

Autor:

Andrés Delgado
Domínguez

Tutores:

José Manuel Quero Reboul,
Francisco Antonio Perdigones Sánchez

Fecha:

12 /02/2025

Diseño, desarrollo, calibración y validación de un espectrómetro portátil



Departamento de Electrónica
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla



Índice



Fundamentos

- Espectrometría.
- Espectrómetro.
- Ley de Lambert beer.
- Fluorescencia.
- Amplificación de AND mediante PRC y LAMP.
- Lab-on-chip.



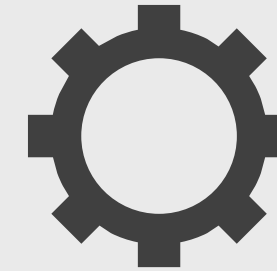
Evaluación

- Caracterización de los ensayos.
- Prueba para espectrometría de emisión.
- Prueba para espectrometría de absorción.



Mediciones

- Medidas de ensayos PCR.
- Medidas de ensayos LAMP.



Fototranstistor

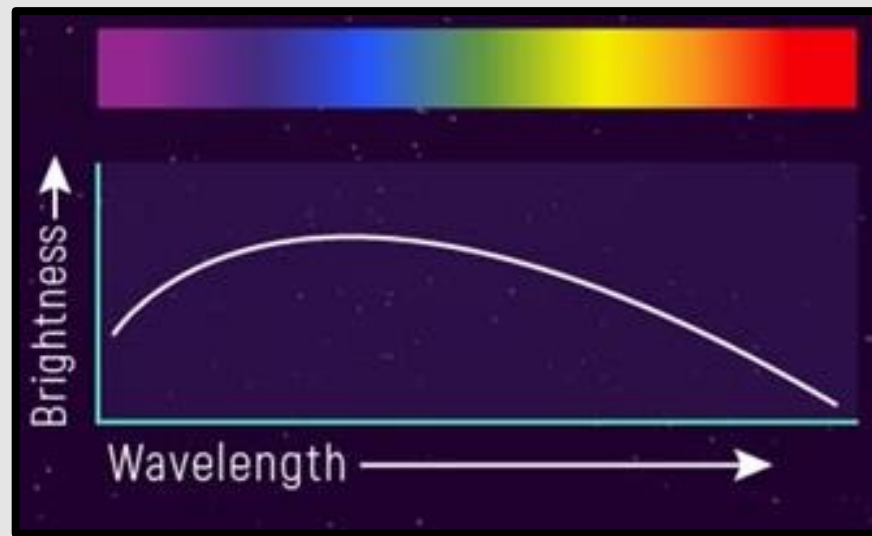
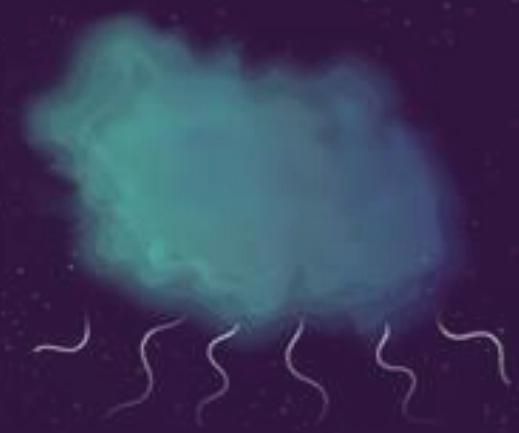
- Disposición del equipamiento.
- Medición de fuentes lumínicas.
- Primer ensayo.
- Diseño del circuito.
- Ensayo acondicionado.



Conclusiones

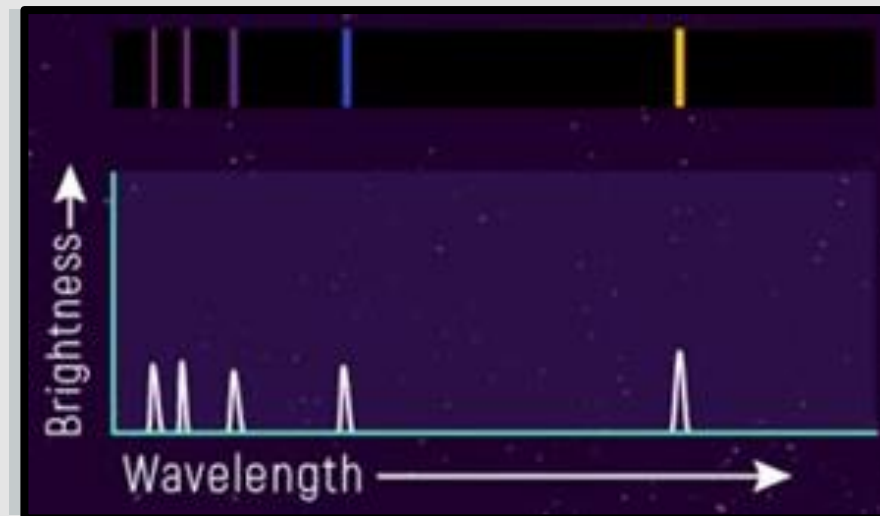
- Conclusiones.
- mejoras.

Espectrometría



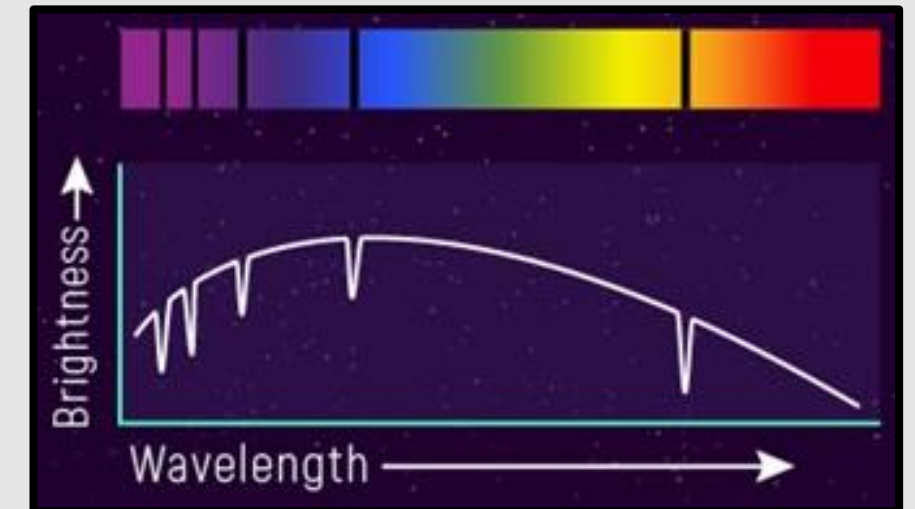
Espectro continuo

- En el TFG asociado a fuentes lumínicas.



Espectrometría de emisión

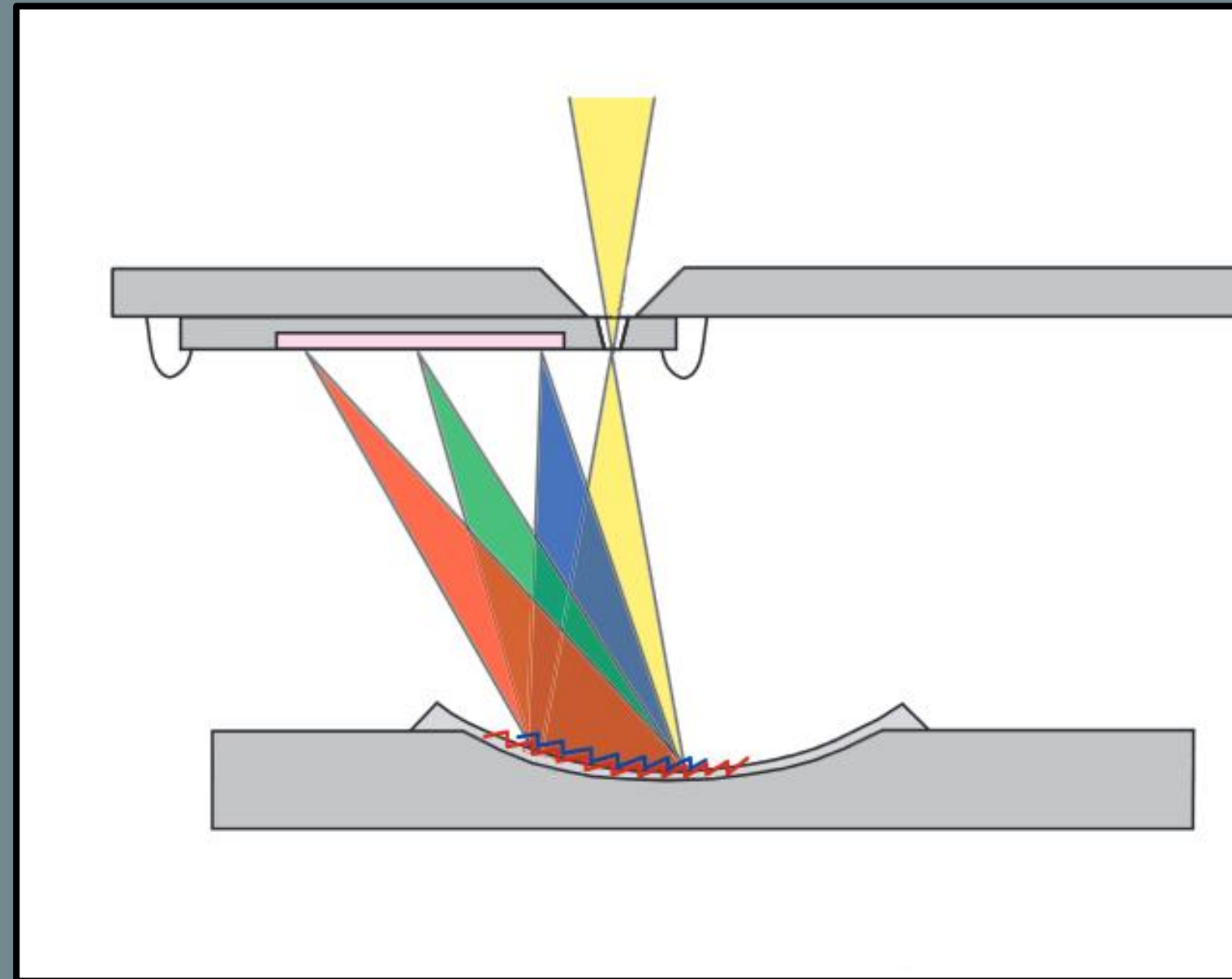
- En el TFG asociada a PCR y fuentes lumínicas.



Espectrometría de absorción

- En el TFG asociada a LAMP.

