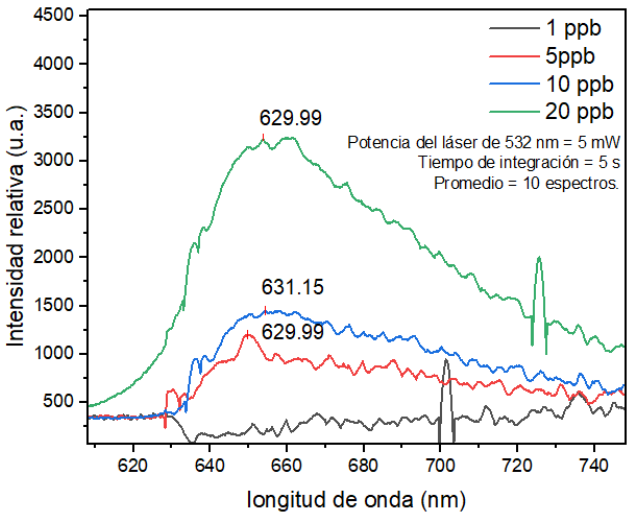


Figura 4.10. Espectro de fluorescencia de soluciones de Crystal Violet diluido en glicerina con concentraciones de 1 ppb a 20 ppb para rango 1.

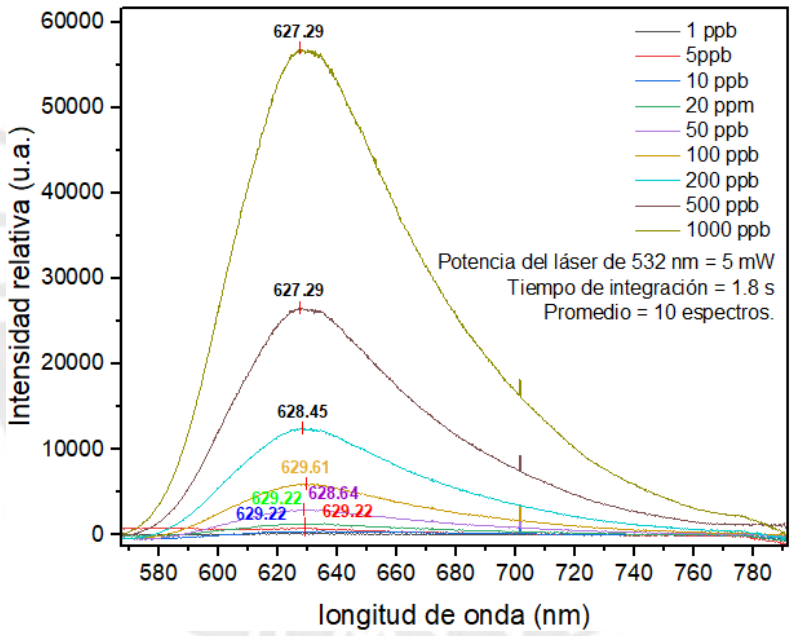


Figura 4.11. Espectro de fluorescencia de soluciones de Crystal Violet diluido en glicerina con concentraciones de 1 ppb a 1000 ppb para el rango 2.

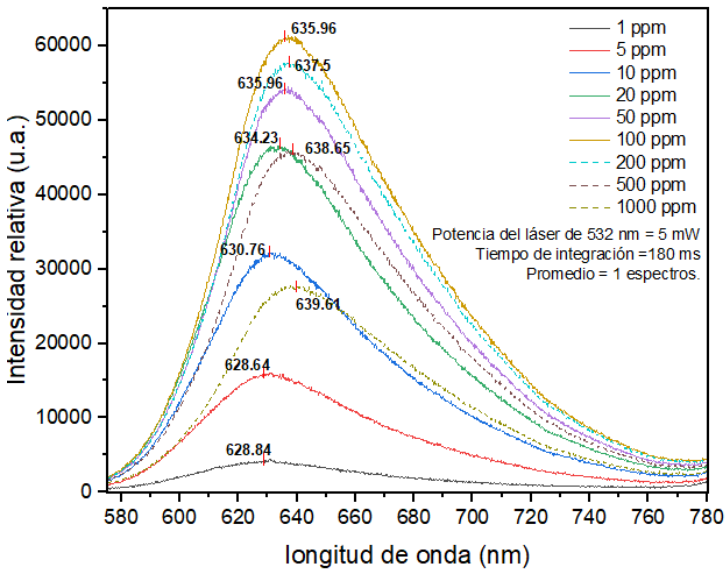


Figura 4.12. Espectro de fluorescencia de soluciones de Crystal Violet diluido en glicerina con concentraciones de 1 ppm a 1000 ppm para el rango 3.

iii. Luego, se requiere determinar la detección del equipo de fluorescencia utilizando Crystal Violet lo cual se realizará mediante la elaboración de tablas 4.11, 4.12 y 4.13, presentada a continuación.

Rango de concentración 1

Laser (W)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (s)
5 mW	10	Crystal Violet	635	1	-	5
				5	629.9	
				10	631.1	
				20	629.9	

Tabla 4.11. Resumen de las longitudes de onda centrales de Crystal Violet en concentraciones 1, 5, 10 y 20 ppb, comparadas con el valor de referencia [24].

Rango de concentración 2

Laser (W)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppb)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (s)
5 mW	10	Crystal Violet	635	1	-	1.8
				5	-	
				10	-	
				20	629.2	
				50	628.6	
				100	629.6	
				200	628.4	
				500	627.2	
				1000	627.2	

Tabla 4.12. Resumen de las longitudes de onda centrales de Crystal Violet en concentraciones 20 hasta 1000 ppb.

