

Tesis de lic

Tomás Di Napoli

7 de diciembre de 2024

Agradecimientos

Resumen

Índice general

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Espectrofotometría estática | 5 |
| 1.2. Espectrofotometría dinámica | 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. Medición de tiempos de vida: <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i> (TCSPC) Creo que agrego esto antes de soft y lo explico directamente con la RP y etc | 7 |
| 2.1.3. Espectrofluorímetros en argentina y obsolescencia | 8 |
| 2.2. Renovación y ampliación de Horiba PTI Quanta Master 400 mencionar a juan | 9 |
| 2.2.1. Espectrofluorímetro Horiba PTI Quanta Master 400 | 9 |
| 2.2.2. Hardware para renovación | 11 |
| 2.2.3. Hardware ampliación | 12 |
| 2.2.4. Software | 14 |
| 3. Validación de funcionamiento | 17 |
| 3.1. Simulación de pulsos y adquisición | 17 |
| 3.2. Caracterización del PMT | 17 |
| 3.3. Conteo de fotones | 17 |
| 4. Caracterización de UCNPs | 18 |
| 5. Conclusiones | 22 |
| Appendices | 25 |
| A. perfil haz | 26 |
| B. instrucciones de armado | 26 |
| C. instrucciones de uso | 26 |
| D. tiempos de vida todos los picos a != pot | 26 |
| E. analisis picos | 26 |

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 char- acteristics of a molecule.
- As a consequence of the strong influence of the surrounding medium on fluo- rescence emission, fluorescent molecules are currently used as probes for the investi- gation 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**
- 1.3. 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 en el tiempo, 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 clave 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 deseada), como el diseño en án-

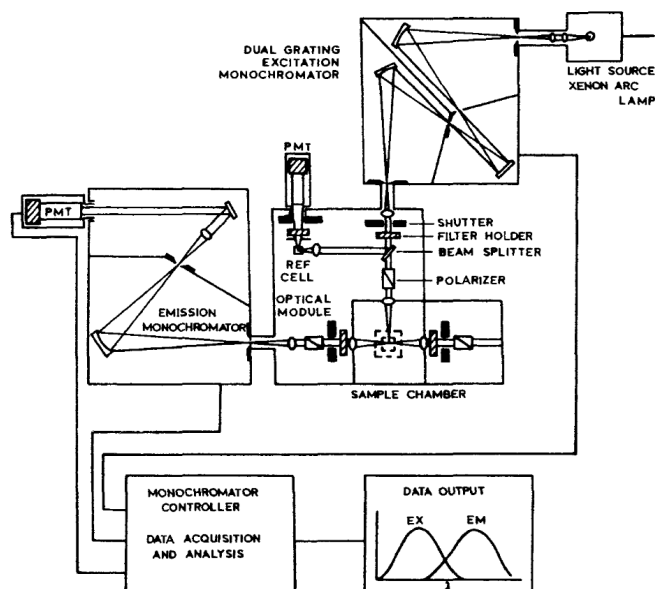


Figura 2.1: Diagrama de un espectrofluorímetro genérico Trabajar en esta figura (A) Diagram of the Horiba PTI QuantaMaster hardware. Red arrows represent motors and limit switch connectors, black is BNC, blue is USB and orange represents a fiber optic. The path that light takes inside the spectrometer is represented in thick blue arrows. (B) and (C) Representation of the old and new instrumental control module respectively. (D) Representation of the raw signal measured from the PMT detector. (E) Spectrum of the sample constructed from the raw signals measured at each wavelength.

gulo 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 de los datos. 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.

1. que mide un espectrofluorímetro?
2. cuales son sus componentes?
3. que variables puede controlar?

2.1.2. Medición de tiempos de vida: *Time-Related Single Photon Counting* (TCSPC) Creo que agrego esto antes de soft y lo explico directamente con la RP y etc

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.