Espectrómetro



Hamamatsu C13985



Hamamatsu C12880MA

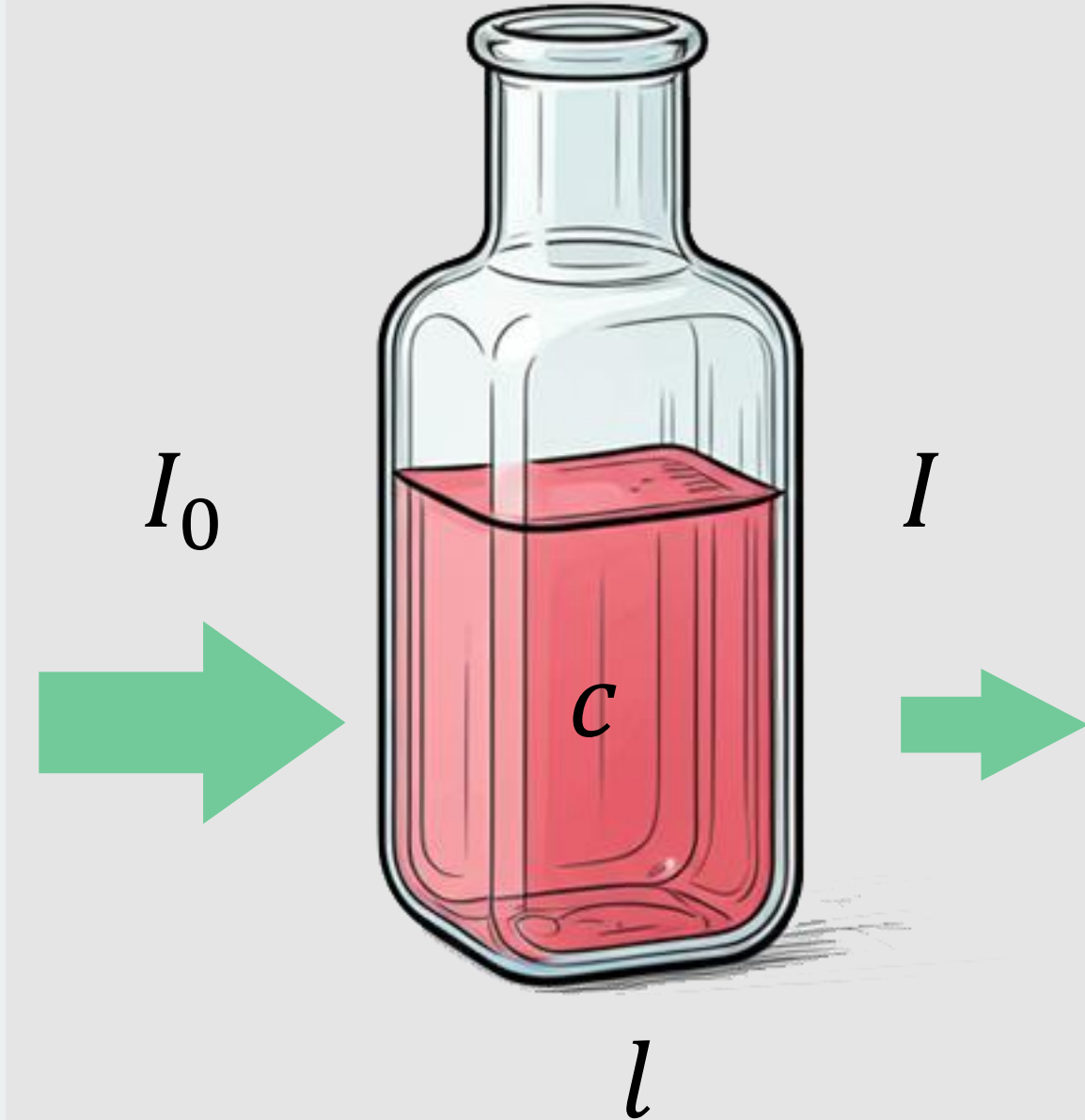
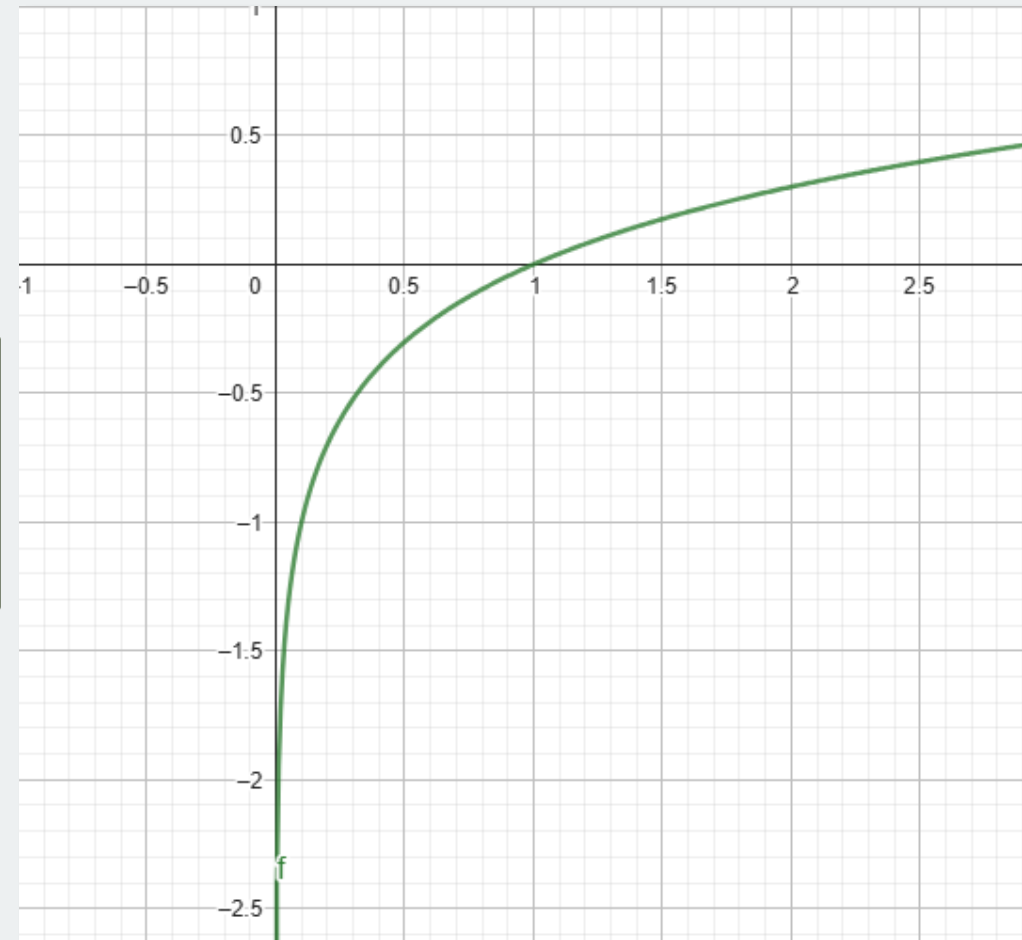
Algunos parámetros de interés:

- ❑ Rango de respuesta espectral: [340,850]nm
- ❑ Resolución espectral: Typ 12, Max 15nm

Ley de Lamber-Beer.

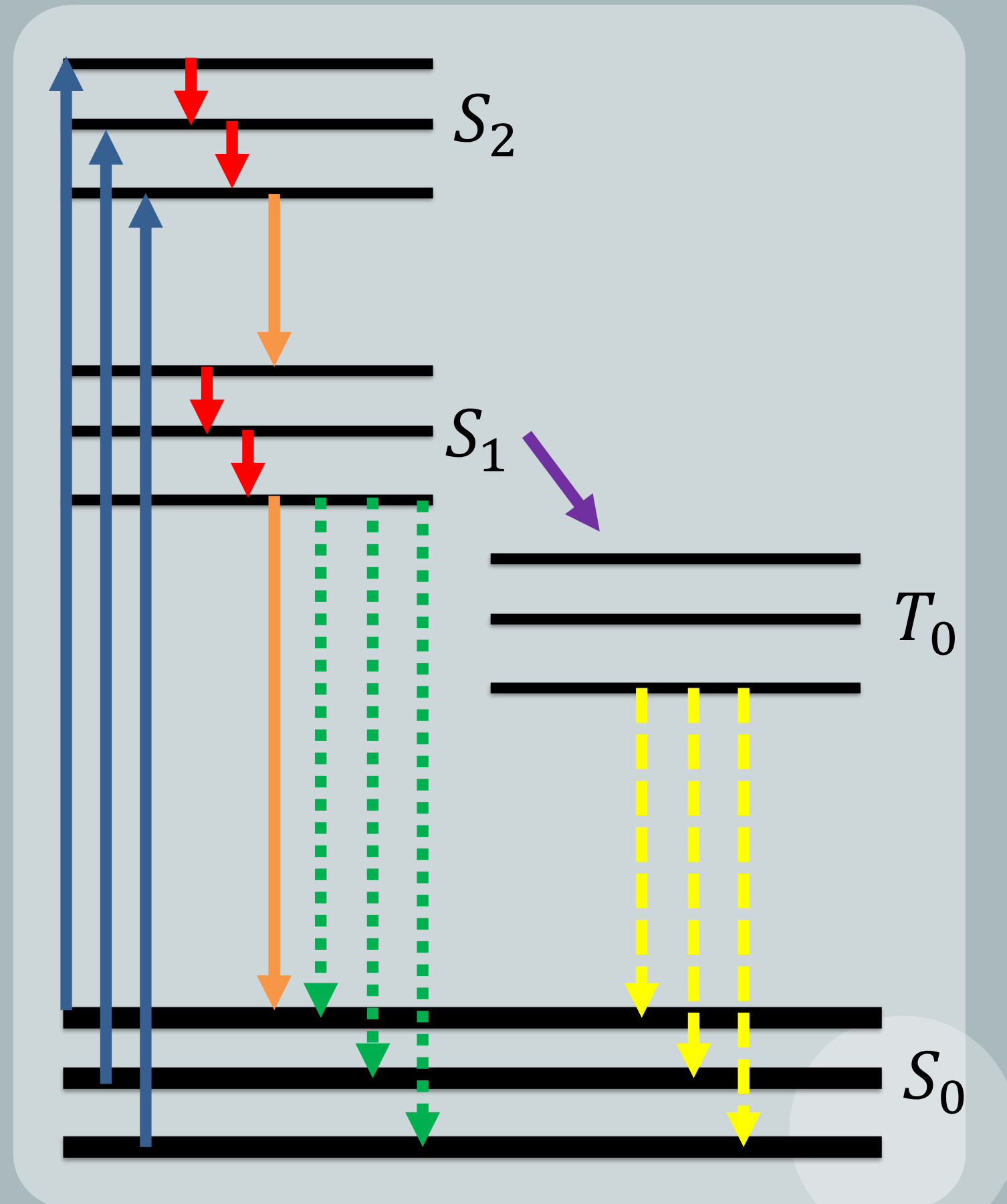
$$T(\%) = \frac{I}{I_0} \cdot 100; T = \frac{I}{I_0}; \forall T \in [0,1]$$

$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right); \forall A \in [0,2]$$



Fluorescencia

Diagrama de Jablonski



- Estado fundamental
- Estados excitados
- Absorción
- Fluorescencia
- Fosforescencia
- Cruce entre sistemas
- Conversión interna
- Relajación vibracional

Amplificación de ADN

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

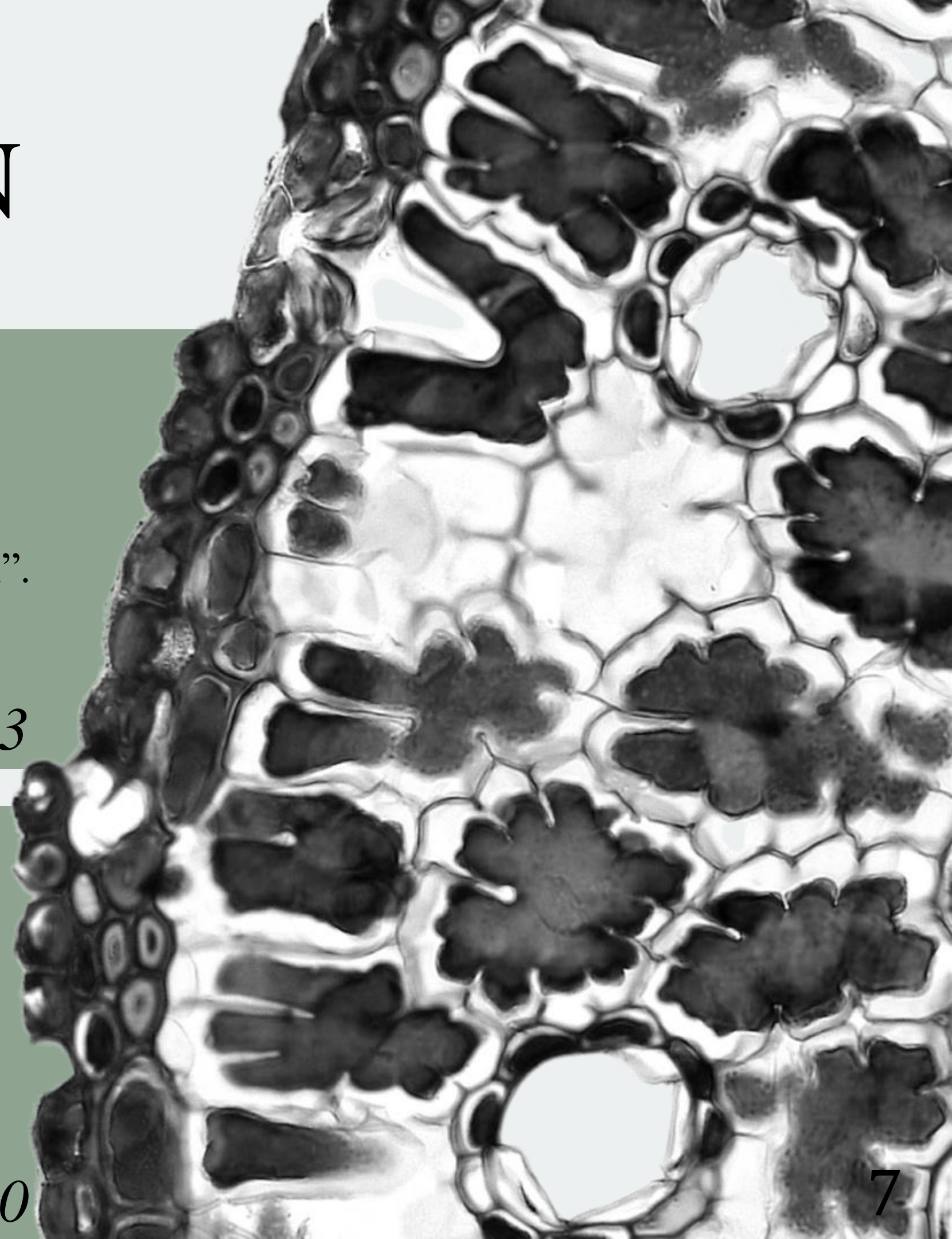
- ❖ Variación de la temperatura en el proceso.
- ❖ Agente intercalante de ADN fluorescente: “SYBRSafe DNA gel Stai”.
- ❖ Detección mediante espectrometría de emisión (fluorescencia).

Absorción máxima en 502nm, emisión en torno a 530nm. 1983

LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*)

- ❖ Proceso isotérmico.
- ❖ WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG.
- ❖ Detección mediante espectrometría de absorción. Absorbancia

máxima en 430 y 560nm. 2000



Tecnología LOC

- ❖ Espacio de trabajo común entre la microfluídica y la microelectrónica.
- ❖ PMMA como material utilizado para la construcción de LOC.

