

Tesis de lic

Tomás Di Napoli

12 de diciembre de 2024

Agradecimientos

Resumen

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Espectrofotometría estática	5
1.2. Espectrofotometría dinámica	5
1.2.1. Medición de tiempos de vida: <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i> (TCSPC) va a la intro	5
1.3. Nanopartículas de conversión ascendente	5
2. Espectrofluorímetro para la caracterización de UCNPs	6
2.1. Espectrometría de fluorescencia	6
2.1.1. Instrumentación: el espectrofluorímetro	6
2.1.2. Espectrofluorímetros en argentina y obsolescencia	7
2.2. Renovación y ampliación del fluorímetro Horiba PTI Quanta Master 400	8
2.2.1. Componentes originales	8
2.2.2. Hardware para la renovación del QM 400	10
2.2.3. Hardware ampliación	11
2.3. Sistema de detección de fotones	12
2.3.1. Caracterización del PMT con la Red Pitaya	13
2.3.2. Conteo de fotones	16
3. Validación de funcionamiento	19
3.1. Software	19
3.2. Protocolo de medición estática	20
3.3. Protocolo de medición dinámica	22
4. Caracterización de UCNPs	24
5. Conclusiones	28
Appendices	31
A. instrucciones de armado	32
A.1. Renovación del Horiba PTI Quanta Master 400	32
A.2. Ampliación para mediciones dinámicas	33
A.3. Instalación y configuración del software	34
B. Instrucciones de uso	35
B.1. Modo de operación GUI	35
C. tiempos de vida todos los picos a != pot	35

D.	análisis picos	35
E.	benchmark	35

Capítulo 1

Introducción

1. ¿qué es la luminiscencia? algunas aplicaciones ej. microscopía, plim y flim

- In 1565, a Spanish physician and botanist, Nicolas Monardes (Figure 2), reported the peculiar blue color (under certain conditions of observation) from an infusion of a wood from Mexico and used to treat kidney and urinary diseases (Figure 3).⁹¹² This wood (later called *Lignum nephriticum*), whose peculiar color effect and diuretic properties were already known to the Aztecs, was a scarce and expensive medicine. Therefore, it was of interest to detect counterfeited wood. Monardes wrote on this respect, ¹² Make sure that the wood renders water bluish, otherwise it is a falsification. Indeed, they now bring another kind of wood that renders the water yellow, but it is not good, only the kind that renders the water bluish is genuine. (in Spanish in the original). This method for the detection of a counterfeited object can be considered as the first application of the phenomenon that would be later called fluorescence. Extracts of the wood were further investigated by Boyle, Newton, and others,⁶ but the phenomenon was not understood at the time.
- In 1845, the polymath Sir John Herschel, son of the famous astronomer and the originator of the word photography (where light is again involved), prepared an acid solution of quinine sulfate and stated,¹⁸ Though perfectly transparent and colorless when held between the eye and the light, it yet exhibits in certain aspects, and under certain incidences of the light, an extremely vivid and beautiful celestial blue color. As the color was always superficial, he believed it to be a hitherto unidentified phenomenon, “a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid, internally colourless”.¹⁸ Herschel called this phenomenon epipolic dispersion, from the Greek: $\epsilon\pi\iota\pi\omicron\lambda\iota\kappa\omicron\varsigma$ = surface. In fact, the solutions observed by Herschel were very concentrated so that the majority of the incident light was absorbed near the surface and all the blue fluorescence originated from there. Herschel used a prism to show that the epipolic dispersion could be observed only upon illumination by the blue end of the spectrum and not the red end. The crude spectral analysis of the emitted light with the prism revealed blue, green, and a small quantity

of yellow light, but Herschel did not realize that the superficial light was of longer wavelength than the incident light.

- One of Stokes's experiments that is spectacular and remarkable by its simplicity deserves attention. Stokes formed the solar spectrum by means of a prism. When he moved a test tube filled with a solution of quinine through the visible part of the spectrum, nothing happened: the solution remained transparent.²⁰ But beyond the violet portion of the spectrum, that is, in the invisible zone corresponding to ultraviolet radiation, the solution glowed with a blue light (Figure 7). Stokes wrote,⁴ It was certainly a curious sight to see the tube instantaneously light up when plunged into the invisible rays: it was literally darkness visible. Altogether the phenomenon had something of an unearthly appearance. From his experiments with a wide range of substances, Stokes concluded that the dispersed light was always of longer wave- lengths than the incident light. Later this statement became the Stokes law. Stokes also noted that the dispersion of light took place in all directions, hence, the fluid behaved as if it were self-luminous. In his paper, Stokes called the observed phenomenon true internal dispersion or dispersive reflection but in a footnote,⁴ he wrote, I confess I do not like this term. I am almost inclined to coin a word, and call the appearance fluorescence, from flourspar, as the analogous term opalescence is derived from the name of a mineral. In his second paper,²¹ Stokes definitely resolved to use the word fluorescence.
- Luminescence is an emission of ultraviolet, visible or infrared photons from an electronically excited species. The word luminescence, which comes from the Latin (lumen $\frac{1}{4}$ light) was first introduced as *luminescenz* by the physicist and science historian Eilhardt Wiedemann in 1888, to describe 'all those phenomena of light which are not solely conditioned by the rise in temperature', as opposed to *incandescence*. Luminescence is cold light whereas incandescence is hot light. The various types of luminescence are classified according to the mode of excitation (see Table 1.1).
- The success of fluorescence as an investigative tool in studying the structure and dynamics of matter or living systems arises from the high sensitivity of fluoro- metric techniques, the specificity of fluorescence characteristics due to the micro- environment of the emitting molecule, and the ability of the latter to provide spatial and temporal information. Figure 1.3 shows the physical and chemical parameters that characterize the microenvironment and can thus affect the fluorescence characteristics of a molecule.
- As a consequence of the strong influence of the surrounding medium on fluorescence emission, fluorescent molecules are currently used as probes for the investigation of physicochemical, biochemical and biological systems. A large part of this book is devoted to the use of so-called fluorescent probes.
- An electronic transition consists of the promotion of an electron from

an orbital of a molecule in the ground state to an unoccupied orbital by absorption of a photon. The molecule is then said to be in an excited state. Let us recall first the various types of molecular orbitals.

- Additionally, fluorescence is used for cell identification and sorting in flow cytometry, and in cellular imaging to reveal the localization and movement of intracellular substances by means of fluorescence microscopy.
- It is interesting to notice that the first known fluorophore, quinine, was responsible for stimulating the development of the first spectrofluorometers, which appeared in the 1950s. During World War II, the Department of Defense was interested in monitoring antimalaria drugs, including quinine. This early drug assay resulted in a subsequent program at the National Institutes of Health to develop the first practical spectrofluorometer.*

2. hamiltoniano de un átomo de muchos electrones? - si hago esto, el foco debería ser
por qué las cosas emiten o no emiten?
3. diagrama de jablonski. Cómo se convierte la excitación del electrón en luz?
de qué otras formas puede convertirse la energía del electrón? decaimientos radiativos y no radiativos.
ver seccion jablonski del lakowicz
4. fluorescencia y fosforescencia diferencias ->transiciones prohibidas y tiempos de vida
5. corrimiento stokes y anti stokes ->fenómenos de muchos fotones
6. caracterización de luminiscencia estática
7. caracterización de luminiscencia dinámica ->TCSPC
8. Nanopartículas de upconversion, composición y aplicaciones
9. fotofísica de los lantánidos
10. mecanismos principales de upconversión
11. dependencia con la potencia de excitación
12. modelos de la dinámica de las nanopartículas
13. que hace falta para caracterizar las nanopartículas?

agregar fenómenos de fosforescencia más antiguos En 1565, el médico y botanista Nicolás Monardes reportó el peculiar color azul que tomaba una infusión de madera mexicana usada para tratar enfermedades de riñón y urinarias. Este efecto ya era conocido por los Aztecas, que lo utilizaban para asegurarse que la valiosa madera no fuera falsificada. Monardes escribe en su libro[?]

Asegúrate de que la madera torne el agua azulada, de lo contrario, es una falsificación. De hecho, ahora traen otro tipo de madera que torna el agua amarilla, pero no sirve; solo el tipo que torna el agua azulada es genuina.

Años más tarde, en 1845, el matemático Sir John Herschel describió el efecto similar que producía una solución transparente de quinina, una sustancia presente en el agua tónica, que reflejaba «un color azul celestial hermoso y extremadamente vívido». Herschel usó un prisma para comprobar que la dispersión causada por la quinina sólo se observaba al iluminar la solución con la parte azul del espectro. El mismo análisis para la luz emitida reveló luz azul, verde, y una pequeña cantidad de amarillo. En esa misma época, el físico Sir George Gabriel Stokes publicó *On the Refrangibility of Light*, un trabajo explicando experimentos con múltiples sustancias que exhibían este tipo de comportamientos, entre ellas incluida la quinina. Uno de sus experimentos más importantes consistía en formar el espectro solar a partir de un prisma, para luego mover un tubo de ensayo con la solución de quinina a través de sus colores. La solución permanecía transparente al ser iluminada por la parte visible del espectro, pero al llegar a la zona ultravioleta (invisible al ojo humano), la muestra se iluminó con luz azul brillante. Además de concluir que la luz siempre se dispersaba con longitudes de onda mayores a las de incidencia, afirmación que luego se conocería como corrimiento de Stokes, llamó a este fenómeno *fluorescencia*[?].

En 1888, el físico Eilhardt Wiedmann introdujo el término luminiscencia para referirse a los fenómenos lumínicos que no están determinados por un aumento en la temperatura de los materiales. El desarrollo de la mecánica cuántica durante el siglo 20 dio a conocer el fenómeno detrás de la emisión de luz sin aumento de temperatura: las transición de los electrones entre los distintos niveles de energía de un átomo.

Entre ellos está la fosforescencia **introducir ejemplo que mencioné antes** y de fluorescencia como el de la quinina descrito por Stokes. Actualmente, tanto la fluorescencia como la fosforescencia tienen aplicaciones en múltiples áreas distintas del conocimiento y la tecnología. Es particularmente destacable su éxito como herramienta para estudiar la estructura y dinámica de la materia viva, gracias la sensibilidad al micro-entorno de las moléculas fluorescentes, lo que resulta en una alta resolución espacial y temporal. Por ejemplo, la microscopía de fluorescencia consiste en iluminar la muestra con una longitud de onda y detectar su fluorescencia en otra, permitiendo filtrar el fondo de la imagen[?]. Técnicas dinámicas como la microscopía de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) o fosforescencia (PLIM) dan lugar a conocer el entorno químico en el que se encuentran distintas proteínas [CITA].

1.1. Espectrofotometría estática

1.2. Espectrofotometría dinámica

1.2.1. Medición de tiempos de vida: *Time-Related Single Photon Counting* (TCSPC) **va a la intro**

Muchos espectrofluorímetros comerciales tienen la capacidad de medir el tiempo de vida de los fluoróforos con tiempos típicos del orden de los nanosegundos. Sin embargo, debido a las transiciones prohibidas de los lantánidos (**Ver cap N**) el tiempo de vida de las UCNPs es del orden de los cientos de microsegundos. Aunque esto alivia la necesidad de una electrónica rápida y costosa, contradictoriamente hace que no se pueda medir su tiempo de vida en instrumentos comerciales, ya que los valores típicos están muy alejados del rango en el que operan¹.

Existen distintas técnicas para medir el tiempo de vida², pero la más implementada es *Time-Related Single Photon Counting* (TCSPC). Como la técnica se suele aplicar para tiempos de vida del orden de los nanosegundos es común que se usen componentes de electrónica rápida. Usualmente la explicación de esta técnica involucra introducir múltiples componentes de electrónica rápida que son necesarios para medir tiempos del orden de nanosegundos. Como en nuestro caso esos componentes no son necesarios, daremos una explicación simplificada. TCSPC es una técnica digital que cuenta fotones correlacionados temporalmente con respecto a un pulso de excitación. El experimento comienza con un pulso de excitación, que tiene dos tareas fundamentales: (i) excitar a la muestra y (ii) iniciar algún tipo de cronómetro. La muestra se excita repetidamente utilizando una fuente de luz pulsada, a menudo un láser o una lámpara de destellos. Cada pulso es monitoreado, produciendo una señal de inicio que activa el contador del cronómetro. La rampa de voltaje se detiene cuando se detecta el primer fotón de fluorescencia proveniente de la muestra. El TAC proporciona un pulso de salida cuyo voltaje es proporcional al tiempo transcurrido entre las señales de inicio y parada. Un analizador multicanal (MCA) convierte este voltaje en un canal de tiempo utilizando un convertidor analógico a digital (ADC). Sumando sobre muchos pulsos, el MCA genera un histograma de probabilidad de cuentas frente a los canales de tiempo.

1.3. Nanopartículas de conversión ascendente

Capítulo 2

Espectrofluorímetro para la caracterización de UCNPs

2.1. Espectrometría de fluorescencia

2.1.1. Instrumentación: el espectrofluorímetro

Para caracterizar la respuesta óptica de una sustancia, generalmente se desea registrar tanto el espectro de excitación como el de emisión. El instrumento científico por excelencia para realizar estas mediciones es el espectrofluorímetro. Fundamentalmente, este instrumento permite realizar mediciones de la intensidad de luz que emite una muestra, haciendo escaneos en longitud de onda de emisión y excitación. Adicionalmente, algunos pueden realizar mediciones de tiempo de vida resueltas, escaneos sincrónicos con alguna señal y mediciones de anisotropía en la polarización de materiales luminiscentes. Estas capacidades son fundamentales para investigaciones en diversas disciplinas científicas, incluyendo química, bioquímica, farmacología, ciencias ambientales, ciencia de materiales y biomedicina. El objetivo principal de un espectrofluorímetro es obtener los espectros de emisión y de excitación de una muestra. Para lograr este objetivo, el instrumento debe ser capaz de iluminar la muestra con múltiples longitudes de onda diferentes y registrar su respuesta a cada una de ellas.