Rango de concentración 3

Laser (W)	Promedio	Muestra	Longitud de onda central según la literatura (nm)	Concentración (ppm)	Longitud de onda central experimental (nm)	Tiempo de integración (ms)
5 mW	1	Crystal Violet	635	1	628.8	180
				5	628.6	
				10	630.7	
				20	634.2	
				50	635.9	
				100	635.9	
				200	637.5	
				500	638.6	
				1000	639.6	

Tabla 4.13. Resumen de las longitudes de onda centrales de Crystal Violet en concentraciones 1 hasta 1000 ppm.

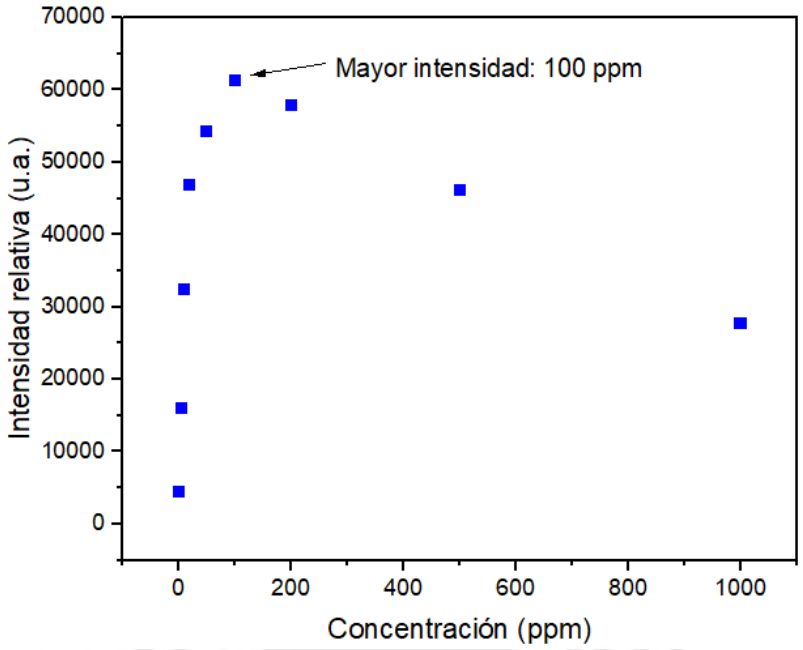


Figura 4.13. El gráfico muestra Crystal Violet diluido en glicerina cómo la intensidad aumenta a medida que las concentraciones aumentan, y en el declive se observa la autoabsorción para el rango 3.

Concentración vs. longitud de onda Cristal Violet con glicerina en los rangos 2 y 3

Al examinar y analizar los datos, notamos un desplazamiento en la posición de los picos máximos, atribuible a la influencia del solvente y soluto que modifica los niveles de energía de la solución. Este fenómeno se conoce como desplazamiento espectral.

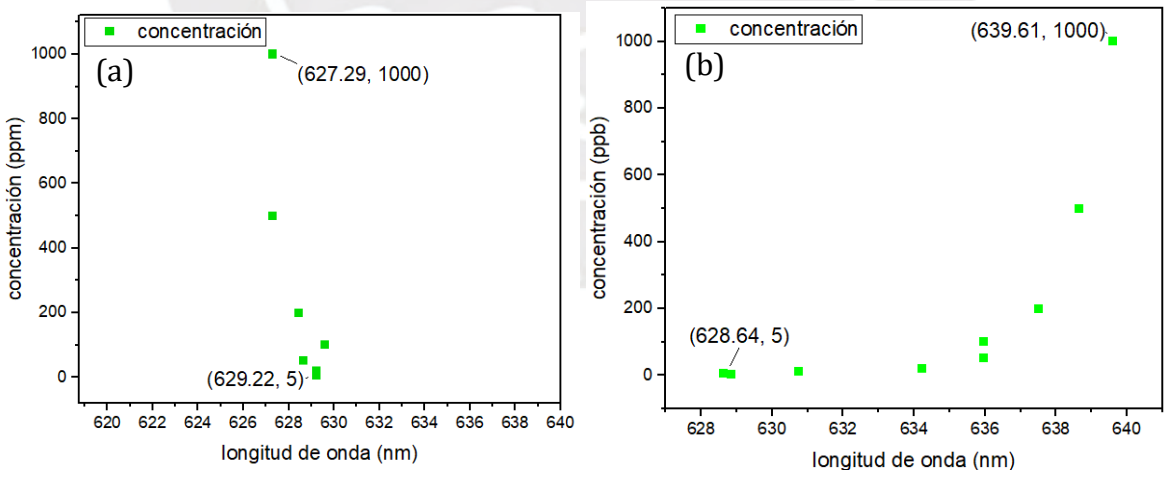


Figura 4.14. (a) Gráfica muestra Crystal Violet diluido en glicerina en los rangos 1 y 2 se muestra que conforme la concentración aumenta, los picos de fluorescencia permanecen constantes en las concentraciones más bajas. (b) Para el rango 3 muestra que a medida que las concentraciones aumentan, los picos de fluorescencia se desplazan en dirección hacia la derecha.

De la figura 4.11 no se hace error de intensidad fluorescencia de Crystal Violet disuelto en glicerina en el rango 1 debido a que no se detectó Crystal Violet a 1 ppb en glicerina, por lo que no presentamos una curva de ajuste.

Error de Intensidad de Crystal con Glicerina rango 2

Se realizará únicamente a partir de 20 ppb en adelante, ya que no se detectaron espectros de fluorescencia por debajo de 20 ppb de glicerina para este rango.

