

# Diseño, construcción e implementación de un dispositivo para medir fluorescencia y densidad óptica

Carlos Arturo Sanchez  
Ciro Fernando Gélvez

7 de mayo de 2015

Presentado a: Edgar Patiño  
Alexander Cardona  
Supervisor: Juan Manuel Pedraza Leal

## Resumen

En el siguiente documento se presentará una descripción detallada de la construcción y resultados de un Fluorímetro portátil, el cual fue implementado a partir de un dispositivo realizado por la universidad de AAachen en Alemania. Sin embargo, SG cuenta con mejoras en el tipo de sensor y la cantidad de mediciones posibles. Cuenta con 4 modos de medición: Densidad Óptica (OD), y fluorescencia para 3 distintas longitudes de onda (Rojo, Verde, Azul) las cuales se obtienen a partir de bacterias usadas en el mundo de la Biofísica y demás ciencias biológicas.

## 1. Objetivos

### Primero:

Construir e implementar un detector de fluorescencia en muestras biológicas

### Segundo:

Construir e implementar un dispositivo que determine la densidad óptica de una muestra.

## 2. Introducción

### 2.1. Fluorescencia

La fluorescencia es un miembro de la familia de procesos de luminiscencia, en los que las moléculas susceptibles emiten luz de los estados excitados electrónicamente ya sea por un mecanismo físico (por ejemplo, la absorción de la luz),

mecánica (fricción), o químico. La generación de luminiscencia a través de la excitación de una molécula por los fotones de luz ultravioleta o visible es un fenómeno que se denomina fotoluminiscencia, que se divide formalmente en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la configuración electrónica del estado excitado y la vía de emisión. La fluorescencia es la propiedad de algunos átomos y moléculas que absorben la luz en una longitud de onda particular, para posteriormente emitir luz de longitud de onda más larga después de un breve intervalo, denominado el tiempo de vida de fluorescencia. El proceso de fosforescencia se produce de una manera similar a la fluorescencia, pero con una vida mucho más larga estado excitado.