La Figura 2.1 muestra un diagrama esquemático de un espectrofluorímetro genérico. Este instrumento incluye todos los componentes fundamentales para cumplir su función. Utiliza una lámpara de espectro amplio que funciona como fuente de luz de alta intensidad para un rango extenso de longitudes de onda. Posteriormente la luz es filtrada por un monocromador de excitación que permite seleccionar la longitud de onda con la que se desea iluminar a la muestra. La luz de excitación seleccionada se enfoca sobre la muestra colocada en la cámara principal, cuya luminiscencia, generalmente con una longitud de onda mayor que la luz de excitación, es filtrada por el monocromador de emisión. Los monocromadores suelen estar motorizados, lo que permite que el escaneo sea automático. La luz restante llega a un detector, usualmente un tubo fotomultiplicador (PMT), un detector muy sensible que convierte fotones en corriente eléctrica. El espectrofluorímetro emplea diversas técnicas para reducir la luz parásita (longitudes de onda diferentes a la

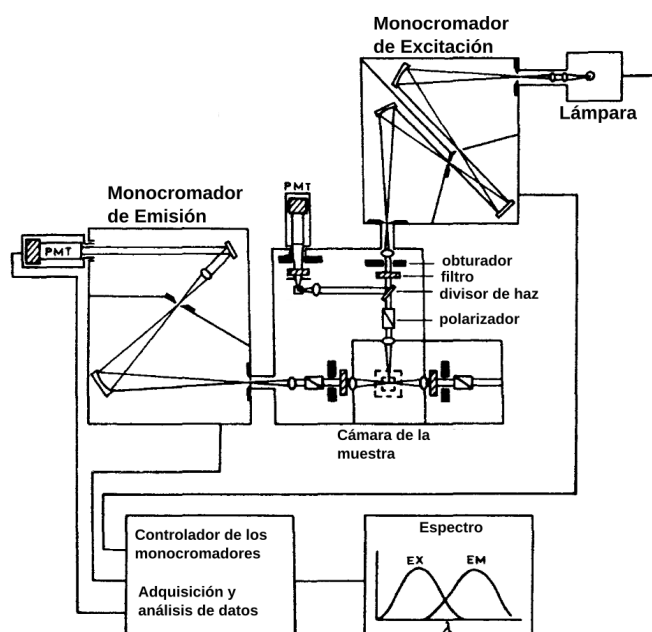


Figura 2.1: **Diagrama de un espectrofluorímetro genérico.** La luz traza un camino que comienza en la lámpara (zona superior derecha) y termina en el PMT de detección (centro izquierda). Después de salir de la lámpara, la luz es filtrada por un monocromador y luego enfocada sobre la muestra. La luz reemitida pasa por otro monocromador y termina en el PMT. La señal se lee con un sistema de control que la digitaliza y para luego ser procesada por una PC que construye los espectros.

deseada), como el diseño en ángulo de 90° entre los brazos de excitación y emisión, y un compartimento hermético pintado de negro no reflectante. La señal del PMT es procesada electrónicamente, digitalizada y analizada en una computadora. Este sistema también controla los monocromadores y la adquisición de datos, además de permitir al usuario ajustar parámetros y facilitar la visualización y análisis. A menudo, se incorporan componentes adicionales en el camino óptico, como obturadores, polarizadores, divisores de haz y otros elementos ópticos, para estudiar diferentes propiedades de la muestra.

2.1.2. Espectrofluorímetros en argentina y obsolescencia

Actualmente, el Departamento de Física de la FCEyN-UBA no cuenta con espectrofluorímetros para la caracterización de espectros de excitación y emisión. Para realizar este tipo de mediciones, la facultad dispone del laboratorio de fotoquímica del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), que cuenta con tres espectrofluorímetros con distintas características, pero que tienen algo en común: ningún equipo tiene menos de 20 años, el más antiguo llegando a los 40 años de uso. La disparidad en la antigüedad y funcionalidad de los instrumentos es un fenómeno común en laboratorios de investigación en países como Argentina, donde la inversión en ciencia es escasa o poco regular en el tiempo³. Ante esta realidad, los institutos suelen priorizar la adquisición de equipos con nuevas capacidades, en lugar de renovar instrumentos existentes por versiones más modernas. Esto es posible gracias a la precisión y robustez de las partes mecánicas de los instrumentos, pero la obsolescencia de los equipos antiguos plantea problemas a largo plazo, especialmente cuando sus plataformas de control quedan desactualizadas. Con el tiempo, se vuelve complicado operar estos instrumentos, ya que los mecanismos de extracción de datos, como los disquetes, dejan de estar disponibles en el mercado. Aún más crítico es que el funcionamiento del equipo depende de la computadora de control, la cual utiliza placas y puertos que ya no se fabrican ni

se consiguen en el mercado actual. El problema de la obsolescencia en instrumentos científicos afecta desproporcionadamente a instituciones con bajo presupuesto, ampliando la brecha de acceso a instrumentos de investigación avanzados.

Esto ha llevado a un auge en el desarrollo de instrumentos científicos accesibles y de bajo costo^{4,5}, particularmente en áreas como instrumentación, microscopía, espectroscopía y adquisición de datos⁶⁻⁸. Las iniciativas de hardware abierto hacen que los diseños y la documentación estén disponibles de forma gratuita para que cualquier persona pueda usarlos, construirlos y modificarlos^{9,10}. Por ejemplo, la plataforma Arduino ha proporcionado una plataforma de desarrollo de electrónica económica y fácil de usar basada en un microcontrolador (<https://www.arduino.cc/>). El OpenFlexure Microscope es un microscopio de código abierto que cuesta menos de 100 USD construir¹¹. Asimismo, recientemente se desarrolló un espectrómetro basado en Raspberry Pi que cuesta menos de 400 EUR¹². El software y los lenguajes de código abierto, como Python (<http://www.python.org>), que cuentan con bibliotecas numéricas y de instrumentación como NumPy¹³ y PyVISA¹⁴, han desempeñado un papel clave al reducir las barreras de entrada y facilitar la creación rápida de prototipos. Cabe destacar que han surgido empresas enfocadas en hardware parcialmente o completamente abierto. Por ejemplo, OpenBCI (<https://openbci.com/>), que ofrece sistemas EEG de bajo costo para interfaces cerebro-computadora, y Opentrons (<https://opentrons.com/>), que proporciona soluciones de manejo de líquidos para la automatización de laboratorios.

En este capítulo de la tesis se describe detalladamente la plataforma de fuente abierta que desarrollamos para renovar la electrónica y el *software* de control del espectrofluorímetro Horiba PTI Quanta Master (QM 400), uno de los espectrofluorímetros antiguos del laboratorio de fotoquímica del INQUIMAE. Además de su renovación, ampliamos sus capacidades para medir tiempos de vida del orden de los microsegundos, que junto con el agregado de un láser pulsado externo de 980 nm nos permitió conseguir la plataforma ideal para la caracterización óptica de UCNPs tanto estática como dinámica.

2.2. Renovación y ampliación del fluorímetro Horiba PTI Quanta Master 400

2.2.1. Componentes originales

La serie Horiba PTI QM incluye espectrofluorímetros modulares para investigación científica y sistemas optimizados para mediciones de fotoluminiscencia. Estos espectrofluorímetros se encuentran frecuentemente en los laboratorios de Argentina, por ejemplo, sabemos que hay tres equipos de esta serie en el laboratorio de fotoquímica del INQUIMAE (QM400, QM-4 y RatioMaster), dos en el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION) y uno en el Centro Atómico Constituyentes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CAC-CNEA), y probablemente haya más similares en otras instituciones. Al ser modelos antiguos y discontinuados se pueden encontrar en el mercado por precios que rondan los \$5000 USD, un costo relativamente bajo para un espectrofluorímetro científico. Los bajos costos se

dan por su antigüedad y fin de soporte por parte de la empresa, lo que obliga a los usuarios a resolver ellos mismos los problemas que haya con los equipos. Por ejemplo, en CIBION, uno de los dos modelos que tienen no está funcionando porque hay problemas con la inicialización de los controladores en la PC. En este trabajo, reacondicionamos específicamente un espectrofluorómetro QM 400 de más de 30 años de antigüedad, (diagrama en la **Fig. 2.2A** y fotografía en la **Fig. 2.3A**), pero dada la similaridad entre los distintos modelos de esta serie, la renovación se pueden aplicar a cualquiera de ellos con leves modificaciones.

El QM 400 está equipado con una lámpara de xenón de 75 W como fuente de luz, la cual proporciona un amplio espectro de longitudes de onda (desde el infrarrojo cercano, alrededor de 1000 nm, hasta el ultravioleta, alrededor de 300 nm). Los monocromadores de excitación y emisión contienen redes de difracción rotadas por motores paso a paso de 200 pasos por revolución, con especificaciones de 7 V y 0.7 A por bobina (M1 y M2), lo que permite una resolución en la selección de longitudes de onda de 0.5 nm. Ambos incluyen un fin de carrera electromecánico para verificar si se ha alcanzado la longitud de onda máxima. Los motores paso a paso, junto con sus fines de carrera respectivos, están conectados a un módulo controlador de motores (MDM) mediante conectores propietarios no documentados. Los fotones son detectados por un tubo fotomultiplicador (PMT, modelo PTI 810), cuya caracterización se detalla en la sección 2.3.1. Éste está conectado al MDM a través de un cable BNC y polarizado con 1000 V desde una fuente de alimentación externa proporcionada también por el MDM. Esto genera pulsos negativos de alrededor de 170 ns con una terminación de 50 Ohm y un voltaje de -3.5 V (**Fig. 2.2D**). Finalmente, el MDM está conectado mediante un cable plano a una tarjeta de interfaz ISA en una PC con sistema operativo Windows 95 y el programa FelixGX, un *software* propietario de adquisición y control instalado por Horiba (**Fig. 2.2B**). FelixGX permite medir espectros de emisión y excitación (**Fig. 2.2E**), además de brindar herramientas de análisis rápido de los datos y controlar diferentes periféricos.

La antigüedad de la PC y electrónica de control hace que el proceso de adquisición de datos sea tedioso, y más aún para la caracterización de UCNPs. Para hacer una medición el usuario debe colocar la muestra en la cámara y luego configurar en FelixGX un barrido de la longitud de onda de excitación o emisión. En el caso de medir *upconversion* se debe agregar un láser controlado externamente por una fuente de corriente (**Fig. 2.2A**) en la que se debe configurar por separado los parámetros de excitación, como la potencia. Una plataforma de caracterización óptica completa de UCNPs debería ser capaz de medir espectros de emisión y tiempos de vida (del orden de los microsegundos) excitando a 980 nm con distintas densidades de potencia. Además, como las mediciones de espectro y tiempo de vida son de larga duración (en especial a bajas potencias), resulta ideal que la plataforma permita configurar múltiples mediciones sucesivas sin la necesidad de una configuración manual por el usuario. Durante su tesis de doctorado, Juan Bujjamer agregó la capacidad de medir tiempos de vida típicos de *upconversion* al QM 400¹. Para lograrlo utilizó en conjunto el control de los monocromadores que brinda FelixGX, una CPU y FPGA Red Pitaya y una fuente de diodo láser externa. El excelente trabajo de Juan durante sentó las bases para que en este trabajo podamos hacer una renovación total del QM 400, utilizando como única plataforma de control a la Red Pitaya e independizandonos

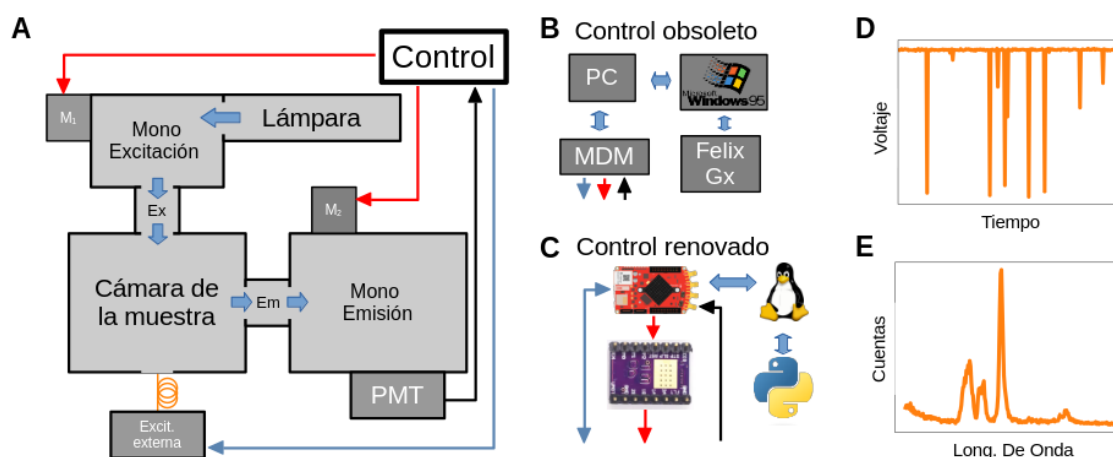


Figura 2.2: **Representación esquemática del espectrofluorímetro** (A) Diagrama del hardware del Horiba PTI QM 400. Las flechas rojas representan los conectores de motores y fines de carrera, las negras corresponden a BNC, las azules a USB y las naranjas representan fibra óptica. La trayectoria de la luz dentro del espectrómetro está indicada con flechas azules gruesas. (B) y (C) Representación del módulo de control instrumental antiguo y nuevo, respectivamente. (D) Representación de la señal cruda medida por el detector PMT. (E) Espectro de la muestra construido a partir del conteo de picos en las señales crudas medidas para cada longitud de onda.

de la PC de control original. En las siguientes secciones, explicaremos los cambios de *hardware* y *software* que realizamos en el espectrofluorímetro para que sea una plataforma ideal para medir *upconversion*.