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
20	1259	16
50	2841	37
100	5873	34
200	12392	62
500	26200	126
1000	57086	39

Tabla 4.14. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Crystal Violet diluido en glicerina para concentraciones de 20 hasta 1000 ppb.

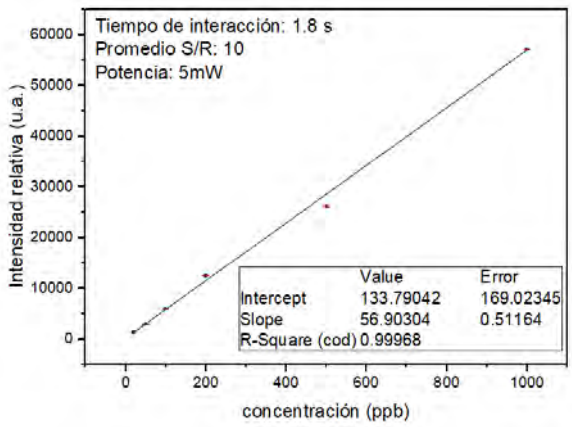


Figura 4.15. Gráfica de intensidad vs. concentración de Crystal Violet diluido en glicerina aplicando ajuste lineal.

En la figura 4.15 se observa para bajas concentraciones, entre de 20 ppb a 1000 ppb, se da un ajuste lineal resultando una ecuación de $I = 56.9C + 133.79$ con un

coeficiente R^2 de 0.99 de lo que muestra la relación lineal de Intensidad de fluorescencia con la concentración para el rango 2.

Error de Intensidad de Crystal con Glicerina rango 3

Concentración (ppm)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad
1	4200	33
5	15798	88
10	32250	113
20	46596	99
50	53531	758
100	61508	106
200	58087	91
500	46539	70
1000	29392	549

Tabla 4.15. Resumen de las intensidades promedio y sus errores de Crystal Violet diluido en glicerina para concentraciones de 5 hasta 1000 ppm.

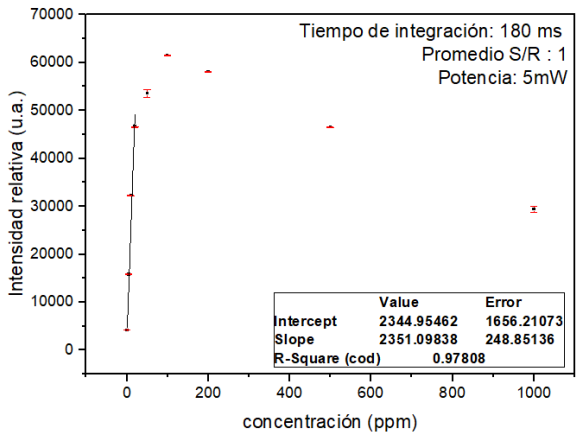


Figura 4.16. Gráfica de Intensidad vs. Concentración de Crystal Violet diluido en glicerina. Se observa para concentraciones de 50 ppm - 1000 ppm hay una caída de fluorescencia debido a la autoabsorción.

Fluorescencia de Crystal Violet diluido en glicerina para el rango 3 de 1 ppm-1000 ppm de la figura 4.16. No elaboramos una curva de ajuste ni tabla de error de concentración

porque no existe una curva que se ajuste a los datos. Se observa en la figura 4.16 para concentraciones de 100-1000 ppm hay una caída de fluorescencia debido a la auto absorción.

Por otro lado, para calcular la incertidumbre de la concentración de Crystal Violet con glicerina en el rango 2 utilizaremos las ecuaciones: 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4.

La tabla 4.16 presenta los valores de longitud de aproximadamente de 628 nm, debido a que en el rango 2 la longitud de onda es estable y lineal visto en la tabla 4.12, la intensidad de fluorescencia para la muestra de Crystal Violet con glicerina. En promedio (dentro del rango 2), se pudo observar que estas intensidades presentaron una desviación como se muestra en la tabla 4.14.

En este paso, se llevó a cabo la tarea de identificar las intensidades de fluorescencia asociadas a cada pico en longitud de onda. Luego, se realizó el cálculo del promedio de 5 mediciones y se estimó su desviación estándar.

Rango de concentración 2

Concentración (ppb)	Intensidad promedio (u.a.)	Error de intensidad (u.a.)	Error de concentración (ppb)	Error porcentual de concentración (%)
20	1259	16	1.36	6.8
50	2841	37	1.49	2.9
100	5873	34	1.51	1.5
200	12392	62	1.92	0.9
500	26200	126	3.17	0.6
1000	57086	39	4.29	0.4

Tabla 4.16. Concentración e intensidad promedio de Crystal Violet con glicerina aplicando ajuste lineal para determinar el error de concentración de 20 ppb a 1000 ppb. Datos obtenidos por el sistema de fluorescencia.

De la tabla 4.16 se observa que para el rango 2 es posible encontrar la concentración de una muestra desconocida de Cristal Violet disuelto en glicerina en el rango de 20 ppb-1000 ppb teniendo un error en concentración menor al 10 %.

CAPÍTULO 5. FLUORESCENCIA EN TINTAS DE LAPICEROS DE COLORES ROJO Y AZUL

Se usaron los sistemas de espectroscopia de fluorescencia implementado en el Capítulo 2, ya que las tintas de lapiceros de color rojo y azul se excitan aproximadamente a 405 nm y 532 nm, respectivamente:

5.1 Análisis de fluorescencia de lapiceros rojos

Se prepararon concentraciones de tintas de lapiceros rojos diluido en alcohol etílico. La tabla 5.1 muestra la masa de cada tinta de lapicero usada y la cantidad de alcohol etílico.

