

Numero de grupo y nombres

Grupo 5 - Joaquín González, Mariano Nicolini, Sasha Smolarchik

Espectrometría difractiva

Día 1: 01/02/2019

Objetivos:

- Familiarizarse con el uso del espectrómetro y el software de adquisición de datos correspondiente.
- Realizar mediciones sin fuente lumínica para conocer el ruido correspondiente a la fibra óptica.
- Medir el espectro de diferentes lámparas de gases.
- Calcular la constante de Rydberg a través del espectro medido para la lámpara de hidrógeno.

instrumental utilizado:

Espectrómetro: Thor-Labs CCS200/m

RANGO: 200nm - 1000nm

RESOL: 2nm a 633nm

Cable de fibra óptica: M28L01-IC400um 0.39NA / TP01037488

Lámpara de halógeno: Thor-Labs SLS201/m

Lámparas de descarga varias.

Lámpara de sodio.

Experiencia:

Medimos el ruido (qué ruido? el ruido de oscuridad? cuenten bien cómo hicieron la medición) la señal recibida por el espectrómetro con y sin cable de fibra óptica, manteniendo las luces de ambiente apagadas, y parece ser un ruido del mismo orden de magnitud en ambos casos. El promedio es del orden de $3 \cdot 10^{-4}$, y la desviación estándar es $1.3 \cdot 10^{-3}$, en unidades arbitrarias, calculado por el software de adquisición de ThorLabs (en qué unidades?, como lo midieron?). Vamos a suponer, entonces, que el offset de la medición será 0 y un error estadístico igual a la SD.

Luego medimos el espectro de la lámpara halógena para comprobar que hubiera alguna respuesta del espectrómetro.

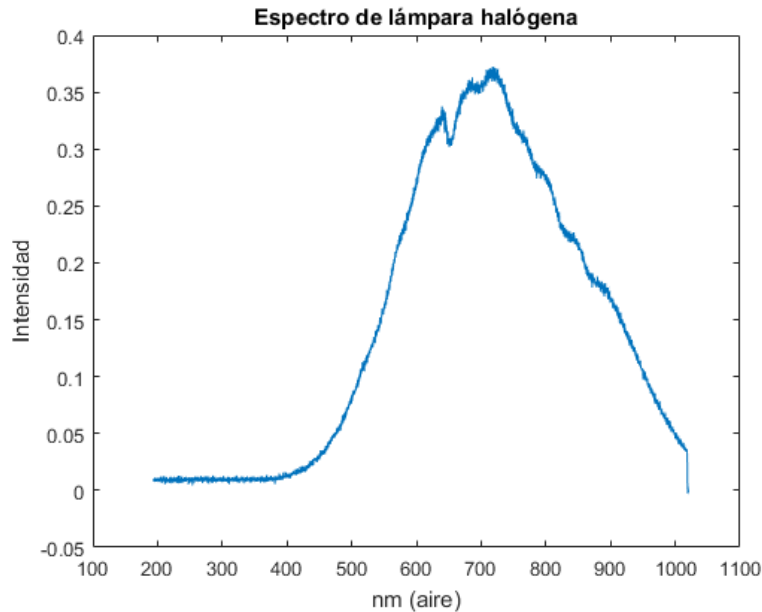
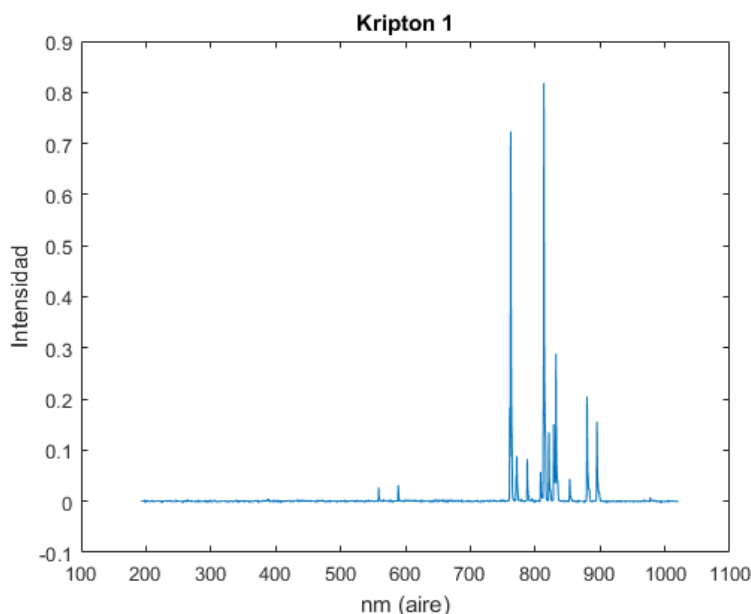


Figura 1

A continuación medimos el espectro de varias lámparas de gases de espectros bien conocidos y disponibles en tablas, para verificar que el espectrómetro esté funcionando adecuadamente. Se colocó el extremo de la fibra óptica opuesto al espectrómetro a la distancia mínima posible al punto medio de la longitud de la lámpara de descarga.

Colocamos una lámpara de Kriptón en un zócalo y medimos su espectro. Obtuvimos este gráfico:



Se observa que el espectro obtenido presenta los picos de mayor intensidad entre los 760 y 910 nm, lo cual se condice con lo expresado en la base de datos de <https://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/Tables/kryptontable2.htm>. De todas formas, hay algunos picos que no coinciden exactamente con los encontrados en la tabla. Vamos a hacer otra medición con Helio antes de ver qué pasa.

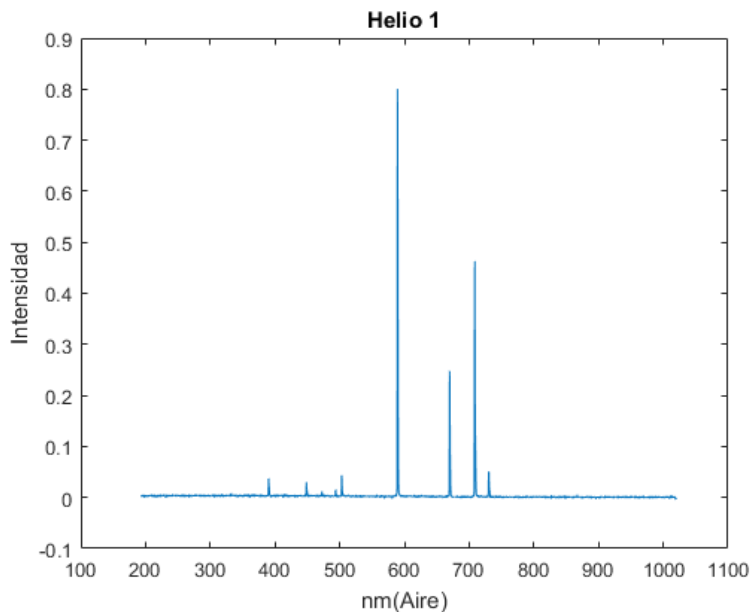


Figura 2

Lo mismo: hay algunas coincidencias, pero por ejemplo las intensidades relativas de los 3 picos más altos no concuerdan con la tabla (está mal que no coincidan las intensidades relativas? cual es el parámetro del espectrometro en el que pueden "confiar", es decir que está calibrado?). Agregado: otra tabla dada por el mismo instituto (NIST) reporta intensidades relativas más similares a las medidas en el caso del Helio, más adelante veremos qué pasa con las otras: https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html. De cualquier manera, las intensidades relativas tienen una importancia menor o nula en este experimento. Lo importante es que el instrumento esté calibrado en frecuencia. También medimos el espectro de: neón, hidrógeno, mercurio y argón.