2.2.2. Hardware para la renovación del QM 400

Luego de hacer una inspección de todas las partes, decidimos conservar los componentes ópticos, la motorización, el PMT, la fuente de alta tensión y el chasis, ya que son robustos y funcionales. En contraste, la electrónica de control y detección resultó ser voluminosa, de código cerrado y obsoleta, por lo que optamos por reemplazarla con alternativas modernas: una CPU con FPGA integrada Red Pitaya (RP) STEM LAB 125-14. La RP cuenta con cuatro entradas y salidas analógicas que emiten y procesan señales en las radiofrecuencias, y un conjunto de pines digitales que permiten controlar circuitos integrados fácilmente. Esta placa junto con dos circuitos integrados DRV8825 que simplifican el control de los motores por paso cumplen la tarea de controlar a los monocromadores. Este cambio en la electrónica de control nos permitió reemplazar el voluminoso módulo MDM ($\sim 10 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$) por dos controladores DRV8825 soldados a una placa PCB mucho más pequeña ($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) (Fig. 2.5). Para facilitar la conexión de los componentes del espectrofluorímetro a la RP también agregamos a la placa un puerto IDC que permite conectar los pines digitales, y conectores a los motores a través de fichas adaptadas a medida. El PMT se conecta a través de un cable BNC-SMA a uno de los canales analógicos de radiofrecuencias de la RP, luego son digitalizados por su convertor analógico digital (ADC) (Fig. 2.2D) y luego contados por software

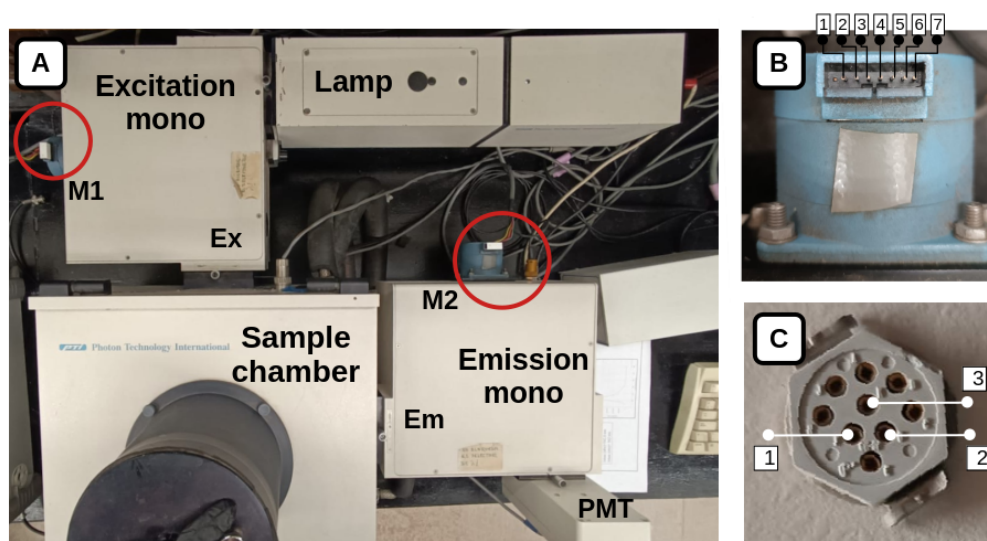


Figura 2.3: **Foto del Horiba PTI Quanta Master 400.** (A) Imagen del espectrómetro completo. En rojo se señalan los motores de los monocromadores y los fines de carrera. (B) Diagrama de pines de los motores paso a paso. Los únicos pines utilizados en la versión renovada son 1 y 7, y 3 y 5, que corresponden a cada bobina del motor respectivamente. (C) Diagrama de pines de los fines de carrera.

(Fig. 2.2E). Todas las conexiones se ven detalladas en la figura (2.4). El ADC de 14 bits de la RP se configura con una frecuencia de muestreo de 31.25 MHz de forma tal de satisfacer el criterio de Nyquist (ver sección 2.3.1). RP tiene una interfaz de programación de aplicaciones que permite configurar dos métodos distintos para comenzar una adquisición de datos. Una opción es llamar a una función que comienza la adquisición de inmediato. Alternativamente, se puede configurar una de las entradas analógicas o digitales como *trigger* para comenzar una medición. Nosotros usamos el primer método para medir espectros estáticos y el otro para medir tiempos de vida. Asimismo, la RP tiene dos mecanismos distintos para escribir los datos en la memoria al hacer una adquisición: un método por defecto de escritura a un espacio de memoria de 2^{14} enteros de 16 bits, y un método de adquisición de memoria profunda (DMA) que permite guardar hasta 2 MB¹⁵. Con esta capacidad para almacenar datos, a 31.25 MHz la ventana temporal de pulsos más grande que se puede obtener es de $\sim 0,5$ ms y ~ 8 ms respectivamente. Aunque resulta beneficioso el método DMA y se podría implementar en esta renovación, nosotros utilizamos el método por defecto por la simplicidad que significó durante el desarrollo. Para contrarrestar la corta duración de la ventana de adquisición, el software de control que desarrollamos permite agregar una demora para obtener ventanas de medición más grandes (ver sección 3.3). El apéndice A explica detalladamente cómo reproducir las conexiones.

2.2.3. Hardware ampliación

El espectrofluorímetro original QM 400 disponible en el laboratorio no era adecuado para estudiar *upconversion*, ya que no contaba con una fuente de luz en el

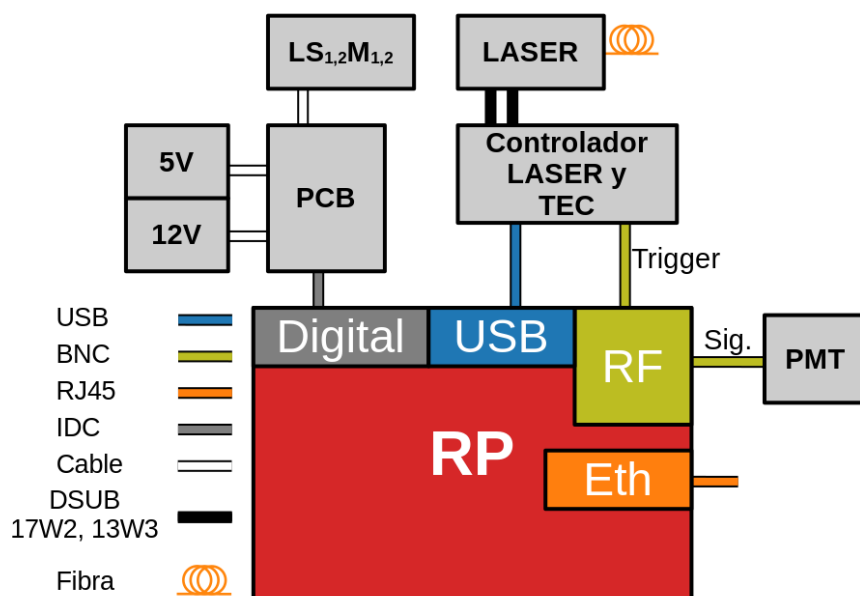


Figura 2.4: Conexiones necesarias para la renovación y ampliación del QM400.

infrarrojo (IR). Tampoco era posible realizar mediciones de tiempos de vida de la luminiscencia debido a la falta de excitación pulsada y detección dependiente del tiempo. Luego de aplicar renovación mencionada anteriormente, incorporamos estas funcionalidades al equipo y al *software* de forma independiente.

Para ello, añadimos una fuente de luz IR externa modulable al sistema. En nuestro caso, utilizamos un controlador de diodo láser y temperatura (TEC) de banco THORLABS ITC4020, controlado por la RP, para operar un diodo láser BL976-SAG300 de 976 nm y 300 mW. La salida del diodo láser se conecta mediante una fibra óptica a la entrada de fuente externa del QM 400 (**Fig. 2.2A**). El ITC4020 permite configurar la frecuencia de pulsado y el ciclo de trabajo, además de proporcionar una señal TTL que está en 5 V cuando el láser está prendido y 0 V cuando está apagado. Esta señal se conecta a otra de las entradas analógicas de la RP, que luego la utiliza como *trigger* para sincronizar la finalización de la excitación del láser, con la medición de los pulsos eléctricos de los fotones. Esa sincronización le permite al *software* realizar histogramas y así medir los tiempos de vida, proceso que se explica en detalle en la sección 3.3.

2.3. Sistema de detección de fotones

Los tubos fotomultiplicadores (PMTs) son detectores de fotones ampliamente utilizados en fluorómetros y cumplen un rol central en el funcionamiento del instrumento. Un PMT está compuesto por un fotocátodo y una serie de dínodos, que actúan como etapas de amplificación. Los fotones incidentes provocan la emisión de electrones desde el fotocátodo, y estos son amplificados sucesivamente por los dínodos. Al final del proceso, que tiene una duración típica de 40 a 50 nanosegundos,

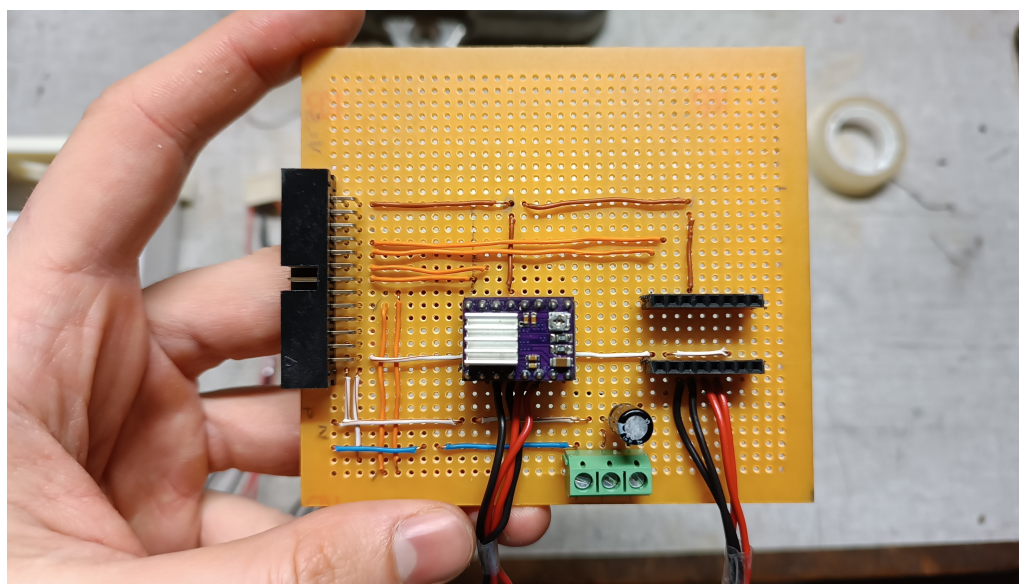


Figura 2.5: **Placa PCB con la electrónica de control.** La placa cuenta con un puerto IDC (izquierda) al que se conectan los pines digitales de la RP, que además provee la alimentación de 3.3 V a los circuitos integrados (centro). La placa incluye una bornera para proveer una referencia a tierra, una alimentación de 5 V y otra de 12 V.

el pulso llega a un ánodo, desde donde se lee la señal. Este detector puede operar en dos modos: analógico o conteo de fotones. En el modo analógico, la corriente que fluye por el ánodo debe ser proporcional a la intensidad de luz que incide sobre el fotocátodo. En el modo de conteo, el PMT registra pulsos eléctricos de corta duración cada vez que se detecta un fotón. Resulta crucial que el detector no se encuentre dañado, cosa que usualmente sucede por la exposición a luz muy intensa. Esto puede generar una corriente de oscuridad alta, pulsos espurios en la señal que sesgan el resultado de la medición¹⁶. En nuestro instrumento renovado, la señal del PMT se adquiere utilizando una Red Pitaya (RP). Este dispositivo permite una frecuencia máxima de adquisición de 125 MHz, aunque también es posible trabajar a frecuencias menores que sean divisiones por 2 de ese valor. Para realizar un conteo preciso de los fotones que inciden en el fotocátodo, caracterizamos la señal del PMT del QM 400 utilizando la RP en las mismas condiciones operativas del fluorómetro modificado. Como resultado, medimos la corriente de oscuridad, determinamos el ancho medio de los pulsos y definimos el algoritmo de detección de pulsos más adecuado para optimizar el conteo. En las próximas secciones describimos en detalle esta caracterización.