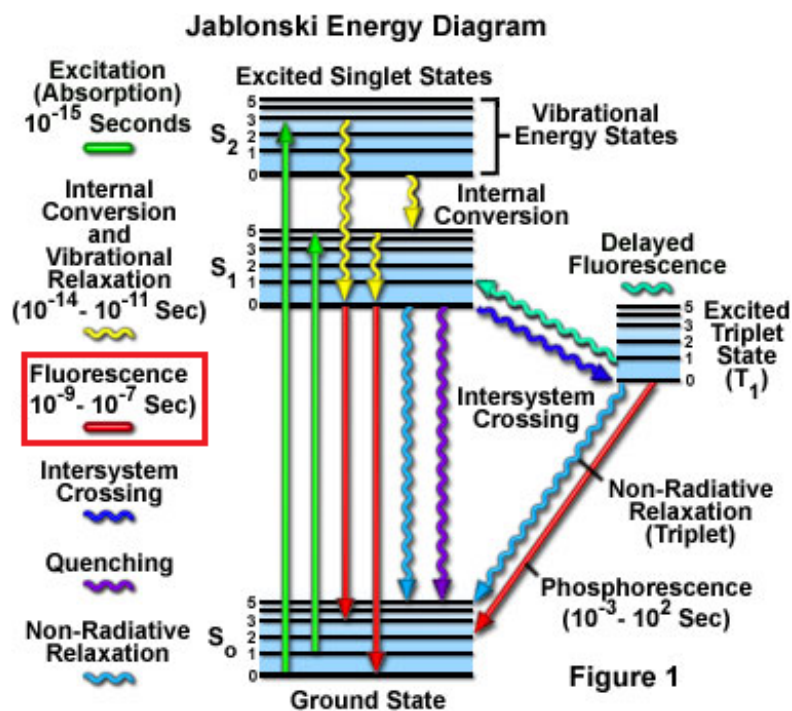


Figura 1: Esquema de bandas para la fluorescencia

El proceso de fluorescencia se rige por tres eventos importantes, los cuales se producen en escalas de tiempo que están separados por varios órdenes de magnitud (véase la Tabla 1). Primero la excitación de una molécula susceptible por un fotón entrante sucede en femtosegundos ( $10^{-15}$  segundos), segundo la relajación vibracional de electrones estado excitado al nivel de energía más bajo es mucho más lenta y se puede medir en picosegundos ( $10^{-12}$  segundos). El tercero, la emisión de un fotón de longitud de onda más larga y el retorno de la molécula al estado fundamental, se produce en un período de tiempo relativamente largo de nanosegundos ( $10^{-9}$  segundos).

Los fotones incidentes de longitud de onda variable pueden tener energía sufi-

Transición	Proceso	Escala de tiempo (s)
$S(0) \Rightarrow S(1)$ ó $S(n)$	Absorción (excitación)	$10^{-15}$
$S(n) \Rightarrow S(1)$	Conversión interna	$10^{-14}$
$S(1) \Rightarrow S(1)$	Relajación vibracional	$10^{-12}$
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Fluorescencia	$10^{-9}$
$S(1) \Rightarrow T(1)$	Cruce entre sistemas	$10^{-10}$
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Relajación no radiativa (Quenching)	$10^{-7}$
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Fosforescencia	$10^{-3}$
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Relajación no radiativa (Quenching)	$10^{-3}$

Tabla 1: Escala de tiempo para procesos de fluorescencia

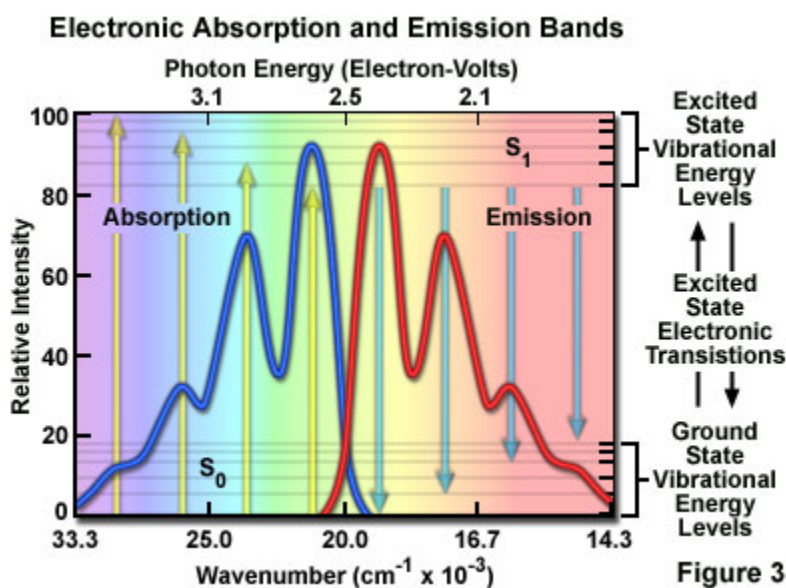


Figura 2: Esquema de absorción y emisión para la fluorescencia

ciente para ser absorbidos y a menudo producen transiciones de otras distancias de separación internuclear y niveles de energía de vibración. Este efecto da lugar a un espectro de absorción que contiene múltiples picos (Figura 2). La amplia gama de energías de fotones asociados con transiciones de absorción en sustancias fluorescentes hace que el espectro resultante parezca como bandas anchas en lugar de líneas discretas. El espectro de absorción hipotético ilustra en la figura 2 (banda azul) los resultados de varias transiciones electrónicas favorecidas desde el estado fundamental al estado de energía excitado más bajo ( $S(0)$  y  $S(1)$ , respectivamente). Superpuesta sobre el espectro de absorción líneas verticales (amarillo) que representan las transiciones desde el nivel vibracional más bajo en el estado fundamental a mayores niveles de energía de vibración

en el estado excitado. Las transiciones a los más altos niveles vibracionales excitados son los que ocurren a energías de fotones de longitud de onda más altas (mayor o menor número de onda). Las energías aproximadas asociadas con las transiciones se indican en eV a lo largo de la abscisa superior de la Figura 2. Los niveles vibracionales asociados con el suelo y estados excitados también se incluyen a lo largo de la línea de la derecha.