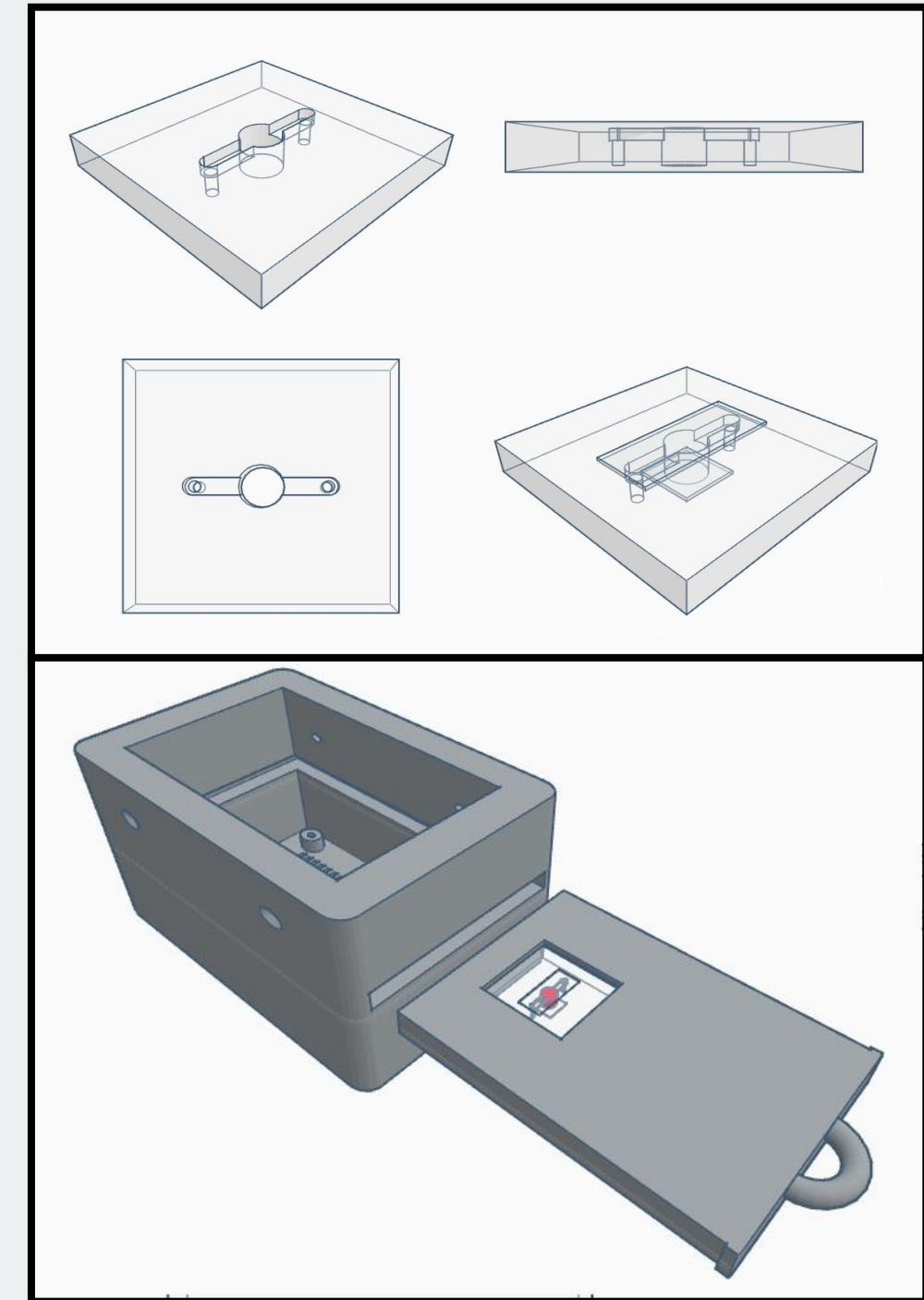
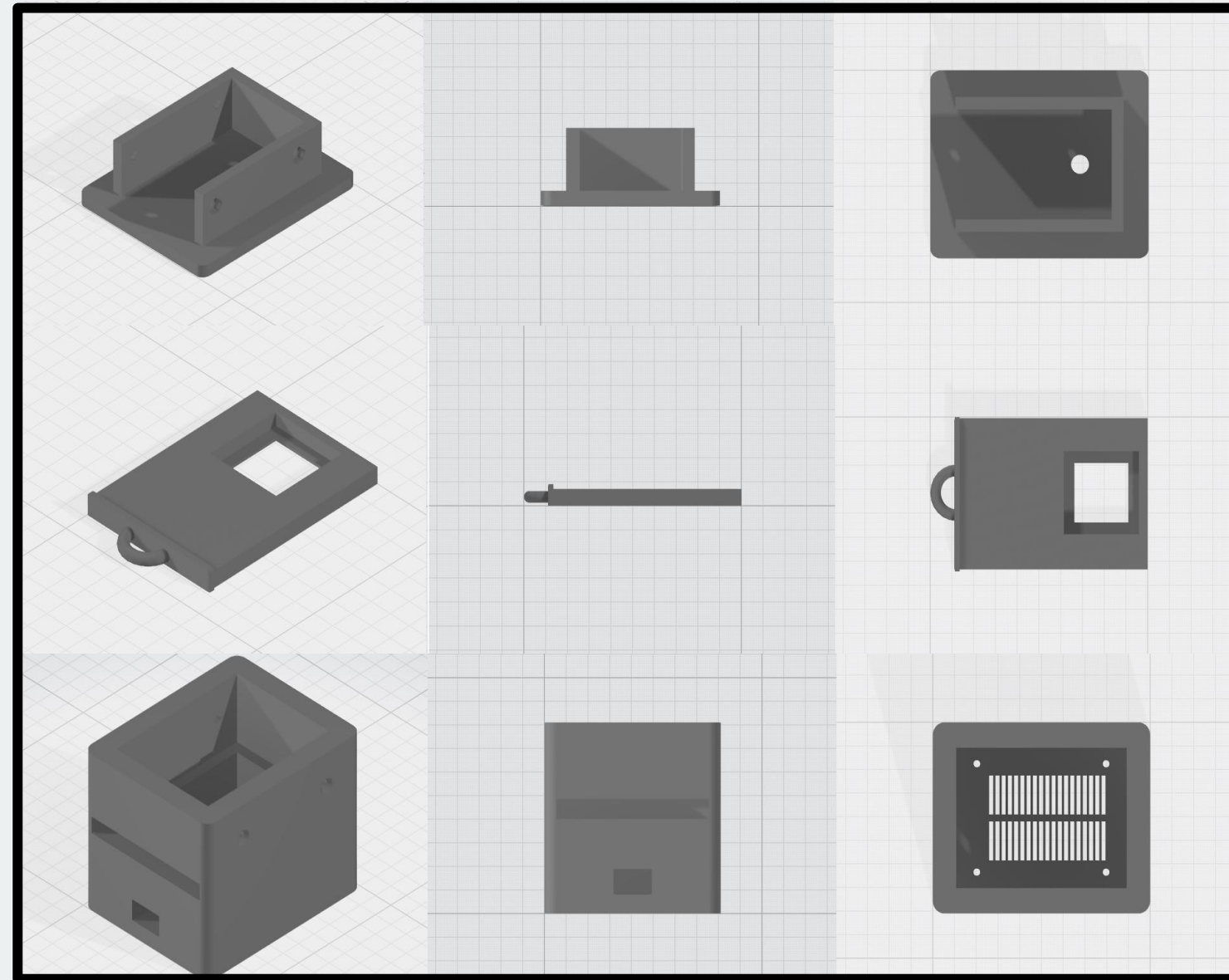
Caracterización de los ensayos

Diagrama de flujo para la toma de muestras:

Entorno físico adecuado

Aplicación del Software y volcado de datos.

Interpretación de resultados



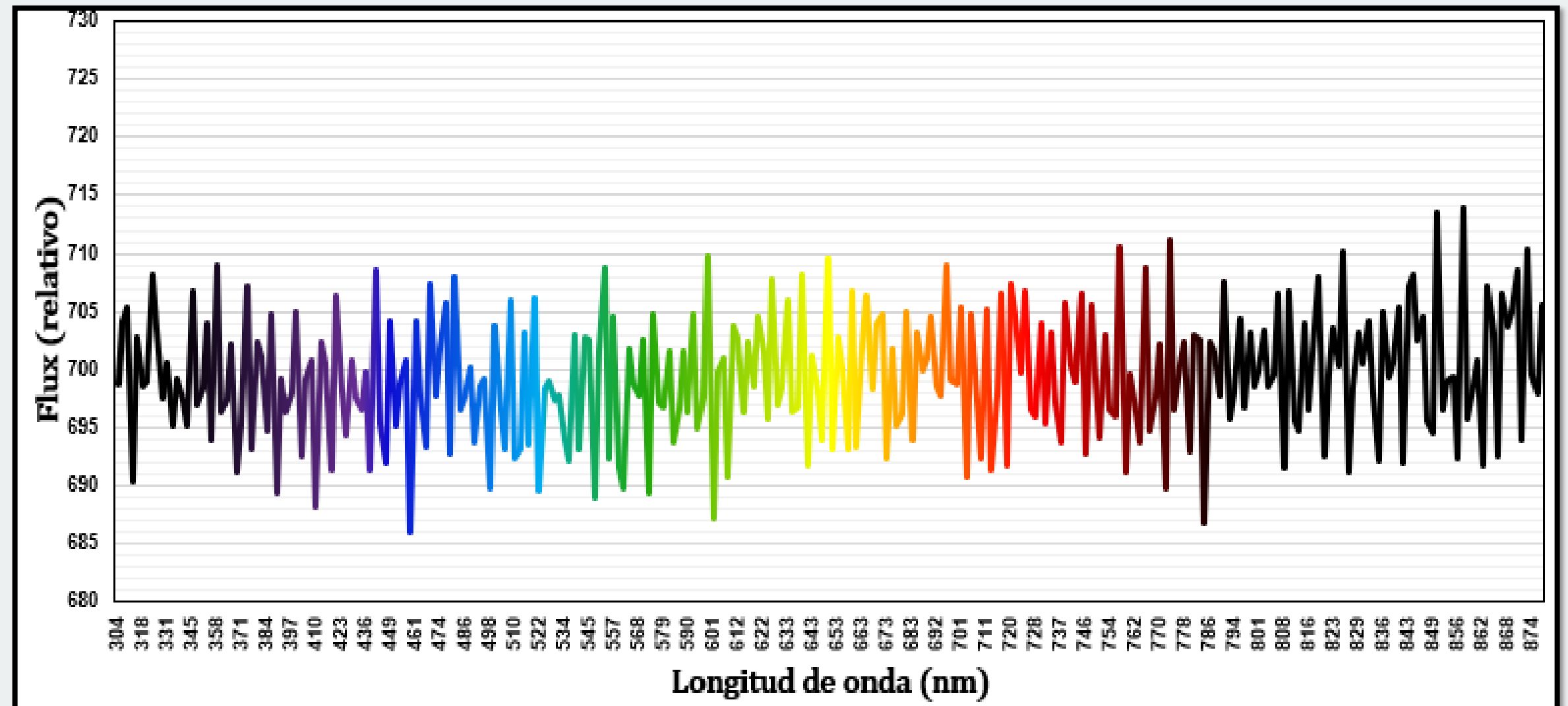
Caracterización de los ensayos

Diagrama de flujo para la toma de muestras:

Entorno físico adecuado

Aplicación del Software y volcado de datos.

Interpretación de resultados



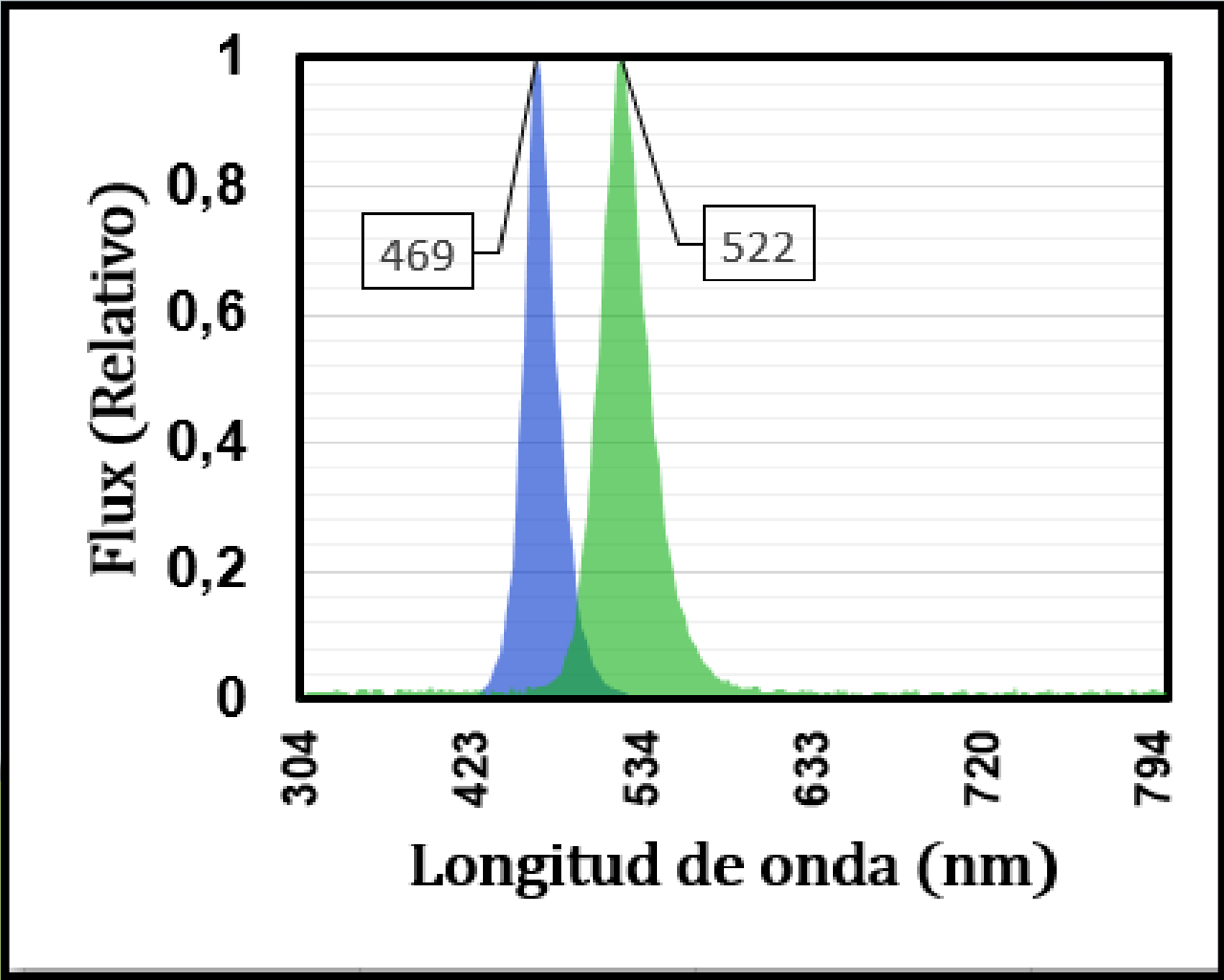
Ensayo para espectrometría de emisión.