Algunas lámparas tenían más ruido de fondo que otras, y todas titilaban más o menos (oscilaciones rápidas de intensidad en el tiempo de todas las longitudes de onda). Los espectros a continuación:

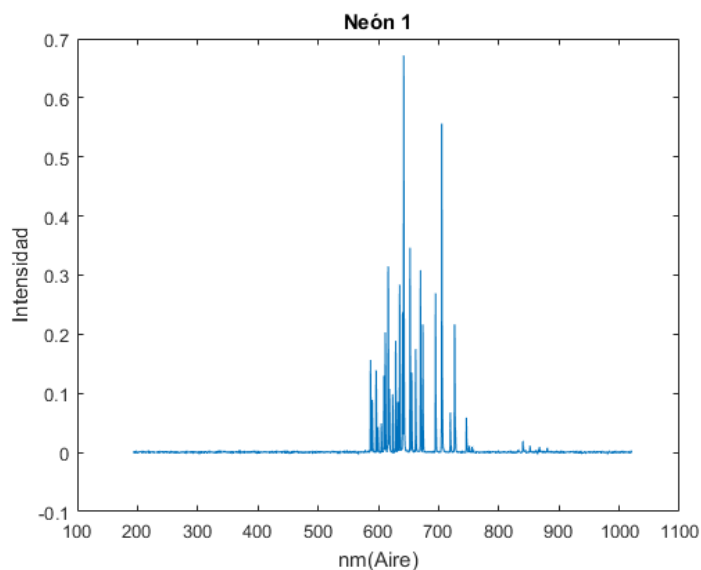


Figura 3

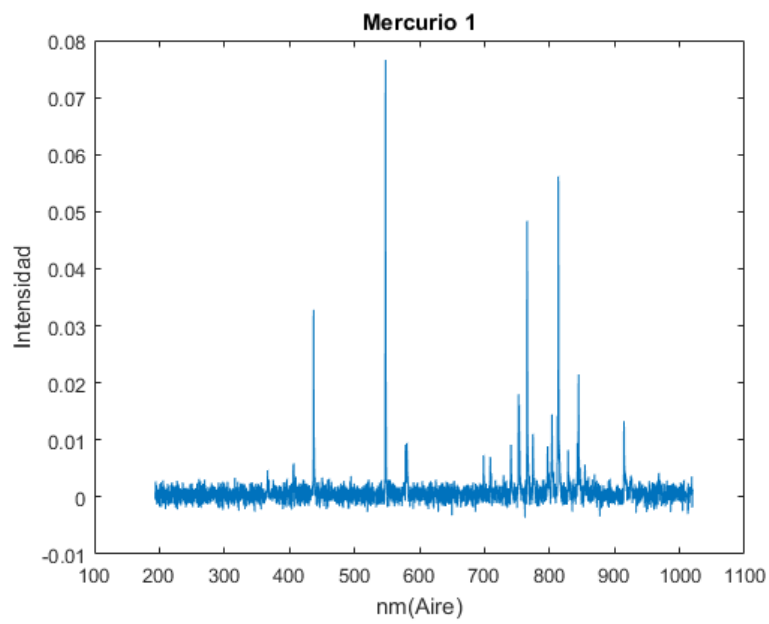


Figura 4

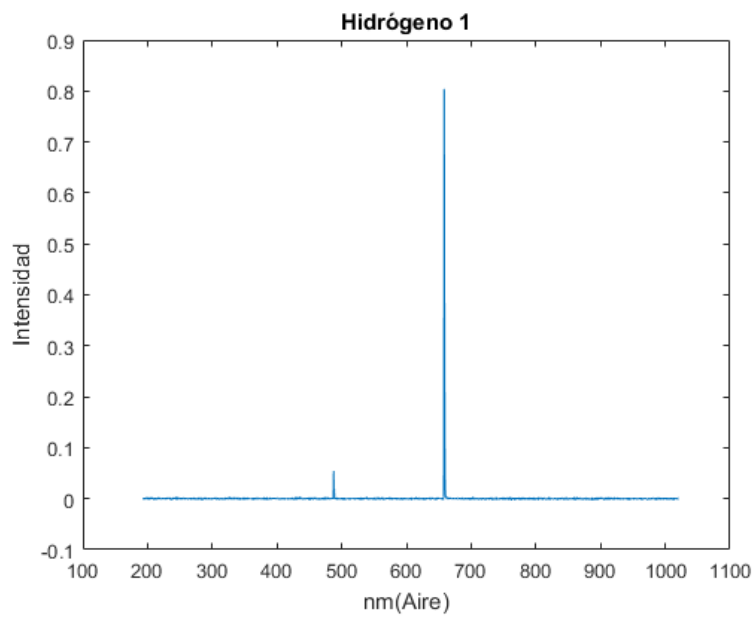


Figura 5

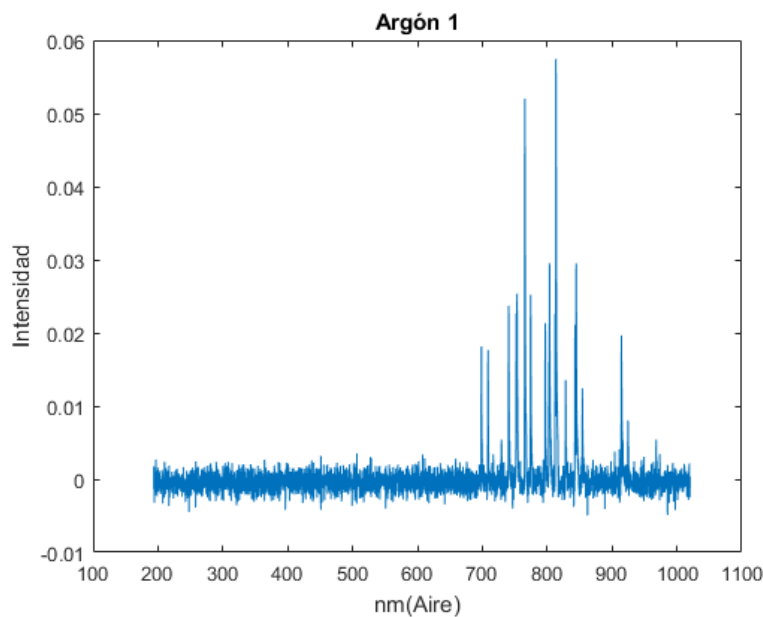
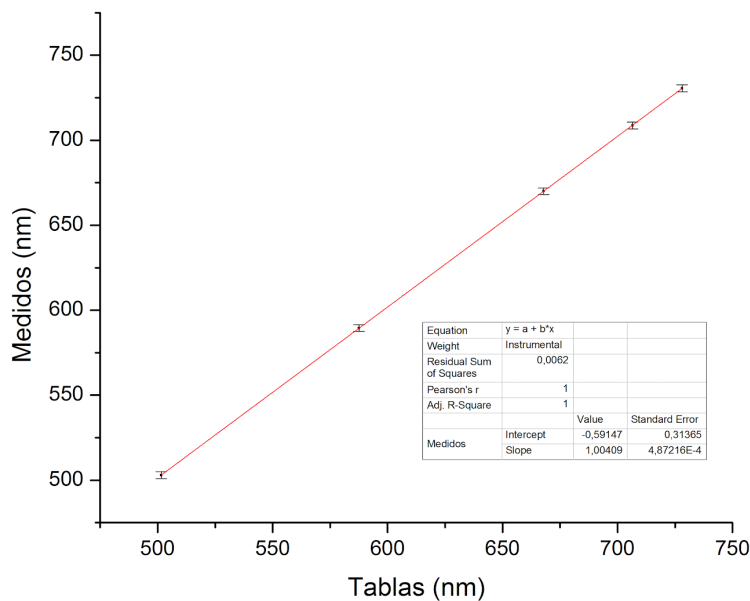


Figura 6

Se observa por un lado que el espectro del hidrógeno corresponde al tabulado. Por otro lado el espectro del neón se asemeja en gran medida al expresado en la nueva tabla, a dif



erencia de que según ésta última, deberían observarse picos de intensidad cerca de los 450 nm.

En cuanto a los espectros del mercurio y el argón, se observa una gran similitud en las longitudes comprendidas entre los 700 y los 930 nm aproximadamente. Esto se puede deber a que la lámpara de Mercurio contenga también argón para facilitar la descarga y el encendido de la lámpara.

Para verificar que la calibración del espectrómetro fuera adecuada, comparamos los picos del Helio medidos con los de tablas (parecían los más fidedignos), y ajustamos una función lineal. La pendiente resultó ser de $(1,0041 \pm 0,0005)$, y la ordenada $(-0,6 \pm 0,3)$, como se muestra abajo. **Incluyanla en el cuaderno.**

Figura 7

Como la resolución del espectrómetro es de 2nm, vamos a considerar que estos parámetros de ajuste indican que el espectrómetro está bien calibrado en frecuencia.

