



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



MÁSTER OFICIAL EN OPTOMETRÍA AVANZADA Y CIENCIAS DE LA VISIÓN

# CALIBRACIÓN DE UN ESPECTROFLUORÍMETRO MULTI-FUNCIONAL PARA LA MEDIDA Y EVALUACIÓN (VISUAL) DE COLORES FLUORESCENTES

AUTORA

MARÍA DEL MAR SANTAMARIA SOLBES

TUTORES

FRANCISCO MIGUEL MARTÍNEZ VERDÚ  
ESTHER PERALES ROMERO

JULIO 2010

Francisco Miguel Martínez Verdú, profesor titular del Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante, y, Esther Perales Romero, Doctora en Ciencias por la Universidad de Alicante, CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación "CALIBRACIÓN DE UN ESPECTROFLUORÍMETRO MULTI-FUNCIONAL PARA LA MEDIDA Y EVALUACIÓN (VISUAL) DE COLORES FLUORESCENTES ", realizado por M<sup>a</sup> del Mar Santamaría Solbes, bajo la dirección de Francisco Miguel Martínez Verdú y Esther Perales Romero, reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido frente al tribunal correspondiente y optar a la concesión de los créditos correspondientes al Trabajo de Investigación del Máster Oficial en Optometría Avanzada y Ciencias de la Visión del curso 2009-10 organizado por la Universidad de Alicante y la Universidad de Valencia.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Alicante, a 5 de Julio de 2010.

Francisco Miguel Martínez Verdú

Inmaculada Pascual Villalobos  
Directora del Dpto.

Esther Perales Romero

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este trabajo, ha sido desde su inicio, un reto y una carrera de obstáculos que he ido superando poco a poco con la ayuda de mucha gente con la que no hubiese sido posible la realización de este proyecto, mis agradecimientos van dirigidos:

A Francisco Miguel Martínez-Verdú y a Esther Perales por querer guiarme en el camino de la investigación, tan desconocido hasta ahora para mi.

A los compañeros del grupo de color, gente muy trabajadora y firmemente comprometida con su trabajo, que siempre supieron decir las palabras justas en el momento justo cuando más lo necesitaba.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión del proyecto DPI2008-06455-C02-02.

A la empresa Microbeam por su asesoramiento científico-técnico.

A mi hija María y a mi marido César (mis dos grandes amores) por la inmensa paciencia que han tenido conmigo y las horas que nos ha robado este trabajo para estar juntos.

A mis padres y mi hermana, por haber hecho el papel de mamá cuando he estado ausente y siempre me han recordado que “querer es poder”.

A Bruno y Ana, que empezaron el Máster siendo compañeros y ahora son buenos amigos. A Bruno le tengo que agradecer especialmente su compañía siempre que lo he necesitado cuando pensaba que el camino era demasiado difícil para mí.

Todos habéis confiado en mí y así me lo habéis demostrado siempre, sin todos vosotros, seguramente, me hubiese rendido.

## SUMARIO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1.1 Fundamentos de la luminiscencia	
1.2 Aplicaciones generales	
1.3 Fundamentos de color y su medida	
1.4 Medida de colores fluorescentes	
1.5 El reto actual de la medida de colores fluorescentes	
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES USADOS</b> .....	31
3.1 Descripción del espectrofluorímetro analítico utilizado	
3.2 Descripción del proceso de medida vía software de control	
3.3 Muestras no fluorescentes y fluorescentes	
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	42
4.1 Obtención del factor de radiancia reflejado	
4.2 Obtención del factor de radiancia luminiscente	
4.3 Obtención del factor de radiancia total, a partir de la matriz triangular de Donaldson	
4.4 Visualización de la matriz triangular de Donaldson	
<b>5. RESULTADOS</b> .....	49
5.1 Calibrado de escalado fotométrico	
5.2 Caracterización de los colores no fluorescentes	
5.3 Medida y caracterización de los colores fluorescentes	
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	69
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	72
<b>8. ANEXOS</b>	

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 FUNDAMENTOS DE LA LUMINISCENCIA

La mayoría de sustancias que absorben radiación ultravioleta o visible pierde su exceso de energía en forma de calor mediante choques con otros átomos o moléculas. Existen un número importante de sustancias, sin embargo, que sólo pierden en forma de calor una parte de su exceso de energía y emiten el resto en forma de radiación electromagnética de longitud de onda ( $\lambda$ ) más larga que la radiación absorbida. Este fenómeno recibe el nombre de luminiscencia [1-3]. Este término engloba los conceptos de fluorescencia y fosforescencia. La diferencia entre ambos términos radica en el modo en que la molécula regresa a su estado fundamental, aunque en la práctica se diferencian por el tiempo transcurrido entre la absorción y la emisión.

El fenómeno de fluorescencia fue descubierto por George G. Stokes en 1852. Stokes observó que la  $\lambda$  de la luz emitida por fluorescencia era mayor que la  $\lambda$  de la radiación incidente, lo que llevó a conocerse como ley de Stokes. En su honor, las líneas de emisión que aparecen desplazadas a  $\lambda$  más largas (con frecuencias más bajas) se llaman líneas de Stokes.

Cuando una molécula absorbe radiación pasa de un estado electrónico y molecular fundamental a un estado excitado (Figura 1). Cuando este estado excitado es fundamentalmente estable, puede perder, mediante colisiones, su exceso de energía vibracional permaneciendo en el estado eléctrico excitado y volver a su estado eléctrico fundamental emitiendo radiación. En el caso de la fluorescencia, esta emisión se produce inmediatamente. Y en el caso de la fosforescencia, pasa primero a un estado triplete meta-estable, emitiendo posteriormente la radiación.

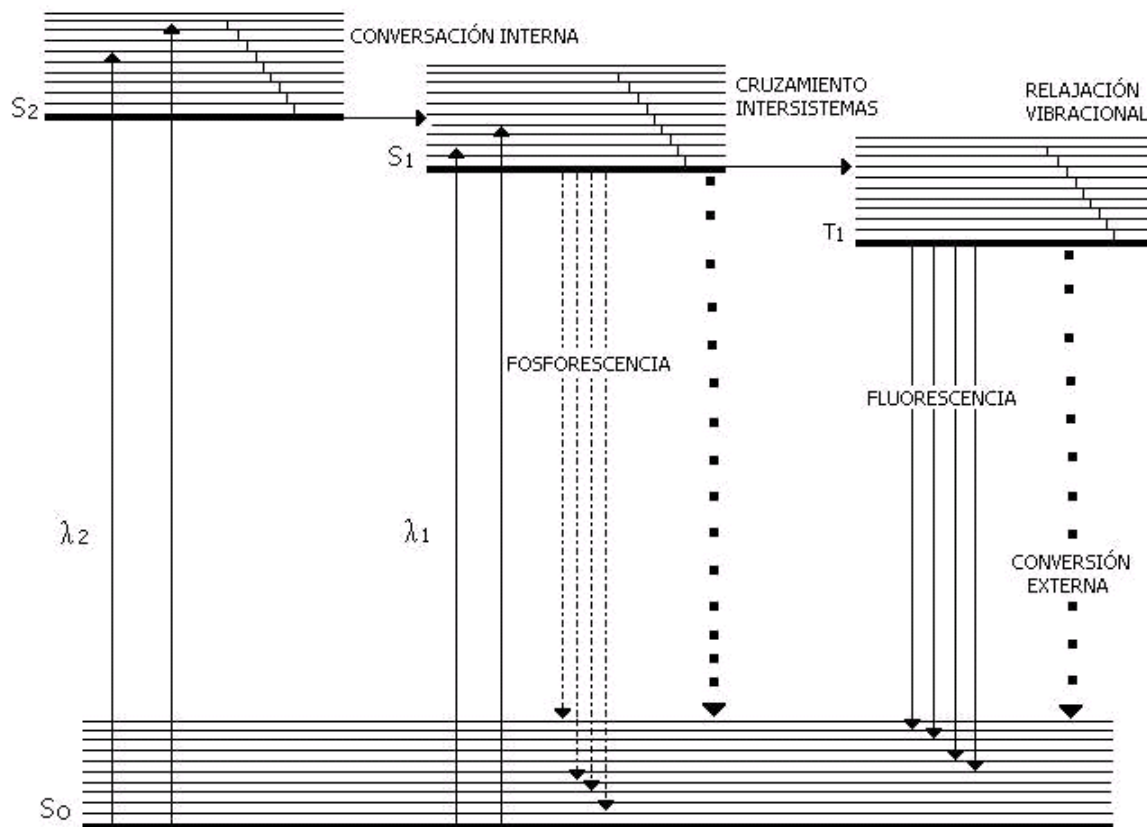


Figura 1: Esquema del proceso de fluorescencia y fosforescencia.

## TEORÍA

A continuación, y de modo resumido, pasamos a describir los fundamentos teóricos de la luminiscencia, que quedan conectados con los conceptos siguientes: [4-13]

- Procesos de moléculas en estados excitados

Para que se produzca luminiscencia, es necesario, que el material absorba previamente radiación con una  $\lambda$  adecuada. Cuando un cuanto de luz de una  $\lambda$  determinada incide sobre una molécula puede ser absorbido en aproximadamente  $10^{-15}$  s (tiempo necesario para que una molécula pase de un estado excitado a otro). Una molécula en estado excitado tiene un tiempo de vida de sólo unos  $10^{-7}$  s y en este tiempo pierde parte de su exceso de energía. Los tres tipos de procesos que pueden darse en una molécula en estado excitado son:

- Que reemita un fotón de la misma frecuencia que el que ha absorbido (emisión de resonancia).
- Que pierda su energía vibracional emitiendo un fotón de radiación infrarroja y pase al nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado.
- Que pierda su energía vibracional y pase al estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado sin emitir radiación, por colisiones.

Cuando la molécula está en el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado puede perder el exceso de energía que le quede de tres maneras:

- Sin emitir radiación, perdiendo energía electrónica mediante choques o interacciones.
- Emitiendo un fotón de luz ultravioleta o visible, como en el caso de la fluorescencia.
- Pasando a un estado triplete metaestable y retornando después de un cierto tiempo al estado eléctrico fundamental emitiendo un fotón de luz ultravioleta o visible, como en el caso de la fosforescencia.

En la mayoría de los casos, la mayor parte de moléculas que absorben radiación UV o visible pierden todo el exceso de energía en forma de calor, pocas moléculas poseen fluorescencia y mucha menos fosforescencia.

- Estado singlete y triplete

Estos nombres definen el número de electrones desapareados en ausencia de un campo magnético. Si  $n$  es el número de electrones desapareados, habrá  $(n + 1)$  estados degenerados, que son estados de igual energía asociados al spin electrónico, con independencia del orbital molecular que ocupan. Así, si no existen electrones desapareados ( $n = 0$ ) habrá solo  $(n + 1)$  o un estado de spin llamado estado singlete. Los demás estados, doblete, triplete, etc., se refieren a sistemas con 1, 2, 3, etc. electrones desapareados.

El estado de fluorescencia/fosforescencia implica moléculas y la mayor parte de moléculas en estado fundamental, estado de menor energía, no poseen electrones desapareados (singlete). Cuando estas moléculas absorben radiación UV o visible de frecuencia adecuada, uno o más de estos electrones apareados pasa a un estado excitado singlete en el que el spin del electrón no ha variado, y por tanto el spin neto sigue siendo nulo.

- Proceso de luminiscencia

Mediante la absorción la molécula pasa del estado electrónico y vibracional fundamental a uno cualquiera de los estados vibracionales (excitados). Después la molécula puede perder su energía vibracional por choques o desactivarse hasta el nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado singlete. A partir de aquí y según el estado de la molécula y las condiciones en la que se encuentra, pueden producirse tres efectos distintos.

Si el estado excitado singlete es relativamente inestable, la molécula volverá al estado fundamental por desactivación por choques y sin emisión de radiación. Si el estado excitado singlete es relativamente estable volverá al estado electrónico fundamental emitiendo un fotón fluorescente. El estado excitado singlete puede estabilizarse mejorando así la eficacia de la fluorescencia.

Puesto que en muchas moléculas las separaciones entre los niveles energéticos vibracionales en el estado electrónico fundamental y excitado son similares, el espectro de emisión fluorescente suele ser una imagen especular del correspondiente espectro de absorción pero algo desplazado a  $\lambda$  más largas.

Las moléculas con estados excitados singletes relativamente estables y capaces de pasar a un estado triplete pueden presentar emisión fosforescente.

Al paso de un estado singlete (sin electrones desapareados) a un estado triplete (con 2 electrones desapareados) se le denomina *cruzamiento de sistemas*. Este mecanismo implica un acoplamiento vibracional entre los estados singlete y triplete. El estado triplete, normalmente, es menos energético que el estado singlete, después del entrecruzamiento de sistemas la molécula tiene otra vez un exceso de energía vibracional y se desactiva, sin emitir radiación, hasta el nivel vibracional cero del estado triplete.

No todas las moléculas en el estado electrónico excitado singlete más bajo vuelven al estado fundamental emitiendo un fotón. El número de las que lo hacen se mide usando el *rendimiento cuántico de fluorescencia*, que se define como el cociente entre el número de fotones emitidos por fluorescencia y el número de fotones absorbidos.

Con estos fundamentos teóricos de la luminiscencia, las variables más importantes que intervienen en este fenómeno óptico de interacción luz-materia son:

- Rendimiento cuántico o eficacia cuántica de la fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Las moléculas altamente fluorescentes tienen eficacias cuánticas que se aproximan a la unidad. Mientras que las sustancias poco fluorescentes tienen rendimientos que tienden a cero.
- Estructura: La fluorescencia más intensa y más útil la presentan los compuestos que poseen grupos aromáticos, estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia.
- Rigidez estructural.
- Temperatura y disolvente: la eficacia cuántica disminuye muchas veces por el aumento de la temperatura ya que a temperaturas elevadas se produce un aumento en la frecuencia de las colisiones que hace aumentar la probabilidad de desactivación no radiante (conversión externa).
- Efecto del pH.
- Efecto de la concentración: la potencia de la radiación fluorescente es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema.



## 1.2 Aplicaciones generales

Entender fenómenos implicados en la transformación de la energía por un material luminiscente es de importancia fundamental en la aplicación tecnológica del diseño de nuevos materiales luminiscentes [14-16]. Para fabricar estos materiales es necesario dotarlos de las propiedades deseables para satisfacer las necesidades de aplicaciones específicas requeridas, siendo el ideal un diseño átomo por átomo y molécula por molécula. Su aplicación va desde los experimentos de la física de altas energías, la física nuclear y las técnicas de diagnóstico por imagen en medicina, hasta los sistemas de protección de tarjetas de crédito.

La mayoría de estos materiales luminiscentes son sólidos con estructura cristalina, aunque también los hay amorfos, como los plásticos y polímeros. La mayoría de ellos deben sus propiedades luminiscentes a ser “cristales impuros”, es decir, a que dentro de la estructura pura hay un trozo que da al cristal su nombre de material “dopado” o “impuro”. Un ejemplo es el rubí. Éste es un cristal de óxido de aluminio que por sí solo es completamente incoloro; pero si algunos de los átomos de aluminio son sustituidos por átomos de cromo, entonces la presencia del cromo hace que el óxido de aluminio sea capaz de transformar la luz solar en una luminiscencia de color rojizo muy apreciada en la joyería. Se debe tener en cuenta que el primer dispositivo láser de estado sólido se construyó a principios de los años 60 basándose en las propiedades luminiscentes del rubí.

Otro ejemplo es el material utilizado en las lámparas fluorescentes. Está constituido por un cristal de fosfato de calcio que tiene dos tipos de impurezas: el antimonio y el manganeso. El antimonio brilla con luz azul y el manganeso con luz amarilla. La mezcla de estos colores produce la luz brillante característica de dichas lámparas.

Una aplicación clínica de los materiales luminiscentes la vemos en el fluoroinmunoanálisis. En esta aplicación, el objetivo es identificar especies biológicas, especialmente para su uso clínico. Su utilidad se basa en la colocación de etiquetas luminiscentes que por sí solas no brillan, pero que se acoplan químicamente con un anticuerpo cuya presencia está ligada a una biomolécula u organismo dado. La etiqueta es entonces, capaz de responder con luminiscencia cuando se le ilumina con luz ultravioleta indicando de esta forma la presencia de la biomolécula u organismo.

Otro ejemplo de etiqueta luminiscente es el europio encapsulado en bipyridina. La bipyridina absorbe la luz ultravioleta con la que se le ilumina y transfiere parte de la energía al europio, el cual emite luz roja siempre y cuando la etiqueta esté acoplada al anticuerpo. También hay etiquetas luminiscentes sólidas cristalinas. En este caso, las partículas de polvo cristalino se conectan con el anticuerpo y pueden transformar la luz ultravioleta en luz visible rojiza por el hecho de estar conectadas, demostrando así la presencia del anticuerpo.

Los materiales luminiscentes que pueden transformar la energía de rayos X o de rayos gamma en luz visible tienen gran interés en diferentes aplicaciones. Estos materiales se conocen como “centelladores”. El fenómeno de la luminiscencia aquí es toda una rareza de la naturaleza, ya que ordinariamente se esperaría que el material transformara la energía de los rayos X o gamma únicamente en calor, pero los centelladores se las arreglan para utilizar parte de esa energía para resplandecer. El fenómeno de centelleo fue descubierto en 1903. Es en el área de las técnicas de diagnóstico por imagen en medicina, entre otras, en donde estos materiales centelladores tienen una aplicación muy práctica [17]. En efecto, un médico puede sospechar que su paciente, dados sus síntomas, tiene un tumor cerebral, pero en lugar de realizar una peligrosa cirugía exploratoria le prescribe algo más benigno: una tomografía por emisión de positrones.

Otra aplicación estaría en la biología marina [18]. Desde siempre los marineros informaban fascinados del despliegue de luces verdosas que a veces les ofrecían los mares tropicales. En general este efecto tiene origen bioluminiscente. Ahora investigadores de la Universidad de San Diego han descubierto pistas claves que desvelan los mecanismos bioluminiscentes de uno de esos seres: un gusano que produce una fosforescencia verdosa.

Los “gusanos de fuego” marinos usan la bioluminiscencia para atraer a las posibles parejas durante el ritual de apareamiento. Dimitri Deheyn y Michael Latz revelaron en el año 2009 que los gusanos usan además este sistema como un mecanismo de defensa [19]. Este estudio proporciona pistas sobre la función de la bioluminiscencia en estos gusanos y permite a los científicos dar un paso más hacia la identificación de las bases moleculares de esta bioluminiscencia. La meta sería la identificación de la proteína que produce esta luz. Proteínas similares ya identificadas en el pasado han servido posteriormente como muy buenos marcadores en investigación biológica. Según Deheyn si se consiguiera entender cómo es posible mantener esta luz tan estable durante tanto tiempo se podría utilizar en aplicaciones biomédicas, bioingeniería y en otros campos.

En los experimentos realizados averiguaron la relación entre la bioluminiscencia, el calor y la presencia de oxígeno. Encontraron que la bioluminiscencia se activa incluso a temperaturas de 20 grados bajo cero pero decae rápidamente a altas temperaturas. También descubrieron que el proceso permanece a bajos niveles de oxígeno.

Basándose en las pruebas realizadas, los investigadores creen que el proceso químico responsable de la bioluminiscencia debe de contar con una proteína productora de luz específica. Se inspiran en Osamu Shimomura que ganó el premio Nóbel de Química 2008, por descubrir la proteína bioluminiscente de una medusa.

### 1.3 Fundamentos de color y su medida

#### Conceptos generales del color

El término color puede tener significados muy diferentes dependiendo de la utilización que presente. Por ejemplo un químico hablará de color como un término genérico aplicado a colorantes, pigmentos y materias similares. El físico se referirá al color en referencia a las propiedades ópticas del material que estudia y los fisiólogos aplicarán el término a la sensación en el subconsciente del observador. Aunque cada especialidad lo entiende de una manera el concepto es idéntico para todas ellas.

La UNE (UNE 48-103-94) distingue como color percibido el aspecto de la percepción visual y color psicofísico a las características de la radiación visible. En ambos casos el color permite al observador distinguir las diferencias entre dos objetos con la misma dimensión, forma y estructura. El color es una percepción que depende de la longitud de onda, si se cambia la longitud de onda de un estímulo, su color también cambiará. Por tanto, una especificación objetiva del color de una superficie podrá expresarse en términos de la reflectancia/transmitancia espectral.

Los tres elementos fundamentales para la percepción del color son: el iluminante, la muestra y el observador [20-21] (Figura 2). Para estandarizar las coordenadas del color y facilitar la comparación entre diferentes laboratorios, la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) recomienda para colorimetría unos estándares para el observador y para la fuente de iluminación. Como observador establece mediante las funciones de mezcla el Observador patrón en su variante 1931 ó 1964.

ILUMINANTE	OBJETO	OBSERVADOR
	opaco $\rho(\lambda)$ , transparente $\tau(\lambda)$ 	funciones de igualación CIE-1931 XYZ 

Figura 2. Elementos fundamentales para la percepción del color.

Como fuentes de iluminación la CIE propone distribuciones espectrales relativas llamadas iluminantes (Figura 3) [22]. Se pueden distinguir varios tipos de fuentes: A, D65, C, D50, D55, D75, diferentes lámparas fluorescentes (FL) y diferentes lámparas de alta presión (HP). A continuación, se detallan las características principales de los iluminantes más utilizados.

Iluminante A: (Figura 3): Corresponde a una lámpara convencional de filamento de tungsteno. La radiación de una lámpara incandescente puede aproximarse a la radiación de un cuerpo negro. Por tanto, la ley de Planck se utiliza para obtener su distribución espectral

Illuminante D65: (Figura 3): Describe las condiciones medias de iluminación en un mediodía en Europa Occidental. Representa una fase de luz diurna con una temperatura de color de 6504 K. La CIE ha establecido un método sencillo para calcular las fases de luz diurna en función de su temperatura de color.

Illuminante E: (Figura 3): Su distribución espectral relativa es independiente de la longitud de onda y representa un espectro equienergético.

Illuminantes F: Los iluminantes fluorescentes se caracterizan en función de su distribución espectral, siendo espectralmente muy diferentes, todos ellos basados en el principio de emisión por luminiscencia.

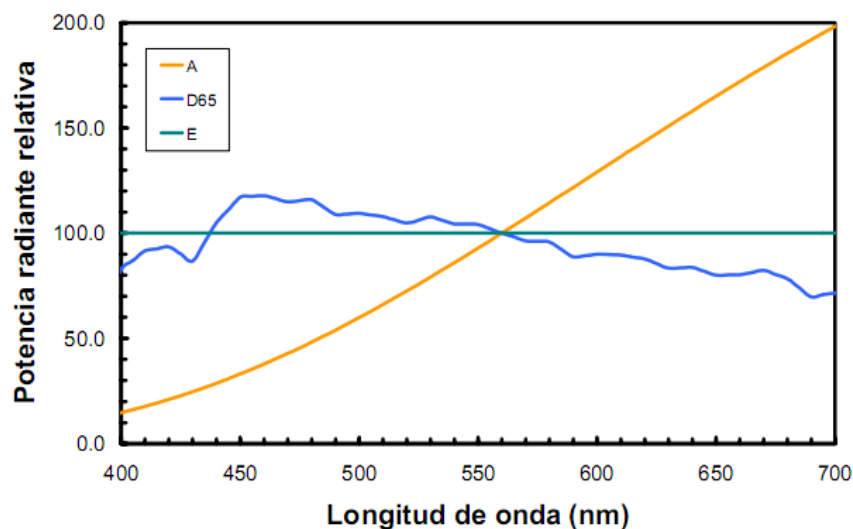


Figura 3. Iluminantes patrón de la CIE

Los dos modos más importantes en los que la luz puede interactuar con los objetos, desde el punto de vista de su influencia en el color, son la absorción y la difusión. La absorción es el proceso por el cual la energía radiante se utiliza para excitar las moléculas en el objeto a estados de energía superiores. La difusión es la interacción por la cual la luz es redirigida como consecuencia de refracciones y reflexiones múltiples. En general, cuando en la interacción de la luz con un objeto sólo interviene la absorción, éste será transparente ya que la luz no es absorbida sino transmitida a través del objeto. Si hay centros de difusión, el objeto aparecerá o bien translúcido o bien opaco, dependiendo del grado de difusión, según la luz es reflejada hacia el observador. Para determinar el color, lo importante es el espectro de luz que llega al ojo, que vendrá del iluminante directamente ( $E_S(\lambda)$ ) o del iluminante modificado por una reflexión selectiva en una superficie ( $S(\lambda) \rho(\lambda)$ ) o en un campo transparente ( $S(\lambda) \tau(\lambda)$ ).

Respecto al observador colorimétrico [23], actualmente se conoce que en el ojo humano existen tres tipos de fotorreceptores o conos, cada uno de ellos sensibles a

determinadas longitudes de onda ya que cada uno de ellos tiene distintos fotopigmentos con propiedades de absorción diferentes. Estos tres tipos se denominan conos L, M y S. Ya que en la retina existen tres detectores de color diferentes, cualquier color puede obtenerse mediante la mezcla en proporciones adecuadas de tres colores básicos (Figura 4, arriba). Según propone la CIE, el observador patrón se define como un conjunto de sensores XYZ, o técnicamente  $\bar{x}(\lambda)$ ,  $\bar{y}(\lambda)$ ,  $\bar{z}(\lambda)$  (Figura 4, abajo), cuyas respuestas son, en cierto modo el número total de interacciones de cada longitud de onda del estímulo-color y cada sensor, o áreas XYZ, también llamados valores triestímulo, expresados matemáticamente según la ecuación 1.