LEDs Azul y Verde

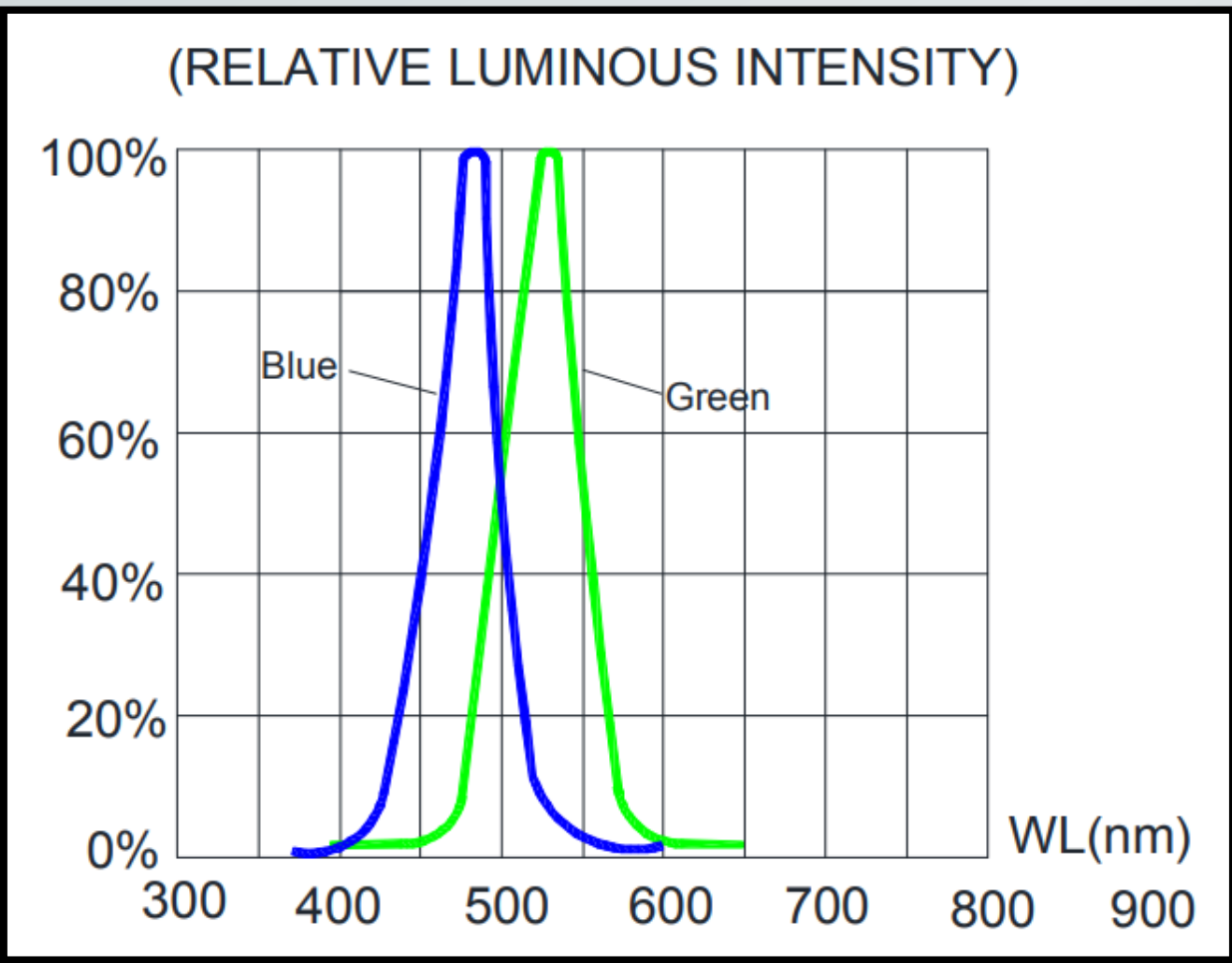
Modelo C503B-BCS/BCN/GCS/GCN

Coincidencia de resultados
teóricos y prácticos

Resultados del espectrómetro



Hoja de datos del fabricante



Color	Dominant Wavelength	
	Min. (nm)	Max. (nm)
Blue	465	480
Blue	465	475
Blue	465	475
Green	520	535
Green	520	530
Green	525	535
Green	520	530



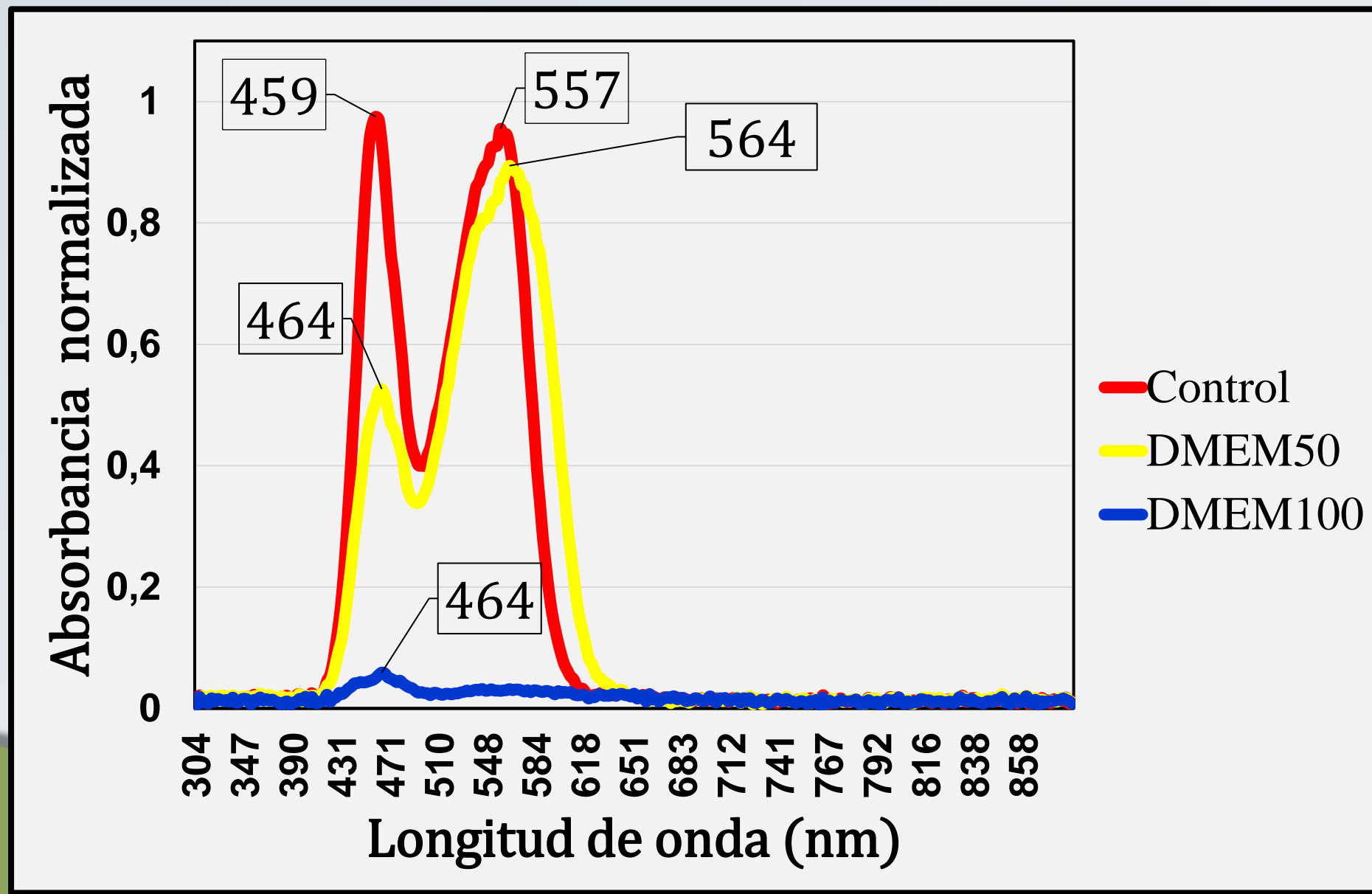
Este gráfico muestra el flujo relativo de cuatro fuentes de luz en función de la longitud de onda (nm). El eje Y representa el 'Flux(Relativo)' de 0 a 1, y el eje X representa la 'Longitud de onda (nm)' de 304 a 875. Las series son: LED (área gris), DMEN100 (línea azul), DMEN50 (línea amarilla) y CONTROL (línea roja). Todas las series muestran un pico principal entre 441 y 474 nm, con el LED y DMEN100 alcanzando un flujo relativo cercano a 1.0. El LED y DMEN100 también muestran un segundo pico más amplio entre 536 y 595 nm, con el LED y DMEN100 alcanzando un flujo relativo de aproximadamente 0.3. El DMEN50 y el CONTROL muestran picos secundarios más pequeños en estas regiones.

Longitud de onda (nm)	LED	DMEN100	DMEN50	CONTROL
304	0.00	0.00	0.00	0.00
339	0.00	0.00	0.00	0.00
374	0.00	0.00	0.00	0.00
408	0.00	0.00	0.00	0.00
441	0.10	0.20	0.10	0.05
474	0.95	0.95	0.55	0.35
505	0.15	0.15	0.05	0.05
536	0.30	0.30	0.05	0.05
566	0.25	0.25	0.02	0.02
595	0.20	0.20	0.05	0.15
622	0.10	0.10	0.10	0.10
649	0.05	0.05	0.05	0.05
675	0.02	0.02	0.02	0.02
700	0.01	0.01	0.01	0.01
723	0.00	0.00	0.00	0.00
746	0.00	0.00	0.00	0.00
767	0.00	0.00	0.00	0.00
788	0.00	0.00	0.00	0.00
807	0.00	0.00	0.00	0.00
825	0.00	0.00	0.00	0.00
843	0.00	0.00	0.00	0.00
859	0.00	0.00	0.00	0.00
875	0.00	0.00	0.00	0.00



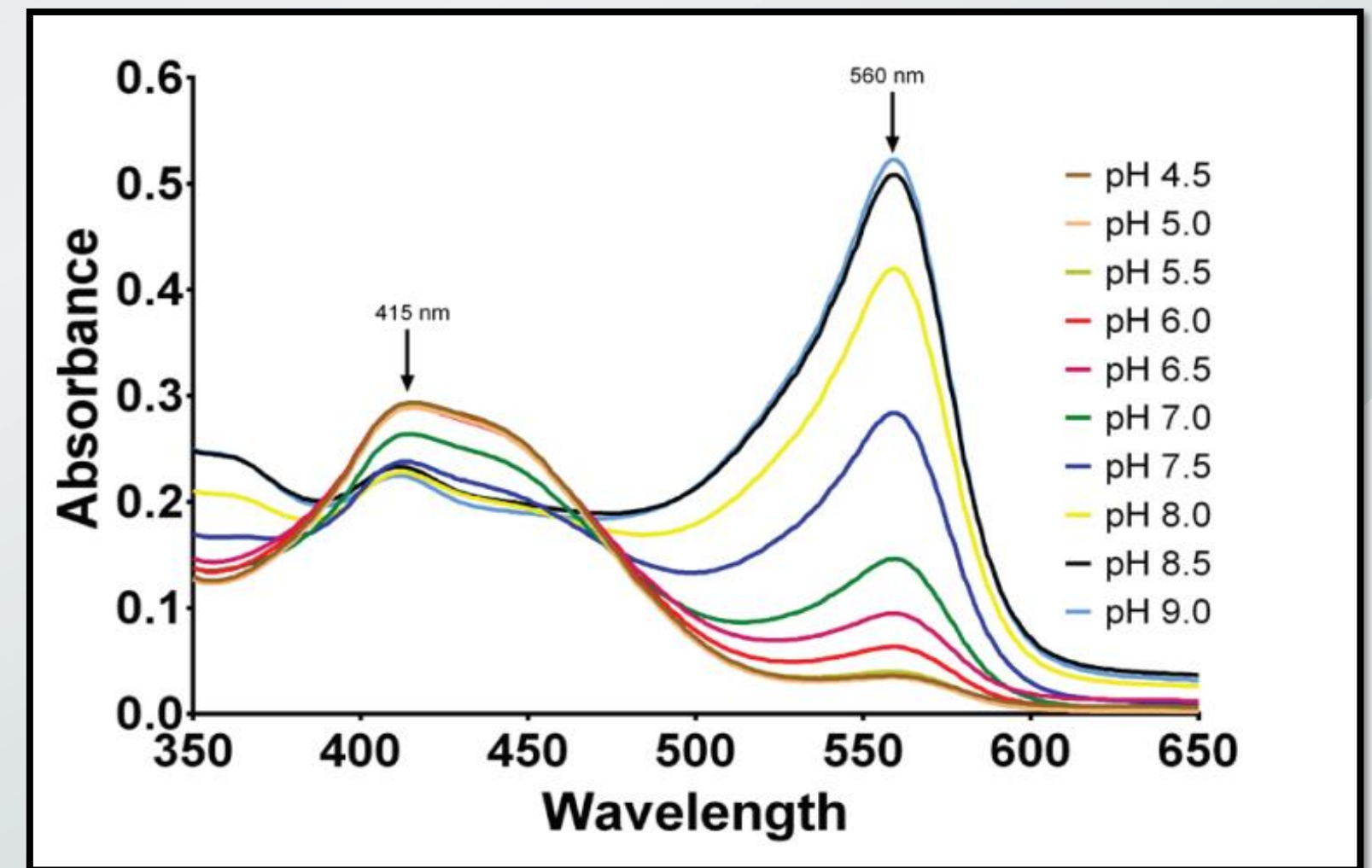
Ensayo para espectrometría de absorción.