2.3.1. Caracterización del PMT con la Red Pitaya

Una señal típica del PMT al ser iluminado de forma constante, medida con una ventana de la RP a 31.25 MHz, se puede ver en la figura (2.6A). La señal muestra un voltaje de base que ronda los 3.5 V, y múltiples picos negativos que representan la llegada de un fotón al fotocátodo. Si bien la mayoría de pulsos suelen estar entre

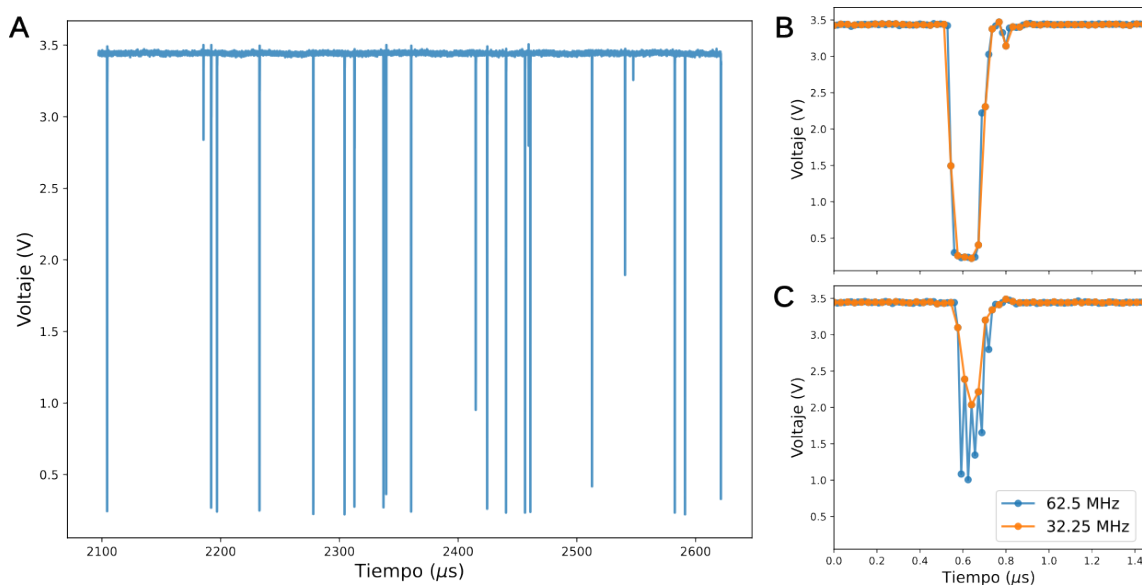


Figura 2.6: **Señal del PMT.** (A) Medición de la señal del PMT en una ventana de la RP. Medidos a 62.5 MHz en azul y 31.25 MHz en naranja: (B) detalle de un pulso que satura al PMT, (C) Detalle de un pulso que no satura el PMT.

1 y 0 V, hay otros que no llegan a saturar el detector y tienen menor altura. Los pulsos que saturan tienen un tiempo rápido de subida, de aproximadamente ~ 16 ns, luego son constantes y después bajan rápidamente. Se puede notar una ligera asimetría en ellos, sus colas presentan dos rebotes alrededor de 2 y 3 V (**Fig. 2.6B**). Por otro lado, los picos que no saturan presentan oscilaciones de alta frecuencia en el máximo. Estos efectos se ven atenuados al medir a menores frecuencias de muestreo (**Fig. 2.6C**).

La figura (2.7) muestra un histograma del voltaje de los puntos de una señal tomada con una frecuencia de muestreo de 31.25 MHz. Para eliminar la base de la señal se tomaron sólo los puntos con voltajes menores a 3.4 V. Se pueden ver dos picos en el histograma, uno para voltajes menores a 1 V, que corresponde a los pulsos que saturan al PMT, y otro para mayores a 3 V, que se pueden adjudicar al ruido y a los rebotes de la señal en las colas de los pulsos. El eje vertical en escala logarítmica permite diferenciar un salto alrededor de 1.4 V, éste corresponde a los pulsos que no saturan y cuyas oscilaciones de alta frecuencia se ven atenuadas a 31.25 MHz. Viendo el histograma de la altura de los pulsos, tomamos como criterio considerar un pulso de la señal como un fotón que llegó al detector a todos ellos cuyo pico sea menor a 1 V. Además de esta medición a iluminación constante analizamos la señal sin iluminar, concluyendo que la corriente de oscuridad es suficientemente baja como para no considerarla en el conteo.

Para estimar el ancho promedio de los pulsos calculamos la autocorrelación a partir de la medición de múltiples ventanas de la señal del PMT bajo iluminación constante. La relación entre la desviación estándar σ de una distribución gaussiana, **esto está mal:** y la desviación estándar σ_c su autocorrelación está dada por $\sigma = \sigma_c / \sqrt{2}$. Aproximando a los pulsos que llegan al detector por gaussianos, y usando que el ancho total a mitad de altura (FWHM) de una gaussiana es $\text{FWHM} = 2\sqrt{2 \ln 2} \sigma$,

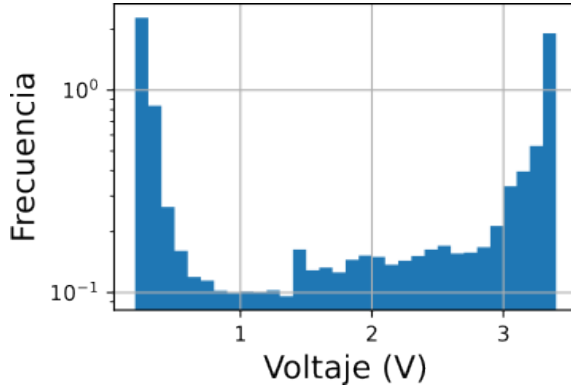


Figura 2.7: **Histograma de voltajes** de una señal del PMT tomada con la RP a 31.25 MHz. El eje vertical está en escala logarítmica.

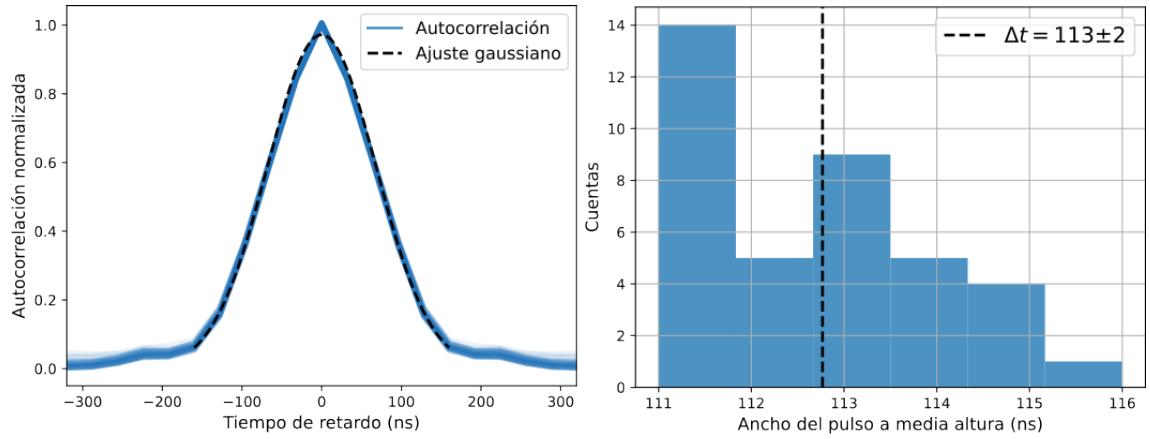


Figura 2.8: **Autocorrelación** de las ventanas medidas por la RP a 31.25 MHz. A la izquierda se ve la autocorrelación de cada ventana y un ajuste gaussiano a una de ellas. A la derecha, un histograma de las desviaciones estandar de las gaussianas.

podemos obtener el FWHM de los pulsos con la fórmula $\text{FWHM} = 2\sqrt{2\ln 2}\sigma_c/\sqrt{2}$. Por lo tanto, ajustamos el resultado de las autocorrelaciones por una gaussiana y realizamos un histograma de las desviaciones estandar de los pulsos $\sigma = \sigma_c/\sqrt{2}$ obtenidas (**Fig. 2.8**). Como resultado, el ancho temporal de los pulsos a mitad de altura es de $(\Delta t = 113 \pm 2)$ ns, donde definimos el error como dos desviaciones estándar de la media. Esto nos permite definir una tasa máxima R de fotones por segundo que podemos detectar con el PMT. Bajo iluminación continua, la probabilidad de que un fotón llegue al detector en un tiempo t al medir en un intervalo T es uniforme. Entonces, la probabilidad P de que otro fotón se solape debe ser $P = R \times T$, por lo que si queremos que la probabilidad máxima sea del 90 %, podremos adquirir a una tasa de fotones por segundo de $R = P/T = 0,1/113 \times 10^9 \text{ Hz} = 8,9 \times 10^5 \text{ Hz}$.

Las mediciones que mostramos en esta sección fueron útiles para determinar que un pulso de la señal es un fotón sólo si su máximo es menor a 1 V. Además, nos permitieron limitar la tasa máxima con la que se miden fotones a $R = 8,9 \times 10^5$ fotones por segundo para tener un 10 % de chances de que se solapen.

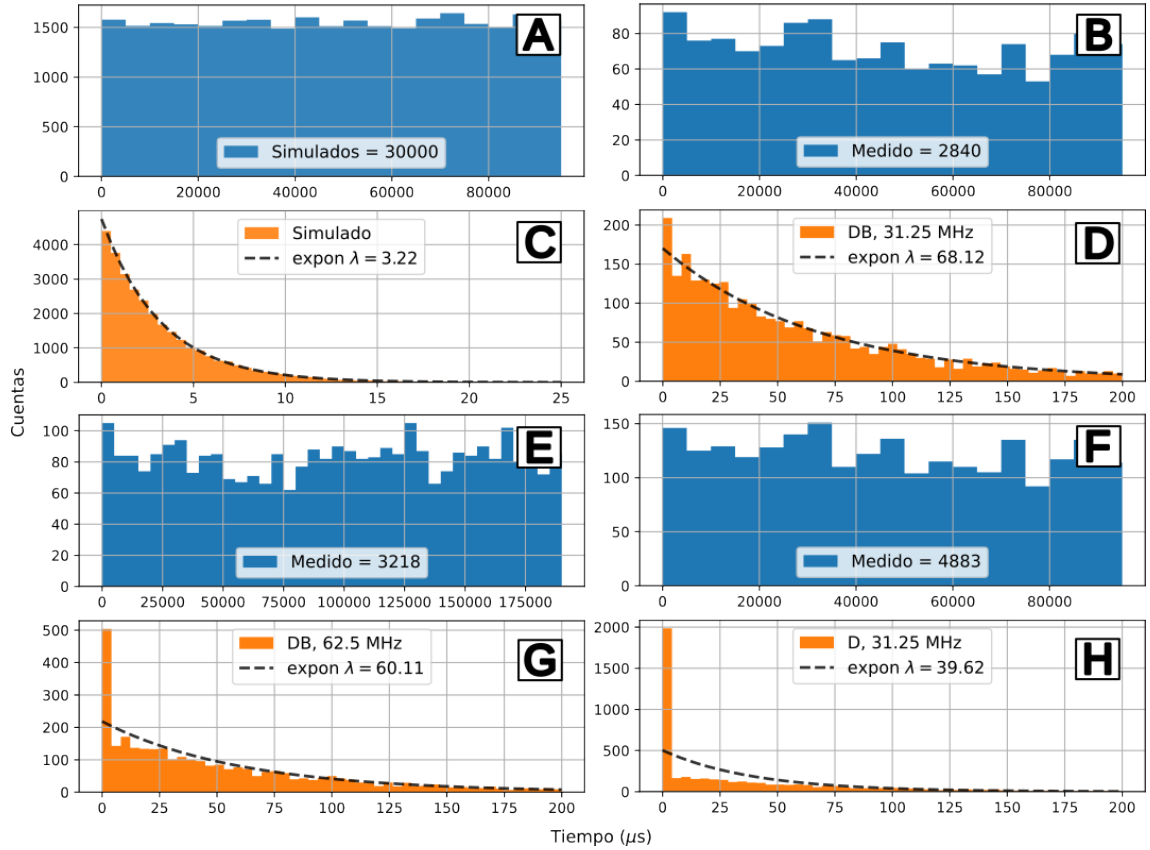


Figura 2.9: **Comparación de distintos métodos de conteo de fotones.** (A) distribución de pulsos simulados en un intervalo $T \sim 96$ ms y (C) distribución del tiempo Δt entre esos pulsos. Análogamente, (B) y (D) para datos de pulsos medidos con frecuencia de muestreo de 31.25 MHz y detectados con el algoritmo *DB*. (E) y (G) medidos a 62.5 MHz y detectados con *DB*. (F) y (H) medidos a 31.25 MHz y detectados con *D*.

2.3.2. Conteo de fotones

Una vez que la RP obtiene la señal del PMT, el paso que queda para convertirla a intensidad lumínica es hacer un conteo de la cantidad de pulsos para la ventana de tiempo que midió. Para esto, se necesita un algoritmo que tome como entrada la señal temporal del PMT $s(t)$, que muestreada es un conjunto discreto $\{s(t_i)\}$ y devuelva como salida el conjunto de tiempos $\{t_p\}$ en los que hay un pulso. El algoritmo debe cumplir con dos condiciones: tiene que ser preciso para no sesgar los espectros y tiempos de vida, y tiene que ser rápido para que las mediciones se puedan hacer en tiempo real.

Nuestra implementación, que llamaremos DB, consiste en tres pasos, (i) binariza la señal temporal, (ii) busca los puntos en los que la derivada hace un salto y (iii) elimina los puntos que están muy cerca en el tiempo. La binarización consiste en convertir en 1 a los puntos que sobrepasan (es decir, cuyo voltaje es menor que) cierto umbral V_b y en 0 a los que no. Luego, se calcula la diferencia entre los puntos consecutivos $\Delta s(t_i) = s(t_{i+1}) - s(t_i)$, y se toma el conjunto $\{t_j\}$ en los que la diferencia es negativa. Por último, se eliminan los puntos que estén a menos de

Δt_{min} de otros. Si bien tanto V_b como Δt_{min} son configurables, los valores por defecto son $V_b = 1V$, que se tomó según lo encontrado en la sección 2.3.1, y $\Delta t_{min} = 0$, ya que vimos que cambiar este último valor no generaba una diferencia en los pulsos detectados. Si bien existen otros algoritmos más sofisticados para encontrar picos, como la función `find_peaks_cwt` del paquete de Python *scipy*, estos suelen aplicar técnicas costosas computacionalmente, y por lo tanto lentas a comparación de tomar la derivada y binarización¹⁷.

