



Universidad
Zaragoza

**METODOS ANALÍTICOS BASADOS EN IMÁGENES
DIGITALES: PROCESOS DE LUMINISCENCIA MEDIDOS CON
SENSORES**

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

SERGIO HERRERA FERNANDEZ

DIRECTOR: ÁNGEL LOPEZ MOLINERO

Convocatoria de Junio de 2017

RESUMEN

La captura de imágenes digitales con sensores de cámaras fotográficas, así como “webCam” han sido evaluadas y aplicadas en el desarrollo de metodología analítica. Procedimientos que dan lugar a coloración o fluorescencia han sido elegidos. La medida de colores básicos RGB y su relación con el analito permite desarrollar métodos rápidos de análisis.

Inicialmente, la reacción colorimétrica de Boedecker con sulfitos, se ha estudiado con una modificación en la que se introducen nanopartículas de Grafeno. Sus prestaciones analíticas se han comparado frente a determinaciones similares en ausencia de Grafeno.

La medida de procesos fluorescentes ha sido objetivo principal y llevada a cabo sobre reacciones de referencia. La fluorescencia de Calceína, Grafeno y Grafeno oxidado y La cromaticidad de la reacción de la Calceína con Ca(II) ha sido caracterizada mediante valores RGB de imágenes digitales.

La influencia de los factores del montaje óptico sobre la medida digital de la fluorescencia ha sido evaluada y optimizada. En las mejores condiciones, con iluminación LED de rango 400-500 nm, se recoge la fluorescencia utilizando un filtro con rango de transmitancia 510- 550 nm, sobre imagen digital. La varianza cromática del sistema identifica al componente G como el de mayor interés en las determinaciones cuantitativas. Los mejores resultados se obtienen con web-cam y cámara réflex. El Ca(II) exhibe un rango lineal de 0-0.12 mg/L, con un LD de y un LQ de 0.0103 y 0.0345 mg/L respectivamente.

El método se ha aplicado a la determinación de Ca en agua mineral.

Los resultados han sido comparados frente a los producidos por un método espectrofluorométrico de referencia.

PALABRAS CLAVE:

Fluorescencia, Imágenes digitales, Calceína , Calcio, determinación.

ABSTRACT

The capture of digital images with sensors of cameras as well as Web Cam have been evaluated and applied for the development of analytical methodology. Procedures that give rise to coloration or fluorescence have been chosen. The measurement of basic RGB colors and their relationship with the analyte allows to develop rapid methods of analysis.

Initially, the colorimetric reaction of Boedecker with sulfites, has been studied with a modification in which nano-particles of graphene are introduced. Its analytical performance has been compared to similar determinations in the absence of graphene.

The measurement of fluorescent processes has been the main objective and carried out on reference reactions. The fluorescence of Calcein, Graphene and oxidized graphene has been characterized by Spectro-Fluorimetry. The chromaticity of the Calcein reaction with Ca (II) has been characterized by RGB values of digital images.

The influence of optical assembly factors has been evaluated and optimized. In the best conditions, with LED illumination of 400-500 nm range, the fluorescence is collected using a 510-5 550 nm transmittance filter over digital image. The chromatic variance of the system identifies the G component as the one of greatest interest in quantitative determinations. The best results are obtained with web-cam and SLR camera. Ca (II) exhibits a linear range of 0-0.12 mg/L, with an LD of and an LQ 0.0103 and 0.0345 mg/L respectively.

The method has been applied to the determination of Ca in mineral water.

The results have been compared to those produced by a spectrofluorometric method

KEY WORDS:

Fluorescence, Digital images, Calcein, Calcium, determination.

ÍNDICE

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN: METODOS ANALITICOS CON IMÁGENES DIGITALES _____ 1
2. SISTEMAS FLUORESCENTES _____ 3
3. OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO _____ 3

CAPITULO II: EXPERIMENTAL

1. INSTRUMENTACIÓN _____ 4
 - 1.1 ESPECTROFOTOMETROS _____ 4
 - 1.2 CÁMARAS DIGITALES _____ 4
2. MATERIALES _____ 4
 - 2.1 “SOFT –BOX” EN LA CAPTURA DE IMÁGENES Y SOPORTES DE REACCIÓN _____ 4
 - 2.2 FUENTES DE ILUMINACION _____ 5
 - 2.3 MATERIAL DE LABORATORIO _____ 6
3. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS _____ 6
 - 3.1 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES _____ 6
4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES _____ 6
 - 4.1 OBTENCIÓN GRAFENO QUANTUM DOTS Y OXIDO GRAFENO QUANTUM DOTS _____ 6
 - 4.2 MICROPARTICULAS DE NITROPUSIATO DE ZINC EN PRESENCIA DE GRAFENO _____ 7
 - 4.3 PROCEDIMIENTO PARA CAPTURA y LECTURA IMÁGENES _____ 8

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SISTEMA CROMOGENICO: REACCION DE BOEDECKER _____ 9
 - a. EXPERIENCIA INICIAL CON MICROPARTICULAS _____ 9
 - b. INFLUENCIAS CON NP’S DE GRAFENO _____ 10
2. SISTEMAS FLUOROMETRICOS _____ 10
 - a. FLUORESCENCIA DE CALCEINA _____ 10
 - b. CARACTERIZACIÓN DE GRAFENO _____ 11
 - c. CARACTERIZACIÓN DE OXIDO GRAFENO _____ 12
 - d. OTROS ESPECTROS _____ 12
3. LECTURA DIGITAL DE LA FLUORESCENCIA _____ 13
 - a. INFLUENCIA DE FACTORES DEL MONTAJE _____ 13
4. EVALUACION QUIMIOMETRICA DE LA FLUORESCENCIA _____ 18
 - a. ANÁLISIS FACTORIAL Y VARIANZA CROMÁTICA _____ 18
 - b. FUENTES DE VARIANZA CROMÁTICA _____ 20
5. PRESTACIONES ANALÍTICAS _____ 21
 - a. RANGO LINEAL Y PRESTACIONES ANALÍTICAS PARA ILUMINACIÓN LED _____ 21
6. APLICACIÓN DEL MÉTODO _____ 23
 - a. MUESTRA _____ 23
 - b. RESULTADOS _____ 23
 - c. VALIDACIÓN _____ 24

CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA

Capítulo I. Introducción y objetivos

1.- INTRODUCCIÓN: METODOS ANALITICOS CON IMÁGENES DIGITALES.

El desarrollo de nuevos métodos analíticos basados en imágenes digitales, en particular la Colorimetría de Imágenes Digitales^{1,2}, DIC, mediante el uso de sensores-detectores integrados en equipos de gran difusión como cámaras digitales³, 'smart-phones'⁴, 'i-pad-tablets', 'web-cam' o incluso 'escáneres', es un campo de gran interés e impacto. Se trata de metodología con medida en condiciones 'casuales-IN SITU-rápidas' que permite acercar el instrumento a la muestra, allá donde esta se encuentra. Con capacidad de producir una respuesta, documentarla, validarla y trasladarla donde se requiera de un modo prácticamente instantáneo. Son metodologías eficientes y adaptadas a la alta demanda de control analítico que los tiempos actuales demandan. Los equipos usan detectores de radiación del tipo CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor), o CCD (Charge Coupled Device), que proporcionan medidas de colores básicos, Rojo, Verde y Azul, RGB, de modo rápido y en 'miles de puntos'.

En su aplicación analítica se pueden diferenciar dos tipos de DIC:

- Basados en colores intrínsecos: cuando los mismos reactivos o productos experimentan un cambio de color.
- Procesos con compuestos cromogénicos externos que reaccionan con los analitos para producir un color o un cambio de color.

La bibliografía analítica de estos temas es muy amplia. Y abarca a diferentes analitos en muy diversos campos. Se citan algunos ejemplos como: iones y metabolitos en fluidos biológicos, antisépticos-povidona yodada-, Fe(III) y Cloro en agua, Ni en meteoritos, o colorantes en alimentación^{5,6}. Se ha aplicado en monitorización continua y automática de reactivos en tiempo real, control de procesos industriales de electrodeposición, en pruebas de campo semi-cuantitativas de compuestos opiáceos ilícitos o anfetaminas. Como un poco más distinto, se comenta la aplicación en métodos de emisión atómica, DIB-FES. En este campo se han determinado principios activos de productos farmacéuticos de modo indirecto, a través de la emisión de metales alcalinos y alcalinotérreos

Las etapas en una determinación analítica cuantitativa mediante imágenes digitales, son:

- Captura de una imagen digital.
- Lectura de la intensidad de la luz reflejada en los colores básicos RGB.
- Relación con la concentración del analito de interés.

En el procedimiento, la luz que alcanza un pixel del detector CCD-CMOS es reflejada por los objetos coloreados, previamente iluminados. El detector está cubierto de una plantilla de filtros (RGB), de modo que lee diferencialmente estos componentes. Los resultados son medidas de intensidades de color RGB, en cada uno de los pixeles del detector. Finalmente, un micro-procesador trata, escala y ajusta los colores para compensar las variaciones en las condiciones de captura, tales como las debidas al nivel de exposición-brillo, y la cromaticidad del iluminante (balance del blanco).

Como se ve los valores RGB son dependientes de muchos factores, entre ellos: la fuente del iluminante, la reflectancia de los objetos y los efectos de interpretación de la cámara. Este complejo modelo introduce algún grado de error y diferencias cuando se comparan diferentes capturas-imágenes.

La metodología analítica cuantitativa de Imágenes Digitales estudia las relaciones entre las intensidades de los colores básicos con las concentraciones analíticas en condiciones de comparabilidad o reproducibilidad para dar lugar a resultados fiables.

1.1.- La colorimetría tricromática

La colorimetría tricromática establece que cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios. En el sistema de la CIE (1931) se toman como colores primarios: los obtenidos a longitudes de onda: 435,8nm (azul), el 546,1nm (verde) y el 700nm (rojo).

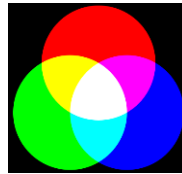


FIGURA 1: Imagen de composición aditiva de colores básicos

Los sistemas de medida de color en las cámaras digitales se basan en el uso de filtros. El típico es el conocido como mosaico-máscara de Bayer y se presenta en la Figura 2. Como se puede ver, está formado por una distribución y disposición sistemática de filtros verdes (50% del total), rojos (25%) y azules (25%).

Así a cada pixel-fotodiodo del sensor le llega la luz correspondiente a un color primario. Posteriormente se deduce matemáticamente la luminosidad, en cada pixel, a partir de la luminosidad que aportan 4 pixeles diferentes próximos. Es decir, la señal cromática de una cámara, es también dependiente de la configuración de la máscara y los algoritmos-procesos de interpolación de los colores individuales.

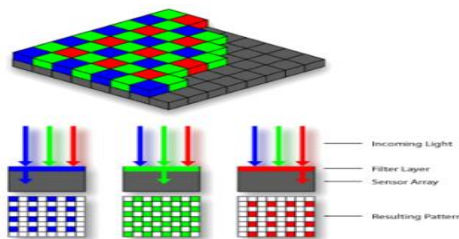


FIGURA 2: Mosaico Bayer utilizado en cámaras digitales.