Lapiceros Rojo	Masa de tinta (g)	Solvente: Alcohol Etílico (ml)	Concentración de tinta en alcohol (ppm)
Lux 034 M Faber Castell	0.006	5	1200
Ove Tri x32	0.025		5000
Pilot_G1	0.097		19400
Stabilo_liner_308	0.012		2400
Trilux 032 M Faber Castell	0.022		4400

Tabla 5.1. Masa de muestras de lapiceros rojos con alcohol etílico.

Se determinó la longitud de onda y la intensidad de fluorescencia de cada solución. Se usó un láser de 4 mW, ajustando el tiempo de integración y el promedio para diferentes muestras. Para estas mediciones, se analizó el espectro de las cinco tintas comerciales presentadas en la tabla 5.2 y se comparó con las bandas de referencia del Eosin Yellow. En la figura 5.1 se observan los diferentes picos de fluorescencia para cada muestra.

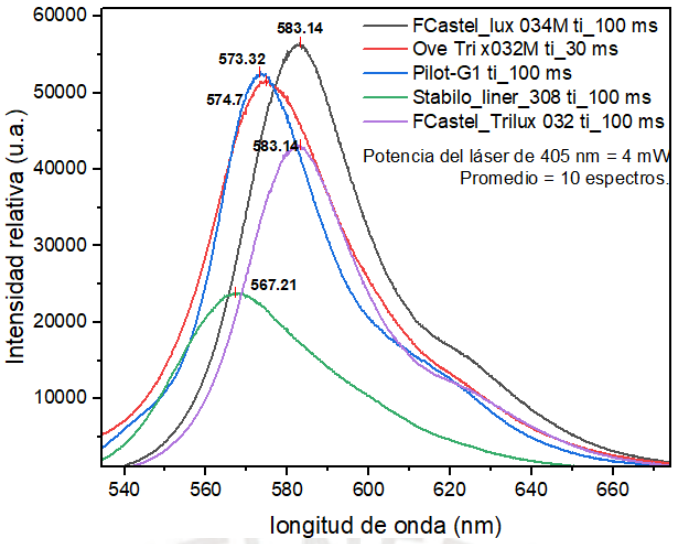


Figura 5.1. Espectro de fluorescencia de soluciones de tintas de lapiceros rojos diluida con alcohol etílico, empleando diversas muestras de lapiceros rojos.

Laser (mW)	Promedio	Tiempo de integración (ms)	Lapiceros rojos	Masas de tinta (g)	Longitud de onda (nm)	Intensidad (u.a.)
4	10	100	Faber Castell lux 034 M	0.006	583.1	56532
		30	Ove tri x 032 M	0.025	574.7	51629
		100	Pilot G1	0.097	573.3	52750
		100	Stabilo liner 308	0.012	567.2	23811
		100	Faber Castell Trilux 032	0.022	583.1	43175

Tabla 5.2. Longitud de onda de emisión e Intensidad de fluorescencia de las tintas de lapiceros rojos disuelto en alcohol etílico.

Espectro de fluorescencia normalizado de las tintas rojas y Eosin Yellow:

Se normaliza los espectros de la figura 5.1 y se obtiene los espectros normalizados de la figura 5.2 compararlo con el espectro normalizado de Eosin Yellow y luego aplicar coeficiente de Correlación de Pearson para obtener la tabla 5.3. Según Pearson, la intensidad de la correlación *r* se interpreta de la siguiente manera: un valor entre 0 y 0,1 sugiere la ausencia de correlación, mientras que un valor de *r* entre 0,7 y 1 indica una correlación muy intensa [33]

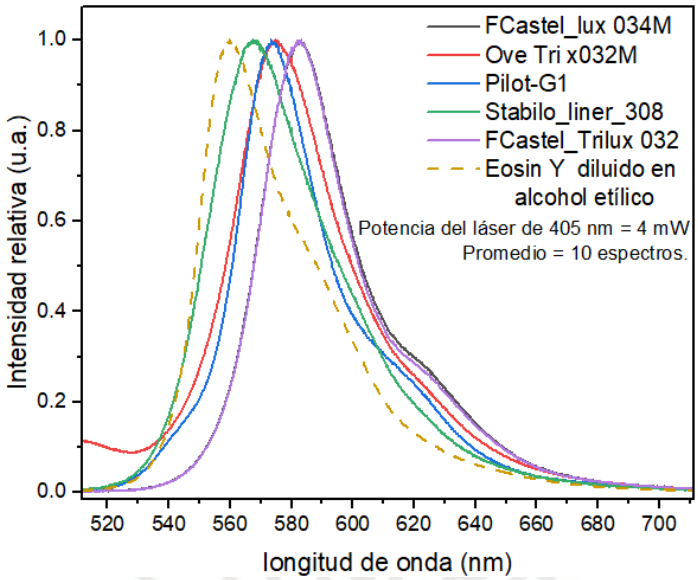


Figura 5.2. Espectro de fluorescencia normalizada de soluciones de tintas de lapiceros rojos y Eosin Yellow diluidas en alcohol etílico, empleando diversas muestras de lapiceros.

Coeficiente de Correlación de Pearson para el lapicero rojo

Se aplicó coeficiente de Correlación de Pearson para comparar los lapiceros rojos con el Eosin Yellow, lo cual permitió medir la relación entre sus características. La tabla 5.3 muestra los resultados de la correlación, destacando aquellos lapiceros con mayor similitud y otros con menor afinidad al Eosin Yellow.