Con respecto a las intensidades relativas, estuvimos mirando el manual del cable y el espectrómetro, y encontramos la respuesta en frecuencia del cable (atenuación en función de longitud de onda). Para deducir la respuesta del espectrómetro, contrastamos el espectro de emisión de la lámpara halógena medido en el laboratorio con el provisto por el fabricante.

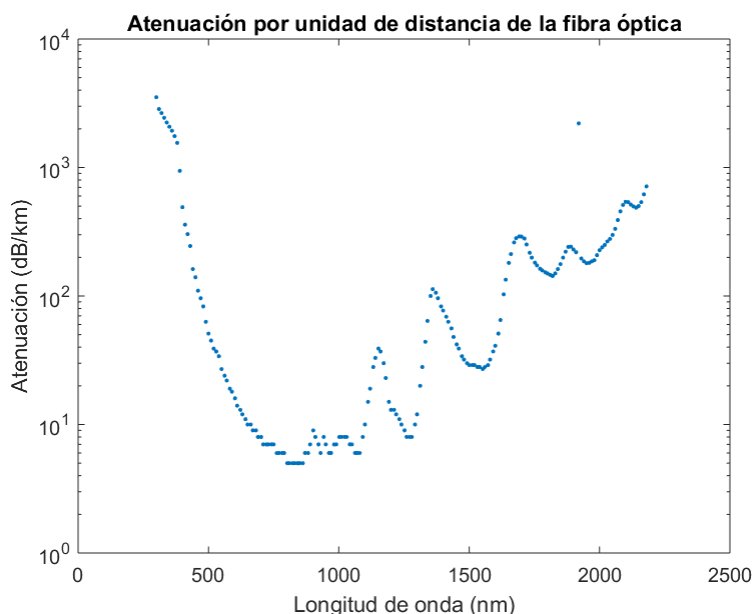


Figura 8

A simple vista puede parecer que la atenuación es considerable, pero es fundamental notar que los valores son de atenuación por km, y el cable mide aproximadamente 1 o 2 metros. Suponiendo que la relación entre atenuación y longitud del cable es lineal, se ve que en el rango visible la atenuación será del orden de 0.1dB o menor. Sólo habría que considerar longitudes de onda muy bajas o muy altas para la corrección correspondiente a la fibra óptica.

Espectro de la lámpara halógena (Lámpara de halógeno: Thor-Labs SLS201/m) según fabricante (negro) y medida en el laboratorio (rojo)

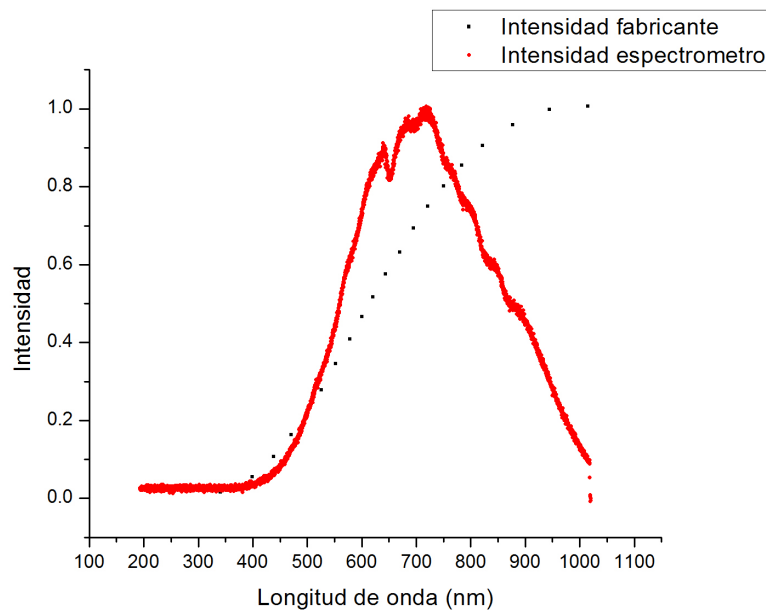


Figura 9

Tomando el cociente entre los valores obtenidos por el espectrómetro, y los reportados por el fabricante se obtiene el siguiente gráfico, que expresa la respuesta del espectrómetro en función de la longitud de onda, la cual presenta un máximo cerca de los 600 nm.

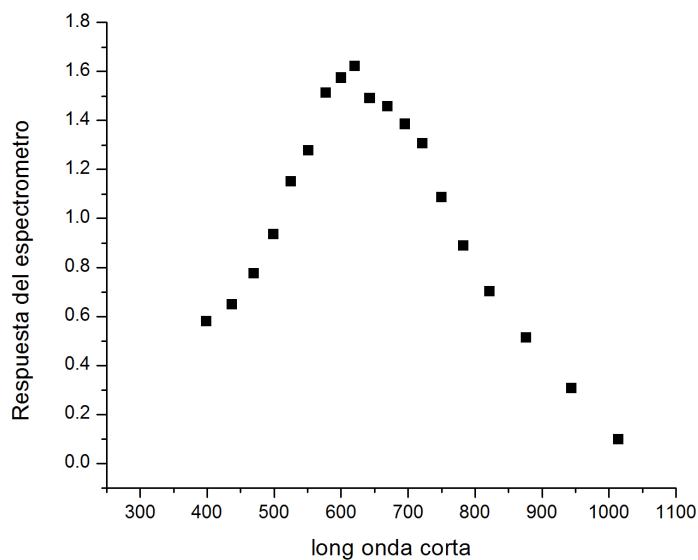


Figura 10

Cálculo de la constante de Rydberg usando el espectro del hidrógeno

Volvimos a medir el espectro del hidrógeno, esta vez aumentando el tiempo de integración del espectrómetro, para capturar intensidades más bajas. Logramos distinguir 4 picos del espectro visible en las siguientes longitudes de onda: 411nm, 435nm, 488nm, 658nm (todas

con un error de 2nm). Comparando en tablas, asociamos a cada una de estas longitudes de onda con los niveles n=6, 5, 4 y 3 respectivamente:

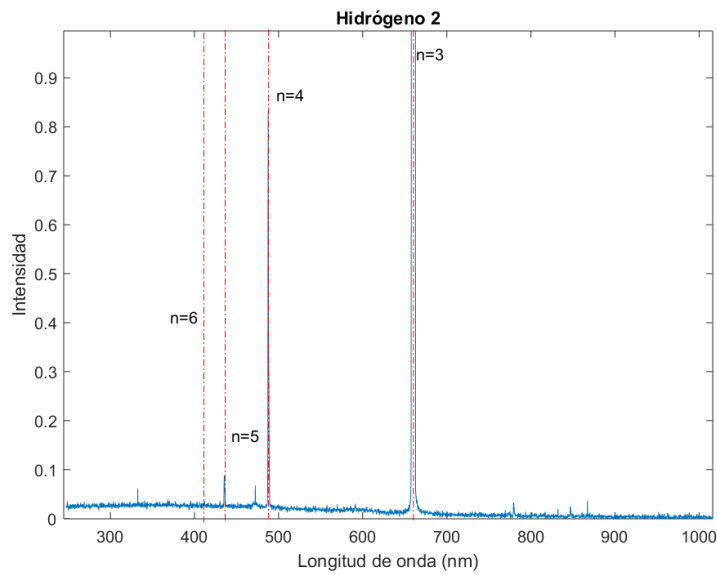


Figura 11

La línea de n=6 no se ve a simple vista, pero sí magnificando (igual podría medirse de nuevo con aun más tiempo de integración). Usando la fórmula de Rydberg:

$$\frac{1}{\lambda_{vac}} = R_H \left(\frac{1}{n_1^2} - \frac{1}{n_2^2} \right)$$

Se puede ajustar una lineal si la variable en x es $1/n_1^2 - 1/n_2^2$ y la variable en y $1/\lambda$, cuya ordenada al origen debería ser 0, y la pendiente obtenida, la constante de Rydberg. Hicimos el ajuste usando Matlab.