Los valores de las intensidades de color son escalados según la sensibilidad del detector-sensor. Así, sensores que leen mediante 8 bits: dan lugar a respuestas escaladas en el rango: 2^8 , 0-255 unidades relativas de color. Mayores escalas, y sensibilidades se consiguen con sensores de 12, 24 bits que dan lugar a medidas con 2^{12} 2^{24} : 0-4096 0-16 777 215 unidades relativas de color, respectivamente.

En un sensor con lectura de 8 bits, el color negro viene definido por la codificación: R-G-B = (0, 0, 0); mientras que el color blanco es definido por: (255, 255, 255).

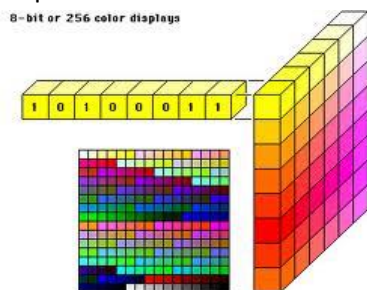


FIGURA 3: Codificación de un canal de color mediante un sensor de 8 bits

1.2.- Empleo de la colorimetría digital RGB en investigaciones precedentes

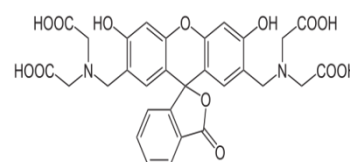
Se han puesto a punto diferentes metodologías en el departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza para determinaciones de: Ti (IV) como aditivo en plásticos⁷, la demanda química de oxígeno en aguas⁷, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en desinfectantes y productos químicos¹⁰, dureza en aguas¹¹, Ca(II) en productos farmacéuticos¹², o sulfitos en vino⁸. Una revisión puede verse en la cita¹³

2.- SISTEMAS FLUORESCENTES

2.1 CALCEINA

Schwarzenbach ha sido un autor clave en el desarrollo de los reactivos analíticos quelantes como la EDTA. Otros autores como Diehl, Ellingboe, Tucker¹⁴ generalizaron la línea de adicionar los ligandos quelantes, mediante síntesis de Mannich- con formaldehído y ácido iminodiacético-, a compuestos colorimétricos y fluorimétricos. En esta idea se ha preparado el reactivo fluoresceín complexan o calceína que reacciona con Ca(II) para dar un producto fluorescente. Esta se ha utilizado como indicador en la titulación del calcio con EDTA y también como reactivo fluorescente para la determinación de calcio. La reacción es considerada como un proceso fluorescente de referencia.

FIGURA 4: Calceína



2.2.- GRAFENO y GRAFENO QUANTUM DOTS-GQDs-

Sobre el Grafeno se está generando una dinámica de estudio de nuevas posibilidades al hilo de sus grandes propiedades. El material se compone de átomos de carbono dispuestos en una estructura de capa hexagonal-panal conseguida mediante una significativa hibridación sp² del C que la diferencia de la clásica o tetraédrica sp³. En este material, nano partículas de grafeno, conocidas como grafeno quantum dots, GQDs, están formadas por láminas 'más o menos pequeñas', 2-12 nm, con interesantes propiedades analíticas¹⁵ como la fluorescencia. En este TFG se han estudiado la preparación de GQDs y Grafeno Oxidado, GO, y sus posibilidades en reacciones cromogénicas que pasan a ser evaluadas mediante Imágenes Digitales.

Se ha aplicado un procedimiento de preparación mediante precursor orgánico de ácido cítrico (CA) que ha sido tratado siguiendo procesos de la bibliografía¹⁶, pero modificado con una preparación en atmosfera controlada.

3.- OBJETIVOS DEL TFG-

Como principales tareas se me ha encomendado:

- i- Evaluación de la influencia de nanopartículas de Grafeno sobre reacciones cromogénicas. En particular sobre la determinación de sulfitos mediante la reacción de Boedecker⁸.
- ii- Evaluación de las posibilidades de medidas de procesos fluorescentes con imágenes digitales. Aplicación, en especial, de sensores integrados en cámaras réflex.

Capítulo II. Experimental

1.-INSTRUMENTACION

1.1- ESPECTROFOTOMETROS

ESPECTROFOTOMETRO UV-Vis V-730 JASCO

Rango longitudes de onda: 190 a 1100 nm

Detector: fotodiodo

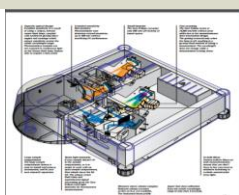
Fuente radiación: Lámpara de Deuterio y Halógena

Velocidad escaneo: 10-8000 nm/min

Precisión Longitud de Onda: ± 0.2 nm (656.1nm)



ESPECTROFLUORIMETRO CARY ECLIPSE AGILENT:



rango de barrido: excitacion – emision 190–1100 nm

Velocidad de barrido máxima: 24 000 nm/min .

Lámpara de Xenón



Características de las cubetas espectrofotométricas

Material Hellma Ventana: Vidrio Óptico Especial

Paso óptico:10 mm

Volumen: 3500 μ L



1.2- CÁMARAS DIGITALES: principales

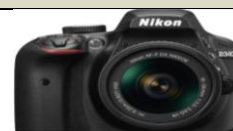
Cámara réflex Nikon D3400: <http://www.nikon.com.mx/nikon-products/product/dslr-cameras/d3400.html>

Sensor CMOS, de 24 MP. Tamaño:23.5x15.6 mm

Sensor de 12 bits , sensibilidad $2^{12}=4096$

Rango ISO 100-25600.

Formatos: JPEG, TIF y RAW



Camara de red- web cam Logitech C 920

Sensor 15 Mp, 1920x1080 pixels

Captura foto y video, conexión USB 3.0 a PC con Windows7-8

Video Full HD, 1080p (líneas) a 30 frames/s

Sotware propio: Logitech webcam C920

<http://www.logitech.com/es-es/product/hd-pro-webcam-c920>



Otras Cámaras compactas y equipos con fibra óptica también han sido utilizados

2.- MATERIALES

2.1- “SOFT –BOX” EN LA CAPTURA DE IMÁGENES Y SOPORTES DE REACCIÓN

“SOFT -BOX” EN CONDICIONES DE REFERENCIA



SOPORTES DE REACCIÓN – CUBETAS -

Poliestireno (PS)		Cerámica	
Cubetas 4 Caras Trasparentes P.O. 10 mm, 4-5 ml	2 Caras Trasparentes Ref: 634-8531E Kartell	Placas cultivo 12 pocillos, Transparentes	Placa toques
			

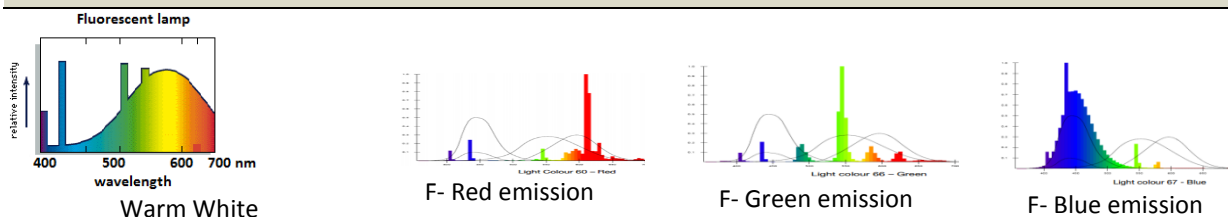
2.2- FUENTES ILUMINACIÓN

Lámpara LED

EGLO:RGB E27 : regulable a 16 colores.
[Clase de eficiencia energética A]; 470 lumen.

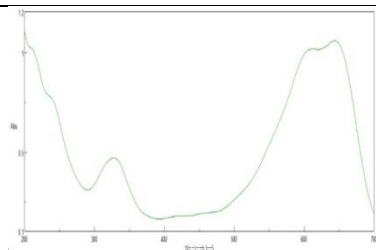


Espectros de emisión para las zonas RGB



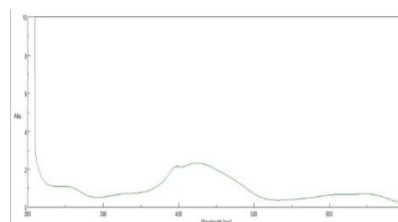
Filtros de corte

Tiras de polímeros sobre soportes PS. Preparación propia: características absorción, en nm



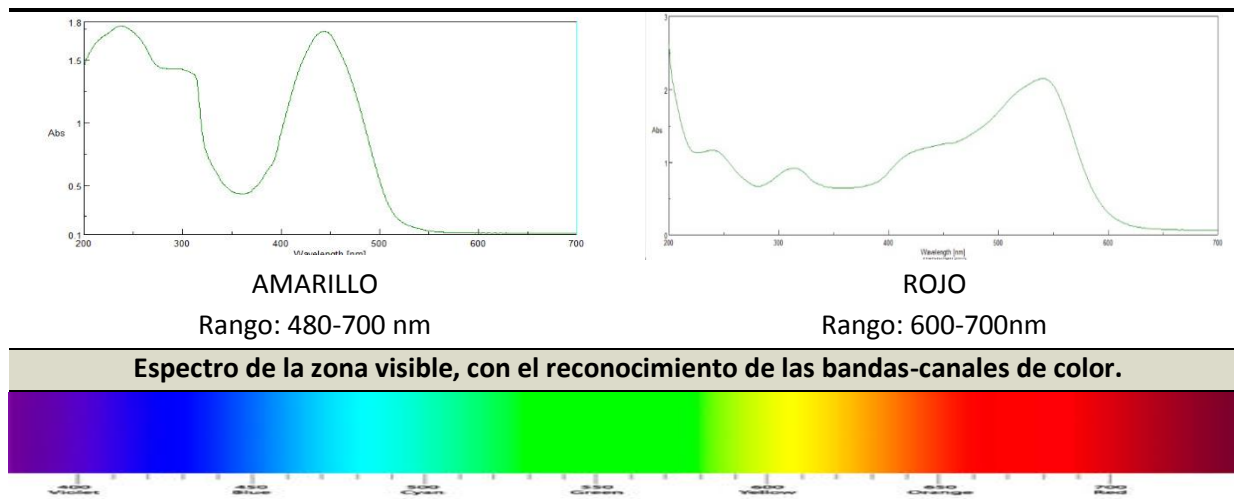
AZUL

Rango: 380-480 nm



VERDE

Rango: 270-380 nm ; 500-700 nm



Espectro de la zona visible, con el reconocimiento de las bandas-canales de color.