2.1.3. 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 **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 explica detalladamente la plataforma de fuente abierta que desarrollamos para renovar la electrónica y el *software* de control del espectrofluorímetro Horiba PTI QuantaMaster (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 de Horiba PTI Quanta Master 400 **mentonar a juan**

2.2.1. Espectrofluorímetro Horiba PTI Quanta Master 400

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 **CIBION** y uno en CAC-CNEA, y probablemente haya más de modelos 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

espectrofluorímetro 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), 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 excitación a 980 nm con distintas densidades de potencia, y tiempos de vida (también a distintas potencias) del orden de los microsegundos. 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.

serie horiba quantamaster. frecuencia de aparición en exactas y arg en general, baratos, etc. quizás mencionar lo de stefani

componentes de funcionamiento: conectores originales, lampara, monocromadores, chamber, pmt, especificaciones

software de control: felix gx, capacidades fundamentales y deficiencias

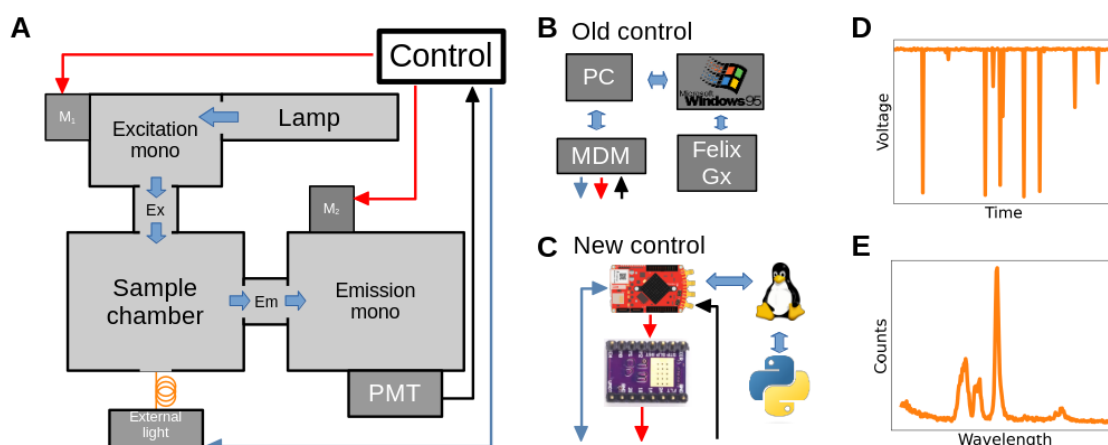


Figura 2.2: **Schematic representation of the spectrofluorometer** (A) Diagram of the Horiba PTI QuantaMaster hardware. Red arrows represent motors and limit switch connectors, black is BNC, blue is USB and orange represents a fiber optic. The path that light takes inside the spectrometer is represented in thick blue arrows. (B) and (C) Representation of the old and new instrumental control module respectively. (D) Representation of the raw signal measured from the PMT detector. (E) Spectrum of the sample constructed from the raw signals measured at each wavelength.

que falta para caracterizar ucnps? time-consuming experiments, operación, medición de tiempos de vida, etc

2.2.2. Hardware para renovación

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 microCPU con FPGA integrada Red Pitaya (RP) STEM LAB 125-14 con múltiples entradas y salidas analógicas y digitales, junto con dos circuitos integrados DRV8825 para el control de los motores. Este cambio en la electrónica de control nos permitió reemplazar el voluminoso módulo MDM ($\sim 10 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$) por dos controladores de motor por pasos DRV8825 ($\sim 2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$) controlados a través de los pines digitales de la RP. Para facilitar la conexión de los componentes soldamos los elementos electrónicos en una placa PCB de prueba (**Fig. 2.5**) a la cual se conectan los pines de la RP a través de un cable IDC, y cada uno de los motores por paso a través de conectores adaptados 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 conversor analógico digital (ADC) y luego contados por software (**Fig. 2.2D**). El ADC de 14 bits de la RP se configura con una frecuencia de muestreo de 32.25 MHz de forma tal de satisfacer el criterio de Nyquist. Dado que el espacio de memoria de adquisición