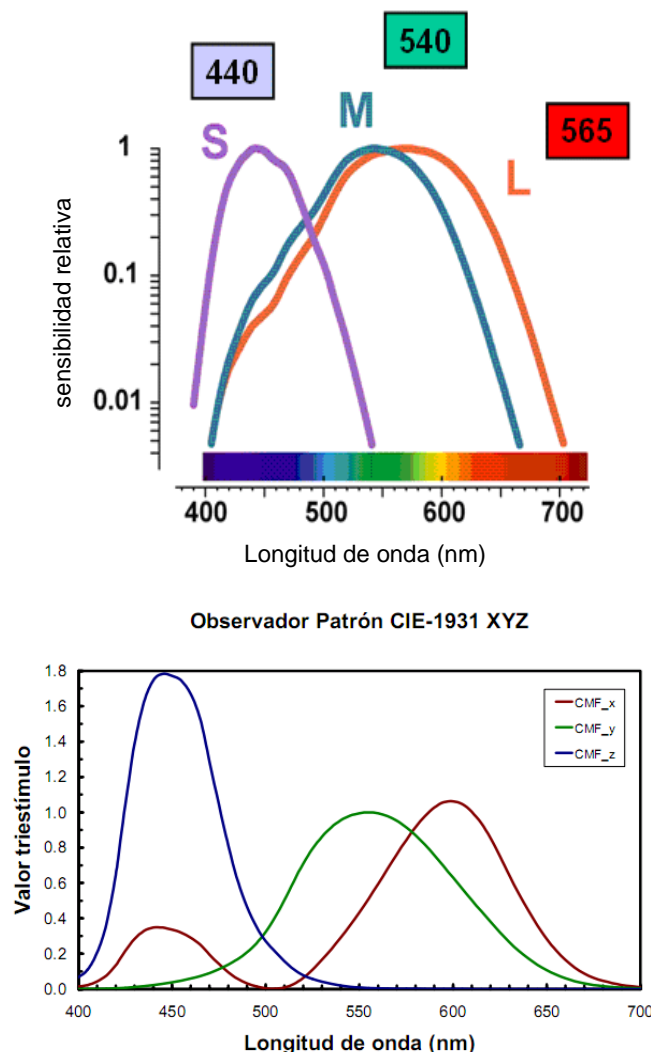


Figura 4. Curvas de sensibilidad espectral de los conos (arriba) y funciones de igualación (abajo).

Después de todo lo expuesto, se puede decir que un estímulo visual dado se percibirá, esencialmente, de un color u otro dependiendo de tres factores: la fuente luminosa (iluminante), la composición espectral del objeto, es decir, del conjunto de

longitudes de onda que sea capaz de transmitir o reflejar y el ojo humano que observa la luz emitida, reflejada o transmitida por ese objeto. Por tanto, un color puede describirse mediante una terna de parámetros que pueden ser:

- valores triestímulo.
- coordenadas cromáticas y luminancia.
- descriptores perceptuales: tono, luminosidad y colorido, etc.

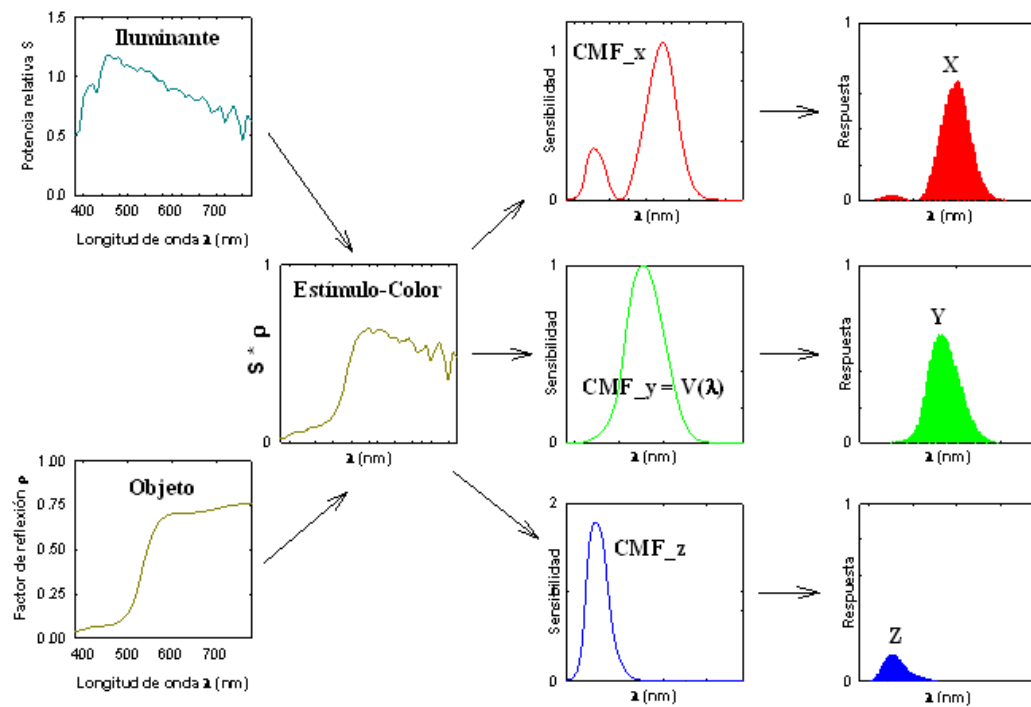


Figura 6. Esquema de codificación triestímulo de un estímulo visual.

La especificación triestímulo CIE-XYZ viene dada por:

Ecuación 1.

$$X = k \sum_{\lambda=380}^{780} S(\lambda) \rho(\lambda) \bar{x}(\lambda) \Delta\lambda$$

$$Y = k \sum_{\lambda=380}^{780} S(\lambda) \rho(\lambda) \bar{y}(\lambda) \Delta\lambda \quad , \quad \text{con} \quad k = \frac{100}{\sum_{\lambda=380}^{780} S(\lambda) \bar{y}(\lambda) \Delta\lambda}$$

$$Z = k \sum_{\lambda=380}^{780} S(\lambda) \rho(\lambda) \bar{z}(\lambda) \Delta\lambda$$

$S(\lambda)$ = iluminante

$\rho(\lambda)$ = reflectancia del objeto

$\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ ,  $\bar{z}$  = funciones de igualación

Una vez definido un lenguaje básico de color, basado en tres números o tres valores triestímulo por las características de trivariancia en la visión del color, falta representarlo en un diagrama bidimensional. La CIE propuso en 1931 un sistema denominado diagrama cromático x e y. Estas coordenadas cromáticas se obtienen directamente de los valores triestímulo según las expresiones de la ecuación 2.

Los datos referentes al iluminante y al observador se encuentran tabulados en normativas CIE (CIE-15:2004) [23] (Anexo 1).

*Ecuación 2.*

$$x = \frac{X}{X+Y+Z}, \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

El espacio de color definido por la CIE para fines aplicados y cuyo objetivo fundamental es la comparación de colores se llama CIELAB. Este modelo se basa en los tres valores CIE-XYZ anteriores ya que estos valores no nos permiten trabajar con atributos perceptuales del color, como pueda ser la luminosidad, colorido, etc. Aunque la claridad sí puede relacionarse directamente con el valor triestímulo Y, el tono y el colorido se obtienen por la combinación de X y Z, o de las coordenadas cromáticas x e y. Así estos atributos perceptuales los representamos de manera tridimensional, según muestra la Figura 7. La claridad se relaciona con el eje central, el tono es el giro y el colorido representa la separación con respecto al eje central

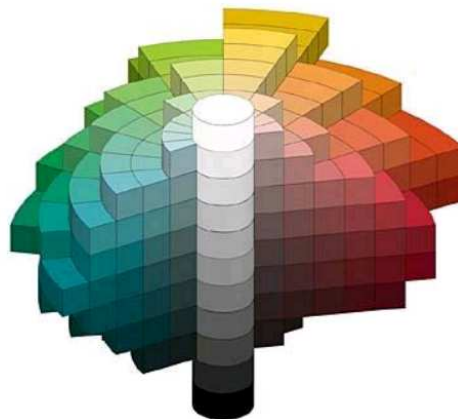


Figura 7. Esquema tridimensional de la percepción de los colores.

En el espacio CIELAB el color psicofísico XYZ se relaciona con el color percibido  $L^*a^*b^*$   $C_{ab}^*$   $h_{ab}^*$  de la siguiente manera [25-28]:

Ecuación 3.

$$L^* = 116 \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - 16$$

$$a^* = 500 \left[ \left( \frac{X}{X_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right] \quad ; \quad C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$b^* = 200 \left[ \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left( \frac{Z}{Z_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right] \quad ; \quad h_{ab}^* = \arctg \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \text{ en deg}$$

- La variable claridad  $L^*$ , solamente depende del valor triestímulo  $Y$ , tanto del objeto como del iluminante o blanco de referencia. La escala numérica va de 0 (negro) hasta 100 (blanco) y no es lineal. Si  $Y=20$ ,  $L^*=51.84$ .
- Las variables  $a^*$  y  $b^*$  representan las coordenadas cartesianas del nuevo diagrama cromático (Figura 8, izquierda). Las coordenadas  $a^*$  representan los canales oponentes rojo-verde: donde si  $a^* > 0$  se percibirá con parte de rojo, si  $a^* < 0$  se apreciará con parte de verde. La coordenada  $b^*$ , representa la sensación amarillo-azul del objeto: donde si  $b^* > 0$  se percibirá con parte de amarillo, si  $b^* < 0$ , se percibirá con parte de azul.
- Las variables  $C_{ab}^*$  (croma) y  $h_{ab}^*$  (tono), pueden ser consideradas como variables polares.

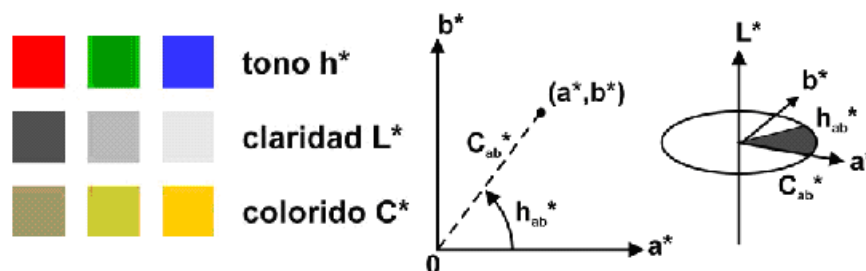


Figura 8. Representación gráfica de los componentes perceptuales del color.

Aparte del estudio de la apariencia de color, con este modelo oponente con no linealidades se pueden analizar las diferencias perceptuales de color entre dos muestras diferentes. Conviene expresar las diferencias de color ( $\Delta E$ ) entre dos colores por la distancia que los separa. Aunque hay muchos factores que pueden alterar la apariencia de la diferencia de un par de colores, si consideramos “m” el objeto tomado como muestra y con “r” el que tomamos como referencia y tenemos en cuenta los valores colorimétricos



$L^*a^*b^*C^*h^*$  para cada color, la diferencia visual entre ellos se puede determinar mediante la siguiente ecuación:

*Ecuación 4.*

$$\begin{aligned}\Delta E &= \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} = \sqrt{(L_m^* - L_r^*)^2 + (a_m^* - a_r^*)^2 + (b_m^* - b_r^*)^2} = \\ &= \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta C^*)^2 + (\Delta H^*)^2} = \\ &= \sqrt{(L_m^* - L_r^*)^2 + (C_m^* - C_r^*)^2 + \left(2\sqrt{C_m^* \cdot C_r^*} \cdot \text{sen}\left(\frac{h_m^* - h_r^*}{2}\right)\right)^2}\end{aligned}$$

Teniendo en cuenta que el cerebro humano piensa en color con tres atributos perceptuales, la diferencia de color  $\Delta E$  es una contribución ponderada de las tres diferencias perceptuales parciales. Por tanto, será igual de importante el dominio del cálculo de la diferencia absoluta de color, como las diferencias relativas implicadas en la diferencia final observada. Teniendo en cuenta las variables  $L^*a^*b^*C^*h^*$ , podemos describir:

- Si  $\Delta L^* > 0$ , la muestra será más oscura que el estándar, y menos oscura si  $\Delta L^* < 0$ .
- Si  $\Delta a^* > 0$ , la muestra será más rojiza que el estándar, o más verdosa si  $\Delta a^* < 0$ .
- Si  $\Delta b^* > 0$ , la muestra será más amarillenta que el estándar, o más azulada si  $\Delta b^* < 0$ .
- Si  $\Delta C^* > 0$ , la muestra será más fuerte o más intensa que la estándar, o más débil si  $\Delta C^* < 0$ .

En los últimos años la CIE ha reestructurado la fórmula de diferencia del color incluyendo factores de peso para correlacionar mejor las diferencias visuales con las estimaciones numéricas. Esta nueva fórmula se representa en la siguiente ecuación:

*Ecuación 5.*

$$\Delta E_{94} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L^*}{k_L \cdot S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C^*}{k_C \cdot S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H^*}{k_H \cdot S_H}\right)^2},$$

con  $S_L = 1$ ,  $S_C = 1 + 0.0045 \cdot C_r^*$ ,  $S_H = 1 + 0.0015 \cdot C_r^*$

Donde todas las constantes  $k$  suelen valer la unidad en condiciones normales de visualización y prioridad en las tolerancias de color.

## Medida del color

En colorimetría lo que se pretende en la medida del color es llegar a conocer el comportamiento óptico del objeto, ya sea por reflexión o transmisión. En situaciones excepcionales, también se puede medir la distribución espectral de potencia radiante de un objeto autoluminoso. A partir de aquí, y siguiendo recomendaciones CIE, es importante acotar varios aspectos como son el tipo de geometría de medida y la elección del tipo de instrumento.

- Sobre la geometría de medida

No es lo mismo observar la apariencia de color de un material iluminado de forma direccional o de forma homogénea, como si la luz proviniera de todas las direcciones. Ni tampoco se apreciaría visualmente lo mismo, si el material siendo iluminado de forma fija, se observa en diferentes direcciones de mirada. Por ejemplo, esto mismo es lo que ocurre con materiales goniocromáticos (metalizados y perlados), que cambian bruscamente de color según la geometría de medida.

Para la medida del factor de reflectancia espectral de un objeto, se usan por recomendación CIE varios tipos de geometría: esfera integradora, y, 45/0 (Figura 9).

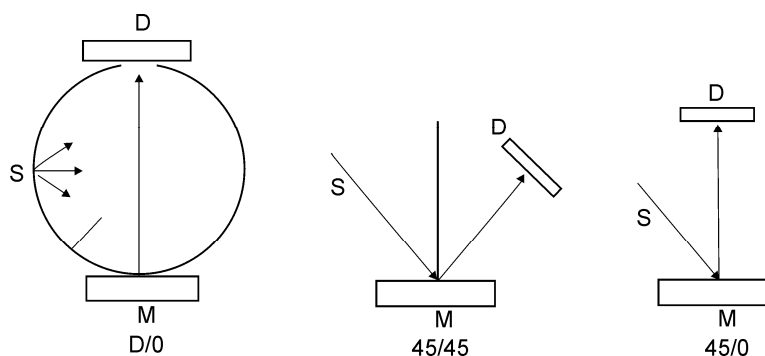


Figura. 9. Diferentes geometrías de medición.

Una esfera integradora permite iluminar la muestra de forma difusa, es decir, de forma igualada desde todos los ángulos, mientras que la luz reflejada se recoge en un ángulo aproximadamente perpendicular a la superficie de la muestra.

Las geometrías basadas en la esfera integradora se conocen como D/0 y 0/D. Es extremadamente difícil establecer la correspondencia de medidas tomadas entre instrumentos cuya geometría óptica no sea idéntica. Un aspecto importante en la medida del color concierne a la geometría de medida. Los resultados pueden mostrar alguna discrepancia, según como se ilumine la muestra y se coloque el detector con respecto a ésta, para la detección de la luz reflejada. Proporcionar los datos de geometría de medición, será por tanto, de vital importancia para evitar las posibles discrepancias entre las medidas llevadas a cabo por diferentes instrumentos.

Para la mayoría de las superficies, la reflectancia cambia según los ángulos de iluminación y observación. Las geometrías estándares establecidas por CIE (15:2004) son:

1. Iluminación difusa y toma de la luz en la normal (D/0).
2. Iluminación en la normal y toma de la luz difusa (0/D).
3. Iluminación a 45° y toma de la luz en la normal (45/0)
4. Iluminación en la normal y toma de la luz a 45° (0/45).

- Sobre tipos de instrumentos de medida del color

En función de sus prestaciones, y obviamente su coste, el mercado permite seleccionar varios tipos de instrumentos según la aplicación industrial. Así tenemos:

-Espectroradiómetros: Mide el espectro radiante de una fuente (o de un color opaco iluminado) y permite calcular valores triestímulo a partir de la distribución espectral de la muestra. Este instrumento está diseñado para medir cantidades radiométricas en función de la longitud de onda. Por tanto, con lo que respecta al color, este dispositivo servirá para determinar la distribución de la energía radiante espectral  $S(\lambda)$  de una fuente cualquiera, para calcular a partir de ahí, las coordenadas cromáticas.

-Espectrofotómetros: Instrumento diseñado para medir los factores de reflectancia espectral de un objeto. A partir de estas funciones y usando la base de datos (iluminante patrón, funciones de igualación, etc.) del ordenador acoplado, el aparato da directamente las coordenadas cromáticas del color en el sistema elegido. En general, es muy similar al espectroradiómetro, pero con el objetivo diferente de comparar para cada longitud de onda, la energía radiante incidente con la reflejada sobre el objeto.

-Colorímetro: Miden los valores triestímulo de forma más directa y funcionan usando tres filtros de amplio espectro. En consecuencia, los colorímetros no pueden proporcionar datos de reflectancia espectral, pero muchas veces son preferibles a los espectrofotómetros debido a su bajo coste de fabricación y facilidad de transporte. También utilizan una base de datos de iluminantes.

El principal problema en la construcción de estos instrumentos es la obtención de los filtros triestímulo, es decir, ajustar tres fotocélulas o fotomultiplicadores de forma que su respuesta sea proporcional, a lo largo del espectro visible, a los coeficientes de distribución  $\bar{x}(\lambda)$ ,  $\bar{y}(\lambda)$ ,  $\bar{z}(\lambda)$ .

Más sencillo de construir es un colorímetro de filtros, donde la energía radiante reflejada en el objeto pasa a través de uno de los tres filtros triestímulo X, Y, Z, e incide en la fotocélula provocando una respuesta proporcional al valor triestímulo correspondiente de la combinación objeto-fuente. Cada filtro triestímulo es una combinación de filtros

coloreados cuya función de transmitancia resultante, junto con la función de respuesta de la fotocélula, imita a una de las funciones de igualación de color de la CIE.

-Espectrofluorímetro [29]: Es un instrumento que realiza la medida de colores fluorescentes mediante doble monocromador. Estos instrumentos son capaces de distinguir entre la luz total reflejada y la contribución de la componente fluorescente.

Un instrumento de luminiscencia [30-31] consiste, de forma generalizada, en una fuente de luz, un filtro primario o un monocromador de excitación, una celda donde se coloca la muestra, un filtro secundario o monocromador de emisión, un fotodetector y un dispositivo para lectura de datos (Figura 10). En contraste con la instrumentación UV/VIS, se necesitan dos sistemas ópticos. El filtro primario o monocromador de excitación selecciona bandas de radiación de longitud de onda específicas de la fuente de luz y las dirige hacia la muestra de la celda. La luminiscencia resultante se aísla con el filtro secundario o monocromador de emisión y se dirige hacia el fotodetector que mide la intensidad de la radiación emitida.

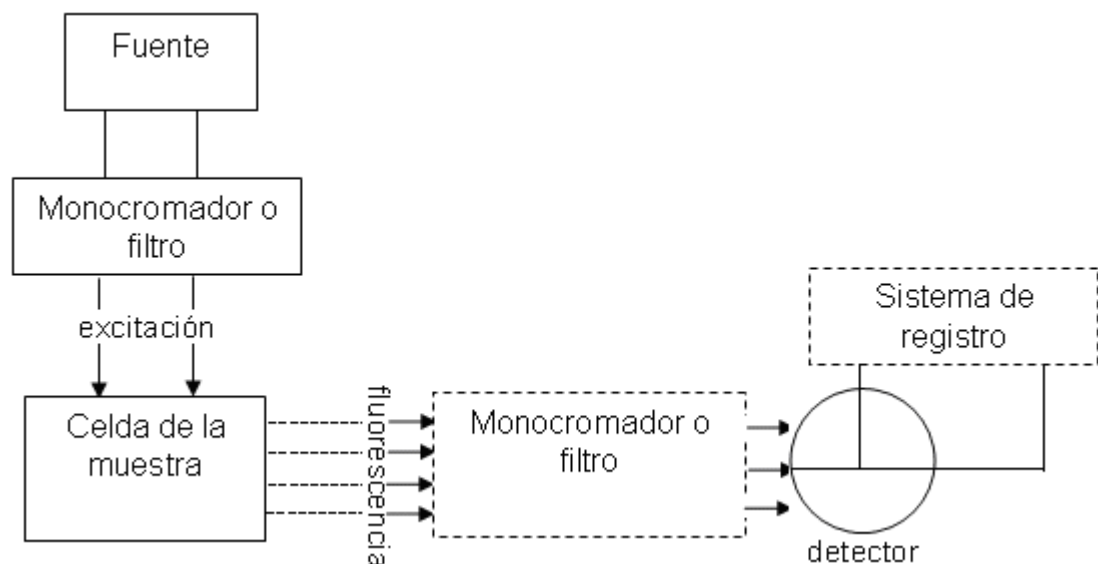


Figura 10. Componentes básicos de un espectrofluorímetro.

El prefijo “espectro” implica que en el instrumento debe utilizarse un monocromador dispersor, que suele ser el de excitación.

En los últimos años la utilización de materiales luminiscentes (fluorescentes y fosforescentes), han adquirido gran importancia en la industria en general, para poder producir materiales con colores brillantes. Los agentes blanqueadores fluorescentes son extensamente utilizados en detergentes, papel, etc, sobre todo en papel reciclado, con el fin de eliminar la apariencia amarillenta que tienen este tipo de materiales. El problema de la medida precisa de los colores fluorescentes radica en la utilización de fuentes de luz que se

usen. La diferente utilización de los diferentes iluminantes, es el factor que creará más incertidumbre a la hora de realizar una medida de colores fluorescentes correcta.

El modo de colocación de la muestra con respecto a la excitación y la emisión, es de gran importancia en este tipo de medidas.

Existen tres sistemas para iluminar y observar una muestra fluorescente:

- El método de los ángulos rectos (geometría de  $90^\circ$ ), donde el ángulo recto es el que forma la línea de excitación y de emisión, en concreto cada uno de ellas formará con respecto a la normal un ángulo de  $40^\circ/50^\circ$ . Este sistema de iluminación es el utilizado en este trabajo.
- El método frontal ( $37^\circ$ ).
- El método de traspaso (transmisión).

La geometría de  $90^\circ$  se emplea para soluciones de baja absorción, soluciones transparentes o casi transparentes [32-33].

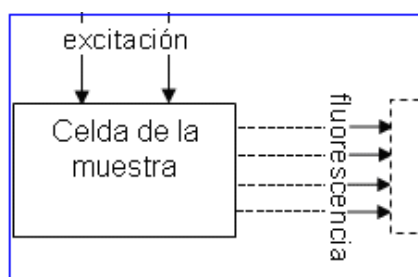


Figura 11. Sistema de medida en forma de T, con geometría  $90^\circ$  (excitación-emisión) para espectrofluorimetría analítica.

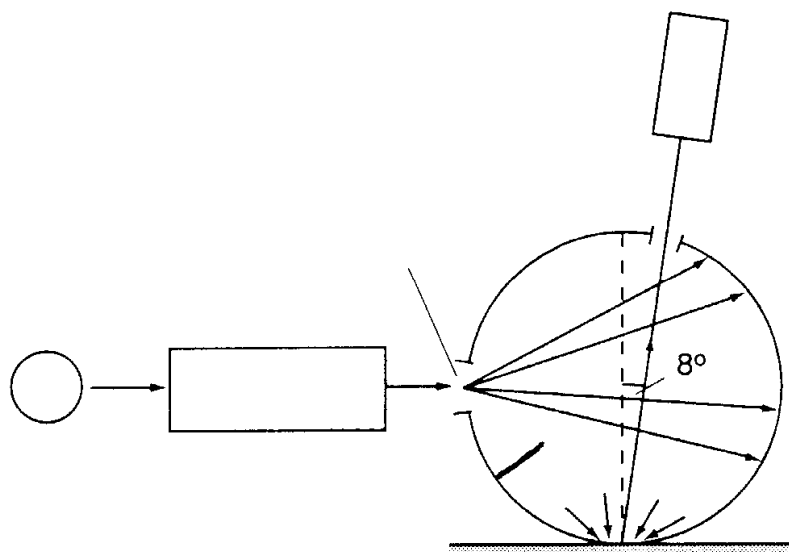


Figura 12. Esquema de incorporación de esfera integradora para la medida de colores luminiscentes en un instrumento de doble monocromador.

Con respecto a la iluminación, los factores primordiales que deben considerarse al seleccionar una fuente de luz para la instrumentación de luminiscencia son, la intensidad de la lámpara, la distribución de la radiación emitida y la estabilidad del espectro de emisión. Otro factor muy importante, es la relación de dependencia lineal entre la señal luminiscente y la intensidad de la radiación excitante, con lo que resulta más ventajoso utilizar una fuente, lo más potente posible.

En casi todos los espectrofluorímetros comerciales se utilizan lámparas de arco de Xe. Esta lámpara emite una radiación continua intensa y relativamente estable que se extiende desde 300 hasta 1300 nm, habiendo varias líneas de emisión intensas entre 800 y 1100 nm. La radiación espectral que se obtiene tiene una temperatura de color de aproximadamente 6,000 K.