Una vez elegido el algoritmo, es necesario asegurarse que estuviera contando pulsos correctamente. Para eso iluminamos una muestra con intensidad constante durante un intervalo T de medición, calculamos la distribución de Δt_j y la comparamos con una simulación equivalente (**Fig. 2.9**). La diferencia $\Delta t_i = t_{i+1} - t_i$ entre dos variables aleatorias uniformemente distribuidas, y ordenadas de forma tal que $t_1 < \dots < t_i < t_{i+1} < \dots < t_N$ es otra variable aleatoria con distribución exponencial y valor medio T/N , donde N es el número de pulsos detectados. La simulación consiste en $N = 30000$ pulsos uniformemente distribuidos en un intervalo de ~ 96 ms, lo que da un valor medio de $\lambda \equiv \langle \Delta t_j \rangle = 3,22 \mu s$ (**Fig. 2.9A y C**). Se tomó $N = 30000$ para tener una buena estadística a la hora de comparar con la distribución de probabilidad exacta (línea punteada en **Fig. 2.9C**) con el mismo valor medio. Realizamos la medición por el mismo intervalo de tiempo con una frecuencia de muestreo de 62.5 MHz al iluminar una muestra con CW. El algoritmo *DB* detectó 3218 pulsos, y se ve que la distribución de Δt_j parece seguir una exponencial excepto por el primer intervalo del histograma que tiene un número de cuentas mucho mayor que el resto (**Fig. 2.9E y G**). Esto se debe a las fluctuaciones de alta frecuencia, que hacen que *DB* detecte dos t_j para un mismo pulso de la señal. Para resolver este problema se puede aumentar Δt_{min} o reducir la frecuencia de muestreo. La frecuencia de 31.25 MHz sigue siendo capaz de detectar pulsos (ver 2.3.1), por lo que realizamos el mismo análisis sub-muestreando la señal original. En este caso *DB* detectó 2840 pulsos, y se ve que la distribución de Δt sigue una exponencial con valor medio $\lambda = 68,12$ (**Fig. 2.9B y D**). A modo de comparación, también procesamos la señal a 31.25 MHz pero usando un algoritmo *D* que consiste en tomar los puntos en los que la derivada es menor a un umbral (en este caso de -0.5). Éste detectó 4883 pulsos, y se puede ver que también tiene el problema de detectar fluctuaciones de alta frecuencia, aumentando sintéticamente la cantidad de pulsos que hay en la señal (**Fig. 2.9F y H**).

Por último, para tener una medida cuantitativa de la bondad de ajuste al modelo exponencial, calculamos el χ^2 dado por la fórmula

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n=50} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}, \quad (2.1)$$

donde n es el número de barras en el histograma, O_i es la cantidad de cuentas observadas, y E_i es la cantidad de cuentas esperadas, asumiendo que la distribución de los datos debería ser una exponencial con el valor medio observado $\langle \Delta t \rangle$. Obtuvimos los estadísticos de la tabla 2.1, donde el χ^2 crítico es el correspondiente a un test de hipótesis con significancia $\alpha = 0,05$. Después de esta comparación entre algoritmos de detección y frecuencias de sampleo, concluimos que la elección óptima es tomar los datos a 31.25 MHz y usar el algoritmo de detección *DB*.

Método	χ^2
DB 31.25 MHz	48
D 31.25 MHz	5690
DB 62.5 MHz	486
Crítico	65

Cuadro 2.1: Comparación del estadístico χ^2 para los distintos métodos.

Capítulo 3

Validación de funcionamiento

3.1. Software

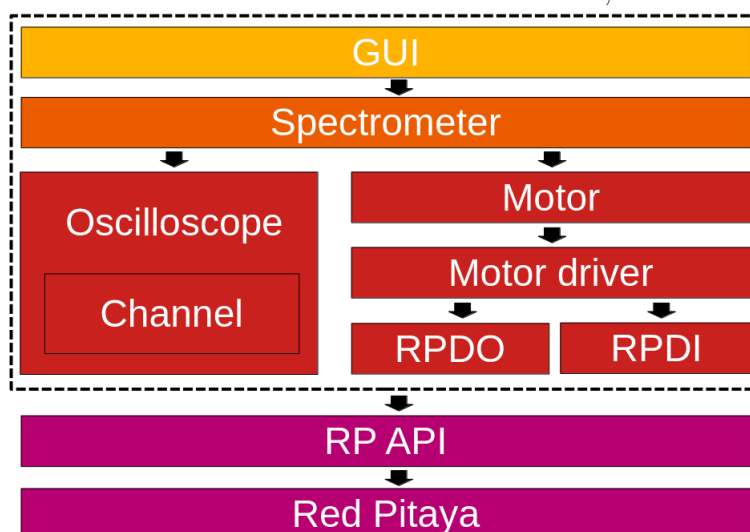
Para reemplazar el rol que cumplía el *software* FelixGX en el espectrofluorímetro original desarrollamos dos paquetes de Python de control de instrumental y adquisición de datos^{18,19}. El código corre en la microCPU de la RP y permite controlar al espectrofluorímetro a través de una interfaz de programación de aplicaciones (API) y una interfaz gráfica simple (GUI) desarrollada con el paquete *IPython's Jupyter Widgets*. El programa conformado por ambos paquetes está compuesto de cuatro capas principales (**Fig. 3.1**):

- **RedpiPy**: Es uno de los dos paquetes que desarrollamos. Consiste en un *wrapper* de la API original de la RP que resulta en que el código esté mejor organizado para hacer una aplicación en Python. Se compone de funciones y clases que permiten manejar el *hardware* de la RP a bajo nivel, como *RPDO* que controla los pines digitales, así como algunas clases de más alto nivel como *Oscilloscope* que permite manejar el osciloscopio.
- **Clases de dispositivos**: Controlan componentes individuales del espectrofluorímetro, como los monocromadores, el láser pulsado, y los motores de los monocromadores permitiendo la el control de todas las partes por separado.
- **Clase Spectrometer**: Coordina el *hardware* para protocolos de medición específicos (por ejemplo, adquirir un espectro de emisión). Es fácil de usar desde un script en Python o desde la línea de comandos. Además, es la encargada de contar los pulsos de voltaje negativo registrados por el PMT. Es utilizada por la interfaz gráfica.
- **Interfaz gráfica (GUI)**: proporciona herramientas de adquisición similares a las de FelixGX. Se accede a través de la web y utiliza el paquete *IPython's Jupyter Widgets*.

Gracias a este diseño la parte del código que implementa el control del instrumento es completamente general y está desacoplada del resto, por lo que debería funcionar para cualquier modelo de espectrofluorímetro cuyos monocromadores sean controlados por motores por paso, y la señal de luminiscencia se lea con un PMT.

Por otro lado, la API pública le permite al usuario avanzado crear sus propios protocolos de medición que se pueden ejecutar sin la supervisión de un operario. Tanto *RedpiPy* como *RefurbishedPTI* (el paquete que controla al espectrofluorímetro) se encuentran públicos en repositorios de GitHub con sus respectivas instrucciones de instalación. El apéndice B explica detalladamente algunos ejemplos que muestran cómo medir un espectro estacionario y el tiempo de vida para distintas longitudes de onda, ambos a través de la API y de la GUI.

Figura 3.1: **cambiar esta figura Structure of the software.** Each element of the software is ordered from high level (**top**) to low level (**bottom**). Inside the dashed line black box In yellow, the two ways the end user can interact with the software. In orange, the refurbished instrument API classes. In red, the RP's hardware API.



El tiempo máximo de adquisición de 8 ms ofrece una ventana suficientemente amplia para la mayoría de los materiales luminiscentes. Como se mencionó anteriormente, cuando se requiere medir tiempos de vida mucho más largos al tiempo de adquisición máximo (0.5 ms), la ventana de detección puede desplazarse respecto al *trigger* para cubrir un rango más amplio. El *software* permite configurar la cantidad de veces que se mide cada ventana de 0.5 ms, lo que hace posible construir una curva de decaimiento más extensa de la luminiscencia.

3.2. Protocolo de medición estática

El espectro estático de emisión(excitación) de una muestra consiste en la medición de su intensidad de luminiscencia al iluminar(observar) en una longitud de onda fija, y observar(iluminar) barriendo un rango de longitudes de onda. Por lo tanto, antes de iniciar una medición deben estar definidos sus parámetros que en este caso son el tiempo de integración t_{int} , la longitud de onda de iluminación(medición) λ_e , y la longitud de onda inicial λ_i y final λ_f del barrido, así como el paso λ_s entre cada medición de intensidad. En el caso de tomar un espectro de UCNPs, dado que la iluminación proviene del diodo láser de 976 nm, también es necesario configurar la

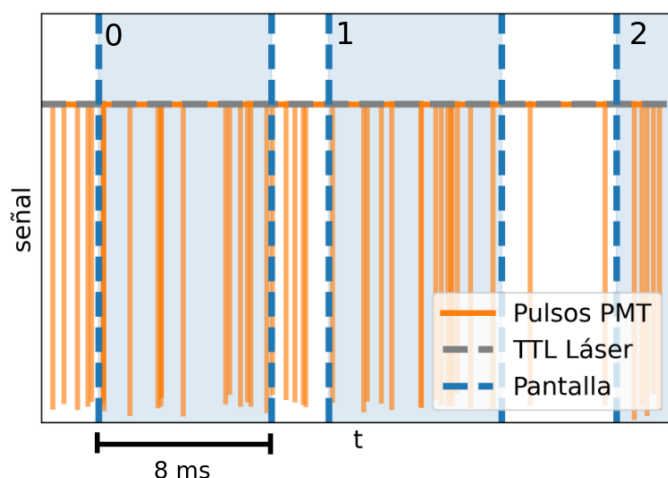


Figura 3.2: Diagrama de medición estática

potencia óptica de excitación.

Una vez configurados los parámetros, el espectrofluorímetro debe realizar los siguientes pasos:

1. **Inicializar los monocromadores** haciendo girar los motores en una misma dirección hasta que la señal del fin de carrera de cada uno sea de 5 V. Esto sirve para que la longitud de onda guardada por el *software* coincida con la real.
2. **Mover el monocromador estático** de emisión(excitación) hasta λ_e .
3. **Mover el monocromador dinámico** de excitación(emisión) hasta λ_f en pasos de λ_s . Para cada longitud de onda los pasos (a) y (b) se deben repetir (**Fig. 3.2A**) n veces, donde n es tal que $n \times t_{max} \geq t_{int}$ y t_{max} es el máximo tiempo de medición que soporta la RP (8 ms):
 - a) Medir la señal del PMT.
 - b) Contar los picos en esa señal y acumularlos. Al finalizar, el resultado es la cantidad de picos (fotones) contados por segundo.

Una vez que el monocromador dinámico llega a λ_f la cantidad de cuentas por segundo para cada longitud de onda se guarda en una tabla y termina la medición. Al caracterizar UCNP's la excitación se da a través del láser externo, por lo que se deben configurar sus parámetros independientemente y el monocromador de excitación no toma ningún rol. Como siempre se miden pantallas enteras, los tiempos de integración posibles siempre son múltiplos de 8 ms. Sin embargo, los tiempos de integración necesarios suelen ser típicamente del orden de los segundos, dos o tres órdenes de magnitud mayores a la duración de la pantalla. Además, los datos también contienen el tiempo de integración para cada punto con un error de ~ 15 ns. En caso de que sea necesario medir con un tiempo de integración más preciso, esto se puede lograr modificando levemente el *software*.

3.3. Protocolo de medición dinámica

La medición de los tiempos de vida de las nanopartículas de *upconversion* se realiza mediante la técnica de TCSPC (ver sección 1.2). Dado que estos tiempos de vida están en el rango de cientos de microsegundos, no son necesarios varios de los componentes de electrónica rápida típicos de la TCSPC utilizada en mediciones en el rango de nanosegundos, como el CFD y el TAC, los cuales son reemplazados por componentes más simples y menos costosos. Contradictoriamente, esto hace que no se puedan caracterizar UCNPs utilizando equipos de fluorescencia de uso general, dado que el tiempo total de adquisición necesario difiere en órdenes de magnitud. En nuestro caso, llevamos a cabo la técnica utilizando el trigger configurable a través de las entradas analógicas de la RP, y la señal TTL proveniente de la fuente de alimentación del láser. Otra diferencia con TCSPC tradicional es el modo de excitación de la muestra. Como la mayoría de fluoróforos orgánicos presentan su luminiscencia a través de la excitación de transiciones dipolares eléctricas, pérdida de energía por fonones, y re-emisión a través otra transición dipolar, todos fenómenos que ocurren en el orden de los nanosegundos, es posible estudiar su espectro dinámico al excitar con un pulso del láser. En el caso de las UCNPs, su luminiscencia se da por la dinámica no lineal de la interacción entre sus dopantes lantánidos (Yb^{+3} y Er^{+3}), procesos que incluyen la excitación sucesiva sus electrones y por lo tanto ocurren en el orden de los microsegundos. Por este motivo, es necesario iluminar a la muestra por algunos milisegundos para asegurarse de llegar al estado estacionario del sistema antes de medir su decaimiento. Esto se hace aprovechando la función de alimentación pulsada (*Quasi Continuous Wave* ó QCW) que ofrece la fuente ITC4020, la cual permite configurar frecuencia de pulsado ν , y ciclo de trabajo dc (**Fig. 3.3**).