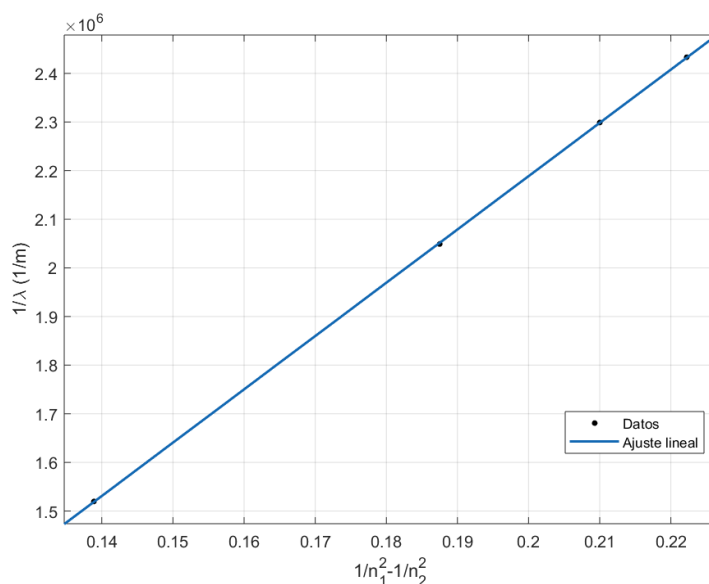


Figura 12

Del ajuste sale que $R = (10,96 \pm 0,15) \mu\text{m}^{-1}$ (coincide con el valor de CODATA).

Ojo que las lamparas no "mienten", es decir que si ven picos es porque en esa energía hay transiciones atómicas. A veces pasa que para que inicie con mas facilidad una descarga en algunos gases, dopan los tubos con algún otro gas. En ese caso verían trazas de otros gases, es decir picos extra. Es una tarea no menor ahora asignar a cada pico que ven una transición. Es parte del trabajo usual de un espectroscopista. Haganlo para la clase próxima

Puse correcciones o sugerencias en rojo. Traten de no borrar nada previamente escrito en el cuaderno. El trackeo de errores que uno haya tenido es importante para no volver cometerlos o seguir un razonamiento o conclusión. Andrea

Día 2: 06/02/2019

Esta clase vamos a trabajar con soluciones de componentes fluorescentes (fluoresceína y rodamina). La idea es medir los espectros de emisión y absorción de cada uno en diferentes concentraciones, y luego (quizá la próxima clase) estudiar el fenómeno de FRET.

Objetivos:

- Preparar las diferentes soluciones.
- Medir el espectro de emisión y absorción de cada una.
- Verificar la ley de Lambert-Beer, en qué rango de concentraciones es válida.

Comenzamos con el preparado de las concentraciones de la fluoresceína. La fluoresceína del fabricante tiene una concentración de 2,5mg por mL de solución (0,25%). Disponemos de una muestra ya diluida de 1 parte en 10 de esta concentración original, es decir, 0,25mg por mL, en una cápsula Eppendorf. En molaridad, el contenido de esta cápsula es de 750mM. La idea es obtener concentraciones de 5uM, 25uM, 50uM y 100uM, mediante diluciones sucesivas.

La lista de las diluciones efectuadas fue la siguiente:

1. 660uL de solución 750mM + 340uL de agua mQ. (SOLUCIÓN 1, molaridad 495mM)
2. 10uL de Solución 1 + 990uL de agua mQ. (SOLUCIÓN 2, molaridad 4,95mM)
3. 14uL de Solución 2 + 1386uL de agua mQ. (SOLUCIÓN 3, molaridad 49,5uM)
4. 100uL de Solución 3 + 900uL de agua mQ. (SOLUCIÓN 4, molaridad 4,95uM)
5. 500uL de Solución 3 + 500 de agua mQ. (SOLUCIÓN 5, 24,75uM)
6. 20uL de Solución 2 + 980 de agua mQ. (SOLUCIÓN 6, 99uM)

Se eligieron las concentraciones basandose en un trabajo realizado en este mismo laboratorio donde se utilizaron concentracions de 0.5uM, 5uM, y 50uM. Y se optó por

cambiar la concentración de 0.5uM por una de mayor molaridad ya que con la primera no se observaban los efectos de interés para la práctica.

Nota: La primera dilución fue innecesaria, producto de una equivocación. Podría efectuarse la dilución desde la solución 750mM a la Solución 2 (con las proporciones adecuadas).

Para medir absorción se iluminará la muestra con la lámpara halógena, colocando la fibra óptica alineada con el haz de entrada, mientras que para medir la emisión se iluminará con un láser VD-IIA laser driver puntero láser violeta (lo cambiamos porque el VD IIA emitía en 532nm, fuera del espectro de absorción de la fluoresceína), a 90° respecto de la fibra óptica que va al espectrómetro (salida del portacubetas).

Nota: en las figuras 19 y 21 se ve una foto del dispositivo.

Se iluminó la muestra a través de su eje más largo, con el propósito de que se excite mejor la muestra.

Primero, se midió la absorción de la cubeta con agua mQ para tener como referencia al comparar con los espectros de absorción de las muestras diluidas. La pinta es muy similar a la de la lámpara halógena sola, lo cual era de esperar:

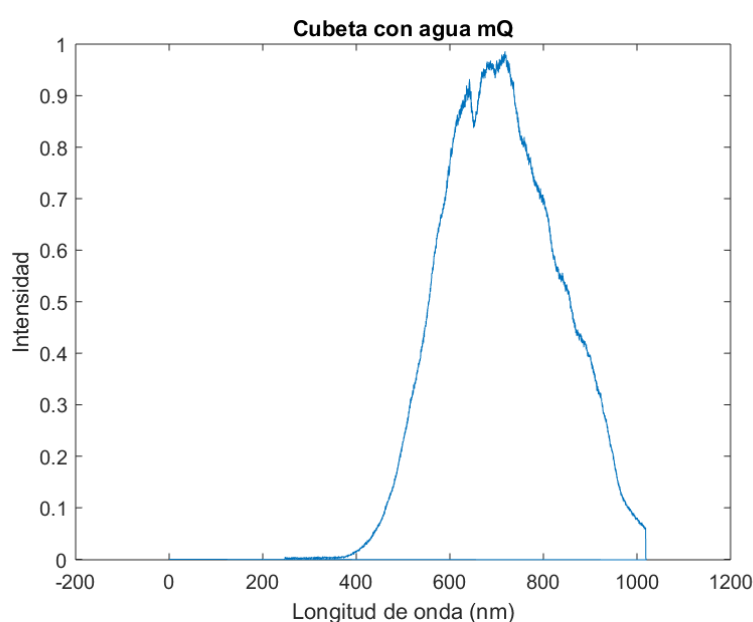


Figura 13

A continuación, en otra cubeta diferente, se introdujo la primera muestra (Solución 2, 5uM), y a la cubeta en el portacubetas de la misma manera que en el caso precedente, para ver el espectro de absorción. Se utilizó la funcionalidad del software de ThorLabs para computar la absorbancia a partir del espectro base (en este caso el de la cubeta con agua pura), y se obtuvo lo siguiente:

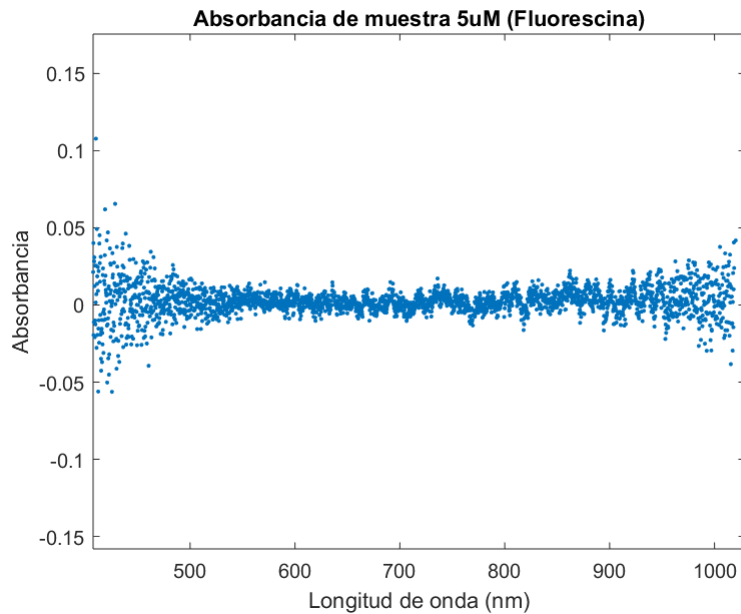


Figura 14

Consideramos que no se distingue ninguna absorbancia significativa. En los extremos (cerca de 400nm y 1000nm) se ve una mayor amplitud, pero tiene que ver con que la intensidad de lámpara que detecta el espectrómetro es muy cercana a 0, lo cual implica (por la ley de Beer-Lambert) un mayor error. En particular, la absorbancia según dicha ley es el logaritmo (en base 10) del cociente de las intensidades, y dicho cociente es más sensible a las fluctuaciones estadísticas (absolutas) de las intensidades cuando estas son más cercanas a 0.