2.3. - MATERIAL DE LABORATORIO

1. Micropipetas Pipet-Lite 'RAININ' 5-50 μl , 20-200 μl , 100 μl – 1 ml y 0,5-5 ml.
2. Matraces aforados de 10, 50, 100 y 250 mL
3. Placa Calefactora/agitadora IKA® RH basic KT/C
4. Cinta calefactora: bronce.120 wat.
5. Termómetro-termopar digital, Testo 925, precisión $\pm 0.5^\circ\text{C}$, resolución 0.1°C , 1 entrada; de mano; 9 V; intervalo -50°C -> 1000°C

3.-REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS

3.1.-PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES:

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Agua desionizada Milli RO ha sido utilizada.

- Disolución Fluoresceína complexona o calceína: 0.065mg/L: Se disuelven 70 mg de Calceína, Sigma- 622.53 g/mol- en la mínima cantidad de Hidróxido de Sodio 0.5 M y se diluye a 100 mL con agua desionizada. La disolución en frigorífico, 4°C , y en condiciones de oscuridad es estable meses.
- Disolución patrón de Calcio: 800mg/L : 200 mg de Carbonato de Calcio , CaCO_3 ,Merck- 100.0869 g/mol- se disuelven en la mínima cantidad de HCl y se diluyen a 250 mL, en matraz aforado, con agua desionizada.
- Disol. NaOH, 10^{-4} mol/L, 3.5 mg/L: 350 mg de NaOH, Merck- 39.997 g/mol- se disuelven en 20 mL de agua desionizada.

4-PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.1 PREPARACIÓN GRAFENO QUANTUM DOTS –GQDS- Y OXIDO GRAPHENE QUANTUM DOTS- GO- .

El procedimiento general se ofrece en el esquema¹⁶:

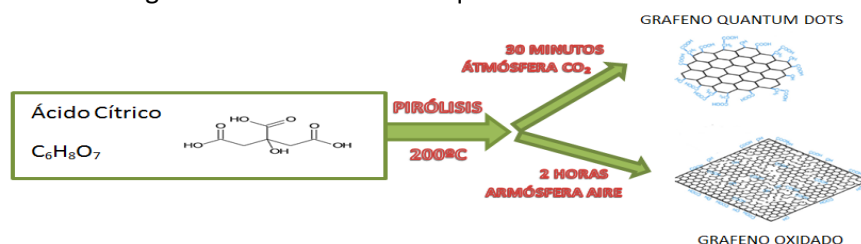


FIGURA 5: Vias de síntesis: GQDs y GO.

Obtención de GQDs: Se depositan 2g de Ácido Cítrico en un vaso reactor de 5 mL. Se calientan a 200°C usando cinta calefactora, y con control de atmosfera de CO₂ para evitar la oxidación. El proceso se mantiene con control constante de Tª y flujo de CO₂, durante 30 minutos. Al cabo del mismo se obtiene un líquido anaranjado. Se trasvasa a un vaso de precipitados y se añaden 100 mL de disolución 10 mg/mL de NaOH con agitación vigorosa constante. Finalmente, se ajusta el pH a 7 con HCl.



IMAGEN 1: Montaje para la obtención de GQDs-GO.

Obtención de GO: Proceso de pirolisis similar al anterior pero ahora se pasa un flujo de aire constante (aproximadamente 0.5 l/min), y se mantiene durante 2 horas. El producto final, se disuelve en 50 mL de NaOH 10 mg/mL. Finalmente se neutraliza con HCl.

4.2 MICROPARTICULAS DE NITROPUSIATO DE ZINC EN PRESENCIA DE GRAFENO:

Se sigue un procedimiento similar al descrito en bibliografía⁸ que conduce a la obtención de suspensiones de micropartículas. Ellas han sido caracterizadas mediante espectroscopia IR y TEM. En este TFG se preparan las disoluciones de trabajo sobre disolución soporte de Grafeno. Según se describe:

- **Nitrato de Zinc Zn(NO₃)₂·6H₂O:** Se disuelven 150 mg de nitrato de zinc (297.49 g/mol marca Probus) en 25 mL de disolución de Grafeno preparada según el apartado anterior. Esta disolución se prepara en baño María y temperatura ambiente, 23°C.
- **Disolución de Nitropusiato Sódico, SNP:** Se toman 30 mg de NaSNP (297.95 g/mol marca Panreac) y se disuelven en 10 mL de disolución de Grafeno preparada anteriormente. Y siempre a temperatura ambiente, 23 °C.

A partir de las anteriores se prepara la suspensión de micropartículas de Zn con Grafeno:

Sobre la disolución De nitrato de Zinc, se añade gota a gota y con agitación constante la disolución de SNP. Una vez añadida, se lleva a pH 3 con HCl 1M. En este momento se empiezan a formar las microparticulas. La disolución resultante se puede preservar hasta 24 horas en frigorífico.

En la disolución final se dan las siguientes características:

vol, ml	SNP, mol/l	Zn(NO ₃) ₂ , mol/l
35,000	0,024	0,1030

4.3.- PROCEDIMIENTO PARA CAPTURA DE IMÁGENES Y LECTURA IMAGENES

Dentro de la `soft-box` se sitúa la placa de pocillos/cubetas de ensayo. Se proyecta iluminación indirecta y artificial, según el experimento. La cámara se utiliza en “modo automático” y sin flash. Antes de tomar las imágenes, se pre-enfoca con referencia al fondo para sistematizar los “balances de colores automáticos”.

Las imágenes en formato “.jpg y raw” se transfieren al ordenador mediante Microsoft PHoto Editor. En cada imagen se miden las intensidades RGB mediante un programa desarrollado por nosotros, en Matlab. La lectura final se obtiene como media de 150 píxeles en ‘regiones de interés: ROI’, a lo largo de cada pocillo o cubeta. El tratamiento matemático de los datos se realiza posteriormente mediante Matlab y /o Microsoft Excel. En la **Tabla 1** se ofrecen las características más significativas del proceso.

Volcado de imágenes	MicroSoft Windows 8, con Microsoft PHoto Editor
Medida colores	‘programa propio’: ‘lectura color’, en MatLab 2011b
Archivos: Matriz de datos RGB:	<u>Patrones- Muestras:</u> 150 puntos’ x 3 intensidad(RGB)
Tratamiento de los datos	Matlab 2011 y Excel 2010
‘ROI’ y lectura de colores, data RGB	‘líneas de lectura’: Sobre pocillos/cubetas: ‘

Tabla 1: Procedimiento para la medida y tratamiento de datos en la imagen digital.

Capítulo III. Resultados y discusión

1. SISTEMA CROMOGENICO: REACCION DE BOEDECKER

El Grafeno aparece como reactivo favorecedor de diferentes tipos de procesos. Este experimento se ha orientado a estudiar la influencia de la presencia de nanopartículas de Grafeno sobre la reacción colorimétrica de Boedecker, en la determinación de sulfitos.

El mecanismo de la reacción cromogénica pasa por la formación de micropartículas y la inclusión de los sulfitos en la estructura. Se ha evaluado la utilización de GQD, como favorecedor de núcleos de precipitación, que den lugar a mejoras en la determinación analítica.

a. EXPERIENCIA INICIAL

Se ha llevado a cabo la determinación de sulfitos mediante la reacción de Boedecker siguiendo trabajos de investigación previos de este grupo de investigación. En la tabla se muestran las condiciones del experimento. La imagen y los resultados de medida digital de RGB. El procedimiento supone la precipitación de micropartículas de nitroprusiato de Zn(II), y reacción con los iones sulfitos. La reacción requiere la presencia de EDTA y amina, Hexametilen tetramina, que favorece el color.

Disol	SNP,	Zn(II)	NaOH,	Hx,	EDTA, mol/L	water,		vol tot,
	mol/L	mol/L	mol/L	mol/L		μL	μL	
bl	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	0	2050	3000	0
2	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	1,69E-05	2045	3000	1,63
3	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	3,38E-05	2040	3000	3,25
4	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	6,76E-05	2030	3000	6,5
5	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	1,01E-04	2020	3000	9,75
6	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	2,37E-04	1980	3000	22,76
7	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	3,38E-04	1950	3000	32,51
8	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	4,40E-04	1920	3000	42,26
9	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	5,41E-04	1890	3000	52,01
10	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	7,78E-04	1820	3000	74,77
11	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	8,79E-04	1790	3000	84,52
12	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	9,81E-04	1760	3000	94,27
13	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	1,12E-03	1720	3000	107,28
14	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	1,22E-03	1690	3000	117,03
15	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	1,32E-03	1660	3000	126,78
16	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	1,42E-03	1630	3000	136,53
17	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	1,56E-03	1590	3000	149,54
18	3,66E-03	1,54E-02	5,00E-03	3,15E-01	1,66E-03	1560	3000	159,29

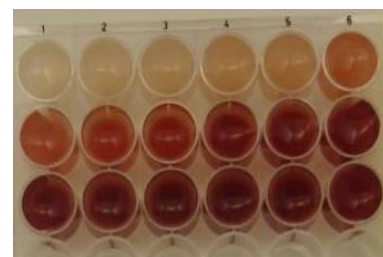


TABLA 2: Experimento referencia: Rango dinámico de sulfitos para su determinación con el procedimiento de Boedecker, según nuestro grupo ⁸

IMAGEN 2: Experimento con iluminación blanca, reacción de Boedecker de referencia ⁸.

b. INFLUENCIAS CON NP'S DE GRAFENO.

Procedemos a realizar estudio similar al anterior, pero añadiendo Grafeno. Las condiciones se describen en la tabla siguiente

diso l	SNP, mol/l	Zn, mol/L	NaOH, mol/L	Hx, mol/l	EDTA,mol/ l	SO3=, mg/L
bl	0,008	0,034	0,010	0,631	0,000	0,00
2	0,008	0,034	0,010	0,631	0,000	6,00
3	0,008	0,034	0,010	0,631	0,000	20,00
4	0,008	0,034	0,010	0,631	0,000	35,00
5	0,008	0,034	0,010	0,631	0,001	50,00
6	0,008	0,034	0,010	0,631	0,001	70,00

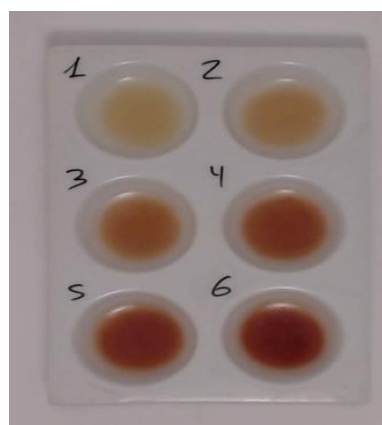
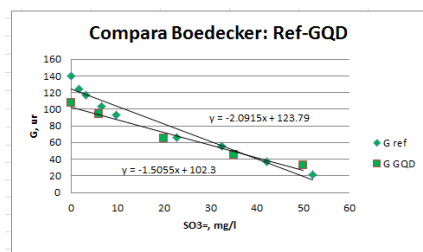


TABLA 3: Rango dinámico para la reacción de sulfitos con Boedecker en presencia de grafeno. IMAGEN 3: reacción de Boedecker con adición de GQDs.