## 2.2. Densidad Óptica

El principio físico de la Densidad Optica consiste en la cantidad de luz que atraviesa una muestra dependiendo de su concentración. Esta se calcula como:

$$DO = -\log \frac{(I/I_0)}{L} \quad (1)$$

donde  $I_0$  es la intensidad de la fuente de luz antes de entrar a la muestra,  $I$  es la intensidad de la luz que se ha transmitido y  $L$  la longitud a través de la cual fue calculada (ver Figura 3). Esto consiste en que la mayor parte de la luz dispersada por las células ya no llega al foto-receptor o sensor, de modo que la señal eléctrica es más débil con una cubeta libre de células. La OD de un cultivo bacteriano no es por lo tanto una medida de absorbancia, como en el caso de la fluorescencia. Las células de muchas bacterias son casi incoloras y la absorción de la luz real es muy poca y despreciable. Por lo tanto, no es correcto para designar la OD de un grupo de células el término de absorción; el término más apropiado sería de hecho la turbidez. Sólo células pigmentadas fuertemente como las bacterias fotótrofas (púrpuras y verdes) causan una significativa absorción de luz. En definitiva, lo que se mostrará en la pantalla del aparato será entonces la cantidad de luz que logra atravesar la muestra y no es reflejada.

Para la medida de DO hay que tener en cuenta 3 puntos importantes:

- (A) Como se ha dicho antes, la DO depende de la longitud de onda que se emite sobre la muestra. Si tenemos una emisión de longitud de onda muy corta, por ejemplo el azul, la dispersión será más fuerte que la de la luz roja. Por ende, siempre hay que realizar las mediciones con la misma longitud de onda emitida.
- (B) La DO depende de la geometría de la cubeta donde se introduce la muestra. También es dependiente de la geometría del haz de luz incidente y la distancia a la que esta se encuentra de la muestra. Por lo que para realizar cualquier medición, hay que asegurarse de que las cubetas sean iguales y no se varia la intensidad de luz emitida ni la distancia a la muestra.
- (C) Debido a que se desea medir sólo la OD causada por la muestra, cualquier dispersión de luz asociada a la cubeta o a otros factores deben ser eliminados antes de empezar. Para esto debemos calibrar nuestro sensor del siguiente modo.
  1. Tomar datos de DO con el haz de luz directo hacia la muestra.
  2. Poner la cubeta totalmente vacia y seca, y de esta forma tomar datos como se observa en la figura 4 parte (a).
  3. Finalmente agregar a la misma cubeta la muestra y tomar datos, Figura 4

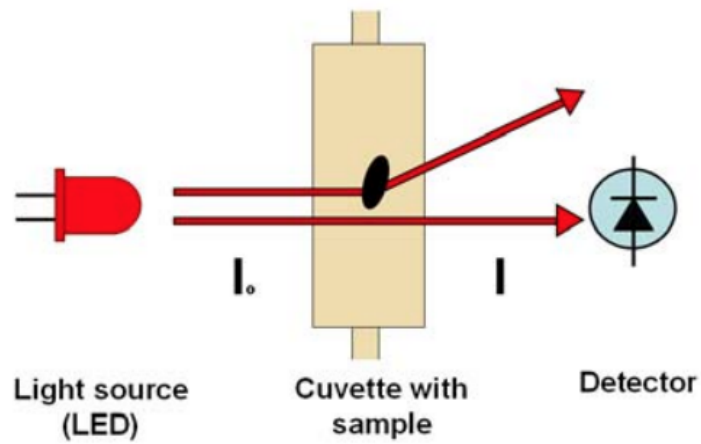


Figura 3: Ejemplo de montaje para la medición de densidad óptica.

parte (b).

