



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERIA ELECTRICA
INGENIERÍA ELÉCTRICA-INSTRUMENTACIÓN

ESTUDIO DEL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA EN TEJIDO
EPITELIAL SUPERFICIAL

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

P R E S E N T A:
MIGUEL REYES ALBERTO

TUTOR PRINCIPAL
DR. ENOCH GUTIÉRREZ HERRERA
CENTRO DE CIENCIAS APLICADAS Y DESARROLLO TECNOLÓGICO
(CCADET-UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ENEO, 2018

Jurado Asignado:

Presidente: Dr. García Valenzuela Augusto

Secretario: Dr. Matatagui Cruz Daniel

1er. Vocal: Dr. Gutiérrez Herrera Enoch

2do. Vocal: Dr. Saniger Blesa José Manuel

3er. Vocal: Dra. Pérez Pacheco Argelia

Lugar donde se desarrolló la tesis: CENTRO DE CIENCIA APLICADAS Y
DESARROLLO TECNOLÓGICO (CCADET-UNAM)

Tutor de tesis

Dr. Enoch Gutiérrez Herrera

Firma

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi asesor el Dr. Enoch Gutiérrez Herrera por compartir su conocimiento y experiencia conmigo además por su apoyo incondicional, paciencia y tiempo en la elaboración de este trabajo.

Agradezco al Dr. Crescencio García Segundo y al Dr. Augusto García Valenzuela por su apoyo, sugerencias e innumerable discusiones respecto al tema de investigación.

Agradezco a laboratorio al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (luce) por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Agradezco al Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET-UNAM) por permitirme utilizar sus instalaciones y equipo de laboratorio para llevar a cabo este trabajo.

Agradezco el apoyo recibido por parte de PAPIITIT100515 por el soporte económico en la realización de este trabajo de tesis.

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis proponemos el uso de la técnica de espectroscopia de fluorescencia para el estudio y la caracterización de propiedades ópticas en tejido superficial con el fin de apoyar la valoración clínica de distintas patologías en epitelio. Particularmente, proponemos un modelo analítico para el estudio del fenómeno de fluorescencia en epitelios superficiales, así como su evaluación experimental mediante el diseño y la implementación de un arreglo óptico que permita medir los cambios de intensidad de fluorescencia en tejido en función del ángulo de incidencia del haz de excitación mediante el modelo propuesto.

Para medir la intensidad fluorescencia del tejido propusimos un modelo que consistió en emplear tejido epitelial vegetal de fácil disposición y conservación, el cual fue teñido con rodamina 6G, tinte fluorescente ampliamente empleado en espectroscopia. Además se elaboró una muestra de referencia con la cual, podemos comparar entre un medio esparcidor que fluoresce (tejido epitelial con rodamina 6G) y un medio no esparcidor que fluoresce (muestra de referencia). Se diseñó, construyó y caracterizó un arreglo óptico para medir la reflectancia y transmitancia del haz de excitación en tejido superficial bajo prueba, así como los espectros de emisión de fluorescencia en función del ángulo de incidencia del haz de excitación.

El modelo analítico y el desarrollo de este sistema óptico tienen como propósito estudiar y mejorar nuestro entendimiento sobre el fenómeno de fluorescencia en tejidos superficiales. Lo anterior, puede proporcionar información que apoye la optimización y eficacia de instrumentos biomédicos basados en espectroscopia de fluorescencia, como es el caso de aquellos desarrollados para estudios clínicos de diversas patologías, como es el cierre de heridas crónicas, en la Unidad del CCADET en el Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

ÍNDICE

Agradecimientos	IV
Índice	V
Resumen	1
Listado de figuras	VII
Listado de tablas	X
Capítulo I	
Introducción	
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Técnicas de evaluación empleadas en epitelios.....	3
1.2 Espectroscopia de fluorescencia.....	5
1.2.1 Fluorescencia.....	6
1.3 Posible herramienta de diagnóstico.....	7
1.4 Motivación.....	8
1.5 Hipótesis.....	9
1.6 Objetivo.....	10
1.7 Metodología.....	10
1.8 Organización del documento.....	11
1.9 Referencias.....	12
Capítulo II	
Modelo matemático de fluorescencia intrínseca en tejido superficial	
2.1 Introducción.....	15
2.2 Modelo matemático de fluorescencia.....	18

2.3	Conclusiones.....	26
2.4	Referencias.....	27

Capitulo III

Metodología experimental

3.1	Introducción.....	29
3.2	Preparación de muestras.....	30
	3.2.1 Deposición de una película delgada fluorescente.....	32
	3.2.2 Tinción de tejido epitelial superficial.....	33
3.3	Arreglo experimental.....	34
3.4	Conclusiones.....	36
3.5	Referencias.....	37

Capitulo IV

Resultados

4.1	Introducción.....	38
4.2	Caracterización de la muestra de referencia y fuente de excitación.....	40
4.3	Mediciones del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación (muestra de referencia).....	44
4.4	Mediciones del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación (tejido epitelial).....	52
4.5	Modelo matemático vs. Perfil de variación de potencia transmitida de fluorescencia en función del ángulo de excitación (muestra de referencia).....	56
4.5.1	Modelo matemático vs. Perfil de variación de intensidad de la fluorescencia en función del ángulo de excitación (muestra de referencia).....	57

4.6	Conclusiones.....	59
4.7	Referencias.....	61
Capítulo V		
	Conclusiones.....	62

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Fig. 1.1	Diagrama de Jablonski. Procesos probables de excitación y relajación.....	6
----------	---	---

CAPÍTULO II

Fig. 2.1.	Fenómeno de fluorescencia en una película delgada con solución de rodamina 6G. na= Índice de refracción del aire, nm= Índice de refracción del medio.....	15
-----------	--	----

Fig. 2.2	Esquema de radiación de una fluoróforo. na= Índice de refracción del aire, nm= Índice de refracción del medio.....	18
----------	---	----

CAPÍTULO III

Fig. 3.1.	Cebolla blanca.....	31
-----------	---------------------	----

Fig. 3.2	a) Spot del haz incidente sobre la CCD b) Spot observado después de transmitirse a través de una capa de 100 μm de pegamento UHU c) Spot observado después de transmitirse a través de una capa de 100 μm de esmalte de uñas.	31
----------	--	----

Fig. 3.3 Esquema de elementos empleados en la deposición de una película de esmalte fluorescente.....	32
Fig. 3.4 Tejido epitelial de cebolla teñido con rodamina 6G. Imagen obtenida con microscopio con un aumento de 10X.....	33
Fig. 3.5 Imagen del arreglo experimental en modo de reflexión para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.....	34
Fig. 3. 6 Arreglo experimental para medir la componente coherente y difusa de la potencia transmitida por la muestra.....	36

CAPÍTULO IV

Fig. 4.1 Espectro de transmitancia en distintas muestras de la muestra.....	41
Fig. 4. 2 a) Espectro de fluorescencia de película de esmalte con R6G al variar la potencia de excitación (532 nm). b) Intensidad de fluorescencia a 560 nm en función de la potencia de excitación.....	43
Fig. 4.3 Regiones donde se hizo incidir la fuente de excitación.....	44
Fig. 4.4 a) Variación de la intensidad de fluorescencia en distintas regiones b) Normalización de la variación de la intensidad de fluorescencia en distintas regiones.....	45
Fig. 4.5 a) Variación de la intensidad de fluorescencia en una película de esmalte con rodamina R6G distintos días b) Normalización de la variación de intensidad de fluorescencia en una película de esmalte con rodamina R6G distintos días.....	46
Fig. 4.6 a) Variación de la intensidad de fluorescencia a distintos lapsos de tiempo b) Normalización de la variación de la intensidad de fluorescencia a distintos lapsos de tiempo.....	47