Absorbancia de resultados medidos con espectrómetro

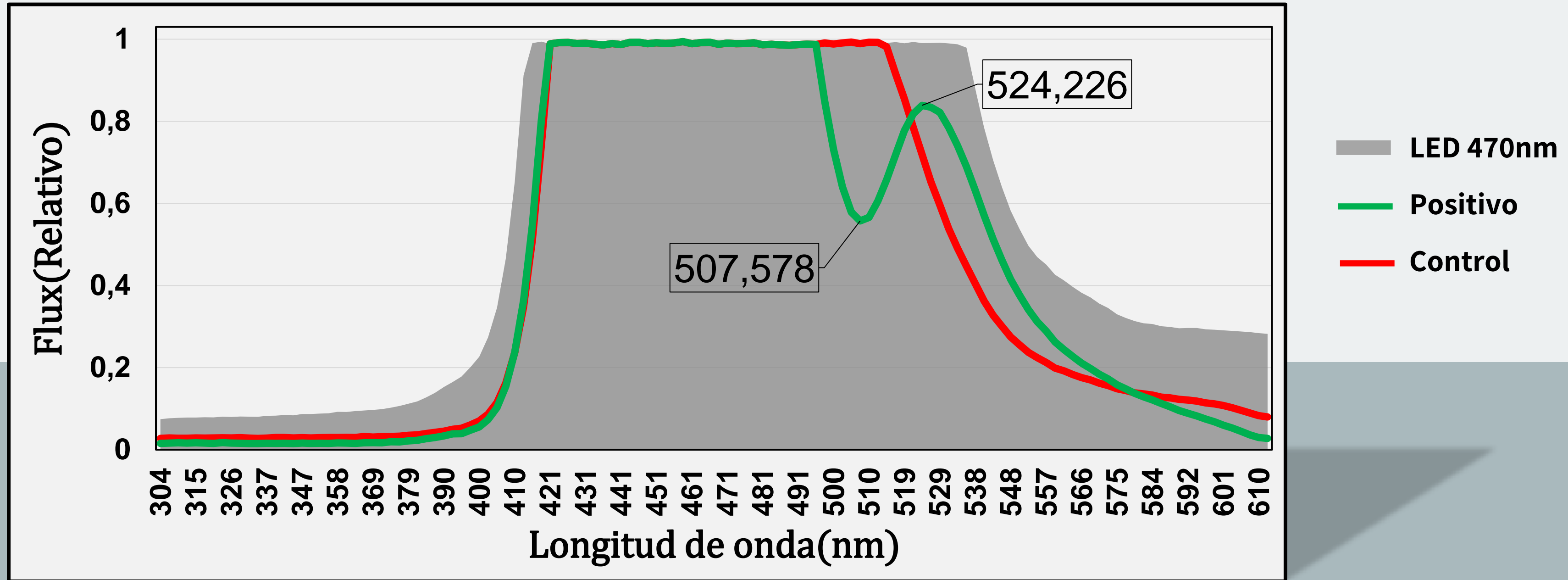


Coincidencia parcial de resultados teóricos y prácticos

Absorbancia teórica para diferentes niveles de PH



Medición ensayo PCR hiperdopado

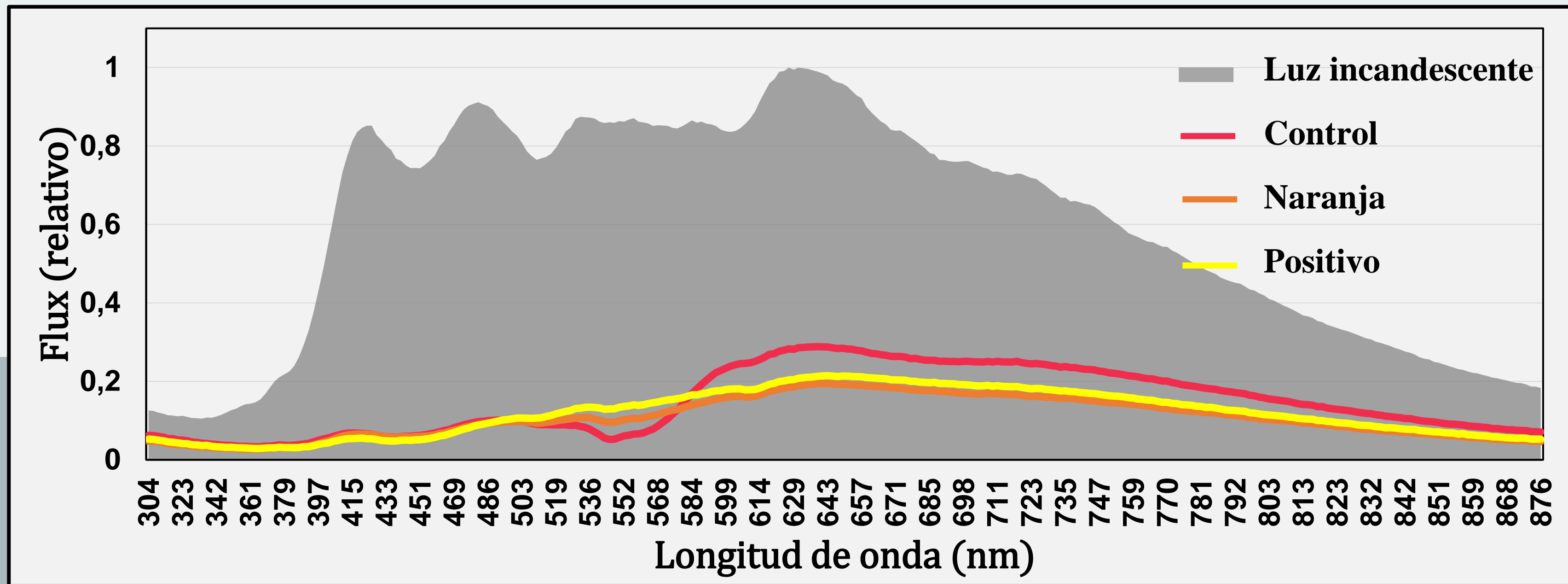


✓
Absorbancia

✓
Fluorescencia

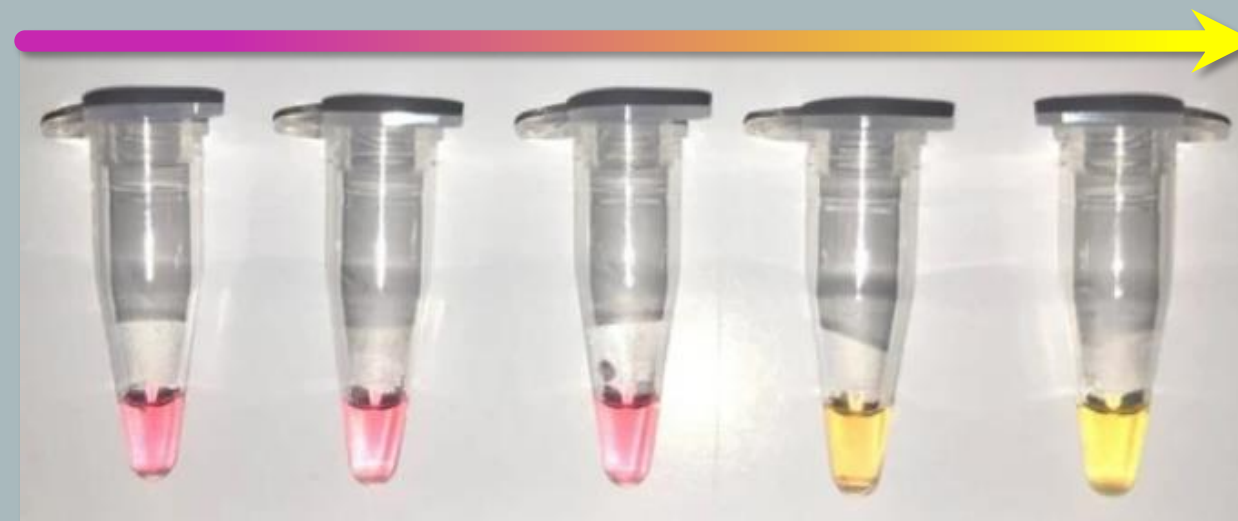
✓
Conclusión

Medición ensayo LAMP.

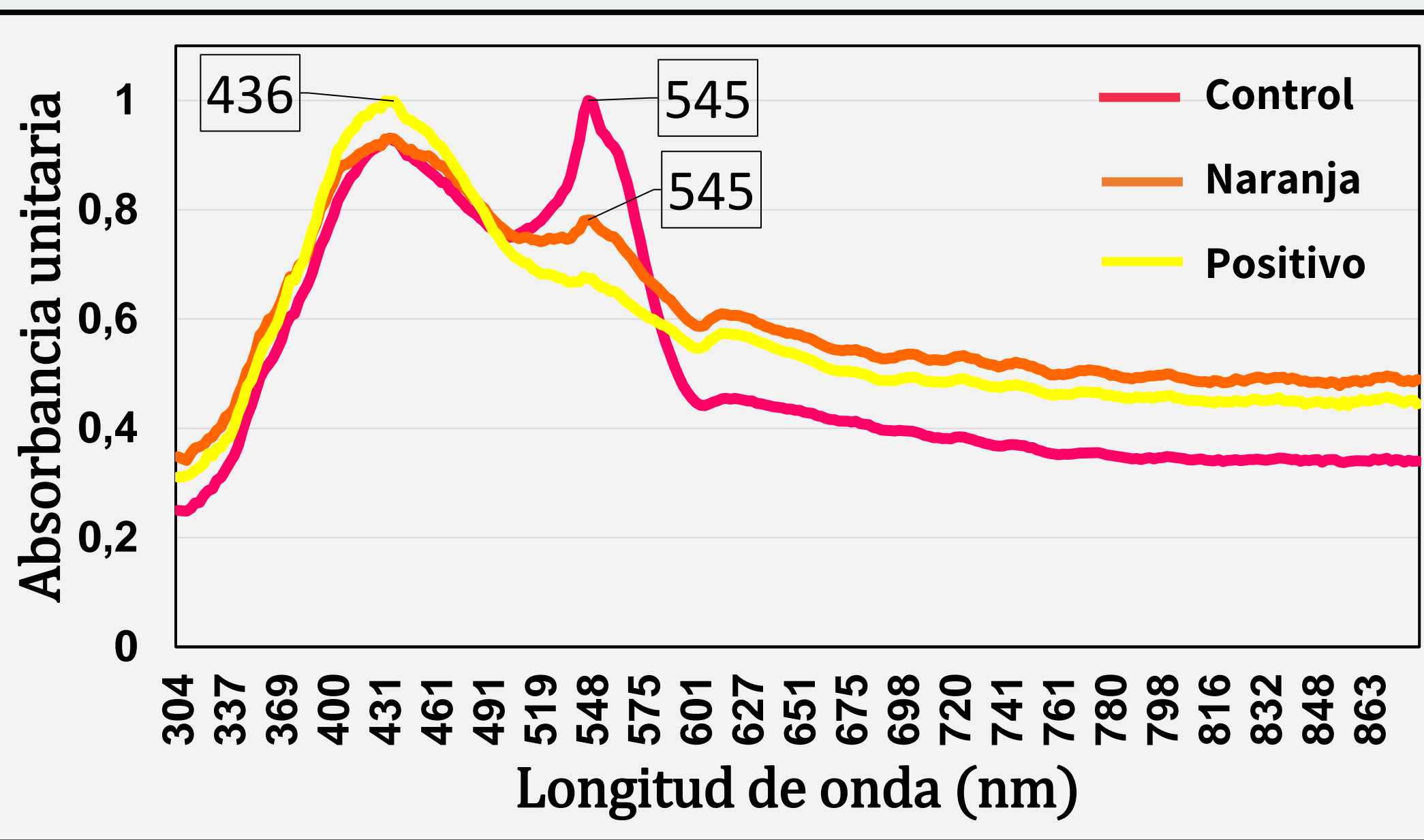


Determinar picos de
absorbancia reales

Determinar la mejor
fuente lumínica



Medición ensayo LAMP.