Se empezó por la solución más diluida con motivo de reutilizar las cubetas y utilizar la menor cantidad posible.

Medimos el espectro de emisión de esta misma muestra usando distintos tiempos de integración. Abajo se ve el caso $t=400\text{ms}$:

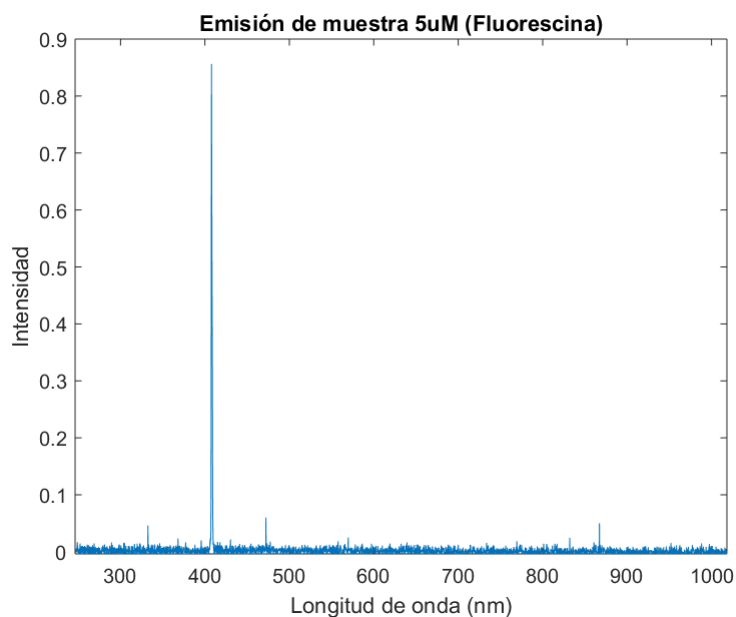


Figura 15

Sólo puede verse un pico en 408nm, que corresponde a la longitud de onda del láser. No se observa emisión de la fluoresceína. Según la base de datos <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/252> hay absorbancia en esa parte del espectro, aunque bastante baja:

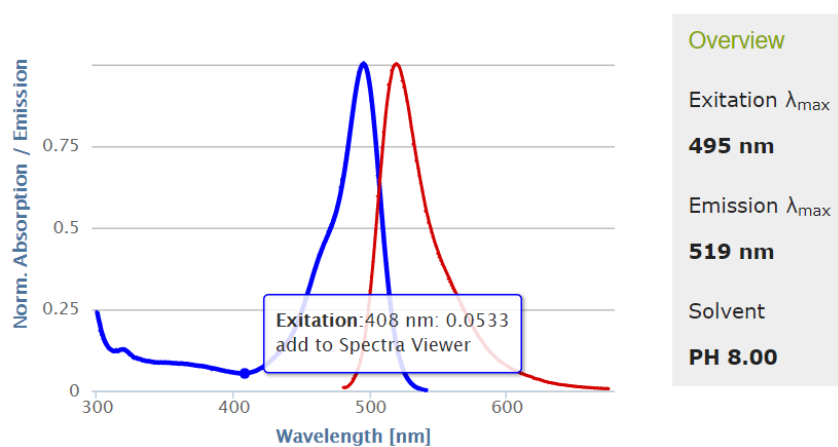


Figura 16

Sin embargo, antes vamos a ver qué pasa con las concentraciones más altas.

Repetimos el proceso con las muestras de 25uM y 50uM, y los resultados no fueron demasiado diferentes. Abajo se muestra el espectro de emisión de la muestra de 50uM.

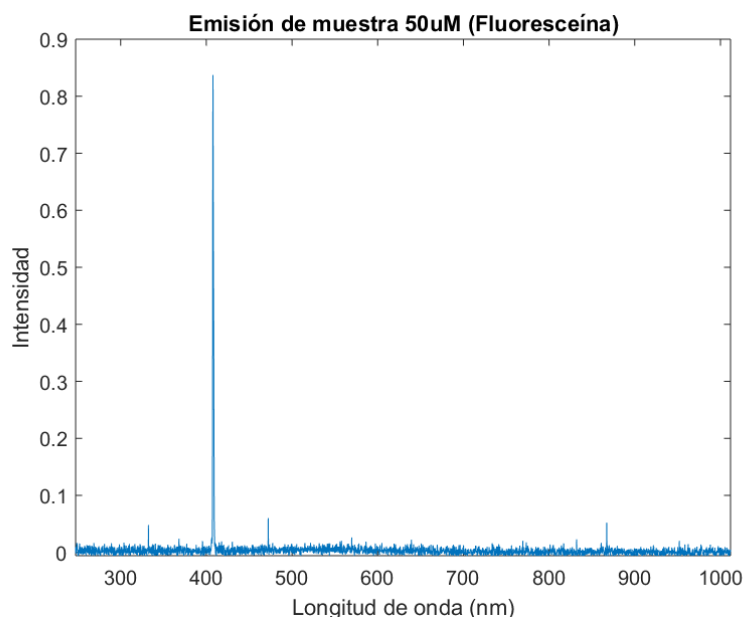


Figura 17

Esta vez puede apreciarse una muy pequeña elevación entre 500nm y 600nm, pero es demasiado leve aun. En los espectros de absorción no se encontraron mayores diferencias.

Nota: el tiempo de integración para todos los espectros de absorción fue de 1.85ms. Para los espectros de emisión se utilizaron 3 tiempos de integración: 100ms, 400ms, 1000ms, ya que no sabemos a priori qué tan intensa va a ser la emisión de la fluoresceína (nota: tal vez no hace falta que todos los espectros de emisión tengan el mismo tiempo de integración, porque no necesariamente hay que comparar sus intensidades, no así en el de absorción). Quizá no esté demás añadir que, igualmente, el ruido de oscuridad también se amplía con el tiempo de integración, y si la intensidad que quiere medirse es demasiado baja de por sí, no va a poder distinguirse de este ruido aunque el tiempo de integración sea muy alto. Esto es lo que ocurre en este caso.

Tenemos algunas ideas de lo que puede llegar a estar impidiendo que logremos medir los espectros. Pudo haber ocurrido que:

- Se hicieran mal los cálculos de las concentraciones.
- Se hubieran preparado las soluciones de manera incorrecta.
- La intensidad de la luz que llega al espectrómetro fuera demasiado baja, lo cual podríamos intentar solucionar agregando elementos ópticos como lentes, para capturar una mayor superficie del frente del haz.

Día 3: 08/02/2019

Resulta que, efectivamente, las concentraciones estaban mal calculadas, y las soluciones demasiado diluídas (más adelante vamos a especificar bien todo); por esto, no podíamos ver nada. Se volvieron a realizar todas las soluciones. En particular, de $5\mu M$, $50\mu M$ y

100 μ M. Elegimos estas concentraciones porque en trabajos anteriores en el laboratorio se habían utilizado estos órdenes de magnitud de molaridad, y apreciado sin inconvenientes. Esta vez, la muestra de 100 μ M fluoresceína a simple vista, lo cual no ocurría la clase pasada (es un buen indicador de que, al menos con nuestro espectrómetro, la fluorescencia podrá apreciarse).