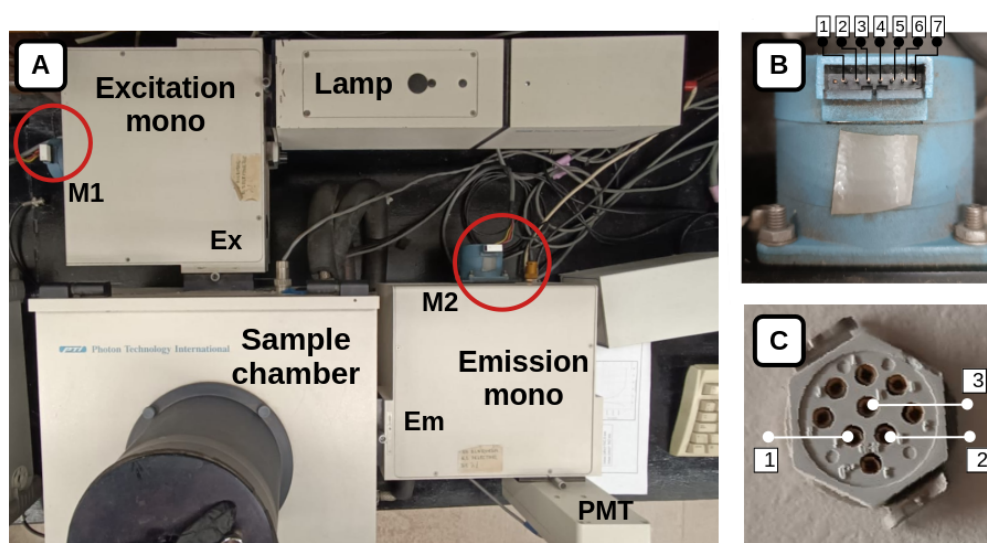


Figura 2.3: Horiba PTI QuantaMaster 400 picture. maybe pasar a apéndice (A) Picture of the whole spectrometer. Circled in red the monochromators' motors and limit switches. (B) Stepper motors pin diagram. The only used pins for the refurbished version are 1 and 7, and 3 and 5, which correspond to each motor winding respectively. (C) Limit switches pin diagram.

por los canales analógicos de la RP es de 2MB, la ventana temporal de pulsos más grande que se puede obtener es de 8 ms. Sin embargo, el software de control que desarrollamos permite agregar una demora para obtener ventanas de medición más grandes.

Qué reemplazamos y con qué nos quedamos, especificaciones finales

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 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.

Para ello, se añadió una fuente de luz IR externa modulable al sistema. En nuestro caso, utilizamos un controlador de diodo láser/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. 2.2). 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 con el láser, con la medición de los pulsos eléctricos de los fotones, para luego realizar histogramas y así medir los tiempos de vida (Fig. 2.4).