4. para el análisis de los datos debemos restar el valor promedio medido en el paso 2, sobre los datos obtenidos con la muestra.

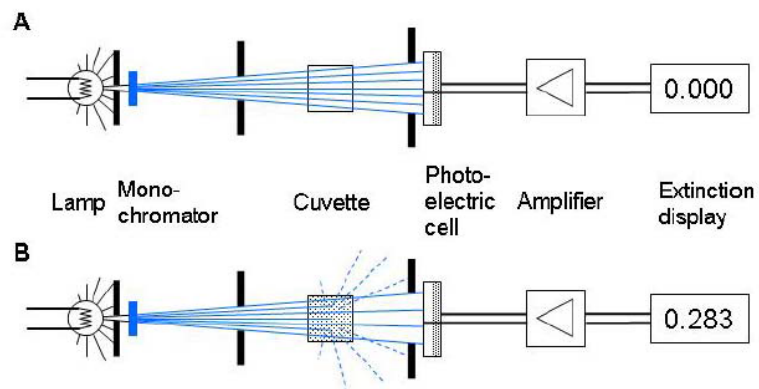


Figura 4: Ejemplo de montaje para la medición de densidad óptica.

### 2.3. Sensor TCS230 (sensor de color)

Ahora describiremos brevemente el funcionamiento del sensor utilizado. Este consiste en un arreglo de pixeles que convierten cantidad de luz de cierta longitud de onda en una señal de corriente, que posteriormente se puede convertir en una señal de frecuencia que nos dará los valores de color. El sensor tiene 4 tipos de operación que dependen de las entradas de los pines que se conectarán posteriormente al ArduinoUNO. estos cuatro modos se pueden ver en la tabla 2:

S2	S3	Estado del fotodiodo
L	L	Red
L	H	Blue
H	L	Clear (no filter)
H	H	Green

Tabla 2: Estados del fotoreceptor según las entradas S2 y S3

Sin embargo, las curvas de recepción del sensor no son lo suficientemente óptimas para las medidas de fluorescencia ver figura 5, ya que las bacterias fluorescentes a medir en este caso (RFP, GFP, BFP), emiten en longitudes de onda muy específicas por lo que tendríamos que tener filtros monocromáticos y de esta forma cambiarlos cada vez que vamos a realizar una medida. Proceso que sería bastante complejo y agregaría error al mismo. Además de esto otro factor que generaría error en la medición es que como se puede ver en la gráfica 5 parte izquierda, el sensor también recibe longitudes de onda que se encuentran en el infrarojo, por lo que alteraría la medición de fluorescencia.

Por lo tanto, la solución a estos problemas es usar un filtro sugerido por el fabricante del sensor (HOYA CM-500), de tal forma que la curva de recepción del sensor queda reducida al visible (principal característica del filtro), y además de esto los picos de los colores quedarán muy cerca de las longitudes de onda de emisión de las bacterias anteriormente mencionadas ver figura 5 gráfica derecha.

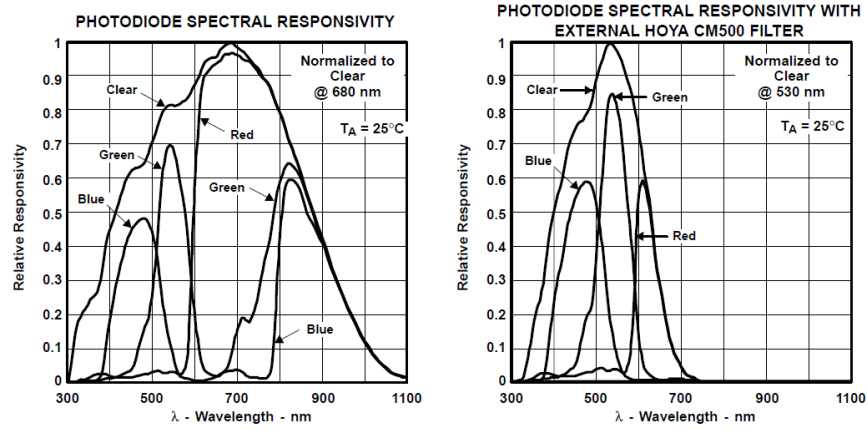


Figura 5: Curvas del sensor.