Utilizamos una nueva lámpara halógena de Tungsteno del mismo fabricante y modelo porque se averió el conector de la anterior. Volvimos a medir el espectro de su luz atravesando una muestra de agua milliQ pura en la cubeta con dos tiempos de integración (tiempos de integración 6,5ms y 12ms) para utilizarlo como referencia, ~~y resulta ser distinto que el de la lámpara anterior. Esto también indica que lo que habíamos considerado la "respuesta del espectrómetro", comparando la luz observada de la lámpara de Tungsteno en comparación al espectro ofrecido por el fabricante, no lo es exactamente.~~ **Nota: en realidad, los espectros parecen bastante similares (por eso se tachó lo anterior). No podemos compararlos porque los tiempos de integración utilizados para la medición de ambos son distintos.**

Abajo se ve una foto de las cubetas con las preparaciones (la verde de la izquierda es alguna concentración de fluoresceína, la transparente de la derecha es agua mQ, y la rodamina exhibía un color apenas rojizo).

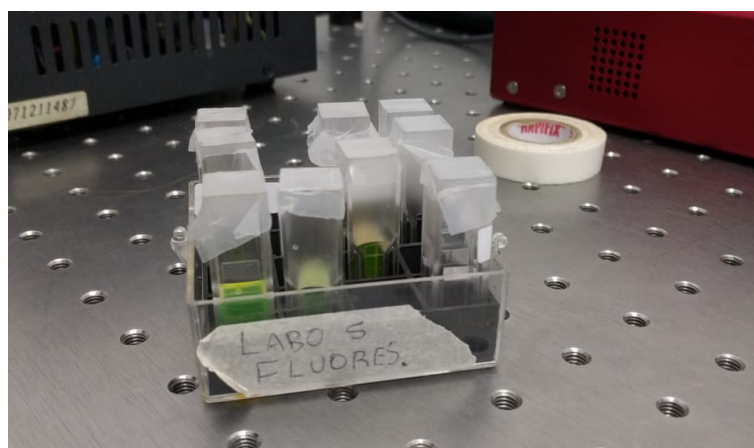


Figura 18

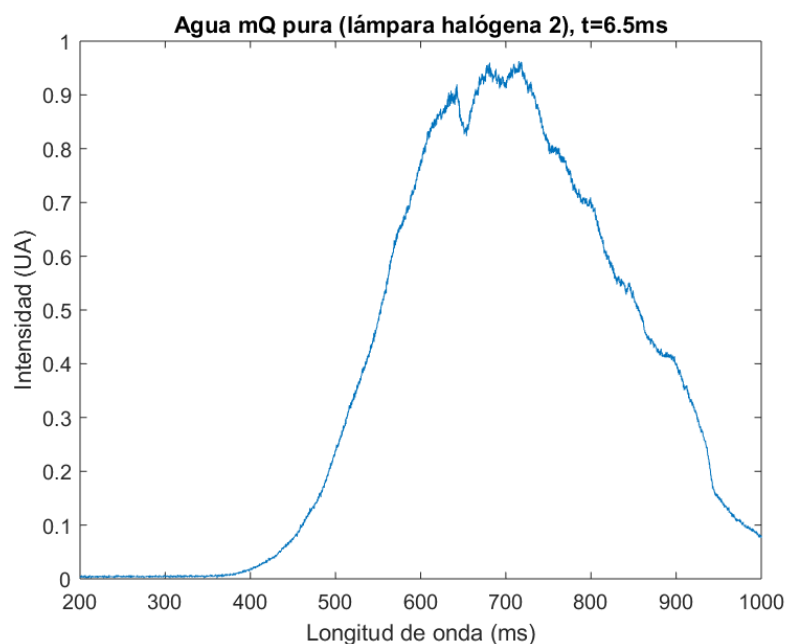


Figura 19

A continuación, colocamos la muestra de $100\mu M$ de fluoresceína en la cubeta, de la misma manera que se había hecho en la jornada previa del 6/2. Medimos primero el espectro con lámpara halógena, y se calculó la absorbancia desde el software de adquisición de ThorLabs, a 6,5ms y 12ms. Esta vez se puede apreciar con claridad. **Nota: elegimos estos tiempos de integración porque en 6,5ms el espectro de la halógena no saturaba, y en 12ms saturaba el pico, pero no el rango de absorción de los fluoróforos.**

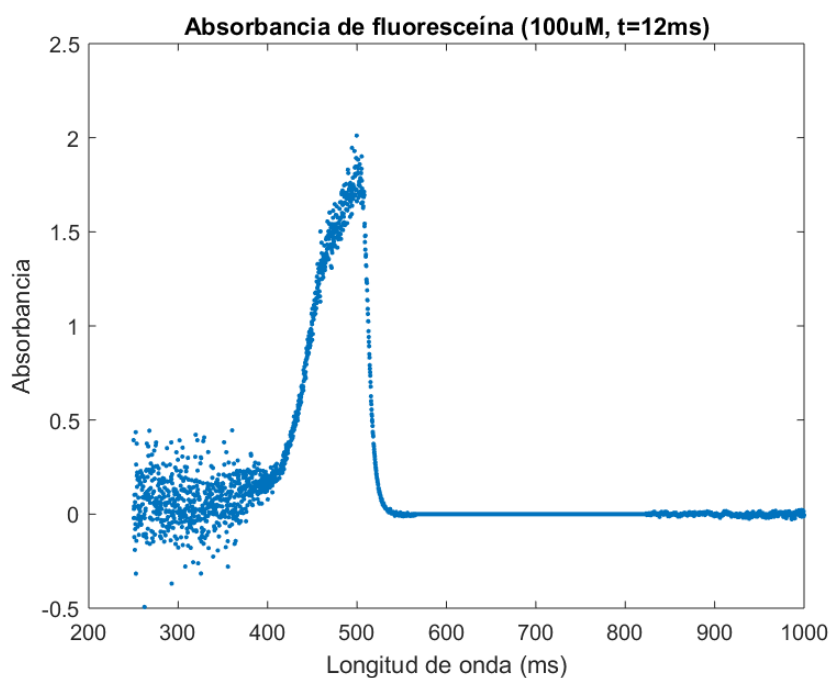


Figura 20

Nota: más adelante se discutirán brevemente algunas características de este perfil, pero el pico de intensidad que se ve en la figura no necesariamente es el pico de absorción de la

fluoresceína, porque la intensidad en la que emite la lámpara de tungsteno cae considerablemente en esas longitudes de onda (sentido decreciente). Comparar con figura 19.

Del mismo modo que en la jornada pasada, apagamos la luz halógena e introducimos el láser de 405nm a 90° para observar el espectro de emisión. El láser fue colocado de la siguiente manera:

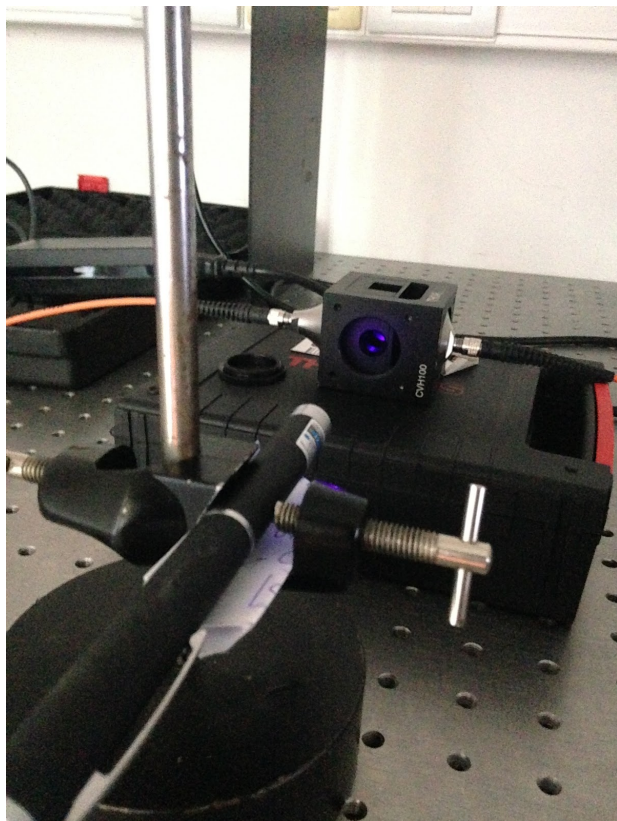


Figura 21

Como se puede ver, el láser tiene un botón de encendido al costado derecho, que hay que ajustar el tornillo de la nuez para que el láser se encienda. **Nota: no mostramos el espectro de emisión, porque más adelante aumentamos el tiempo de integración.**

Repetimos esto con las otras dos concentraciones de fluoresceína (5uM y 50uM).