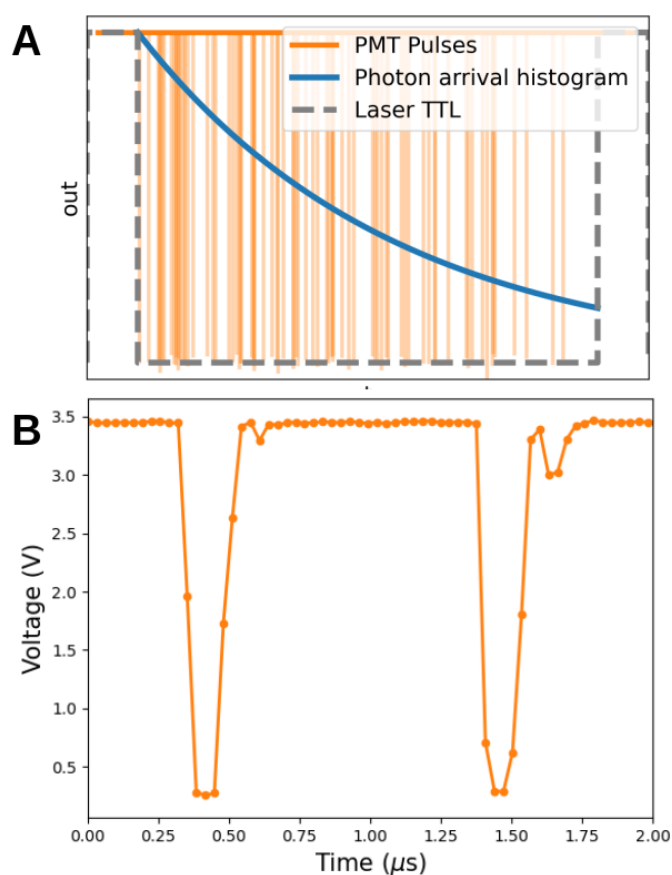


Figura 2.4: **Representación esquemática de un espectrofluorímetro** (A) Diagram of the Horiba PTI Quanta-Master hardware. Red arrows represent motors and limit switch connectors, black is BNC, blue is USB and orange represents a fiber optic. The path that light takes inside the spectrometer is represented in thick blue arrows. (B) and (C) Representation of the old and new instrumental control module respectively. (D) Representation of the raw signal measured from the PMT detector. (E) Spectrum of the sample constructed from the raw signals measured at each wavelength.

Excitación con laser pulsado. Control de potencia y duty cycle. funcionamiento del trigger. el resto ya lo puede hacer la RP

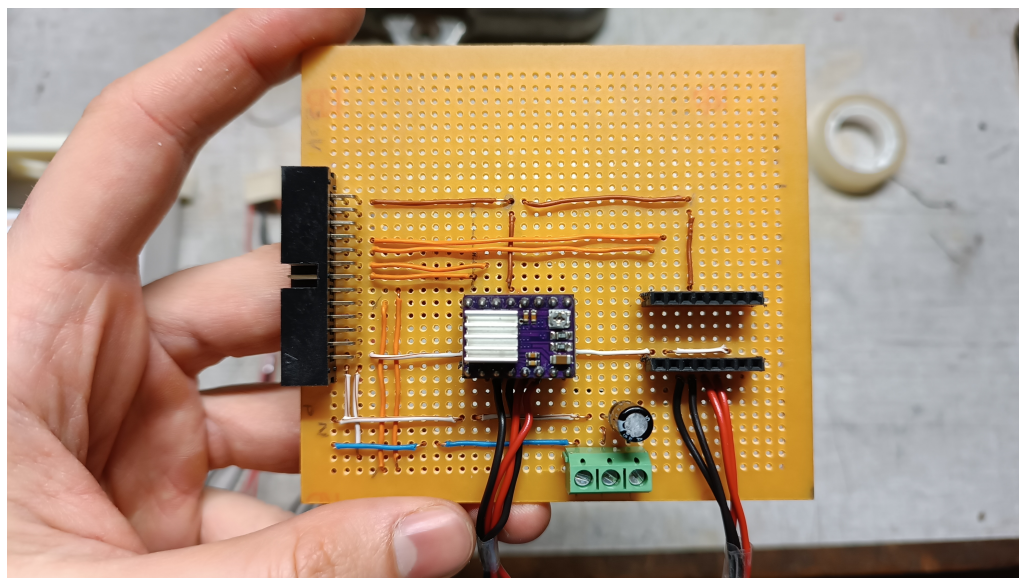


Figura 2.5: **Horiba PTI QuantaMaster 400 picture.** maybe pasar a apéndice (A) Picture of the whole spectrometer. Circled in red the monochromators' motors and limit switches. (B) Stepper motors pin diagram. The only used pins for the refurbished version are 1 and 7, and 3 and 5, which correspond to each motor winding respectively. (C) Limit switches pin diagram.