Fig. 4.7 Espectro de fluorescencia en función el ángulo de incidencia del haz de excitación a) Polarización TM b) Polarización TE.....	48
Fig. 4.8 Perfil de variación de potencia transmitida en función del ángulo de incidencia de excitación.....	48
Fig. 4. 9 a) Perfil de variación de la potencia transmitida en una película de esmalte R6G. SIN filtro b) Normalización del perfil de variación de la potencia transmitida en una película de esmalte R6G. SIN filtro.....	49
Fig. 4. 10 a) Perfil de variación de la potencia transmitida en una película de esmalte R6G CON filtro b) Normalización del perfil de variación de la potencia transmitida en una película de esmalte R6G CON filtro.....	50
Fig. 4.11 Comparación del perfil de variación de la potencia de luz transmitida en una película de esmalte CON y SIN rodamina 6G. a) modo de polarización de la fuente de excitación TM b) Modo de polarización de la fuente de excitación TE.....	51
Fig. 4. 12 Orientación del tejido epitelial. a) Horizontal b) Vertical.....	53
Fig. 4.13 Espectros de fluorescencia en tejido epitelial. a) Orientación del tejido vertical. b) Orientación del tejido horizontal.....	53
Fig. 4. 14 a) Variación de la intensidad de fluorescencia en tejido epitelial distintos días b) Normalización de la variación de la intensidad de fluorescencia en tejido epitelial distintos días.....	55
Fig. 4. 15. Modelo matemático Vs. Perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación. Esmalte con rodamina 6G.....	57
Fig. 4. 16 Modelo matemático Vs. Perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación. Tejido epitelial.....	58

LISTADO DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1.1 Típicos fluoróforos intrínsecos y su longitud de onda de excitación y emisión.....6

Tabla 1.2 Fluoróforos extrínsecos utilizados para la espectroscopia de fluorescencia.....6

CAPÍTULO IV

Tabla 4. 1 Porcentaje de la variación de potencia de salida de la fuente de excitación.....42

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

El tejido epitelial constituye uno de los cuatro tejidos fundamentales en un organismo. Este representa en su conjunto más del 60 % de todas las células del cuerpo humano. Los epitelios recubren superficies corporales, tanto internas como externas. Además, los derivados epiteliales son las principales células secretoras del organismo y en algunos casos, como el hígado, forman el propio parénquima del órgano [1,2]. Los epitelios en general pueden clasificarse en tres tipos:

- Revestimiento o barreras selectivas de protección.
- Glandulares o secretorios.
- Sensoriales.

Una forma sencilla de clasificar los distintos tipos de epitelios es por su estructura [1]:

- Epitelio plano o escamas.
- Epitelio como cubos.
- Epitelio como columnas.

Los epitelios se adaptan estructuralmente para cumplir alguna o varias de las siguientes funciones [2,3]:

- Barrera de protección
- Transporte de material a lo largo de su superficie libre
- Absorción
- Síntesis y secreción
- Recepción de estímulos

Por otro parte, algunas de las patologías asociadas a epitelios son:

- Metaplasia, es la transformación patológica de un tejido adulto en otro tejido distinto, por lo general de la misma hoja blastodérmica. Las causas de metaplasia son múltiples, pero todas producen una irritación crónica del tejido [4].
- Esclerodermia, es la esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad generalizada del tejido conectivo que se caracteriza por engrosamiento y fibrosis de la piel y que compromete a órganos internos como el tracto gastrointestinal, pulmón, corazón y riñón. Se acompaña de anticuerpos relativamente específicos y de alteraciones de la microvasculatura [5].
- Dermatitis, es un trastorno cutáneo prolongado (crónico) que consiste en erupciones pruriginosas y descamativas. Es un tipo de eccema. La dermatitis atópica se debe a una reacción en la piel. Esta provoca picazón, hinchazón y enrojecimiento continuos. Las personas con dermatitis atópica pueden ser más sensibles debido a que su piel carece de ciertas proteínas que mantienen la barrera protectora contra el agua [6].
- Herpes labial simple, se caracteriza por una ampolla intraepidérmica, con grados variables de necrosis. Las alteraciones más características se observan en los núcleos de los queratinocitos epidérmicos, que muestran una marginación periférica de la cromatina, que aparece pegada a la membrana nuclear y el resultado son queratinocitos de núcleo balonizado, en anillo y con aspecto de vidrio esmerilado. En el citoplasma de estos queratinocitos, la anomalía más precoz es la presencia de vacuolización [7].

1.1.1 TÉCNICAS DE EVALUACIÓN EMPLEADAS EN EPITELIOS

En general no existe una misma técnica para evaluar todas las posibles alteraciones patológicas en tejidos. Las técnicas más comunes utilizadas para las alteraciones patológicas descritas en la anterior sección son:

Metaplasia utiliza dos técnicas. La Endoscopia, es una forma de mirar dentro del cuerpo mediante una sonda flexible que tiene una pequeña cámara y una luz en su extremo. Este instrumento se denomina endoscopio [8]. Biopsias, es la extracción de células o tejidos para ser examinados por un patólogo. El patólogo puede estudiar el tejido con un microscopio o someter las células o el tejido a otras pruebas. Hay muchos tipos diferentes de biopsias. Los tipos más comunes son: biopsia por incisión, biopsia por escisión y biopsia con aguja [9].

Esclerodermia utiliza una técnica denominada capilaroscopia periungueal, cuya importancia radica en que en los pacientes con Esclerosis Sistémica pueden verse dos patrones de alteración capilar que pueden predecir en meses e incluso en años la forma clínica antes de que aparezca otra sintomatología clínica. Los patrones son: Patrón lento, con dilatación de asas capilares por sus tres porciones arteriolar, capilar y venular. Patrón activo, con pérdida de asas capilares por destrucción de las mismas ya sea difusamente o de forma más típica en áreas vecinas a las zonas de dilatación [10].

Dermatitis se identifica los signos y síntomas clínicos desde la primera consulta se describe la morfología y topografía de la dermatosis. Se deben considerar las variaciones del cuadro clínico. Se recomienda el uso de la prueba del parche como prueba diagnóstica en pacientes con sospecha clínica de dermatitis por contacto de tipo alérgico. No existe evidencia que justifique el uso de exámenes de laboratorio y biopsia de piel como estudios de rutina para el diagnóstico de dermatitis por contacto [6,7].

Herpes simple labial puede diagnosticar revisando la zona de la boca afectada. Algunas veces, se toma una muestra de la úlcera y se envía a un laboratorio para un análisis más detallado. Los exámenes pueden incluir: Cultivo de virus, Pruebas de ADN del virus y Prueba de Tzanck en busca del VHS [6,7].

Por otra parte, las alteraciones patológicas en epitelio y tejido son acompañadas por cambios fundamentales en el entorno molecular que pueden ser analizados por espectroscopia de fluorescencia.

Estudios previos han demostrado el potencial de la espectroscopia de fluorescencia para proporcionar información espacial y temporal sobre los cambios moleculares e incluso

estructurales del tejido epitelial [11,3]. Por lo tanto, dicha técnica puede resultar en un medio objetivo de evaluación para monitorizar los componentes clave del proceso de cierre de heridas [3], la evolución fibrosis en tejido [12], delimitación de lesiones cancerígenas [3], etc. Sin embargo, existe aún un conocimiento limitado del proceso de fluorescencia en tejidos. Por consiguiente, es indispensable profundizar en el estudio del fenómeno de fluorescencia en medios altamente esparcidos, como el tejido epitelial, con el fin de mejorar nuestra comprensión del proceso de fluorescencia en tejidos.

1.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La espectrometría de fluorescencia también llamada fluorimetría o espectrofluorimetría es el estudio del proceso de absorción de una muestra al ser excitada con energía electromagnética y su proceso de emisión de fluorescencia a consecuencia del primero. Esta técnica en términos sencillos consiste en hacer incidir un haz de luz a la muestra bajo estudio y captar el espectro de luz emitido con el objetivo de determinar la presencia del o los fluoróforos de interés. Se le llama fluoróforos a aquellas moléculas o parte de las moléculas que tiene la capacidad de fluorescer. Algunos dispositivos comerciales empleados en este tipo de estudio son: espectrofluorómetros, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, citómetros de flujo, etc.

El espectro de excitación corresponde con el espectro de absorbancia. Ambos espectros son una representación de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias en función de la longitud de onda excitación. El uso de la espectroscopia de fluorescencia ha sido sugerido en diversas aplicaciones médicas como son: el monitoreo de cáncer en cuello uterino (ver Ref. 13), como sistema de fotografía de excitación de autofluorescencia para demarcar lesiones en piel de rápida proliferación celular (ver Ref. 14) y utilizado como un sistema de biopsia óptica para el análisis de tejidos (ver Ref. 15), por mencionar algunas.

