

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUIMICA



**Construcción y optimización de un equipo para la lectura de celdas de ELISA por fluorescencia molecular.**

Trabajo Especial de Grado, presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. Gabriella M. Díaz Fernández, para optar por el título de Licenciada en Química, opción Tecnología

Caracas, Abril 2010

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA



**Construcción y optimización de un equipo para la lectura de celdas de ELISA por fluorescencia molecular**

Trabajo Especial de Grado, presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. Gabriella M. Díaz Fernández, para optar por el título de Licenciada en Química, opción Tecnología

Caracas, Abril 2010



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ASPECTOS TEÓRICOS.....	2
2.1. Generalidades de la Fluorescencia .....	2
2.2. Diagrama de Jablonski .....	3
2.3. Espectros de Fluorescencia.....	8
2.4. Efecto de la estructura molecular y del entorno químico sobre la Fluorescencia	9
2.5. Dependencia de la intensidad de la fluorescencia con la concentración.....	12
2.6. Instrumentación .....	13
2.6.1. Fuentes .....	14
2.6.2. Selectores de longitud de onda de excitación y emisión .....	16
2.6.3. Compartimiento de las muestras .....	17
2.6.4. Detectores.....	20
2.7. Aplicaciones de la espectroscopia de fluorescencia.....	22
2.7.1. Determinación fluorimétrica de especies inorgánicas.....	23
2.7.2. Aplicaciones en la bioquímica clínica .....	23
2.8. Imágenes digitales y espectroscopía.....	24
3. DESARROLLOS RECIENTES DE INSTRUMENTOS ESPECTROSCÓPICOS CON DETECCIÓN DE IMÁGENES.....	25
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. Objetivo General .....	28
5.2. Objetivos Específicos:.....	28
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
6.1. Materiales y equipos .....	29
6.1.1. Placas para inmuno-ensayos de ELISA .....	29
6.1.2. Diodos Emisores de Luz (LED) .....	30
6.1.3. Lámpara fluorescente .....	31
6.1.4. Scanner .....	32

6.1.4. Cámara fotográfica .....	35
6.1.5. Espectrómetro .....	36
6.2. Reactivos.....	38
7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
7.1 Montaje experimental con Scanner.....	40
7.2. Montaje experimental desarrollado empleando lámparas fluorescentes como fuente de excitación y cámara fotográfica como detector. ....	43
7.3 Evaluación Instrumental .....	48
7.4 Procesamiento de la Imagen.....	49
7.5 Evaluación de la homogeneidad en la iluminación .....	51
7.6 Efecto del tamaño del área de observación sobre la señal de fluorescencia ..	55
7.7 Estudio de la Reproducibilidad .....	59
7.8 Curva de calibración.....	62
8. CONCLUSIONES.....	67
9. RECOMENDACIONES.....	68
10. BIBLIOGRAFÍA.....	69
11. AGRADECIMIENTOS.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de Jablonski.....	6
<b>Figura 2.</b> Diagrama esquemático de un equipo de fluorescencia.....	14
<b>Figura 3.</b> Bandejas contenedoras de multi-muestras.....	18
<b>Figura 4.</b> Configuración de ángulo recto (A), Configuración frontal (B).....	19
<b>Figura 5.</b> Representación del principio del modelo aditivo de color RGB.....	21
<b>Figura 6.</b> Celdas para inmuno-ensayos de ELISA.....	29
<b>Figura 7.</b> Espectro de emisión del diodo emisor de luz empleado como fuente de excitación.....	31
<b>Figura 8.</b> Espectro de emisión de la lámpara fluorescente empleada como fuente de excitación.....	32
<b>Figura 9.</b> Funcionamiento y componentes de un digitalizador de imágenes.....	33
<b>Figura 10.</b> Espectro de transmisión típico de una Cámara CCD.....	36
<b>Figura 11.</b> Espectrómetro Ocean Optics USB2000.....	37
<b>Figura 12.</b> Porta muestra empleado Ocean Optics.....	37
<b>Figura 13.</b> Espectro de fluorescencia de una solución de fluoresceína en una mezcla etanol-agua de 25 mg/L.....	39
<b>Figura 14.</b> Superposición (cualitativa) con el espectro de la fluoresceína (línea negra) espectro RGB.....	40
<b>Figura 15.</b> Imagen capturada por un digitalizador de imágenes de una celda ELISA, que contiene una solución de fluoresceína de 100 mg/ml.....	41

<b>Figura 16.</b> Imagen adquirida de placa con pozos con solución de fluoresceína alternados con pozos con agua.....	42
<b>Figura 17.</b> Diagrama esquemático el montaje experimental de equipo desarrollado para lectura de la fluorescencia en placas ELISA.....	44
<b>Figura 18.</b> Detalle de la parte superior del equipo construido, se observan las lámparas de excitación y el orificio central que contiene el objetivo de la cámara fotográfica.....	45
<b>Figura 19.</b> Detalle del equipo construido, se muestra la gaveta que contendrá la placa a analizar.....	46
<b>Figura 20.</b> Imagen de la toma frontal del equipo construido. ....	47
<b>Figura 21.</b> Imagen obtenida con el equipo ensamblado de una placa ELISA conteniendo soluciones de fluoresceína de diferentes concentraciones.....	49
<b>Figura 22.</b> Desviación con respecto al promedio de las señales de fluorescencia de cada pozo de la placa.....	54
<b>Figura 23.</b> Efecto del menisco del agua en la zona de observación.....	56
<b>Figura 24.</b> Diagrama de caja obtenido del análisis de varianza del efecto del radio de observación en la magnitud de la señal de fluorescencia.....	59
<b>Figura 25.</b> Estudio de la reproducibilidad de la señal de fluorescencia en el tiempo.....	62
<b>Figura 26.</b> Representación gráfica de la variación de la señal de fluorescencia en función de la concentración de soluciones de fluoresceína.....	63
<b>Figura 27.</b> curva de calibración con sólo los valores comprendidos de 0 a 25 mg/L de fluoresceína.....	64
<b>Figura 28.</b> Curva de calibración obtenida en equipo comercial Ocean Optics.....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Señal de fluorescencia para 250µl de una solución de 25 mg/L adquirida con un diámetro de 5 píxel.....	50
<b>Tabla 2.</b> Análisis de varianza de los datos de la tabla 1.....	50
<b>Tabla 3.</b> Señal de fluorescencia para 250µl de una solución de 25 mg/L adquirida con un diámetro de 5 píxel.....	54
<b>Tabla 4.</b> Señal de fluorescencia para 250µl de una solución de 25mg/L adquirida con un diámetro de 7 píxel.....	54
<b>Tabla 5.</b> Señal de fluorescencia para 250µl de una solución de 25 mg/L adquirida con un diámetro de 9 píxel.....	55
<b>Tabla 6.</b> Señal de fluorescencia para 250µl de una solución de 25mg/L adquirida con un diámetro de 11 píxel.....	55
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza de los datos promedio de señal de fluorescencia para diámetro de 5,7,9 y 11 píxel.....	55
<b>Tabla 8.</b> Datos del estudio de reproducibilidad en el tiempo. Medidas realizadas a 200 µL de solución de Fluoresceína d 25 mg/L. Medidas realizadas por triplicado con intervalo de 10 minutos entre medidas.....	57

## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la construcción y la evaluación preliminar de un equipo de medición simultánea de fluorescencia molecular, teniendo como objetivo su aplicación futura en el análisis de muestras clínicas.

Se ensayaron dos montajes experimentales: uno basado en un digitalizador de imágenes (scanner) convencional y otro empleando un montaje convencional de fluorescencia por reflexión. En el primer caso no se logró obtener una sensibilidad adecuada. El montaje del equipo propuesto emplea lámparas fluorescentes convencionales como fuentes de excitación, placas de 96 pozos para inmuno-ensayo de ELISA como porta muestras y una cámara fotográfica convencional como sistema de detección y registro de la señal de fluorescencia. Para el procesamiento de la señal se empleó un programa diseñado empleando Matlab. La evaluación analítica se realizó empleando soluciones de fluoresceína en una mezcla de etanol/agua. El intervalo lineal obtenido es relativamente limitado, típico de los métodos basados en medidas de fluorescencia. La sensibilidad, evaluada como la pendiente de la curva de calibración es sustancialmente menor que la obtenida en equipos comerciales, sin embargo, es lo suficientemente elevada para realizar análisis cuantitativos de especies de interés que no se encuentren en niveles de concentración de trazas. El equipo diseñado mostró sensibilidad, estabilidad y respuesta lineal para realizar análisis cuantitativo de hasta 96 muestras de forma simultánea en un corto tiempo.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas ha habido un importante interés en la aplicación de técnicas de fluorescencia molecular en las ciencias biológicas en general. Tanto la espectroscopía de fluorescencia convencional como la fluorescencia resuelta en el tiempo (mediciones de tiempo de vida de las especies fluorescentes) se han convertido en herramientas fundamentales en la investigación en biofísica, bioquímica, biomedicina e incluso se han desarrollado métodos rutinarios de análisis clínicos que permiten la detección y control de algunas patologías humanas. Sin temor a exagerar, la fluorescencia es, hoy en día, la técnica base de la biotecnología, citometría, diagnóstico médico, secuenciación de ADN para estudios forenses y genéticos entre otras áreas. La fluorescencia es lo suficientemente sensible como para lograr la detección de especies moleculares que se encuentran en los materiales biológicos en muy baja concentración e incluso reportándose la de moléculas individualmente. Por otra parte la dependencia del fenómeno de fluorescencia con el ambiente que rodea la molécula permite obtener información muy valiosa sobre mecanismos de acción de drogas a nivel celular <sup>[1]</sup>.

Por otra parte, el desarrollo acelerado de componentes opto electrónicos de muy alta calidad y bajo costo han permitido rediseñar equipos analíticos más versátiles y económicos. La sustitución de costosas lámparas de excitación por diodos emisores de luz o láser de estado sólido en equipos para absorción y fluorescencia molecular, así como el reemplazo de costosos detectores fotoeléctricos por dispositivos de carga acoplada o fotodiodos en equipos espectroscópicos son cada vez más frecuentes.

La presente propuesta de trabajo consiste en la construcción y evaluación preliminar de un equipo para la medición de la fluorescencia molecular en soluciones

con el objetivo de proponer un instrumento aplicado para el análisis cuantitativo simultáneo de un número elevado de muestras de futura aplicación al análisis clínico.





## 2. ASPECTOS TEÓRICOS

### 2.1. Generalidades de la Fluorescencia

Cuando una especie química, absorbe una fracción de energía radiante de un haz de luz, ésta es promovida a un estado excitado. Dicha especie tiene un tiempo de vida muy breve ( $10^{-8}$  segundos) en el estado electrónico excitado y en consecuencia tiende a regresar rápidamente al nivel de energía menor. Para lograrlo la especie tiene varios mecanismos de relajación no radiantes: (a) puede transferirse energía a otras especies del medio (al solvente por ejemplo en el caso de una solución) y (b) puede convertirla en otro tipo de energía eléctrica o térmica. Sin embargo, también puede ser re-emitida en forma de radiación electromagnética. En general, este último mecanismo de relajación de la energía absorbida se conoce como luminiscencia.

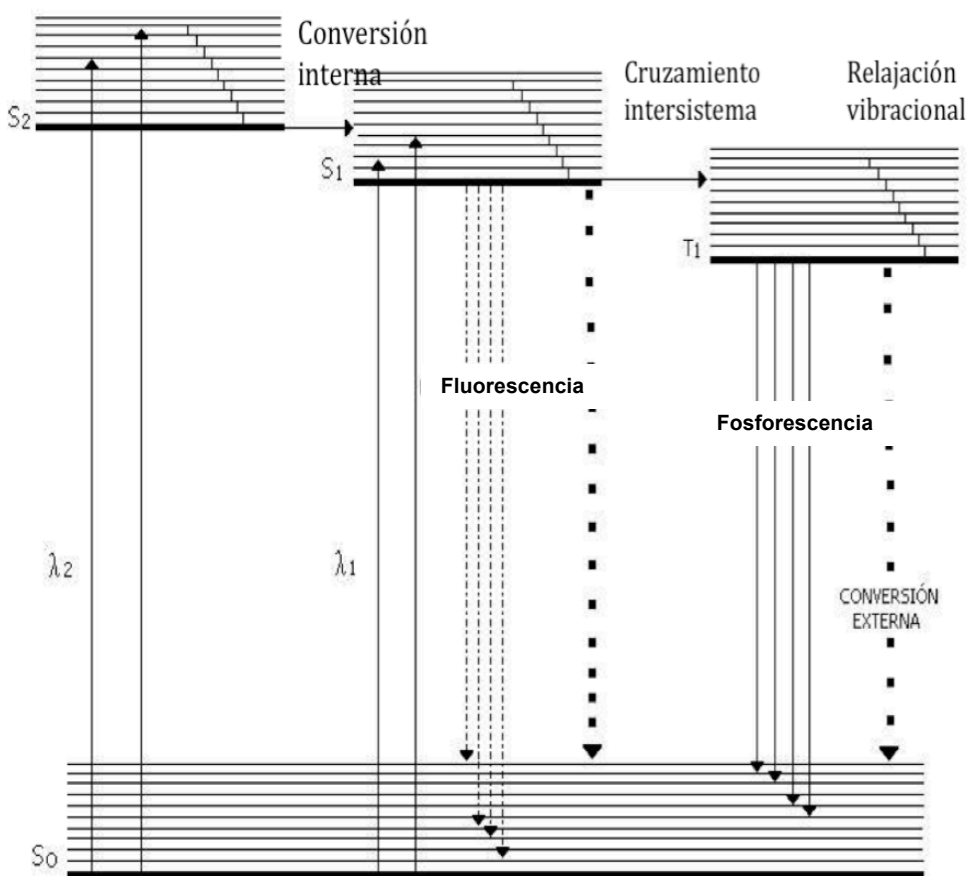
La luminiscencia está formalmente clasificada en dos tipos, dependiendo de la naturaleza del estado excitado de la especie química: la fluorescencia y la fosforescencia. En la fluorescencia el estado excitado es un estado singlete, en donde el electrón en el orbital excitado se encuentra apareado (por un spin opuesto) con un segundo electrón en orbital del estado de menor energía. Consecuentemente, el retorno por emisión de fotones al nivel de menor energía ocurre rápidamente. El tiempo en el que ocurre la emisión de la fluorescencia es típicamente del orden de  $10^{-8}$  segundos. En la fosforescencia la emisión se da desde un estado triplete, en donde el electrón en el nivel excitado tiene la misma orientación spin del electrón en el orbital en el nivel fundamental. La transición al nivel de menor energía es prohibida y tiempo de emisión es mayor, del orden de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  segundos. <sup>[1]</sup>

## 2.2. Diagrama de Jablonski

En la Figura 1 se muestra un diagrama parcial de niveles de energía para una hipotética molécula fotoluminiscente, conocido como diagrama de Jablonski. La línea horizontal inferior identificada como  $S_0$  representa la energía del estado fundamental de la molécula, el cual normalmente es un estado singlete, en este nivel electrónico al igual que en los estados excitados se encuentran asociados varios niveles vibracionales de la molécula. A la temperatura ambiente, la energía electrónica de casi todas las moléculas es  $S_0$ . Las dos líneas superiores de la izquierda denominadas  $S_1$  y  $S_2$ , corresponden respectivamente, al primero y segundo estado singlete excitado. La línea horizontal superior a la derecha, identificada como  $T_1$ , corresponde al primer estado triplete excitado. Hay que señalar que el estado triplete es menos energético que el correspondiente estado excitado singlete.

La excitación de esta molécula puede ocurrir por absorción de dos bandas de radiación, una centrada a la longitud de onda  $\lambda_1$  (transición  $S_0 \rightarrow S_1$ ) y la segunda a la longitud de onda  $\lambda_2$  ( $S_0 \rightarrow S_2$ ). El paso directo de la molécula de un estado singlete basal  $S_0$  a un triplete excitado  $T_1$  no ocurre debido a que es una transición prohibida.

Una vez que la especie ha sido excitada, la desactivación o pérdida de la energía en exceso puede ocurrir a través de diferentes procesos. El camino más probable para regresar al estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos no radiativos, se observa tal emisión.



**Figura 1.** Diagrama de energía de Jablonski para una molécula fluorescente hipotética.

En la mayor parte de las especies químicas, la desactivación por relajaciones no radiactivas (choques moleculares de la especie excitada con el solvente) es la ruta cinéticamente favorecida, ya que el número de especies fluorescentes es muy pequeño en comparación con las especies no fluorescentes (por ejemplos las moléculas del solvente en una solución de un compuesto fluorescente). El fenómeno de fluorescencia está restringida a un número relativamente pequeño de sistemas que poseen características estructurales y ambientes químicos que hacen que la velocidad de los

procesos de relajación o desactivación sin radiación se reduzca hasta el punto que la reacción de emisión puede competir cinéticamente. Los procesos que son posibles de ocurrir en una molécula que tiene niveles de energía similares a los mostrados en la Figura 1 son los siguientes:

a) Conversión externa: Este es el proceso que ocurre más frecuentemente en las especies atómicas y moleculares. Durante este proceso y el exceso de energía que tiene la especie excitada se pierde por choques moleculares entre la especie excitada y el solvente, el resultado neto es una transferencia de energía de la especie excitada a las moléculas vecinas y un incremento mínimo en la temperatura del solvente.

b) Conversión interna: En este proceso una molécula excitada pasa del estado electrónico más alto al estado electrónico más bajo ocasionando una serie de relajaciones vibracionales sin emisión de radiación, se favorece cuando dos niveles electrónicos son de energía similar y puede ocurrir un solapamiento.