Vamos a ver si son consistentes las intensidades del láser en las distintas mediciones. Es decir, vamos a ajustar y desajustar el tornillo de la nuez y ver si la intensidad del láser es siempre la misma.

Resulta ser que la intensidad es demasiado variable, por lo que habrá que repetir las mediciones más adelante manteniendo la misma intensidad (una vez que se deja presionado el láser y se espera a que se estabilice, la intensidad se mantiene bastante estable).

Mientras tanto, vamos a continuar con las mediciones de espectros de absorbancia de la rodamina. Comenzamos con la concentración $100\mu M$. Nos dimos cuenta de que el posicionamiento de la cubeta puede cambiar de manera significativa la detección de intensidades de luz. Esta “baila” un poco en el portacubetas, y fue necesario verificar en el software de adquisición que la parte inalterada del espectro (en el caso de la rodamina, por arriba de los $700nm$) coincida con el “blanco” (luz halógena en agua mQ). La absorbancia obtenida puede verse a continuación.

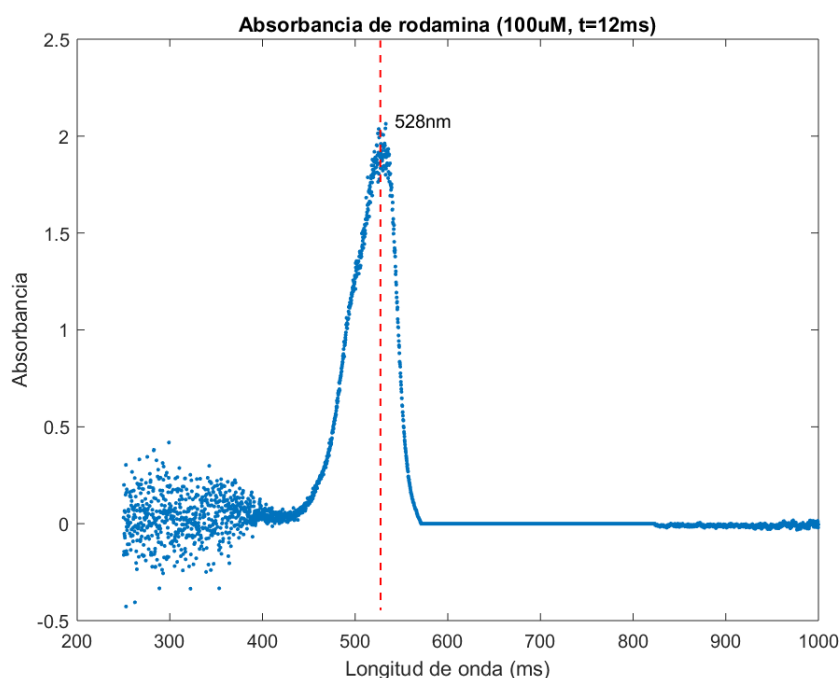


Figura 22

El pico de absorción está en $(528 \pm 2)nm$, y la campana va desde $490nm$ a $547nm$ aproximadamente (FWHM=57nm).

Otro detalle importante: **las fibras ópticas son sensibles a su orientación. Es fundamental ajustarlas bien en una posición fija (si se prefiere, puede buscarse aquella de máxima intensidad). Es preferible no tocarlas nunca a lo largo del experimento.** Nosotros tuvimos que “recalibrar” en un dado momento, reajustando el cable hasta que volvieran a coincidir los espectros del blanco. Podría haber algunas pequeñas diferencias, pero no son considerables, así que resolvimos conservar las mediciones anteriores.

Preparamos todas las muestras y estamos listos para medir los espectros de emisión y FRET (por ahora $5\mu M$ y $50\mu M$).

Colocamos un divisor de haz entre el láser y el portacubetas, como para redireccionarlo hacia un fotodiodo (monitoreado por un osciloscopio) que nos asegure que la intensidad del láser se mantiene constante. Mantenemos presionado el botón utilizando una cinta adhesiva. El voltaje recibido por el fotodiodo en el osciloscopio es de 12.2V.

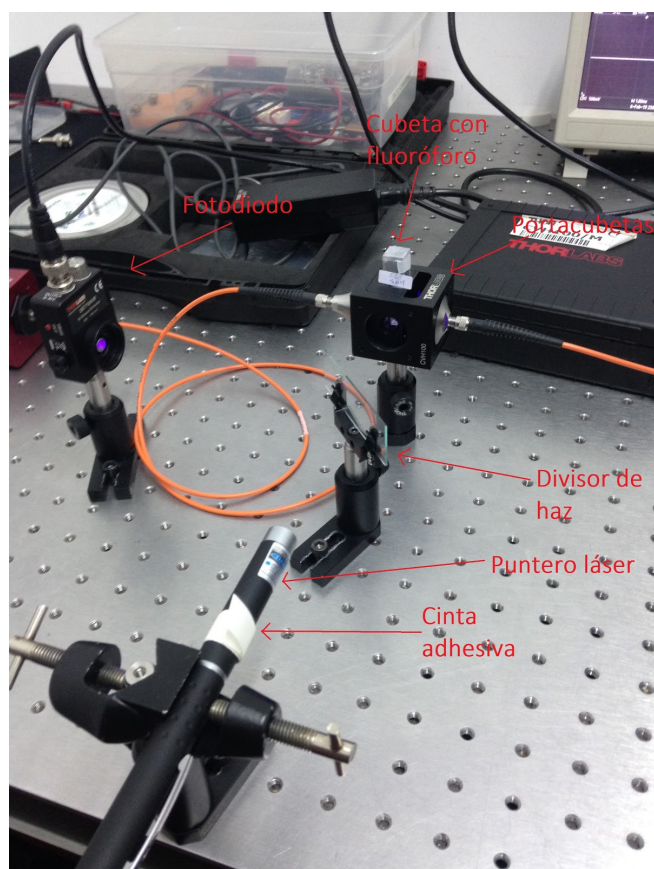


Figura 23

Vamos a empezar midiendo el espectro de Flu 5uM y Rodamina 5uM, con tiempos de integración 4,5ms, 6,75ms y 9ms. También adquirimos el espectro de emisión de la solución mixta con 5uM (de cada una). Sólo utilizamos, en este último caso, un tiempo de integración de 9ms. A continuación se ven los resultados. **Nota: estos tiempos de integración (en el caso de emisión) son innecesariamente bajos en nuestro set-up. Más adelante los incrementamos para aprovechar al máximo el rango del instrumento.**

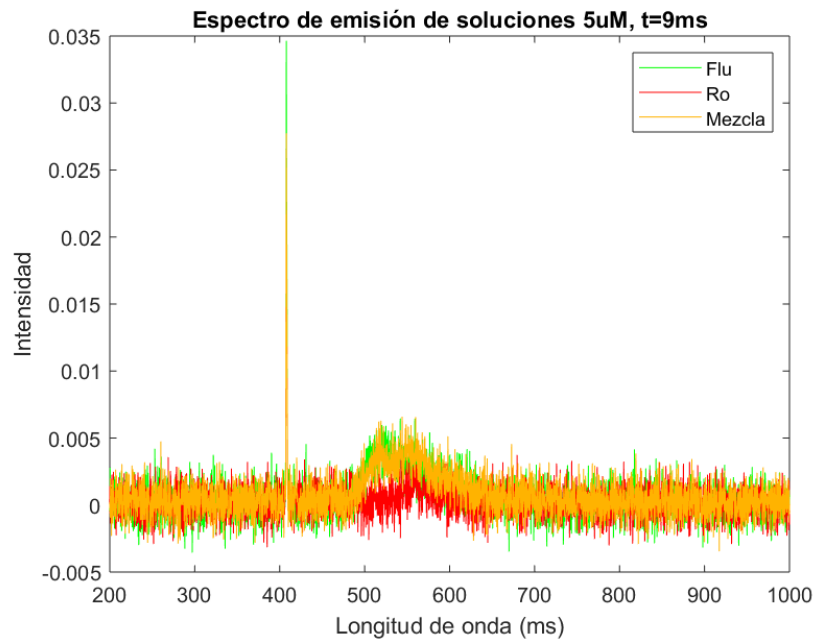


Figura 24

Se ve que logra distinguirse más la luz del láser dispersada por los elementos que están dentro del portacubetas (agua, plástico, etc.) alrededor de 400nm, que la emisión propia de los fluoróforos. Además, el ruido es significativo en comparación a la intensidad máxima.