### 3. Materiales

En la Tabla 1. se encuentra el costo total de construcción del aparato, en términos de los materiales que lo componen, su costo total es de al rededor de 315.000 pesos colombianos.

Componentes	Referencia	Costo
Microcontrolador	Arduino UNO R3	25.113
Sensor de color	TCS230	30.000
Display	16x2 Estándar	7.720
LCD Display to I2C	Estándar	4.684
Boton	Estándar	6.614
Muestrario de filtros	lee filters swatchbook	4.707
Cables	macho-hembra colores	15.000
Pila cuadrada 9V	Estándar	5.000
Servicio de impresion 3D	Resina	80.000
MDF	Estándar	3.554
Conectores	macho	6.402
Filtro	HOYA CM- 500	130.000
LEDs	UV, Azul, verde, 530 nm	5000
Total		315.794

Tabla 3: Materiales y costo del proyecto

## 4. Ensayo de sensibilidad de Fluorescencia

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli DH103* fluorescentes (plac - mCherry), y se incubaron a 37 C durante 24 horas, posteriormente se tomaron diluciones consecutivas de 0.5. Las muestras se midieron de nuestra máquina en el modo correspondiente (rojo), con el objetivo de probar que la maquina tiene la capacidad de distinguir concentraciones pequeñas de fluorescencia. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

Replica	Blanco	0.0625	0.125	0.25	0.5	1
1	52	55	62	96	198	328
2	52	55	62	95	197	329
3	52	55	62	96	197	329
4	52	55	61	96	197	329
5	52	55	62	96	196	329
6	52	56	62	96	197	328
7	52	56	62	96	196	329
8	52	56	61	95	196	329
9	52	56	62	96	197	329
10	53	56	62	96	196	329

Tabla 4: Datos medidos durante la calibración del modo de densidad óptica.

Al graficar los datos se pudo observar (ver Figura 6.) que la medición de nuestro fluorímetro genera tanto datos reproducibles como coherentes, cada Punto en la gráfica corresponde a 10 mediciones