Los monocromadores de rejilla [34] seleccionan las longitudes de onda, tanto de excitación como de emisión, con una exploración a lo largo de los 200 a 800 nm, que es la franja más útil para el estudio de la fluorescencia. Por lo general, los espectrofluorímetros incorporan monocromadores de rejilla de tipo Czerny-Turner con una focal ( $f$ ) de 0.25 m y aberturas de  $f/4$  o  $f/5$ . Ambos monocromadores usan rejillas con 600 ranuras/mm, biseladas (en el primer orden) para 300 nm, en la unidad de excitación y 500 nm en la de emisión. Se usan filtros para bloquear la luz difractada de orden más elevado. El esquema es el siguiente; un monocromador, el de excitación, está situado entre la fuente de luz y la muestra, y el de emisión, se coloca entre la muestra y el tubo fotomultiplicador. Para los análisis cuantitativos, se seleccionan las longitudes de onda para la excitación y para la emisión, y se compara las intensidades relativas de las fluorescencias de las muestras patrón (blanco) y problema. Para una buena selectividad espectral y para que sea posible resolver las estructuras finas, el monocromador de emisión debe poder resolver dos líneas con una separación de 1.0 nm.

Los instrumentos que miden características de la muestra sin una comparación continua con un patrón de referencia, como es nuestro caso, poseen las mismas desventajas principales que presentan en el registro de espectros de absorción con instrumentos de un solo haz. Si la fuente de luz es inestable y varía en intensidad, puede dar lugar a la aparición de picos falsos en el espectro. La variación de la sensibilidad del fotodetector con respecto a la  $\lambda$  es igualmente importante. A este tipo de instrumentos, se le aplica el término "sin corrección", debido a que los espectros de excitación y de emisión son una combinación de los espectros verdaderos de la muestra de ruidos instrumentales. Cuando se escanean los espectros de excitación, no se intenta mantener la intensidad constante, con lo que estos espectros son una combinación de los espectros de excitación reales, de la distribución espectral de la lámpara con respecto a las  $\lambda$  y la eficacia del monocromador de excitación relativa a la  $\lambda$ . De la misma manera, los espectros de emisión

son una combinación de los espectros de emisión real, la distribución espectral de la respuesta del detector y la eficacia del monocromador de emisión con respecto a la  $\lambda$ . En algunas regiones del espectro, los ruidos instrumentales resultan dominantes. A pesar de estas desventajas, es posible utilizar el espectrofluorímetro sin corrección para hacer análisis cuantitativos y usarse para comparaciones aproximadas de espectros con otros laboratorios y comparaciones directas en el mismo laboratorio.

Con respecto a las limitaciones instrumentales causadas por la inestabilidad de la fuente de Xe se eliminan usando la técnica de "relación de señales". Una pequeña fracción de la luz de excitación se dirige hacia el fotodetector de referencia, seleccionada inicialmente en base a su respuesta a un amplio rango de  $\lambda$ , en nuestro caso del blanco patrón. La luz emitida se aísla con un fotodetector de emisión, seleccionado en especial para que contenga un ruido de fondo bajo y una intensidad de señal alta. La señal de salida se amplifica en un fotomultiplicador de relación inversa. A medida que la radiación de excitación aumenta o disminuye debido a las variaciones de la lámpara de Xe se produce un aumento o una disminución proporcional en la fluorescencia relativa. La tarea de corrección recae sobre el detector de referencia, pues es el único componente del sistema con un intervalo dinámico y una rapidez de respuesta necesaria para monitorear y ajustar la señal generada por la radiación monocromática de excitación. Ya que la señal se monitorea después del monocromador de excitación, los espectros de excitación incluyen ya la compensación de las fluctuaciones de energía dependientes de la  $\lambda$ . Sin embargo, esta compensación no implica que se obtenga un espectro de excitación real corregido.

A medida que gira el interruptor óptico, toda la radiación queda bloqueada con respecto a uno u otro fotomultiplicador. En estas circunstancias, la señal que sale del detector bloqueado es la corriente de oscuridad inherente del detector. Las dos señales, ya separadas, se dirigen a un amplificador diferencial que sustrae la corriente de oscuridad y presenta únicamente la señal diferencial del fotómetro. De esta manera, se obtiene con más facilidad una señal diferencial tanto del tubo fotomultiplicador que analiza la corriente de excitación, como el tubo fotomultiplicador que mide la intensidad de la fluorescencia.

La sección óptica del instrumento está constituida por cuatro monocromadores de rejilla. Dos de ellos utilizados para dispersar la energía de excitación y los otros dos para analizar los espectros fluorescentes. Un filtro óptico, colocado entre la lámpara de Xe y el monocromador de excitación, evita la excitación de segundo orden cuando se utilizan  $\lambda$  de excitación de 400 nm o más. La doble monocromación reduce en gran medida la porción de luz parásita y además, permite usar rendijas de mayor magnitud para lograr la misma resolución que se obtiene con los monocromadores tradicionales con rendijas más estrechas. El uso de rendijas más anchas permite que pase más cantidad de luz a través del monocromador de excitación de la muestra. Esto constituye una gran ventaja cuando se

trabaja con muestras a concentraciones bajas, puesto que se dispone de un máximo de energía sin sacrificar la resolución.

#### 1.4 Medida de colores fluorescentes

En el caso de la medida de color de muestras fluorescentes [35-43], la energía radiante remitida por la muestra tiene siempre una frecuencia inferior que la correspondiente a la absorbida, lo que implica que la luz reemitida tenga una longitud de onda  $\lambda'$  más larga que la absorbida  $\lambda$ . Ya dijimos que se trataba de la ley de Stokes. ¿Qué influencia tiene este hecho en la medida del color?

Para calcular  $\rho(\lambda)$ , iluminamos tanto la muestra como el blanco de referencia con una  $\lambda$  determinada previamente por el monocromador. El detector registra la proporción de luz reflejada por la muestra respecto al blanco para esa  $\lambda$ . Si hacemos esto para cada  $\lambda$ , obtendremos  $\rho(\lambda)$  de la muestra. Sin embargo, si la muestra es fluorescente, esto nos conducirá a resultados erróneos, ya que iluminaríamos con una determinada  $\lambda$ , pero el detector no registraría la proporción de esa  $\lambda$  que refleja la muestra, sino de una  $\lambda'$ , tal que  $\lambda' > \lambda$ , producto de la fluorescencia de la muestra.

Para solucionar este problema hay que actuar de forma inversa. En vez de iluminar la muestra y el blanco con una  $\lambda$  preseleccionada por el monocromador, hay que iluminarlos con una fuente que emita en todo el rango del espectro visible y colocar el monocromador a la salida para que analice la luz reflejada. Por tanto se utilizará un iluminante policromático, el monocromador selecciona una  $\lambda$  de luz reflejada cuya energía radiante es registrada por el detector y tomada como referencia. Seguidamente es la muestra la que se ilumina por la fuente policromática, estando el monocromador sintonizado a la misma  $\lambda$  que antes, por tanto el detector determina la proporción de energía radiante de esa  $\lambda$  que, respecto al estándar, refleja la muestra. Repitiendo el proceso para cada  $\lambda$  del espectro visible que vamos sintonizando con el monocromador, se determina la curva de reflectancia espectral  $\rho(\lambda)$ . A partir de aquí se operará para calcular las coordenadas cromáticas.

El valor del flujo radiante de una muestra fluorescente a la longitud de onda ( $\lambda$ ) varía mucho dependiendo de la longitud de onda incidente ( $\mu$ ). Su valor es una función del flujo radiante absorbido a  $\mu$  y de la eficacia cuántica (excitación del material a esa longitud de onda en concreto). Si el material absorbe  $q_0$  (cuantos) a una longitud de onda  $\mu$  y emite  $q$  en la totalidad de la banda de emisión, la eficacia de excitación del material viene dado por  $q/q_0$ . Los cuantos ( $q_0$ ) absorbidos que no se transforman en fluorescencia se convierten en energía térmica. Muchos materiales fluorescentes tienen una eficacia de excitación que es casi constante en un amplio rango de  $\mu$ . En cambio esta eficacia disminuye cuando  $\mu$  cae en la banda de emisión.



El objetivo de la medición de color de un espectrofluorímetro es la obtención del factor de radiancia total del material  $\beta_T(\lambda)$  en el espectro visible para poder ser utilizado en el cálculo de las variables colorimétricas del objeto cuando es irradiado por una determinada fuente de luz. El valor obtenido por una muestra fluorescente debe llamarse, según CIE, factor de radiancia espectral total  $\beta_T(\lambda, S)$ , con los siguientes componentes

*Ecuación 6.*

$$\beta_T(\lambda, S) = \beta_R(\lambda) + \beta_L(\lambda, S)$$

$\beta_R(\lambda)$  - factor de radiancia reflejada.

$\beta_L(\lambda, S)$  - factor de radiancia luminiscente (que depende de la longitud de onda y de la distribución espectral de la fuente (S).)

Con lo cual el factor de radiancia total, será una función de  $\lambda$  y de S. Si las medidas se realizan con un espectrofotómetro basado en una geometría 0/D, los valores no son ni factores de reflectancia espectral ni de radiancia espectral, de acuerdo con las definiciones de la CIE, pues la fluorescencia impide que sea factor de reflectancia. Tampoco será factor de radiancia ya que el ángulo de observación vale  $2\pi$  en vez de 0. En este caso el único término permitido es el de valores de reflectómetro, que la CIE recomienda para aquellos valores obtenidos en un instrumento de medida.

El método más utilizado para determinar la radiancia total de un objeto fluorescente, es el de la *Óptica inversa*. Una fuente S irradia un objeto fluorescente y también el patrón de trabajo (blanco no fluorescente), cuyo factor de radiancia espectral es conocido. La luz reflejada, pasa a través de patrones de interferencia muy estrechos, que simplifica la estructura del aparato. Los espectrofluorímetros más modernos incorporan mejoras en el tiempo de medida, para que no se produzca un calentamiento excesivo de la muestra. El método del doble monocromador es el método considerado como referencia para determinar las propiedades colorimétricas de los materiales fotoluminiscentes. En este método la medida se realiza con dos monocromadores por separado uno encargado de la radiación y el otro, encargado de la detección. El primer monocromador (monocromador de excitación) ilumina la muestra de manera monocromática aunque el espectro del iluminante es policromático. El segundo monocromador es del tipo detector o emisor, analizador de la radiación de salida.

El monocromador analiza las intensidades radiantes del patrón y del objeto fluorescente. Esta luz pasará a través de filtros de interferencia estrechos y a continuación por el sistema detector, por tanto el cociente entre ambos factores define el factor de radiancia total de los colores fluorescentes.

Los factores de radiancia totales también dependen de la fuente de iluminación  $S$  que se ha utilizado para irradiar el objeto. Hay que destacar que en las muestras fluorescentes los valores del factor de radiancia pueden ser superiores al valor del 100% estándar ( $\beta_R$ ) viene determinada por la exploración sincronizada de los dos monocromadores en la misma longitud de onda. La reflectancia luminiscente ( $\beta_L$ ) se obtiene fijando una longitud de onda  $\mu$  incidente y registrando, a través del segundo monocromador todas las  $\lambda$  del espectro de emisión. Este proceso se repite para cada una de las longitudes de onda del espectro de excitación ( $\mu$ ). Los resultados se representan en una matriz bidimensional  $D(\mu, \lambda)$ , que se denomina Matriz de Donaldson (Figura 13).

300~	430	440	450	460	470	480	490	500	510~	~780
440		0.046475								
450			0.046363							
460				0.047336						
470					0.047867					
480	0.003761	0.00446	0.005088	0.004754	0.001302	0.058661				
490	0.011325	0.013698	0.015199	0.014556	0.012131	0.005584	0.09798			
500	0.024563	0.027368	0.02929	0.029882	0.028557	0.026865	0.012881	0.183529		
510	0.039665	0.043669	0.044939	0.046761	0.046878	0.04396	0.038887	0.012886	0.291216	
520	0.036722	0.040335	0.04196	0.042792	0.041618	0.04063	0.03723	0.026923	0.002903	
530	0.02523	0.027876	0.030193	0.030422	0.028911	0.028284	0.026957	0.019357	0.008819	
540	0.019142	0.021393	0.023585	0.023488	0.021749	0.020803	0.020318	0.014466	0.006898	
550	0.011116	0.013939	0.01432	0.015269	0.012544	0.012127	0.012329	0.009582	0.004307	
560	0.007446	0.009776	0.009541	0.010181	0.008627	0.007398	0.0081	0.006342		
570	0.003724	0.005074	0.006	0.007116	0.00506	0.003825	0.004411	0.002882		
580	0.001602	0.002742	0.003835	0.004281	0.00234	0.001341	0.003135	0.001463		
590~	~780	0.00132	0.003033	0.003063						

Figura 13. Ejemplo de representación de la matriz de Donaldson.

Los componentes de la diagonal ( $\mu=\lambda$ ) son los factores de reflexión reflejado  $\beta_R(\lambda)$ . Los elementos de fuera de la diagonal son los factores de radiación luminiscente a cada longitud de onda  $\beta_L(\lambda, S)$ . En la práctica se utilizan intervalos de longitud de onda de 5 nm, 10 nm o 20 nm ya que la medida y el cálculo de la matriz son bastante largos.

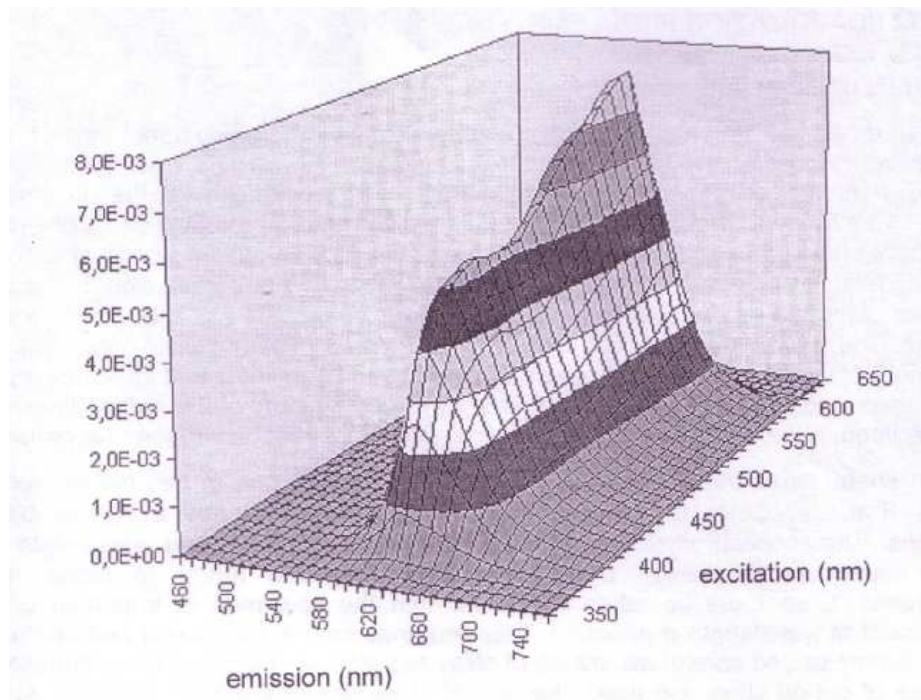


Figura 14. Representación tridimensional de la matriz de Donaldson.

Por tanto, el factor de radiación luminiscente de la muestra se obtiene por la combinación de la distribución espectral del iluminante  $E_{st}(\mu)$  y el sumatorio de todas las longitudes de onda  $\mu$  en la banda de excitación, según la fórmula:

*Ecuación 7.*

$$\beta_T(\lambda) = \beta_R(\lambda) + \beta_L(\lambda), \quad \text{con} \quad \beta_L(\lambda) = \frac{\sum_{\mu} E_{st}(\mu) \cdot \beta_{L\lambda}(\mu) \cdot \Delta\mu}{E_{st}(\lambda)}$$

$$X = k \sum_{\lambda} E_{st}(\lambda) \cdot \beta_T(\lambda) \cdot \bar{x}(\lambda) \cdot \Delta\lambda$$

$$Y = k \sum_{\lambda} E_{st}(\lambda) \cdot \beta_T(\lambda) \cdot \bar{y}(\lambda) \cdot \Delta\lambda, \quad \text{con} \quad k = \frac{100}{\sum_{\lambda} E_{st}(\lambda) \cdot \bar{y}(\lambda) \cdot \Delta\lambda}$$

$$Z = k \sum_{\lambda} E_{st}(\lambda) \cdot \beta_T(\lambda) \cdot \bar{z}(\lambda) \cdot \Delta\lambda$$

La ventaja de este método es que proporciona una caracterización muy completa del color de materiales fluorescentes sin las imprecisiones que nos daría con otros métodos, como el sistema con un único monocromador.

### 1.5 El reto actual de la medida de colores fluorescentes

En los últimos años, el incremento en el mercado de colorantes fluorescentes, agentes blanqueadores en todo tipo de industria, papel, plásticos, tela, etc, demandan

procedimientos estándar de la medida y apariencia de estos colores, para poder ser caracterizados.

Los primeros estudios con materiales luminiscentes para su caracterización colorimétrica fueron desarrollados por dos comités técnicos de la CIE: CIE TC 2.3 “Photometric Characteristics of Materials” y CIE TC 2-08 “Luminiscence Intercomparison” [43]. Entre los años 1979 y 1983, cuatro laboratorios de todo el mundo realizaron la medida de siete muestras fluorescentes utilizando una fuente de luz D65 y dos geometrías de medida, una bidireccional y otra con esfera integradora. Las diferencias de color que aparecieron entre los cuatro laboratorios eran del orden de 3.0 y 4.2 en el espacio de color CIELAB.

Con estos resultados se llegó a la conclusión que la medida de color mediante doble monocromador, es la más fiable, aunque resulta muy costosa y laboriosa en su manejo. La instrumentación y metodología son altamente complejos, de ahí que solamente existan a nivel mundial en laboratorios científicos, 4 espectrofluorímetros bidireccionales, con el fin de la caracterización del color (Tabla 1).

Hasta el año 1998, solamente existían estos cuatro instrumentos. Hoy en día, se han desarrollado más instrumentos comerciales de este tipo, orientados a aplicaciones multidisciplinarias, por esta razón se denominan espectrofluorímetros analíticos. Aunque dado la amplia gama de aplicaciones posibles, se encuentran de manera modular teniendo que adquirir complementos específicos dependiendo del fin último de uso, con lo cual lo encarece más si cabe. El espectrofluorímetro analítico adquirido por el Grupo Visión y Color tiene la posibilidad de incorporar en el módulo primitivo una esfera integradora para caracterizar colores, aunque no disponemos de ella. Según la norma CIE 182:2007 [32], existen aún muchos flecos pendientes que deben ser revisados en un futuro y que plantean serias dudas sobre la fiabilidad y trazabilidad a nivel mundial de cualquier medida estandarizada de colores fluorescentes. Los principales retos a superar en la calibración de espectrofluorímetros analíticos comerciales, como veremos en nuestro trabajo, radican en la medición con diferentes instrumentos, la fuente de luz utilizada, las diferentes muestras luminiscentes, y sobre todo, la geometría de medición.

<p><b>Bundesanstalt für Materialforschung und-Prüfung (BAM)</b> Configuración: 45°/0°; doble monocromador. Lámpara de Xe de 300W. Rango espectral: 300nm a 800nm. Resolución espectral: seleccionable (1nm, 5nm o 10nm)</p>
<p><b>National Physical Laboratory (NPL)</b> Configuración: 0°/45° o 45°/0°; Doble monocromador. Lámpara de Xe. Rango espectral: 320 a 780nm en la excitación; 380 a 780nm en la detección. Resolución espectral: 10nm.</p>

<p style="text-align: center;"><b>National Research Council (NRC)</b>  Configuración: 45°/0°; con iluminación central.  Lámpara de Xe de 300W.  Rango espectral: 250 a 1050nm (tanto en la excitación como en la detección).  Resolución espectral: 5nm.</p>
<p style="text-align: center;"><b>National Measurement Institute (NIST)</b>  Configuración: 0°/45° o 45°/0°; Doble monocromador.  Lámpara de Xe.  Rango espectral: 320 a 780nm en la excitación; 380 a 780nm en la detección.  Resolución espectral: 10nm.</p>

Tabla 1. Laboratorios internacionales que caracterizan colores fluorescentes.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo consiste en presentar los pasos preliminares llevados a cabo para la calibración de un espectrofluorímetro analítico modular adquirido recientemente por el Grupo de Visión y Color de la Universidad de Alicante para la medida y caracterización del color en materiales fluorescentes. Siguiendo recomendaciones de la CIE (CIE 182:2007) [32], esta calibración constará de varios pasos: cálculo del ruido de fondo, medida de un blanco patrón no fluorescente, linealidad, etc. Tras esta calibración, será posible obtener y representar los factores de radiancia luminiscente biespectral, reflejada y total de cualquier muestra fluorescente. De esta forma, será posible la caracterización del color bajo cualquier observador, iluminante y espacio uniforme de color. Por tanto, será posible la caracterización de colores fluorescentes para su correcta formulación, el estudio de gamas de colores fluorescentes, etc.

Para la calibración se consideran tanto muestras fluorescentes como no fluorescentes. En el caso de las muestras no fluorescentes, los pasos a seguir son:

1. Medida del blanco patrón
2. Medida del ruido de fondo del instrumento que posteriormente será sustraído del resultado final de reflectancia.
3. Cálculo de la reflectancia de las muestras.
4. Comparación entre los datos proporcionados por el fabricante de las muestras y los datos experimentales.

En el caso de las muestras fluorescentes, se realizarán los mismos pasos iniciales. Pero además, construiremos la matriz de Donaldson, característica importante de los materiales fluorescentes tal como se ha introducido en capítulos anteriores [44-50]. Posteriormente, la representaremos de manera tridimensional para una mejor visualización. También, realizaremos un estudio de apariencia del color con estas muestras, comparando los resultados con y sin contribución de la componente luminiscente.

### 3. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES UTILIZADOS

En este capítulo se explica detalladamente el instrumental utilizado para la realización de este trabajo. Primeramente se realizará una descripción de todos los componentes del espectrofluorímetro. Seguidamente se explicará el funcionamiento del software y se hará una descripción de las muestras que hemos utilizado para la calibración.

#### 3.1 Descripción del espectrofluorímetro analítico utilizado

El instrumento que pretendemos calibrar en este trabajo de investigación es un espectrofluorímetro modular (Figura 15) de la empresa PTI ( [www.pti-nj.com](http://www.pti-nj.com) ), modelo QM3 PH, que permite añadirle otros accesorios para adaptarlo a múltiples aplicaciones en biomedicina, ciencia de materiales, etc. A continuación, extraemos algunos detalles de sus prestaciones técnicas:

- Marca PTI, modelo QM3 PH.
- Objetivo: medida de fluorescencia en estado estacionario y fosforescencia.
- Relación señal ruido 3000:1 para banda Raman del agua ( $\text{Ex}=350$  nm, rendija de 10 nm, tiempo de integración de 1 s).
- Límite de detección de 50 femtomolar de fluorescencia en OHNa.

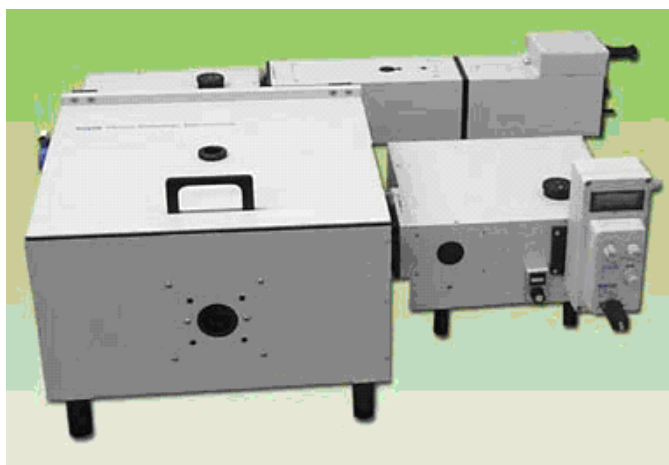


Figura 15. Espectrofluorímetro PTI, modelo QM3 PH.

De acuerdo con esta descripción técnica preliminar, pasamos a continuación a detallar sus componentes ópticos básicos: fuente de luz, monocromadores, compartimento de muestra, detector, dispositivo de salida y software de visualización y tratamiento de datos medidos.

#### Fuente de luz

Este espectroscopio tiene una fuente de luz pulsada de una lámpara de Xe de 200 a 2000 nm de rango espectral, con lo cual la muestra sólo está expuesta a la luz el 0,03% de

la duración total del estudio. Estos instrumentos son muy útiles en ensayos de cinética fotosensible y de muestras biológicas. Esta lámpara de Xe combinada con un detector de entrada, se utiliza para determinación de espectros de fluorescencia, introduciendo un software de adquisición de datos. Para una correcta medida, el instrumento previamente realiza una corrección necesaria por el uso de la lámpara de Xe. Todas las fuentes de luz emiten radiación que no es de igual intensidad en todo el espectro de salida, y esto puede conducir a errores en la medición del espectro de excitación. Los datos deben ser corregidos para esta discrepancia.

Durante el experimento, una parte del haz de excitación es desviada antes de llegar a la muestra. Esta fracción de fotones se mide y se corrige a continuación. El detector de referencia a continuación, proporciona una salida corregida que es independiente de las características de excitación o de cualquier fluctuación temporal de la intensidad de la lámpara, lo que garantiza una excelente estabilidad.

Un fenómeno similar se da con los datos de emisiones. Dado que la eficiencia en la detección de la óptica, rejillas, espejos y el detector no es equivalente en todas las longitudes de onda, algún tipo de corrección se debe realizar para tener en cuenta estas variaciones. Por lo general, el canal de emisión se calibra en la fábrica con una fuente de luz conocida como un estándar de NIST. Esta información se utiliza para construir un archivo de corrección, que luego se almacena localmente en el equipo.

De la corrección se obtiene el verdadero espectro de emisión corregido. Esta corrección se puede realizar en tiempo real o se pueden recuperar en el análisis posterior de los datos sin corregir.