Coeficiente de Correlación de Pearson	Faber Castell lux 034M	Ove Tri x032M	Pilot-G1	Stabilo_liner_308	Faber Castell Trilux 032	Eosin Yellow diluido en alcohol etílico
Faber Castell lux 034M	1	0.940	0.931	0.839	0.999	0.729
Ove Tri x032M	0.940	1	0.990	0.960	0.941	0.888
Pilot-G1	0.931	0.990	1	0.960	0.933	0.881
Stabilo_liner_308	0.839	0.960	0.960	1	0.840	0.977
Faber Castell Trilux 032	0.999	0.941	0.933	0.840	1	0.729
Eosin Yellow diluido en alcohol etílico	0.729	0.888	0.881	0.977	0.729	1

Tabla 5.3. Valores de coeficiente de Correlación de Pearson entre los espectros de Eosin Yellow y los espectros de las tintas de lapiceros rojos.

La figura 5.3 las tintas de los lapiceros rojos que mostraron una mayor correlación con el Eosin Yellow fueron el Stabilo Liner 308, Ove Tri x0.32M y Pilot G1, mientras que Faber Castell Tri lux 032 y Faber Castel lux 034 M presentó una correlación menor.

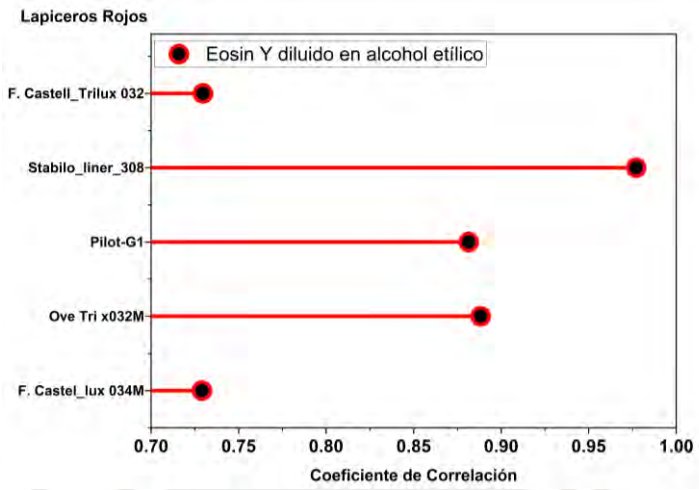


Figura 5.3. Uso del coeficiente de Correlación de Pearson aplicada al análisis de Eosin Yellow con los lapiceros Faber Castell Tri lux 032, Stabilo Liner 308, Pilot G1, Ove Tri x0.32M y Faber Castel lux 034 M.

5.2 Análisis de fluorescencia de lapiceros azules

Se prepararon concentraciones de tintas de lapiceros azules diluido en glicerina. La tabla 5.4 muestra la masa de cada tinta de lapicero usada y la cantidad de glicerina.

Lapiceros Azules	Masa de tinta (g)	Solvente: glicerina (ml)	Concentración de tinta en glicerina (ppm)
Lux 034 M Faber Castell	0.007	5	1400
Ove Tri x32	0.014	5	2800
Pilot_G1	0.015	5	3000
Stabilo_liner_308	0.016	5	3200
Trilux 032 M Faber Castell	0.02	5	4000

Tabla 5.4. Masa de muestras de lapiceros azules con glicerina.

Se determino la longitud de onda y la intensidad de fluorescencia de cada solución. Se usó un láser de 4.7 mW, ajustando el tiempo de integración y el promedio para

diferentes muestras. Para estas mediciones, se analizó el espectro de las cinco tintas comerciales presentadas en la tabla 5.5 y se comparó con las bandas de referencia del Crystal Violet. En la figura 5.4 se observan los diferentes picos de fluorescencia para cada muestra.

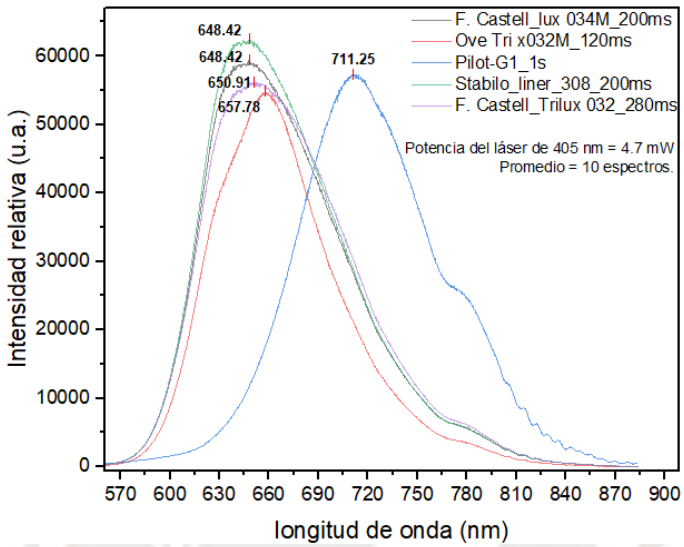


Figura 5.4. Espectro de fluorescencia de soluciones de tintas de lapiceros azules diluido en glicerina, empleando diversas muestras de lapiceros azules.

Laser (mW)	Promedio	Tiempo de integración (ms)	Lapiceros azules	Masa de tinta (g)	Longitud de onda (nm)	Intensidad (u.a.)
4.7	10	100	Faber Castell lux 034 M	0.007	648.4	59408
		30	Ove tri x 032 M	0.014	657.8	54787
		100	Pilot G1	0.015	711.2	57406
		100	Stabilo liner 308	0.016	648.4	62563
		100	Faber Castell Trilux 032	0.02	650.9	56162

Tabla 5.5. Longitud de onda de emisión e Intensidad fluorescencia de los lapiceros azules disuelto en glicerina.