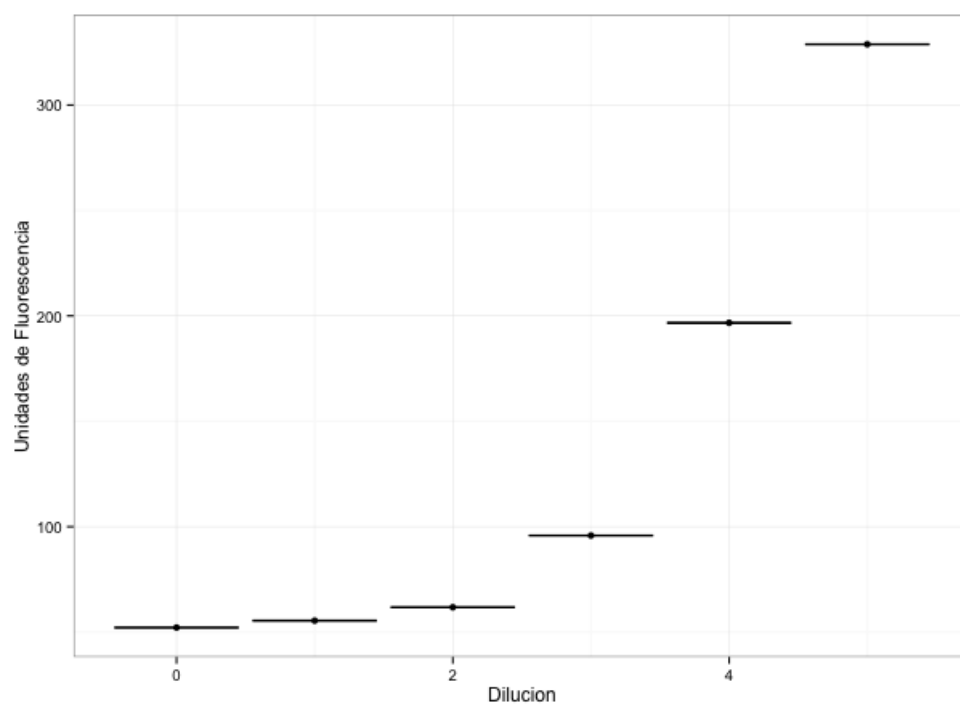


Figura 6: Biomate vs SG.

## 5. Calibración de Densidad Óptica

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli DH5 $\alpha$*  sin capacidad fluorescente, y se incubaron a 37 C durante 24 horas, posteriormente se tomaron diluciones consecutivas de 0.5. Las muestras se midieron tanto en el espectrofotómetro *BioMate* como en nuestra máquina. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos.

Maquina	Blanco	0.125	0.25	0.5	1
BioMate	0	0.134	0.250	0.533	0.971
BioMate	0	0.129	0.251	0.532	0.970
BioMate	0	0.130	0.251	0.534	0.969
BioMate	0	0.128	0.251	0.532	0.968
BioMate	0	0.128	0.250	0.528	0.966
BioMate	0	0.127	0.251	0.530	0.964
BioMate	0	0.127	0.250	0.528	0.964
BioMate	0	0.127	0.250	0.526	0.983
BioMate	0	0.123	0.246	0.535	0.970
BioMate	0	0.129	0.246	0.527	0.960
SG	0	0.122208605	0.195722215	0.372033736	0.660058655
SG	0	0.127860103	0.204767191	0.375640430	0.669044645
SG	0	0.127876110	0.204800591	0.380572107	0.670016962
SG	0	0.133940825	0.210909613	0.393077287	0.678084957
SG	0	0.133358252	0.210452868	0.394645891	0.676999403
SG	0	0.132844850	0.210985862	0.415812963	0.677667606
SG	0	0.132540017	0.211057871	0.418168820	0.678018068
SG	0	0.132614268	0.211114528	0.421309946	0.678261530
SG	0	0.132333280	0.211615545	0.422821511	0.678854978
SG	0	0.130678935	0.210988373	0.418175906	0.677997021

Tabla 5: Datos medidos durante la calibración del modo de densidad óptica.

Al graficar los datos se pudo observar (ver Figura 7.) que la medición de nuestro fluorímetro generaba tanto datos reproducibles como acertados y una respuesta mucho mas lineal que en el caso del espectrofotómetro *BioMate*.