En estas circunstancias la fluorescencia tiene lugar sólo a  $I_3$ . A pesar de que la radiación de longitud de  $\lambda_1$  o  $\lambda_2$  fue la responsable de la excitación. La quinina es un ejemplo clásico de este comportamiento, esta sustancia presenta una banda de excitación a 340 nm y una banda de emisión a 450 nm.

Un espectro de fluorescencia siempre implica la presencia de una emisión a una longitud de onda de mayor que la utilizada para la excitación de la especie, pues como se ve en el diagrama parte de la energía que recibe la molécula se disipa en forma de calor (procesos no radiativos) y solo parte de esta energía se reemite como radiación electromagnética (Fluorescencia).

El cruzamiento de sistemas es un proceso en el que el espín de un electrón excitado se invierte y da lugar a un cambio en la multiplicidad de la molécula. Como se observa en la figura 1 la transición directa de un singlete a un triplete es poco probable debido a las restricciones cuánticas. La presencia de especies paramagnéticas como el oxígeno molecular en disolución también favorece el cruzamiento entre sistemas y consecuentemente disminuye la fluorescencia.

Empíricamente se observa que el comportamiento fluorescente lo presentan con más frecuencia compuestos en los que la transición es el tipo  $p, p^*$  ya que tales transiciones presentan tiempos de vida promedio más cortos y no aquellos compuestos en los que la transición de menor energía es del tipo  $n, p^*$ ; esto es, la eficacia cuántica es mayor para transiciones  $p^*, p$ .

### **2.3. Espectros de Fluorescencia**

La fluorescencia ocurre sólo en regiones de longitudes de onda muy específicas que corresponden a las energías del estado fundamental y del excitado involucrados, estas diferencias son también específicas de una especie química dada. La combinación de la longitud de onda o energía específica para excitar a la especie y la longitud de onda o energía de la radiación fluorescente nos da una posibilidad de obtener información muy valiosa a la hora de realizar estudios cualitativos.

Desafortunadamente los espectros de fluorescencia son de banda ancha, producto de la superposición de las distintas transiciones de los estados vibracionales que ocurren en un mismo nivel electrónico. Esto hace que sea común, al igual que en la espectroscopía de absorción molecular, que se presenten interferencias espectrales

cuando se analizan mezclas de especies con mucha o mediana similitud en sus estructuras.<sup>[2]</sup>

Los espectros de fluorescencia los podemos obtener de al menos dos maneras experimentalmente, estos se denominan espectros de emisión y de excitación. Los espectros de emisión se obtienen midiendo la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda fija, a medida que se varía la longitud de onda de excitación. Como sabemos la primera etapa del proceso de fluorescencia es la absorción de radiación para excitar las especies, este espectro es idéntico al de absorción. Este espectro nos permite evidenciar las longitudes de onda que son absorbidas preferencialmente por el analito y darían inicio al proceso de fluorescencia.<sup>[2]</sup>

El espectro de excitación, comúnmente denominado espectro de fluorescencia, se obtiene con una excitación a una longitud de onda fija mientras se registra la fluorescencia en función de la longitud de onda. Este espectro nos da “la respuesta” del analito a la excitación a una longitud de onda específica. Es claro que ambas respuestas expresadas en ambos tipos de espectros son definidos por la estructura del analito.<sup>[2]</sup>

#### **2.4. Efecto de la estructura molecular y del entorno químico sobre la Fluorescencia**

En general una especie que produce fluorescencia se denomina comúnmente fluoróforo, aunque también se denomina así al grupo funcional o porción que en una molécula es responsable de la fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia puede verse afectada por su estructura molecular así como, por el entorno químico. La fluorescencia se presenta sólo cuando se absorbe

radiación de longitud de onda mayor a 250 nm, por debajo de esa longitud de onda los fotones poseen suficiente energía como para que se generen procesos de desactivación de los estados excitados como consecuencia de la predisociación o disociación. Por ello, las transiciones menos energéticas ( $\pi \Rightarrow \pi^*$ ,  $n \Rightarrow \pi^*$ ) son las que típicamente observamos en los experimentos de fluorescencia. Por lo tanto la fluorescencia más intensa es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos, en particular estructuras de anillos conjugados. La presencia de heteroátomos (N, S, O), sustituyentes alquílicos, etc., producen modificaciones en los espectros de fluorescencia, tanto en intensidad como en la posición de las bandas. El pH del medio puede ser también otra variable importante en el caso de compuestos aromáticos fluorescentes que posean grupos ácidos o básicos sustituyentes, esto producto de la dependencia del número de estructuras resonantes asociadas a las formas ácidas y básicas. Se hace entonces necesario el uso de medios amortiguados con el uso de buffer en las medidas de fluorescencia de este tipo de compuestos<sup>[2]</sup>

En general los fluoróforos se clasifican en dos grupos: intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos son aquellas especies que presentan fluorescencia de forma natural, mientras que los extrínsecos son productos de formación de derivados para inducir la fluorescencia en especie que no la presenta de forma natural. Por ejemplo en las proteínas, el fluoróforo dominante es el grupo indol del triptophan (aminoácido esencial). El indol absorbe cerca de 280 nm emitiendo fluorescencia cerca de los 340 nm. Los compuestos que conforman las membranas celulares no presentan fluorescencia intrínseca, por lo que se añaden compuestos fluoróforos que espontáneamente se sitúan, por afinidad química, en las cadenas no polares de los componentes de las membranas, un ejemplo de ello es el diphenilhexatriene (DPH).

Para medir la capacidad de fluorescencia de una especie se emplea el rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia. Este se define como la



relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. En especies altamente fluorescentes, este rendimiento es cercano a uno. Las especies que no presentan fluorescencia apreciable su valor se aproxima a cero. El rendimiento cuántico disminuye al aumentar la temperatura debido al aumento de las frecuencias de las colisiones que a su vez aumentan la desactivación de los estados excitados por conversión externa. Un aumento de la viscosidad del medio (solvente) también genera el mismo efecto. <sup>[2]</sup>

Los procesos que producen una disminución de la intensidad de fluorescencia, son conocidos como *quenching*. El *quenching colisional* ocurre cuando fluoróforos en estado excitado se desactivan (regresan a su estado fundamental) luego del choque con otras moléculas presentes en el medio, denominados *quencher*. Los fluoróforos no son alterados químicamente en este proceso. El oxígeno, halógenos, aminas y moléculas deficientes de electrones son *quencher* típicos. La transferencia de energía puede ocurrir mediante la transferencia electrónica o acoplamiento spin orbital, dependiendo por supuesto del tipo de interacción *fluoróforo-quencher*. El *quenching* también puede presentarse por mecanismos no moleculares, como la atenuación del haz de excitación por presencia de otras especies absorbentes en el medio. La presencia de oxígeno disuelto suele reducir la intensidad de fluorescencia de una solución, este efecto se atribuye a la oxidación de las especies fluorescentes, inducida fotoquímicamente. Sin embargo, el *quenching* que tiene lugar debido a las propiedades paramagnéticas que tiene el oxígeno, favorece el cruce entre sistemas y la conversión de las moléculas excitadas al estado triplete. <sup>[2]</sup>

## 2.5. Dependencia de la intensidad de la fluorescencia con la concentración

La potencia de la emisión fluorescente  $F$  es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación, que podemos escribir como:

$$F = K' (P_0 - P) \quad (\text{ec. 1})$$

En donde  $P_0$  es la potencia del haz incidente sobre la muestra y  $P$  es su potencia luego al atravesar la muestra. La  $K'$  depende de la eficacia cuántica del proceso de fluorescencia. Para introducir la dependencia de  $F$  con la concentración escribimos la ley de Beer como:

$$P = P_0 10^{-\epsilon bc} \quad (\text{ec. 2})$$

Donde  $\epsilon$  es la absorptividad de la sustancia,  $b$  el espesor de la muestra que atraviesa el haz de excitación y  $c$  su concentración. Sustituyendo la ecuación 2 en la 1, desarrollando el término exponencial y considerando soluciones diluidas de forma que la absorbancia sea menor de 0,05, podemos escribir:

$$F = 2,3 K' \epsilon bc P_0 \quad (\text{ec. 3})$$

Cuando  $P_0$  es constante, escribimos entonces,

$$F = K c \quad (\text{ec. 4})$$

Así, que la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración es lineal a bajas concentraciones. Cuando la concentración ( $c$ ) de la especie es elevada tal

que la absorbancia supera el 0,05 la dependencia ya no es lineal, producto de la no validez de las aproximaciones que nos llevan a la expresión 3. [2]

Otros factores, responsables también generan desviaciones de la linealidad a elevadas concentraciones, son la auto-amortiguación generada por el incremento de las colisiones de moléculas excitadas y la auto-absorción que se presenta por la presencia de moléculas en estado fundamental alrededor de las especies excitadas que rápidamente absorben la radiación emitida como fluorescencia. [2]

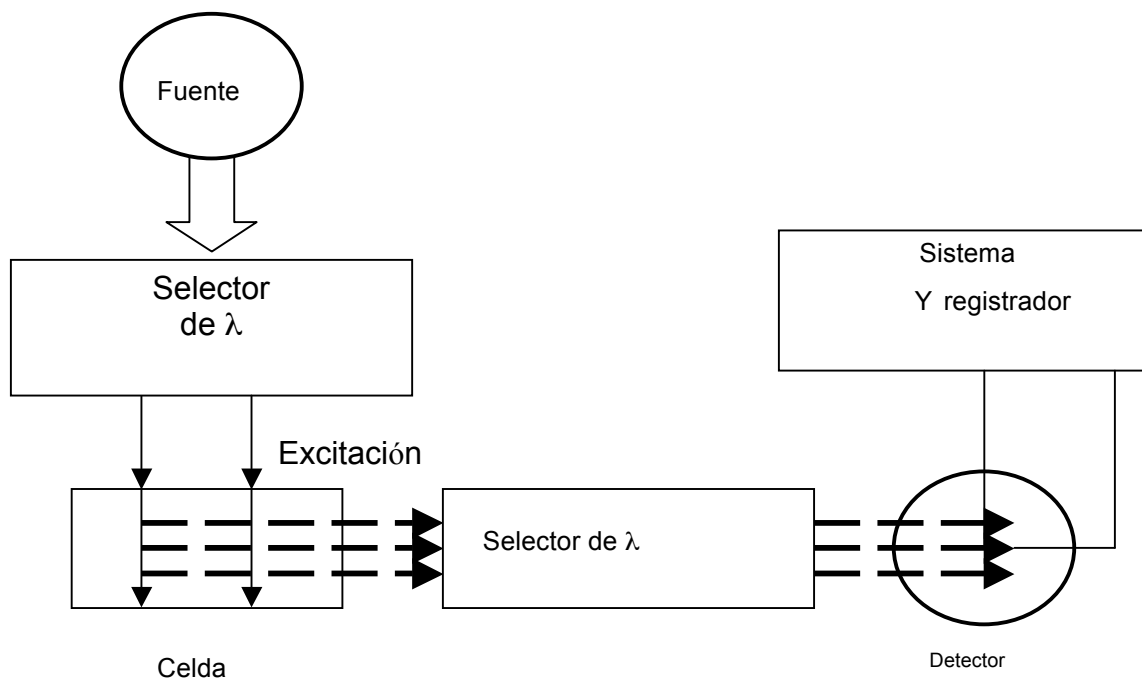
## 2.6. Instrumentación

Los componentes esenciales que constituyen un espectrómetro de fluorescencia molecular son los siguientes: una fuente de excitación, dos selectores de longitud de onda y un detector. Un diagrama esquemático se presenta en la figura 2. La radiación proveniente de la fuente se hace pasar por un selector de longitudes de onda para aislar el intervalo de la radiación deseada para excitar la muestra. Luego la radiación se hace incidir sobre el contenedor o celda de muestra y posteriormente la radiación emitida se hace incidir sobre un segundo selector de longitud de onda y así aislar la radiación característica de emisión a ser detectada. El segundo selector se coloca en una disposición tal de evitar que el mismo sea iluminado por la radiación de la fuente transmitida hacia la muestra y evitar así la saturación del detector y la interferencia espectral.

Los instrumentos de fluorescencia son clasificados como fluorómetros de filtros (que también reciben el nombre de fluorímetros), espectrofluorómetros y espectrofluorómetro de compensación. [3]

### 2.6.1. Fuentes

El factor que se considera para seleccionar una fuente de excitación de fluorescencia es la intensidad de la lámpara, su intervalo espectral y su estabilidad. Considerando que la intensidad de la radiación fluorescente es directamente proporcional a la potencia de la radiación de excitación, para lograr una buena sensibilidad es necesaria una fuente de elevada potencia radiante. Existen diferentes tipos de lámparas, entre ellas tenemos, lámparas de arco de alta presión de xenón, lámpara de destello de xenón, lámparas de vapor de mercurio de baja presión, los láser, etc. <sup>[3]</sup>



**Figura 2.** Diagrama esquemático de un equipo de fluorescencia <sup>[2]</sup>

Las fuentes de radiación que mejor se ajustan son las lámparas de arco de Xenón o de Mercurio de alta densidad. La lámpara de Xenón produce una radiación intensa como consecuencia del paso de una corriente a través de una atmósfera de Xenón. Estas producen un espectro continuo entre 200 y 1000 nm, con un máximo de intensidad en 500nm. Una limitación de este tipo de fuentes es la inestabilidad producida por el parpadeo, pues el arco situado entre los electrodos internos de la lámpara tienden a moverse ligeramente, provocando una variación aleatoria en la potencia radiante de la radiación que llega a la cubeta. Las lámparas de Mercurio de alta presión producen un espectro discontinuo con líneas de emisión entre 365 y 734 nm. Otras fuentes incluyen lámparas de halógenos y combinación de las lámparas de Mercurio- Xenón. <sup>[3]</sup>

#### 2.6.1.1. Diodos Emisores de Luz (LEDs)

Los Diodos de emisión de luz, también conocido como LED (acrónimo del inglés de Light-Emitting Diode) se han venido empleando recientemente como fuente de excitación en equipos espectroscópicos. El LED es un dispositivo semiconductor (diodo) que emite luz incoherente de espectro reducido cuando se polariza de forma directa la unión PN del mismo y circula por él una corriente eléctrica. Este fenómeno es una forma de electroluminiscencia. El color (longitud de onda), depende del material semiconductor empleado en la construcción del diodo y puede variar desde el ultravioleta, pasando por el visible, hasta el infrarrojo. Requieren una alimentación de 5 voltios, generando una iluminación bastante estable y son relativamente económicos. <sup>[1]</sup>

Hoy en día se disponen de LEDs en una gama amplia de longitudes de onda y de intensidad variable y cada día gracias a la investigación en el campo de la optoelectrónica hay mayor variedad. Debido a su pequeño tamaño, los LEDs puede

colocarse muy cerca de la muestra, evitando así la pérdida de radiación por dispersión o por reflexión de los haces de luz en otros componentes ópticos (espejos, lentes por ejemplo), haciendo esto una ventaja cuando se quieren desarrollar equipos compactos. Por otra parte, su bajo precio disminuye sustancialmente el costo de los equipos. Otra ventaja es la poca emisión de luz infrarroja que poseen que evita el calentamiento de las muestras disminuyendo el riesgo de descomposición térmica de analitos inestables. Quizás, una desventaja es su limitada intensidad, que puede ser parcialmente compensada empleando grupo o arreglos de LEDs, sin embargo, cada día los LEDs que se desarrollan poseen intensidad mayor pudiéndose esperar que en el futuro cercano reemplacen muchas de las fuentes convencionales. <sup>[1]</sup>

### **2.6.2. Selectores de longitud de onda de excitación y emisión**

El aislamiento de una radiación de una determinada longitud de onda desde la fuente de excitación puede conseguirse mediante filtros o monocromadores. En los instrumentos más sencillos se utilizan filtros de interferencia, filtros de vidrio coloreado. De todos ellos los, filtros de interferencia son los más utilizados, pues los filtros transmiten mas radiación y son menos costosos que los monocromadores. En el caso de equipos más complejos se utilizan monocromadores con redes que permiten la obtención de espectros con mayor resolución <sup>[6]</sup>.

En un espectrofluorímetro los selectores de longitud de onda se colocan antes y después del compartimiento de la muestra para seleccionar la longitud de onda de la radiación de excitación y emisión respectivamente. Además, esta selección se puede completar utilizando rendijas de entrada y salidas para determinar el ancho de banda espectral requerido. <sup>[6]</sup>

### 2.6.3. Compartimiento de las muestras

Las cubetas utilizadas para las mediciones fluorescentes son generalmente rectangulares, por lo menos con dos caras adyacentes transparentes, pero también pueden ser cilíndricas. Las dos caras restantes pueden ser también transparentes o pueden tener una superficie reflectante para dirigir la emisión fluorescente hacia el detector. Las cubetas de cuarzo se utilizan para medir radiaciones de luz UV-visible y las de vidrio pueden utilizarse para medir solamente en la zona visible y son más económicas.