Longitud de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
433,40	1,14	1,13	1,22
435,94	1,13	1,13	1,22
558,99	1,12	0,91	0,79
561,26	1,10	0,90	0,79
Promedio			
Longitud de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
434,67	1,13	1,13	1,22
560,12	1,11	0,91	0,79

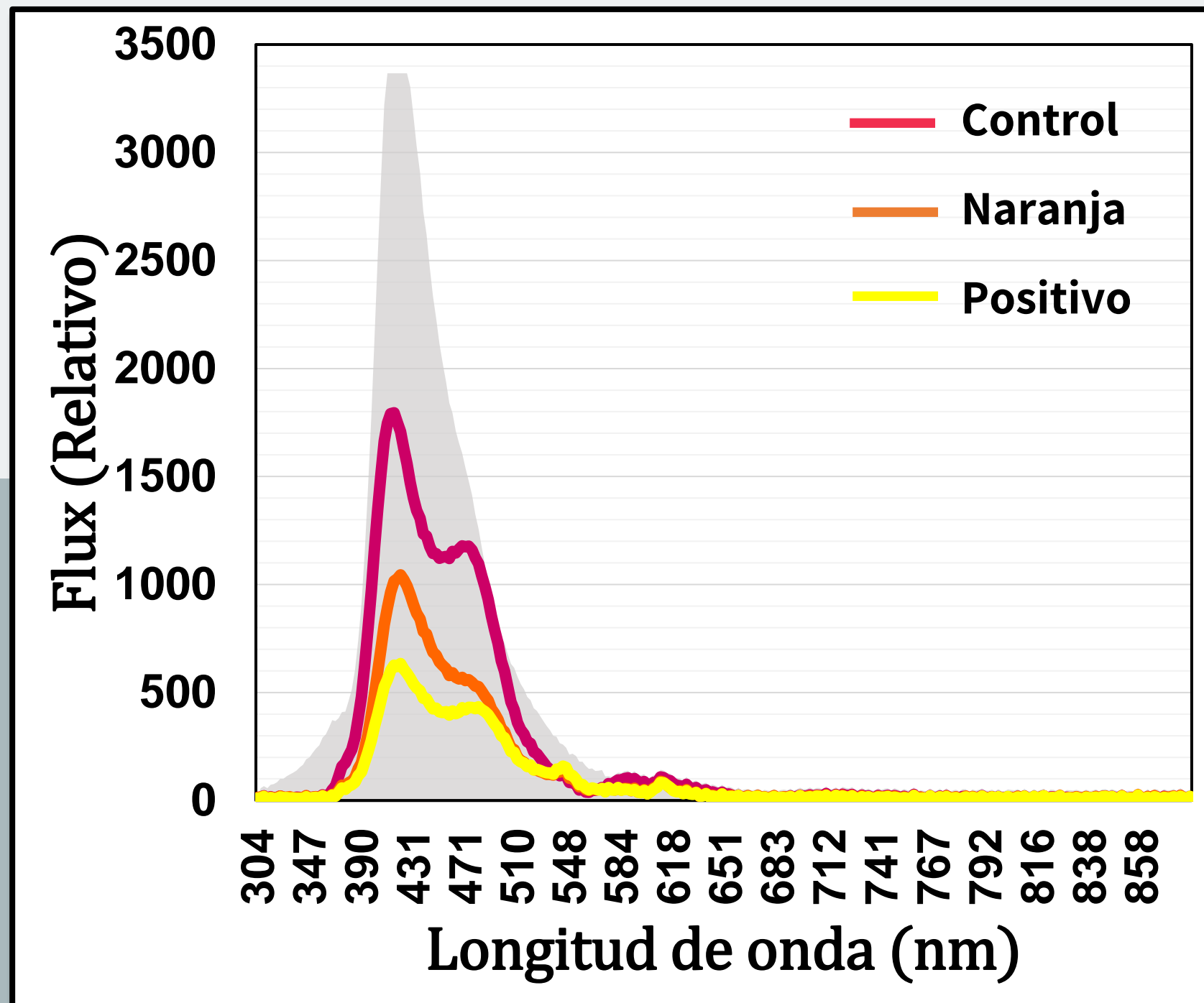
✓

Determinar picos de absorbancia reales

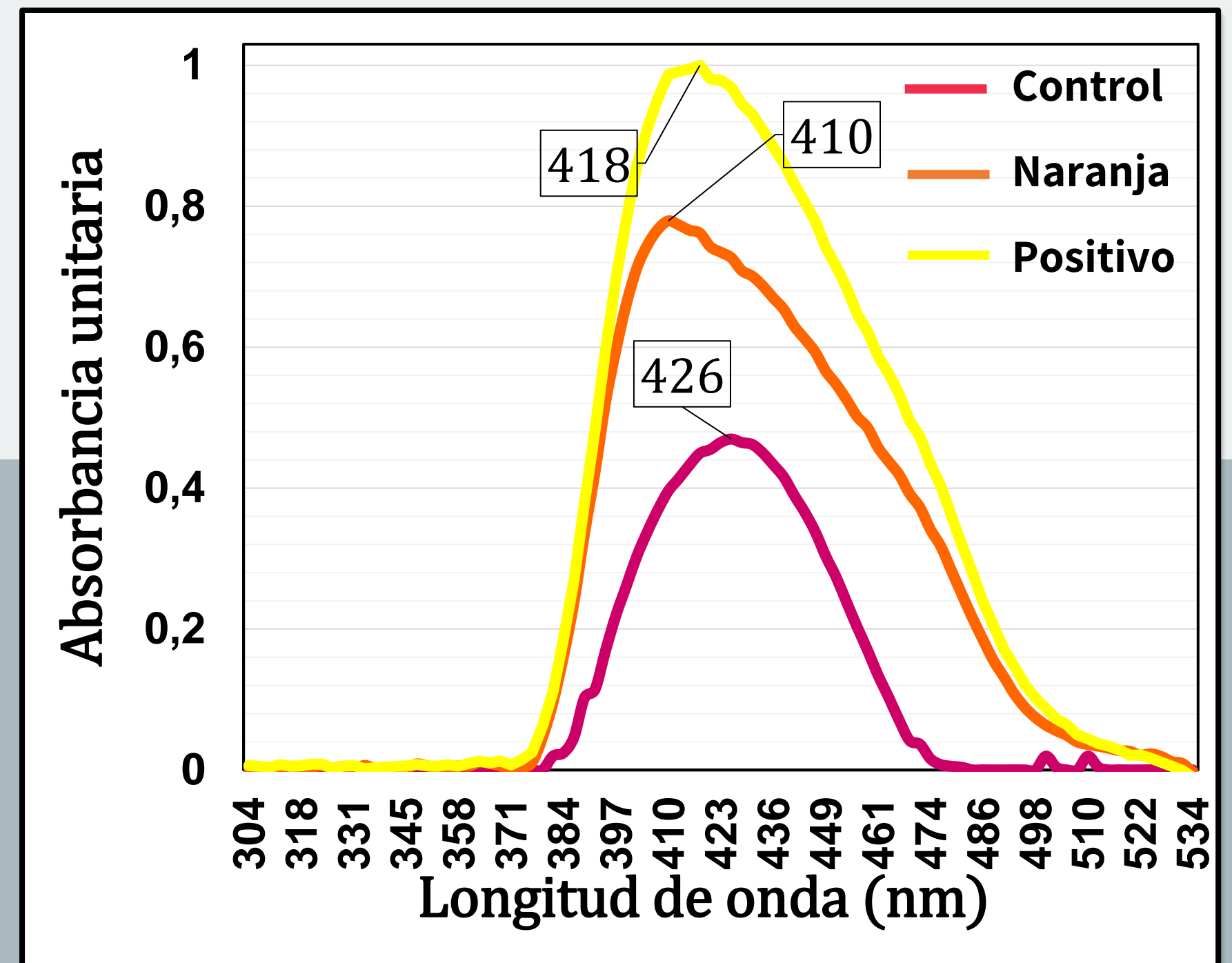
Determinar la mejor fuente lumínica

Medición ensayo LAMP. LED 430nm

Transmitancia

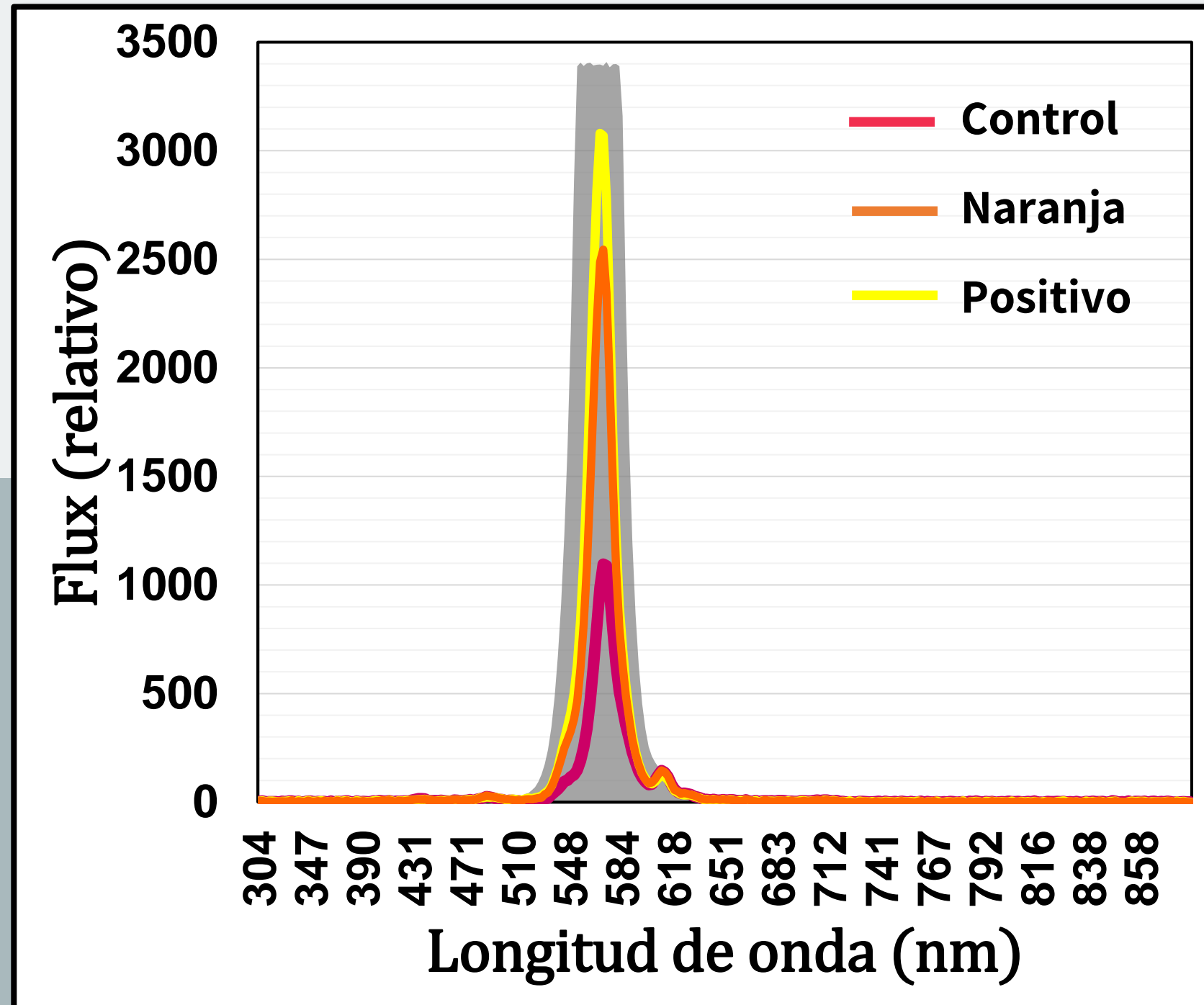


Absorbancia

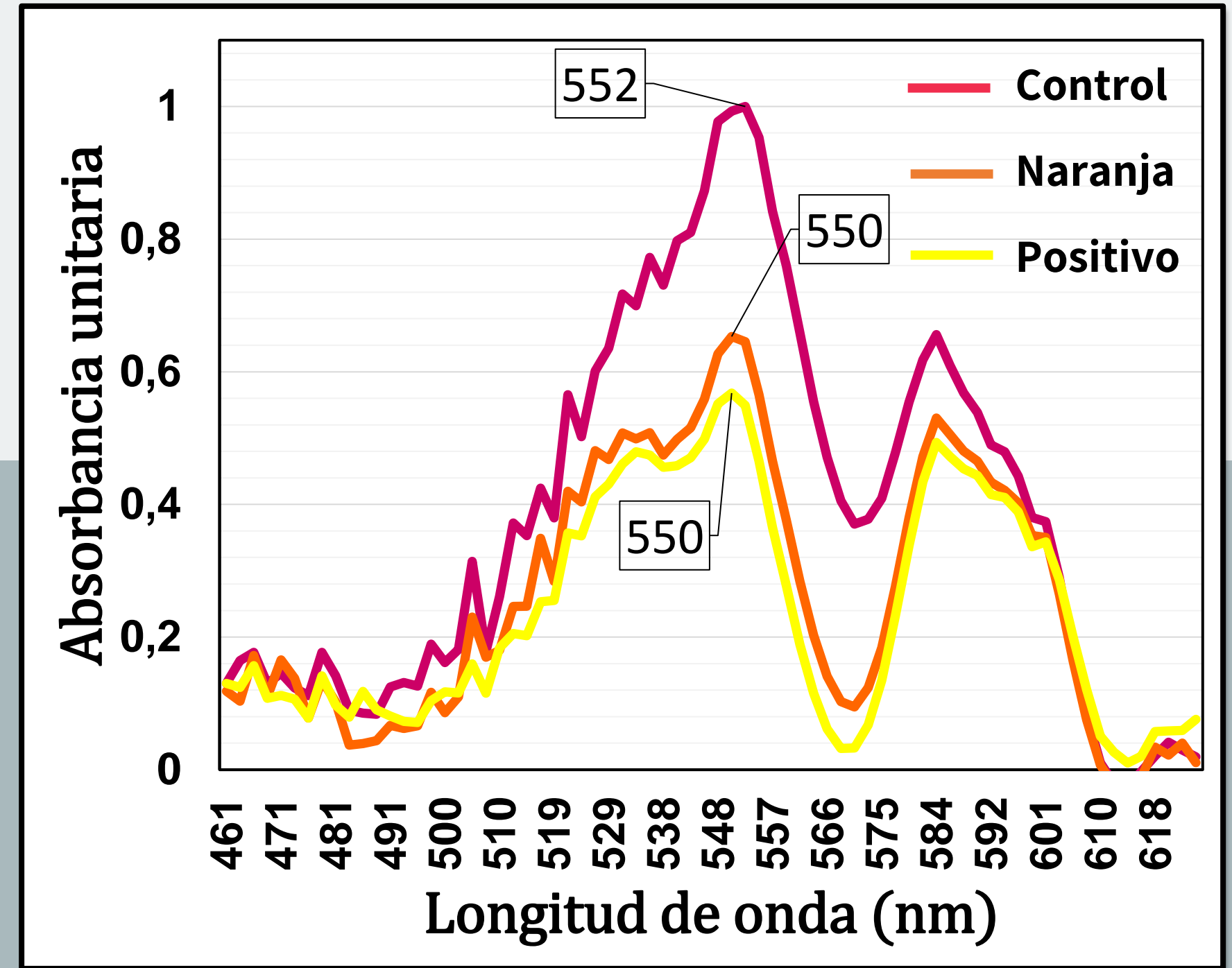


Medición ensayo LAMP. LED 560nm

Transmitancia



Absorbancia



Medición ensayo LAMP. LED 560nm

Tabla Absorbancia LAMP para LED 430nm

Long. de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
410,33	0,19	0,38	0,48
412,91	0,20	0,38	0,486
415,48	0,21	0,38	0,49
418,05	0,22	0,37	0,49
420,62	0,22	0,36	0,48
423,18	0,23	0,36	0,48
433,40	0,22	0,34	0,45
435,97	0,21	0,33	0,43
Promedio			
Long. de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
416,76	0,21	0,37	0,49
434,67	0,22	0,33	0,44