1.2.1 FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un caso particular de fotoluminiscencia. Cuando la luz incide sobre una sustancia orgánica o inorgánica, interactúa con los componentes del medio y se producen fenómenos ópticos como la absorción, la reflexión y el esparcimiento, entre otros. En particular, existen sustancias que absorben la energía de la luz incidente de cierta longitud de onda y luego reemiten parte de esta energía a una mayor longitud de onda. Dependiendo de la naturaleza del estado excitado la fotoluminiscencia se puede dividir en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia [24]. Este fenómeno se representa gráficamente en el diagrama de Jablonski como se muestra en la Fig. 1.1 [16].

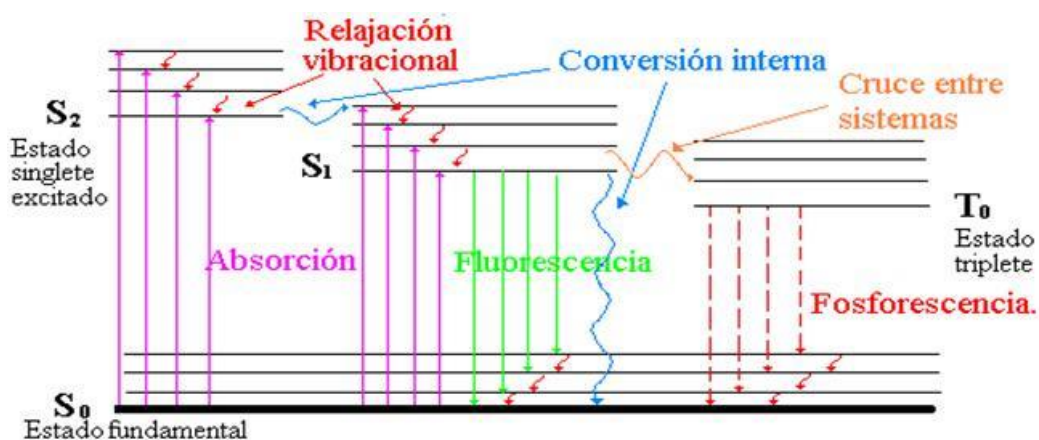


Fig. 1.1 Diagrama de Jablonski. Procesos probables de excitación y relajación [17]

En la Fig. 1.1 se muestra el diagrama de Jablonski donde se ilustra las transiciones electrónicas probables durante los procesos de excitación y relajación. Para fines prácticos la fluorescencia y la fosforescencia son procesos similares. La diferencia consiste en los tiempos de vida del fotón. Para la fluorescencia el tiempo de vida aproximado está en un rango de 10^{-9} - 10^{-7} s y para la fosforescencia de 10^{-3} - 10^{-2} s [18].

La fluorescencia en materiales biológicos puede ser de dos tipos: intrínseca y extrínseca. Siendo la primera aquella donde se excita a los elementos que componen al material biológico como proteínas y aminoácidos. Ejemplos de esto son el triptófano, tirosina, fenilalanina incluso el DNA, etc [19]. A estos elementos se les llama fluoróforos intrínsecos en la Tabla 1 se muestran algunos fluoróforos y su longitud de excitación y emisión.

Tabla 1.1 Típicos fluoróforos intrínsecos y su longitud de onda de excitación y emisión [19].

Fluoróforos intrínsecos.	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$
DNA, RNA	260	320
triptófano	275-295	330-340
tirosina	275	300
fenilalanina	260	280

Por otra parte, la fluorescencia extrínseca en materiales biológicos se refiere a aquella donde al material bajo estudio se le agrega un marcador fluorescente externo. Estos marcadores se les dan el nombre de fluoróforos extrínsecos. Ejemplos de algunos son: fluoresceína, TRITC, lucifer yellow, Rodamina 6G, etc. (ver Tabla 2) [20].

Tabla 1.2 Fluoróforos extrínsecos utilizados para la espectroscopia de fluorescencia [20].

Fluoróforos extrínsecos.	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$
Rodamina 6G	300-550	520-650
TRITC	535-545	570-580
lucifer yellow	430	540
Fluoresceína	470	550

1.3 POSIBLE HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO

La espectroscopía de fluorescencia, como técnica de diagnóstico de alteraciones patológicas en organismos, mide la radiación electromagnética que emana de la materia o que interactúa con ella. Su aplicación en áreas de la medicina se encuentra en la región del ultravioleta al infrarrojo cercano. Se emplea para el análisis de los cambios bioquímicos y morfológicos de los tejidos in vivo y ex vivo [21]. Se ha propuesto como herramienta auxiliar en el diagnóstico médico de enfermedades como son: diabetes (evaluación del cierre de úlceras), fibrosis hepática (cuantificación de fibrosis), cáncer (delimitación de lesiones), etc. En diferentes investigaciones científicas la espectroscopía de fluorescencia se ha presentado

una alta sensibilidad y especificidad cuando es comparada con la histopatología de los tejidos [22,23]

La concentración de fluoróforos puede ser atribuidos a varios eventos, por ejemplo a cambios químicos, estos pueden dejarse de producir o al contrario producirse más en estados de enfermedad. Del mismo modo, la distribución o la constitución del fluoróforo puede variar a lo largo del tejido, por ejemplo NADH es una molécula fluorescente en su forma reducida y no es fluorescente en su forma oxidada. El cambio en la microestructura (ambiente local) que rodea al fluoróforo puede tener efectos importantes en las propiedades de fluorescencia, como la eficiencia cuántica, la posición espectral del máximo de la emisión fluorescente, el ancho de su línea espectral y el tiempo de vida de la fluorescencia. Todos estos factores tienen un impacto significativo en la emisión de fluorescencia del tejido ya que varían sus propiedades ópticas [18].

Un factor importante en las diferencias asociadas con los estados de enfermedad del tejido, es la presencia de cromóforos no fluorescentes como la hemoglobina, ya que varían en concentración, dependiendo del estado y tipo de la enfermedad pueden absorber la luz a las longitudes de onda de la fluorescencia emitida por el tejido o también absorber longitudes de onda de la luz de excitación empleada en el análisis. Un ejemplo es el incremento de la vascularización del tejido tumoral debido a la angiogénesis, esto incrementa la hemoglobina que absorbe en el rango visible del espectro electromagnético [18].

1.4 MOTIVACIÓN

La Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT) del CCADET en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” desarrolla una línea de investigación en instrumentación biomédica, basada en espectroscopia de fluorescencia de UV para la evaluación de tejido. Actualmente se realizan estudios de regeneración de tejido epitelial y el estudio de tejido biológico fibroso por medio de esta técnica.

Es este trabajo de tesis propone diseñar e implementar un modelo de estudio para el análisis de espectroscopia de fluorescencia en tejido epitelial superficial bajo consideraciones

sencillas la cual nos brinde información útil para entender el fenómeno de fluorescencia en medios altamente esparcidos como lo es el tejido.

En la revisión de la literatura referente a esta investigación. En general todas las aplicaciones de espectroscopia de fluorescencia la fuente de luz (excitación) se encuentra a un ángulo de incidencia fijo. Uno de los aspectos a investigar en este trabajo de tesis es examinar exactamente ese aspecto. Por esta razón, se propone un modelo matemático para que valide el fenómeno bajo estudio el cual describa como es que se ve afectada la intensidad de fluorescencia cuando el ángulo de incidencia de la fuente de excitación varía su posición.

Se realiza un análisis del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación, lo cual nos permita mejorar las configuraciones de los instrumentos utilizados en la UIDT.

1.5 HIPÓTESIS

Cambios identificados en la fluorescencia intrínseca del tejido epitelial superficial como función del ángulo de incidencia de la energía de excitación pueden proporcionar información relacionada con diferentes estratos del tejido.

El modelo matemático utilizado para validar el fenómeno bajo estudio fue desarrollado por Dr. Humberto Contreras Tello (ver Ref. 25) visto desde una forma muy sencilla este modelo describe el perfil angular de la intensidad de luz retroesparcida por conjunto de partículas suspendidas en un medio acuoso. En este modelo la posición angular de la fuente de excitación es fija y el ángulo de observación es variable. Este trabajo de tesis hace la propuesta de utilizar este modelo matemático donde ahora las partículas suspendidas son los fluoróforos y el medio donde estén suspendidos es un medio sólido (en el capítulo II y III se explica más a detalle) para este caso el ángulo de incidencia de la fuente es variable y el ángulo observación es fijo.

Partiendo de ciertas suposiciones como la anteriormente descrita se hace la hipótesis que este modelo matemático puede utilizarse para describir el perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

1.6 OBJETIVO

Proponer, diseñar e implementar un modelo de estudio para el análisis de fluorescencia de tejido epitelial superficial.