En muchos casos, se desea tener la capacidad de analizar un número relativamente elevado de muestras de forma simultánea, en vez de un análisis secuencial. En estos casos se emplean porta-muestras como los micropozos, que son bandejas que poseen contenedores en arreglos en el plano o cuadrícula (ver figura 3). Estos contenedores se utilizan en los ensayos de inmuno-absorción ligado a enzimas, denominado comúnmente ELISA (por las iniciales en inglés) y se denominan celdas de ELISA, las cuales son fabricadas en material polimérico y sirven directamente como porta-muestras. Poseen numerosos pozos, generalmente 96, con capacidades variables de algunos pocos mililitros o menos. Cada celda, conteniendo una muestra distinta, se puede excitar secuencialmente y recolectar la fluorescencia de la misma manera. También existen equipos con configuración que permite la excitación y lectura de forma simultánea. <sup>[1]</sup>



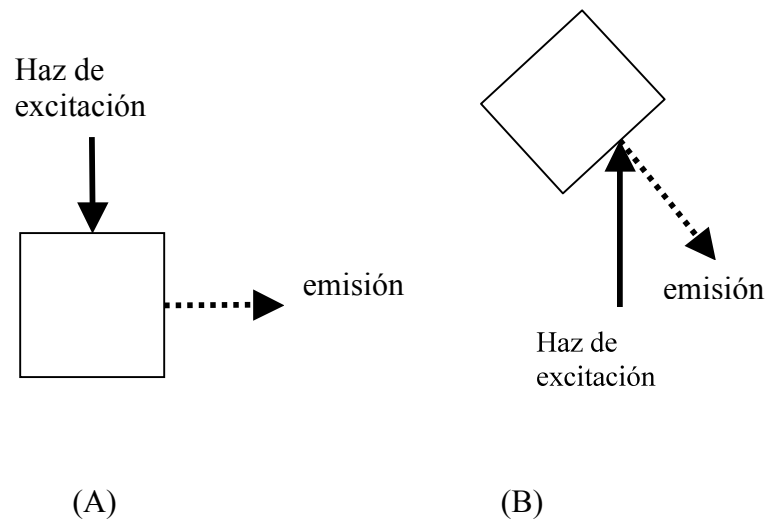
**Figura 3.** Bandejas contenedoras de multimuestras <sup>[4]</sup>

#### 2.6.3.1. Configuración de la detección por Fluorescencia

Existen varias formas o geometrías para iluminar y recolectar la fluorescencia de la muestra, las dos más populares son la configuración en ángulo recto ( $90^\circ$ ) en donde el haz de excitación incide en una de las caras de el porta-muestra y se recoge la emisión de fluorescencia en una de las caras de la celda de forma perpendicular a la incidencia del haz de excitación. Esta configuración tiene como ventajas que disminuye sustancialmente el riesgo que llegue al detector una elevada intensidad la radiación que se emplea para la excitación, disminuyendo la probabilidad de saturación del mismo. Por otra parte, el camino del haz de excitación por la muestra puede ser prolongado excitando a su paso una mayor cantidad de especies que directamente incrementarían la cantidad de radiación fluorescente y por ende incremento de sensibilidad, ver figura 4 (A). La segunda configuración mas empleada es la de



reflección (figura 4B), en donde el haz de excitación incide a un ángulo determinado, menor a  $90^\circ$  con respecto a la superficie de una de las caras de la celda portamuestra, la emisión de fluorescencia se recolecta en la misma cara colocando el detector a un ángulo de  $37^\circ$  con respecto al haz de excitación. Puede emplearse un ángulo  $0^\circ$  cuando el elemento detector y la fuente de excitación se colocan en el mismo plano, conocido como configuración por reflexión total. Esta configuración es particularmente empleada para muestras muy absorbentes o concentradas o con presencia de elevadas concentraciones de sólidos suspendidos que disminuirán sensiblemente la intensidad del haz de excitación si este atraviesa la misma. Un diagrama esquemático de ambas configuraciones se muestra en la figura 4. <sup>[2]</sup>



**Figura 4.** Configuración de ángulo recto (A), Configuración frontal (B)

#### 2.6.4. Detectores

Los detectores mas utilizados en espectrometría de fluorescencia molecular son los tubos fotomultiplicadores. Más recientemente se vienen empleando detectores de estado sólido como las cámaras CCD, cuyo funcionamiento se basa principalmente en el sistema de procesamiento de imágenes. <sup>[3]</sup>

##### 2.6.4.1. Cámara CCD como Detectores de Luz

Cuando adquirimos una imagen con una cámara digital, tenemos una serie de puntos en el área de la imagen conteniendo un color como una representación del modelo de color (R,G,B) que define el color e intensidad de la misma. Esto representa el principio básico de los sistemas de detección CCD.

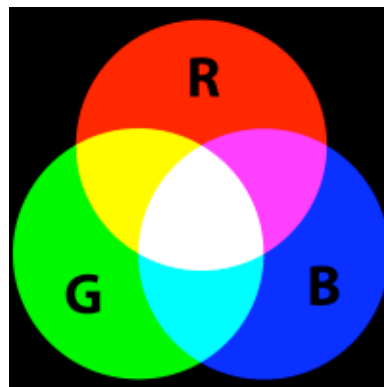
Hoy en día puede resultar común el término CCD, derivado del ingles término dispositivo de carga acoplada (Charge Coupled Device), ya que es uno de los elementos principales de las cámaras fotográficas y de video digitales. En éstas, el CCD es el sensor con pequeñas celdas fotoeléctricas que registran la imagen. Esta imagen es procesada por la cámara y registrada en la tarjeta de memoria o en una pantalla. La capacidad de resolución o detalle de la imagen depende del número de células fotoeléctricas del CCD. Este número se expresa en píxeles. A mayor número de píxeles, mayor resolución. Los pixeles del CCD registran la imagen en código RGB, por lo cual tres píxeles, uno para cada color, forman un conjunto de celdas fotoeléctricas capaz de captar cualquier color en la imagen. Los detectores CCD al igual que las celdas fotovoltaicas, se basan en el efecto fotoeléctrico: la conversión la luz recibida o incidente en corriente eléctrica. La sensibilidad del detector CCD depende de la eficiencia cuántica, es decir la cantidad de fotones que deben incidir sobre cada

detector para producir una corriente eléctrica. El número de electrones producido es proporcional a la cantidad de luz recibida. <sup>[5]</sup>

#### 2.6.4.2. Modelo aditivo de color RGB

El modelo de color RGB es un modelo aditivo de color en donde luz de color Rojo (Red) Verde (Green) y Azul (Blue) son combinadas en diferentes proporciones para generar una muy amplia gama de colores. El propósito del modelo RGB es generar una forma numérica de representación de los colores percibido por los humanos para sistemas electrónicos, tales como televisores, computadores, cámaras, etc.

En la figura 5 se representan tres haces de luz: uno azul, uno verde y uno rojo que se proyectan en una pantalla negra y que se superponen parcialmente. La intensidad es nula en ausencia de luz y por lo tanto cada componente genera el color mas oscuro, es decir el color negro, mientras que la intensidad máxima de los tres haces generaría el color blanco (zona central), esto es cuando el sistema esta totalmente iluminado. <sup>[5]</sup>



**Figura 5.** Representación del principio del modelo aditivo de color RGB.

La zona de superposición de dos haces, por ejemplo el verde y rojo, genera el color amarillo. Si uno de estos dos haces posee mayor intensidad que el otro generaría un amarillo verdoso o un amarillo rojizo (naranja). Entonces se puede generar una gama de colores muy grande sólo con variar la superposición de estos tres haces y la intensidad de cada uno de ellos. La gran utilidad del modelo RGB se evidencia cuando lo llevamos a una representación numérica. El color se expresa como un triplete (R,G,B) en donde cada componente varía desde cero (ausencia total) hasta un máximo dado, si los tres componentes son cero (0,0,0) se obtiene el negro, por otro lado si todos poseen el valor máximo se genera el blanco. En el caso de sistemas digitales el máximo número viene expresado por la resolución digital, en el caso de un sistema de resolución de 8 bits (esto es  $2^8$ ) el máximo es 255, en el caso de una resolución de 16 bits ( $2^{16}$ ) será 65.535. En el caso que se quiera representar el color rojo puro con 8 bits se escribiría (255,0,0) es decir intensidad máxima para el componente R (rojo) intensidad cero para el componente G (verde) y cero para el B (azul). Para la representación de 16 bits será (65.535,0,0). Para representar cualquier tono de amarillo se deberá incrementar el componente verde. Mientras más elevada sea la resolución mayor será la capacidad de reproducir mayor gama de colores. <sup>[5]</sup>

## **2.7. Aplicaciones de la espectroscopia de fluorescencia**

Los métodos de fluorescencia son de uno a tres ordenes de magnitud más sensibles que los métodos basados en la absorción, debido a que la sensibilidad se puede mejorar, ya que la señal de fluorescencia (F) se puede medir independientemente de la intensidad del haz incidente  $P_0$ , pudiendo incrementar F al incrementar  $P_0$ , lo que no es posible en el caso de la absorción por la medida relativa de la absorbancia con  $P_0$ . sea aumentando la energía del haz de excitación o por amplificación de la señal del detector. Debido a su gran sensibilidad tiene un número grande de aplicaciones, tales como:

### **2.7.1. Determinación fluorimétrica de especies inorgánicas**

Los métodos fluorimétricos sobre especies inorgánicas pueden ser de dos tipos. Los métodos directos que implican la formación de un quelato fluorescente y un segundo grupo que se basa en la disminución de la fluorescencia que resulta de la acción atenuadora de la sustancia que va a ser determinada. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la determinación de aniones.

Los reactivos fluorimétricos que son más utilizados para el análisis de cationes son los que presentan estructuras aromáticas con dos o mas grupos funcionales dadores que permitan la formación de quelatos con el ión metálico.<sup>[3]</sup>

### **2.7.2. Aplicaciones en la bioquímica clínica**

La espectrometría de fluorescencia molecular es una técnica que permite medir la concentración de un número elevadísimo de sustancias orgánicas, tanto de formas directas, si son fluorescentes, como de forma indirecta, acoplado una sustancia no fluorescente a un reactivo fluorescente. Los procedimientos fluorimétricos tienen interés gracias a su elevada sensibilidad y bajo límite de detección. Pueden medirse sustancias que están presentes en concentraciones muy bajas en los distintos fluidos biológicos tales como vitaminas, hormonas, fármacos, enzimas, productos naturales, etc. La lista de compuestos que pueden analizarse a partir de la fluorescencia es extensa, se pueden mencionar: adenina, ácido antranílico, cisteína, hidrocarburos aromáticos policíclicos, indol, naftol, proteínas, ácido salicílico, escatol, triptófano, ácido úrico, adrenalina, alquilmorfina, LSD, penicilina, fenobarbital, procaína, reserpina, clorofila, alcaloides, flavonoides, esteroides, ácido ascórbico, ácido fólico, nicotinamida, piridoxal, corticoesteroides, estrógenos, progesterona, andrógenos, ácidos biliares,

colesterol, triglicéridos, creatinina, deshidrogenasas, transaminasas, fosfatasas, peroxidasas, ATP, luciferina, luciferasa, vitaminas: A, B1, B2, B6, C y la E, etc.

La utilización de marcadores fluorescentes en inmunoanálisis ha sido una alternativa importante a los marcadores radioactivos, y es este el campo en el que la espectrometría de fluorescencia molecular tiene actualmente mayor interés en la bioquímica clínica.<sup>[6]</sup>

## **2.8. Imágenes digitales y espectroscopía**

El uso de imágenes digitales en la espectroscopia abrió un campo enorme de aplicaciones, así como de las posibilidades de tratamiento de las mismas mediante computadoras, conllevan a un ahorro sustancial de tiempo comparado con sistemas espectroscópicos convencionales. En particular la capacidad de tomar información simultánea de un gran grupo de muestras que posteriormente podrán ser tratadas matemáticamente para extraer información como absorción, fluorescencia, entre otras propiedades. Sumado esto al hecho del desarrollo acelerado de cámaras con mayor resolución y de menor costo, cada día ha generado que sea más común encontrar desarrollos instrumentales de técnicas espectroscópicas con detección de imágenes, para la realización de análisis clínicos de laboratorio. En consecuencia, diferentes autores han reportado aplicaciones de cámaras web en el análisis de distintos tipos de muestras biológicas, alimentos, etc. Todos los autores coinciden en la potencialidad del desarrollo de equipos muy económicos, ensamblados con componentes comúnmente empleados en computadoras. Abriendo esto la posibilidad de una nueva generación de equipos portátiles.<sup>[7] [8] [9] [10]</sup>

### 3. DESARROLLOS RECIENTES DE INSTRUMENTOS ESPECTROSCÓPICOS CON DETECCIÓN DE IMÁGENES.

N. Maleki y colaboradores <sup>[11]</sup> (2004) reportan el desarrollo de un sistema para el análisis simultáneo de Al(III) y Fe(III) en aleaciones empleando complejos organometálicos coloreados, y como sistema de detección una cámara CCD. La imagen simultánea de cincuenta (50) celdas o cubetas cuadradas (cada una conteniendo muestras de distinta concentración) iluminadas desde atrás con luz blanca es tomada con una cámara Cannon EOS. Los datos analíticos suministrados por la cámara son datos estándares de código RGB con una resolución de 8 bits. Estos fueron tratados matemáticamente para calcular las respectivas absorbancia de cada muestra individualmente. Las absorbancias son calculadas con cada uno de los componentes del r,g,b es decir a tres rangos de longitudes de ondas. Dependiendo del espectro de absorción del compuesto uno de estos tres canales RGB, generará la mayor sensibilidad e intervalo dinámico lineal.

Castillo y colaboradores <sup>[12]</sup> (2007) reportan el desarrollo y evaluación de un lector absorbancia de placas de multi-pozos para aplicaciones al análisis clínico, empleando LEDS como fuentes de excitación y una web-cam como detector. Se emplea como contenedor de muestras una placa de 96 pozos comúnmente empleada en ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, conocidas como placas ELISA. Estas placas poseen 96 pozos, o contenedores de muestras, y están fabricadas en poliestireno de gran transparencia. Un arreglo de LEDs de luz blanca, iluminan de forma homogénea la placa ELISA y su imagen superior se toma con una cámara de computadora (Web-cam) de 640x480 pixels. Los datos de la imagen son adquiridos por una computadora y procesados empleando un software desarrollado en MatLab para el cálculo de la absorbancia. El software desarrollado es capaz de seleccionar la zona de la imagen correspondiente a la zona central de cada pozo, conteniendo cada uno una

muestra, promediando los componentes R,G,B de cada pixel y obteniendo así un valor promedio de la solución. La absorbancia es entonces calculada comparando los valores (r,g,b) de cada pozo conteniendo sólo el blanco y los valores (R,G,B) de la placa que contiene las muestras.

Las curvas de calibración se realizaron empleando cada uno de los tres canales de cada pixel (R,G,B) para determinar la máxima sensibilidad e intervalo dinámico lineal, esto para evaluar con cual de los tres componentes (R,G,B) se debe realizar el análisis para obtener la mayor sensibilidad y selectividad. Se entiende entonces que este filtro se emplea en lugar de un monocromador para seleccionar la longitud de onda de análisis. El sistema fue evaluado en la determinación de hierro empleando el complejo Fe(III)-Tiocianato, el cual se aplica como base de métodos clásicos del análisis clínico. Estos autores reportan <sup>[12]</sup> excelente exactitud y límites de detección adecuados para su aplicación en el análisis de Fe en varios tipos de muestras biológicas.

Más recientemente (2009), Fernández y colaboradores <sup>[13]</sup>, realiza una evaluación analítica del sistema colorimétrico anterior y estudia su aplicación en el análisis de glucosa y proteínas en plasma de ratas. Se reporta que no hay diferencias estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos con el equipo propuesto y aquellos obtenidos empleando un espectrómetro convencional, con las características técnicas requeridas en los protocolos de análisis estándar. Los autores reportan que el sistema propuesto presenta las siguientes ventajas: el tiempo de análisis en dicho sistema es mucho menor en comparación al que se requiere en un espectrómetro convencional, El sistema colorimétrico permite utilizar placas ELISA con pozos de mayor capacidad, que facilitan la reacción colorimétrico directamente en la placa y es de menor costo.



#### **4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO**

De la revisión bibliográfica anterior se desprende que el desarrollo de instrumentos espectroscópicos de espectroscopía molecular no convencionales, con componentes opto- electrónicos tales como los LEDs y aquellos provenientes de computadoras (cámara web, etc.) constituyen una alternativa para la eficaz realización de inmunoensayos de ELISA y análisis cuantitativo. Estos instrumentos suelen ser de bajo costo, permiten disminuir el tiempo de análisis con respecto a los equipos tradicionales y han sido validado el uso de estos equipos en la cuantificación de especies biológicas en plasmas sanguíneo, tales como la glucosa, obteniendo excelentes resultados en cuanto a exactitud, precisión y robustez del análisis. Una limitación encontrada en el desarrollo de estos equipos es cuando se emplean CCD de bajo costo, su baja sensibilidad, alcanzado límites de detección del orden de las partes por millón para algunos analitos, que en algunos casos no llenan las expectativas y exigencias La utilización de la fluorescencia como técnica analítica de medición en dichos equipos, resulta una propuesta muy atractiva para las determinaciones de especies que requieren mayor sensibilidad. En este trabajo se plantea la implementación de la fluorescencia en un dispositivo diseñado para leer placas de ELISA, proponiendo en una primera fase del trabajo las modificaciones instrumentales necesarias para optimizar el equipo y en una segunda fase la evaluación analítica empleando soluciones fluorescentes patrones.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo General.**

Construir un equipo para la medición simultánea de fluorescencia molecular, empleando fuentes de luz no convencionales (LEDs, lámparas fluorescentes) como fuentes de excitación y cámara CCD, como sistema de detección.