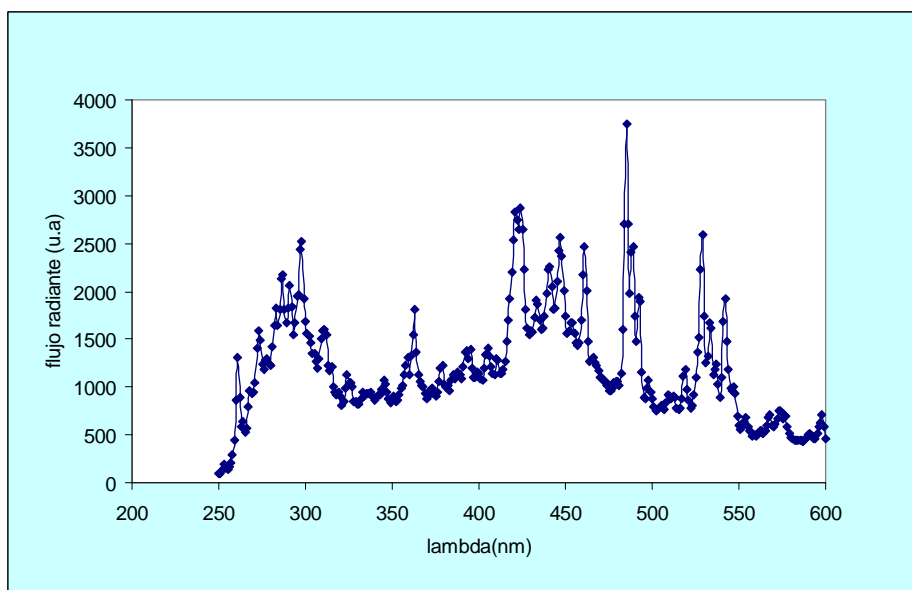


Figura 16. Espectro de la lámpara de Xe proporcionado por el fabricante.



## Monocromadores

Los espectroscopios de filtro más sencillos utilizan filtros fijos que seleccionan las  $\lambda$  de las radiaciones tanto excitatorias como emitidas. Los filtros de emisión deben ser capaces de filtrar la luz dispersada por el efecto Rayleigh de la muestra y cualquier dispersión Raman.

Este instrumento cuenta con filtros de interferencia continua, tanto de excitación como de emisión. La mayoría de instrumentos modernos de este tipo utilizan redes de difracción monocromáticas con el fin de seleccionar las  $\lambda$ .

QuantaMaster tiene una resolución elevada debido a la posibilidad de añadir una gran cantidad de rejillas para llegar a una resolución espectral de hasta 0,2 nm de separación en las regiones del UV y del visible.

Los dos monocromadores con que cuenta el instrumento, son del tipo Czerny-Turner de 200 mm de distancia focal, red de difracción de 1200 l/mm, o 5 nm de resolución, uno para la excitación óptica y otro para la recogida de la emisión luminiscente, ambas con rendijas variables monitorizadas y controladas por ordenador.

La cantidad de difusión de la luz en el instrumento determinará también la calidad en las medidas. Este instrumento cuenta con un sistema óptico que reduce al mínimo la luz dispersada, esto permitirá medir más exactamente la fluorescencia real que presente la muestra a estudiar. Este instrumento es capaz de rechazar la luz parásita gracias a la presencia de los dos monocromadores.

## Detectores

La mayoría de espectroscopios fluorescentes utilizan como detector tubos fotomultiplicadores. Normalmente se utilizan dos tubos para poder recorrer el espectro del UV al visible. El tipo S5 puede ser utilizado para detectar fluorescencia a 650 nm, y en el caso de tener que medir  $\lambda$  más largas deberemos recurrir a un segundo tubo sensible al rojo.

La sensibilidad del fotomultiplicador vendrá determinada por la corriente oscura y este efecto puede ser minimizado por un sistema de enfriamiento, ya que la corriente oscura se genera por activación térmica. La respuesta espectral de los fotomultiplicadores depende de la  $\lambda$ .

QuantaMaster cuenta como detector un tubo fotomultiplicador (PMT) de la marca Hamamatsu, modelo R928, con opción de una salida analógica o digital, siendo posible personalizar la modalidad dependiendo de las características del estudio. Este fotomultiplicador será sensible al rango espectral 200-900 nm.

### Compartimento de las muestras

Este compartimento es flexible, tanto para las muestras sólidas como para las líquidas. En concreto, el soporte de sólidos puede rotar  $360^\circ$ , posee capacidad de desplazamiento lateral y el área de medida es de aproximadamente  $10 \times 8$  mm.

Según muestra la Figura 16, la configuración de la geometría de medida no puede ser directamente ni  $45^\circ/0^\circ$  ni obviamente de esfera integradora (aunque está incluida en la posibilidad de los accesorios). Por tanto, la colocación de la muestra en forma de T, con una relación angular fija de  $90^\circ$  entre los haces de excitación y emisión, será tal que permita balancear diversas geometrías especulares de medida diferentes alrededor de la geometría especular  $45/45$  sobre la normal de la superficie de la muestra. Ejemplos:  $60^\circ/30^\circ$ ,  $30^\circ/60^\circ$ ,  $15^\circ/75^\circ$ ,  $75^\circ/15^\circ$ . En nuestro caso hemos utilizado una geometría de media  $40^\circ/50^\circ$ .

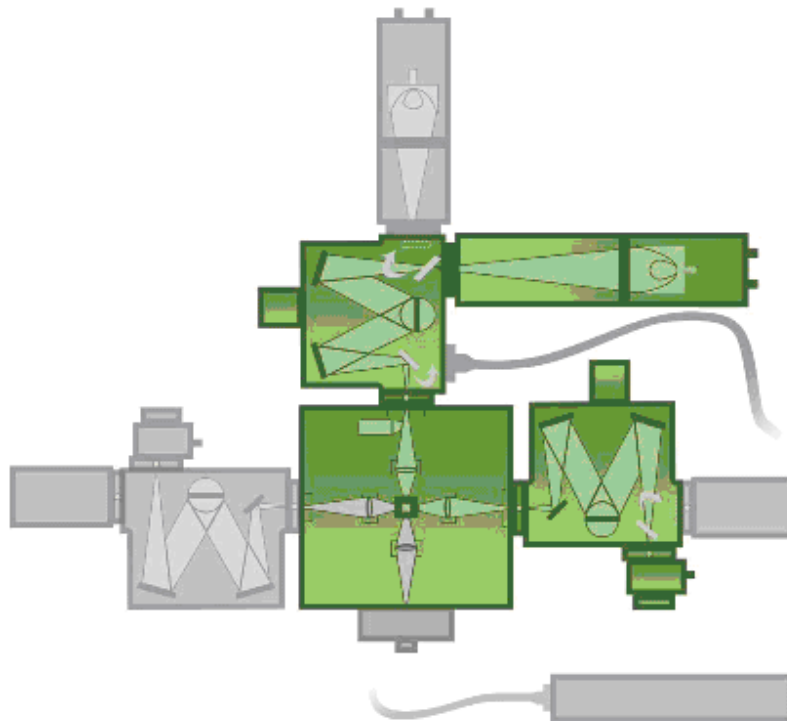


Figura 17. Esquema del diseño básico modular (en verde) y accesorios posibles (en gris) para diversas aplicaciones de fluorescencia en estado estacionario.

### Dispositivo de salida

La señal de salida del detector es mostrada y amplificada en un dispositivo de lectura o en una pantalla digital.

Las pantallas digitales son más sensibles y ajustables en su interpretación. Se mejora la precisión con un dispositivo que valora la medición estable durante un periodo de tiempo pequeño. También se incorporan microprocesadores que son compatibles con una impresora para evitar errores en la transferencia de datos.

La sensibilidad de este instrumento es elevada. Como sensibilidad se entiende la relación existente entre señal/ruido. Este valor será muy importante ya que consigue resultados muy exactos incluso en concentraciones muy bajas. De esta manera se puede ahorrar bastantes costes reduciendo el tamaño de la muestra.

### Software

El software Felix32 se utiliza para la recogida y posterior análisis de muestras de fluorescencia. Funciona bajo Windows 98, 2000 o XP y su interfaz es muy similar a la de programas como Word o Excel.

Felix32 controla la recogida de datos y ofrece una gran variedad de herramientas para el análisis de muestras de fluorescencia. De este modo, los resultados pueden presentarse en varios formatos, según las preferencias y la clase de experimento del usuario. Además, los resultados pueden exportarse a otros programas Windows con una gran facilidad.

- Data Acquisition (recogida de datos)

Desde el menú Acquisition podemos definir y ejecutar los experimentos de fluorescencia. Los diversos ítems del menú se refieren a técnicas básicas de representación, como por ejemplo, muestras de "excitation wavelength", "emission wavelength", "excitation ratios", sólo accesibles desde este menú. Asimismo, podemos guardar los resultados para definir la presentación de los mismos.

- Excitation Ratio (ratio/índice/proporción de excitación)

Este script se utiliza para experimentar determinaciones de iones ultracelulares como puedan ser Fura-2 para el calcio o BCECF para el pH. La fuente de excitación para este experimento debe alternarse entre dos diferentes longitudes de onda de excitación. La intensidad de emisión de estas longitudes se calcula en este script. El ratio es proporcional a la concentración de iones durante la investigación.

Para la ejecución de este script deberemos introducir manualmente las longitudes de onda de excitación 1 y 2 en las cajas de texto correspondientes, así como la longitud de onda de emisión. La máquina alternará ambas longitudes de onda de excitación dependiendo del índice de alternancia del tipo de lámpara. Si la máquina dispone de dos monocromadores de emisión, Felix32 solicitará dos longitudes de onda de emisión.

- Emission Ratio (ratio de emisión)

Este script se utiliza para realizar experimentos como Indo-1 o SNAFL. En este experimento se utiliza una única longitud de onda de excitación constante y dos longitudes de onda de emisión. En este experimento se medirá la intensidad de emisión en ambas longitudes de onda de emisión y se calculará el ratio de estas intensidades. El ratio será proporcional a la concentración de iones.

Aquí deberemos introducir tanto la longitud de onda de excitación como las longitudes de onda de emisión entre las que alternará la máquina.

- Excitation Scan (exploración de excitación)

En este script podremos explorar el monocromador de excitación entre dos longitudes de onda al mismo tiempo que se fija el monocromador de emisión. La intensidad de emisión se mide en función de la longitud de onda de excitación. Debido a la naturaleza de la fluorescencia, la longitud de onda de emisión se fija a una longitud de onda más larga que la de excitación.

Aquí deberemos introducir las longitudes de onda de excitación inicial y final en las cajas de texto correspondientes, así como la longitud de onda de emisión (si la máquina tiene dos monocromadores de emisión se solicitarán dos). Se nos mostrará la longitud de la exploración.

- Emission Scan (exploración de emisión)

Aquí la longitud de onda de emisión se explora entre dos longitudes de onda mientras se especifica el monocromador de excitación. La intensidad de emisión se mide en función de la longitud de onda de excitación. Debido a la naturaleza de la fluorescencia, la longitud de onda de excitación se fija a una longitud de onda más corta que la longitud de onda de emisión.

Aquí deberemos especificar la longitud de onda de excitación y las longitudes de onda de emisión inicial y final. Si la máquina viene con dos monocromadores de emisión, se solicitarán dos longitudes de onda de emisión. Se mostrará la longitud de la exploración. Si introducimos la longitud de onda inicial y la longitud, Felix32 calculará la longitud de onda final correspondiente de acuerdo con los parámetros introducidos.

- Synchronous Scan (exploración sincronizada)

En este scrip los monocromadores de excitación y emisión se explorarán simultáneamente con una diferencia de longitud de onda constante entre ellos. De esta manera podremos obtener muestras complejas de excitación o emisión.

Aquí se deberán introducir los rangos de longitud de onda de excitación en las cajas de texto correspondientes, así como los rangos de longitud de onda de emisión. Si la máquina viene con dos monocromadores de emisión, Felix32 solicitará dos rangos.

También se deberá introducir los rangos de escaneo en nanómetros, los cuales pueden también ser calculados si se introduce sólo uno.

### **3.2 Descripción del proceso de medida vía software de control**

Según las prestaciones que nos ofrece el instrumento, se calcula de manera separada la radiancia reflejada y la radiancia luminiscente, a través de 2 macros con diferentes características diseñadas específicamente a tal fin.

Como ya hemos dicho anteriormente, el factor de radiancia reflejada  $\beta_R$  viene determinado por la exploración sincronizada de los dos monocromadores en la misma longitud de onda.

Para su exploración se ha diseñado una Macro específica que determinará esta condición.

#### MACRO 1. TIMEBASED (Figura 17, izquierda)

En el diseño de esta macro, se fijan las longitudes de onda de emisión y excitación, que serán fijas durante todo el experimento. La intensidad emitida se mide en función del tiempo.

Se fija la longitud de onda con que se quiere iniciar la excitación y se elige el rango de emisión.

#### MACRO 2. PHOSPHORESCENCE TIMEBASED: LASER (Figura 17, derecha)

En esta macro, debemos seleccionar en otro menú el tamaño de las rendijas y el tiempo (frecuencia) del escaneo.

Tiempo- En el caso de la fluorescencia es importante el tiempo de integración ya que se presenta principalmente en los primeros 5 a 10  $\mu\text{s}$ . El pulso de excitación y el tiempo de integración se eligen para maximizar la sensibilidad de la medida.

Tamaño de las rendijas- Se trata del número de pulsos registrados por cada punto de exploración. El tamaño de las rendijas hará que mejore la relación señal/ruido, a costa del tiempo de integración.

Frecuencia- Esto determinará la frecuencia de disparo del láser, con un máximo de 20 Hz. Frecuencias altas pueden mejorar el tiempo de resolución, mientras que el consumo de nitrógeno aumenta y decae la energía por pulso. Las frecuencias más bajas se suelen utilizar cuando el tiempo de medida es largo.

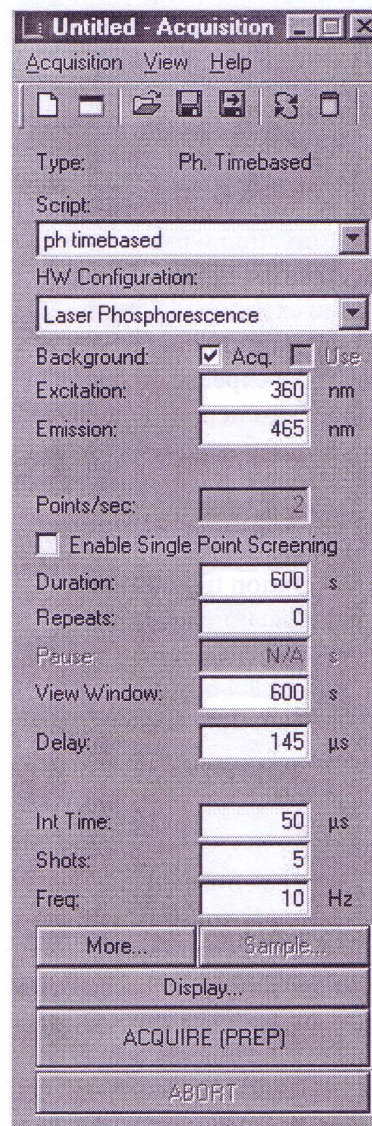
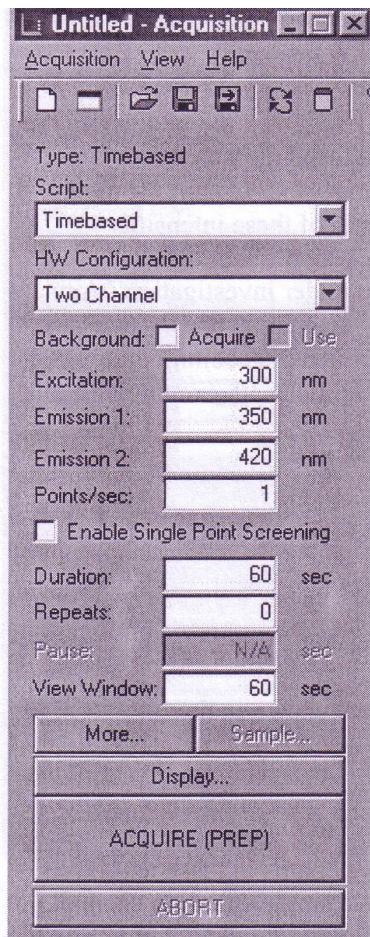


Figura 17. Macro muestras no fluorescentes (macro 1) Macro muestras fluorescentes (macro 2).

Con esta descripción general del instrumento y su uso queda pendiente para otra sección la recogida de los datos espectrales medidos y su transformación matemática según norma CIE (182:2007) para la calibración final del instrumento como un espectrofluorímetro capaz de medir y caracterizar objetos fluorescentes.

### 3.3 Patrones de calibración y muestras de calibración

Para la calibración de este instrumento se han usado patrones y muestras de reflectancia, incluso luminiscentes, disponibles en catálogos especializados de la empresa Labsphere ( <http://www.labsphere.com/> ). En concreto, el blanco patrón no fluorescente y mate será de tipo halon (Figura 18), las muestras han sido medidas por el fabricante con un espectrofotómetro dotado con una esfera integradora, utilizando una geometría de medición de 8°/d, basada en las normas del instituto internacional de estandarización (NIST).

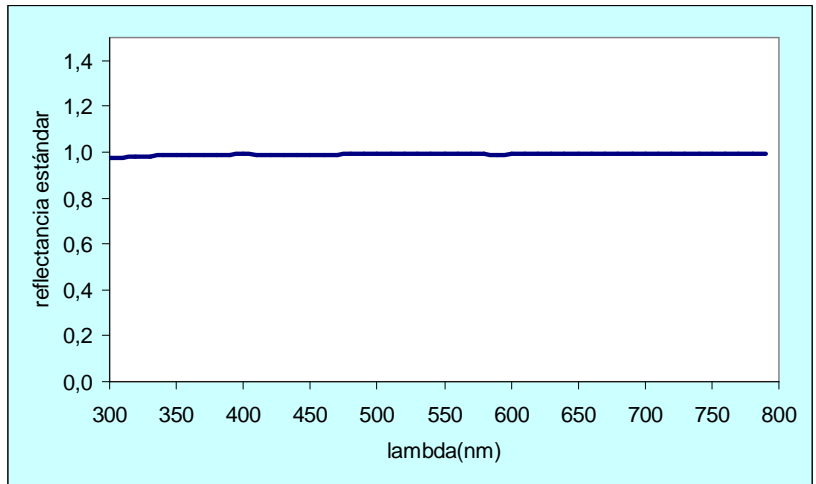


Figura 18. Factor de reflectancia reflejada del blanco patrón con los datos proporcionados por el fabricante.

### Muestras no fluorescentes

Para el calibrado de la escala de radiancia o linealidad se ha adquirido un conjunto de 8 muestras Spectralon altamente lambertianas en su rango espectral, es decir, casi espectralmente planas, con factores de reflectancia comprendidos entre el 99% (blanco patrón) y 2% (negro).



Figura 19. Caja de muestras no fluorescentes.

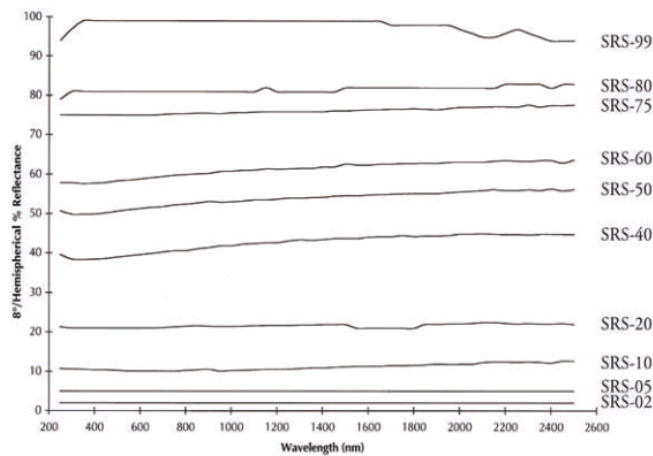


Figura 20. Factor de reflectancia de las muestras no fluorescentes según los datos del fabricante.



Todas las pruebas de calibración de reflectancia se realizan en el Laboratorio de Espectroscopía de Reflectancia en Labsphere. Los estándares utilizados en estas pruebas se atribuyen al Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST)( <http://www.nist.gov/index.html> ).

Las normas de reflectancia difusa Spectralon están disponibles individualmente y en grupos. Consisten en un blanco difuso estándar y una selección de muestras de gris difuso. Cada estándar se proporciona con reflectancia difusa completa (de 250 – 2500 nm).

Según el certificado de calibración que nos proporciona el laboratorio Labsphere las condiciones de medida de estas muestras patrón fueron:

- Uso de esfera integradora.
- Geometría 8°/d, basada en las normas del instituto internacional de estandarización (NIST).
- Uso del espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 119 de la serie (#1035), equipado con un accesorio de esfera integradora de la serie (#6236).
- Temperatura de la sala a la que se realizó la medición 23°C.
- Incertidumbre en la medida alrededor de los 0.005 nm en el caso del rango espectral de 300-2200 nm. Y de 0.020 en el caso del rango entre 250-2500 nm.

El laboratorio recomienda comprobar el espectro de las muestras un año después de su adquisición. Se certifica la fecha de calibrado en estas condiciones por el laboratorio Labsphere en la fecha 26/05/2009.

Vemos que en este caso el laboratorio nos ha especificado claramente cuáles han sido los estándares de medida, según qué normas, y cuáles han sido los instrumentos involucrados en ella. Como ya hemos dicho anteriormente, nuestra medición se ha realizado con otro instrumento y con otra geometría de medida ya que no se dispone de esfera integradora.

### Muestras fluorescentes

De la misma empresa citada anteriormente también se ha adquirido un conjunto de 4 patrones fluorescentes. Según la información facilitada por el laboratorio, las muestras fluorescentes presentan una estabilidad y durabilidad elevada con respecto a otros materiales, como el papel, textil, etc., en cuanto al fenómeno de la fluorescencia. Especifica claramente que las muestras no están calibradas.

Las muestras están ordenadas en orden creciente de escalado, en la que el número más alto representa la muestra con mayor nivel de blancura. Recomendamos su uso para:

- Reconstrucción de la reflectancia total de muestras fluorescentes.



- Calibración de colorímetros y espectrofluorímetros. Aunque no han realizado la calibración, con lo cual no tenemos datos que demuestren la medida de las muestras.

Nuestras muestras son:

1. USFs-461 Blue/WHite Fluorescence
2. USFs-336 orange Fluorescence
3. USFs-210 green Fluorescence
4. USFs-200 Blue/WHite Fluorescente

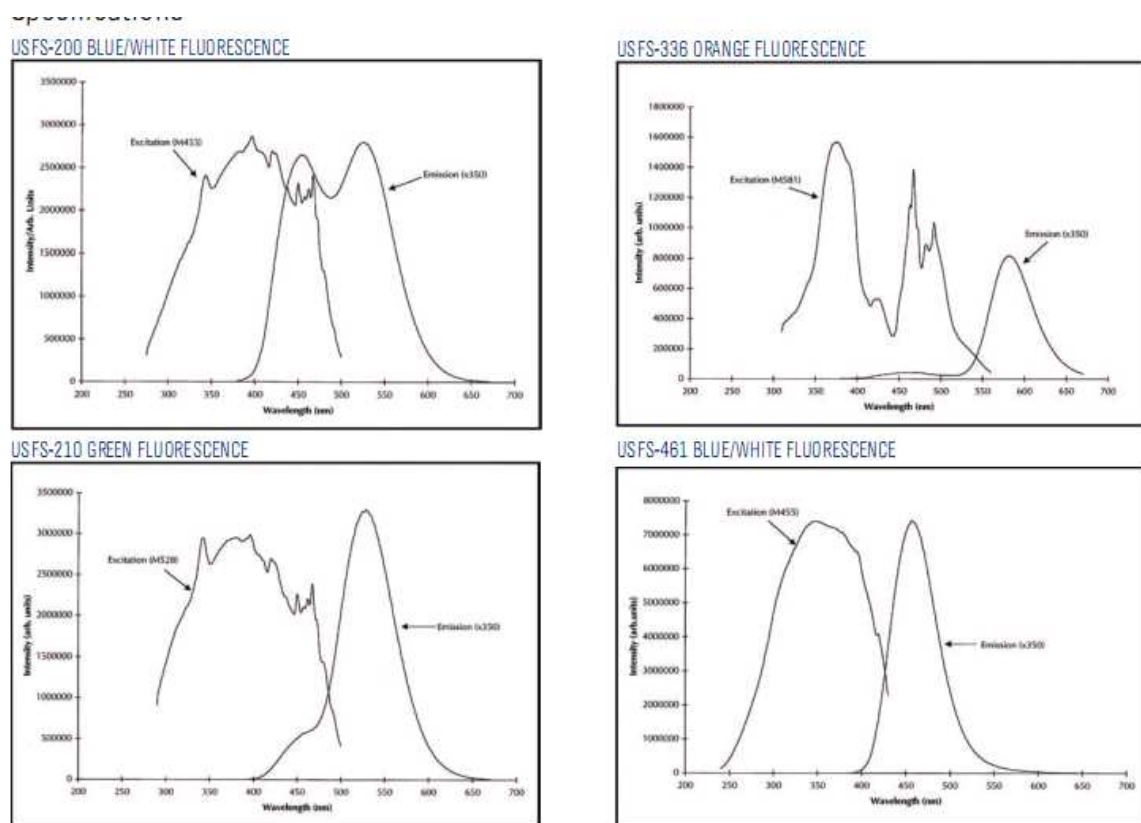
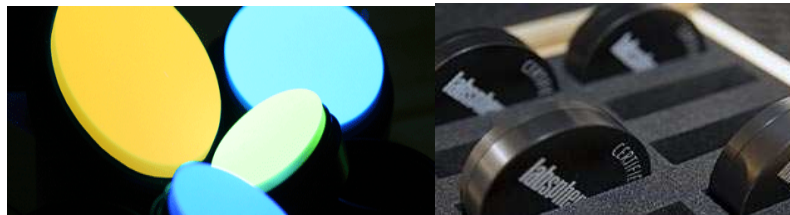


Figura 21. Patrones fluorescentes.