Objetivos particulares

- Proponer y validar un modelo analítico de estudio del fenómeno de fluorescencia en tejido epitelial superficial.
- Diseñar e implementar un arreglo óptico para el estudio del fenómeno de fluorescencia en tejido epitelial superficial de fácil adquisición y manejo.
- Analizar los espectros de emisión de fluorescencia la transmitancia de la muestra.
- Estudiar las características de fluorescencia del tejido como función del ángulo de incidencia del haz de excitación y su relación con las propiedades ópticas del tejido.

1.7 METODOLOGÍA

La metodología llevada a cabo a lo largo del presente trabajo de investigación se presenta de manera individual en cada una de las experiencias desarrolladas en esta tesis.

- Propuesta de un modelo analítico del fenómeno de fluorescencia del tejido superficial.
- Diseño y determinación de componentes ópticos y electrónicos del arreglo experimental para la validación del modelo propuesto y la realización del fenómeno de fluorescencia en tejidos.
- Construcción y caracterización del arreglo óptico.
- Estimación del índice de refracción efectivo de las muestras y estudio del fenómeno de fluorescencia como función del ángulo de incidencia de la energía de excitación.
- Análisis de los espectros de emisión como función de ángulo de excitación.
- Validación del estudio.

1.8 ORGANIZACIÓN DEL DOCUMENTO

El presente documento está compuesto por IV capítulos. En el capítulo I hicimos una breve descripción de los antecedentes y resaltamos la importancia del trabajo reportado. Por otra parte, establecimos la hipótesis de nuestro estudio, así como el objetivo y la metodología empleada.

En el capítulo II se explicará las características, consideraciones y desarrollo del modelo matemático utilizado para describir la variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

En el capítulo III se describirá la metodología experimental empleada para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Por otra parte, se detalla el proceso desarrollado para la preparación de las muestras de bajo estudio, así como el diseño experimental empleado (reflexión y transmitancia).

En el capítulo IV se presentarán los resultados obtenidos en las distintas mediciones que se realizaron para validar el modelo matemático del fenómeno de fluorescencia bajo estudio. Se muestran las mediciones realizadas en modo de reflexión (para el tejido epitelial y la muestra de referencia) y en modo de transmitancia (para la muestra de referencia). Se realiza una comparación del modelo matemático propuesto contra y los resultados obtenidos en la muestra de referencia y tejido epitelial.

En el capítulo V se mencionan los aspectos más importantes obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

1.9 REFERENCIAS

- [1] Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez Y F.S. “Citología e histología vegetal y animal: biología de las células y tejidos animales y vegetales”. Cuarta Edición, Madrid, España Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, 2002
- [2] Ulrich Welsch, Johannes Sobotta, “Histología con 21 cuadros”, Primera Edición, Buenos Aires Bogotá Caracas Madrid México y Porto Alegre, Ed. Médica Panamericana, 2008.
- [3] Gutierrez-Herrera, E., Ortiz, A.E., Doukas, A. y Franco, W, “Fluorescence Excitation Photography of Epidermal Cellular Proliferation,” British Journal of Dermatology, 174(5), pp. 1086-1091. 2016
- [4] Pedro J Grases Galofré, Francesc Tresserra Casas y Roque Devesa Hermida, “Patología ginecológica : bases para el diagnóstico morfológico”, Primera Edición, Madrid, España Ed. Barcelona Masson, 2003
- [5] Jordi Carbonell Abelló, “Semiología de las enfermedades reumáticas”, Primera Edición, Madrid, España, Ed. Médica Panamericana, 2005.
- [6] Frederik M. Dearborn, “Enfermedades De La Piel”, Primera Edición, India, Ed. B. Jain Publishers Pvt. Ltd. New Delhi (India), 2005
- [7] Thomas P Habif, “Enfermedades de la piel: diagnóstico y tratamiento”, Segunda Edición, Madrid, España, Ed. Madrid:Elsevier 2006.
- [8] U.S. National Library of Medicine, “Endoscopy”, Medical Encyclopedia. Disponible en línea: <https://medlineplus.gov/ency/article/003338.htm>
- [9] Instituto Nacional del Cáncer, “Biopsia”, Diccionario del Cáncer. Disponible en línea: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45164>
- [10] Institut Ferran de Reumatología, S.L., “Esclerodermia (esclerosis sistémica)”, National Library of Medicine, Disponible en línea: <http://www.institutferran.org/esclerodermia.htm>

- [11] Wang, Y., Gutierrez-Herrera, E., Ortega-Martinez, A., Anderson, R. R., y Franco, W., “UV Fluorescence Excitation Imaging of Healing of Wounds in Skin: Evaluation of Wound Closure in Organ Culture Model,” *Lasers in Surgery and Medicine*, 48(7), pp. 678-685. 2016
- [12] Gutierrez-Herrera, E., Perez-Garcia, A., Aleman-Garcia, N., Ortega-Martinez, A., Sánchez-Pérez, C., Franco, W. y Hernández-Ruiz, J., “Preservation media analysis for in vitro measurements of endogenous UV fluorescence of liver fibrosis in bulk samples,” *SPIE Proc.* 10062, 100621C. 2017
- [13] Belarmino Segura Giraldo, “Espectroscopía óptica de fluorescencia aplicada al soporte de diagnóstico médico de precánceres de tejidos de cuello uterino”, Tesis doctoral, Facultad de ingeniería y arquitectura depto. de eléctrica, electrónica y computación.
- [14] Gutierrez-Herrera, E., Ortiz, A.E., Doukas, A. y Franco, W., “Fluorescence Excitation Photography of Epidermal Cellular Proliferation”, *Brit. J. Dermatol.* **174**(5), 1086-1091 (2016).
- [15] Corti Agustina, Garavaglia y Mario, “Biopsia. Descripción general y resultados preliminares por espectroscopia óptica de autofluorescencia”, Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina. 2. Centro de Investigaciones Ópticas (CCT-CONICET La Plata y CIC), Gonnet, La Plata, Argentina, 3ras Jornadas ITE 2015.
- [16] Hans Beyer, “Manual de química orgánica”, Ed. Reverté 1987.
- [17] Luis Guillermo Durango Mercado, “Electrónica orgánica”, Disponible en línea: <http://www.c2o.pro.br/automacao/ar01s20.html>
- [18] María Teresa Martínez Estrada y Claudia L. Moctezuma González, “Espectrofluorimetría”, Trabajo final del curso Métodos Físico-Químicos de Biotecnología Universidad Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Mayo 2006
- [19] Alan Fersht, “Estructura y mecanismo de los enzimas” Editorial: Reverte, S.A.
- [20] Joseph R. Lakowicz, “Principles of fluorescence spectroscopy”, Disponible en línea: <http://macromoleculas.unq.edu.ar/teoricos/Fluorescencia.ppt>
- [21] Joseph R. Lakowicz, “Principles of fluorescence spectroscopy”, Disponible en línea: <http://macromoleculas.unq.edu.ar/teoricos/Fluorescencia.ppt>

[22] N. Ramanujan. Spectroscopy fluorescence in vivo, Encyclopedia of analytical chemistry, Ed. Meyers (2000).

[23] T. Breslin, F. Xu, G. Palmer, C. Zhu, K. Gilchrist, N. Ramanujam. Autofluorescence and Diffuse Reflectance Properties of Malignant and Benign Breast Tissues. Annual surgery Oncology. 11 (2004) 65-70.

[24] D.M. Jameson, Introduction to Fluorescence, 1.^a ed., Ed. CRC Press, New York 2014.

[25] Humberto Contreras Tello, “Refractometría óptica de medios opacos”, México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de Estudios de Posgrado, 2016.