### **5.2. Objetivos Específicos.**

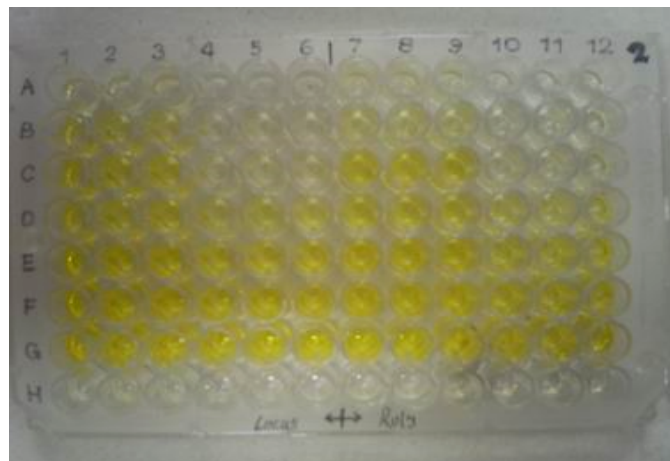
- ✓ Seleccionar los componentes opto-electrónicos adecuados para la construcción de un equipo para fluorescencia molecular.
- ✓ Optimizar y poner a punto del sistema de medición.
- ✓ Evaluar el software de adquisición de imágenes y el cálculo de la señal analítica.
- ✓ Evaluar las figuras de mérito analíticas del analizador de fluorescencia.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. Materiales y equipos

#### 6.1.1. Placas para inmuno-ensayos de ELISA

Se emplearon como porta-muestras las placas para inmuno-ensayos denominadas comúnmente placas de ELISA. Están fabricadas de un material de poliestireno de gran calidad, en la figura 6, se muestra una imagen de estas placas.



**Figura 6.** Celdas para inmuno-ensayos de ELISA. <sup>[4]</sup>

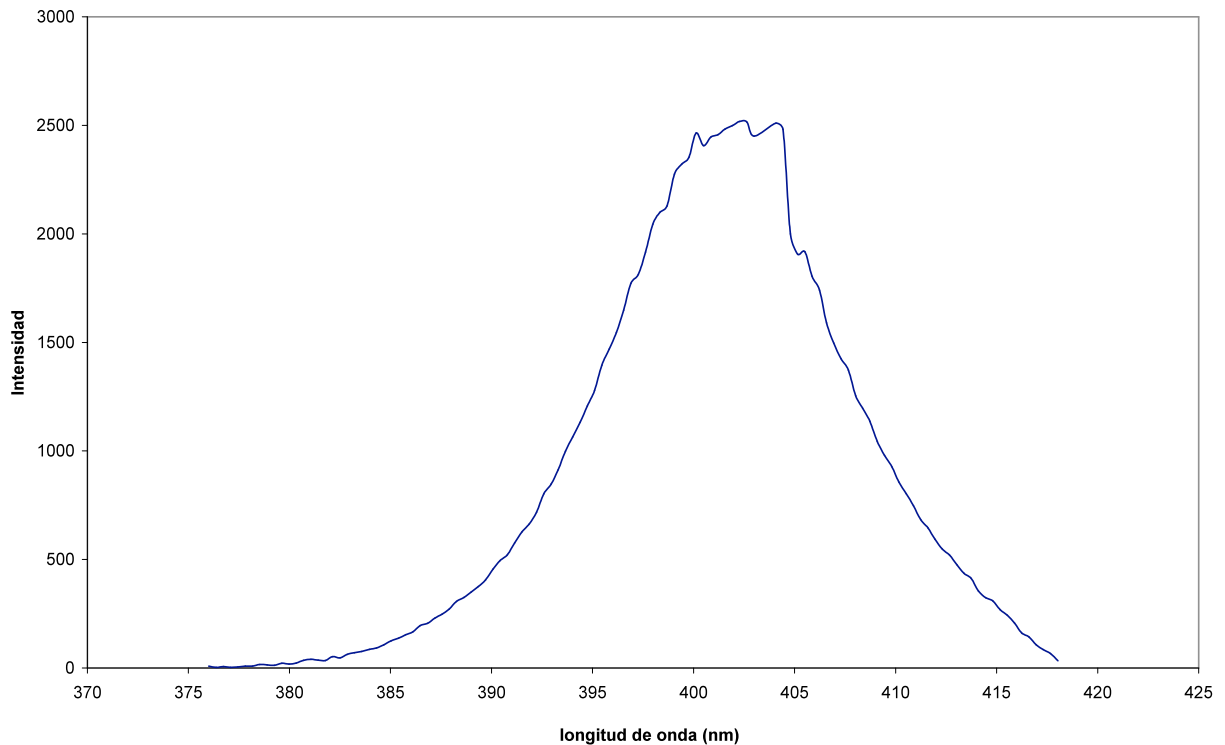
#### Características de la placa de ELISA

- El espesor uniforme de la placa proporciona la máxima claridad óptica y la mínima interferencia ambiental.

- Todos los pozos están numerados y marcados con letras para facilitar su referencia y evitar errores.
- Los bordes de los pozos son elevados lo que reduce el riesgo de contaminación entre muestras adyacentes.
- Están disponibles en modelos con tapa de baja evaporación o cinta sellante.
- Compatible con todos los lavadores, dispensadores y lectores estándar de microplacas.
- Disponible en poliestireno opacas de color blanco para ensayos quimioluminiscentes, y de color negras para ensayos fluorescentes.

### **6.1.2. Diodos Emisores de Luz (LED)**

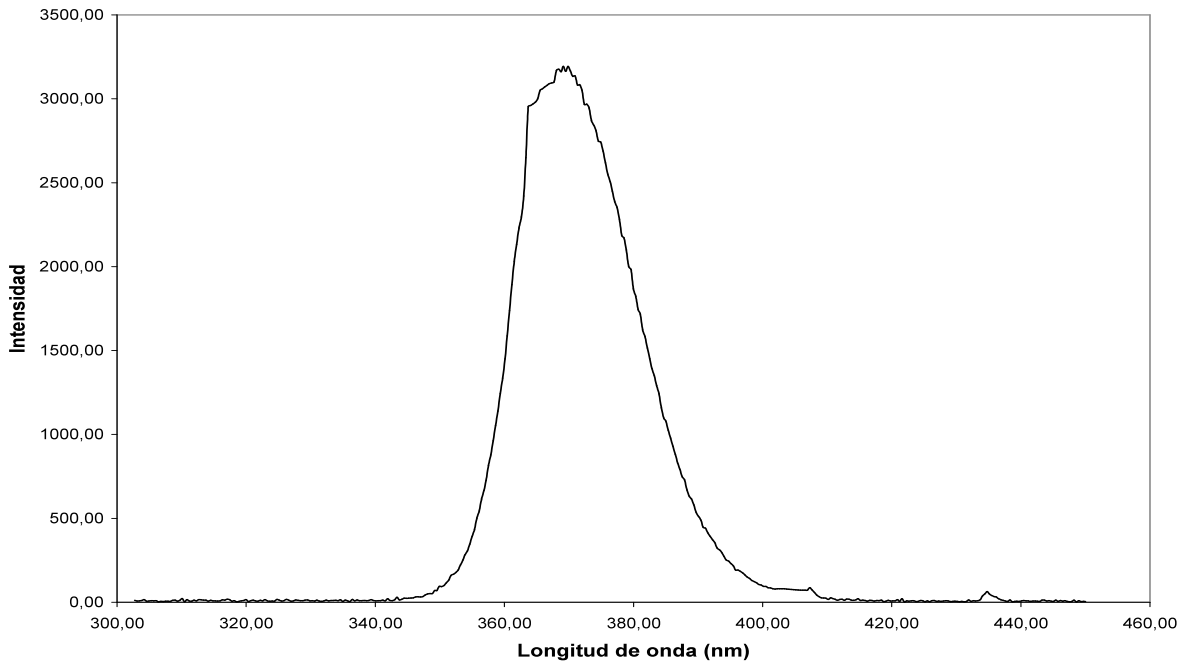
Como fuente excitación se utilizó un conjunto de 5 LEDs en un arreglo lineal. En la figura 7, se presenta el espectro de emisión de esta fuente. Se puede observar que la máxima intensidad se observa a una longitud de onda cercana a los 400 nm, que corresponde al color azul.



**Figura 7.** Espectro de emisión del arreglo de diodos emisores de luz empleado como fuente de excitación.

### 6.1.3. Lámpara fluorescente

Como opción de otra fuente de excitación se utilizó una lámpara fluorescente comercial de un diámetro de 1 cm y una longitud de 14 cm, empleadas comúnmente para el análisis papel moneda (luz negra). En la figura 8, se presenta el espectro de emisión de esta fuente, se observa que la banda de emisión se encuentra comprendida entre 340 y 400 nm presentando un máximo de intensidad alrededor de los 375 nm.

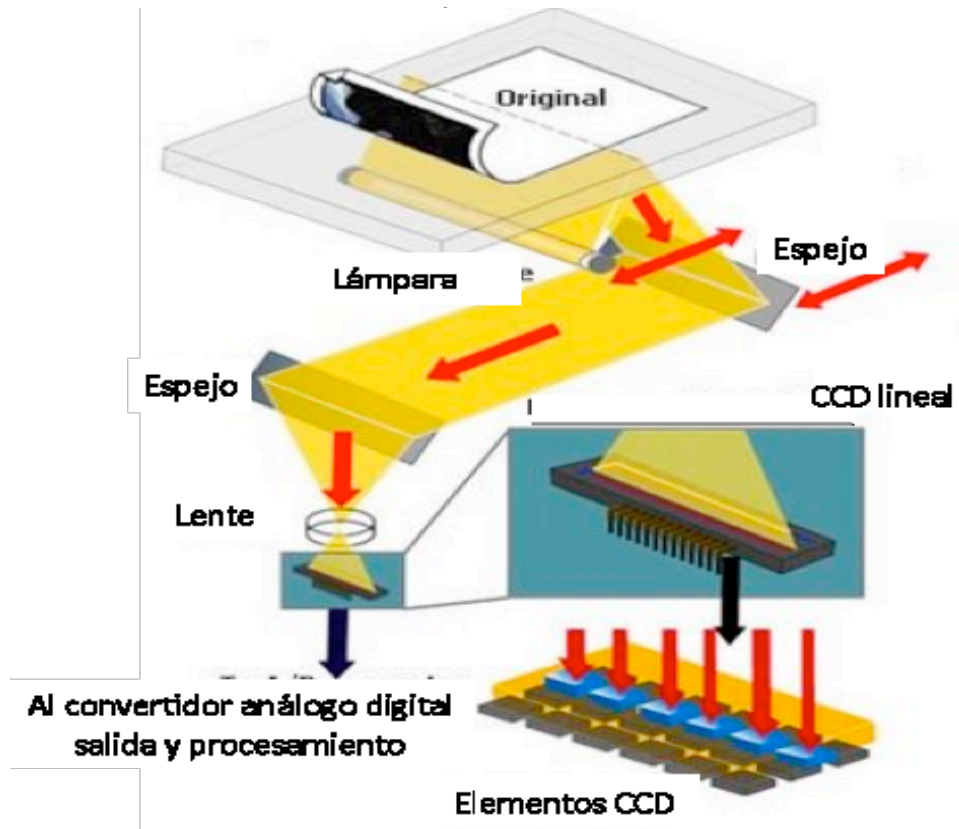


**Figura 8.** Espectro de emisión de la lámpara fluorescente empleada como fuente de excitación.

#### 6.1.4. Digitalizador de Documentos

Un Digitalizado de imágenes (conocido también como scanner) posee en principio los siguientes componentes: 1) un plano constituido por un vidrio transparente en donde se coloca el material a digitalizar, 2) una fuente de luz intensa que ilumina el plano 3) una serie de lentes espejos y prisma y filtros que descomponen la luz en tres componentes: rojo, verde y azul (R,G,B), 4) un arreglo de detectores tipo que son los encargados en traducir la luz reflejada en una señal eléctrica y 4) convertidores analógicos digital para convertir la señal eléctrica en señales digitales que puedan ser procesadas por un computador para de reconstruir la imagen del documento.

La figura 9, Muestra la disposición de los componentes del digitalizador de imágenes (scanner) y una descripción de su funcionamiento.



**Figura 9.** Funcionamiento y componentes de un digitalizador de imágenes o scanner.  
[15]

La digitalización de un objeto se realiza con el barrido del documento por la fuente luminosa. Las zonas claras reflejan más luz que las partes oscuras. La luz reflejada se envía por un juego de espejos y a través de un objetivo hasta tres sensores CCD los cuales la convierte en señal eléctrica. Los tres sensores CCD están recubiertos con filtros que permiten el paso de bandas de radiación correspondientes a los colores rojo, verde y azul. Los elementos CCD están colocados en una sola fila de forma que a

cada elemento le corresponde un pixel de cada una de las filas de puntos que forman la imagen. Los detectores convierten las intensidades de luz recibidas en señales eléctricas, las cuales a su vez son convertidas en información digital, gracias a un conversor analógico-digital.

Si se analiza con cuidado un digitalizador de documentos posee los componentes típicos y configuración de un equipo para realizar espectroscopía de fluorescencia, ya que posee: una fuente de luz que ilumina la superficie del vidrio y recolectar a un ángulo determinado la luz reflejada, que en el caso de ser una solución transparente fluorescente el detector sería iluminado con la radiación emitida por la solución. Se puede emplear entonces un scanner en nuestro caso, colocando una placa ELISA de fondo transparente, llenando cada pozo con la solución a analizar (en este caso fluoresceína) y proceder a escanear la placa. Durante el barrido con la lámpara la luz genera la excitación del soluto fluorescente al ser iluminado durante su paso por el fondo del pozo. La radiación emitida es recolectada por los espejos para luego ser detectada y digitalizada.<sup>[15]</sup>

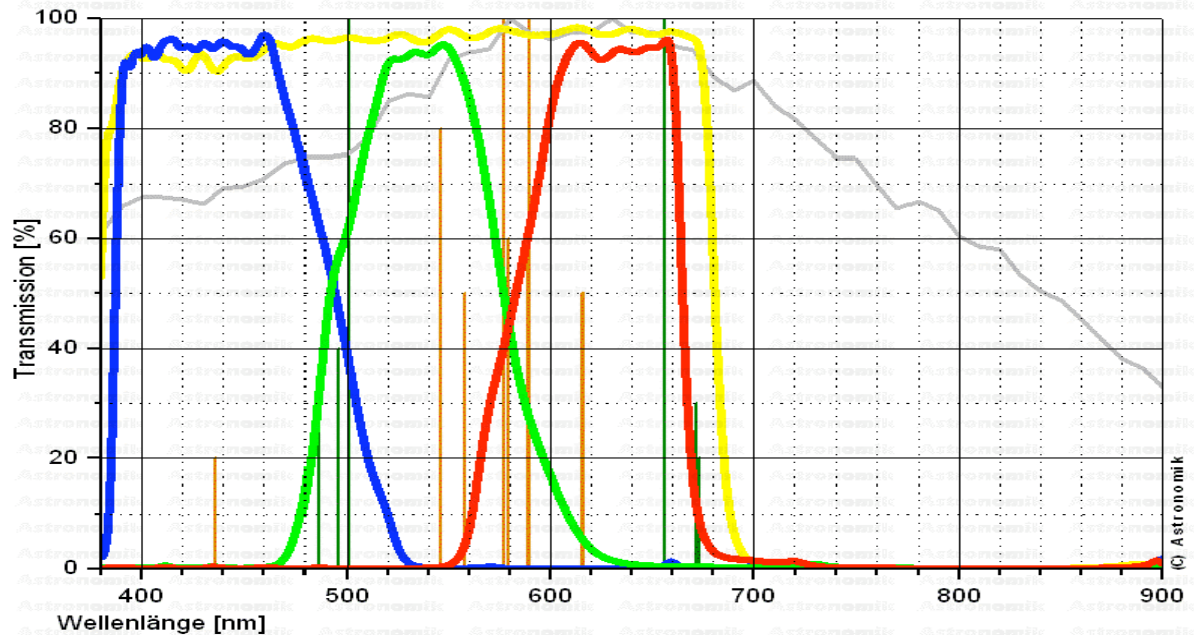
Se empleó un digitalizador de documentos comercial de marca BenQ, modelo S2W 4300V, la lámpara original que empleaba el scanner para su funcionamiento fue cambiada por un arreglo lineal de LEDs de forma de lograr una mayor excitación del analito. Este arreglo de diodos iluminará la placa durante su barrido.



#### 6.1.4. Cámara fotográfica

Se empleó como sistema de detección una cámara fotográfica digital marca Olympus modelo D-55, con una resolución de 3.0 megapíxel, Zoom de 2,8x, lente de 36-100 mm y aperturas de f/2,9 a f/4,4. Esta cámara en la opción macro puede enfocar objetos situados de 20 a 80 cm.