En las tablas siguientes se muestran los resultados de la comparación de las rectas de calibrado. Las medidas se obtuvieron con todos los valores RGB. Ahora solo se muestran los mejores resultados sobre el valor de reflectancia del color G. Los otros colores presentan menores valores de prestaciones analíticas.



	Boedecker referencia			Boedecker GQD			
	estadística regresion			estadística regresion			
b	-2.092	123.793	a	b	-1.50550699	102.304522	a
sb	0.167	4.383	sa	sb	0.165115	4.76321719	sa
r ²	0.957	9.104	s y/x	r ²	0.96517162	6.80145543	s y/x
	LD, mg/l	LQ, mg/l		LD, mg/l	LQ, mg/l		
	2.0	6.7		2.0	6.7		

FIGURA 6: Comparación de las prestaciones de las rectas de calibrado, en los rangos lineales óptimos, para el color G, e iluminación blanca.

Como podemos apreciar, las ventajas de la adición de GQDs se han puesto de manifiesto en el rápido crecimiento de las micropartículas, sin necesidad de esperar tiempo ni enfriar. Por otra parte el estudio demuestra un menor valor de error de residuales en la recta de calibrado con GQD, Sy/x . Es decir, se pone de manifiesto que con GQD se da lugar a rectas de calibrado con menor incertidumbre, lo cual mejora la reproducibilidad y por tanto reduce el intervalo de confianza en los resultados. Sin embargo la presencia de GQDs no afecta a la sensibilidad de la reacción.

2. SISTEMAS FLUOROMETRICOS

a. CALCEINA o FLUORESCIEIN COMPLEXAN

Es compuesto fluorescente caracterizado en la bibliografía¹⁴ con una longitud de onda de excitación óptima a 495 y emisión a 515 nm, a pH 9-10. Nuestros estudios de fluorescencia de una

disolución de compuesto a pH 7.4 se realiza mediante un barrido de excitación 460-540 nm y de emisión de 460-540 nm, con resolución de 4 nm. Los resultados obtenidos se dan en la figura 6. Se demuestra una fluorescencia en el rango de excitación entre 493-497 nm y la emisión en el rango 510-515 nm.

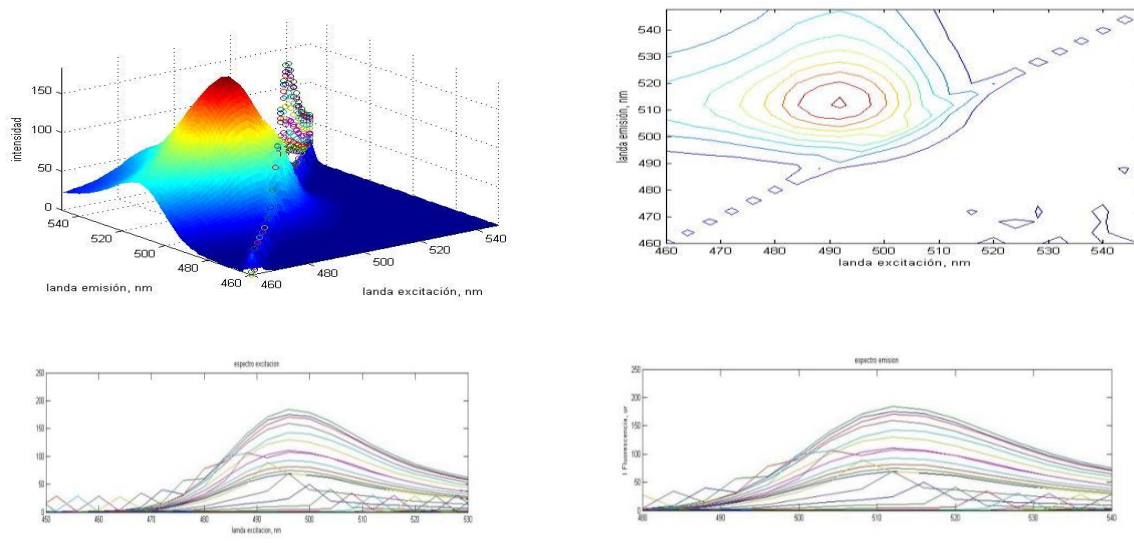


FIGURA 7: Espectros 3-D Fluorescencia de disol. Calceina $3.4 \cdot 10^{-6}$ mol/L. a pH neutro. Y proyecciones parciales.

Otros pHs mas alcalinos, 8.6, 12.7, se han estudiado. Los resultados muestran una disminución de la fluorescencia. Por ello se ha elegido el trabajo a pH próximo a neutro, como valor óptimo. El espectro de fluorescencia del complejo Calceina-Ca, también se ha obtenido en las mismas condiciones.

b. CARACTERIZACIÓN DEL GRAFENO

Se ha caracterizado la fluorescencia de una disolución de Grafeno, GQDs, a partir del producto sintetizado según se describe en la parte experimental. Es decir, se prepara una disolución GQDs a pH neutro, y se realiza el espectro de Florescencia en las mismas condiciones que las de la Calceína. En la figura se muestra el espectro obtenido.

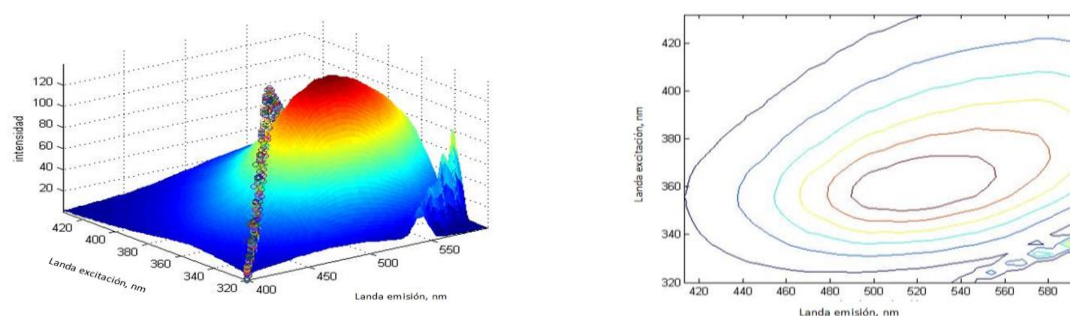


FIGURA 8: Espectro fluorescencia disol GQDs 2,3 g/L. Unidas arbitrarias de intensidad.

La bibliografía caracteriza el producto formado como capas únicas de grafito o 'nano laminas' de 15 nm x entre 0.5-2.0 nm (1.4 nm v medio). Las disoluciones exhiben fluorescencia con excitación UV a 365 nm y emisión a 460 nm (azul). El rendimiento cuántico de la fluorescencia, respecto patrón de quinina, es 9%.

En nuestro experimento se demuestra una excitación óptima a 360 y emisión a 520 nm respectivamente. Y se ha calculado el rendimiento cuántico de fluorescencia de 5%, respecto a patrón de Calceína, mediante la expresión (I o mejor II)¹⁷.

Los resultados se consideran una estimación adecuada pues se han llevado a cabo sobre el producto bruto sin purificación.

$$\Phi_{gqd} = \Phi_{PATRÓN} \left(\frac{A_{PATRÓN}}{A_{GQD}} \right) \cdot \left(\frac{I_{PATRÓN}}{I_{GQD}} \right) \cdot \left[\left(\frac{\eta_{PATRÓN}}{n_{GQD}} \right) \right]^2 \quad (I)$$

Otros autores usan la expresión (II), e introducen el valor de la absorptividad molar: ϵ

$$\Phi_{gqd} = \Phi_{PATRÓN} \left(\frac{\epsilon_{PATRÓN}}{\epsilon_{GQD}} \right) \cdot \left(\frac{I_{PATRÓN}}{I_{GQD}} \right) \cdot \left[\left(\frac{\epsilon_{PATRÓN}}{n_{GQD}} \right) \right]^2 \quad (II)$$

A = absorbancia de las disoluciones patrón y producto (QGD), a la lambda del máximo.

I = intensidad integrada de la fluorescencia para patrón y GQD.

η = índices de refracción de las disoluciones patrón y GQD.

Disolución GQDs: 2.8 mg/l

Absorbancia: 1.2 a 360 nm

$\epsilon = 885 \text{ l.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ¹⁸

$\Phi_{patrón} = 0.79$; rendimiento fluorescencia – calceína

c. CARACTERIZACIÓN DE OXIDO GRAFENO.

La bibliografía caracteriza el GO como capas únicas de grafito o ‘nano laminas’ de tamaño algo mayor que el GQDs pero de altura 1.0 nm. Las disoluciones exhiben fluorescencia con rango de excitación UV 300-480 nm y rango de emisión a 450-542 nm (azul). El rendimiento cuántico de la fluorescencia, respecto patrón de quinina, es 2.2%.

En nuestro experimento se demuestra un rango de excitación 350-370 y rango de emisión 500-520 nm respectivamente. El rendimiento cuántico de fluorescencia, es del 1% respecto patrón de Calceína, calculado mediante la expresión II.

Los resultados de mismo modo que en GQDs se consideran una estimación adecuada pues se han llevado a cabo sobre el producto bruto sin purificación.

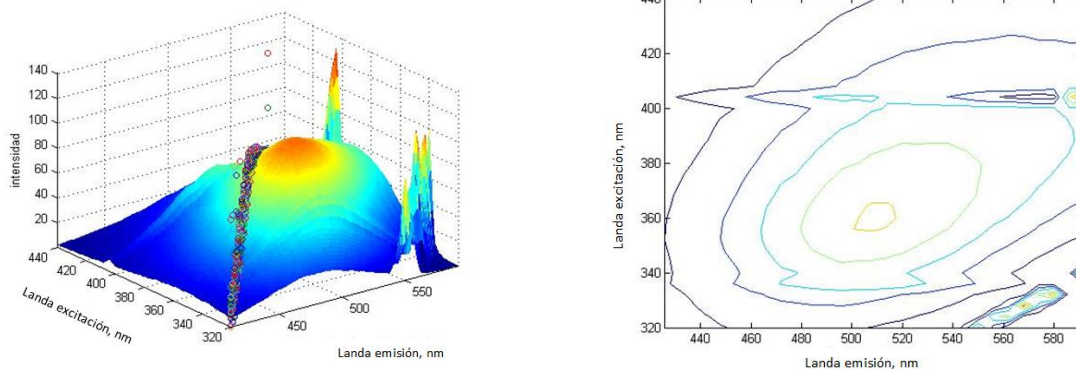


FIGURA 9: ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE GRAFENO OXIDADO 1MG/ML. UNIDADES DE INTENSIDAD ARBITRARIAS

d. OTROS ESPECTROS

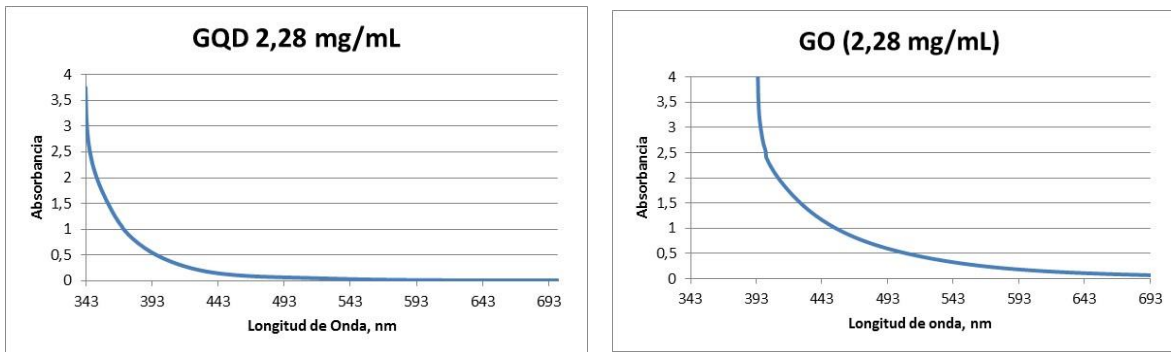


FIGURA 10: Espectros de absorción molecular UV-VIS de Grafeno y Grafeno Oxidado.