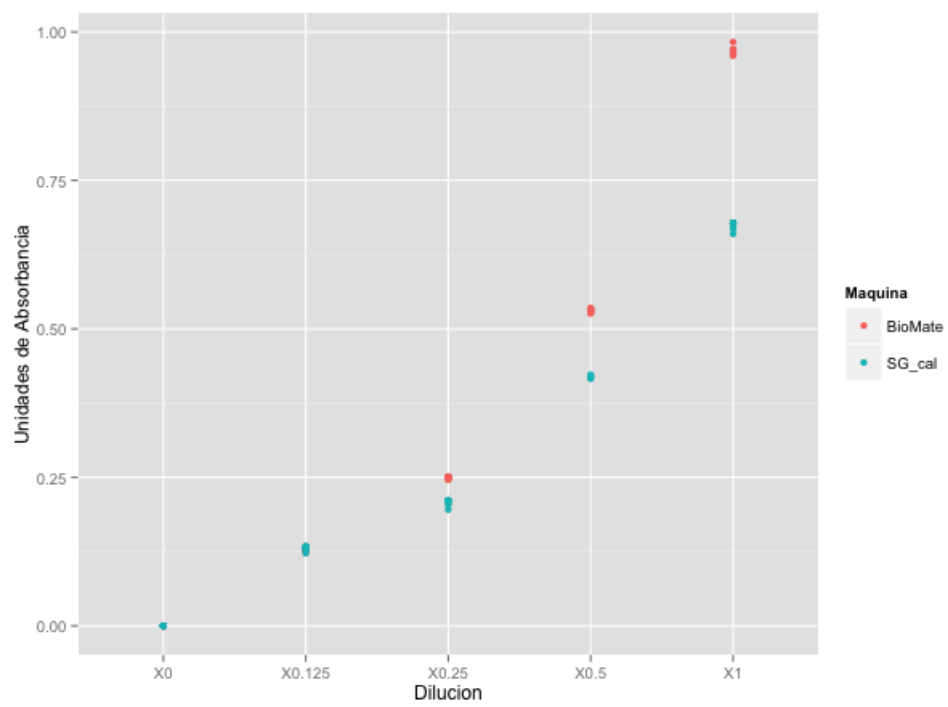


Figura 7: Biomate vs SG.

## 6. Resultados Conclusiones

Los datos obtenidos son bastante satisfactorios, por un lado para la densidad óptica se obtuvo una curva mas lineal que con el *BioMate*, que debido a como se realizó la preparación de las muestras era lo esperado, sin embargo estos aparatos reciben un uso continuo y poco mantenimiento de manera que no es extraño haber obtenido esta curva.

Por otro lado para el ensayo de sensibilidad de fluorescencia se realizó una curva anova (de comparación de medias) obteniendo un *valor p* de  $1 * 10^{-9}$  con lo cual es que existen diferencias significativas entre los valores de cada una de las mediciones realizadas y por ende la maquina se puede utilizar para hacer ensayos de detección cuantitativa de fluorescencia.

## 7. Discusión y A futuro

Consideraciones:

1. Para convertirlo a una maquina mas amigable para el usuario, recomendamos añadir otros 3 botones para seleccionar cada modo de manera independiente. Por la forma en la que funciona el código, el valor que entrega al usuario en el modo de densidad óptica realmente es el valor transmitido de intensidad de luz, recomendamos modificar el código de manera que entregue densidad óptica directamente. También se recomienda el diseño de una interfaz gráfica compatible con la maquina, y finalmente la implementación de una memoria para almacenar datos en el mismo dispositivo.
2. Por las características del sensor los modos de fluorescencia solo son capaces de detectar un rango limitado de sustancias fluorescentes, sin embargo no esta únicamente limitado a proteínas fluorescentes, es decir otro tipo de sustancias como la clorofila pueden ser detectadas también con una serie de simples ajustes.
3. Debe notarse que el fluorímetro fue diseñado para que funcione tanto conectado a un computador como con pilas, de manera que es un aparato para tanto mediciones en laboratorio como en campo.

## 8. Agradecimientos

*Departamento de Fisica, Universidad de los Andes*  
*Laboratorio de Biofísica Universidad de los Andes*  
*Centro de Investigaciones Microbiológicas, Universidad de los Andes*  
*Juan Manuel Pedraza*  
*Alexander Cardona*  
*David Guzmán*

*Aneider Angulo*  
*Andrés Moreno*

## **9. Bibliografía**

Widdel, F. Theory and Measurement of Bacterial Growth. (Universitat Bremen, 2010)

TAOS. Programable color light to frequency converter. (Texas, USA, 2003)

Herman, B. Lakowicz, J. Murphy, J. Spring, K. Davidson, M. Basic Concepts in fluorescence. (University of Texas, USA, 2009)

Sutton, S. Measurement of cell concentration in suspension by optically density. (American society for Microbiology, Washington, DC, 2006)

Koch, AL. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. (Anal Biochem, USA, 1970)