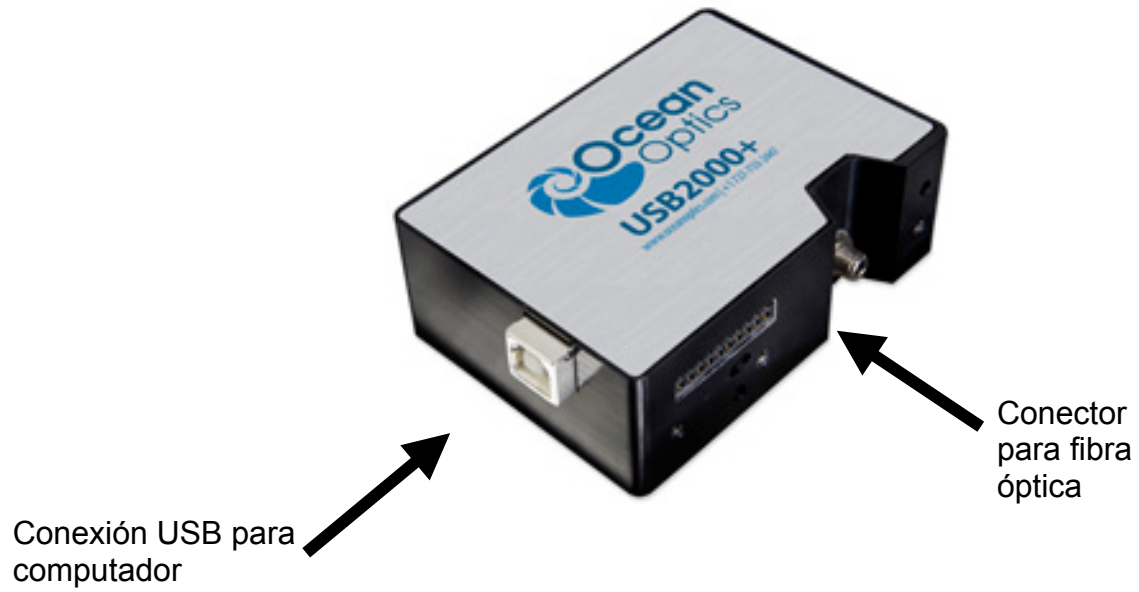
En general la curva de sensibilidad de los elementos detectores de una CCD se muestra en la figura 10. En esta grafica se muestra la variación del % de transmisión en función de la longitud de onda (nm), para las curvas de sensibilidad de los tres componentes: rojo, verde y azul que cubren el intervalo de longitudes de ondas desde 380 a 690 nm. Al seleccionar el componente azul, estaríamos registrando la intensidad correspondiente a la luz debida a los fotones en la zona de 380 a 540 nm, en el caso de seleccionar el verde estararíamos registrando en zona de 460 a 600 nm y en el caso del rojo corresponderían fotones de 540 a 690 nm.



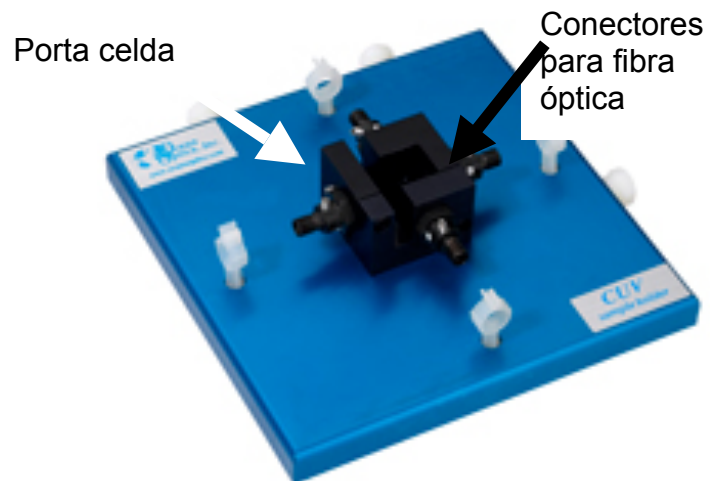
**Figura 10.** Espectro de transmisión típico de una Cámara CCD (referencia). Mostrándose los espectros para los tres elementos (R,G,B), la envolvente obtenida al sumar los tres (línea amarilla) y como referencia el espectro de emisión de una lámpara de tungsteno (línea gris).<sup>[16]</sup>

### 6.1.5. Espectrómetro

Espectrómetro de fibra óptica Ocean Optics modelo USB2000, equipo provisto de un detector lineal CCD de 2048 pixeles y de 42 mm de distancia focal, red de difracción de 600 líneas/mm y con una resolución del conjunto de 0,04 nm. Porta celda provista de cuatro conexiones tipo SMA para fibras óptica y contenedor para celdas de 1 cm de paso. En las figuras 11 y 12 se presentan imágenes de estos equipos empleados.



**Figura 11.** Espectrómetro Ocean Optics USB2000. <sup>[17]</sup>



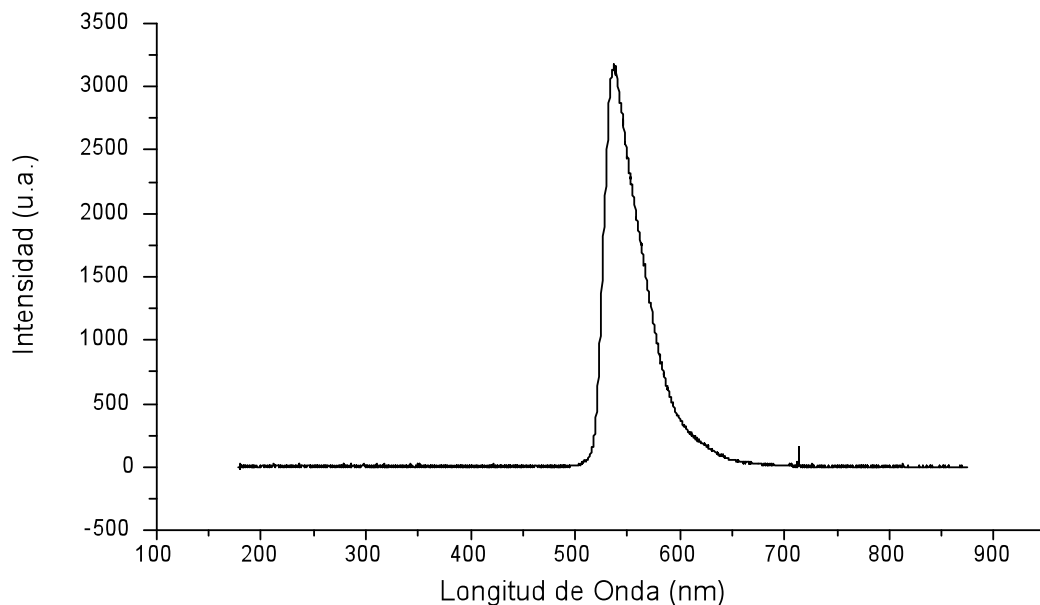
**Figura 12.** Porta muestra empleado Ocean Optics modelo CUV-ALL para celdas de 1 cm de paso. <sup>[17]</sup>

## 6.2. Reactivos

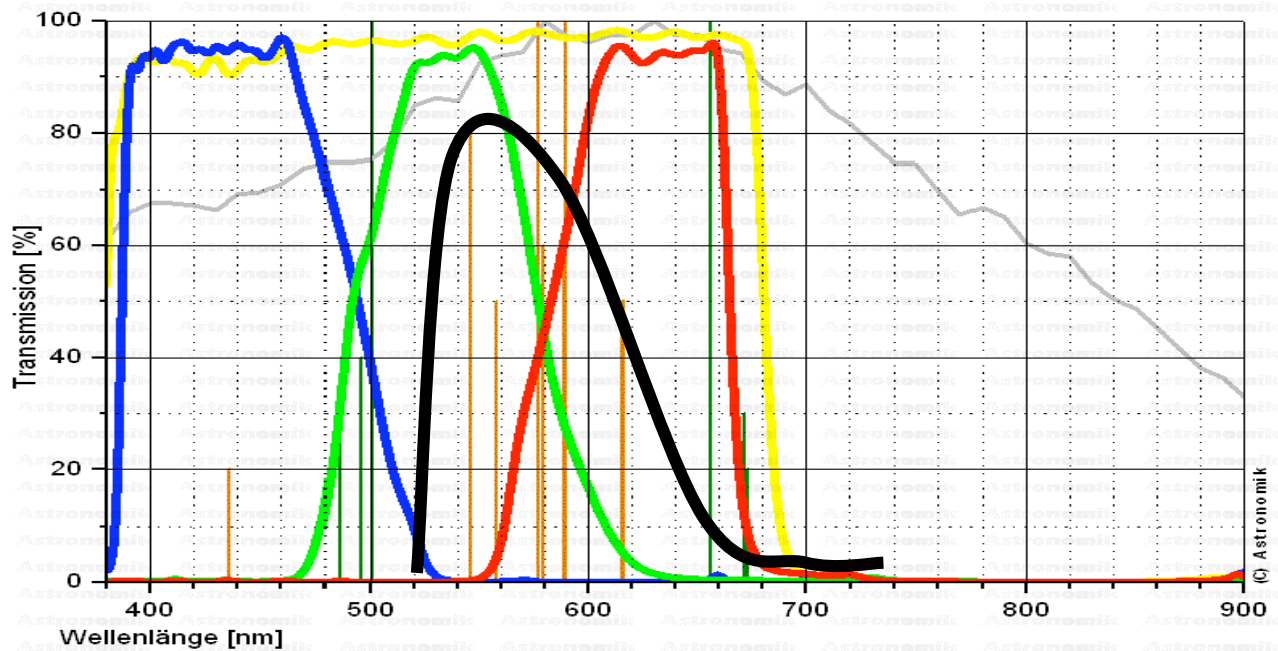
Para la evaluación instrumental se utilizó como analito la Fluoresceína, ( $C_{20}H_{12}O_5$ , PM 332,31 g-mol, Sigma, formula molecular 95% de pureza), la cual fue preparada en una mezcla de 9:1 en etanol-agua.

## 7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la figura 13, se presenta el espectro de emisión de fluorescencia obtenido para una solución de 25 mg/L de fluoresceína en una mezcla etanol-agua, empleando un espectrofotómetro comercial. Se observa que el máximo de emisión se presenta a 550 nm, la banda posee un ancho en su base que abarca un intervalo de 510 a 650 nm. Una superposición del espectro de emisión de la fluoresceína al espectro típico RGB del detector (ver figura 14) permite determinar que la banda de emisión de fluorescencia se ubica en una zona entre el color verde y el rojo, con una mayor porción en la zona del rojo. Al emplear el componente R y G de la representación R,G,B de la imagen adquirida con una cámara CCD se aísla una fracción importante de la emisión de fluorescencia de la fluoresceína.



**Figura 13.** Espectro de fluorescencia de una solución de fluoresceína en una mezcla etanol-agua 25mg/L



**Figura 14.** Superposición (cualitativa) con el espectro de la fluoresceína (línea negra) espectro RGB.

### 7.1 Montaje experimental con digitalizador de imágenes.

En la figura 15, se presenta la imagen capturada por el digitalizador de imagen de una placa ELISA que contiene en todos los pozos 300 uL de una solución de fluoresceína de 100 mg/L. A simple vista se observa una baja intensidad de la luz emitida desde la superficie de la solución y una aparente heterogeneidad de la misma.

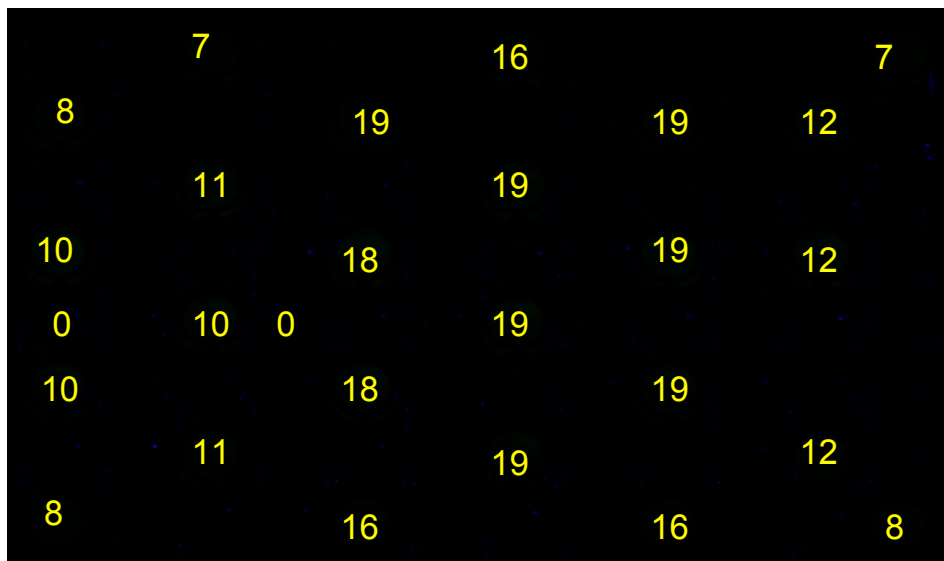
La imagen fue posteriormente procesada a fin de obtener los valores numéricos de la intensidad de emisión de cada pozo.



**Figura 15.** Imagen capturada por un digitalizador de imágenes de una celda ELISA, que contiene una solución de fluoresceína de 100 mg/L

Una vez realizado el análisis de las intensidades correspondientes para cada pozo, se pudo observar que éstas eran sustancialmente diferentes en algunas zonas de la placa a pesar de poseer la misma solución, lo cual hace pensar que la iluminación en toda la placa no es homogénea. Para realizar análisis con este sistema no se podría usar toda la placa, sino sólo la zona que se compruebe que presenta una iluminación homogénea. Por otra parte, se observa una gran radiación dispersa de las paredes internas de cada pozo que pueden interferir entre sí, pudiendo esto generar señales diferentes en pozos localizados al centro de la placa con respecto a los ubicados en los

bordes de la misma. Para tratar de disminuir este efecto se procedió a ubicar la solución de fluoresceína en pozos alternados rodeados de pozos llenos con agua, la figura 16, muestra la imagen de la placa preparada de la forma descrita y el número presentado en el centro de los pozos corresponden a la intensidad de la señal.



**Figura 16.** Imagen adquirida de placa con pozos con solución de fluoresceína alternados con pozos con agua (ver texto para explicación).

El análisis de las señales de intensidad en la zona central de cada pozo de fluorescencia demuestra que en la zona central de la placa se logran obtener señales similares, no así en los extremos en donde la señal es sensiblemente menor, aunque reproducible. Esto es atribuido a una iluminación más intensa en la zona central de la



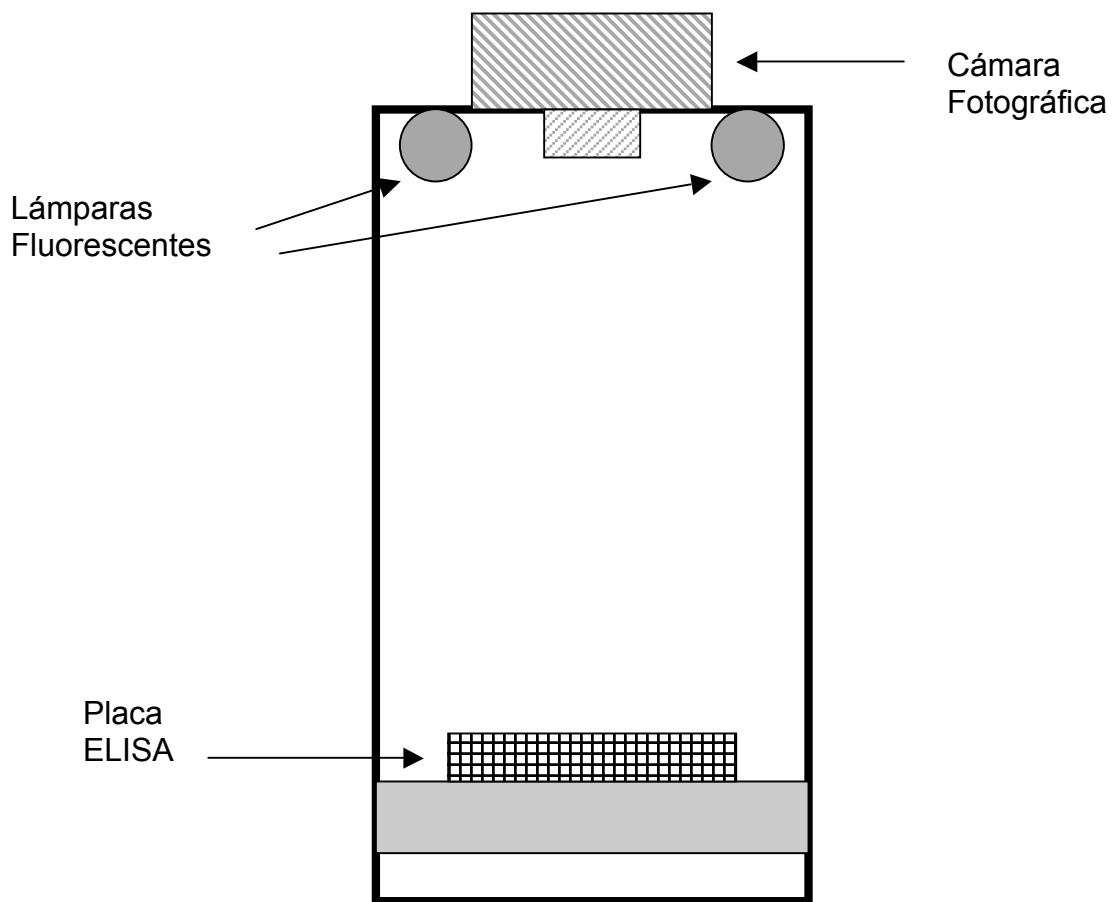
placa posiblemente producto de la configuración del arreglo de diodos que se emplea como fuente de excitación.

Empleando los pozos de la zona central de placa, se procedió a medir una serie de soluciones de diferentes concentraciones: 5, 15, 25, 50, 100 y 250 mg/L, con el fin de evaluar la posibilidad de construir una curva de calibración y la de determinar el nivel de sensibilidad a la variación de la concentración que posee el conjunto. Los resultados preliminares demostraron una muy baja sensibilidad, al obtener señales muy cercanas a cero para las soluciones menores a los 25 mg/L. Por otra parte, la variación de la señal con la concentración para las restantes soluciones posee un valor muy bajo para la pendiente. Se concluye entonces que esta configuración no posee sensibilidad suficiente para las aplicaciones planteadas, esto posiblemente atribuido a no disponer de una fuente de excitación adecuada y/o a baja sensibilidad de los detectores CCD del digitalizador de imágenes.