Para hacer una medición de TCSPC es necesario definir la longitud de onda λ en la que se detectará la emisión, el intervalo de tiempo t_{max} en el que se van a contar los fotones luego del trigger, y la cantidad de veces n que se va a medir ese intervalo. Entonces, el protocolo para realizar la medición es:

1. **Iniciar el láser en modo QCW** para que se prenda y se apague con frecuencia ν y ciclo de trabajo dc .
2. **Configurar**

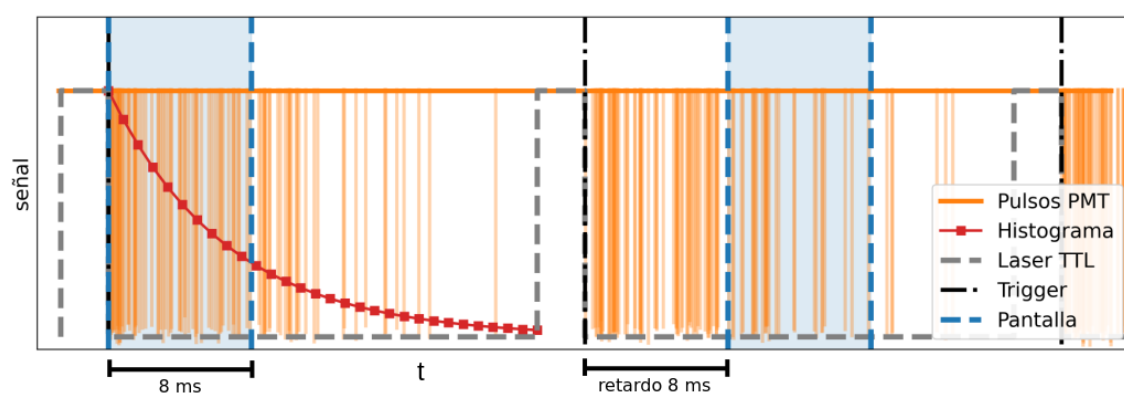


Figura 3.3: Diagrama de medición dinámica

Capítulo 4

Caracterización de UCNPs

En este capítulo, vamos a utilizar el Horiba PTI QM 400 renovado y con su ampliación de capacidades para caracterizar ópticamente un lote de UCNPs. Todas las partículas usadas en este trabajo fueron sintetizadas por el equipo colaborador del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), liderado por Beatriz Barja y María Claudia Marchi. Las nanopartículas utilizadas consisten en una red cristalina de fluoruro de ítrio NaYF_4 dopadas con los lantánidos iterbio (Yb) y erbio (Er), que en conjunto conforman una de las UCNPs más eficientes descriptas hasta el momento $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{+3},\text{Er}^{+3}$ ²⁰. El método de síntesis empleado escapa el alcance de esta tesis, pero está detalladamente documentado en la literatura²¹.

Nuestra plataforma adaptada nos permitió medir el espectro dinámico dependiente de la potencia de las UCNPs sintetizadas (**Fig. 4.1**), y sus tiempos de vida (**4.3**) al ser excitadas con un láser de diodo IR de 980 nm. Como fue detallado en la sección 1.3, la conversión ascendente es un proceso óptico no lineal en el que dos o más fotones se absorben secuencialmente entre niveles de energía igualmente espaciados, lo que lleva a la emisión de luz con una longitud de onda más corta que la incidente. Debido a las particularmente largas vidas medias (del orden de los cientos de microsegundos) y a los niveles de energía escalonados de los iones de tierras raras, se pueden observar espectros de conversión ascendente de UCNP en el rango visible incluso a bajas potencias de excitación. En este caso, medimos los espectros estáticos con densidades de potencia que varían entre 16 mW cm^{-2} y 80 mW cm^{-2} al excitar con el láser de forma continua (CW) (**Fig. 4.1A**). El espectro estático muestra los picos de emisión conocidos de los iones Er^{3+} , que van desde la energía más baja hasta la más alta del espectro visible. Comenzando por el lado de menor energía, etiquetamos las regiones de emisión como rojo (R, 630–690 nm), amarillo (Y, 535–570 nm) y verde (G, 500–535 nm), correspondientes a las transiciones $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, y $^4\text{S}_{3/2}, ^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, respectivamente. El espectro también muestra azul (B, 397–425 nm) y ultravioleta (UVA, 372–390 nm), que provienen de transiciones de niveles excitados más altos, como $^2\text{H}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (410 nm) o $^4\text{G}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ (383 nm)²². Como se mencionó en la sección 1.3, aunque las UCNPs muestran una relación no lineal entre la intensidad de emisión y la densidad de potencia de excitación, esto solo es apreciable cuando se abarcan varios órdenes de magnitud²³. La intensidad de emisión de conversión ascendente (I_{UC}) está relacionada de manera no lineal con

la densidad de potencia de excitación, $I_{UC} = P^\alpha$, donde α es el número efectivo de fotones involucrados en el proceso de absorción por fotón de mayor energía emitido, y P es la potencia incidente²⁴. El gráfico $\log(I_{UC})$ vs $\log(P)$ (**Fig. 4.2**) muestra que, para este rango de potencias, cada región de emisión está caracterizada por una pendiente relacionada con el número de fotones involucrados en cada proceso (**Fig. 4.2 inset**). No se observaron cambios en estas pendientes para cada longitud de onda (UV, B, G, R), lo que indica que los mecanismos fotofísicos que causan la conversión ascendente son los mismos para todas las potencias. Esto está en línea con el hecho de que la relajación cruzada y la transferencia de energía hacia atrás (BET) desde Er^{3+} hacia Yb^{3+} son despreciables en estos límites de baja potencia^{25 26}.

Además de obtener los espectros estacionarios de las UCNPs, medimos el tiempo de vida medio en los picos de emisión de cada una de las regiones espectrales (**Fig. 4.3**), esto es para las longitudes de onda 379, 410, 522, 541 y 654 nm. Ajustamos los histogramas de tiempo de arribo de los fotones con una curva de decaimiento monoexponencial, comenzando a los 100 μs después de que se detuvo la excitación para medir solo la desocupación de los estados excitados. El resultado son vidas medias que varían entre ~ 125 y ~ 400 μs . Se observa una disminución en la vida media para los fotones de longitud de onda más corta, correspondientes a estados excitados de mayor energía, lo que es consistente con un mayor número de vías de relajación. Adicionalmente, medimos el tiempo de vida para el pico de emisión de 541 nm a dos potencias distintas de excitación, 3 y 87 mW **4.4**. Al igual que con la relación entre potencia e intensidad, el cambio en tiempo de vida no presenta diferencias significativas para el rango de potencias en el que medimos.

Para este rango de potencias de excitación, no se llegan a medir diferencias significativas ni en la relación funcional entre potencia e intensidad, ni en el tiempo de vida para el pico más intenso de emisión. En el futuro, se podrían repetir las mediciones excitando a densidades de potencia en el rango de 10^0 mW cm^{-2} y 10^2 mW cm^{-2} , en el que se observan cambios en la pendiente de los gráficos $\log(I)$ vs $\log(P)$ ²⁷. Sin embargo, estas mediciones demuestran la posibilidad de realizar una caracterización óptica completa de las nanopartículas de *upconversion* con las modificaciones que realizamos en el espectrofluorímetro QM 400. Tanto las mediciones de espectro en función de la potencia como las de tiempo de vida fueron realizadas automáticamente con secuencias de comandos programadas en Python. La plataforma permite desarrollar una secuencia de comandos más compleja que mida un espectro completo, detecte los picos de emisión y mida los tiempos de vida en esos picos, de forma que el usuario sólo tendría que colocar la muestra en la cámara y ejecutar el programa para realizar una caracterización óptica completa.

Nanopartículas y síntesis

Como se dijo en la intro, espectro dependiente de la potencia

Explicación de las mediciones. que medimos? que dio? a que transiciones corresponden? rango pequeño de potencias -> lineal Medición de tiempos de vida, resultados. Medición de tiempos de vida a distintas potencias

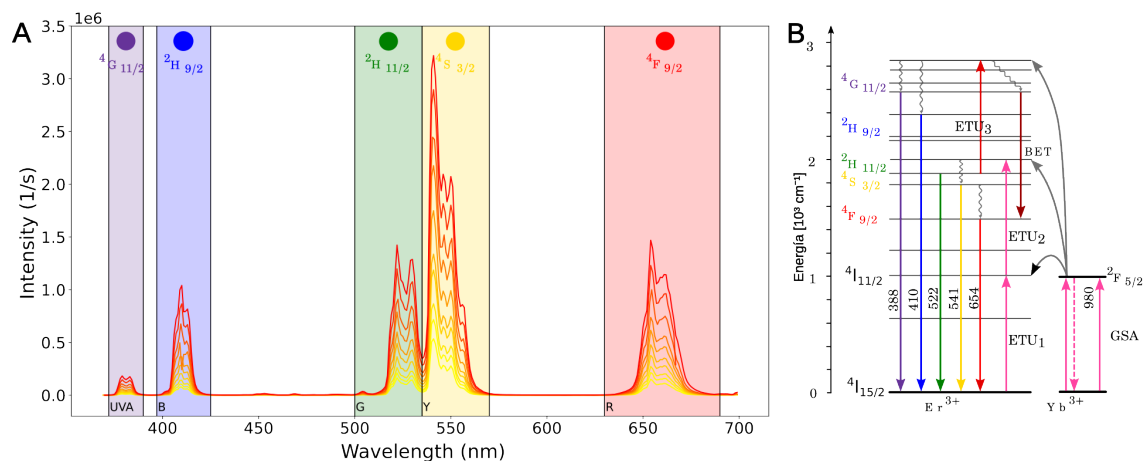


Figura 4.1: **Espectro de las UCNPs dependiente de la potencia.** (A) Espectro de emisión bajo excitación CW por un diodo láser de 976 nm para distintas densidades de potencia de excitación entre 16 mW cm^{-2} y 80 mW cm^{-2} . (B) Esquema de niveles de Yb^{3+} y Er^{3+} , marcados con colores los niveles excitados del Er^{3+} cuya emisión corresponde a las regiones del espectro.

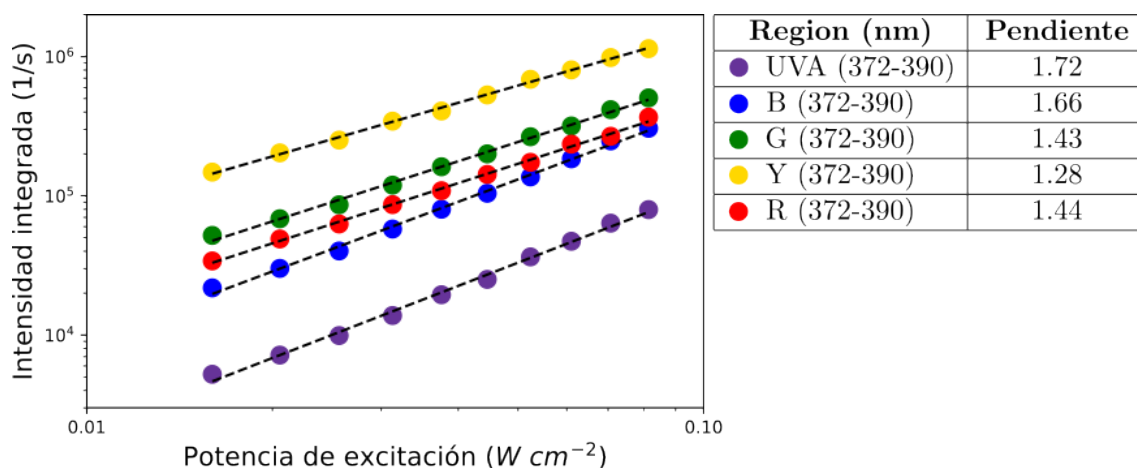


Figura 4.2: **Gráfico Log-Log de I vs P.** Codificado con colores se encuentran las intensidades para cada potencia de excitación para cada uno de las regiones del espectro definidas. La tabla muestra la pendiente de un ajuste lineal para cada rango.