CAPITULO II

MODELO MATEMÁTICO DE FLUORESCENCIA INTRINSECA EN TEJIDO SUPERFICIAL

2.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis es dar una explicación al fenómeno de fluorescencia intrínseca en tejidos cuando el haz de excitación incide a distintos ángulos, como se muestra en la Fig. 2.1. En este capítulo se propone un modelo matemático que permita describir la variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

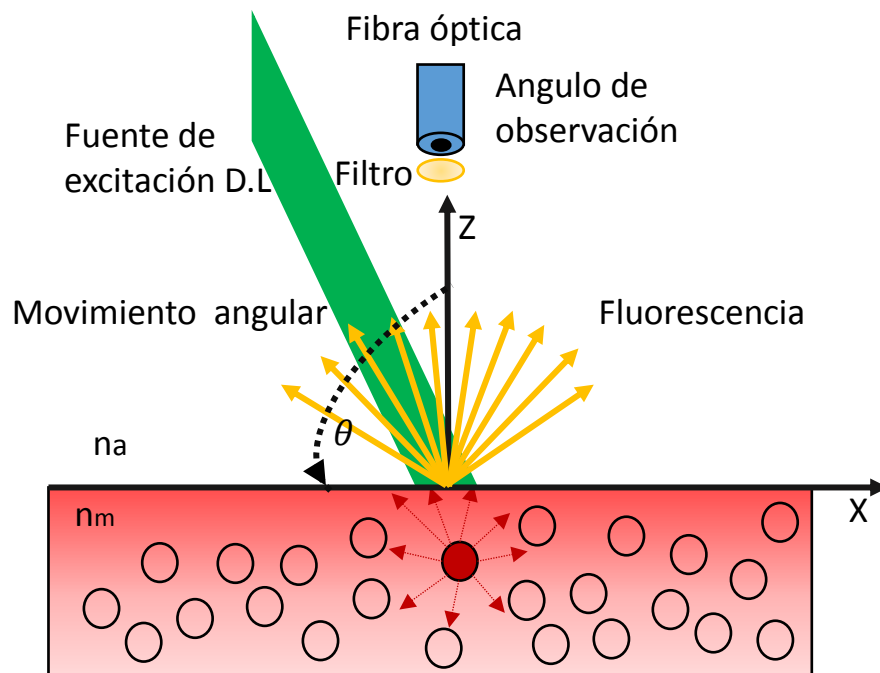


Fig. 2.1. Fenómeno de fluorescencia en una película delgada con solución de rodamina 6G.
 n_a = Índice de refracción del aire, n_m = Índice de refracción del medio.

Existen modelos matemáticos reportados en literatura que son empleados para describir el fenómeno de fluorescencia en tejidos biológicos. Cada modelo considera ciertas características como: la cantidad y concentración de fluoróforos, la estructura intrínseca del material biológico, absorción y dispersión de cada elemento que contenga el tejido biológico etc. [1-5]. Ejemplo de lo anteriormente mencionado es: Belarmino Segura Giraldo (ver Ref. 1) donde se describe un modelo matemático para la detección de precánceres en tejidos de cuello uterino, este modelo matemático está basado en la ley de Beer-Lambert donde el tejido es representado como una sola capa, la cual es infinitamente profunda con respecto a la capacidad de penetración de la luz incidente, considera a cada uno de los fluoróforos asociados a esta enfermedad, hace un promedio de la cantidad de luz que absorben y emiten cada uno de los fluoróforos. Con esta información puede predecir la intensidad de fluorescencia cuando la enfermedad está o no está presente.

Por otra parte, Fischer (ver Ref. 2) emplea un modelo matemático para describir el crecimiento de biopelículas de hongos en superficies marinas. En este caso, se utiliza la función de Gompertz (esta función es aplicada en diferentes campos para describir el crecimiento poblacional del objeto en interés ver Ref. 13), esta función se utiliza para describir el crecimiento de los hongos que forman la biopelícula. Lo divide en tres fases en las cuales establecen: la aparición del hongo, su crecimiento y formación de la biopelícula. En cada una de las fases, se estima la intensidad de fluorescencia que se obtiene en cada fase del crecimiento de la biopelícula y de esta forma, estimar en qué fase se encuentra la formación de la biopelícula.

En general, dado que el tejido biológico es un material muy complejo existen diversos modelos matemáticos, cada uno de ellos describe la fluorescencia en función de las incógnitas o variables a examinar. Casi todos los modelos matemáticos empleados para describir fluorescencia utilizan simulaciones numéricas del Método Monte Carlo (ver ref. 2, 3, 4, 5) por ser una técnica relativamente sencilla y con buenos resultados. Para geometrías y procesos complejos el Método Monte Carlo resulta ser una técnica numérica adecuada. Sin embargo, en la revisión de la literatura en este trabajo de tesis, se observó que los modelos matemáticos que se utilizan para describir el fenómeno fluorescencia, enfocan su atención a las características del tejido, que si bien esto no es una idea errónea, son pocas investigaciones

toman en cuenta al ángulo de incidencia de la fuente de excitación [1,2]. Generalmente reportan, que hicieron simulaciones por computadora para encontrar el ángulo de incidencia de la fuente de excitación óptimo, para obtener la mayor intensidad de fluorescencia pero no son claras y no cuentan con un trabajo experimental que describa como varia la intensidad de fluorescencia si la fuente de excitación varia el ángulo de incidencia de la fuente de excitación o en ciertos casos no es un factor de relevancia, lo único que buscan es obtener o no, fluorescencia. Por esta razón, se utilizó un modelo matemático que sea capaz de describir la variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca en tejidos en función de ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

El modelo matemático utilizado en este trabajo de tesis fue desarrollado por el Dr. Humberto Contreras Tello (ver Ref. 6). Este modelo matemático es capaz de describir el comportamiento de la luz difusa retroesparcida de “ n ” partículas suspendidas en un medio líquido. Su desarrollo matemático consiste en describir el campo esparcido por una de las partículas que esta suspendidas en un medio que llama matriz, posteriormente se propaga el campo electromagnético radiado por esa partícula hasta el detector y se calcula la intensidad correspondiente, después se suma incoherentemente la intensidad debida a cada partícula para así obtener una ecuación que describa el comportamiento de la luz retroesparcida. Este modelo es capaz determinar parámetros como es el índice de refracción (IR) para medios altamente dispersores. Por lo cual, se hizo utilizo este modelo matemático el cual se modificó para poder aplicarlo al fenómeno de fluorescencia en tejidos. Se hacen ciertas suposiciones para poder aplicar este modelo matemático las cuales son: las partículas suspendidas son fluoróforos de R6G y el medio líquido donde están suspendidas es tejido epitelial. El objetivo en el desarrollo siguiente es establecer un modelo matemático sencillo y bajo consideraciones simples que sea capaz de describir como se ve afectada la intensidad de fluorescencia intrínseca de un tejido en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Esto con el propósito ampliar el conociendo que se tiene sobre la fluorescencia intrínseca en tejidos biológicos.

El modelo matemático a continuación descrito se lleva a cabo de la siguiente manera: se establece el campo esparcido por un fluoróforo, posteriormente se propaga el campo electromagnético radiado por ese fluoróforo hasta el detector y se calcula la intensidad

correspondiente, posteriormente se suma incoherentemente la intensidad debida a cada fluoróforo para así obtener una ecuación que describa el comportamiento de la luz retroesparcida.

2.2 MODELO MATEMÁTICO DE FLUORESCENCIA

Suponemos un conjunto de fluoróforos como se muestra en la Fig. 2.2, inmersos en un material infinito y transparente, llamado matriz, el cual tiene un índice refracción n_m los fluoróforos están localizados dentro del semi-espacio $z < 0$. Se asume que la matriz es no magnética y con una permeabilidad magnética μ_0 . Además, todos los fluoróforos son considerados como esferas de radio a y su centro está localizado en $z < -a$.

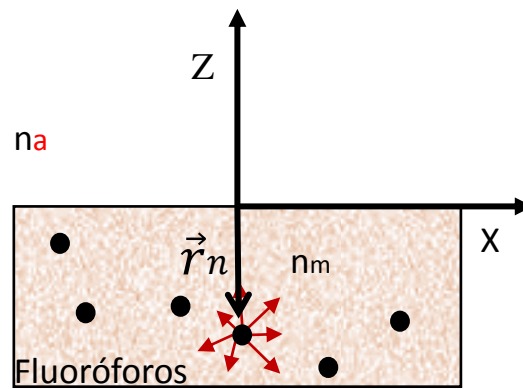


Fig. 2.2 Esquema de radiación de una fluoróforo.
 n_a = Índice de refracción del aire, n_m = Índice de refracción del medio.