## **7.2. Montaje experimental desarrollado empleando lámparas fluorescentes como fuente de excitación y cámara fotográfica como detector.**

La figura 17, muestra un diagrama esquemático del montaje instrumental diseñado y construido para el análisis de soluciones con fluorescencia. El diseño se realizó empleando la configuración de detección de la fluorescencia por reflexión de la superficie de la solución en donde el detector y la fuente se colocan en un mismo plano y la muestra justo en frente de ambos. Se emplea como fuente de excitación un par de lámparas fluorescentes que se colocan en el extremo superior de un cajón de madera de 38 cm de alto por 25 cm de ancho. Al centro de las lámparas existe un orificio circular que contiene el objetivo de la cámara fotográfica. En la parte inferior y descansando en una superficie plana se coloca la placa a leer que contiene las soluciones a estudiar, esto se diseñó y construyó como una gaveta de forma de permitir

de forma fácil el cambio de placas en estudio. Todo el cajón fue forrado en laminado color negro mate a fin de disminuir interferencias por reflexión interna. En las figuras 18,19, y 20, se presentan imágenes del equipo construido.



**Figura 17.** Diagrama esquemático del montaje experimental de equipo desarrollado para lectura de la fluorescencia en placas ELISA.



**Figura 18.** Detalle de la parte superior del equipo construido, se observan las lámparas de excitación y el orificio central que contiene el objetivo de la cámara fotográfica.



**Figura 19.** Detalle del equipo construido, se muestra la gaveta que contendrá la placa a analizar.



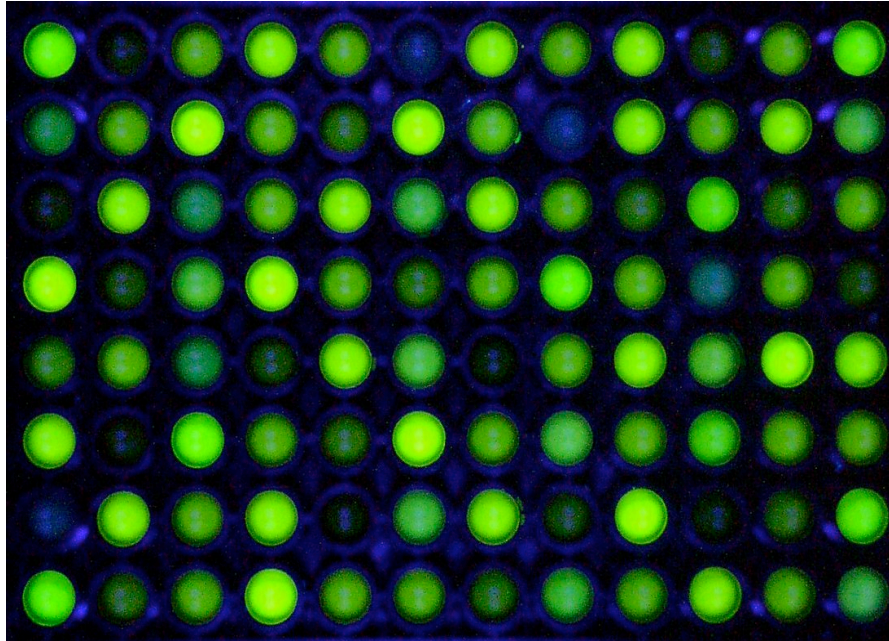


**Figura 20.** Imagen de toma frontal del equipo construido.

Para realizar medidas de fluorescencia en este equipo, se procede a llenar con las soluciones de interés los distintos pozos de una placa ELISA, esta operación se hace con una micro-pipeta automática. Luego la placa es colocada cuidadosamente al centro de la superficie interior de la gaveta y se cierra para proceder a excitarla con la luz de las lámparas y registrar la imagen con la cámara. La cámara se coloca en el orificio superior colocando en foco y exposición automática que permite tomar una buena imagen del plano horizontal que contiene la placa. Las lámparas son encendidas y se procede a adquirir la imagen empleando el disparador manual. La imagen es almacenada en la memoria de la cámara y luego transferirlas a una computadora personal para su procesamiento.

### **7.3 Evaluación Instrumental**

En la figura 21, se presenta una imagen captada por la cámara de una placa ELISA en la cual se han colocado soluciones de fluoresceína de diferentes concentraciones (5 a 250 mg/L). Se observa claramente la diferencia en intensidad de la emisión de fluorescencia de las distintas soluciones, lo que indica de forma preliminar que esta configuración posee una mayor sensibilidad que los experimentos realizados con el montaje empleando el digitalizador de imágenes. Detallando la imagen, específicamente la zona correspondiente a un pozo, se observa la reflexión de luz de las paredes de los pozos, pudiéndose detallar incluso el espesor de las mismas, también se puede detallar la reflexión de la superficie de la placa.



**Figura 21.** Imagen obtenida con el equipo ensamblado de una placa ELISA conteniendo soluciones de fluoresceína de diferentes concentraciones.

#### 7.4 Procesamiento de la Imagen

La imagen adquirida y procesada por la cámara fotográfica se transfiere a una computadora personal en forma de un gráfico jpg. Estos archivos son procesados mediante un programa desarrollado en Matlab®, en esencia son matrices cuyos elementos poseen la intensidad de la luz en cada pixel o elemento detector en sus tres componentes: (R,G,B). Cada componente esta constituido por número comprendido entre 0 a 255. Al seleccionar sólo el componente correspondiente a rojo, se está aislando la zona del espectro que corresponde a la zona de mayor intensidad de la

emisión de fluorescencia del analito, generada en la configuración instrumental propuesta. Se procede entonces ubicar en pantalla un rectángulo que contenga todos los 96 pozos, de forma que los vértices de dicho rectángulo se localicen muy cercanos de los cuatro pozos ubicados en las esquinas de la placa. La figura 21, corresponde al rectángulo de una imagen típica tomada por la cámara a la cual se le realiza el procedimiento antes descrito. De forma automática, considerando la distribución regular y equidistante de los pozos adyacentes, el software procede a subdividir la imagen en doce columnas y 8 filas que generaran 96 rectángulos constituidos por un número determinado de pixeles que a su vez contendrán la información correspondiente a la señal generada por los pozos. Posteriormente, en cada uno de esos pequeños rectángulos se ubican al centro, pequeños círculos buscando la zona específica de la emisión de la solución contenida en cada pozo.

La información de intensidad de cada pixel en el área del círculo definido es entonces recolectada y procesada. La señal de emisión es definida como la mediana de las señales del conjunto de pixeles contenidos en dicho círculo. Se define de esta forma, ya que la mediana es una medida de tendencia central de un conjunto de medidas que es menos sensible a la presencia de valores extremos, a diferencia del promedio o media. Estos valores extremos pueden presentarse si, en el círculo definido se incluyen las paredes del pozo en donde la señal es cercana a cero, que en un pixel se presenta un valor anormalmente alto por efectos ópticos. Variando el radio de dicho círculo se pueden limitar los problemas que se presentan al incluir zonas de poca o baja señal (por ejemplo paredes de los pozos o superficie de la placa).

Para seleccionar el diámetro del círculo se procedió a definir una variable denominada diámetro, que se fija por un número entero entre 1 y 11. Esta variable se emplea para dividir el número de pixeles totales contenidos en cada uno de los 96 rectángulos en los que se dividió la imagen de la placa. Esto es: mayor valor de la



variable diámetro menor será el tamaño del círculo que emplearemos para determinar la señal de emisión. En trabajos previos <sup>[12,13]</sup> similares se reporta el uso como señal la intensidad de la mediana del conjunto de píxeles que corresponden a la imagen de cada pozo. Para verificar esto procedimos a evaluar la señal de intensidad obtenida al sumar las intensidades individual de cada pixel para definir una señal total de fluorescencia y compararla a la obtenida definiendo la señal como la intensidad de la mediana. En términos de magnitud en el primer caso se obtienen un valor muy superior pero de muy baja repetibilidad cuando se comparan los valores de las réplicas (desviación estándar relativa >15 %), hecho este que compromete la reproducibilidad de método que se desea desarrollar. La señal de emisión es definida entonces como la intensidad que corresponde a la mediana del conjunto de pixel que se encuentran en el área del círculo definido como área de lectura, ésta será entonces un número entero comprendido entre 0 y 255. La forma de procesamiento de cada imagen es manual, este proceso puede ser automatizado de forma de realizarlo de forma más rápida y reproducible.

## **7.5 Evaluación de la homogeneidad en la iluminación**

Para evaluar la homogeneidad de la iluminación de la placa ELISA por las lámparas fluorescentes que se emplean como fuente de excitación y así determinar las variaciones que se puedan presentar de la magnitud en la señal de fluorescencia, se procedió a medir la intensidad de fluorescencia en todos los pozos de una placa en donde se llenó cada uno de ellos con el mismo volumen de una solución de una concentración determinada. Posteriormente, una vez adquirida y procesadas las

imágenes se obtienen las señales de fluorescencia de los 96 pozos. Con estas señales se procede a realizar un análisis de varianza, el cual va a permitir de manera cuantitativa determinar, si las variaciones en la señal de fluorescencia son producto de errores aleatorios o si en efecto son producto de diferencias en la intensidad del haz de excitación en la superficie del área de las muestras que genera variación en la señal de fluorescencia. Esto se realizó con soluciones de concentraciones de 250, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5 y 2 mg/L, a fin de evaluar si el efecto de la homogeneidad de la iluminación se hace mas evidente a medida que la señal de fluorescencia se hace menor (a consecuencia de la disminución de la concentración). En la tabla 1, se presentan las señales de fluorescencia obtenidas al medir 250  $\mu$ l una solución de 25 mg/L con un diámetro de observación de 5, éstas se presentan en una tabla ordenadas en filas (señaladas por letras de la A a la F) y columnas (señaladas con números del 1 al 12) tal como son adquiridas en la placa. Un análisis de varianza, comparando las señales entre los pozos de una columna y las señales entre los pozos que constituyen cada columna, permite evidenciar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos valores de señal de fluorescencia, obtenidos en los distintos pozos de la placa, los resultados del análisis de varianza se presentan en la tabla 2. Una prueba F evidencia que al 95% de confianza no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de señal de fluorescencia de cada pozo, tanto en columna como en fila, y que las variaciones observadas son atribuibles a errores aleatorios, considerándose entonces que se pueden utilizar todos los pozos de la placa para hacer medidas analíticas cuantitativas.

Queda por comprobar la posible existencia de pozos que generen señales sustancialmente diferentes, producto de heterogeneidad en la iluminación, que no se detecten al realizar el análisis de varianza en los pozos de una columna y entre columnas, como por ejemplo los pozos ubicados en las esquinas o una diagonal a la superficie de la placa. Para evaluar esto, se realizó el cálculo del promedio y desviación estándar de la señal de emisión en los 96 pozos (promedio: 47; desviación estándar: 2)

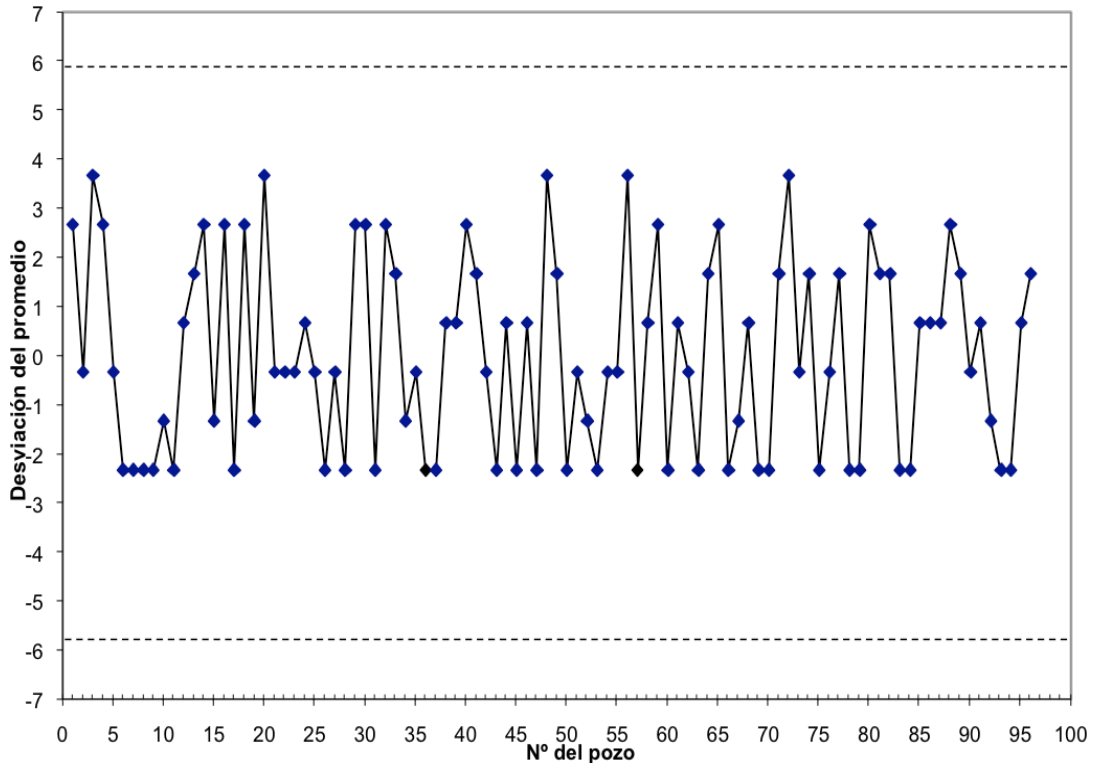
y se procede a calcular la desviación con respecto al promedio de la señal de cada pozo individualmente. Esta desviación con respecto a la media se representa en función del número del pozo (numerándoles de la esquina superior izquierda) la cual se muestra en la figura 20. Se puede observar que las diferencias entre las señales individuales con respecto al promedio en todos los pozos no superan tres veces la desviación estándar del promedio, lo que confirma que las diferencias se pueden atribuir a errores aleatorios con un 95% de confianza.

**Tabla 1.** Señal de fluorescencia para 250 µl de una solución de 25 mg/L adquirida con un factor de reducción del diámetro de 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	44	49	49	47	45	45	45	49	44	47	45	45
B	47	48	44	49	48	47	47	46	49	45	45	47
C	43	49	48	47	47	49	49	44	48	49	49	46
D	44	46	43	49	49	46	46	49	46	47	49	48
E	47	45	47	44	49	49	49	46	49	45	46	49
F	49	44	47	44	46	46	46	47	49	49	46	49
G	49	48	47	49	46	46	49	49	45	49	46	46
H	49	44	46	44	44	44	43	45	43	44	44	45

**Tabla 2.** Análisis de varianza de los datos de la tabla 1.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrada	F	P
Entre Columnas	4.36458	11	0.39678	0.09	1.0000
En la columna	385.875	84			4.59375
Total (corr.)	390.24	95			

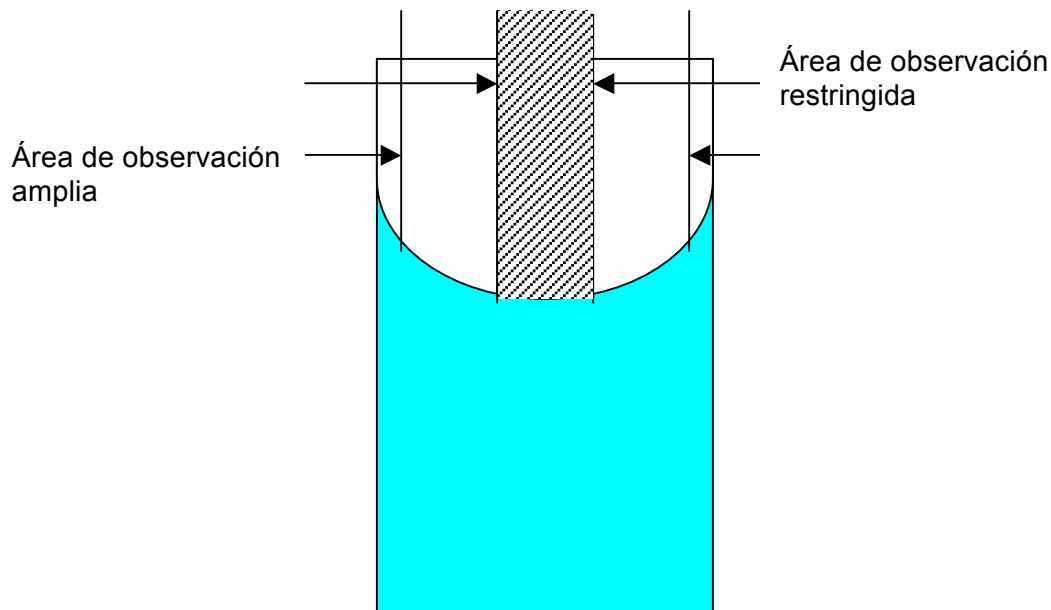


**Figura 22.** Desviación con respecto al promedio de las señales de fluorescencia de cada pozo de la placa. La numeración de los pozos se realiza de izquierda a derecha iniciando en la esquina superior izquierda de la imagen. La línea punteada indica el valor de tres (3) desviaciones estándar del promedio.

Resultados similares, en cuanto a la homogeneidad de las señales en toda la placa se obtuvieron para las diferentes concentraciones de la solución de fluoresceína medida. Esto permite concluir que la iluminación es homogénea en todos los pozos de la placa, generando señales de fluorescencia que difieren entre si en una magnitud que pueden atribuirse a errores aleatorios con un 95 % de confianza.