## 4. METODOLOGÍA

En este capítulo se explican los pasos que se han dado para medir la reflectancia espectral de cada muestra, tanto las fotométricas como las luminiscentes. Hemos seguido recomendaciones de la CIE, aplicando las fórmulas correspondientes que se recomiendan para cada caso.

Los pasos para la medida del color de cualquier muestra será la siguiente:

1. Parámetros a fijar en el software Felix32 para las medidas: tamaño rendijas y tiempo de decaimiento.
2. Elección del tipo de geometría de medida según la posición de las muestras.
3. Medida del blanco patrón.
4. Medida del ruido de fondo.

### 4.1 Obtención del factor de radiancia reflejado

En primer lugar, se realiza la medida de un estándar de referencia que habitualmente es un blanco patrón.

El blanco es un color con elevada luminosidad y una saturación muy baja. Como cualquier otro color pueden calcularse los valores triestímulo a partir de la reflectancia espectral, o directamente con un colorímetro de filtros. A partir de aquí se determinan las coordenadas cromáticas o la transformación en otras variables.

El sistema detector (D) recibe la energía radiante espectral tanto del objeto como del estándar, relacionándolas y generando una señal que es transmitida a un ordenador para su análisis y procesamiento.

Al estándar de referencia se le asigna un factor de reflectancia unidad para todo el espectro visible. Con respecto a este blanco se determina el factor de reflectancia de la muestra para cada una de las  $\lambda$  en las que se ha dividido el espectro visible, obteniendo así la curva que representa el factor de reflectancia espectral  $\rho(\lambda)$  de la muestra. Conocido éste, el ordenador que procesa los datos se convierte en un espectrocolorímetro calculando los valores triestímulo de la muestra mediante las correspondientes ecuaciones.

Además de la medición del blanco patrón se realiza una medida del ruido de fondo, mediante la obturación de la cabina, tanto en la entrada como en la salida del compartimento donde colocamos la muestra y que debe ser sustraído de las medidas y cálculos que se realizan a continuación.

Una vez realizada la medida del blanco patrón y del ruido de fondo, procedemos a medir la reflectancia estándar de las muestras no fluorescentes. Según las condiciones de tamaño de rendija y tiempo de decaimiento que nos ha marcado la primera medida del blanco patrón. Seleccionamos la Macro 1, donde por cada longitud de onda en el rango de excitación, nos devolverá una intensidad en la misma longitud de onda en el rango de

excitación, de esta manera obtendremos la intensidad para todas las longitudes de onda sincronizadamente en el rango de excitación y de emisión. Una vez obtenida la tabla de datos, calcularemos la reflectancia según la formula marcada por la CIE 182:2007 [31, 32].

Ecuación 8.

$$\beta_R(\lambda) = \left[ \frac{i_s(\lambda) - i_b(\lambda)}{i_{ref}(\lambda) - i_b(\lambda)} \right] \cdot \beta_{std}(\lambda)$$

donde:

- $i_s(\lambda)$  - fotocorriente de la muestra para cada longitud de onda.
- $i_b(\lambda)$  - fotocorriente del fondo para cada longitud de onda.
- $i_{ref}(\lambda)$  - fotocorriente del blanco de referencia para cada longitud de onda.
- $\beta_{std}(\lambda)$  - fotocorriente de radiancia del blanco patrón (Anexo II, columna muestra 99).

El factor de normalización se introduce para así obtener una reflectancia comprendida entre cero y uno.

Para los cálculos de  $\beta_R$ , factor de radiancia espectral reflejada, se han seleccionado los siguientes parámetros:

- Tamaño de rendija en la excitación: 0.75/0.75.
- Tamaño de rendija en la emisión: 0.75/0.75.
- Tiempo de decaimiento: 110  $\mu$ s

Las medidas del blanco patrón y del ruido de fondo con las condiciones anteriores (condición 1) están representadas en las Figuras 22 y 23, respectivamente. (Anexo III)

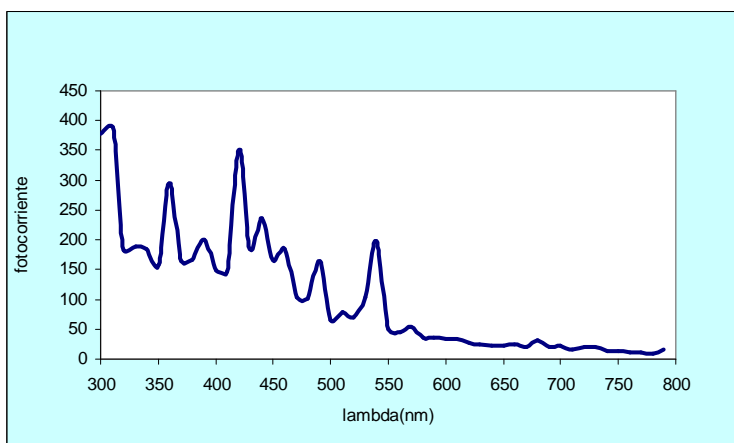


Figura 22. Blanco patrón

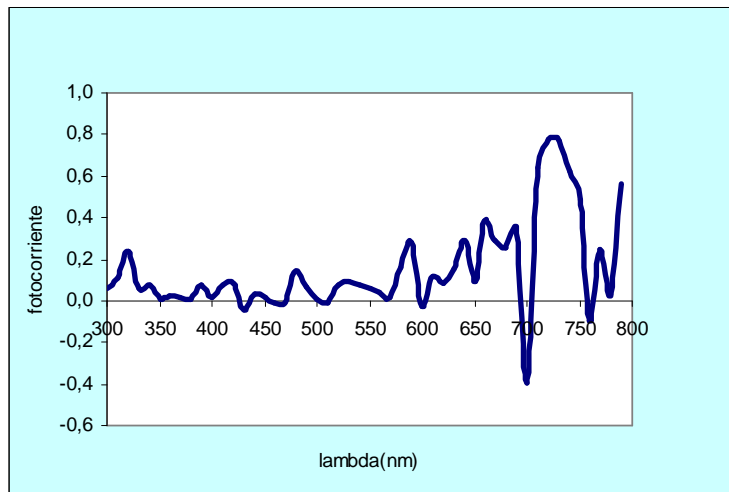


Figura 23. Medida del ruido de fondo

Después de realizar las medidas del blanco patrón y del ruido de fondo, se procede a medir las muestras de escala fotométrica en las mismas condiciones que antes. Los resultados obtenidos se incluyen en el apartado de resultados.

#### 4.2 Obtención del factor de radiancia luminiscente

Al iniciar las medidas de las muestras fluorescentes [45-50], se eligió un tamaño de rendija y tiempo de decaimiento diferente de las que se utilizó en el caso de la medida de muestras no fluorescentes. Se empezó con la medida del blanco patrón y del ruido de fondo utilizando la macro correspondiente a la medida de reflectancia estándar (macro 1), donde la longitud de onda incidente es igual a la emitida y además actúan de manera sincronizada por los dos monocromadores.

En este caso se tomaron los siguientes parámetros:

- Geometría 40/50
- Medidas como en Macro 1(factor de reflectancia reflejado): rendijas 1.0/0.75 en excitación y en emisión.
- Tiempo de decaimiento:115
- calibramos el instrumento con Macro 1: blanco y el fondo (sin muestra, con obturación completa de la cabina de medición)

Los resultados de la medida del blanco y del ruido de fondo con las nuevas condiciones (condición 2) se encuentran en Anexo IV.

Los datos obtenidos de la medida del blanco patrón cambiando las características de la medida son prácticamente iguales. En la Figura 24 se comparan los resultados obtenidos mediante las condiciones de medida 1 y 2.

Condición 1:

- Tamaño de rendija en la excitación: 0.75/0.75.
- Tamaño de rendija en la emisión: 0.75/0.75.
- Tiempo de decaimiento: 110  $\mu$ s

Condición 2:

- Tamaño de rendija en la excitación: 1/1.
- Tamaño de rendija en la emisión: 0.75/0.75.
- Tiempo de decaimiento: 115  $\mu$ s.

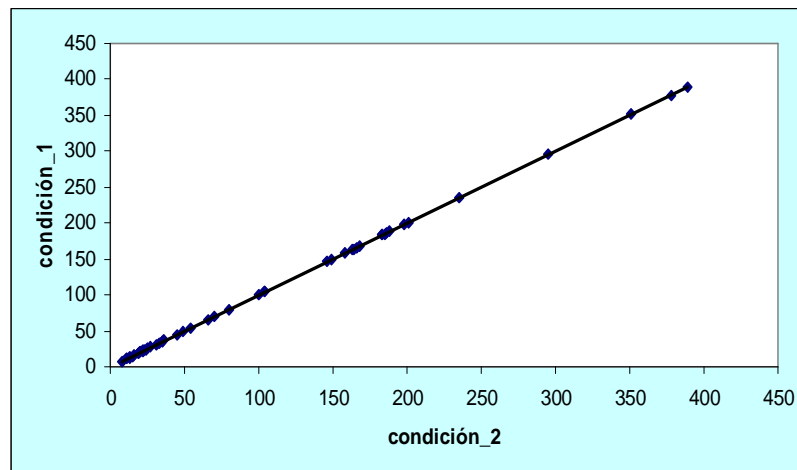


Figura 24. Comparación de los resultados de las medidas del blanco patrón con dos condiciones diferentes

Para medir la contribución de la fluorescencia en la muestra cambiamos la Macro, seleccionando aquella en la que el primer monocromador emite con una longitud de onda fija  $\mu$  y el segundo monocromador detecta todas las  $\lambda$  del espectro de emisión (macro 2). Este proceso se repite para cada una de las longitudes de onda del espectro de excitación.

En este caso al excitar con una longitud de onda determinada, lo que nos devuelve el instrumento, es un rango de intensidades emitidas a lo largo del espectro de emisión, a partir de la longitud de onda incidente. Una vez obtenidas las intensidades en cada longitud de onda de emisión, se realiza el cálculo de la reflectancia luminiscente, según la siguiente fórmula, marcada por la CIE 182:2007 [32].

Ecuación 9.

$$\beta_{L\lambda}(\mu_C) = \left[ \frac{i_S(\lambda, \mu_C) - i_b(\lambda)}{i_{sw}(\lambda) - i_b(\lambda)} \right] \beta_{std}(\lambda)$$

#### 4.4 Construcción de la matriz triangular de Donaldson.

Una vez calculadas las reflectancias estándar y luminiscentes de las muestras fluorescentes, se puede construir la matriz triangular de Donaldson.

El instrumento, según la macro 1, nos ha proporcionado una fotocorriente de emisión por cada longitud de onda de excitación y después por la aplicación de la fórmula, hemos conocido el valor de la reflectancia estándar en cada longitud de onda emitida. Esos serán los valores que debemos introducir en la diagonal de la matriz.

El instrumento nos proporciona la medida de esta manera, para poder montar la matriz de Donaldson de esta manera. Aquí viene representada una de las muestras (USF-200).

$\lambda\mu$	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
300	0,2958										
310	0,0003	0,2850									
320	0,0002	0,0001	0,2619								
330	0,0002	0,0001	0,0003	0,2558							
340	0,0001	0,0001	0,0002	0,0002	0,2664						
350	0,0001	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,3555					
360	0,0003	0,0002	0,0005	0,0004	0,0003	0,0002	0,3374				
370	0,0001	0,0001	0,0002	0,0002	0,0001	0,0001	0,0000	0,3797			
380	0,0003	0,0002	0,0005	0,0004	0,0003	0,0003	0,0001	0,0002	0,3950		
390	0,0004	0,0003	0,0007	0,0005	0,0004	0,0003	0,0001	0,0002	0,0001	0,3687	
400	0,0003	0,0002	0,0006	0,0005	0,0003	0,0003	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,4313
410	0,0002	0,0001	0,0003	0,0002	0,0002	0,0001	0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000
420	0,0011	0,0008	0,0020	0,0016	0,0012	0,0010	0,0003	0,0006	0,0004	0,0002	0,0003
430	0,0013	0,0009	0,0024	0,0019	0,0014	0,0012	0,0004	0,0007	0,0005	0,0003	0,0003
440	0,0020	0,0014	0,0037	0,0029	0,0021	0,0018	0,0006	0,0011	0,0007	0,0005	0,0005
450	0,0031	0,0022	0,0057	0,0045	0,0032	0,0028	0,0009	0,0016	0,0011	0,0007	0,0007
460	0,0038	0,0027	0,0070	0,0054	0,0040	0,0034	0,0011	0,0020	0,0013	0,0009	0,0009
470	0,0052	0,0036	0,0096	0,0074	0,0054	0,0047	0,0015	0,0027	0,0018	0,0012	0,0012
480	0,0068	0,0048	0,0126	0,0098	0,0071	0,0062	0,0020	0,0036	0,0024	0,0015	0,0016
490	0,0145	0,0102	0,0268	0,0208	0,0151	0,0131	0,0042	0,0076	0,0051	0,0033	0,0034
500	0,0210	0,0148	0,0389	0,0302	0,0220	0,0191	0,0061	0,0110	0,0075	0,0047	0,0049
510	0,0340	0,0239	0,0629	0,0488	0,0355	0,0308	0,0098	0,0178	0,0121	0,0076	0,0080
520	0,0475	0,0334	0,0879	0,0682	0,0496	0,0431	0,0137	0,0249	0,0169	0,0107	0,0112
530	0,0553	0,0389	0,1022	0,0793	0,0577	0,0501	0,0159	0,0289	0,0197	0,0124	0,0130
540	0,0584	0,0411	0,1080	0,0838	0,0610	0,0529	0,0168	0,0306	0,0208	0,0131	0,0137
550	0,0515	0,0362	0,0952	0,0738	0,0537	0,0466	0,0148	0,0269	0,0183	0,0116	0,0121
560	0,0473	0,0333	0,0876	0,0679	0,0494	0,0429	0,0137	0,0248	0,0168	0,0106	0,0111
570	0,0419	0,0295	0,0775	0,0601	0,0438	0,0380	0,0121	0,0219	0,0149	0,0094	0,0099
580	0,0333	0,0235	0,0617	0,0478	0,0348	0,0302	0,0096	0,0174	0,0119	0,0075	0,0078
590	0,0347	0,0244	0,0642	0,0498	0,0363	0,0315	0,0100	0,0182	0,0123	0,0078	0,0082
410											
420											
430											
440											
450											
460											
470											
480											
490											
500											
510											
520											

0,4693  
0,0002 0,5009



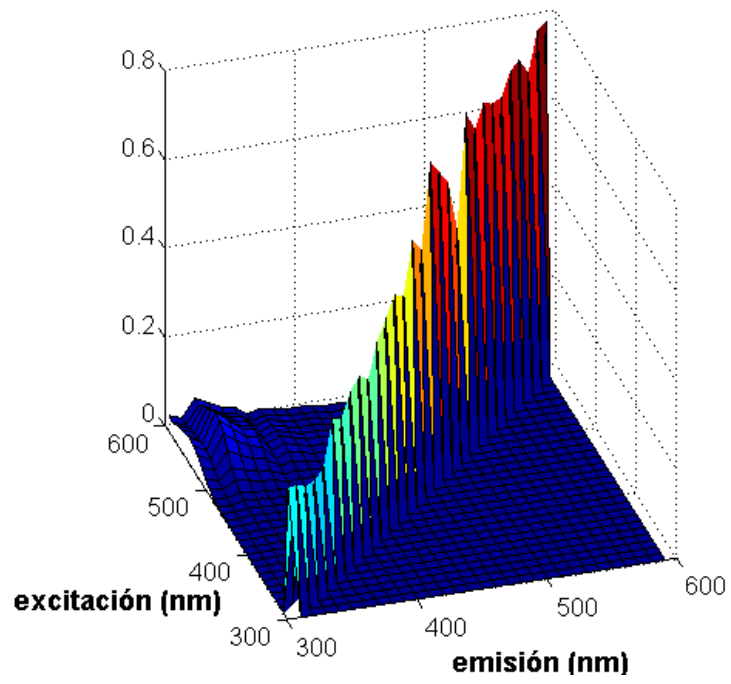


Figura 26. Representación tridimensional de la matriz de Donaldson de la muestra USF-200



## 5. RESULTADOS

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de la medida de las muestras no fluorescentes y fluorescentes. En primer lugar se mostrará el resultado que nos proporciona el instrumento, que será la fotocorriente emitida por la muestra para cada longitud de onda de excitación en el caso de las muestras no fluorescentes. Y en las muestras fluorescentes, el instrumento recoge datos de fotocorriente para un rango del espectro de emisión para cada longitud de onda de excitación. En segundo lugar, a partir de los datos de fotocorriente obtenidos se calcula la reflectancia reflejada y luminiscente en el caso de las muestras fluorescentes, según las Ecuaciones 8 y 9.

Una vez obtenidas las reflectancias, se puede empezar con los cálculos colorimétricos: valores tristímulo XYZ y apariencia del color a través del modelo CIELAB.

### 5.1 Calibrado del escalado fotométrico.

La calibración se va a realizar en dos escalas: fotométrico y de longitud de onda. En el anexo V se muestra la fotocorriente de las muestras no fluorescentes. En el Anexo VI se muestra el resultado de la aplicación de la Ecuación 8 para la obtención de la reflectancia de las muestras. En ambos casos los resultados de medición del blanco y ruido de fondo se encuentran en el Anexo III.

En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos después de la aplicación de la ecuación. Se han representado las muestras (02), (05), (10), (20), (40), (60), (80). La muestra (99) no está representada aquí, ya que es la que se ha utilizado como blanco patrón, es decir,  $\beta_{std}$ . El número que identifica cada muestra significa la reflectancia que debería tener cada muestra. En la figura puede comprobarse que la escala de reflectancia está acotada entre 0 y 1. Además, en este caso, para considerar que se ha realizado bien la calibración hay que considerar las siguientes condiciones.

La primera es considerar el escalado fotométrico. Es decir, si las muestras corresponden a una reflectancia de por ejemplo 60%, en la gráfica la recta de esta muestra debería estar a la altura de 0.6 y así con el resto de las muestras. Como vemos en la gráfica, en todas las muestras según las condiciones tomadas para la medida, se han obtenido valores de reflectancia más bajos de lo que esperábamos. Estos resultados serán determinantes para la valoración final de la apariencia del color y de las diferencias encontradas con respecto a los datos del fabricante.

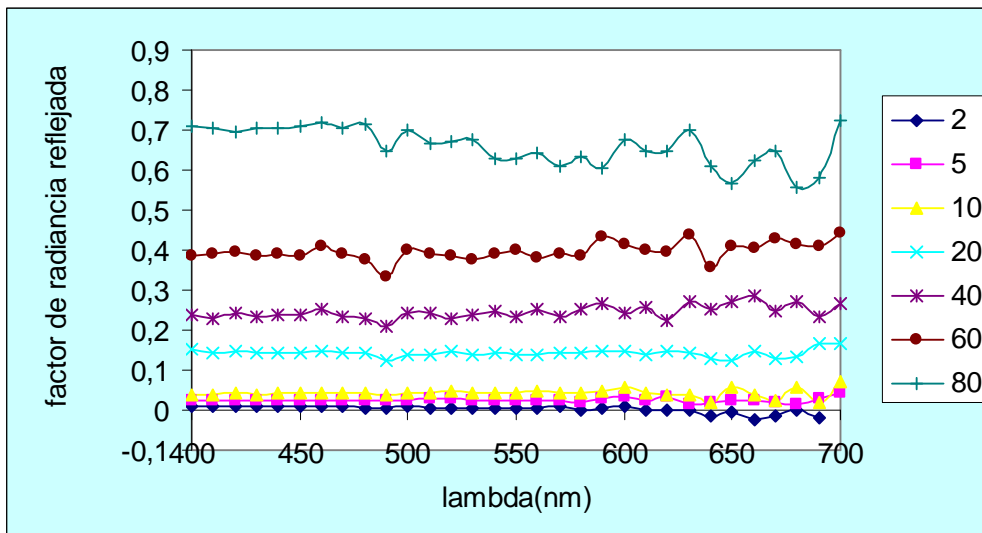


Figura 27. Factor de reflectancia reflejada de cada muestra.

Para valorar el escalado fotométrico se han calculado los valores triestímulo de las muestras considerando la Ecuación 1 según los datos del fabricante y los obtenidos en las medidas y se han comparado para obtener una representación de linealidad. En la Figura 28 se representa Y (que representa la luminancia de cada muestra). Los valores triestímulo de cada muestra se encuentran en el Anexo VII. El hecho que exista una diferencia en la reflectancia implica que las muestras sean más o menos oscuras.

En relación a la caracterización de los colores no fluorescentes, como hemos dicho anteriormente, el color de un objeto depende de dos factores principales: el iluminante y el observador. Por tanto es necesario definir estos dos parámetros para medir un color. En nuestro caso se ha elegido el iluminante D65 y como observador se ha considerado el observador estándar CIE-XYZ 1931 definido mediante las funciones de igualación. Considerando estos datos y con la medida de la reflectancia espectral del objeto, será posible obtener los valores triestímulo XYZ para posteriormente transformar en cualquier espacio perceptual de color, como el espacio CIELAB, que nos permitirá visualizar las diferencias perceptuales entre los datos proporcionado por el fabricante y las medidas experimentales obtenidas con nuestra instrumento de medida. De esta forma, se podrá evaluar los posibles errores en las medidas o las desviaciones encontradas entre los datos teóricos y experimentales.

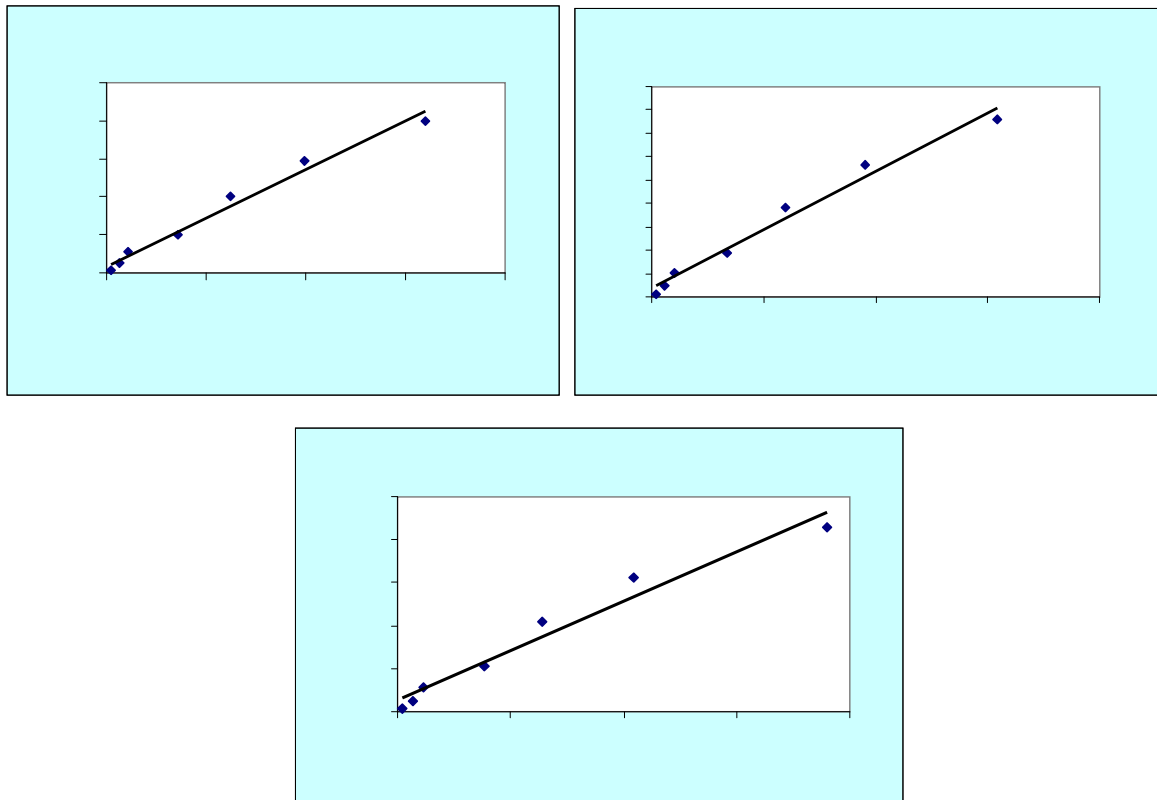
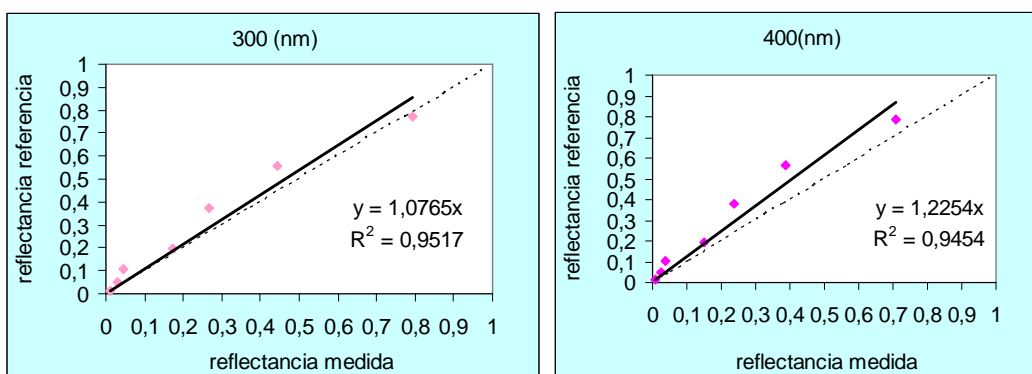


Figura 28. Escalado fotométrico (XYZ)

En segundo lugar, para obtener el escalado de lambda, compararemos el resultado para cada longitud de onda de todas las muestras. La variabilidad en los resultados implica que las muestras tengan una discrepancia en la tonalidad, según veremos en las gráficas de apariencia del color aplicando CIELAB.