El modelo considera uno de los fluoróforos, el n -ésimo fluoróforo localizado en la posición \vec{r}_n como se muestra en la Fig. 2.2. Se propaga el campo emitido por este fluoróforo a través del medio matriz y posteriormente lo transmitimos dentro del medio incidente, el cual es considerado aire. Entonces, se propaga el campo transmitido al plano de detección, el cual por simplicidad se asume que está en el mismo medio y en la región de campo lejano. Obteniendo así la intensidad debida al campo emitido por el n -ésimo fluoróforo en el plano de detección. Finalmente se suma incoherentemente la intensidad debida a todos los

fluoróforos localizados en otras posiciones en la muestra, tomando el promedio configuracional, el cual asume una densidad uniforme de probabilidad de encontrar alguno de los fluoróforos debajo de la interface.

Se asume una onda plana monocromática con frecuencia ω en la matriz que incide desde el semi-espacio negativo ($z < 0$) a el sistema aleatorio de fluoróforos. El campo eléctrico esparcido por algún fluoróforo puede ser expresado en términos de la corriente inducida dentro del fluoróforo, para el n-ésimo fluoróforo “n” situado aleatoriamente en una fracción de volumen localizado en “ r_n ” se puede escribir de la siguiente forma [7]:

$$E_n^s(r; r_n) = i\omega\mu_0 \int_{V_n} d^3r' \vec{G}(r; r') \cdot J_n^{\text{ind}}(r') \quad (1)$$

Donde:

$V_n \Rightarrow$ Es el lugar ocupado por el n-ésimo fluoróforo.

$\vec{G}(r; r') \Rightarrow$ Es función diádica de Green del vector de la ecuación de Helmholtz a la frecuencia ω con la condición a la frontera de la radiación de Sommerfeld [8].

Para puntos de observación fuera de los fluoróforos esto quiere decir ($r \notin V_n$) podemos usar la función de Green diádica [7]

$$\vec{G}(r; r') = \frac{i}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{1}{k_z} (I - \widehat{k}_\pm \widehat{k}_\pm) \exp[i\widehat{k}_\pm \cdot (r - r')] \quad (2)$$

Donde $K_\pm = k_x \widehat{a}_x + k_y \widehat{a}_y + k_z \widehat{a}_z$, $k_z = \sqrt{k_0^2 n_m^2 - k_x^2 - k_y^2}$ Los signos + y - son usados para indicar $z > z'$; $z < z'$, respectivamente.

En general podemos escribir [7]:

$$J_n^{\text{ind}}(r') = \frac{1}{i\omega\mu_0} \int_{V_n} \vec{T}_n(r', r'') \cdot E_n^{\text{exc}}(r'') d^3r'' \quad (3)$$

Donde:

$E_n^{\text{exc}}(r'') \Rightarrow$ Es el campo que excita el n-ésimo fluoróforo.

$\vec{T}_n(r', r'') \Rightarrow$ Es el operador de transición para el n-ésimo fluoróforo [7].

$\vec{T}_n(\mathbf{r}', \mathbf{r}'')$ es el operador de transición lineal, el cual obedece a la ecuación integral de Lippmann-Schwinger [7]. Este corresponde al operador de transición para el fluoróforo embebido en un medio matriz. El campo debido el **n-ésimo** fluoróforo incluye la contribución de los demás pero descarta el campo originado por el mismo. Sin embargo considera el campo que el ejerce sobre los demás.

Para puntos con $z > 0$ (esto es más grande que la coordenada z' para todos los puntos ($\mathbf{r} \in V_n$)) podemos escribir,

$$E_n^s(\mathbf{r}) = -\frac{\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{1}{k_z} (\mathbf{I} - \widehat{k}_\pm \widehat{k}_\pm) \cdot \int_{V_n} d^3r' \exp[ik_+ \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_n)] J_n^{\text{ind}}(\mathbf{r}') \quad (4)$$

Haciendo un cambio de variable $\mathbf{r}' = \mathbf{r}_s + \mathbf{r}_n$ donde \mathbf{r}_s es el vector de posición relativo al centro del fluoróforo el cual está en \mathbf{r}_n .

Así, se obtiene $\mathbf{r}_s = \mathbf{r}' + \mathbf{r}_n$ y $d^3r' = d^3r_s$, reescribimos.

$$E_n^s(\mathbf{r}) = -\frac{\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[ik_+ \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_n)]}{k_z} (\mathbf{I} - \widehat{k}_\pm \widehat{k}_\pm) \cdot \int_{V_n} d^3r_s \exp(-ik_+ \cdot \mathbf{r}_s) J_n^{\text{ind}}(\mathbf{r}_s; \mathbf{r}_n) \quad (5)$$

La Ec. (5) se puede escribir como:

$$E_n^s(\mathbf{r}) = -\frac{\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[ik_+ \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_n)]}{k_z} s(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) \quad (6)$$

Donde:

$$s(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) = (\vec{\mathbf{I}} - \widehat{k}_+ \widehat{k}_+) \cdot \int_{V_n} d^3r_s \exp(-ik_+ \cdot \mathbf{r}_s) J_n^{\text{ind}}(\mathbf{r}_s; \mathbf{r}_n) \quad (7)$$

La Ec. (7) se asume que el medio matriz \mathbf{n}_m tiene un índice de refracción efectivo \mathbf{n}_{eff} además es una superposición lineal de ondas planas inhomogéneas viajando en el medio.

Tomando en cuentas estas condiciones: \mathbf{k}_z y \mathbf{k}_+ se rempazan con

$$k_{eff} = k_x \hat{a}_x + k_y \hat{a}_y + k_z \hat{a}_z \text{ y } k_{eff} \text{ respectivamente donde } k_{eff} = \sqrt{k_0^2 n_{eff}^2 - k_x^2 - k_y^2}$$

por lo cual se obtiene:

$$E_n^s(r) = -\frac{\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[ik_{eff}(r-r_n)]}{k_z^{eff}} s^{eff}(k_x, k_y; r_n) \quad (8)$$

De la Ec. (8) se interpreta que las corrientes inducidas dentro de los fluoróforos como las corrientes inducidas en exceso de aquellas corrientes que deberían de ser generadas en la matriz de índice de refracción n_{eff} y dentro del volumen ocupado por el fluoróforo pero sin el fluoróforo. Se le agrega el superíndice $s^{eff}(k_x, k_y)$ para indicar que este término viene de usar las corrientes efectivas inducidas en exceso sobre aquellas inducidas en la matriz de índice de refracción s^{eff} donde el **n-ésimo** fluoróforo se encuentra localizado.

Se observa que el kernel de la Ec. (8) está dividido por k_z^{eff} el cual tiene un mínimo cuando $k_x^2 + k_y^2 = \text{Re}(n_{eff}^2)$ el cual puede tomar el valor de cero si el índice de refracción es real. Los valores k_x y k_y que satisfacen la última ecuación corresponden a ondas planas viajando paralelas a la superficie del sistema, esto es al plano $\mathbf{z} = \mathbf{0}$

Si se considera que el semi-espacio negativo donde la luz incide tiene un índice de refracción diferente na (aire) y se asume como real, se introduce una interfaz plana en $\mathbf{z} = \mathbf{0}$ entre dos índices reales, na y nm . Al introducir esta interface tanto el campo incidente sobre los fluoróforos como el campo que excita alguno de las fluoróforos se modifica. El campo incidente se refracta y es multiplicado por un coeficiente de transmisión en la interface, y el campo que excita los fluoróforos incluirá ahora múltiples reflexiones de la interface.

El detector es colocado en el medio incidente a una gran distancia de la interface y viendo hacia la superficie. Por lo tanto se propagan las ondas planas de cada fluoróforo al plano de detección.

Primero propagamos los campos justo antes de la interface en esto es en $\mathbf{z} = \mathbf{0}^-$

Por lo tanto:

$$E_n^s(r)|_{z=0^-} = \frac{-\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[ik_x x + ik_y y - ik_z^{eff} z_n]}{k_z^{eff}} s^{eff}(k_x, k_y; r_n) \quad (7)$$

Por otra parte el campo del otro lado de la interface en $\mathbf{z} = \mathbf{0}^+$ se obtiene al dividir el campo en su transversal eléctrico **TE**, y transversal magnético **TM**, y multiplicar por el correspondiente coeficiente de transmisión.