## 7.6 Efecto del tamaño del área de observación sobre la señal de fluorescencia

Tomando en consideración que por efecto de la atracción de las moléculas de agua por parte de la superficie del recipiente se genera un menisco cóncavo en la superficie de la solución, la señal que se recolecte por el detector ubicado perpendicularmente a la superficie de la muestra, se podrá ver afectada por este radio de curvatura en la zona observada. En la figura 23, se representa gráficamente este efecto, que ha sido reportado previamente <sup>[12]</sup> y que lleva a emplear con fines analíticos sólo la porción central de las imágenes adquiridas, que corresponde a la más plana. Una observación cuidadosa de la imagen de cualquier pozo de la placa (ver figura 21) revela un anillo de baja luminosidad que rodea cada pozo, posiblemente producto de la combinación del efecto del menisco y la interacción de la luz emitida con la paredes del recipiente. Es evidente entonces, que la máxima intensidad debe localizarse en un círculo ubicado al centro de cada pozo. En el sistema diseñado y ensamblado en este trabajo, se hace necesario la evaluación del radio del área de observación, para ello se procede a procesar una imagen adquirida de una placa que contenía una misma solución de fluoresceína en todos sus pozos y se procede a evaluar la señal con varios radios para así determinar la magnitud de este efecto sobre el mismo en la magnitud de la señal.



**Figura 23.** Efecto del menisco del agua en la zona de observación.

En las tablas 3, 4, 5, y 6, se presentan los valores de señal de fluorescencia para 250  $\mu\text{l}$  de una solución de 25 mg/L, procesada variando el diámetro del área de observación de la señal, las magnitudes de la variable el factor de reducción del diámetro empleadas fueron de 5, 7, 9 y 11. Considerando los resultados previos que demostraron la homogeneidad de la iluminación de toda la superficie de la placa, se procedió a promediar los valores de señal de la primera columna de cada conjunto de señal para cada radio y realizar un análisis de varianza para evaluar estadísticamente la variabilidad de la señal en función del diámetro. En la tabla 6, se presentan los resultados del análisis de varianza realizado, el cual evidencia que las diferencias observadas para las señales de fluorescencia a distintos factores de reducción del diámetro no pueden ser atribuidas a los errores aleatorios, lo cual permite concluir que

el efecto de este factor es significativo obteniendo que a menor diámetro de observación la señal de intensidad de fluorescencia se incrementa considerablemente. En la figura 24, se presenta un diagrama de caja obtenido a partir del análisis estadístico, en donde se evidencia claramente el incremento de la señal de intensidad de fluorescencia y la magnitud de la dispersión de cada conjunto de medidas.

**Tabla 3.** Señal de fluorescencia para 250  $\mu$ l de una solución de 25 mg/L adquirida con un factor de reducción del diámetro de 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	44	49	49	47	45	45	45	49	44	47	45	45
B	47	48	44	49	48	47	47	46	49	45	45	47
C	43	49	48	47	47	49	49	44	48	49	49	46
D	44	46	43	49	49	46	46	49	46	47	49	48
E	47	45	47	44	49	49	49	46	49	45	46	49
F	49	44	47	44	46	46	46	47	49	49	46	49
G	49	48	47	49	46	46	49	49	45	49	46	46
H	49	44	46	44	44	44	43	45	43	44	44	45

**Tabla 4.** Señal de fluorescencia para 250  $\mu$ l de una solución de 25 mg/L adquirida con un factor de reducción del diámetro de 7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	49	49	45	45	45	48	47	49	49	49	49	49
B	47	43	49	44	49	49	45	45	49	47	49	49
C	48	47	49	49	49	48	49	49	47	49	49	49
D	42	48	49	49	49	46	48	49	48	47	43	49
E	47	47	46	49	43	49	49	49	45	47	47	43
F	49	49	49	49	49	47	46	49	49	46	47	44
G	49	49	49	49	49	49	49	49	49	48	48	47
H	49	49	47	49	49	47	49	44	47	49	49	49

**Tabla 5.** Señal de fluorescencia para 250µl de una solución de 25 mg/L adquirida con un factor de reducción del diámetro de 9

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	60	59	58	57	57	59	56	59	58	58	58	59
<b>B</b>	55	58	52	55	59	58	58	56	56	57	54	57
<b>C</b>	59	51	56	59	56	54	56	58	59	57	57	57
<b>D</b>	52	52	54	54	55	60	59	58	57	57	56	56
<b>E</b>	52	61	58	57	52	52	57	56	57	57	58	54
<b>F</b>	57	67	60	58	59	61	54	57	58	56	54	54
<b>G</b>	59	59	58	57	57	54	58	54	56	52	55	59
<b>H</b>	58	57	58	52	59	54	53	57	54	58	59	57

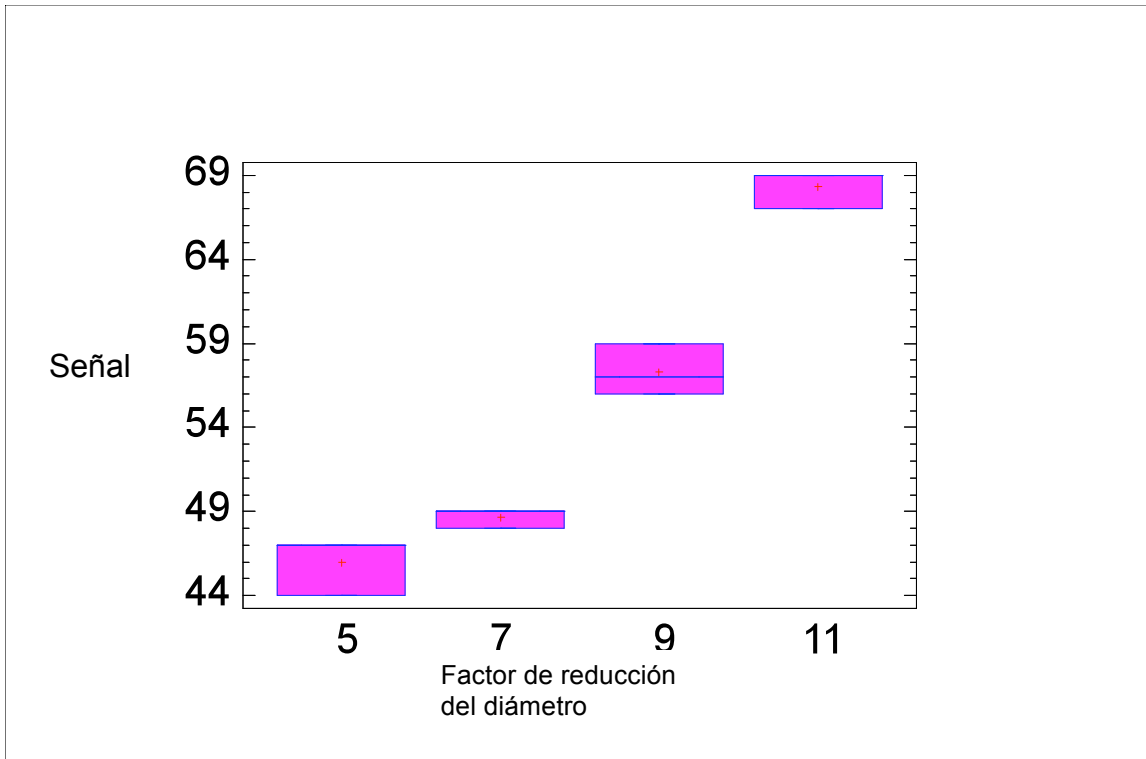
**Tabla 6.** Señal de fluorescencia para 250 µl de una solución de 25 mg/L adquirida con un factor de reducción del diámetro de 11

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	62	69	64	69	69	63	67	68	63	62	63	62
<b>B</b>	61	64	60	60	65	67	61	61	61	62	68	65
<b>C</b>	62	63	66	66	61	65	63	62	67	69	61	67
<b>D</b>	63	65	63	69	63	64	60	68	70	64	62	66
<b>E</b>	64	62	63	67	66	66	64	61	64	67	63	63
<b>F</b>	69	64	62	62	61	63	61	69	63	69	62	68
<b>G</b>	69	64	67	69	66	66	68	63	63	66	69	63
<b>H</b>	67	63	68	67	65	63	66	66	69	60	64	64

**Tabla 7.** Análisis de varianza de los datos promedio de señal de fluorescencia para factores de reducción del diámetro de 5, 7, 9 y 11

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrada	F	P
Entre Columnas	92.917	3	304.306	173.89	0.0000
En la columna	14.0	8	1.75		
Total (corr.)	926.917	11			





**Figura 24.** Diagrama de caja obtenido del análisis de varianza del efecto del factor de reducción del diámetro de observación en la magnitud de la señal de fluorescencia.

### 7.7 Estudio de la Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad instrumental desarrollado se procedió a adquirir las imágenes por triplicado de placas las cuales contienen todos sus pozos llenos de una misma solución de fluoresceína de 25 mg/l. Las imágenes se adquirieron en intervalos de tiempo de diez minutos. En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos de las tres réplicas realizadas. Para evaluar la reproducibilidad en todos los pozos se procedió a evaluar la diferencia con respecto al promedio de cada una de las señales y se procede a graficarla en función de su ubicación en la placa (de forma

similar a lo realizado en la sección correspondiente al estudio de homogeneidad). La figura 25, presenta los resultados obtenidos para las tres réplicas realizadas, puede observarse que la desviación con respecto al promedio en ningún caso supera tres (3) veces la desviación estándar calculada, esto nos permite concluir que la reproducibilidad entre réplicas es elevada y que las variaciones observadas se pueden atribuir a errores aleatorios. Similares resultados se obtienen en replicas realizadas en mayores lapsos (de hasta 2 horas) colocando la solución fresca en los pozos, para evitar la variación de concentración a consecuencia de la evaporación de uno de los solventes (etanol). Estos resultados permiten concluir que la reproducibilidad en el tiempo es del instrumental propuesto es aceptable.

**Tabla 8.** Datos del estudio de reproducibilidad en el tiempo. Medidas realizadas a 250  $\mu\text{L}$  de solución de Fluoresceína de 25 mg/L. Medidas realizadas por triplicado con intervalo de 10 minutos entre medidas.

#### Réplica 1.

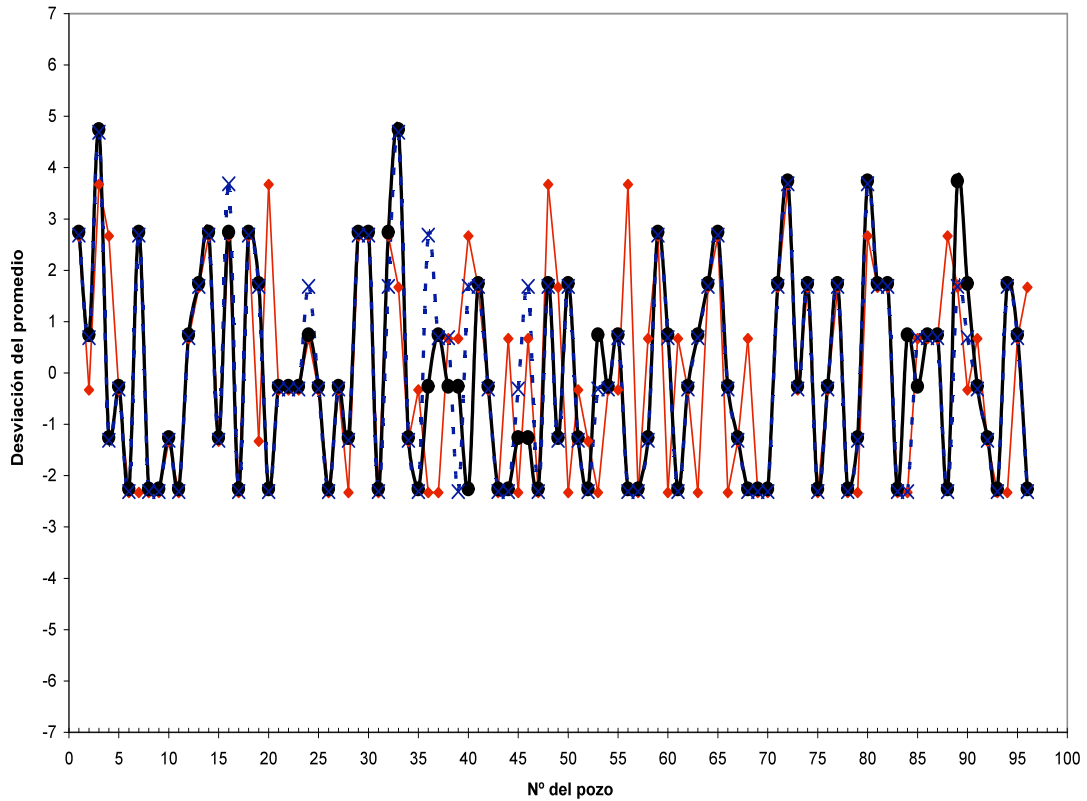
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	44	49	49	47	45	45	45	49	44	47	45	45
B	47	48	44	49	48	47	47	46	49	45	45	47
C	43	49	48	47	47	49	49	44	48	49	49	46
D	44	46	43	49	49	46	46	49	46	47	49	48
E	47	45	47	44	49	49	49	46	49	45	46	49
F	49	44	47	44	46	46	46	47	49	49	46	49
G	49	48	47	49	46	46	49	49	45	49	46	46
H	49	44	46	44	44	44	43	45	43	44	44	45

**Réplica 2.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	44	49	49	47	45	45	48	49	44	47	45	43
B	46	48	44	49	48	47	45	48	47	45	45	45
C	42	49	41	47	49	49	48	44	48	49	49	47
D	48	46	49	48	47	49	49	46	49	47	46	48
E	47	45	47	44	46	48	43	49	49	45	47	49
F	49	44	47	44	47	43	47	47	49	49	46	45
G	44	48	47	49	47	49	46	46	45	48	46	46
H	49	44	46	44	49	45	49	45	43	44	49	49

**Réplica 3.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	44	49	49	47	42	45	48	49	44	47	45	45
B	46	48	44	49	48	47	45	46	49	45	45	47
C	42	49	41	47	49	49	48	44	48	49	49	46
D	48	46	49	48	44	49	49	49	46	47	49	48
E	47	45	47	44	46	47	49	46	49	45	46	49
F	49	44	47	44	46	43	43	47	49	49	46	49
G	44	48	47	49	49	49	47	49	45	49	46	46
H	49	43	46	44	45	45	49	45	43	45	44	45

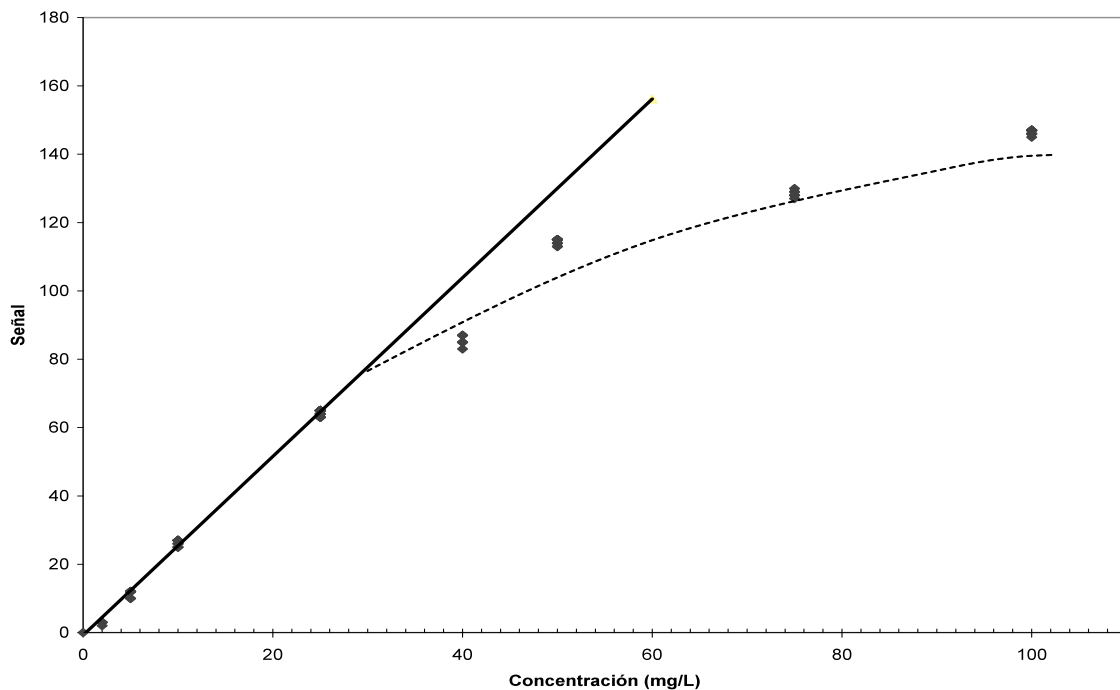


**Figura 25.** Estudio de la reproducibilidad de la señal de fluorescencia en el tiempo. Réplica 1 a  $t = 0$  minutos (—), réplica 2  $t = 10$  minutos (—) y réplica 3  $t = 20$  (---) minutos.