Tabla Absorbancia LAMP para LED 560nm

Long. de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
549,84	0,99	0,65	0,57
552,14	1	0,65	0,55
554,43	0,95	0,57	0,47
558,99	0,76	0,38	0,28
561,26	0,66	0,28	0,19
Promedio			
Long. de onda (nm)	Control	Naranja	Positivo
552,14	0,98	0,62	0,53
560,12	0,71	0,33	0,23

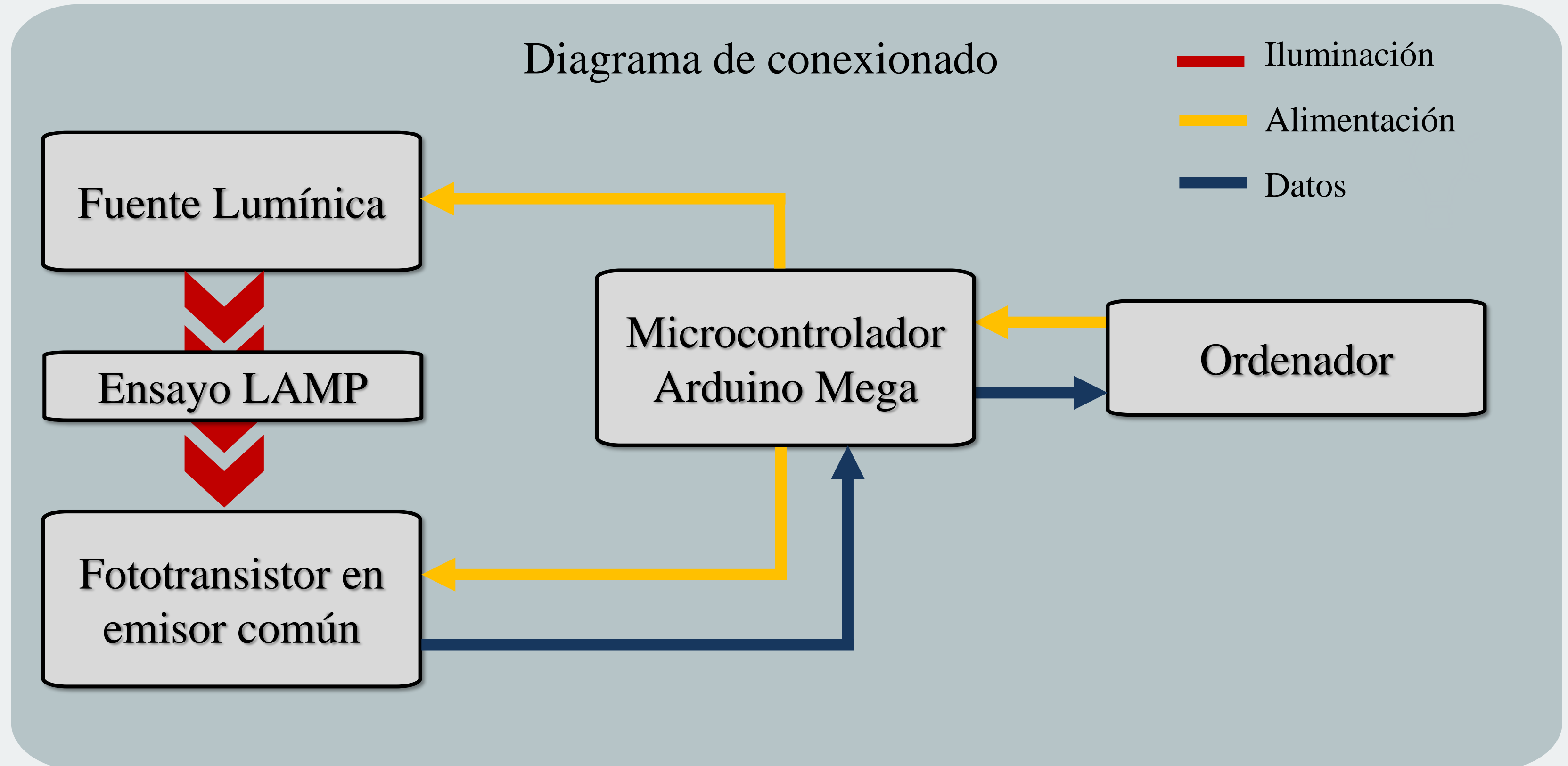
Tabla comparativa de Resultados

Long. de onda (nm)	Positivo-Control	Naranja-Control	Positivo-Naranja
552,14	0,45	0,36	0,09
560,12	0,48	0,38	0,1
416,76	0,28	0,16	0,12
434,67	0,22	0,11	0,11

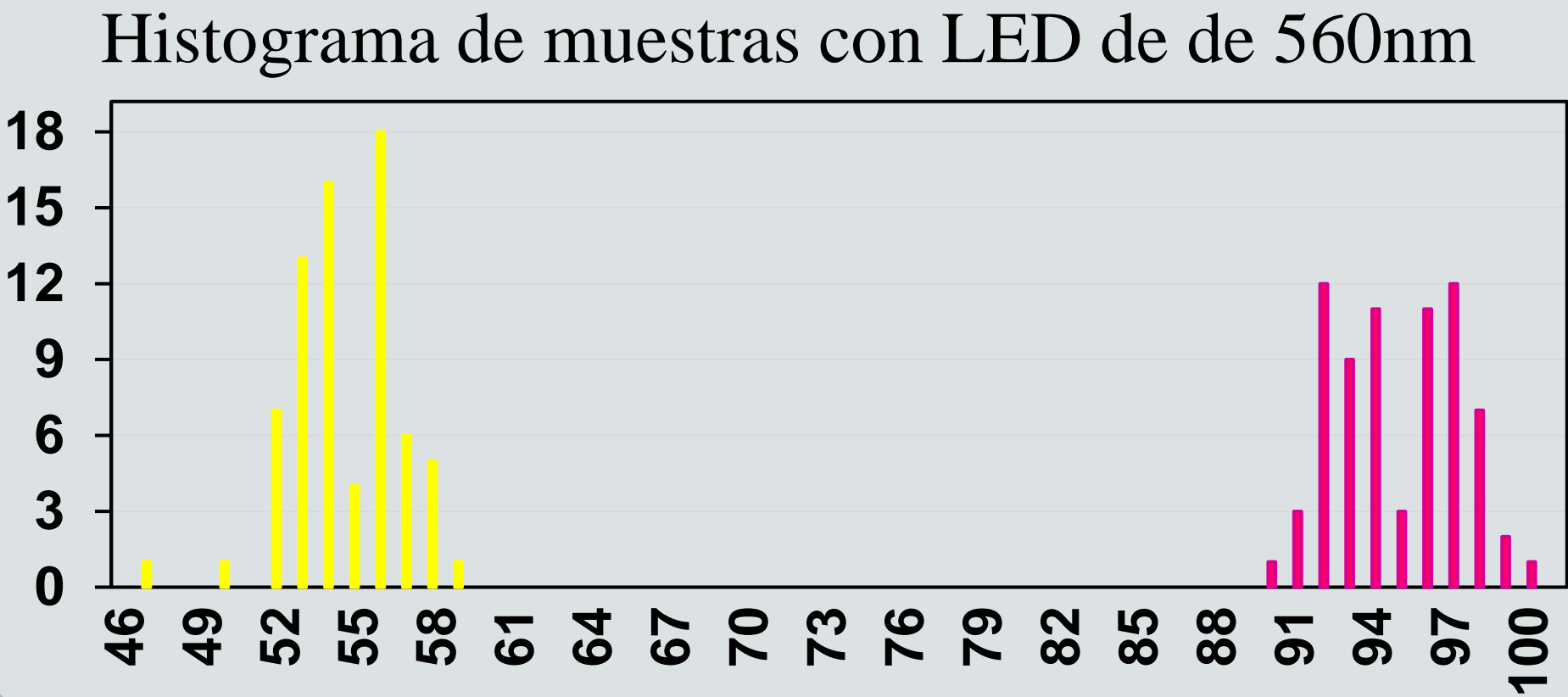
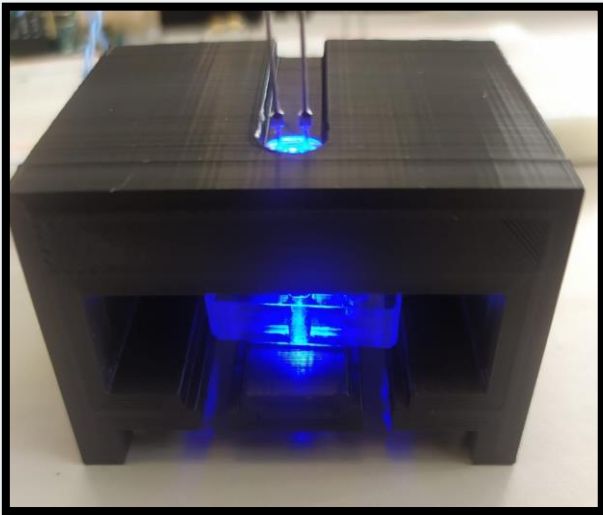
Determinar picos de absorbancia reales

Determinar la mejor fuente lumínica

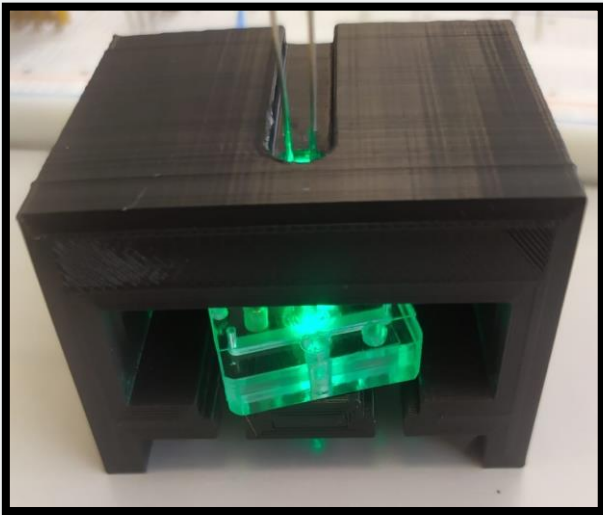
Disposición del equipamiento



Medición de fuentes lumínicas

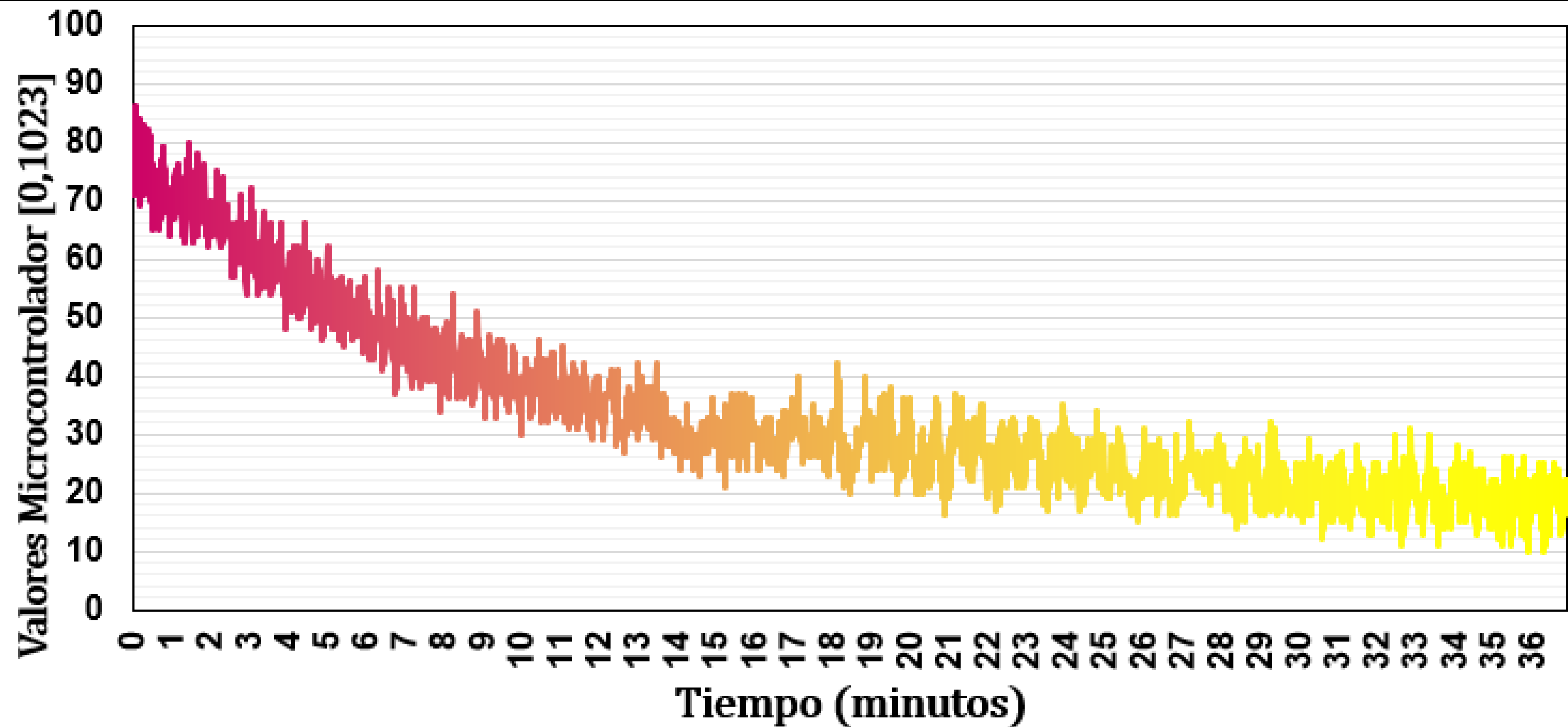


Estadísticos	Control	Positivo
Rango	26	20
Varianza	55,33	26
Desviación estándar	7,15	5,02
Rango	10	12
Varianza	5,70	4,41
Desviación estándar	2,39	2,10