Por lo tanto:

$$E_n^s(r)|_{z=0^+} = \frac{-\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[ik_x(x-x_n) + ik_y(y-y_n) - ik_z^{eff}z_n]}{k_z^{eff}} \vec{t}(k_x, k_y) \cdot s^{eff}(k_x, k_y; r_n) \quad (8)$$

Donde:

$$\vec{t}(k_x, k_y) \cdot s^{eff}(k_x, k_y; r_n) = t^{TE} S_{TE}^{eff}(k_x, k_y; r_n) \hat{S}_{TE} + t^{TM} S_{TM}^{eff}(k_x, k_y; r_n) \hat{S}_{TM} \quad (9)$$

Las variables t^{TE} y t^{TM} son los coeficientes de transmisión para ondas polarizadas **TE** y **TM** respectivamente. Los vectores unitarios **TE** y **TM** que aparecen en la Ec. (9) están dados por

$$\hat{S}_{TE} = (\mathbf{k}^{eff} \times \hat{\mathbf{a}}_z) / |\mathbf{k}^{eff} \times \hat{\mathbf{a}}_z| \quad \text{y} \quad \hat{S}_{TM} = (\mathbf{k}^{eff} \times \hat{S}_{TE}) / |\mathbf{k}^{eff} \times \hat{S}_{TE}| \quad (10)$$

Puesto que únicamente la componente \mathbf{z} de \mathbf{k}^{eff} puede ser compleja, podemos ver que \mathbf{S}_{TE} es un vector real unitario. Sin embargo, $\hat{\mathbf{S}}_{TM}$ es en general un vector unitario complejo.

Ahora, se introduce el factor $\exp(i\mathbf{k}_z^p \mathbf{z})$ con $k_z^p = \sqrt{k_0^2 n_p^2 - k_x^2 - k_y^2}$ en el kernel de la Ec. (8) para propagar el campo dentro del medio incidente del índice de reflexión \mathbf{n}_a . Podemos propagar el campo de la Ec. (8) en el campo lejano y usar el método de fase estacionaria [8] para evaluar el campo. Para este fin, asumimos que el sistema se extiende a lo largo pero finita área sobre $\mathbf{z} = \mathbf{0}$ y llevamos el punto de observación muy lejos comparado a las dimensiones laterales del sistema.

Por lo tanto:

$$E_n^s(\mathbf{r}) = \frac{\omega \mu_0}{8\pi^2} \frac{4\pi^2 i k_p \cos \theta}{2\pi r} \frac{\exp(-i k_z^{eff} z_n)}{k_z^{eff}} \vec{t}(k_1, k_2) \cdot s^{eff}(k_1, k_2; r_n) \quad (11)$$

Donde $\mathbf{k}_1 = k_p \sin \theta \cos \phi$ y $\mathbf{k}_2 = k_p \sin \theta \sin \phi$ son coordenadas del punto de fase estacionaria en el espacio $(\mathbf{k}_1, \mathbf{k}_2)$ y $(\mathbf{r}, \theta, \phi)$ son las coordenadas esféricas del punto de observación. Por otra parte:

$$k_z^{eff} = \sqrt{(\omega^2/c^2) n_z^{eff} - k_1^2 - k_2^2} \quad (12)$$

En general la Ec. (12) es complejo $k_z^{eff} = \text{Re}\{k_z^{eff}\} + i \text{Im}\{k_z^{eff}\}$ puesto que n_{eff} es en general un número complejo para coloides turbios. Incluso en la ausencia de absorción [9], [10]. El perfil de intensidad angular en la zona lejana está dado para magnitud del promedio en el tiempo del vector de Poynting $\mathbf{S} = \frac{1}{2} \text{Re}(\mathbf{E} \times \mathbf{H}^*)$

$$S = \frac{1}{2} |E|^2 \text{Re} \left(\frac{k}{\omega \mu} \right) = \frac{1}{2} |E|^2 \frac{k_p}{\omega \mu_0} \hat{\mathbf{r}} = \frac{1}{2} n_p \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} |E|^2 \hat{\mathbf{r}} \quad (13)$$

Dado que los vectores unitarios $\hat{\mathbf{S}}_{TE}$ y $\hat{\mathbf{S}}_{TM}$ son ortogonales uno al otro se obtiene:

$$|\vec{t}(k_x, k_y) \cdot s^{eff}(k_x, k_y; r_n)|^2 = |t^{TE}|^2 |S_{TE}^{eff}(k_x, k_y; r_n)|^2 + |t^{TM}|^2 |S_{TM}^{eff}(k_x, k_y; r_n) \hat{\mathbf{S}}_{TM}|^2 \quad (14)$$

Las funciones $S_{TE}^{eff}(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_y; r_n)$ y $S_{TM}^{eff}(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_y; r_n) \hat{\mathbf{S}}_{TM}$ son proyecciones de $s^{eff}(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_y; r_n)$ sobre los vectores unitarios $\hat{\mathbf{S}}_{TE}$ y $\hat{\mathbf{S}}_{TM}$.

Estas funciones hacen referencia a los coeficientes de transmisión de Fresnel. Es razonable agregar estos coeficientes dado que la fuente de excitación varía angularmente su posición. Un análisis riguroso de cómo calcular dichos coeficientes de Fresnel a partir de las ecuaciones de Maxwell se pueden encontrar en [11].

En este caso los coeficientes de transmisión t^{TE} y t^{TM} y son proporcionales a k_z^{eff}

$$t^{TE} = \frac{2 \mu_2 k_z^i}{\mu_2 k_z^i + \mu_1 k_z^t} \quad t_E^{TM} = \sqrt{\frac{\mu_1 \epsilon_2}{\mu_2 \epsilon_1}} \frac{2 \epsilon_2 k_z^i}{\epsilon_2 k_z^i + \epsilon_1 k_z^t} \quad (15)$$

Donde k_z^i y k_z^t en este caso son el número de onda incidente y transmitido, respectivamente.

Para obtener el perfil de intensidad debemos sumar la contribución de todos los fluoróforos que esparcen y tomar el promedio configuracional sobre su posición, forma, tamaño e índice de refracción. Podemos asumir que todos los fluoróforos son equivalentes y que la densidad de probabilidad de encontrar el centro de algún fluoróforo debajo de la interface es uniforme y está dada por $1/V$ donde V es el volumen accesible al fluoróforo. Si asumimos que hay N fluoróforos podemos escribir

$$I(r) = \frac{1}{2} \rho \frac{k_p^2 \cos \theta}{4\pi r} \int_{-L/2}^{L/2} \int_{-L/2}^{L/2} \int_0^{-\infty} dx_n dy_n dz_n \frac{\exp[2\text{Im}(K_z^{eff})Z_2]}{|K_z^{eff}|^2} \langle |\vec{t}(k_x, k_y) \cdot S^{eff}(k_x, k_y; r_n)|^2 \rangle \quad (16)$$

Donde:

$\rho = N/V \Rightarrow$ Es la densidad en número de fluoróforos.

$\langle \cdot \rangle \Rightarrow$ Es el promedio configuracional de las variables apropiadas.

Se asume que las dimensiones laterales de la película ocupan un volumen V tan grande comparado a la profundidad del volumen iluminado k_1 y k_2 de la Ec. (11) están en función del ángulo de observación θ y ϕ que hacen referencia a posición donde se encuentra el elemento sensor. Esta dependencia angular se puede omitir ya que como se mencionó en el capítulo I su posición es fija. Por otra parte, la fuente de excitación es la varia angularmente su posición; por tanto, es indispensable considerar en el modelo la dependencia de angular de incidencia del haz de excitación ϑ_i , lo que modifica el valor de los coeficientes de Fresnel [11].

Se agrega la variable μ_z que está relacionada con el haz de incidencia de la fuente de excitación y es la diferencia del índice de refracción del medio que rodea la muestra y el índice de refracción del medio matriz, esta variable se puede relacionar con el coeficiente de penetración de la luz incidente sobre la muestra [12]

$$\mu_z = k_0^{Exc} \text{Im}(n_{eff_{Exc}}^2 - n_a^2 \sin^2 \vartheta_i)^{1/2} \quad (17)$$

Donde:

$n_{effExc}^2 \Rightarrow$ Es el índice de refracción efectivo de la película en la longitud de onda de la fuente de excitación.

$n_a^2 \Rightarrow$ Es el índice de refracción del medio que lo rodea la película, es decir aire.

$\vartheta_i \Rightarrow$ Angulo de incidencia del haz de excitación y está relacionada con la posición angular de la fuente.

Hasta este momento no contamos con una técnica para estimar el valor numérico de la densidad de número de fluoróforos ρ y el radio r . Dado que su valor no depende de la posición angular de la fuente de excitación, hace la suposición de que su valor debe ser constante que llamaremos I_0 .