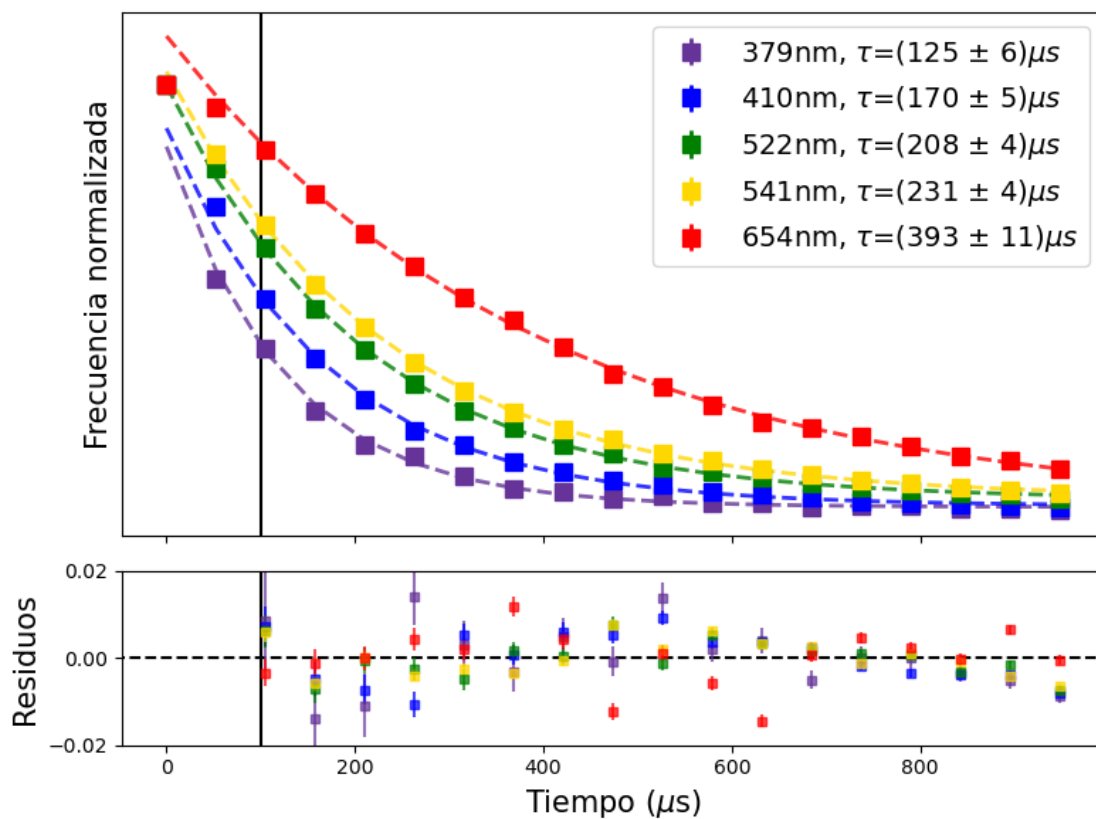


Figura 4.3: **Histogramas de tiempos de vida.** Tiempo de arribo de los fotones (cuadrados) y ajuste de decaimiento exponencial (líneas sólidas) para cada región del espectro. Los tiempos de vida se midieron a 976 nm, 0.087 mW cm^{-2} .

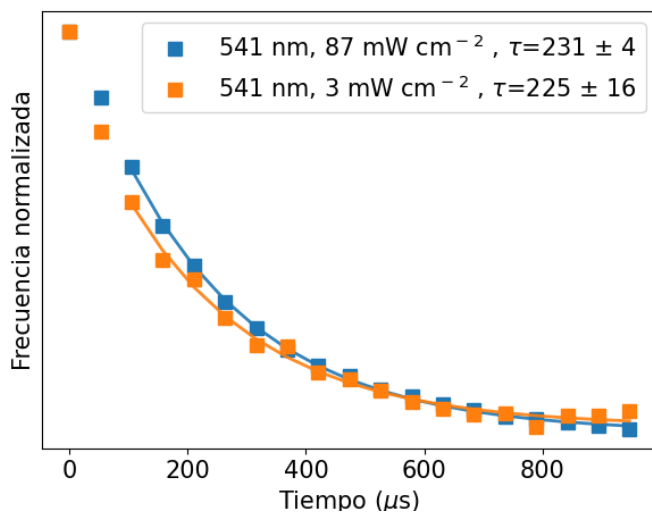


Figura 4.4: **Tiempo de vida a distintas potencias.** Tiempo de arribo de los fotones (cuadrados) para el pico de emisión de 541 nm y dos potencias de excitación distintas, 3 mW cm^{-2} y 87 mW cm^{-2} .

Capítulo 5

Conclusiones

Bibliografía

- [1] J. Bujjamer, *PhD Thesis*, LEC, Departamento de Física, FCEyN, UBA, 2020.
- [2] W. Becker, *Journal of Microscopy*, 2012, **247**, 119–136.
- [3] D. R. Ciocca and G. Delgado, *Cell Stress and Chaperones*, 2017, **22**, 847–852.
- [4] T. Wenzel, *PLOS Biology*, 2023, **21**, e3001931.
- [5] J. Arancio, *Environmental Science & Policy*, 2023, **150**, 103576.
- [6] International Symposium in Honor of Gregorio Weber’s Seventieth Birthday, author, New York, 1989.
- [7] Z. Li, H. Lin, L. Wang, L. Cao, J. Sui and K. Wang, *Science of The Total Environment*, 2022, **838**, 156515.
- [8] X.-L. Hu, H.-Q. Gan, F.-D. Meng, H.-H. Han, D.-T. Shi, S. Zhang, L. Zou, X.-P. He and T. D. James, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2022, **16**, 1425–1437.
- [9] A. Powell, *Media, Culture & Society*, 2012, **34**, 691–708.
- [10] M. Oellermann, J. W. Jolles, D. Ortiz, R. Seabra, T. Wenzel, H. Wilson and R. L. Tanner, *Integrative and Comparative Biology*, 2022, **62**, 1061–1075.
- [11] J. T. Collins, J. Knapper, J. Stirling, J. Mduda, C. Mkindi, V. Mayagaya, G. A. Mwakajinga, P. T. Nyakyi, V. L. Sanga, D. Carbery, L. White, S. Dale, Z. J. Lim, J. J. Baumberg, P. Cicuta, S. McDermott, B. Vodenicharski and R. Bowman, *Biomedical Optics Express*, 2020, **11**, 2447–2460.
- [12] G. Tunens, E. Einbergs, K. Laganovska, A. Zolotarjovs, K. Vilks, L. Skuja and K. Smits, *HardwareX*, 2024, **18**, e00530.
- [13] C. R. Harris, K. J. Millman, S. J. van der Walt, R. Gommers, P. Virtanen, D. Cournapeau, E. Wieser, J. Taylor, S. Berg, N. J. Smith, R. Kern, M. Picus, S. Hoyer, M. H. van Kerkwijk, M. Brett, A. Haldane, J. F. del Río, M. Wiebe, P. Peterson, P. Gérard-Marchant, K. Sheppard, T. Reddy, W. Weckesser, H. Abbasi, C. Gohlke and T. E. Oliphant, *Nature*, 2020, **585**, 357–362.
- [14] H. E. Grecco, M. C. Dartiailh, G. Thalhammer-Thurner, T. Bronger and F. Bauer, *Journal of Open Source Software*, 2023, **8**, 5304.

- [15] 3.4.4. *Deep Memory Acquisition (DMA) — Red Pitaya 2.05-37 Documentation*, <https://redpitaya.readthedocs.io/en/latest/appsFeatures/remoteControl/deepMemoryAcquisition/>
- [16] *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ed. J. R. Lakowicz, Springer US, Boston, MA, 2006.
- [17] P. Du, W. A. Kibbe and S. M. Lin, *Bioinformatics*, 2006, **22**, 2059–2065.
- [18] T. Di Napoli, *Tdinapoli/refurbishedPTI*, 2024, <https://github.com/tdinapoli/refurbishedPTI>.
- [19] H. Grecco, *Hgrecco/Redpipy*, 2024, <https://github.com/hgrecco/redpipy>.
- [20] R. R. M. Dijkstra, *Brightness characterization of single core and core/shell Yb³⁺, Er³⁺-doped NaYF₄ upconversion nanoparticles*, 2012, <http://essay.utwente.nl/65898/>.
- [21] J. Zhang, B. Li, L. Zhang and H. Jiang, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 4860.
- [22] M. Haase and H. Schäfer, *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, **50**, 5808–5829.
- [23] M. Pollnau, G. D. R., L. S. R., G. H. U. and H. M. P., *Physical Review B*, 2000.
- [24] A. F., *Chemical Reviews*, 2004.
- [25] J. F. Suyver, A. Aebischer, S. García-Revilla, P. Gerner and H. U. Güdel, *Physical Review B*, 2005, **71**, 125123.
- [26] M. T. Berry and P. S. May, *The Journal of Physical Chemistry A*, 2015, **119**, 9805–9811.
- [27] J. Bujjamer, M. Claudia Marchi, B. Barja and H. Grecco, *Energy Reports*, 2020, **6**, year.
- [28] *Welcome to the Red Pitaya Documentation — Red Pitaya 2.05-37 Documentation*, <https://redpitaya.readthedocs.io/en/latest/>.

Appendices

A. instrucciones de armado

A.1. Renovación del Horiba PTI Quanta Master 400

El proceso de ensamblaje para la renovación del espectrómetro Horiba PTI Quanta Master 400 se puede organizar en cinco pasos: (1) conectar el motor de excitación M_1 (**Fig. 2.3**), (2) conectar el fin de carrera de excitación, (3) conectar el motor de emisión M_2 , (4) conectar el fin de carrera de excitación y (5) conectar la salida del PMT. Las fuentes de alimentación deben permanecer apagadas hasta que todo esté correctamente conectado, como se muestra en el esquema (**Fig. A1**). Es necesario asegurarse de que el voltaje de GND sea el mismo en todas las conexiones. **Advertencia:** configurar límite de corriente del controlador DRV8825 esté configurado correctamente (en nuestro caso, para limitar a 0.7 A) y que los pines estén conectados adecuadamente, de lo contrario existe el riesgo de que circule demasiada corriente por los bobinados de los motores y se dañen.

1. Conectar el motor de excitación

- a) Conectar los pines P6 y P7 del RP a los pines STEP y DIR del DRV8825, respectivamente (**Fig. A1**).
- b) Conectar los pines restantes: utilizando 3.3 V del RP como nivel alto digital, coloque los pines $\overline{\text{SLEEP}}$ y $\overline{\text{RESET}}$ del controlador del motor en alto, y conecte el GND lógico al GND del RP. Los pines $\overline{\text{ENABLE}}$, M0, M1, M2 y $\overline{\text{FAULT}}$ pueden dejarse flotantes.
- c) Ajustar el límite de corriente de salida del DRV8825 al máximo soportado por el motor paso a paso; en este caso, el motor M061CS02 tiene un límite de 0.7 A.
- d) Provea la fuente de alimentación del motor conectando los pines VMOT y GND a una fuente de 12 V que pueda suministrar al menos $2 \times$ *límite de corriente*. Conectar un capacitor de 100 μF en paralelo.
- e) Conectar el controlador del motor al motor paso a paso: desconecte el conector original del motor M_1 y conecte los pines A1 y A2 del DRV8825 a los pines 1 y 7 del motor, y los pines B1 y B2 a los pines 3 y 5 (**Fig. 2.3B**).

2. Conectar el fin de carrera de excitación

- a) Alimentar con 5 V y GND a los pines 1 y 2, respectivamente, del fin de carrera junto al motor M_1 (**Fig. 2.3C**).
- b) Conectar el pin 3 del fin de carrera al pin digital P2 del RP para el fin de carrera de M_1 , utilizando una resistencia pull-up externa al nivel lógico de 3.3 V del RP.

3. Conectar el motor de emisión

- a) Conectar los pines P4 y P5 del RP a los pines STEP y DIR del controlador del motor, respectivamente.

- b) Repetir los pasos (b) a (e) del ítem (1) para el motor M_2 .

4. Conectar el fin de carrera de emisión

- a) Alimentar con 5 V y GND a los pines 1 y 2, respectivamente, del fin de carrera junto al motor M_2 (**Fig. 2.3C**).
- b) Conectar el pin 3 del fin de carrera al pin digital P3 del RP para el fin de carrera de M_2 , utilizando una resistencia pull-up externa al nivel lógico de 3.3 V del RP.

5. Conectar la salida del PMT

- a) Conectar el cable BNC-SMA a la entrada analógica 1 del RP y configure el modo de alto voltaje.
- b) Conectar una ficha T BNC al extremo BNC del cable BNC-SMA conectado al RP.
- c) Conectar una terminación de $50\ \Omega$ a uno de los extremos de la ficha T para conformar pulsos de 40 a 100 ns.
- d) Conectar el otro extremo de la ficha T a la salida del PMT utilizando un cable BNC-BNC.

Después de estos pasos, el instrumento estará listo para realizar mediciones estacionarias.

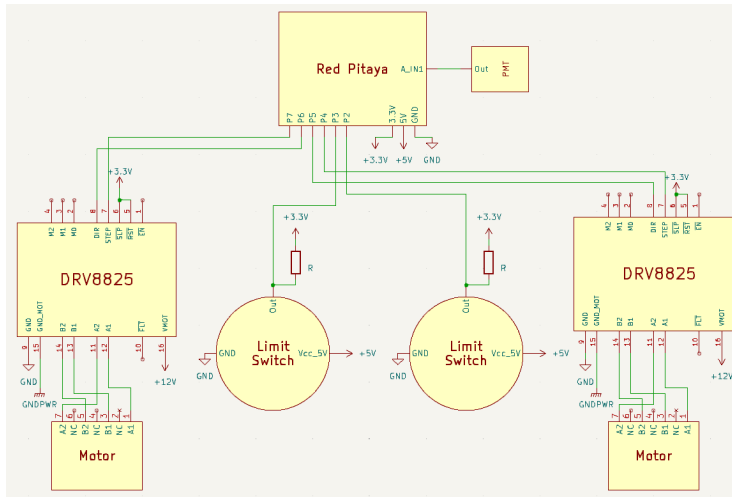


Figura A1: **Esquemático de las conexiones** que contiene la placa PCB de prueba para conectar las componentes del hardware a la RP.

A.2. Ampliación para mediciones dinámicas

Para añadir la funcionalidad de medir tiempos de vida con el espectrómetro Horiba PTI, además de las instrucciones anteriores, deben realizarse los siguientes pasos adicionales:

1. Conectar la fuente de luz externa al puerto externo utilizando un cable de fibra óptica.

2. Conectar el puerto USB tipo B del ITC4020 al puerto USB tipo A del RP.
3. Conectar la salida BNC R3 (salida TTL de 5 V del ITC4020) en el panel trasero del ITC4020 a un adaptador BNC a SMA, y luego conectarlo a la entrada analógica 2 del RP configurando ese canal en modo de alto voltaje.