2.2.4. 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^{15,16}. 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. 2.7**):

- **RedpiPy:** Es uno de los dos paquetes que desarrollamos. Consiste en un *wrapper* de la API original de la RP que permite 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

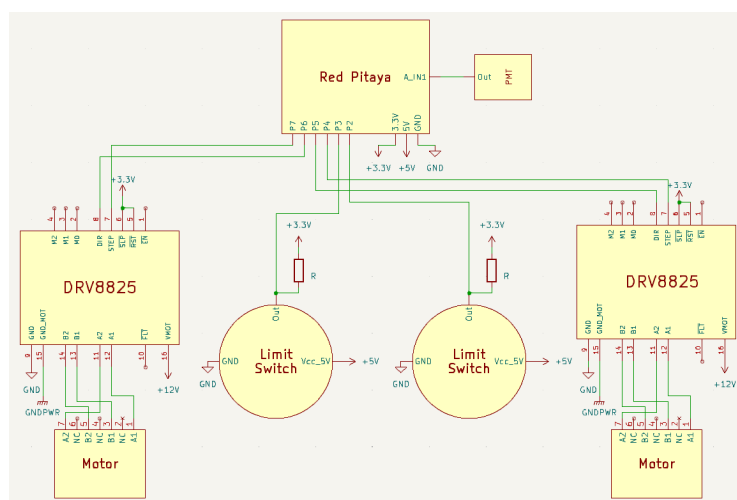


Figura 2.6: Connection diagram.

monocromadores permitiendo la creación de protocolos de medición personalizados.

- **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 que implementa el control del espectrofluorímetro es completamente general y está desacoplada del resto del código, por lo que debería funcionar para cualquier 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.

capacidades del software

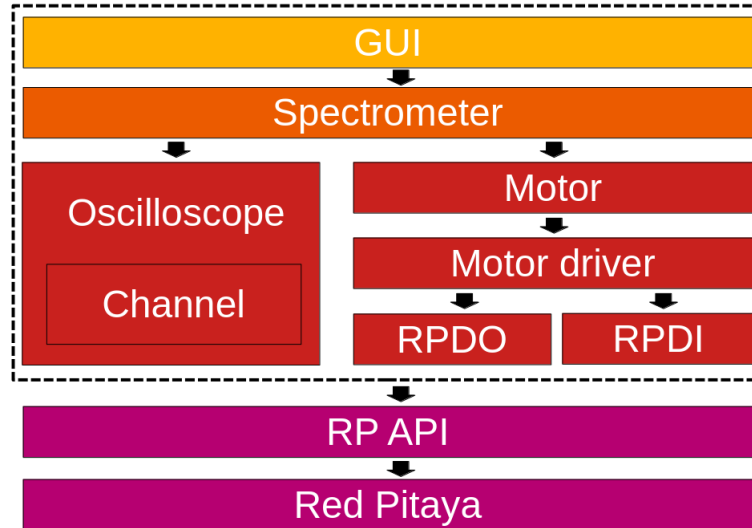
Jerarquía de clases API para desacoplar. Extensión del software: sirve para espectrofluorímetro genérico siempre y cuando tengas motor por pasos y pmt.

quien cuenta los picos, (mencionar que hay analisis de picos más adelante)

Modos de uso, API GUI (capacidades, más detallado en apéndice).

introduccion a medicion de tiempos de vida

Figura 2.7: **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. Cuando se requiere medir tiempos de vida mucho más largos, 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 8 ms, lo que hace posible construir una curva de decaimiento más extensa de la luminiscencia.

explicar que es lo mismo que antes salvo que se usa el trigger.
Explicar funcionamiento de las pantallas y offsets

Capítulo 3

Validación de funcionamiento

3.1. Simulación de pulsos y adquisición

3.2. Caracterización del PMT

3.3. Conteo de fotones

Espectro patrón rhodamina

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 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{+3},\text{Er}^{+3}$ ¹⁷. El método de síntesis empleado escapa el alcance de esta tesis, pero está detalladamente documentado en la literatura¹⁸.

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)¹⁹. 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 magnitud²⁰. 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 incidente²¹. 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^{22,23}.