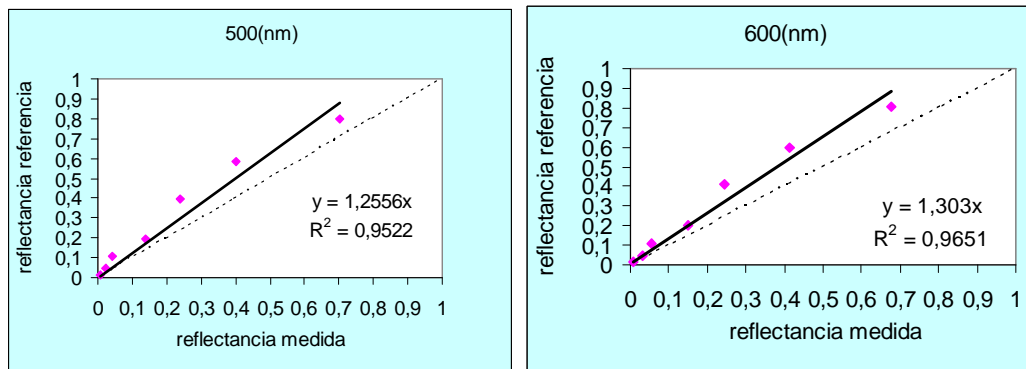


Figura 28. Escalada de lambda de las muestras no fluorescentes

Según vemos representado en las gráficas, para un correcto escalado de longitud de onda, la línea de desviación debe ser 1 o muy próxima a 1, valores inferiores a 0.8, o superiores a 1.2, indican que las medidas no deberían ser consideradas como fiables por la gran variabilidad en las medidas tomadas con respecto a los datos proporcionados por el fabricante.

## 5.2. Caracterización de los colores no fluorescentes

El iluminante que vamos a utilizar para caracterizar nuestras muestras es el D65, según establece la norma CIE [25, 51-52]. El objeto, con una reflectancia determinada, estará en función de este iluminante. Definiremos al observador por sus funciones de igualación, y de estas descompondremos el color en sus coordenadas cromáticas. Después transformaremos las coordenadas a un modelo de apariencia de color, CIELAB, que nos mostrará gráficamente cuales son las diferencias perceptuales entre los datos proporcionados por el fabricante y las medidas experimentales que hemos obtenido, para así poder evaluar los posibles errores en la medida, o desviaciones.

A continuación se representan los diagramas cromáticos de cada muestra comparando en cada caso la muestra según los datos del fabricante (std) y según los datos experimentales (m). Según estos diagramas, la muestra (std) se encuentra en el centro del diagrama ( $a^*$ ,  $b^*$ ). La separación de la muestra (m) con respecto al centro representará la variabilidad en la percepción del color. En el gráfico que representa ( $L^*$   $C^*$ ) se observa que la separación entre los puntos significa un cambio en la apariencia con respecto a la claridad y el cromatismo.

La tabla con el resultado de todos los cálculos derivados de aplicar las fórmulas resumidas en las Ecuaciones 3, 4 y 5, se encuentran en el Anexo VII:

## Muestra (02)

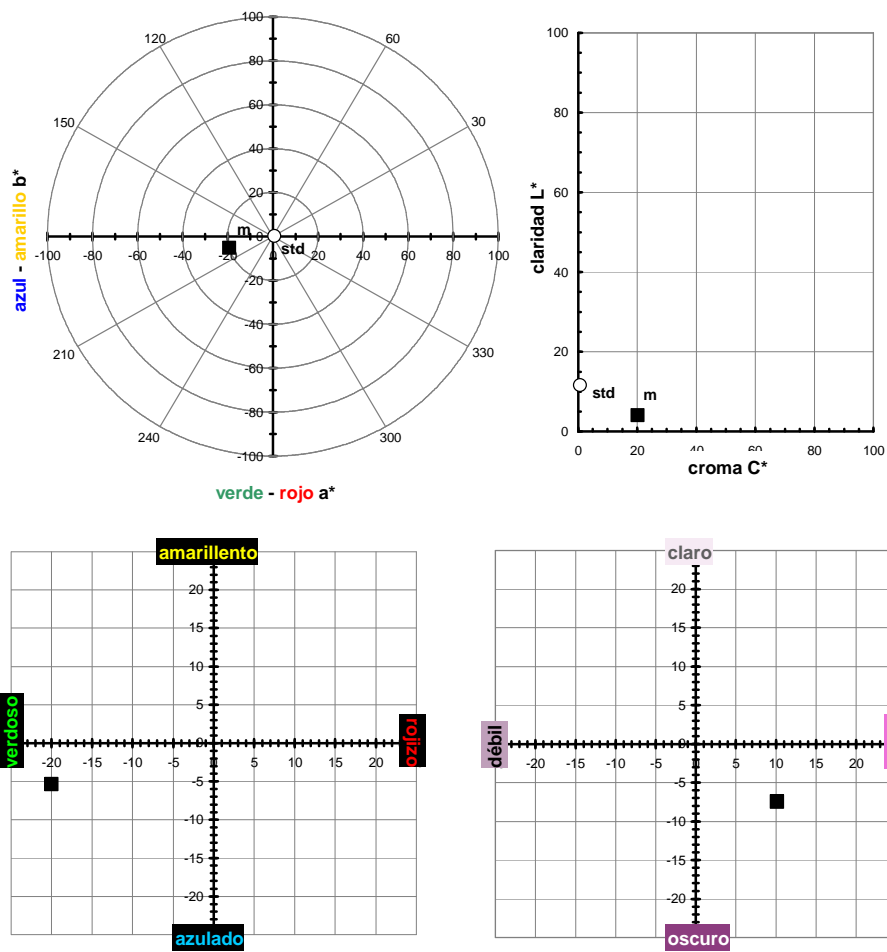


Figura 29. Diagrama cromático muestra (02) (arriba). Diferencias relativas (abajo)

Según estos diagramas y como ya esperábamos, al tener los valores experimentales reflectancias menores que las del fabricante, las muestras se aprecian más oscuras (desviación de  $L^*$ ) y mas fuertes (debido a la desviación en el cromac  $C^*$ ). Con respecto a la percepción del tono, el punto (m) tiene una desviación hacia la parte de los verdosos-azulados, que será la apariencia que nos proporcionará esta desviación experimental.

Muestra (05)

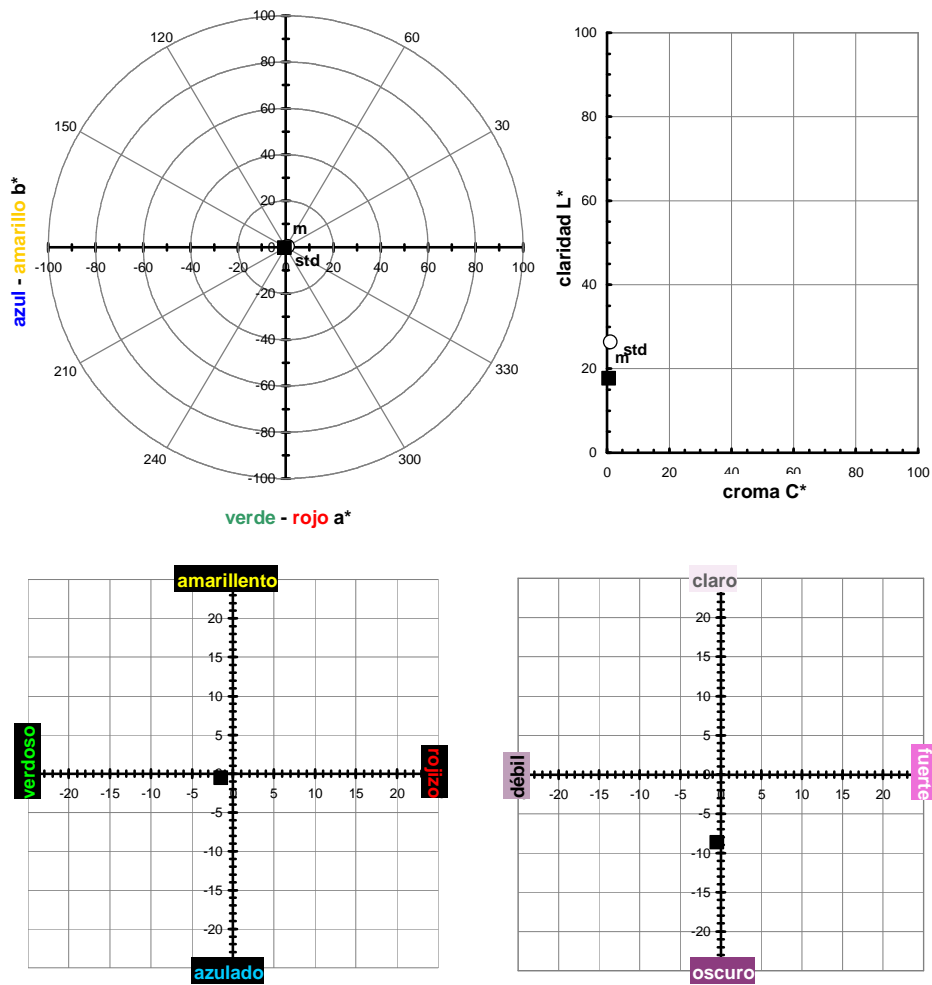


Figura 30. Diagrama cromático muestra (05) (arriba). Diferencias relativas (abajo)

En este caso los puntos (m) y (std) están situados prácticamente en el eje de coordenadas, por tanto, no habrá un cambio aparente en la apreciación de la tonalidad. En el caso del diagrama L\*C\* se observa que en cuanto al croma no hay cambios, pero si en L\*, dando como resultado una apariencia más oscura.

Muestra (10)

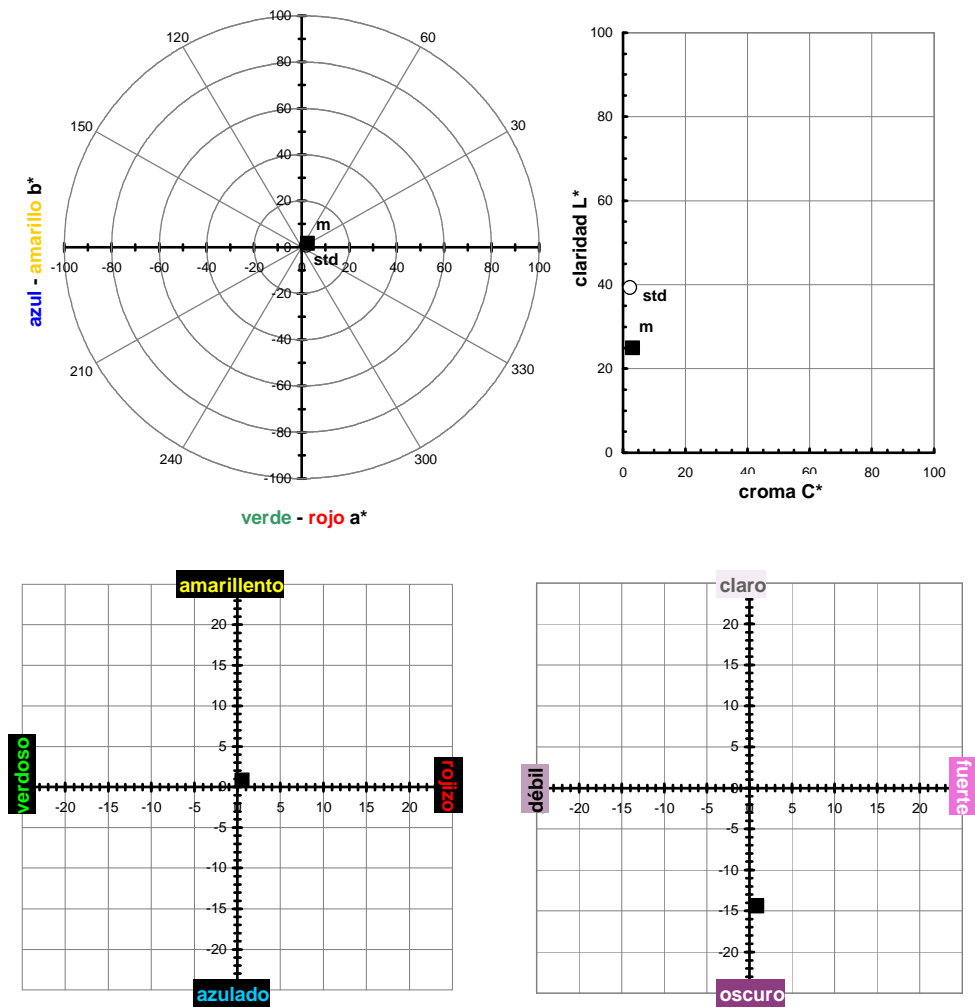


Figura 31. Diagrama cromático muestra (10) (arriba). Diferencias relativas (abajo)

En este caso, estamos en la misma situación que antes, donde sólo habrá discrepancia en la percepción de claridad/oscuridad ( $L^*$ ) de la percepción final de la muestra. Siendo en este caso más oscuro que enlaza perfectamente con el resultado de escalado fotométrico, donde los resultados de reflectancia de las datos experimentales nos han salido inferiores a los esperados.

Muestra (20)

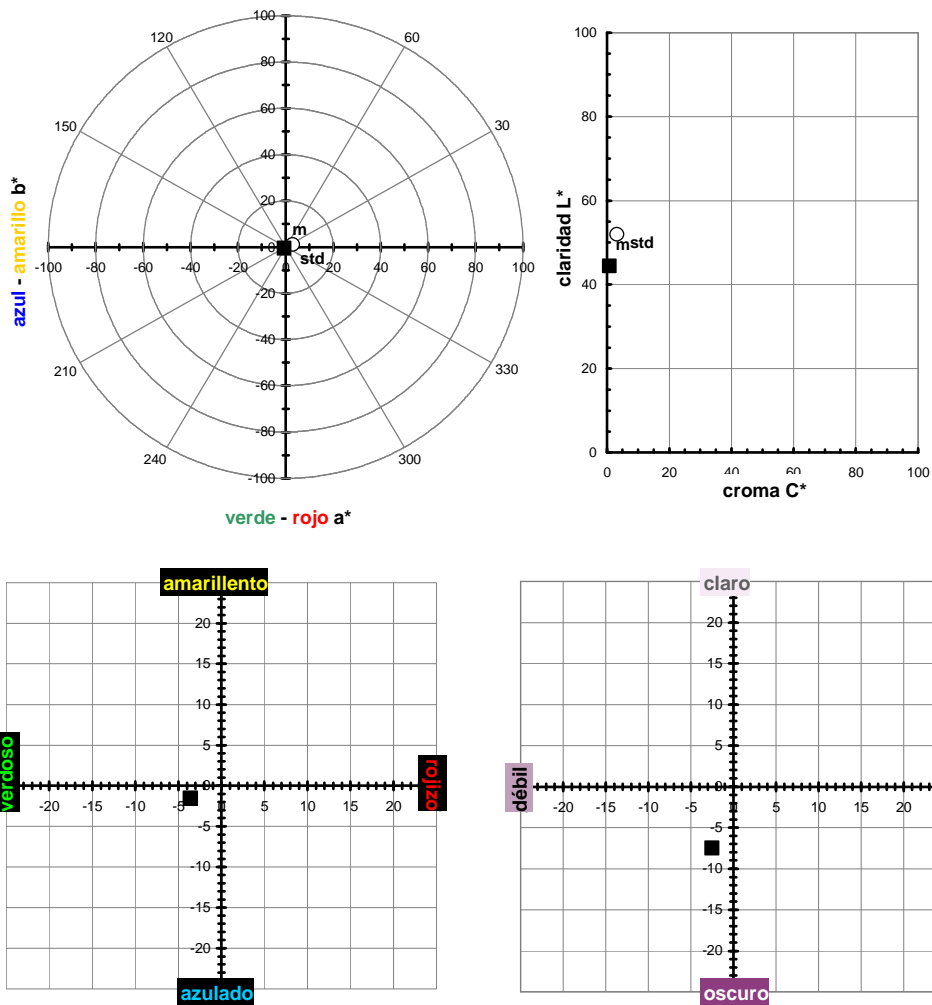


Figura 32. Diagrama cromático muestra (20) (arriba). Diferencias relativas (abajo)

En este caso nos encontramos, tanto con un variabilidad de la percepción del tono como de la luminosidad y un poco del croma. La apariencia final será verde-azulado y más oscuro, con un poco de debilidad (relacionado con el croma, que es la relación que existe entre la luminancia de la muestra con respecto al blanco de referencia).



Muestra (40)

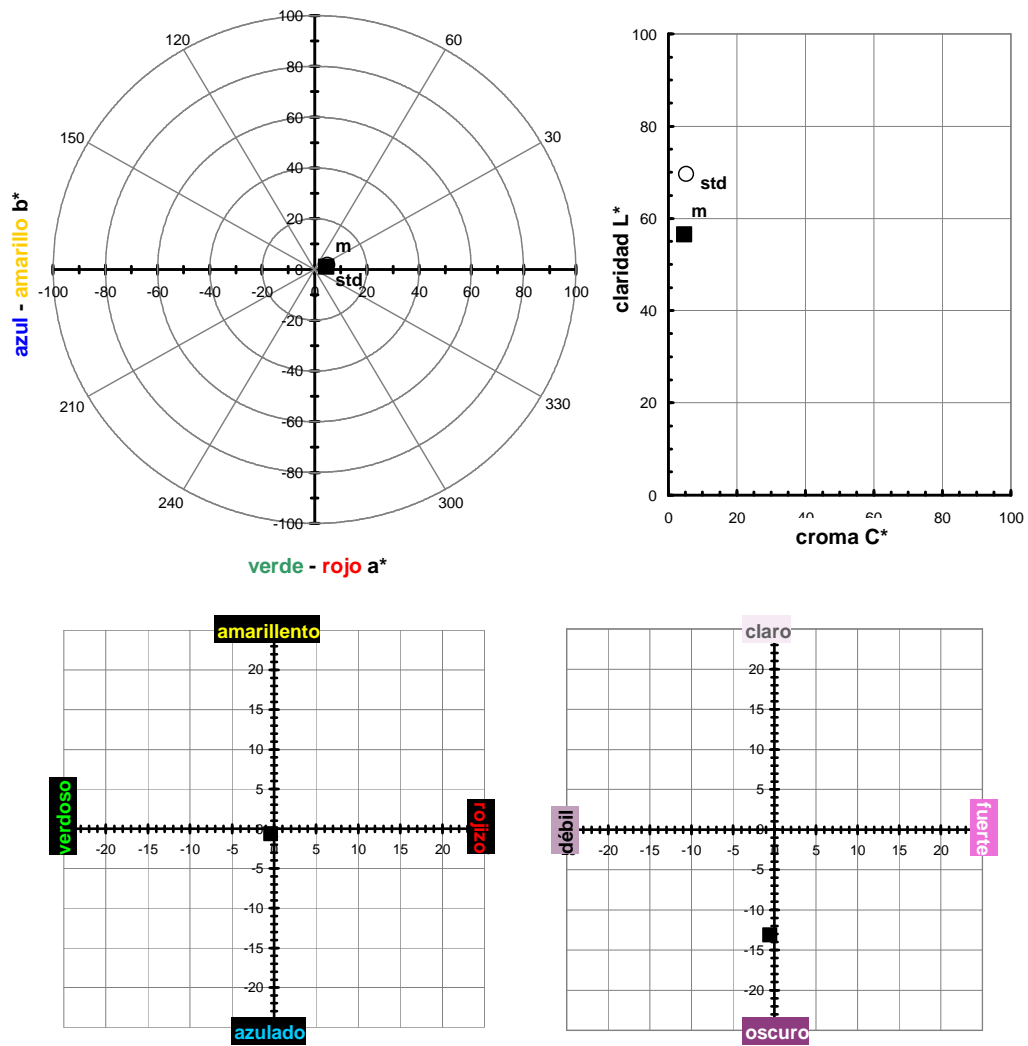


Figura 33. Diagrama cromático muestra (40) (arriba). Diferencias relativas (abajo)

En este caso, nos encontramos en la misma situación que la Figura 31. La percepción final será de la misma tonalidad pero diferente luminosidad.

Muestra (60)

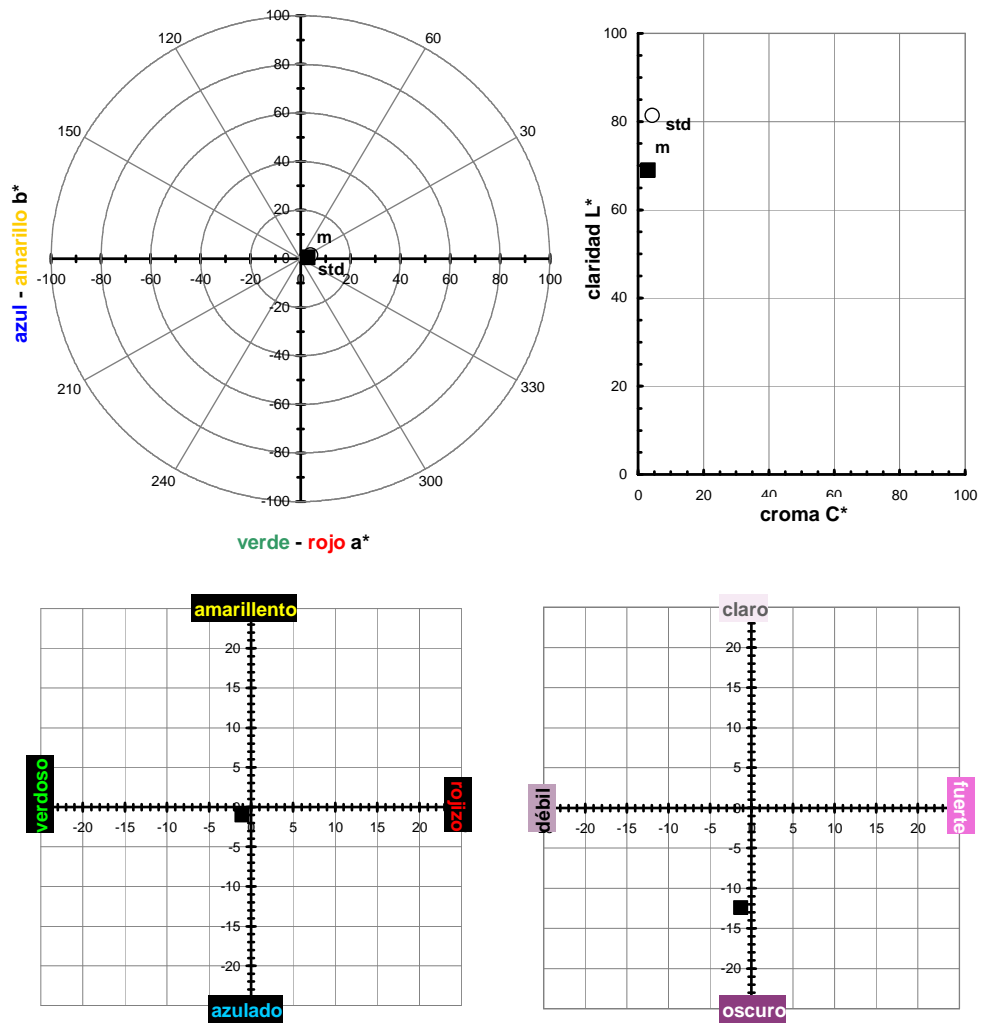


Figura 34. Diagrama cromático muestra (60) (arriba). Diferencias relativas (abajo)

En este caso, nos encontramos en la misma situación que en el caso de la muestra (40). La percepción final será de la misma tonalidad pero diferente luminosidad.

## Muestra (80)

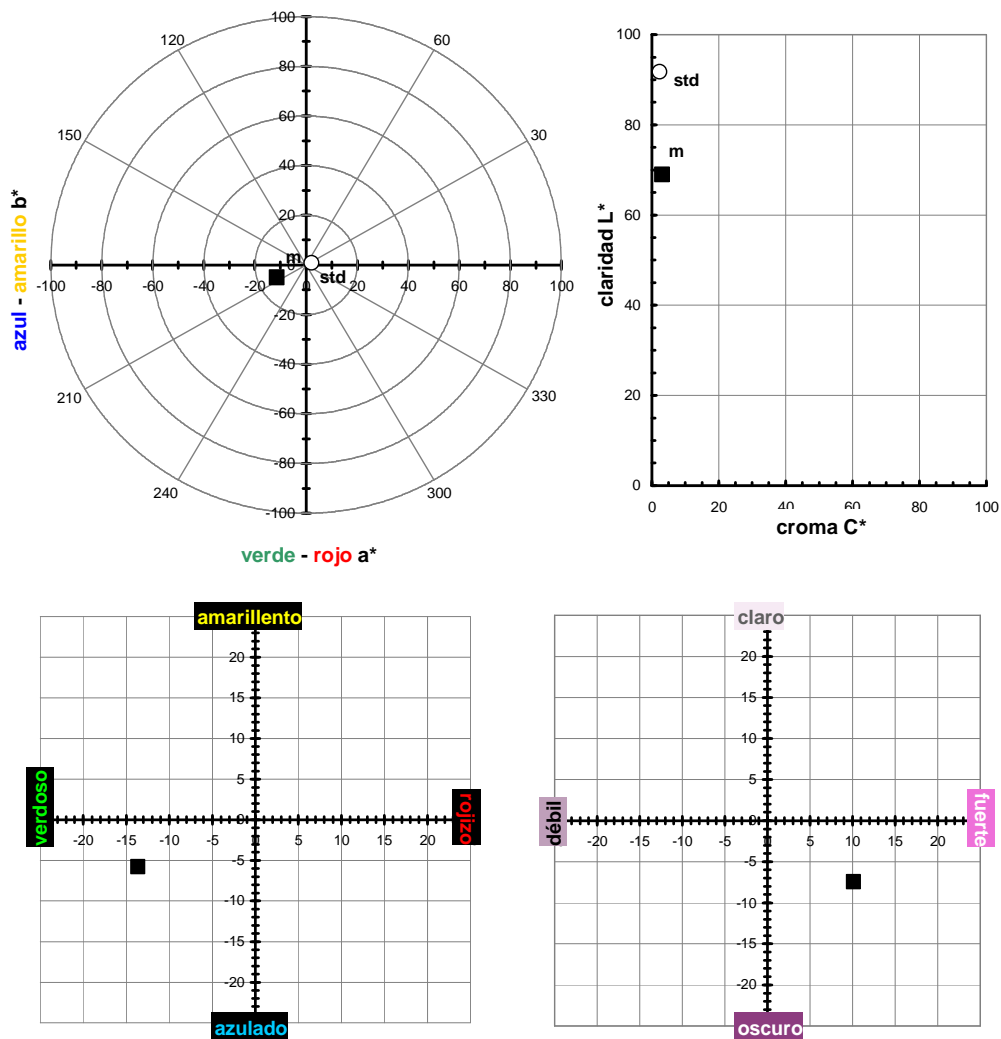


Figura 35. Diagrama cromático muestra (80) (arriba). Diferencias relativas (abajo)

Según estos diagramas, al tener los valores experimentales reflectancias menores que las del fabricante, las muestras se apreciarán más oscuras (desviación de  $L^*$ ) y mas fuertes (debido a la desviación en el croma  $C^*$ ). Con respecto a la percepción del tono, el punto (m) tiene una desviación hacia la parte de los verdosos-azulados, que será la apariencia que nos proporcionará esta desviación experimental.