3. LECTURA DIGITAL DE LA FLUORESCENCIA

a. INFLUENCIA DE FACTORES DEL MONTAJE

En este apartado se presentan los resultados del estudio de la influencia de los factores más importantes en el procedimiento. Los siguientes factores se han incluido:

- **Fuente iluminación:** Lámpara LED (azul, rango 400-500 nm, máximo a 450 nm).
- **Fondo-color:** Negro o Blanco.
- **Tipo de Cámara:** Compacta, Web-cam y Réflex.
- **Filtro de radiación:** Filtro amarillo: con transmisión óptima a 510 nm
- **Tipo de recipiente:** cubeta o pocillo.

*Otras condiciones se han experimentado, pero se resumen.

Para realizar el estudio se han preparado rectas de calibrado en las condiciones que se dan en la tabla:

Rango dinámico			
disol	R-Calcn, mol/l	NaOH, mol/L	Ca , µg/L (ppb)
bl	2,4095E-06	2,153E-07	0,00
1	2,4095E-06	2,153E-07	4,95
2	2,4095E-06	2,153E-07	9,90
3	2,4083E-06	2,152E-07	14,85
Volumen total: 2 mL. pH: 7,4			

TABLA 4: Rango dinámico experimento de comparación de variables.

Los resultados se han evaluado midiendo las características de las rectas de calibrado y siempre sobre el valor G. Así se comparan valores de: pendiente y su desviación estándar, d.e., ordenada y su d.e., coeficiente de correlación y desviación de los residuales, Syx. Solo se consideran los experimentos que ofrecen rectas con $r^2 > 0.9$. En la tabla siguiente se dan los resultados:

- Pendiente= $\Delta G/\Delta Ca$ ur de color x l/ug, d.e. pendiente= mismas unidades, Ordenada= u.r de color, d.e. ordenada= u.r. de ordenada, Syx: d.e. residuales= ur. de color.

					Pendiente	s Pendiente	ordenada	s ordenada	r2,>0.9	Syx
CUBETAS	Fondo Negro	Fibra	canon	Sin Filtro	-4895,87	490,297	209,613	5,242	0,990	3,431
			canon	Con Filtro	-3569,39	229,491	147,448	2,454	0,996	1,606
		Nikon Reflex	Sin Filtro							
		Nikon Reflex	Con Filtro	-5040,05	506,697	155,114	5,418	0,990	3,545	
		Web Cam	Sin Filtro							
		Web Cam	Con Filtro	-824,64	54,037	26,084	0,578	0,996	0,378	
	Lampara	canon	Sin Filtro							
		canon	Con Filtro							
		Nikon Reflex	Sin Filtro	-1133,75	374,306	177,402	4,002	0,902	2,619	
		Nikon Reflex	Con Filtro	-1315,73	197,008	180,043	2,106	0,978	1,378	
		Web Cam	Sin Filtro	-534,90	120,817	44,973	1,292	0,951	0,845	
		Web Cam	Con Filtro	-402,22	17,679	26,695	0,189	0,998	0,124	
POZOS	Fondo Negro	Fibra	canon	Sin Filtro	673,14	161,915	9,703	1,731	0,945	1,133
			canon	Con Filtro	580,79	46,427	17,170	0,496	0,994	0,325
		Nikon Reflex	Sin Filtro	1882,37	153,298	68,462	1,639	0,993	1,073	
		Nikon Reflex	Con Filtro	2792,92	595,883	56,139	6,371	0,956	4,169	
		Web Cam	Sin Filtro							
		Web Cam	Con Filtro							
	Lampara	canon	Sin Filtro							
		canon	Con Filtro							
		Nikon Reflex	Sin Filtro							
		Nikon Reflex	Con Filtro							
		Web Cam	Sin Filtro							
		Web Cam	Con Filtro							
	Fondo Blanco	Fibra	canon	Sin Filtro	4171,42	656,746	107,854	7,022	0,976	4,595
			canon	Con Filtro	958,04	40,869	6,640	0,437	0,998	0,286
		Nikon Reflex	Sin Filtro	3780,79	982,885	128,999	10,509	0,937	6,877	
		Nikon Reflex	Con Filtro							
		Web Cam	Sin Filtro							
		Web Cam	Con Filtro							
Lampara	canon	Sin Filtro								
	canon	Con Filtro								
	Nikon Reflex	Sin Filtro	-2726,35	666,735	191,602	7,129	0,944	4,665		
	Nikon Reflex	Con Filtro								
	Web Cam	Sin Filtro								
	Web Cam	Con Filtro								

Imagen tipo de experimento:

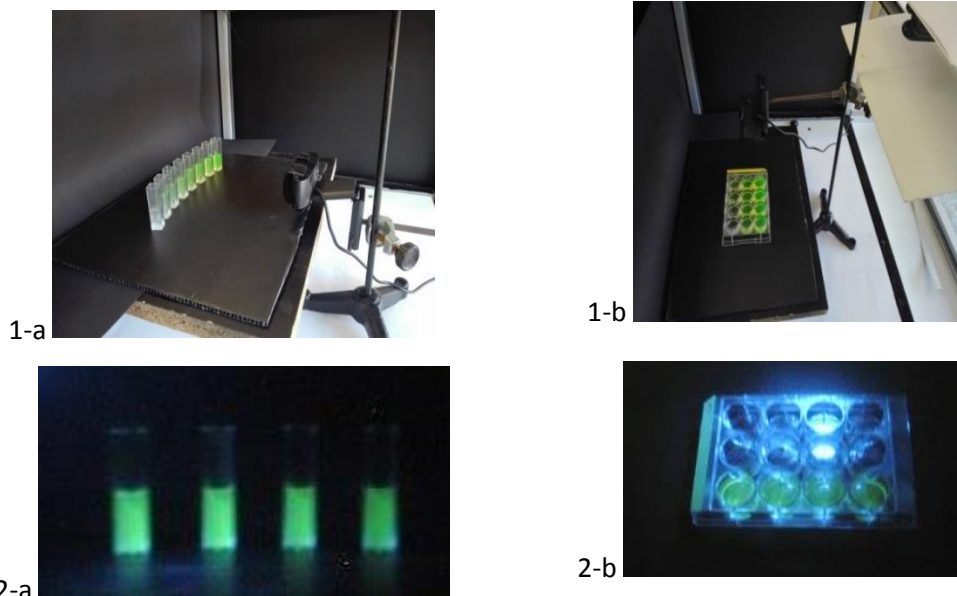


IMAGEN 4: Montaje para captura de imagen sobre cubetas (1a) y pozos(1b).

Imagen de cubetas con fuente de iluminación LED 2-a - Imagen de pozos con iluminación LED y fibra óptica 2-b. Sensor web-Cam.

Los resultados sobre los valores de las pendientes se muestran en la gráfica:

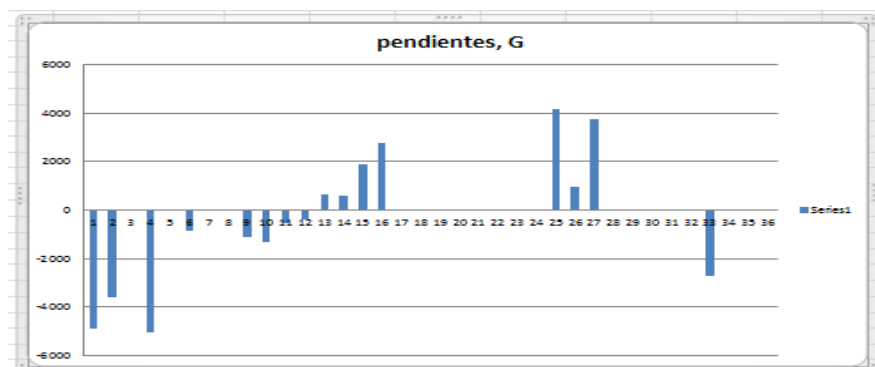


FIGURA 12: Comparación de pendientes para el estudio de factores.

En los resultados se evidencia la influencia sobre la magnitud de la pendiente y sobre el signo. Se aprecia la diferencia de signo al cambiar de cubetas a pozos, negativas y positivas respectivamente, consecuencia de la necesidad de medir fluorescencia con ángulo de 90° entre fuente de iluminación y sensor. Esta configuración, como se parecía en la imagen 4 solo es posible para las cubetas.

En las siguientes imágenes se muestra la influencia de cámara y del formato de la imagen, jpg y raw.

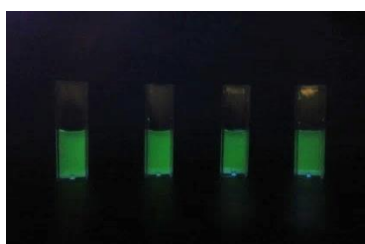


IMAGEN 5: Cámara compacta: Canon, formato jpg

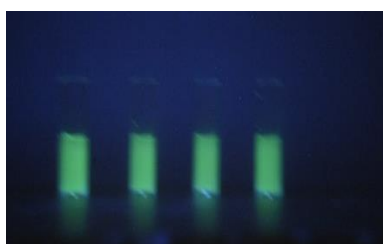


IMAGEN 6: Reflex Nikon, formato raw



IMAGEN 7: Web Cam Logitech, jpg

Los resultados evaluados sobre las rectas de calibrado, y sobre el valor G, se muestran en la figura siguiente:

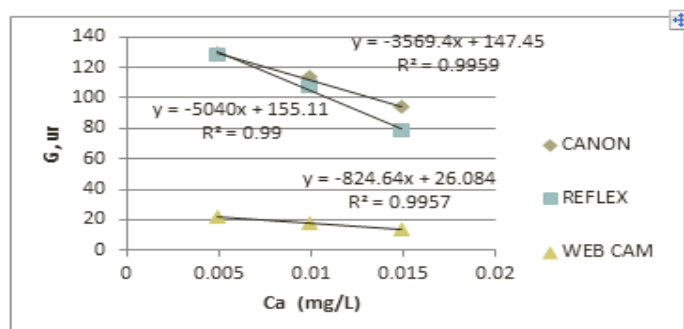


FIGURA 13: Rectas de calibrado sobre color G, Verde, en función de tres tipos de sensores (cámaras)

Como se puede apreciar, la cámara que aporta la mayor sensibilidad es la cámara réflex; que trabaja en formato **raw**. En **estos formatos** la imagen está sin tratar y sin pérdida de información. Aun así, las tres cámaras nos proporcionan rectas de calibrado con una buena linealidad. Es la web cam la que proporciona una menor señal y una menor sensibilidad.