Espectro de fluorescencia normalizado de tintas azules y Crystal Violet:

Se normaliza los espectros de la figura 5.4 y se obtiene los espectros normalizados de la figura 5.5 compararlo con el espectro normalizado de Crystal Violet y luego aplicar coeficiente de Correlación de Pearson para obtener la tabla 5.6.

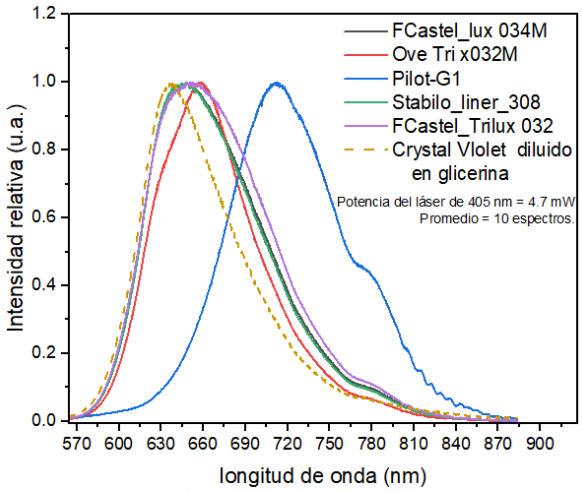


Figura 5.5. Espectro de fluorescencia normalizada de soluciones de tintas de lapiceros azules y Crystal Violet diluida en glicerina, empleando diversas muestras de lapiceros.

Coeficiente de Correlación de Pearson para el lapicero azul

Se aplicó coeficiente de Correlación de Pearson para comparar los lapiceros azules con el Crystal Violet, lo cual permitió medir la relación entre sus características. La tabla 5.6 muestra los resultados de la correlación, destacando aquellos lapiceros con mayor similitud y otros con menor afinidad al Crystal Violet.

Coeficiente de Correlación de Pearson	Faber Castell lux 034M	Ove Tri x032M	Pilot-G1	Stabilo_liner_308	Faber Castell Trilux 032	Crystal Violet diluido en glicerina
Faber Castell lux 034M	1	0.993	0.522	0.999	0.998	0.977
Ove Tri x032M	0.993	1	0.492	0.993	0.992	0.964
Pilot-G1	0.522	0.492	1	0.510	0.562	0.369
Stabilo_liner_308	0.999	0.993	0.510	1	0.997	0.980
Faber Castell Trilux 032	0.998	0.992	0.562	0.997	1	0.966
Crystal Violet diluido en glicerina	0.977	0.964	0.369	0.980	0.966	1

Tabla 5.6. Valores de coeficiente de Correlación de Pearson entre los espectros de Crystal Violet. y los espectros de las tintas de lapiceros azules.

En la figura 5.6 las tintas de los lapiceros azules que mostraron una mayor correlación con el Cristal Violet fueron el Faber Castell Trilux 032, el Stabilo Liner 308, el Over Tri X032M y el Faber Castell Lux 034M, mientras que el Pilot G1 presentó una correlación menor.

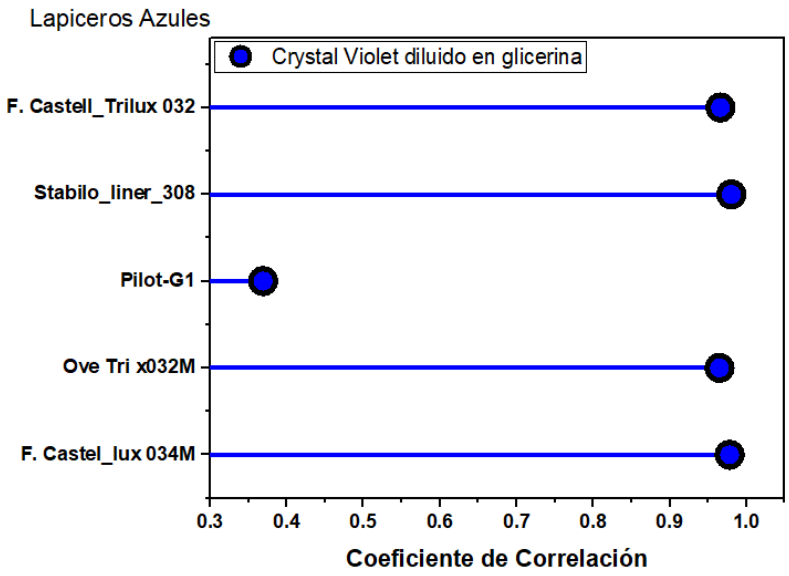


Figura 5.6. Uso del coeficiente de Correlación de Pearson aplicada al análisis de Crystal Violet con las tintas de lapiceros Faber Castell Tri lux 032, Stabilo Liner 308, Pilot G1, Ove Tri x0.32M y Faber Castel lux 034 M.

Se concluye que tanto las tintas de lapiceros rojos como azules presentan características espectrales de fluorescencia similares a las de los compuestos analizados, Eosin Yellow y Crystal Violet, respectivamente. Esto sugiere que los colorantes presentes en los lapiceros podrían tener propiedades fluorescentes similares a las de los compuestos utilizados, lo que abre la posibilidad de utilizar estos materiales en aplicaciones relacionadas con la espectroscopía de fluorescencia.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Se logró implementar y poner en funcionamiento dos sistemas de espectroscopia de fluorescencia utilizando láseres de 405 nm y 525 nm, junto con un montaje experimental robusto que incluyó un espectrómetro Ocean Optics, lentes de focalización, un divisor de haz y un sistema de adquisición de datos. Estos sistemas demostraron ser efectivos para la identificación y análisis de colorantes en tintas de lapiceros.