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 $\log(P)$ ²⁴. 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

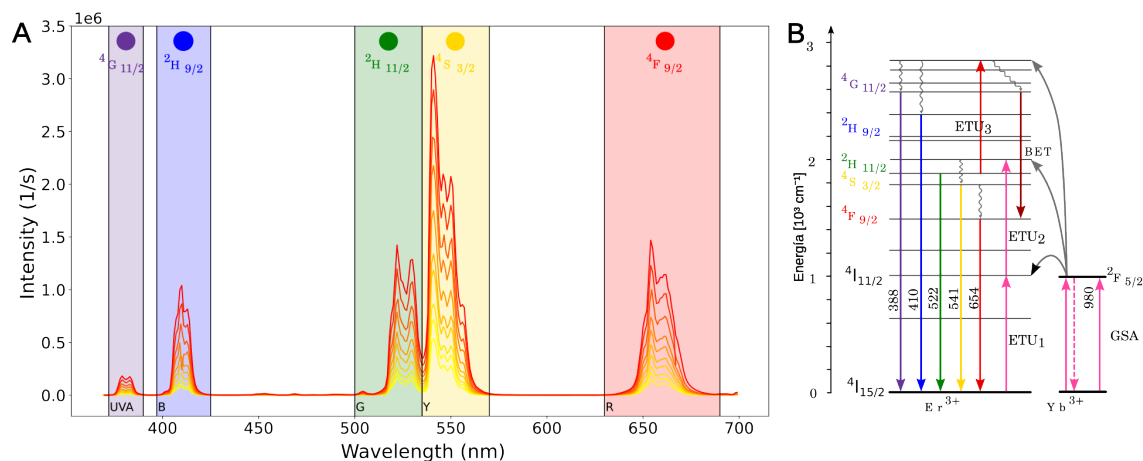


Figura 4.1: **Espectro de las UCNPs dependiente de la potencia.** (A) Espectro de emisión bajo excitación CW por un diodo láser de 976 nm para distintas densidades de potencia de excitación entre 16 mW cm^{-2} y 80 mW cm^{-2} . (B) Esquema de niveles de Yb^{3+} y Er^{3+} , marcados con colores los niveles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

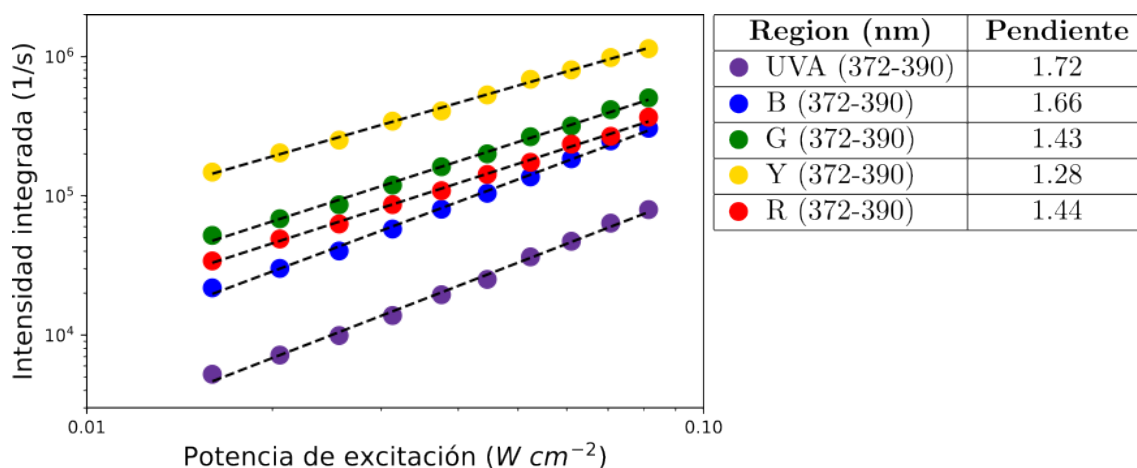


Figura 4.2: **Gráfico Log-Log de I vs P.** Codificado con colores se encuentran las intensidades para cada potencia de excitación para cada uno de las regiones del espectro definidas. La tabla muestra la pendiente de un ajuste lineal para cada rango.