Se repite el experimento pero en este caso con iluminación LED y sin fibra de vidrio.

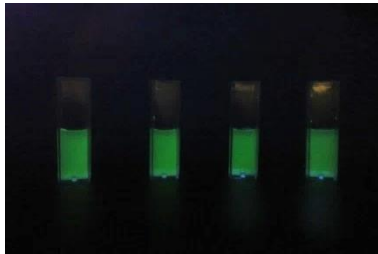


IMAGEN 8: Cámara compacta: Canon, formato jpg

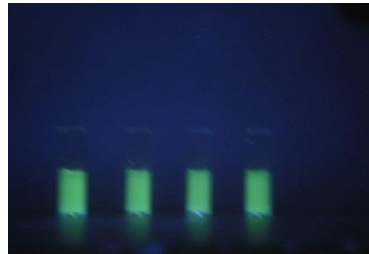


IMAGEN 9: Reflex Nikon, formato raw

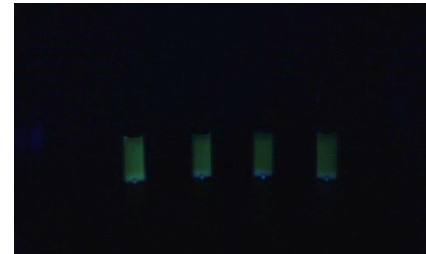


IMAGEN 10: Web Cam Logitech, jpg

Los resultados muestran la misma tendencia: el formato raw (cámara réflex) aporta la mayor sensibilidad. En cambio, con webcam se obtiene menor señal y sensibilidad. La cámara compacta Canon con formato jpg se encuentra entre estas dos.

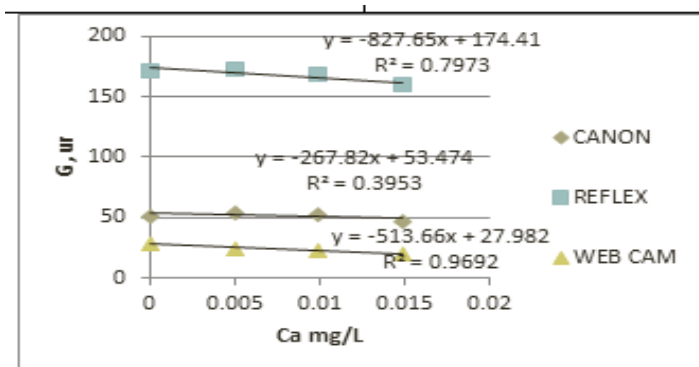
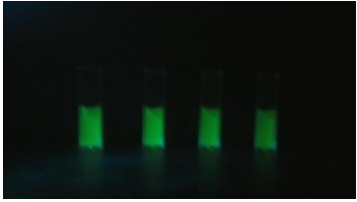
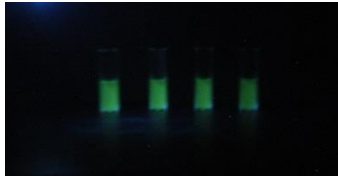

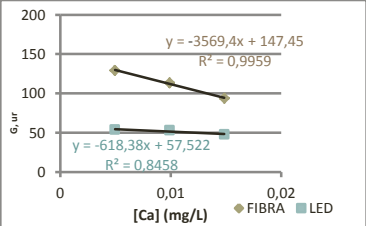
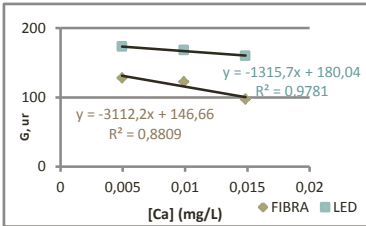
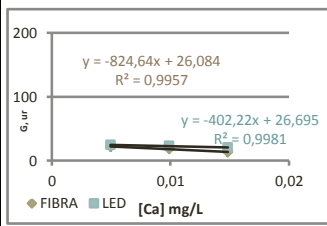


FIGURA 14: Rectas de calibrado sobre color G. Se utilizan los tres tipos de sensores (cámaras).

En el siguiente apartado se estudia la influencia de la iluminación: Lámpara LED azul o luz a LED azul pero dirigida y focalizada con fibra óptica.

El LED y la fibra permite dirigir mejor la luz hacia las cubetas. Con lámpara LED, la iluminación es más homogénea en toda la zona de trabajo. Las imágenes tomadas muestran los resultados con las tres cámaras y usando filtro amarillo.

	Canon	Nikon Reflex	Web cam-
LED			

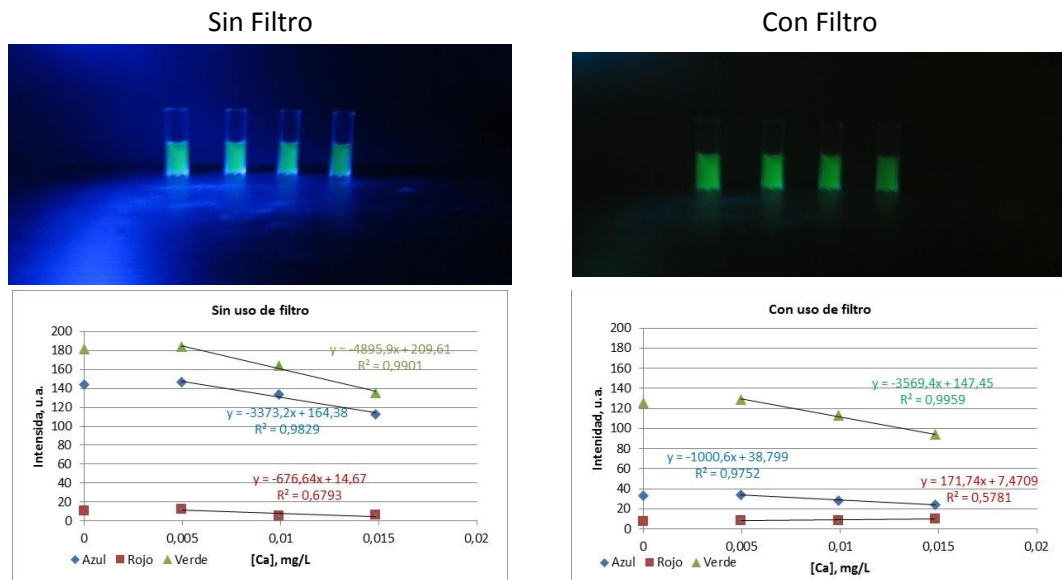
Fibra óptica			
Representación			

Se pone de manifiesto que, para las tres cámaras, se obtiene mejor sensibilidad, mayor pendiente, mediante iluminación con fibra óptica, pero con peor coeficiente de correlación. Es decir, la curva de calibración es menos recta. Esto se justifica porque la iluminación por fibra óptica es más focalizada pero menos uniforme. En cambio, con la lámpara LED la iluminación es más uniforme, y aunque la sensibilidad es menor la curva de calibración tiene una buena linealidad.

Una forma de aprovechar las propiedades interesantes de la fibra óptica es tomando la foto cubeta a cubeta. De esta forma, todas las cubetas estarán iluminadas de la misma forma.

Por último, vamos a ver la influencia de utilizar filtro a la hora de captar las imágenes.

En el siguiente experimento se muestra la imagen captada con la cámara compacta Canon, en cubeta y con iluminación de fibra óptica, con filtro y sin filtro



El gráfico representa claramente las tendencias sobre los tres colores primarios (RGB). En el gráfico correspondiente a la imagen sin filtro, el color azul tiene un gran protagonismo, aunque es el verde el dominante. Mediante el filtro, se pierde intensidad en el verde, pero su perfil es el mismo. Y se evidencia que el color azul se ha reducido en un 60%.

En la siguiente figura se comparan las pendientes del color verde para las dos imágenes:

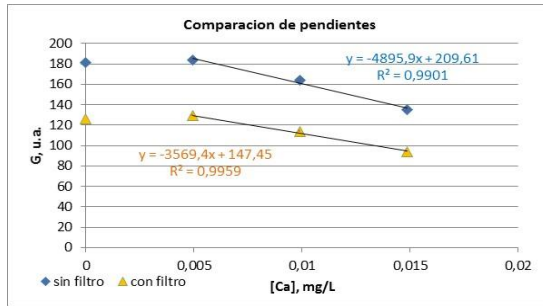


FIGURA 15: Rectas de calibrado sobre color G, Verde.

En el experimento siguiente se captura la imagen con webcam, tanto con fuente de iluminación LED y confinamiento con fibra óptica como con lámpara LED.

	Fibra óptica	Lámpara LED
Sin Filtro		
Con Filtro		
Representación		

Se observa que la lámpara produce una iluminación homogénea. Mientras que la fibra óptica ilumina a solo una zona concreta. Esto no obstante no impide que los experimentos con fibra óptica tengan alta sensibilidad. El uso del filtro también disminuye la sensibilidad, pero también disminuye la ordenada en el origen. Las tendencias muestran que con el uso de filtro y fibra se gana en linealidad en la recta de calibrado, ahora bien se pierde en intensidad y en reproducibilidad.

4. EVALUACION QUIMIOMETRICA DE LA FLUORESCENCIA

a. ANÁLISIS FACTORIAL Y VARIANZA CROMÁTICA

Se ha preparado una experiencia tipo de fluorescencia. En la tabla se dan las concentraciones. Las imágenes fueron tomadas con iluminación de lámpara LED y con filtro y se han utilizado Cámaras Compacta Canon, Webcam y Reflex Nikon.

Rango Ca(II)				
disol	Calcn, mol/l	NaOH, mol/L	Ca PATRÓN, mg/L	Ca PATRÓN, µg/L (ppb)
bl	3,3733E-06	4,000E-05	0,0000	0,00E+00
1	3,3733E-06	4,000E-05	0,0297	7,43E-01
2	3,3733E-06	4,000E-05	0,0396	9,90E-01
3	3,3733E-06	4,000E-05	0,0594	1,49E+00
4	3,3733E-06	4,000E-05	0,0792	1,98E+00
5	3,3733E-06	4,000E-05	0,0990	2,48E+00
6	3,3733E-06	4,000E-05	0,1188	2,97E+00
7	3,3733E-06	4,000E-05	0,1403	3,51E+00
Volumen total: 2 mL. pH del medio: 7,4				
Cámaras: Canon, webcam, Reflex Nikon.				

Se calcula la varianza cromática que cada cámara puede capturar. Este valor se obtiene de la matriz de varianza-covarianza de los colores obtenidos en el experimento de calibración. Y el resultado es indicativo de la sensibilidad y potencialidad analítica.