Se demostró que es posible desarrollar sistemas de espectroscopia de fluorescencia con materiales accesibles y configuraciones ópticas simplificadas, logrando resultados comparables a equipos comerciales más avanzados, lo que amplía su aplicación en entornos con recursos limitados.

Se determinó que la elección del solvente es un factor clave en la intensidad y precisión de las mediciones espectroscópicas. El etanol resultó ser un solvente más adecuado que el agua destilada para mejorar la intensidad de fluorescencia y reducir la incertidumbre estándar a menos del 10%. Se observó que el Eosin Yellow presentó mayor intensidad de fluorescencia en alcohol etílico, mientras que el Crystal Violet mostró mayor intensidad de fluorescencia en glicerina.

La calibración del sistema con Rhodamine B permitió establecer una relación clara entre la concentración del colorante y la intensidad de fluorescencia, facilitando la cuantificación precisa de estos compuestos en tintas de lapiceros.

Se comprobó que tintas del mismo color, pero de distintas marcas presentan variaciones en su composición química. Se observó que las tintas rojas mostraron una mayor correlación con Eosin Yellow, especialmente en el caso del Stabilo Liner 308, Ove Tri x0.32M y el Pilot G1. En el caso de las tintas azules, la mayor correlación se encontró con Crystal Violet, destacándose las marcas Faber Castell Trilux 032, Stabilo Liner 308, Over Tri X032M y Faber Castell Lux 034M.

Se identificó la necesidad de mejorar la estabilidad mecánica del sistema de espectroscopia y optimizar la preparación de muestras para mejorar la precisión de las mediciones y garantizar la reproducibilidad de los resultados.

La metodología desarrollada permitió no solo identificar compuestos fluorescentes en las tintas de lapiceros, sino también cuantificar su concentración mediante análisis de regresión lineal.

Esta investigación demuestra la viabilidad de implementar sistemas de espectroscopia de fluorescencia accesibles y su potencial en el análisis de tintas, con posibles aplicaciones en el ámbito forense, control de calidad y entornos de investigación con recursos limitados.

RECOMENDACIONES

Es preferible calibrar el equipo de espectroscopia de fluorescencia utilizando Rhodamine B disuelta en alcohol etílico, ya que únicamente en el rango 3 (10 ppb - 1000 ppb) presenta un porcentaje de error de concentración inferior a la mitad en comparación con el obtenido con Rhodamine B disuelta en agua destilada. Sin embargo, en los demás rangos, los errores porcentuales son similares para ambas soluciones, siendo inferiores al 10%.

Es recomendable almacenar las soluciones a base de agua y glicerina en recipientes de plástico sellados con cinta adhesiva en la parte superior para evitar la contaminación, ya que la concentración se mantiene estable hasta 2 semanas. Sin embargo, este método no es adecuado para el alcohol etílico debido a su alta volatilidad.

También se sugiere utilizar una lámpara de escritorio LED de luz blanca con una potencia de 8 W para observar las impurezas que pueda tener el envase de vidrio y verificar si las soluciones siguen un patrón de color al diluirse.

COMPLICACIONES

Una de las complicaciones fue la necesidad de limpiar adecuadamente los frascos y cubetas, ya que una pequeña contaminación puede alterar el espectro de fluorescencia emitido. Para esto, es esencial utilizar papel tissue para la limpieza. Sin embargo, otra complicación surgió al limpiar las cubetas de plástico con demasiado alcohol, ya que esto puede hacer que se opaquen sus paredes.

Además, el tiempo necesario para que la sustancia se diluya uniformemente puede afectar la respuesta de emisión de fluorescencia. Por ejemplo, en disolventes como la glicerina, disolver la sustancia puede ser más complicado, lo que podría requerir un equipo para facilitar la rápida disolución de la muestra.

TRABAJO A FUTUROS

Los sistemas de espectroscopia de fluorescencia de 405 nm y 532 nm implementado en el Laboratorio de Espectroscopia Óptica demostró ser altamente eficiente y sensible, permitiendo la detección de compuestos en concentraciones de hasta 10 ng/ml. Este resultado sienta las bases para futuras mejoras en la sensibilidad del sistema, como la optimización de la estructura mecánica para minimizar la filtración de luz parásita y el desarrollo de software especializado para el análisis de espectros de emisión y excitación de sustancias como Crystal Violet, Rhodamine B y Eosin Yellow.

Estos mismos estudios se pueden realizar en nuevas muestras de tintas de lapiceros, con el objetivo de identificar compuestos y concentraciones en lapiceros que estén diluidos en diferentes disolventes. Además, el interés por estudiar los espectros de fluorescencia de las tintas y determinar que disolventes pueden mejorar la intensidad de fluorescencia.

Para trabajos a futuro se desea encontrar espectros de fluorescencia en billetes de peruanos para identificación de colorantes para la autentificación y detección de su originalidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Naresh, Kommu. *Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Lecturer, Government Degree College, Bichkunda, Nizamabad, Telangana: National Level Workshop on Spectroscopic Techniques in Structural Elucidation Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 2014.
2. Chang, Aransselly Jesus Quiroz. *Desarrollo y optimización de un equipo de espectroscopia Raman convencional para el análisis cuantitativo de muestra solidas (polvo) y liquidas.* Departamento de física aplicada, Universidad Católica del Perú, 2016.
3. Beer, A. *Bestinmmung der Absorption des rothen Licths in farbigen Flussigkeiten.* 1st ed. Leipzing,Johann Ambbosius Barth., 1952.
4. Evans, Luke. *UV-Vis Spectrophometry (a brief background to Spectrophotometry).* Biochron US a division of Harvard Bioscience, Inc.
5. Settle, Frank A. *Handbook of Intrumetal Techniques for analytical Chemistry.* Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall, 1997.
6. Thomas G. Mayerhofer, Susana Pahlow. *The Bouguer – Beer – Lambert law: Shining light on the obscure.* Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics Friedrich Schiller University, Jena. ChemPhysChem Germany.
7. Skoog, D., Holler,J., Crouch, S. *Principles of Instrumental Analysis.* [ed.] seventh. s.l. : USA: Cengage Learning, 2018
8. Harris, Daniel C. *Quantitative Chemical Analysis.* s.l. , (Eighth Edition) USA: W.H. Freeman and Company., 2010.
9. Hofmann, Andreas. *Spectroscopic Technique.* Griffith University, 2010.