Nuestro software está diseñado para trabajar con el controlador láser ITC4020, pero se puede utilizar otro siempre y cuando se añadan clases de control específicas al software.

A.3. Instalación y configuración del software

Seguir las instrucciones en este enlace¹⁸ para instalar nuestro paquete Python en su RP. Una vez conectados los componentes de hardware, se deben calibrar los motores de los monocromadores y las entradas analógicas del Red Pitaya. Las instrucciones para calibrar las entradas analógicas del RP están disponibles en su documentación oficial²⁸.

Para calibrar los monocromadores, desarrollamos un intérprete de línea de comandos que guía el proceso paso a paso y genera un archivo YAML con los parámetros de calibración (**Tabla A1**). El siguiente código en Python abre el menú para calibrar el monocromador de emisión:

```
from refurbishedPTI import Spectrometer
spec = Spectrometer.constructor_default()
spec.emission_mono.calibrate()
```

El comando `save_to_yaml` guarda el archivo de configuración en el directorio del RP indicado por el método `.get_config_path()` de la clase `Motor`. Una vez calibrado el monocromador de emisión, repita el proceso para el monocromador de excitación:

```
spec.excitation_mono.calibrate()
```

Repetir los mismos pasos que para el monocromador de emisión para completar la configuración.

Parámetro	Tipo de dato	Descripción
<code>greater_wl_cw</code>	bool	True si la longitud de onda incrementa al girar en sentido horario, Falso en el caso contrario.
<code>max_wl</code>	float	Longitud de onda máxima (en nanómetros) que permitirá configurar la API del monocromador
<code>min_wl</code>	float	Longitud de onda mínima (en nanómetros) que permitirá configurar la API del monocromador
<code>wl_step_ratio</code>	float	Cambio (en nanómetros) de longitud de onda por cada paso que da el motor.
<code>home_wavelength</code>	float	Longitud de onda (en nanómetros) en la que se activa la señal del fin de carrera.

Tabla A1: Parámetros de la API de la clase `Monochromator`.

B. Instrucciones de uso

Como se comentó en la sección 3.1, hay dos formas de operar el espectrómetro renovado: a través de la API de Python y mediante la interfaz gráfica Jupyter Notebook con IPython Widgets.

Para ambos modos de operación, todos los instrumentos listados en la explicación de la sección A.1 deben estar conectados, y tanto el PMT como la lámpara deben estar encendidos. Se deben ajustar las rendijas de Em y Ex (**Fig. 2.2**) según las necesidades del experimento. Una vez completados estos pasos, se puede proceder con las siguientes secciones para el modo de operación por script o GUI.

B.1. Modo de operación GUI

La interfaz gráfica del espectrómetro se encuentra en un Jupyter Notebook que permite al usuario cambiar los parámetros del instrumento mediante Widgets de Jupyter. La GUI se compone de dos secciones: el panel de parámetros y el panel de gráficos (**Figs. A2 y A3**). El panel de parámetros contiene menús desplegables, botones y campos de texto para especificar los parámetros de medición y del archivo de medición. El panel de gráficos incluye dos gráficos, uno para mediciones de espectro y otro para mediciones de tiempo de vida.

Para inicializar el modo GUI del QM400 renovado, se debe abrir el notebook `gui.ipynb` ubicado en `/home/jupyter/refurbishedPTI/gui.ipynb`. Al ejecutar la primera celda del notebook con el código:

```
from refurbishedPTI.gui import Gui
gui = Gui()
```

se inicializa la GUI.

Para realizar una medición seleccionar las opciones **Spectrum** o **Lifetime** en el menú desplegable **Measurement type**. Se especifican los parámetros de la medición utilizando los componentes de la GUI (detallados en las **Tablas A2 y A3**) y comenzar la adquisición. Una vez finalizada la medición, guarde y manipule los datos con los componentes de la GUI (**Tabla A4**).

C. tiempos de vida todos los picos a != pot

D. analisis picos

E. benchmark

Parameter Name	Description
Spectrum type	Emission: fixed excitation monochromator and scanning emission monochromator.
	Excitation: fixed emission monochromator and scanning excitation monochromator.
	Laser: scanning emission monochromator external laser excitation.
Static monochromator wavelength	Fixed monochromator wavelength (nm).
Starting wavelength	Starting wavelength of the scanned wavelength range (nm).
Ending wavelength	Ending wavelength of the scanned wavelength range (nm).
Wavelength step	Difference in wavelength between each data point (nm).
Acquire	Starts the measurement.

Tabla A2: **Parámetros de configuración de una medición de espectro estático.**

Parameter Name	Description
Pump power	Laser pump power (mW).
Frequency	Laser on and off TTL signal frequency.
Duty Cycle	Duty cycle of TTL signal in %.
Emission monochromator wavelength	Wavelength at which the lifetime will be measured (nm).
Amount of counts	Amount of counts that will be measured until the measurement ends.
Starting time	Time after trigger before start counting (ms).
Ending time	Time after trigger before stop counting (ms).
Acquire	Starts the measurement.

Tabla A3: **Parámetros de configuración de una medición dinámica.**

Parameter Name	Description
Measurement filename	Select a filename and directory where the measurement will be saved once the Save button is pressed. If no filename is selected at the time of pressing the Acquire button, the filename will be the current date and time.
Selected measurement	Select a measurement to Save it or Delete it.
Save	Save measurement with selected filename, directory, and format.
Delete	Delete selected measurement.
Save to	File format for the saved measurement. Options:
	pickle
	csv
	excel

Tabla A4: **Parámetros de configuración del archivo que guarda los datos de una medición.**

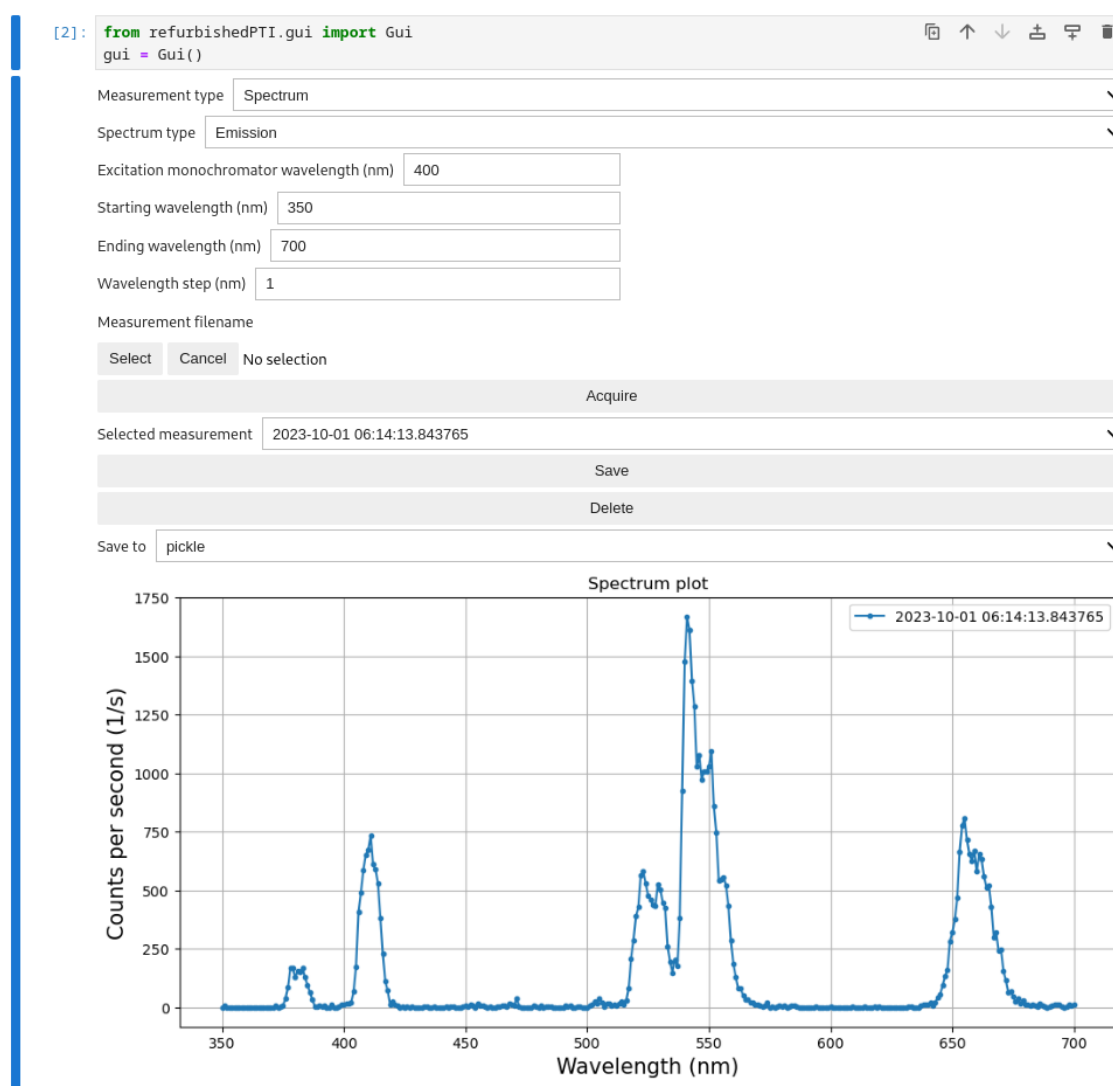


Figura A2: **GUI para medir espectros estacionarios.**

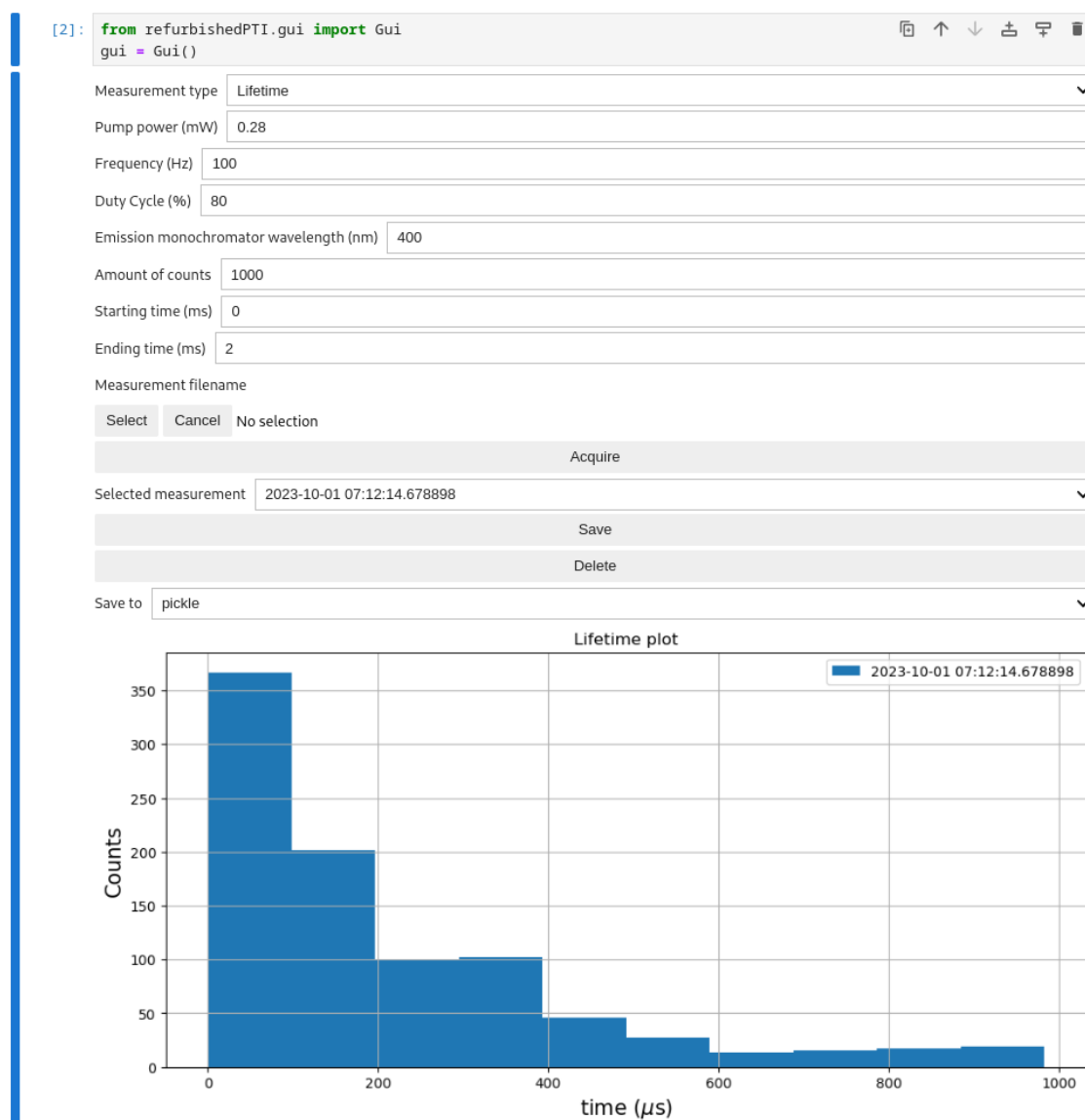


Figura A3: GUI para medir tiempos de vdia.