### 5.3 Medida y caracterización de los colores fluorescentes

La medida de las muestras fluorescentes se ha realizado utilizando la Macro 2 del software del instrumento. En esta macro el instrumento registra, para cada longitud de onda incidente, un intervalo del espectro emitido por la muestra entre 300 a 600 nm, donde se recogerá la incidencia de la componente luminiscente, como se representa en la Figura 36.

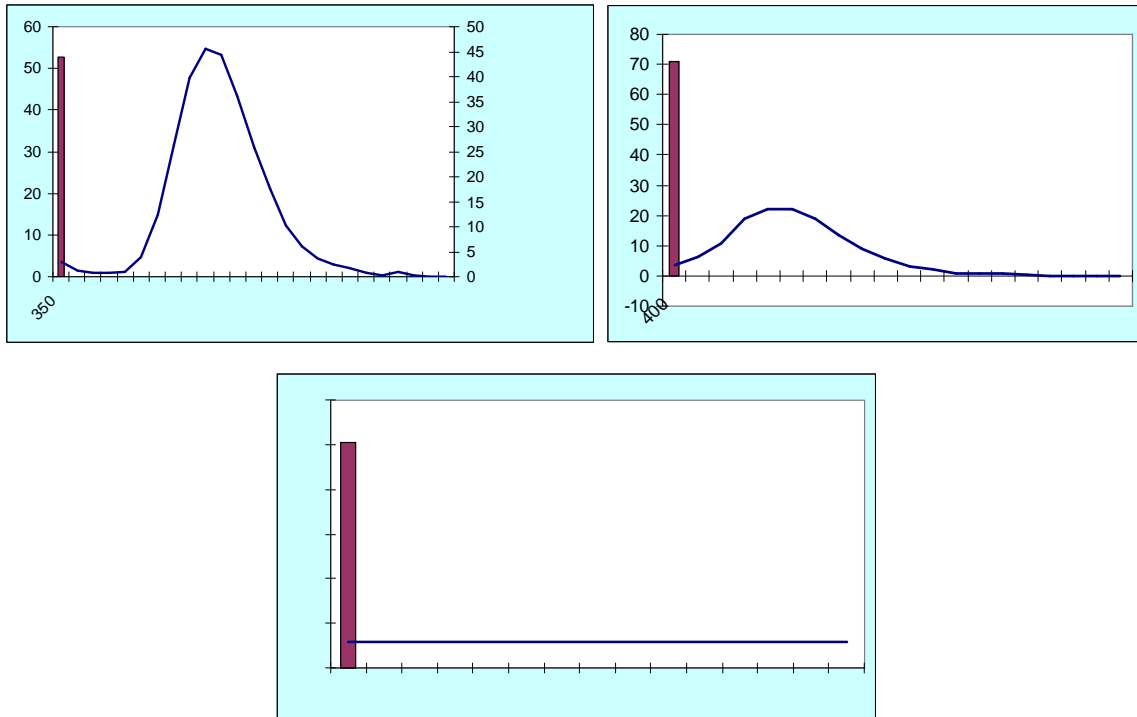


Figura 36. (1) Excitación 350 nm (2) excitación 400 nm (3) excitación 450 nm.

Como se ve en la Figura 36, en la muestra 461 por ejemplo, de 300 a 450 nm hay una contribución importante del efecto de la fluorescencia, mientras que a partir de 450 nm desaparece por completo la luminiscencia de la muestra.

En el caso de las muestras fluorescentes los resultados obtenidos se separan en 3 pasos. Los valores de fotocorriente para el blanco patrón y el ruido de fondo para las condiciones 2, en las que se ha trabajado con Macro 2, se encuentran en el Anexo IV.

Cálculo de  $\beta_R$ : bajo las condiciones de medición 2, se realiza una medición de la fotocorriente de las muestras sin contar con la contribución del factor luminiscente, utilizando la Macro 1. Esto es para cada intensidad de longitud de onda de excitación, tenemos una intensidad para la misma longitud de onda de emisión. El resultado se muestra en el Anexo VIII. Se ha calculado la  $\beta_R$  según la Ecuación 8. Los resultados se muestran en el Anexo IX.

Cálculo de  $\beta_L$ : En el caso del cálculo de la reflectancia luminiscente, el instrumento nos proporciona una fotocorriente a la salida de la muestra distribuida en un rango del espectro, no solo un valor, como sucedía anteriormente, con lo cual construimos la matriz de Donaldson donde se verán representados los resultados. Posteriormente, para cada longitud de onda se calculará la  $\beta_L$ , según la Ecuación 9. Estos resultados vienen recogidos en los anexos X y XI, respectivamente.

Cálculo de  $\beta_T$ : La reflectancia total, se ha calculado a partir de la suma de los coeficientes de la diagonal de la matriz de Donaldson normalizada, con los valores de la

matriz, situados debajo de cada uno de los valores de la diagonal. El resultado viene reflejado en el anexo XII.

Ya que no tenemos datos de partida de las muestras, se han realizado cálculos de apariencia de color de las muestras con contribución luminiscente y sin ella, para ver que cambio encontramos en la apariencia del color. Vamos a aplicar los cálculos colorimétricos como se ha realizado anteriormente. Los resultados se encuentran en el Anexo XIII.

### Muestra USF-200

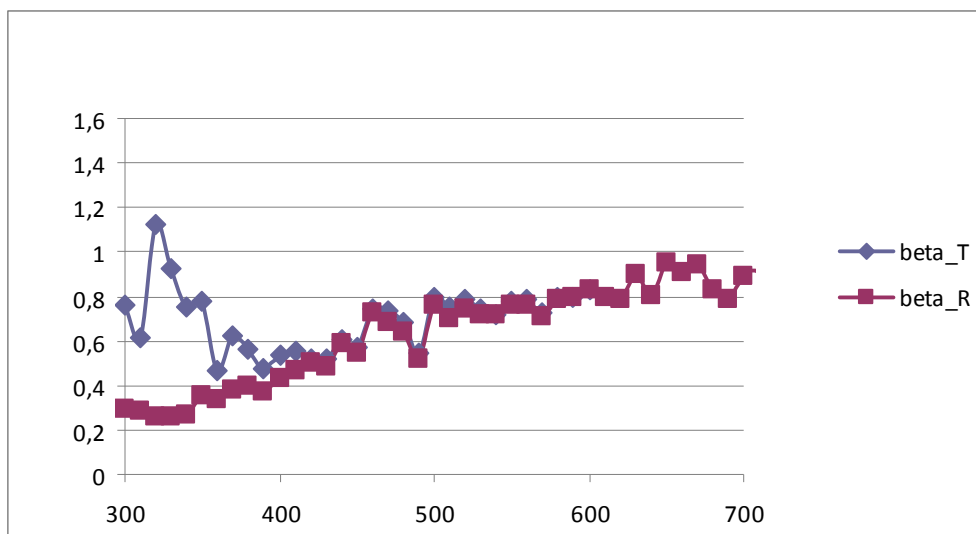


Figura 37. Representación de factor de reflectancia reflejada y total de la muestra USF-200

En esta muestra, se observa que la contribución luminiscente es muy importante en el rango del espectro de emisión que está entre 300 a 450 nm, es a partir de aquí donde el factor de radiancia reflejado coincide con el total, porque ya no existe contribución de la parte luminiscente.

Según los cálculos de apariencia de color, tenemos para esta muestra:

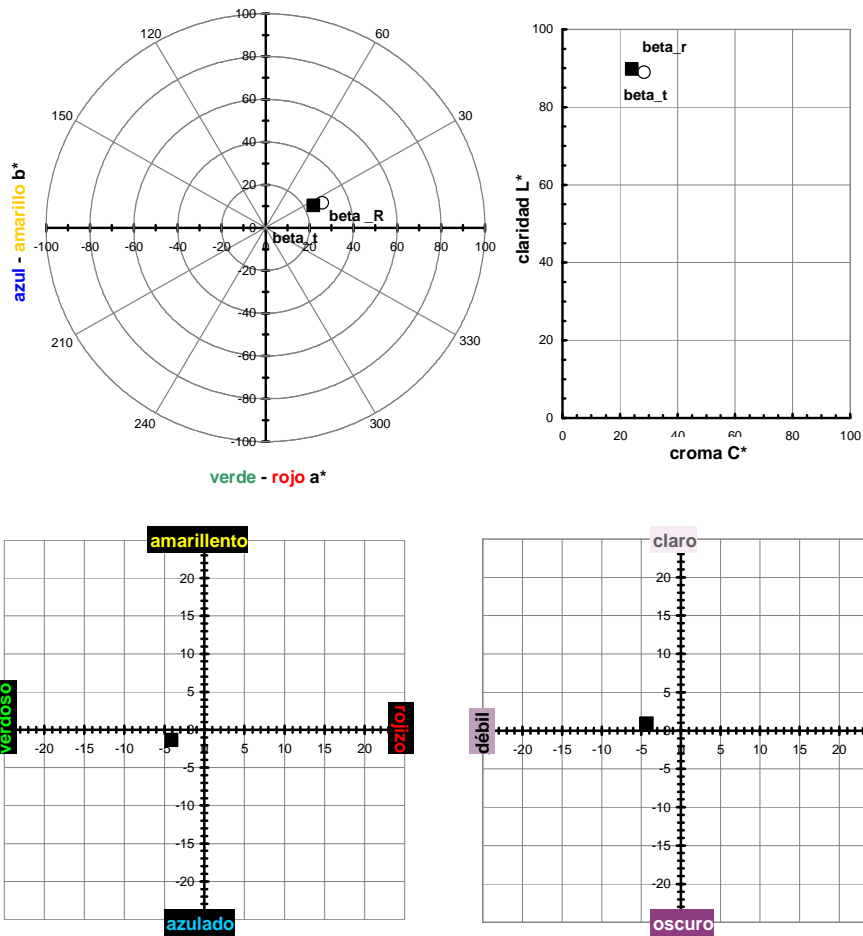


Figura 38. Diagrama cromático muestra USF-200 (arriba). Diferencias relativas (abajo)

En el caso del diagrama cromático, como hemos explicado en el modelo CIELAB, las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  de la muestra con y sin contribución de la componente luminiscente, son positivas. Si  $a^* > 0$ , la muestra tendrá una componente rojiza y si  $b^* > 0$ , tendrá también una componente amarillenta.

En cambio, como observamos en las gráficas de diferencias de color entre las muestras, los dos valores de  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  tiene valores negativos con lo que la diferencia en la apariencia de color de la muestra con y sin la contribución de la componente luminiscente será de un tono verde-azulado.

## Muestra USF-210

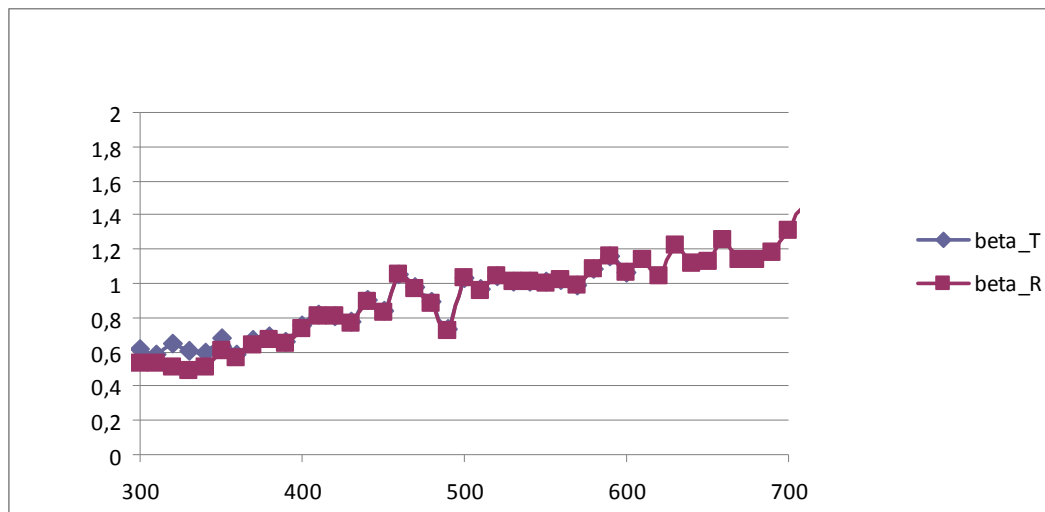
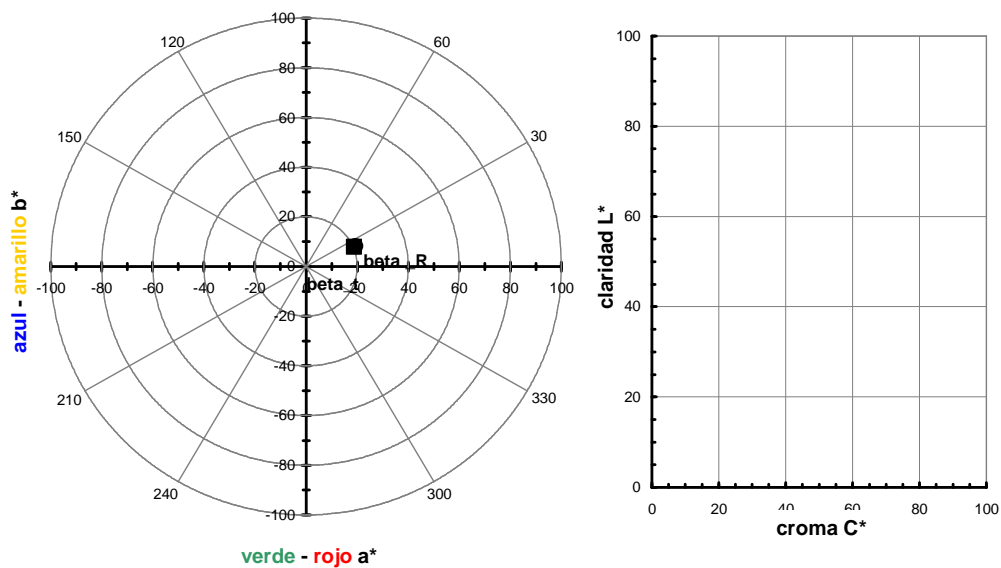


Figura 39. Representación de factor de reflectancia reflejada, luminiscente y total de la muestra USF-210

En esta muestra, el resultado esperado, que es encontrar un pico de fluorescencia en algún lugar del espectro superior al factor de reflectancia reflejada, no se aprecia. En todo el espectro de emisión la componente luminiscente no tendrá ninguna repercusión en el factor de reflectancia total, ya que, como vemos en la figura, ambas curvas coinciden prácticamente.

Según los cálculos de apariencia de color, tenemos para esta muestra:



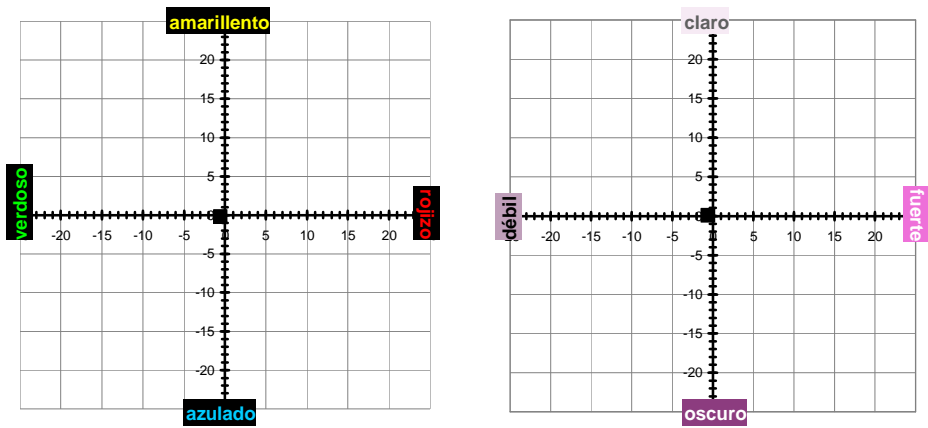


Figura 40. Diagrama cromático muestra USF-210 (arriba). Diferencias relativas (abajo)

Como era de esperar, al haber una coincidencia entre las dos curvas, la apariencia de las muestras comparando la presencia de la luminiscencia y sin ella, es la misma.

Muestra 205

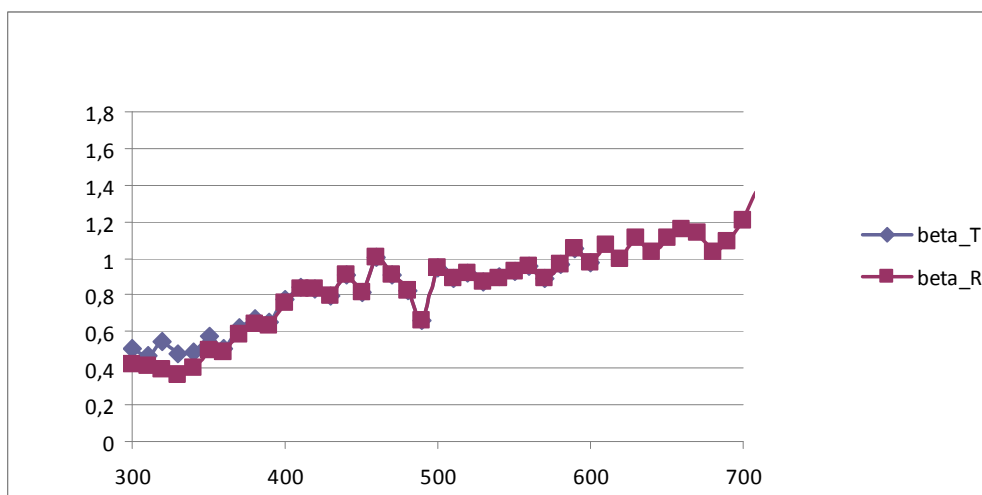


Figura 41. Representación de factor de reflectancia reflejada, luminiscente y total de la muestra USF-205

En esta muestra nos encontramos en la misma situación que la muestra USF-210, en el que no se encuentra ningún pico de fluorescencia superior a la radiancia reflejada, en ningún lugar del espectro de emisión, las dos curvas se solapan prácticamente en todo el espectro de emisión.



Según los cálculos de apariencia de color, tenemos para esta muestra:

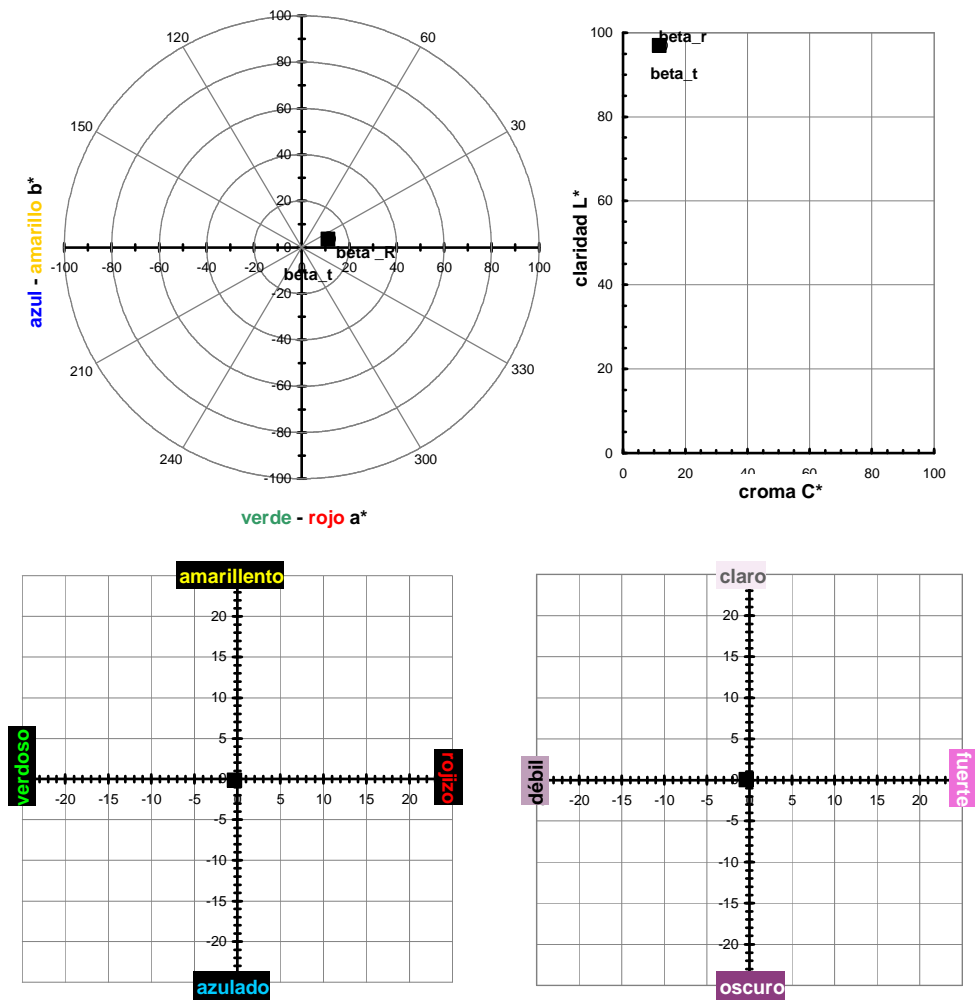


Figura 42. Diagrama cromático muestra USF-205 (arriba). Diferencias relativas (abajo)

En este caso no habrá ningún cambio significativo en la apariencia final del color con y sin contribución luminiscente.

## Muestra USF-336

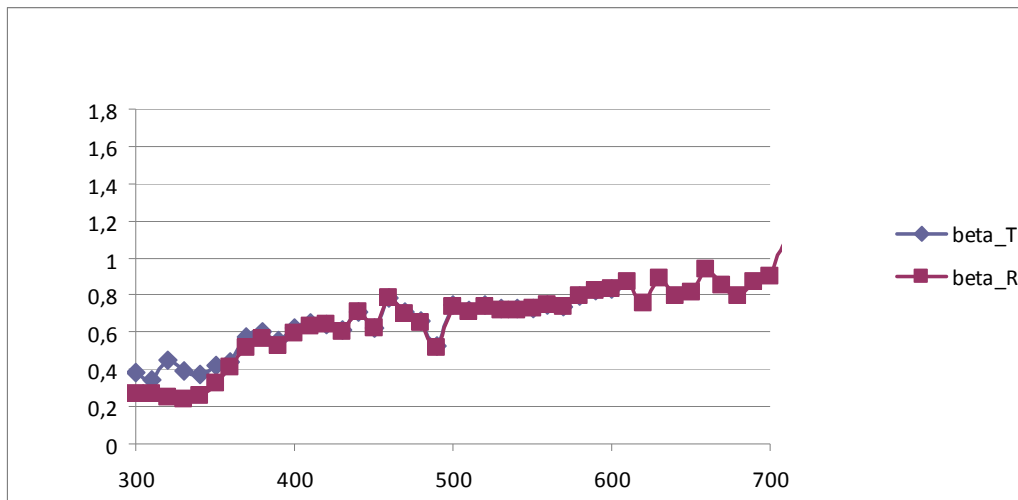
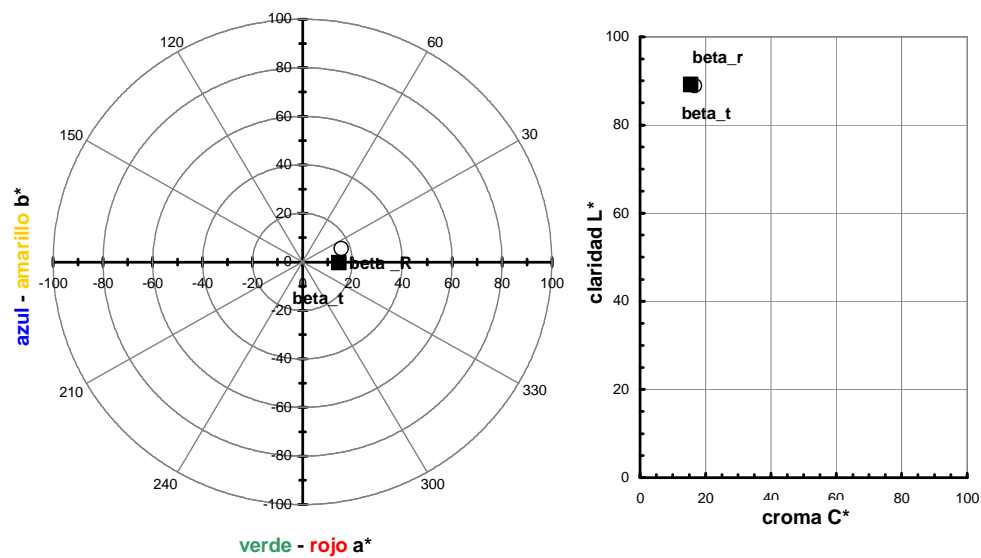


Figura 43. Representación de factor de reflectancia reflejada, luminiscente y total de la muestra USF-336

Aquí vuelve haber un solapamiento de las dos curvas, aunque entre 300 y 350 nm se ve cómo la luminiscencia ha contribuido a aumentar la radiancia total.