Por otra parte la reducción de las variables cromáticas RGB a Componentes principales, permite reconocer las tendencias de las variables RGB a través de su representación vectorial.

Los resultados para la Webcam se ofrecen en la **tabla 5**:

MATRIZ VARIANZA-COVARIANZA				Loading of initial color variables						
	B	R	G	COMPONENTE	B	R	G	var	%var	%var acum
varianza	2,346	33,620	107,313	PC1	0,57386286	0,58157538	0,57658607	2,95313788	98,4379295	98,4379295
% Var	1,637	23,464	74,898	PC2	0,76857959	-0,1393506	-0,62439317	0,04646015	1,54867163	99,9866011
				PC3	-0,28278408	0,80146833	-0,5269551	0,00040197	0,01339891	100

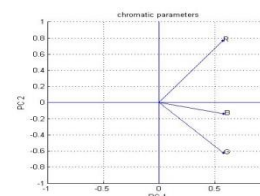


Tabla 5. Varianza cromática utilizando como sensor webcam, y su reducción a PC's.

Los resultados obtenidos demuestran que:

- La matriz de covarianza-varianza, señala al color G como el de mayor varianza cromática del sistema, aprox. 75%, y por tanto, presenta una gran potencialidad en su sensibilidad analítica.
- La varianza del sistema se proyecta hasta el 99.986% en solo dos componentes principales, siendo el más significativo el PC1 con un 98.43%.
- El PC1 está correlacionado con las tres componentes, mientras que el PC2 está muy correlacionado R.
- Las tendencias-informaciones de los colores RGB son distintas con matices. Los colores B y G presentan una clara proximidad y por tanto una mayor similitud en su información.

Para otras cámaras

MATRIZ VARIANZA-COVARIANZA				Loading of initial color variables					chromatic parameters		CAMERA
	B	R	G	COMPONENTE	B	R	G	var	%var	%var acum	
varianza	1,452	16,740	12,738	PC1	0,53725252	0,5572301	0,63313059	2,45599814	81,8666045	81,8666045	NIKON
% Var	4,695	54,123	41,183	PC2	0,74345061	-0,66737485	-0,04349712	0,51969188	17,3230627	99,1896673	
				PC3	-0,39829752	-0,49407026	0,77282188	0,02430998	0,81033274	100	
varianza	1,420	41,663	19,743	PC1	0,6014094	0,56002737	0,56980354	2,76117835	92,0392784	92,0392784	CANON
% Var	2,260	66,315	31,426	PC2	-0,0737898	0,74908567	-0,65835076	0,23882165	7,96072157	100	
				PC3	0,79552611	-0,35389265	-0,49183147	0	0	100	

Es decir, se puede apreciar que la cámara influye de modo importante sobre la varianza cromática. En la imagen se muestra la relación de varianza capturada.

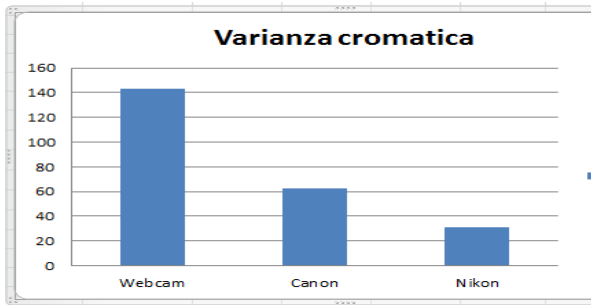


Figura 16: varianza capturada según el tipo de cámara, en ur² de color G.

La web Cam en las condiciones de trabajo utilizadas captura la mayor varianza cromática. La relación entre ellas es de reducirse prácticamente a la mitad.

b. FUENTES DE VARIANZA CROMÁTICA.

La varianza cromática total en este experimento puede ser atribuida a tres fuentes principales:

- El analito que produce la variación de color, Ca(II).
- La cámara o efecto instrumental.
- El método analítico.

$$S_{tot}^2 = S_{cámara}^2 + S_{método}^2 + S_{analito}^2$$

Es decir:

En la **Figura 17** se identifican los componentes de la varianza sobre la imagen de un experimento tipo:

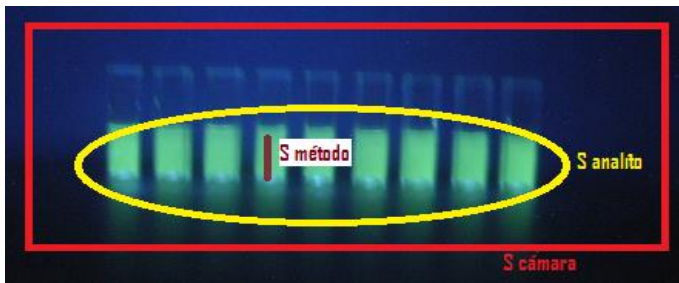


Figura 17. Experimento de rango dinámico. Con iluminación de lámpara Led azul y uso de filtro.

En la **figura 18** se ofrecen los resultados de la distribución de la varianza, realizado mediante ANOVA, para la mejor de las opciones, webcam. También se han obtenido para cámara Reflex.

Var		u.r.	%
analito+cámara		109,81	
Analito		109,63	91,83
B	0,00		0,00
R	2,33		1,96
G	107,30		89,88
Camera		0,17	0,15
B	0,15		0,13
R	0,01		0,01
G	0,01		0,01
Method		9,57	8,02
B	5,45		4,57
R	2,21		1,85
G	1,91		1,60
Total		119,38	100,00

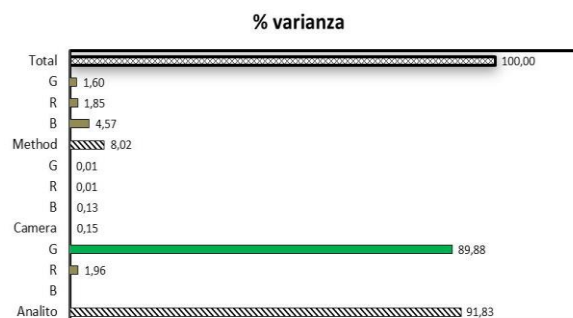


Figura 18. Diagrama de bloques de la participación de los componentes de la varianza cromática para web cam .

Es decir, según cálculos estadísticos se puede demostrar que el método DIC, incluso trabajando en condiciones muy simples en la captura y procesado de la imagen fotográfica, produce una varianza cromática significativa que puede ser atribuida al analito: 91.83%. Y que en este sistema cromático es recogida en su mayoría por el color G. El resto de efectos influyen en menor medida.

5. PRESTACIONES ANALÍTICAS Y CALIBRACIÓN

Con el fin de evaluar las propiedades analíticas del método para las mejores condiciones estudiadas, se prepara la siguiente recta de calibrado.

Rango dinámico				
disol	Calcn, mol/l	NaOH, mol/L	Ca PATRÓN, mg/L	Ca PATRÓN, µg/L (ppb)
bl	3,3733E-06	4,000E-05	0,0000	0,00
1	3,3733E-06	4,000E-05	0,0297	0.743
2	3,3733E-06	4,000E-05	0,0396	0.99
3	3,3733E-06	4,000E-05	0,0594	1,49
4	3,3733E-06	4,000E-05	0,0792	1,98
5	3,3733E-06	4,000E-05	0,0990	2,48
6	3,3733E-06	4,000E-05	0,1188	2,97
7	3,3733E-06	4,000E-05	0,1403	3,51

Volumen total: 2 mL. pH del medio: 7,4

TABLA 6: Experiencia tipo para la determinación de las propiedades analíticas.

a. Rango lineal y prestaciones analíticas para iluminación LED

Eligiendo condiciones de compromiso óptimas: lámpara de iluminación LED, Webcam y utilización de filtro, los resultados se muestran:

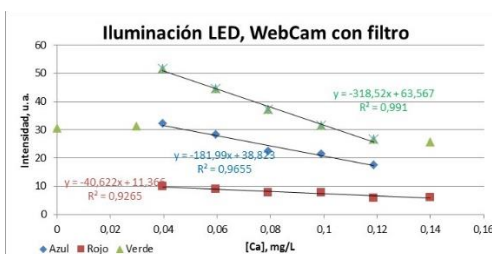
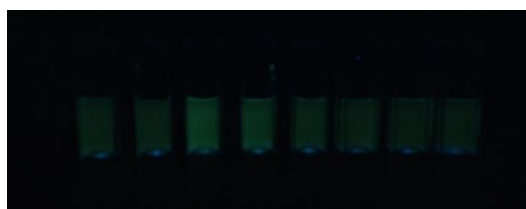


FIGURA 19: Resultados experiencia determinación propiedades analíticas. Sensor Web Cam e iluminación LED

Los resultados muestran las tendencias generales sobre colores RGB. En esto momento se muestra que el color verde presenta mayor sensibilidad, lo cual encaja con la mayor varianza obtenida en el estudio de varianzas.

Teniendo en cuenta estos valores, se ha caracterizado el rango lineal y las prestaciones del sistema cromático. Los resultados se obtienen a partir de las experiencias de rango dinámico en las que se reduce oportunamente el intervalo de ajuste.

La componente verde consigue una mayor sensibilidad. Su recta de regresión se caracteriza por los siguientes valores:

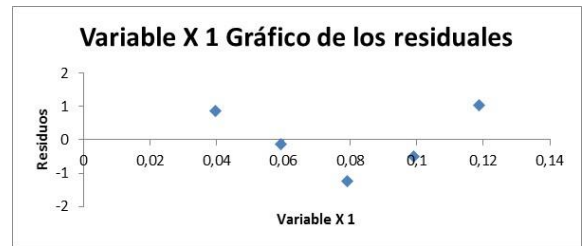
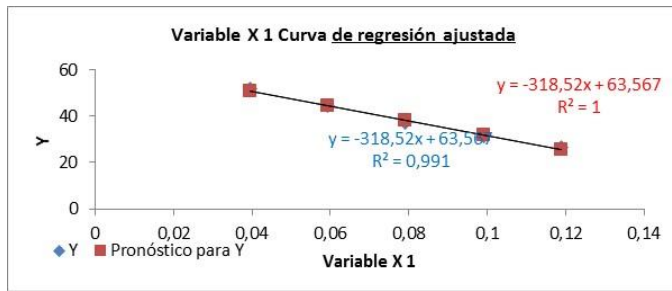


FIGURA 20: Gráfico de los residuales G

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,995480454
Coefficiente de determinación R ²	0,990981334
R ² ajustado	0,987975112
Error típico	1,098443343
Observaciones	5

TABLA 7: Ajuste estadístico para el color G

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	397,7404444	397,7404444	329,643436	0,000364486
Residuos	3	3,619733333	1,206577778		
Total	4	401,3601778			

La calidad de la regresión se verificó mediante el estudio estadístico de los residuos.