### 7.8 Curva de calibración

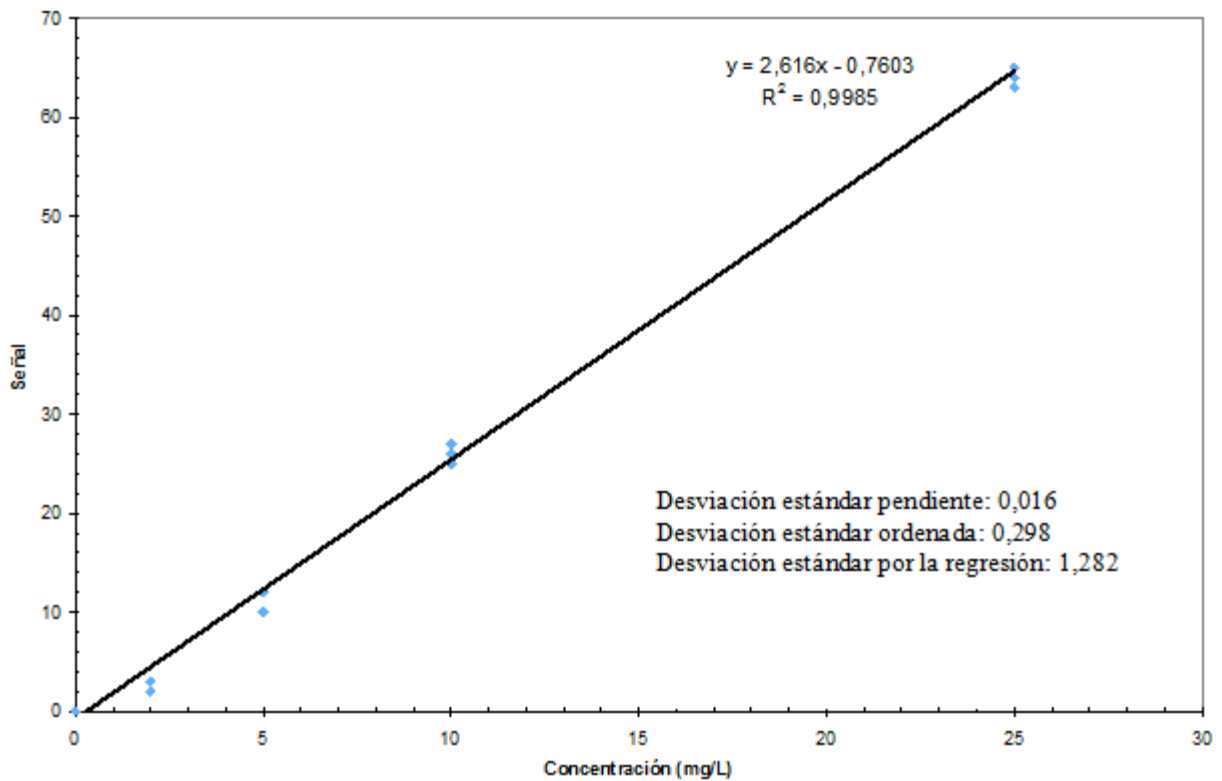
Se procedió a construir una curva de calibración a fin de evaluar algunas figuras de mérito analíticas del sistema ensamblado, para ello se prepararon soluciones de fluoresceína de 2, 5, 10, 25, 40, 50, 75 y 100 mg/L y se colocan al azar en los distintos pozos en una placa y se procede a tomar la imagen por triplicado. La imagen fue procesada para determinar la señal de fluorescencia con el radio de observación más

pequeño (11). Se adquirieron tres imágenes de forma consecutiva en un lapso no mayor de 5 minutos y disminuir así las variaciones de la concentración de las soluciones producto de la evaporación del etanol. Las señales se graficaron en función de su concentración, la figura 26, se presentan los resultados obtenidos. Se puede observar claramente que en el intervalo de 0 a 25 mg/L existe una clara tendencia lineal con elevada pendiente, que luego decrece (saturación) a consecuencia del *quenching* de la fluorescencia por el incremento de la concentración. Se alternaron varios pozos con la solución blanco (agua-etanol), los valores obtenidos de señales siempre fueron igual a 0.



**Figura 26.** Representación gráfica de la variación de la señal de fluorescencia en función de la concentración de soluciones de fluoresceína. Las líneas rectas y curva son sólo trazadas para destacar el efecto de saturación (ver texto).

La figura 27, presenta la curva de calibración obtenida al eliminar los valores en donde se observa la saturación y dejando sólo los valores por debajo de 25 mg/L.



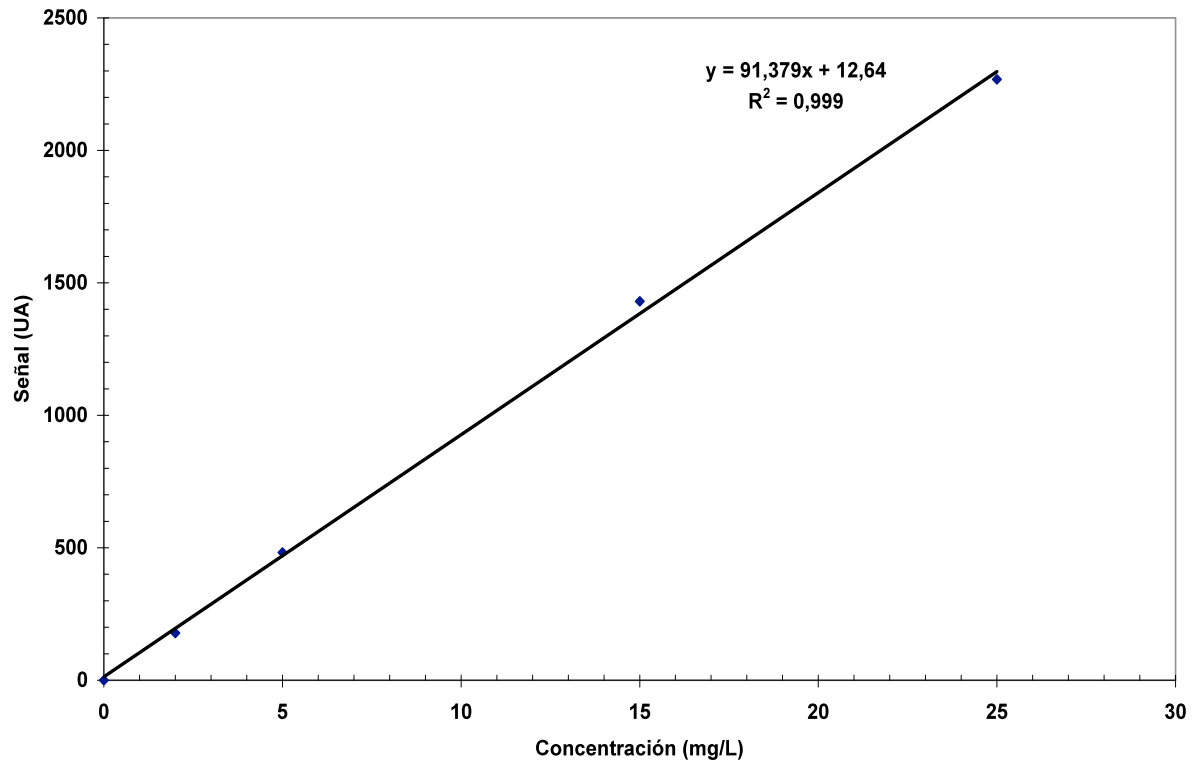
**Figura 27.** Curva de calibración con sólo los valores comprendidos de 0 a 25 mg/L de fluoresceína.

Aunque se prepararon soluciones patrones de 0,5 y 1,0 mg/L estas no pudieron ser medidas ya que sus señales no distinguían de los valores obtenidas para el blanco esto posiblemente atribuible a la existencia de un umbral de detección por el detector que requiere una radiación emitida (fluorescencia) mínima para generar una respuesta que se traduciría en una imagen por el detector. El valor de la señal obtenido para el patrón de 2,0 mg/L (señal experimental promedio: 3) se observa un poco por debajo del valor predicho por el modelo lineal (4,98) posiblemente el umbral de detección se encuentre ubicado en un valor de concentración superior a 2,0 mg/L. Sin embargo la inclusión o no de este punto en la curva de calibración tendría sentido en el caso que se estuviera evaluando las figuras de mérito de un método de análisis. En este caso el

hecho de evaluar la linealidad de la curva de calibración nos permite demostrar la utilidad de la configuración experimental para el análisis cuantitativo de la configuración desarrollada, una explicación similar justificaría la ausencia de la determinación del intervalo dinámico lineal del instrumento.

Para efectos comparativos de las capacidades del equipo propuesto, se procedió a construir una curva de calibración para la misma serie de soluciones patrones empleando para ello un espectrómetro comercial (Ocean Optics USB 2000) determinando la señal de fluorescencia a 563 nm, empleando como fuente de excitación el haz de un láser de ión Ar a 488 nm. La figura 28, presenta la curva de calibración obtenida al medir por triplicado las soluciones patrones de 2, 5, 15 y 25 mg/L de fluoresceína. Inserta en la figura se muestra la ecuación obtenida al ajustar los puntos por mínimos cuadrados así como el factor de correlación. Una sencilla comparación demuestra que la pendiente de la curva de calibración obtenida en este caso (91,73) es aproximadamente 34 veces mayor que la obtenida con el equipo propuesto (ver figura 27 y tabla 7). Esta diferencia de sensibilidad se atribuye a varios factores: (1) a la mayor intensidad y direccionalidad del haz de excitación (láser) comparado con la intensidad y poca direccionalidad de la radiación generada por una lámpara fluorescente (2) A una mejor selección por parte del monocromador de la radiación emitida que permite aislar la radiación fluorescente en su máximo de intensidad (3) A la configuración de medición de fluorescencia empleada (detección a 90°) comparada con la detección por reflexión de la superficie de la solución empleada en las placas ELISA. Al menos la primera de estas limitaciones podría ser superada si empleamos una fuente de mayor intensidad y algún sistema de enfoque para la radiación que se emplea para excitar las muestras. Sin embargo la posibilidad de medir simultáneamente 96 muestras (96 pozos de la placa ELISA) en un tiempo de apenas algunos minutos (incluyendo tiempo de procesamiento) permite afirmar que a pesar de la limitante de la sensibilidad la configuración experimental propuesta puede ser de gran utilidad, en particular en los casos en que no se requiera una elevada sensibilidad,

como es el caso de algunos análisis clínicos en donde los rangos críticos para la toma de decisiones es relativamente alto.



**Figura 28.** Curva de calibración obtenida en equipo comercial Ocean Optics.



## 8. CONCLUSIONES

- Se ensambló un equipo para medición de la fluorescencia de 96 muestras simultáneas empleando equipos sencillos y económicos como cámara fotográfica digital como elemento detector y selector de la longitud de onda, lámparas fluorescentes de UV como fuente de excitación y placas para inmuno-ensayos de ELISA como contenedor de las muestras.
- El tiempo de análisis de 96 muestras es relativamente corto lo cual es una gran ventaja cuando se le compara con fluorómetros convencionales.
- El tamaño de área de observación de la señal de fluorescencia resultó ser una variable importante, encontrándose que para áreas menores se logra mayor sensibilidad y reproducibilidad, esto es producto del efecto del menisco que forma la solución en la superficie de cada pozo.
- El equipo construido presentó una reproducibilidad, sensibilidad y una respuesta lineal en la evaluación analítica empleando soluciones de fluoresceína como sistema de prueba.
- La sensibilidad del equipo ensamblado permitiría desarrollar métodos para la determinación cuantitativa de algunos analitos cuando no se requiera elevada sensibilidad.

## 9. RECOMENDACIONES

- Evaluar otras fuentes de excitación de mayor intensidad o configuración de la iluminación que permita obtener mayor sensibilidad.
- Evaluar el sistema propuesto al aplicarlo en métodos de análisis de muestras clínicas.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lakowicz J. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer. Third Edition. Baltimore. USA. 954 p.
- [2] Willard H, Merritt E, Dean J, Settle F. 1988. Espectroscopia de fluorescencia y fosforescencia. pp: 193-218. *Métodos Instrumentales de análisis*. Grupo Editorial Iberoamericana. Ciudad de México. México.
- [3] Skoog D, Holler J, Nieman T, 2001. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill. Quinta Edición. Madrid. España. 1028 p.
- [4] Instrumentación científica técnica, S.L. 2009. Placa ELISA y placas para ensayos. 28 de abril de 2009. <http://www.ictsl.net/productos>
- [5] Poynton C. 2003. Digital Video and HDTV: Algorithms and Interfaces. The Morgan Kaufmann Series in Computer Graphics. NY
- [6] Fuentes X, Castiñeiras M, Queraltó J, 1998 Espectroscopía de luminiscencia molecular. pp: 243-258. *Bioquímica clínica y Patología molecular*. Reverté. Segunda Edición. Ciudad de México. México.
- [7] Alimelli, Filippini D, Paolesse R, Moretti S, Ciolfi G, D'Amico A, Lundstrom I, Di Natale C. 2007. Direct quantitative evaluation of complex substances using computer screen phot-assisted technology: the case of red wine. *Analytical Chimica Acta*. 597 (1): 103-112.

- [8] Filipini D, Asberg P, Nilsson P, Iganas O, Lundstron I, 2006. Computers creen Photo-assisted detection of complemetary DNA strand using lumincens. Sensors and Actuators B. 113: 410-418.
- [9] Filipini D, Svenson S, Lundstron I, 2003. Computers creen as a programable Light source for visible absorption characterization of bio-chemical assays. Chemical Communications. 2: 240-241.
- [10] Byrne, Baker J, Pernnarum G, Diamond D, 2000. Trends in Analyical Chemistry. 19: 517.
- [11] Maleki N, Safavi A, Sedaghatpour. 2004. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for arificial neural network usin a CCD camera. Talanta 64: 830-835
- [12] Castillo J, Gutierrez H, Vitta Y, Martinez M, Fernández A. 2007. Development and testing of multi-well plates absorbance reader for clinical análisis using inexpensive Web-Cam. Advance Enviromental, Chemical, and Biological Sensing Technologies V. Tuan Vo-Dinh, Robert Liberman and Gunter Gauglitz Editors. Proceedings of SPIE, 6755
- [13] Fernández A, Gonzáles F, Castillo J, Vitta Y, Briceño A. 2009. Aplicaciones de un analizador colorimétrico de placas de ELISA basado en la detección con Webcams a la determinación de glucosa en plasma sanguíneo. BISTUA: 1-7p.
- [14] Pérez M, Rivas S, 2008. *Software para el cálculo de la concentración en soluciones acuosas coloridas*. Universidad Central de Venezuela. Escuela de computación.

[15] Enciclopedia electrónica, 2009. Funcionamiento y componentes de un scanner. 18 de marzo de 2010. [www.holacape.com](http://www.holacape.com)

[16] Espectro de transmisión de una cámara CCD. 22 de marzo de 2010. [www.kodak.com](http://www.kodak.com)

[17] Ocean optics USB2000. 10 de marzo de 2010. [www.news.directindustry.com](http://www.news.directindustry.com)

## 11. AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero agradecerle a DIOS, que siempre me guío por el mejor camino, permitiéndome desarrollar y culminar una etapa muy importante en mi vida.

A la UVC, a esta gran casa de estudio, por permitirme desarrollar una carrera profesional.

A mi madre Eslovenia Fernández, por su apoyo incondicional, por siempre estar en todo momento cuando la necesitaba, cuando sentía que no podía más, siempre estabas presente, Gracias. A mi papi Gelasio Díaz, por siempre confiar en mí y por ser mi gran amigo. Sin ustedes no hubiese podido llegar a donde estoy.

A mis familiares, Oswaldo Fernández, Gilberto Fernández y Anaisamar Fernández gracias por su apoyo y por estar siempre.

Al Prof. Alberto Fernández, un agradecimiento muy especial, ya que no tengo palabras para decirle lo inmensamente agradecida que estoy, simplemente gracias por compartir conmigo todos esos conocimientos, guiarme por el mejor camino y por el apoyo incondicional. Eres una persona brillante por sus conocimiento y por como eres, simplemente GRACIAS.

Prof. María Antonieta Ranaudo, gracias y mil veces gracias, no solo por su ayuda académica, si no por ser como una mamá para mí y por brindarme una amistad incondicional.

A mi tutor, Prof. Jimmy Castillo, por permitirme trabajar en el laboratorio de espectroscopia láser, gracias por su paciencia.

Prof. Manuel Caetano, por brindarme siempre su apoyo.

Prof. Luis Gómez, gracias por la enseñanza que me brindo y por su amistad.

A los profesores que me enseñaron durante toda mi carrera, Prof. Manuel Martínez, Prof. María Rodríguez, Prof. Yosmeri vitta, Prof. Héctor Gutiérrez, Prof. Mary Lorena Araujo, estoy profundamente agradecida.

A mis amigas de toda la vida, María Fernanda Van Woerkom y Adriana Vargas por siempre estar en todo momento, sin ustedes todo seria distinto.

A Jonathan Cancillo (Mi Jo.), gracias por permanecer a mi lado en todo momento, se que no fue una tarea fácil. Eres una persona maravillosa y estoy feliz de estar a tu lado.

A Eduardo Carrasquero, por su nobleza y por enseñarme a ver el lado positivo de las cosas.

Este párrafo es especial para mis amigos que estuvieron en todo momento conmigo y compartiendo durante toda mi carrera universitaria, Daniel Arismendi (Mi Dani), gracias por guiarme por el mejor camino y por enseñarme muchas cosas, eres una persona maravillosa. Patricia Guevara (Mi Paty linda) gracias por darme la oportunidad de ser tu amiga, y por enseñarme que en la vida todo se puede superar. Karina Benavides (Kari) gracias por brindarme tu amistad y por enseñarme a ser independiente. Rohany Flores (Roha) por tu compañerismo, amistad y lealtad. Gracias a todos ustedes, porque hoy sin duda alguna me siento realmente afortunada por haberlos conocido

Muchas Gracias

Gabriella Díaz