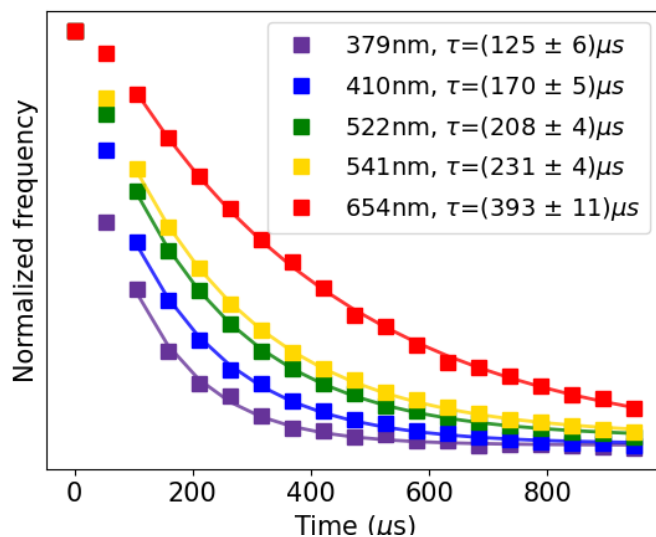
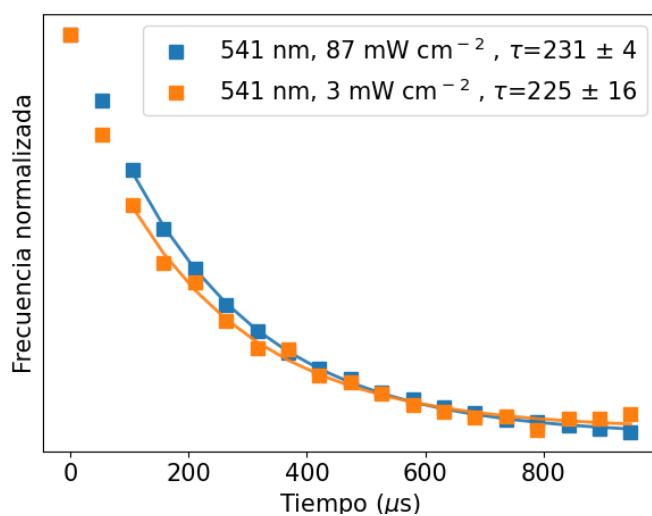


Figura 4.3:

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] T. Di Napoli, *Tdinapoli/refurbishedPTI*, 2024, <https://github.com/tdinapoli/refurbishedPTI>.
- [16] H. Grecco, *Hgrecco/Redpipy*, 2024, <https://github.com/hgrecco/redpipy>.
- [17] R. R. M. Dijkstra, *Brightness characterization of single core and core/shell Yb³⁺, Er³⁺-doped NaYF₄ upconversion nanoparticles*, 2012, <http://essay.utwente.nl/65898/>.
- [18] J. Zhang, B. Li, L. Zhang and H. Jiang, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 4860.
- [19] M. Haase and H. Schäfer, *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, **50**, 5808–5829.
- [20] M. Pollnau, G. D. R., L. S. R., G. H. U. and H. M. P., *Physical Review B*, 2000.
- [21] A. F., *Chemical Reviews*, 2004.
- [22] J. F. Suyver, A. Aebischer, S. García-Revilla, P. Gerner and H. U. Güdel, *Physical Review B*, 2005, **71**, 125123.
- [23] M. T. Berry and P. S. May, *The Journal of Physical Chemistry A*, 2015, **119**, 9805–9811.
- [24] J. Bujjamer, M. Claudia Marchi, B. Barja and H. Grecco, *Energy Reports*, 2020, **6**, year.

Appendices

- A. perfil haz
- B. instrucciones de armado
- C. instrucciones de uso
- D. tiempos de vida todos los picos a \neq pot
- E. analisis picos