Repetimos la medición para las soluciones con concentraciones 50uM y 100uM, sólo integrando 9ms.

También medimos la absorbancia de las mezclas. Los gráficos comparativos se muestran a continuación.

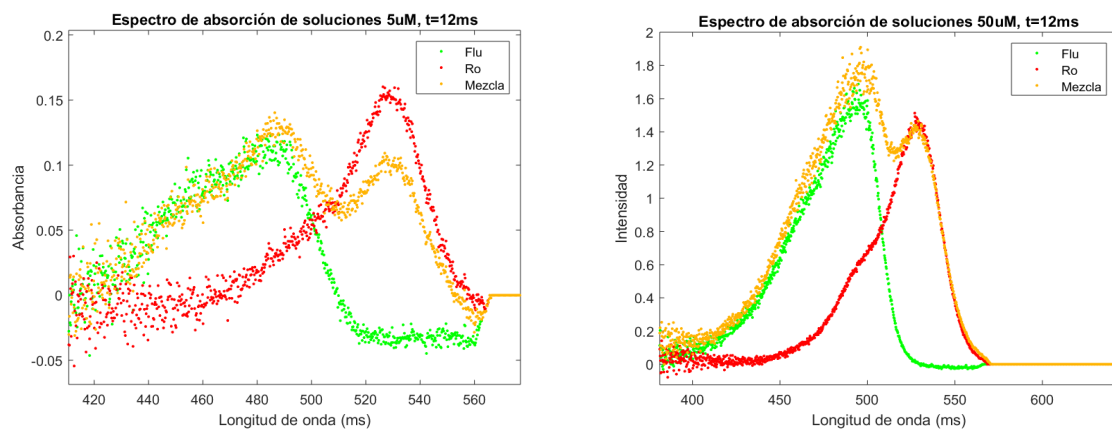


Figura 25

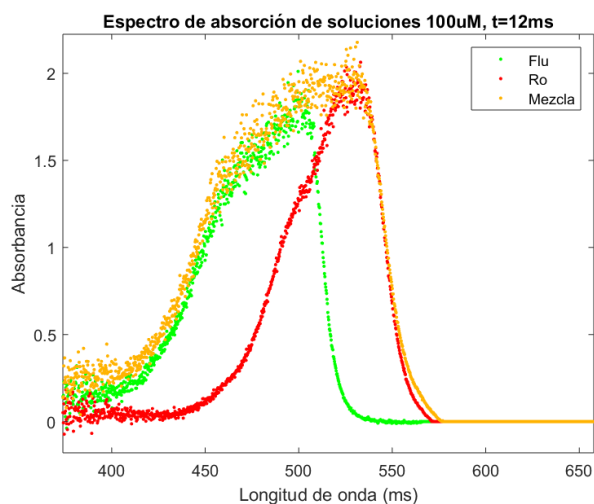


Figura 26

A simple vista, parece que el perfil de absorbancia de la solución mixta es muy similar al de la combinación de los otros dos por separado. En el último gráfico, para 100uM, se ve que en el espectro de la solución mixta ya no se distinguen dos picos con una depresión en el medio. Esto se debe a que los fluoróforos, en esta concentración, absorben toda la luz de la lámpara (al menos detectable por el espectrómetro) presente en esta región. Esto significa que las concentraciones elegidas fueron buenas. Probablemente, lo mejor sea alguna entre 50uM y 100uM (para esta lámpara).

A continuación, buscamos caracterizar el espectro de emisión de la rodamina utilizando un láser con longitud de onda de 532nm (sabemos, por lo que vimos antes y las tablas, que hay un pico ahí). Colocamos y encendimos dicho láser (importante usar gafas protectoras), y medimos el espectro de la rodamina en concentraciones de 50uM y 100uM, a tiempos de integración de 160ms.

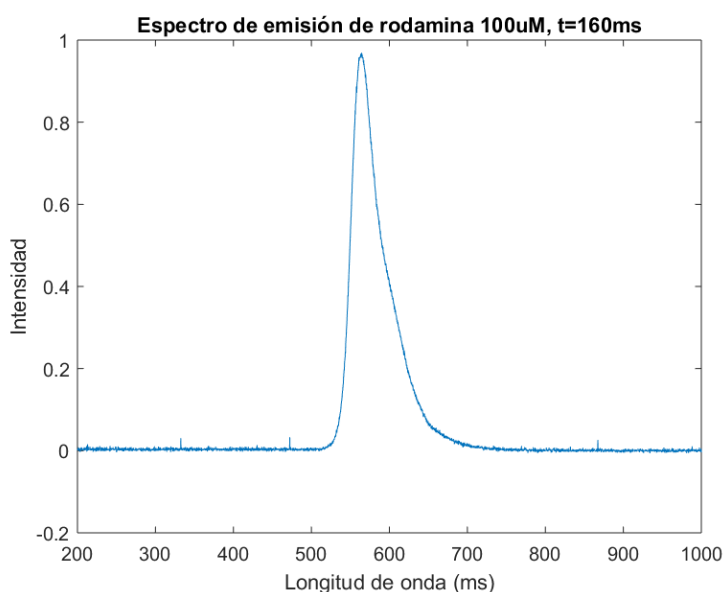


Figura 27

Haciendo esto, nos dimos cuenta de que habíamos usado tiempos de integración demasiado bajos para los otros espectros de emisión. Volvimos a medir, por lo tanto, todos los de las soluciones de 50uM y 100uM con el láser de 405nm.

Esta vez, el fotodiodo, a través del osciloscopio, detectaba un voltaje de 5.38V. Notamos que permanecía aproximadamente estable y comenzamos a medir las soluciones de rodamina y fluoresceína separadas. Luego medimos las soluciones mixtas, aunque notamos que el voltaje había decrecido a 5.20V.

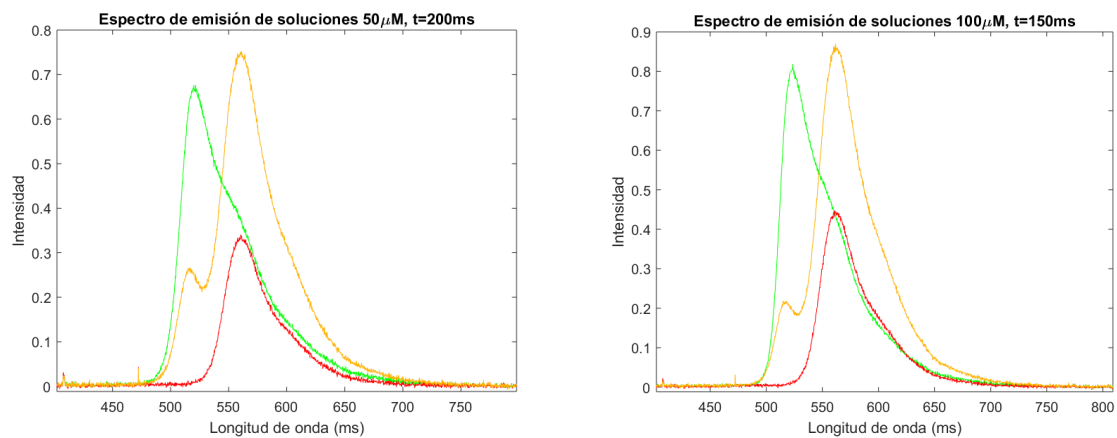


Figura 28