Análisis de los residuales			
Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Residuos estándares
1	50,95333333	0,853333333	0,897037126
2	44,64666667	-0,14	-0,147170153
3	38,34	-1,246666667	-1,310515176
4	32,03333333	-0,5	-0,525607691
5	25,72666667	1,033333333	1,086255895

Estudio estadístico de los residuos para G

De los resultados anteriores se deduce que:

- Sensibilidad, como la pendiente de la recta: -318.52 ur· l/mg
- Sensibilidad analítica, definida como 'sensibilidad/error típico', es -289.973 l/mg
- Límite Máximo de Linealidad, LML: 0.12 mg/l
- Desviación estándar del método, como error típico: 1.0984 ur
- Límite de detección, LD: 0.0103 mg/l, calculado como: LD= (3·x G_{blanco})/pdte recta.
- Límite de cuantificación, LQ: 0.0345 mg/l, como: LQ=10·LD/3
- Intervalo lineal de la regresión; 0.07-0.12 mg/l

Así mismo se estudia la recta mediante espectrofluorimetría, obteniendo la excitación y emisión a condiciones óptimas: 493-510 nm respectivamente. Y se compara frente a la regresión con G.

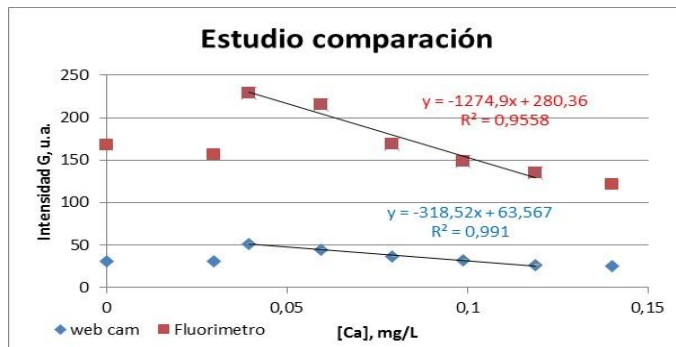


FIGURA 21: Estudio comparación sensor Web Cam frente a Espectrofluorímetro como referencia.

6.- APLICACIÓN DEL MÉTODO. DETERMINACIÓN DE CALCIO EN AGUA

a. MUESTRA

Se analiza calcio en una muestra de agua mineral comercial cuyo contenido en calcio indicado es 37,7 mg/L. No requiere tratamiento de muestra. Se prepara una dilución de acuerdo a la trazabilidad: la muestra se diluye 5 veces (1 volumen de muestra: (+4vol) 5 volúmenes totales) con agua destilada.

b.- RESULTADOS

Se desarrolla una nueva experiencia de complejo de Ca(II) con Calceína en las condiciones de referencia y se mide de nuevo fluorescencia utilizando **cámara web y Cámara Nikon**. La calibración estándar se lleva a cabo en las condiciones apropiadas (con Lámpara LED azul y filtro amarillo). La siguiente gráfica muestra el rango de la experiencia.

disol	Calcín, mol/l	NaOH, mol/L	Ca PATRÓN, ug/L	Ca PATRÓN, umol/L
blanco	2,9911E-06	2,759E-04	0,0000	0
1	2,9911E-06	2,759E-04	25,0406	0,63
2	2,9911E-06	2,759E-04	34,1462	0,85
3	2,9911E-06	2,759E-04	45,5283	1,14
4	2,9911E-06	2,759E-04	56,9103	1,42
5	2,9911E-06	2,759E-04	68,2924	1,71
6	2,9911E-06	2,759E-04	85,3655	2,13

TABLA 8: Recta de calibrado para la determinación de Calcio en Agua mineral.


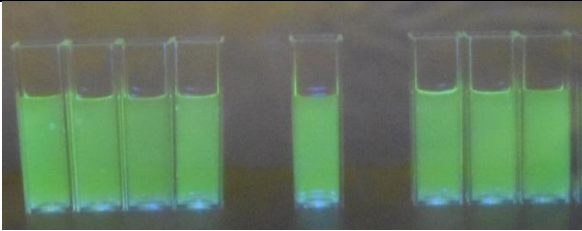
	
<i>Figura: imagen sobre Web Cam</i>	<i>Figura: imagen sobre Nikon D3400 reflex</i>
<i>Regresión: $Y = 3.418X + 14.392$</i>	<i>$Y = 16.381 X + 146.1$</i>
<i>$Y = \text{Color G ur.}, X = \text{Ca(II) ug/l}$</i>	<i>$Y : \text{color G ur.}, X \text{ Ca ug/l}$</i>

FIGURA 22: Imágenes tomadas con Web Cam y Nikon respectivamente, así como los resultados de regresión.

Valores para la muestra

	Intensidad G, ur
Web Cam	17,066
Nikon	176,466

Deducción del contenido de la muestra:

	Ca(II) umol/L cubeta	umol/L muestra	mg/L	Intervalo confianza, mg/L
Web cam	0,78	567,33	22,69	0,37
Nikon con filtro	1,85	1344,07	53,76	1,39

i.c.: $t s/\sqrt{n}$, para P 0.05, n = 3 réplicas.

c.- VALIDACIÓN

Se procede al análisis de la misma experiencia de calibración mediante el uso de espectrofluorimetro como método de referencia.

La regresión con el espectrofluorimetro responde a: $Y = 31.434 X + 42.185$

$Y = \text{Intensidad de emision a 510 nm, ur.}, X = \text{Ca(II) ug/l}$

Los resultados conducen:

	Intensidad muestra, ur.	umol/L cubeta	umol/L muestra	mg/L	Intervalo confianza (al 95%) mg/L
Espectrofluorimetro	113,14	2,26	1636,59	65,46	0,55

i.c.: $t s/\sqrt{n}$, para $P 0.05$; $n = 3$ réplicas.

La comparación de los resultados puede verse en la figura:

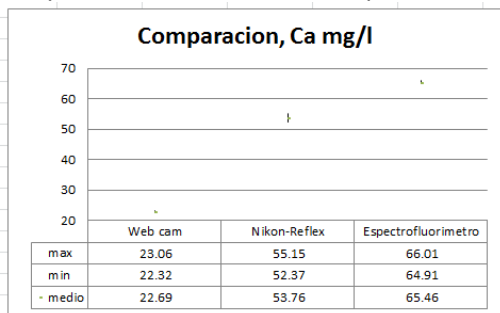


Figura 23: comparación grafica de los resultados de los tres métodos. Valor medio con el intervalo de confianza.

Los resultados muestran una concordancia entre la medida con cámara Reflex y el Espectrofluorimetro. Sin embargo, existe gran diferencia con el resultado de la Web-Cam.

Una comparación mediante test t, tomando como referencia el método espectrofluorimetro produce el resultado:

compara test t	valor conocido	valor medio	t teorico,P0.05	t exp
fluorimetro	a comparar			
	65.46	53.76	4.30	36.22
		s	P	
		0.56	0.00035	

Tabla 9: resultados de la comparación con test t.

Es decir, el valor t_{exp} supera al t teórico, para el nivel de $P 0.05$. Por tanto, se puede decir que hay una diferencia estadísticamente significativa, para el nivel del 95% de confianza. Si se evalúa la probabilidad de que las diferencias sean debidas a un efecto aleatorio, se obtiene un valor de $P 0.00035$, es decir 0.03%.

Estos resultados son interpretados como una experiencia inicial en la que se muestran tendencias coincidentes y por tanto prometedoras. Y que deberán ser tenidas en cuenta en próximos trabajos. Y que permitirán optimizar y mejorar los procedimientos.

Capítulo IV: Conclusiones y Bibliografía

Como principales **conclusiones** del trabajo se destaca:

- Se ha demostrado la ventaja de la utilización de sustancias fluorescentes, Grafeno, en la determinación de sulfitos mediante la reacción de Boedecker por determinación colorimétrica, no tanto en las propiedades analíticas, si en las condiciones experimentales.
- En cuanto a las condiciones experimentales para la determinación de Calcio por fluorescencia por un método colorimétrico se ha demostrado la necesidad del uso de cubetas (y no pozos) debido a la geometría del sistema.
- Se ha demostrado la necesidad y la mejora en los resultados de la utilización de filtros de corte en los sensores a la hora de tomar las imágenes digitales.
- Se ha demostrado el futuro prometedor de las ventajas de la utilización de fibra óptica como fuente de iluminación, así como la utilización de un formato de imagen de datos tratados al mínimo, formato RAW.
- Se ha puesto a punto un método de determinación de Calcio en agua mineral dando buenos resultados con cámara Nikon y fuente de iluminación LED.

BIBLIOGRAFIA

¹ A. López Molinero, et al, Chem, Intell lab Syst, 2016,

² A. López Molinero, et al, Talanta, (2013, 103, 236–244)

³ A. López Molinero, et al, Microchem J (2010, 96, 380-385)

⁴ M. Eriksson, Sensors and Actuators B (2013, 185,354-362)

⁵ W.Li,et al, Anal. Methods. (2016, 8, 2887-2894)

⁶ W. S. Lyra, et al, Anal. Methods,(2011,3,1975-1979).

⁷ M.A. Gómez, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2009)

⁸ Lorena Gomez, Trabajo Fin de Grado, Univ Zargoza, Fac Ciencias, 2016.

⁹ Norma UNE-EN, 1988-1-2000. Métodos alimentarios. Determinación de sulfitos. Parte 1- Método Monier-Williams optimizado.

¹⁰ J. Jiménez, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2009)

¹¹ M. Pérez, Postgrado de Iniciación a la Investigación, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2014)

¹² P. Berlín, Trabajo fin de Grado, Univ. Zaragoza, Fac. Ciencias (2015)

¹³ L F. Capitan , N.Lopez-R,A Martinez-O, M.M. Erenas, A. J. Palma Anal. Chim.acta,(2015),899,23-56.

¹⁴ Wallach, D., Surgenor, D., Soderberg, J. and Delano, E. (1959). Preparation and Properties of 3,6-Dihydroxy-2,4-bis-[N-N'-di-(carboxymethyl)-aminomethyl] fluoran. *Analytical Chemistry*, 31(3), pp.456-460.

¹⁵ Benítez-Martínez, S. and Valcárcel, M. (2015). Graphene quantum dots in analytical science. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 72, pp.93-113.

¹⁶ Dong, Y., Shao, J., Chen, C., Li, H., Wang, R., Chi, Y., Lin, X. and Chen, G. (2012). Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. *Carbon*, 50(12), pp.4738-4743.

¹⁷ Jacob Q. Umberger, Victor K. LaMer. (1945). The Kinetics of Diffusion Controlled Molecular and Ionic Reactions in Solution as Determined by Measurements of the Quenching of Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, 67 (7), pp 1099–1109

¹⁸ Song, L., Shi, J., Lu, J. and Lu, C. (2015). Structure observation of graphene quantum dots by single-layered formation in layered confinement space. *Chem. Sci.*, 6(8), pp.4846-4850.

¹⁹ Zuo, P., Lu, X., Sun, Z., Guo, Y. and He, H. (2015). A review on syntheses, properties, characterization and bioanalytical applications of fluorescent carbon dots. *Microchimica Acta*, 183(2), pp.519-542.