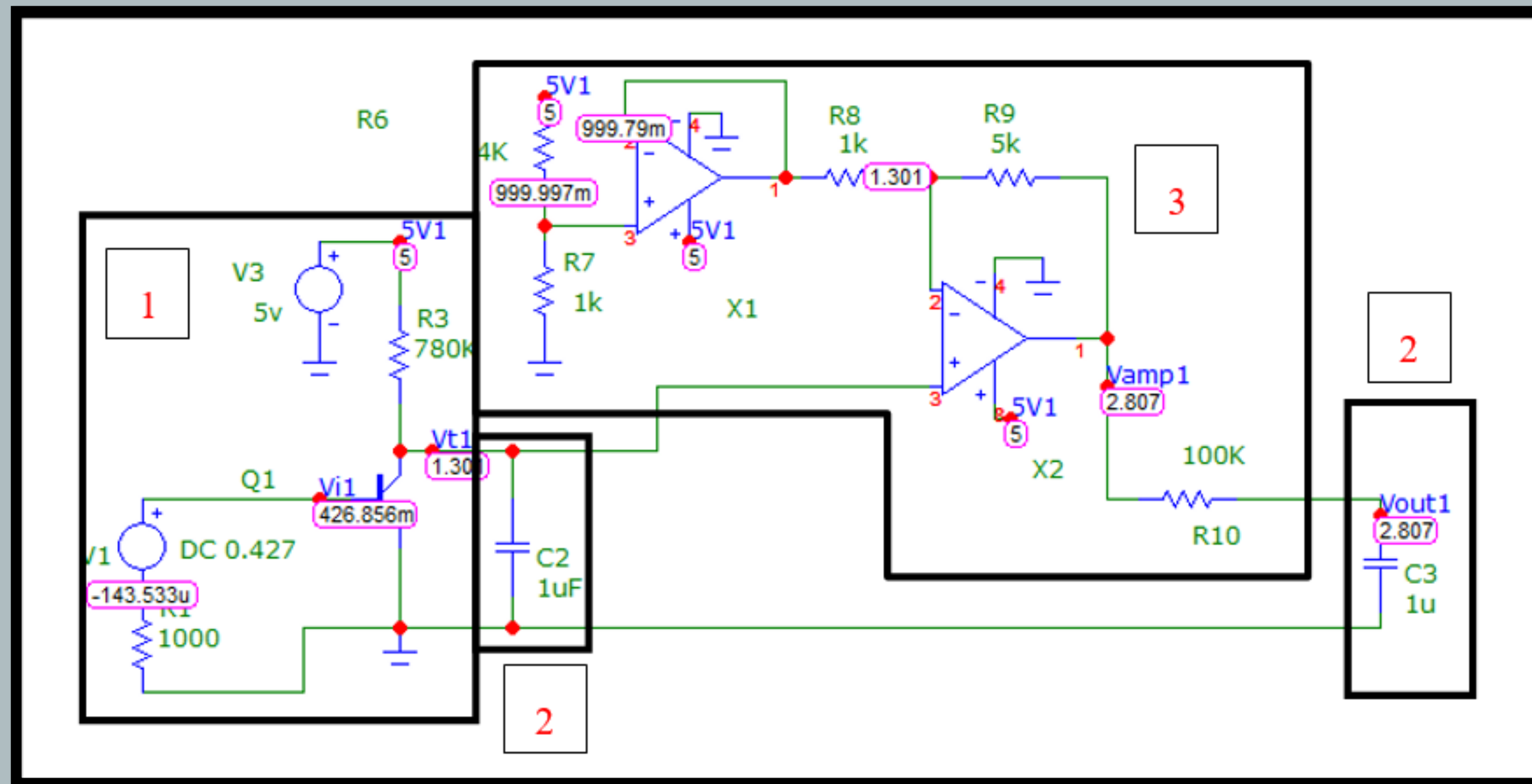
Primer ensayo

Ensayo realizado en **tiempo real**, SNR de 4,86dB con muestra en positivo.



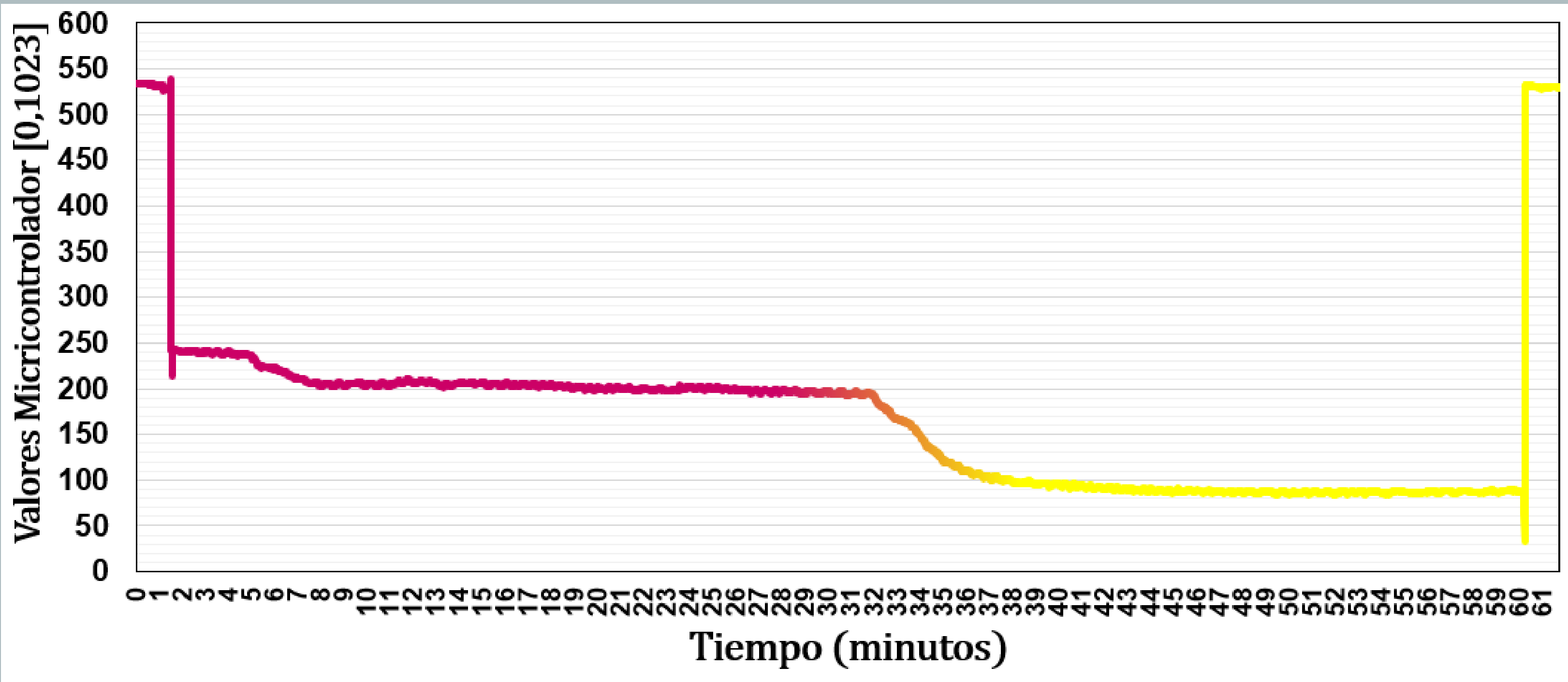
Diseño del circuito

Circuito de amplificación y filtrado



Ensayo acondicionado

Ensayo realizado en **tiempo real**, SNR de 14,33dB con muestra en positivo.



Conclusiones

Ensayo de PCR

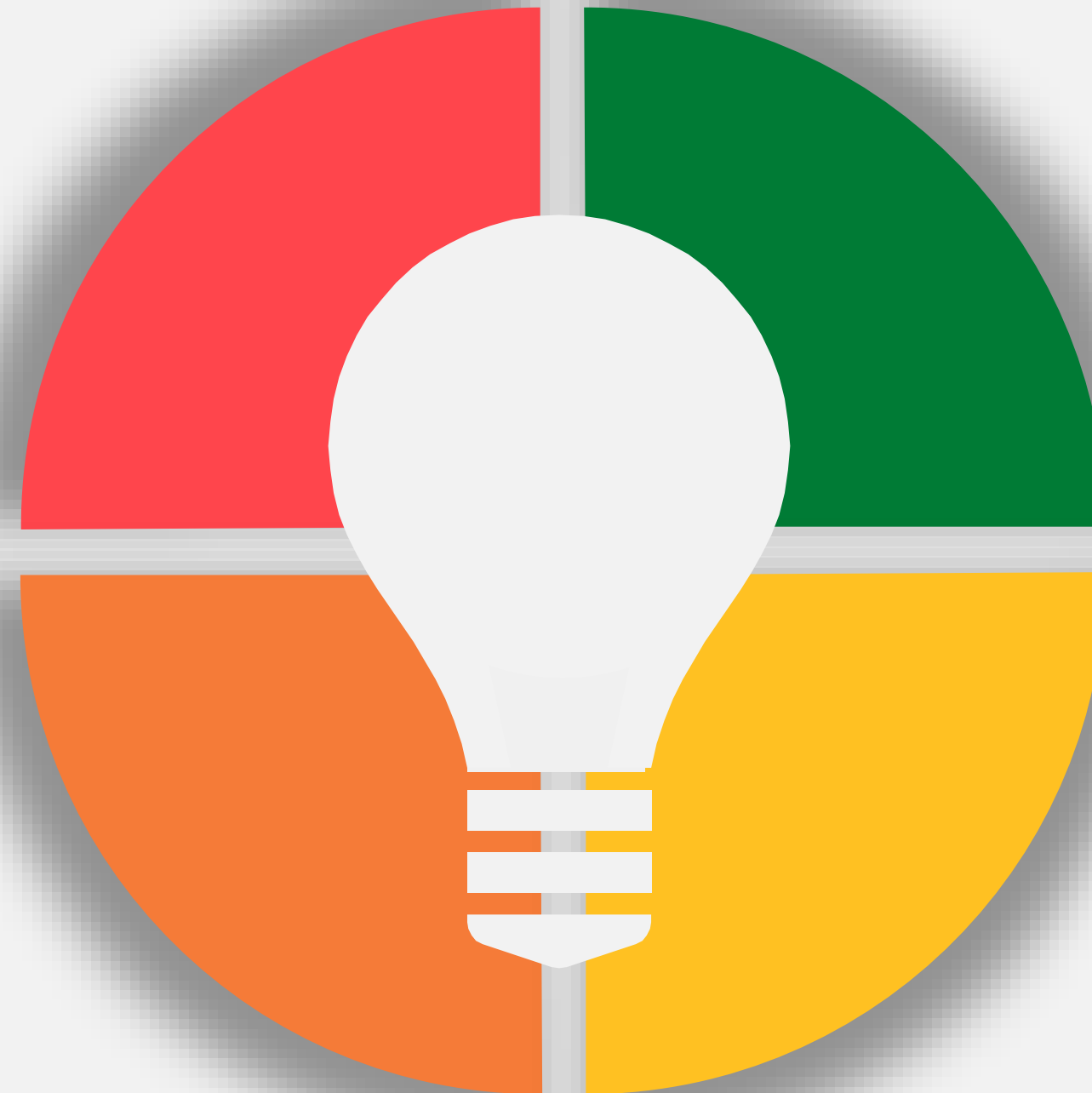


- Se detecta el efecto de la fluorescencia, pero sólo en muestras hiperdopadas.

Circuito auxiliar



- Se consigue atenuar el ruido, mejor SNR
- Se consigue amplificar señal a más del doble, aún así mejorable.



Ensayo de LAMP

- El espectrómetro diferencia entre tipos de muestras
- Uso de espectrómetro resulta ser una solución sobredimensionada



Fototransistor

- El fototransistor resulta ser favorable. Detecta con precisión entre tipos de muestras.
- La iluminación adecuada en torno a 560nm

Mejoras

1. Mejorar el circuito de iluminación.

4. Análisis de visibilidad materiales LOC.

5. Realizar más ensayos.
Consolidar resultados.

6. Estudiar el efecto del aumento de temperatura en el funcionamiento del sistema.

3. Calibrar valores del circuito de amplificación y filtrado.

2. Mejorar el sistema de alimentación del circuito.