10. Cazes, Jack. *Analytical Instrumentation Handbook.* USA, Third Edition,Marcel Dekker, 2005.

11. McMahon, Gillian. *Analytical Instrumentation- A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments.* England , First Edition,Jon Wiley & Sons,Ltd, 2007.

12. P.W- Atkins, J.D. Paula. *Fluorescence Quenching.* Physikalische Chemisches Praktikum I, Wiley- VCH, Weinheim, 2016.

13. Femenias, Andreu Figuerola. *Escuaramidas como agentes de "Quenching" de fluorescencia.* Universidad de Baliarica Colombia , Departamento de Química, 2015-16.

14. Lakowicz, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* New York, (third edition). Springer Science, 2006.

15. *https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rhodamine-B.*

16. *https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/rhodamine-b.*

17. *https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eosin-yellowish.*

18. *https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/009.html.*

19. Asmiyenti Djaliasrin Djalil, Bondan Bagus Wijaksono, Pri Iswati Utami. *Spectrofluorimetric Method for the Determination of Rhodamine B in Syrup,* Vice Dean, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Indonesia.

20. *https://cen.acs.org/articles/93/i37/Periodic-Graphics-Chemistry-Writing-Inks.html.*

21. *https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/061.html.*

22. Sun, Qiran. *Detection and identification of dyes in blue writing inks by LC-DAD-orbitrap MS.* Institute of Forensic Science, Ministry of Justice, 1347 West Guangfu Road, 2016.

23. *https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gentian-Violet*.

24. *https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/049.html*.

25. *https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-violet*.

26. *https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/methyl_violet_2b*.

27. *https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1740*.

28. *https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/Victoria Blue B.*

29. *https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/Victoria Pure Blue Bo.*

30. *https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Basic-Blue-7#section=2D-Structure*.

31. Bousquet, J Guezenoc A Gallet Budynek and B. *Critical review and advices on spectral based normalization methods for LIBS quantitative analysis Spectrochim,* Acta Part B At Spectrosc 160,105688 , 2019.

32. Edith Castillo, Adalberto Mestanza. *Laboratorio de Física 1*, Publicaciones – PUCP, 2015.

33. *https://datatab.net/tutorial/pearson-correlation.*

34. Lambert,J (1760), *Photometrie. Photometria sive de ensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*. 1st ed. Ausburg Eberhardt Klett, p.361.

35. Lambert,J (1760), *Photometrie. Photometria sive de ensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*. 1st ed. Ausburg Eberhardt Klett, p.361.

36. Rhett Williamson, Daniela Djidrovs.ka, Ledie Andrea. *Characterization and Identification of luminiscent componens in inks using varios analytical techniques for the study of crossed- line intersections*, Forensic Chemistry, Elsevier 2016.

37. C. Vogt, J. Vogt, A. Becker, E. Rohde. *Separation, comparison and identification of fountain pen inks by capillary electrophoresis with UV- visible and fluorescence dtection and by proton-induced X-ray emission*, Journal of Chormatography A, 781 (1997), 391-405.

38. David Baez Lopez, Ofelia Cervantes Villagomez (2012) , *MATLAB-Con aplicaciones a la ingeniería , Física y Finanzas* (2da Edicion), ALFAOMEGA.

39. Mark Lutz (2011), *Programming Python* (4th Edition), O'reilly & Associates.

40. Originlab Corporation,*Origin 8.1 Getting Started Booklet* (2009) Recuperado 2022,https://www.originlab.com/pdfs/origin_8.1_getting_started_booklet.pdf.

41. Smith, E., & Dent, G. (2005). *Modern Raman Spectroscopy- A Practical Approach* (Primera ed.). (A. Rowe, & C. Wiltshore, Edits.) Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd.

42. Thorlabs. (s.f.) Recuperado el 2015, de Thorlabs: www. Thorlabs.com.

43. G. Reed, N. Nic Daeid, Savage, K. Faulds and C. Keeley, *The Analysis of blue, black and Red Gel Ink pens by Raman Spectroscopy*, Centre for Forensic and Centre for molecular Nanometrology, WestCHEM, Foster & Freeman.

44. Mehwish Sharif, Medeeha Batool, Sohail Chand, *Forensic Discrimination Potential of Blue, Black, Green, and Red Colored Fountain Pen Inks Commercially Used in Paksitan, vy UV/Visible Spectroscopy, Thin Layer Chromaography, and*

Fourier Transform Infrared Specroscopy, International Journal of Analytucal Chemistry, Vol 2019, Arti. ID 5980967, 10 p

45. Chang, R (2007). *Química* (novena ed.). (P.E Vasquez, Ed.) México, D.F., México: Mc Graw- Hill Interamericana.

46. Hecht,E. (2000). *Óptica* (Tercera ed.). Madrid: Addison Wesley Iberoamericana, S.A.

47. Herrera, A.; Flores, A; Rueda, P. J.E . *Fabricación y caracterización óptica de vidrios fluoroindatos con Sm3+. Departamento de Física*, Universidad de Pamplona Colombia, 2006.