Según los cálculos de apariencia de color, tenemos para esta muestra:



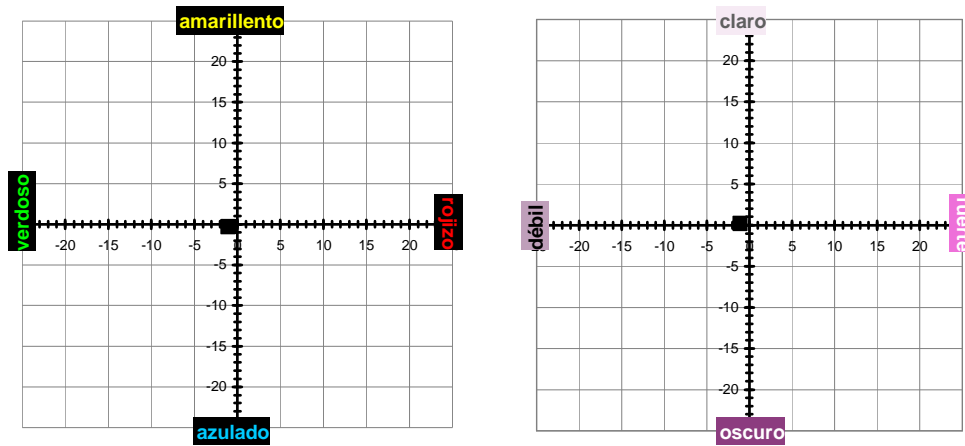


Figura 44. Diagrama cromático muestra USF-336 (arriba). Diferencias relativas (abajo)

En este caso, vuelve haber un solapamiento de las dos curvas, por lo que las diferencias relativas serán prácticamente nulas.

### Muestra USF-461

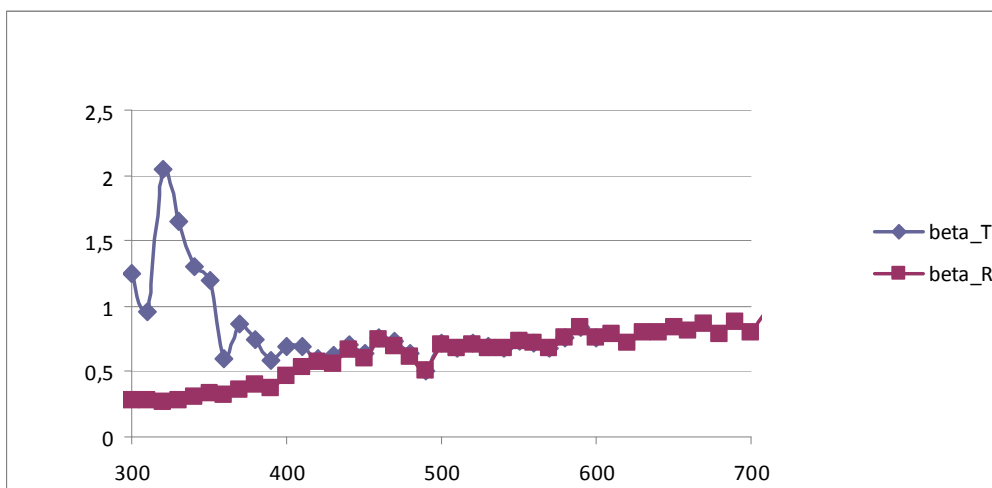


Figura 45. Representación de factor de reflectancia reflejada, luminiscente y total de la muestra USF-461

En esta muestra, se observa que la contribución luminiscente es muy importante en el rango del espectro de emisión que está entre 300 a 450 nm. A partir de aquí hasta los 600 nm la luminiscencia es prácticamente cero, siendo en este rango más importante la contribución del factor de radiancia reflejada.

Según los cálculos de apariencia de color, tenemos para esta muestra:

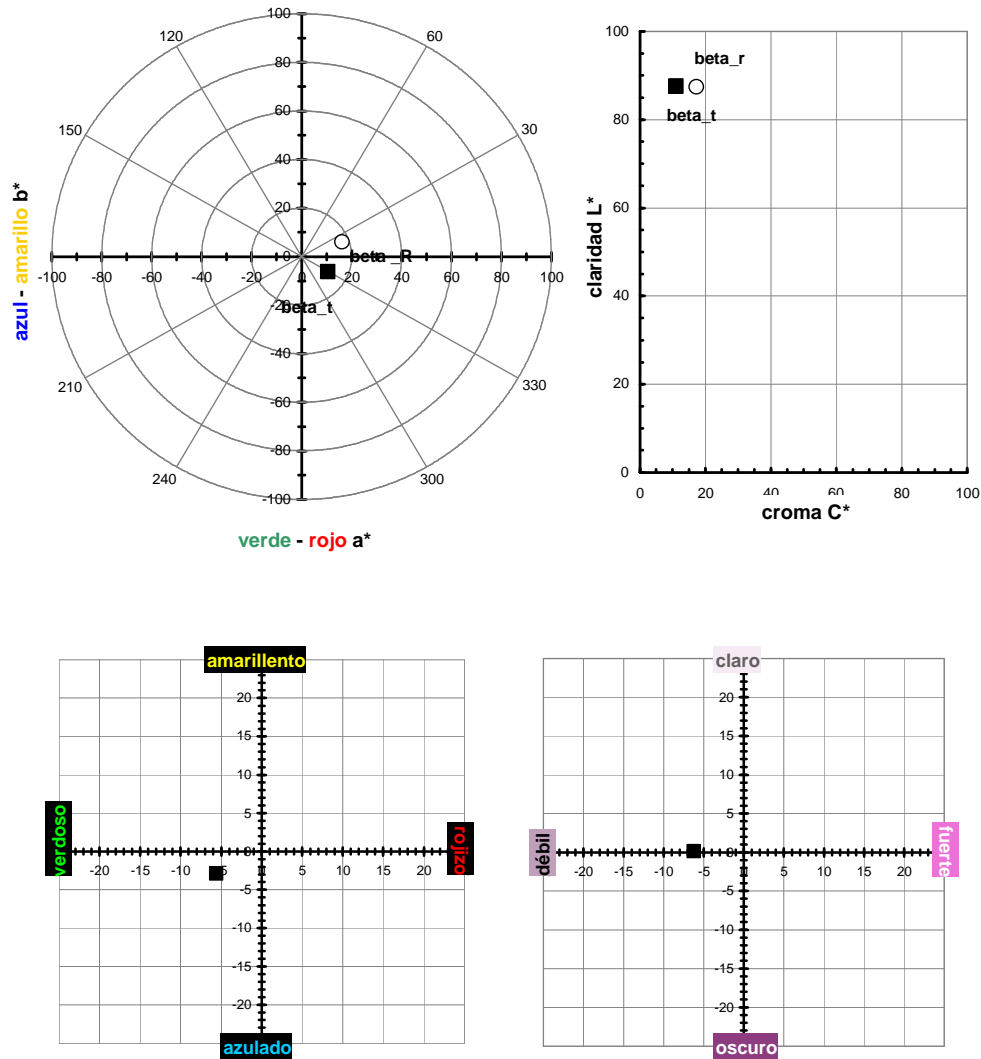


Figura 46. Diagrama cromático muestra USF-461 (arriba). Diferencias relativas (abajo)

Como vemos en las gráficas, el comportamiento de la fluorescencia no es el mismo para todas las muestras. En las Figuras 39, 41 y 43 vemos que la componente luminiscente no tiene prácticamente ninguna repercusión en el factor de reflectancia total de la muestra. En el resto de gráficas la curva de  $\beta_L$  está situada por encima de la curva de  $\beta_R$  en algún momento del espectro.

En resumen, casi todas las muestras la contribución de la componente luminiscente ha resultado para la apariencia final del color, en un cambio de tonalidad a azul verdoso, verde azulado y de una apariencia más fuerte, relacionado con el cambio de cromaticidad.

## 6. CONCLUSIONES

En este trabajo se han presentado los pasos preliminares llevados a cabo para la calibración de un espectrofluorímetro analítico modular adquirido recientemente por el Grupo de Visión y Color de la Universidad de Alicante para la medida y caracterización del color en materiales fluorescentes. Siguiendo recomendaciones de la CIE (CIE 182:2007) [32], esta calibración ha constado de varios pasos: cálculo del ruido de fondo, medida de un blanco patrón no fluorescente, linealidad, etc. Tras esta calibración, ha sido posible obtener y representar los factores de radiancia luminiscente biespectral, reflejada y total de un conjunto de muestras fluorescentes. De esta forma, ha sido posible la caracterización colorimétrica de estas muestras con el fin de ser comparadas con las medidas de referencia. Por tanto, a la vista de los resultados, este espectrofluorímetro podrá ser usado para la caracterización de colores fluorescentes para su correcta formulación, el estudio de gamas de colores fluorescentes, etc.

Tras el calibrado fotométrico del instrumento, realizado considerando las muestras de referencia, se ha observado tanto a nivel fotométrico como de longitud de onda, que existen cambios significativos lo que provoca cambios de claridad y tono respectivamente en la medición de las muestras tal como se ha puesto de manifiesto en la sección de los resultados.

Además se ha realizado la calibración utilizando un conjunto de muestras no fluorescentes. Para ello se han representado en los diagramas cromáticos  $a^*$  vs.  $b^*$  y  $L^*$  vs.  $C^*$  los datos colorimétricos asociados a estas muestras y las diferencias parciales de color entre los datos experimentales y los proporcionados por el laboratorio de referencia. Según estos diagramas y como ya esperábamos tras la calibración del escalado fotométrico, las muestras se aprecian más oscuras (desviación de  $L^*$ ) y más fuertes (debido a la desviación en el croma  $C^*$ ). En particular, la reflectancia de las muestras obtenidas con este instrumento, con la geometría de medida  $40^\circ/50^\circ$  y con las condiciones fijadas, nos ha dado como resultado, un factor de reflectancia más bajo que la proporcionada por el laboratorio fabricante. Esto no ha dado como resultado unas muestras que aparentemente tendrían un aspecto más oscuro, con menos luminosidad. Ya que las condiciones de medida no son las mismas que los datos proporcionados por el fabricante, es difícil deducir donde se puede encontrar el error o desviación. Sería necesario repetir las mediciones con otras geometrías, así podría extraerse datos estadísticos de cómo cambia la reflectancia según el ángulo de excitación y de emisión. Otro aspecto a destacar, es el resultado asociado a la muestra (80). Esta muestra tiene un factor de reflectancia menor que el proporcionado por el fabricante y además presenta una variabilidad en el espectro de emisión, cuando esto no debería ser así, la representación de su espectro de emisión debería asemejarse lo más posible a una línea recta. Se debería repetir la medida de la

muestra (80), aunque con las mismas condiciones que antes para poder ser interpretada en el conjunto de las muestras anteriores. Aunque queda un interrogante en el aire. ¿Qué ha pasado con la medida de esta muestra si, en teoría, se ha realizado exactamente igual a las otras? ¿Podría tener alguna influencia el hecho de que al ser la última medida se haya producido un calentamiento de la cabina? o ¿Puede deberse a la inestabilidad de la sujeción de la muestra, que haya hecho que la muestra se inclinará levemente?

Por otro lado, se ha procedido a la caracterización colorimétrica de un conjunto de muestras fluorescentes. Para ello, se realizó la medida del factor de radiancia reflejada, luminiscente y total de la muestra tal como se recomienda en diferentes normativas CIE y ASTM. Con estas medidas, se ha representado la matriz de Donaldson, característica principal de muestras fluorescentes. Se ha comprobado que en casi todas las muestras, la contribución de la componente luminiscente ha influido en la apariencia final del color, provocando un cambio de tonalidad a azul verdoso, verde azulado y una apariencia más fuerte, relacionado con el cambio de cromaticidad. Cabe destacar el comportamiento asociado a tres de las muestras estudiadas, USF-210, USF-205 y USF-336. Como se ha comentado en la sección de resultados, en estas muestras no se observa la contribución luminiscente, ya que tanto el factor de radiancia reflejado y total son prácticamente iguales, no observándose por tanto, variación en la apariencia de las muestras cuando se considera o no la contribución luminiscente. En el caso de las muestras fluorescentes, las características de la geometría de medición tienen un efecto muy importante en el factor de radiancia de la muestra. Los cambios en la geometría afectan de diferentes maneras en la medida final: cambios en la naturaleza de la medida, efectos de la geometría que introducen errores sistemáticos relacionados con la longitud de onda, etc. Por tanto, una de las posibles causas del comportamiento observado en estas muestras, puede deberse al hecho de no haberse realizado la medida en la misma geometría de medida que la utilizada por el fabricante, que ha provocado una falta de energía de excitación, no observándose por tanto la fluorescencia. De este modo, sería necesario cambiar la geometría de medida para observar el comportamiento fluorescente de las muestras.

Es importante también enumerar en esta sección de conclusiones una serie de condiciones que nos han condicionado el resultado final y que pueden haber influido de en el resultado esperado y deseado.

- Instrumento de medida: Ya hemos comentado en apartados anteriores que las mediciones realizadas a cualquier nivel y en cualquier área de investigación vendrá determinada por el instrumento que utilicemos para la toma de medidas. Por este motivo existen normas internacionales que estandarizan la toma de medidas, para que los resultados sean generales. Aún así, puede haber una pequeña discrepancia que ha de ser tenida en cuenta. En nuestro caso específico, hemos utilizado un espectroflurímetro modular analítico, con

una aplicación más encaminada a la biomédica, que implica unas limitaciones importantes en su uso con respecto a la caracterización de colores. Dado que tiene muchas utilidades, la cantidad de accesorios de los que dispone son también elevados. Así por ejemplo, la cabina donde se sitúa la muestra (Figura 47) tiene en su interior un goniómetro rotatorio señalizado en sus 360° para saber la posición en que está colocada la muestra. Al principio, al empezar a estudiar el instrumento, en el goniómetro rotatorio había un módulo donde colocar muestras de espesor micrométrico y de tamaño no superior a 2 cm. Nuestras muestras son de un laboratorio diferente al del instrumento, al tener unas dimensiones mucho más grandes por su espesor y tamaño, tuvimos que desmontar el módulo que servía para colocar las muestras pequeñas y colocar unos tornillos de manera estratégica, para que la muestra no se inclinara ni rotara durante el proceso de medida. El siguiente inconveniente al que nos enfrentamos fue que dada la versatilidad del instrumento, el software también ofrecía múltiples posibilidades, al estudiar el manual vimos que había muchas Macros que se podían diseñar con el fin último de la medición. Asesorados por el técnico del instrumento, desarrollamos un tutorial con lo necesario para poder acoplar nuestro instrumento a nuestro objetivo. A partir de este momento, ya se podía comenzar a realizar las medidas.



Figura 47. Interior del compartimento donde se coloca la muestra a medir.

-Geometría de medida: como ya hemos adelantado en los capítulos anteriores, en los años 80 existían espectrofotómetros diseñados exclusivamente para la caracterización de colores fluorescentes, también con el sistema de doble monocromador. Estos instrumentos eran muy costosos y limitados en su uso. Con lo que se pasó fabricar otros más versátiles donde poder ser utilizados en más campos tecnológicos. Como se ha nombrado anteriormente, solamente existen en el mundo cuatro laboratorios científicos que realizan

medidas estandarizadas de colores fluorescentes. Según la norma considerada, la geometría de medida recomendada es mediante esfera integradora, con las direcciones que se han explicado en capítulos anteriores. Nuestro instrumento no dispone, por el momento de este accesorio, con lo cual, la geometría de medición que se ha tomado ( $40^\circ/50^\circ$ ) es totalmente arbitraria, solamente se ha evitado la colocación de la muestra en una geometría  $45^\circ/45^\circ$  para evitar la reflexión de la muestra. Pero se podrían haber elegido otras geometrías igualmente. Queda para posteriores estudios el resultado de las medidas con otras geometrías, viendo que influencia tiene con el resultado final.

-Condiciones de medida: Nosotros hemos trabajado con unas condiciones de medida (tamaño de rendijas y tiempo de decaimiento) que nos proporcionaba una escala del blanco patrón, que es el que utilizamos para calibrar el instrumento antes de realizar las medidas, que no saturara el instrumento, es decir que estuviera en un rango de fotocorriente inferior a 4500 u.a. Esta escala nos daba la confianza de que al medir las muestras fluorescentes tampoco se produjera saturación. Queda propuesto para otros trabajos, el resultado de las medidas al cambiar las condiciones iniciales.

A pesar de todas las dificultades encontradas, se ha intentado seguir los pasos de la norma CIE 182:2007 para poder utilizar este espectrofluorímetro para caracterizar colores fluorescentes. Quedan muchas preguntas por resolver todavía ya que hay demasiados factores arbitrarios (colocación de la muestra, geometría de medida, condiciones de medida, temperatura de la habitación y de la cabina de medición, etc. Pero, como conclusión final, se puede decir que el instrumento utilizado es válido para la medida de colores fluorescentes, aunque queda todavía mucho por hacer para hacerlo fiable y trazable con respecto a otros instrumentos internacionales de referencia.



## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Garritz, A. Química. Pearson Educación, 369-377. (1998)
2. Ichijio, T. "Colorimetry of fluorescent materials". Journal of the Illuminating Engineering Institute of Japan, 71, no.4, 226-31, 1987.
3. Zhang J.L., Hong G.Y. "Progress on the study of nanoscale rare earth luminescent materials". Chinese Journal of Luminescence, 26, no.3, 285-93, 2005.
4. Guilbault, G.G. *Practical Fluorescence: Theory, Methods and Technique*, (Marcel Dekker, New York, 1993).
5. Hercules, D.M. "Some Aspects of Fluorescence and Phosphorescence Analysis". Anal. Chem., 38, 29A, 1966.
6. Wehry, E.L. *Modern Fluorescence Spectroscopy*, Vols. I-III, (Plenum, New York, 1976).
7. Jablonski, A. "Über den mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren". Zeitschrift für Physik, 94:38–46, 1935.
8. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3th edition, (Springer, New York, 2006).
9. Stokes, G.G. *On the change of refrangibility of light*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 142:463–562, 1852.
10. Wight, J.C. and F.J. Gustafson, "Ultratrace inorganic ion determination by laser excited fluorescence". Anal. Chem., 50, 1147A, 1978.
11. Springsteen, A. "Introduction to measurement of color of fluorescent materials". Analytica Chimica Acta, 380:183–192, 1999.
12. Porro, T.J. and Terhaar D.A. "Double-beam fluorescence spectrophotometry" Anal. Chem., 48, 1103A-1107A, 1976.
13. Zwinkels, J. C. and Gauthier, F. "Investigation of photoluminescent effect in opal glasses used as diffuse reflectance standards". Proc. SPIE, 4826:70–78, 2003.
14. Ronda C. (ed.), "Luminiscence. From Theory to Applications", (Wiley-VCH, Weinheim 2008).
15. Berberan\_Santos M.N. (ed.), *Fluorescence of Supramolecules, Polymers, and nanosystems*, Springer Series on Fluorescence, vol. 4, (Berlin: Springer-Verlag, 2007).
16. Clark, R.N "Spectroscopy of Rocks and Minerals, and Principles of spectroscopy", Manual of remote Sensing, vol. 3, remote Sensing for the earth Sciences (A.R. Rencz, ed.), 3-58 (Wiley, New York, 1999).
17. Flores Ruiz, E.M, Miranda Novales, M.G., Solórzano Santos, Sánchez Huerta, F.G. y Díaz Ponce, H. "Fluorescencia directa e inmunofluorescencia indirecta en extensión

- leucocitaria para el diagnóstico de candidemia en pacientes pediátricos: estudio comparativo". *Revista Iberoamericana de Microbiología*. 22. 102-104, 2005.
18. Cognetti, G., Sarà, M. y Magazzù, G. *Biología Marina*. (Ariel, Barcelona, 2001).
  19. Marine Biology Research Division. Scripps Institution of Oceanographic. (1), 2009.
  20. Tornquist, J. *Color y Luz: teoría y práctica*. (Gustavo Gili, Barcelona, 2008).
  21. Schanda, J. *Colorimetry. Understanding the CIE system*. (John Wiley & Sons, New Jersey, 2007).
  22. ISO 10526(E):2007/CIE S 014-2/E:2006. CIE Standard Illuminants for Colorimetry (ISO: Genova, 2007).
  23. CIE Comisión Internationale de l'Eclairage. Colorimetry. 15:2004. (CIE: Viena, 2004).
  24. Capilla P. et al, *Fundamentos de colorimetría*. (Universidad de Valencia, Valencia, 2002).
  25. Artigas, J.M. et al. *Tecnología del color*. (Universidad de Valencia, Valencia, 2002).
  26. Gilabert, E. *Medida del color*. (Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2002).
  27. Kang, H.R. *Computational color technology*. (SPIE Press, 2006).
  28. Montesinos Azorín, R. "Especificación cromática de gamas de colores usados en la industria del calzado". Trabajo de Investigación. Universidad de Alicante (2003).
  29. Bowman, R.L., "History and Development of the spectrophotofluorometer", *Fluorescence News*, 3 (1), 1974.
  30. Lott, P.F. and Hurtubise, R.J. "Instrumentation for Fluorescence and Phosphorescence", *J. Chem. Educ.*, 51, A315, A358, 1974.
  31. CIE Comisión Internationale de l'Eclairage. Calibration Methods and Photoluminescent Standards for Total Radiance Factor Measurements, CIE 182:2007 (CIE: Viena, 2007).
  32. ASTM American Society for Testing and Materials. Standard Test method for Linearity of Fluorescence Measuring Systems, ASTM E578-07 (ASTM: West Conshohocken, 2007).
  33. Hobart H. Willard, John A. Dean, Lynne L Merritt, Lynne L. Merritt (Jr). *Métodos instrumentales de análisis*. (Compañía Editorial Continental, 1970).
  34. Billmeyer, F.W. Jr. "Colorimetry of Fluorescent Specimens: A State-of-the-Art Report". NBS-GCR 79-185, 1979.
  35. CIE Comisión Internationale de l'Eclairage. The Effects of Fluorescent in the Characterization of Imaging Media. CIE 163:2004. (CIE: Viena, 2004).
  36. CIE Comisión Internationale de l'Eclairage. Intercomparison on Measurement of (total) Spectral Radiance Factor of Luminescent Specimens. CIE 76:1990. (CIE: Viena, 1990).

37. ASTM American Society for Testing and Materials. Standard Practice for Obtaining Bispectral Photometric Data for Evaluation of Fluorescent Color, ASTM E2153-01 (2006) (ASTM: West Conshohocken, 2006).
38. Terstiege H. "Artificial daylight for measurement of optical properties of materials". *Color Research & Application*, 14, no.3, 131-8, 1989.
39. Elliott CT. "Negative luminescence and its applications". *Philosophical Transactions of the Royal Society London, Series A (Mathematical, Physical and Engineering Sciences)*, 359, no.1780, 567-79, 2001.
40. Burns, D.M., Donahue, TJ. "Measurement Issues in the Color Specification of Fluorescent-retroreflective Materials for High-visibility Traffic Signing and Personal Safety Applications". *SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 4826, 39-49, 2003.
41. Zwinkels, J.C., Gignac, D.S., Nevins, M., Powell, I., Bewsher, A. "Design and Testing of a Two-monochromator Reference Spectrofluorimeter for High-accuracy Total Radiance Factor Measurements". *Applied Optics*, 36, no.4, 892-902, 1997.
42. Zwinkels, J.C. and Gignac, D.S. "Development of a New Reference Spectrofluorimeter". National Research Council, Institute for National Measurement Standards, Ottawa, K1A 0R6.
43. DeRose, P.C., Wang, L., Gaigalas, A.K., Kramer, G.W., Resch-Genger, U., Panne, U. "Needs for and Metrological Approaches Towards Standardization of Fluorescence Measurement from the View of National Metrology Institutes", *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I: Techniques* (U. Resch-Genger, ed.), 33-62, de Springer Series on Fluorescence, vol. 5, 2008.
44. ASTM American Society for Testing and Materials. Standard Test Method for Wavelength Accuracy and Spectral Bandwidth of Fluorescence Spectrometers, ASTM E2153-01(2006). (ASTM: West Conshohocken, 2009).
45. ASTM American Society for Testing and Materials. Standard Guide for Fluorescence Instrumentation Calibration and Qualification, ASTM E2719-09. (ASTM: West Conshohocken, 2006).
46. Hanley, Q.S., Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M. "Spectrally Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy". *Applied Spectroscopy*, 56, no.2, 155-66, 2002.
47. Pfeifer, D., Hoffmann, K., Hoffmann, A., Monte, C., Resch-Genger U. "The calibration kit spectral fluorescence standards: a simple and certified tool for the standardization of the spectral characteristics of fluorescence instruments". *Journal of Fluorescence*, 16, no.4, 581-7, 2006.

48. Shaw, M.J., Clarke, P.J., Burnitt, T.A. "The design of the new NPL reference spectrofluorimeter". SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering, 5192, no.1, 30-5, 2003.
49. ISO International Organization for Standardization, Standard Method of assessing the spectral quality of daylight simulators for visual appraisal and measurement of colour, ISO 23603:2005, CIE S 012:2004. (ISO: Geneva, 2005).
50. González, S. *Evaluation of Biespectral Spectrophotometry for Accurate Colorimetry of Printing Materials* (Rochester: University of Rochester, 2000).