Después de realizar el álgebra el modelo de intensidad de fluorescencia intrínseca en función del ángulo de incidencia del haz de luz queda de la siguiente forma:

$$I(\vartheta_i) = \frac{I_0 (T^{TE}(\vartheta_i) + T^{TM}(\vartheta_i))}{k_0^{Exc} \text{Im}(n_{effExc}^2 - n_a^2 \sin^2 \vartheta_i)^{1/2} + 2k_0^{Emi} \text{Im}(n_{effEmi})} \quad (18)$$

Donde:

$T^{TE} \Rightarrow$ Coeficiente de transmisión de Fresnel transversal eléctrica.

$T^{TM} \Rightarrow$ Coeficiente de transmisión de Fresnel transversal magnética.

$k_0^{Exc} \Rightarrow$ Longitud de onda de excitación en el medio.

$k_0^{Emi} \Rightarrow$ Longitud de onda de emisión en el medio.

$n_a^2 \Rightarrow$ Índice de refracción del aire.

$n_{effExc}^2 \Rightarrow$ Índice de refracción de excitación. Parte real e imaginaria.

$n_{effEmi}^2 \Rightarrow$ Índice de refracción de emisión. Parte real e imaginaria.

Se debe de aclarar que el modelo matemático anteriormente descrito está diseñado para describir el perfil de variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación en modo de reflexión y como se mencionó en el capítulo I y se mostrara en los capítulos III y IV se realizaron mediciones en modo de

transmitancia. Por lo cual, para aplicar este modelo matemático en este caso en particular, se debe realizar un ajuste, el cual consiste, en multiplicar los coeficientes de Fresnel por una función “ $e^{-2\text{Im}(\mathbf{K}_z \mathbf{h})}$ ” exponencial negativa que multiplica dos veces el imaginario del producto de la componente “ \mathbf{K}_z ” del vector de onda incidente en la dirección “ z ” por el espesor de la muestra “ \mathbf{h} ”.

2.3 CONCLUSIONES

El modelo matemático anteriormente desarrollado es capaz de describir la intensidad de fluorescencia intrínseca en tejidos en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación para dos situaciones (modo de reflexión y transmitancia). El cual está basado en consideraciones simples que permiten entender cómo es que la intensidad de fluorescencia se ve afectada cuando el ángulo de incidencia de la fuente de excitación varía su posición a diferentes ángulos. Como sabemos el tejido biológico es un material muy complejo, la intensidad de fluorescencia puede verse afectada por distintas variables, la principal, por obvias razones es la composición del tejido.

Pero solo si por un momento, hacemos la suposición de que las características del tejido no fueran tan relevantes y momentáneamente nos permitimos omitir estas. Por lo cual, se hizo la propuesta de utilizar una muestra de referencia, que tuviera el mismo espectro de fluorescencia pero sin las características del tejido. Es decir, La estructura, propiedades de absorción y esparcimiento. Dado este argumento, se utilizó un material traslucido, con poca absorción y que no dispersara la luz. El material empleado fue esmalte de uñas transparente el cual se mezcló con la solución de R6G para formar una película delgada aproximadamente del mismo grosor del epitelio utilizado (100 μm). La idea principal es tener una muestra de referencia la cual nos permita comparar la variación de intensidad de fluorescencia entre el tejido epitelial que es un material altamente dispersor de la luz y la muestra de referencia.

En el siguiente capítulo se presentan la metodología experimental empleada para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación en modo de reflexión y transmisión. Por otra parte, se detalla el proceso

desarrollado para la preparación de las muestras de estudio, así como el diseño experimental empleado.

2.4 REFERENCIAS

- [1] Belarmino Segura Giraldo, “Espectroscopía óptica de fluorescencia aplicada al soporte de diagnóstico médico de precánceres de tejidos de cuello uterino”, Tesis doctoral, Depto. de eléctrica, electrónica y computación. Facultad de ingeniería y arquitectura, Colombia, 2009.
- [2] Matthias Fischer, “Marine Biofilm Formation Dynamics From Sensor Development To Field”, Diplomado en ingeniería, Chiloniensis Sigillum Collegii Scient. Math. Et. Nat. Kiel, Juli 2013
- [3] J. Campoy, R. Alcarria A, P. González-Marcos, “Study of the optical behavior of skins using Monte Carlo techniques”, Volume 31, Issue 3, Pages 161-170, July–September 2015
- [4] María Cecilia Valentinuzzi, “Análisis por fluorescencia de rayos x: implementación de guías de haces en reflexión total”, Presentado ante la Facultad de Matemática, Astronomía y Física como parte de los requerimientos para la obtención del grado de Doctora en Física de la Universidad Nacional de Córdoba, Marzo 2008.
- [5] P. Guerra, J. Aguirre, J. E Ortuño, M.J Ledesma, J.J Vaquero, M. Desco, J. Ripoll y A. Santos, “Simulador Monte Carlo para el estudio de la propagación de la luz en el tejido”, Actas del XXVII congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica.
- [6] Humberto Contreras Tello, “Refractometría óptica de medios opacos”, México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de Estudios de Posgrado, 2016.
- [7] L. Tsang, J. A. Kong, and K.-H. Ding, “Scattering of Electromagnetic Waves, Theories and Applications”, vol. 6. John Wiley & Sons, 2004
- [8] A. Ishimaru, “Electromagnetic wave propagation, radiation, and scattering”, 1st edition. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice Hall, 1991.

- [9] C. F. Bohren and D. R. Huffman, “Absorption and scattering of light by small particles”, 1st edition, John Wiley & Sons, Sep 1983.
- [10] A. Ishimaru, “Wave Propagation and Scattering in Random Media”, 1st edition, Wiley-IEEE Press, Feb. 1999.
- [11] J.M. Cabrera, F.J. López y F. Agulló López, “Óptica Electromagnética: Fundamentos” Primera Edición, ed. Addison-Wesley, (2001)
- [12] H. Contreras-Tello, A. García-Valenzuela. “Refractive index measurement of turbid media by transmission of backscattered light near the critical angle”, Applied Optics Vol. 53, Issue 21, pp. 4768-4778 (2014).
- [13] C. A. Martínez, A. P. Rodríguez, A. Jiménez y C. Manrique, “Mathematical description of the gompertz function applied to animal’s growth” Rev. med. vet. zoot., Volume 57, Issue 1, p. 76-80,. eISSN 2357-3813. Print ISSN 0120-2952, (2010)

CAPITULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 INTRODUCCIÓN

El presente capítulo describimos la metodología experimental empleada para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Por otra parte, detallamos el proceso desarrollado para la preparación de las muestras de estudio, así como el diseño experimental empleado.

En general, los elementos básicos que se utilizan para obtener espectros de fluorescencia, consiste en una fuente de luz (i.e. energía de excitación), la muestra que se va analizar, filtros ópticos pasabanda (Opcionales, dependerá de las necesidades de cada arreglo) y un detector óptico con el cual registrar la fluorescencia en las longitudes de onda de interés. Esta configuración aplica para todos los arreglos experimentales por sencillos o complejos que estos sean. Las diferencias entre cada arreglo dependerá para que fueron diseñados.

Algunos ejemplos de arreglos experimentales reportados en literatura que son empleados para medir el fenómeno de fluorescencia son: caracterización de papel, monitorización del crecimiento de biopelículas, evaluación de heridas, por mencionar algunos [1-3]. De la Rosa y Bautista (ver Ref. 1) describen las propiedades de esparcimiento y fluorescencia de papel bond. El arreglo experimental consiste en una fuente de excitación laser a un ángulo de incidencia fijo, una esfera integradora conectada a un fotodiodo modelo MRD500 para medir la intensidad de fluorescencia. Fisher (ver Ref. 2) monitoriza el crecimiento de biopelículas de hongos en superficie marinas. En este caso, el sistema sigue el mismo esquema, una fuente de luz, la muestra de estudio (biopelículas de hongos) y un detector óptico conectado a una semiesfera a través 20 fibras ópticas. Gutierrez-Herrera (ver Ref. 3) demuestra la eficacia de un sistema de fotografía de excitación de autofluorescencia para demarcar lesiones en piel de rápida proliferación celular. Por otra parte, el equipo Fluorolog del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscopica (LUCE) del CCADET es un

sistema más complejo empleado en estudios de fluorescencia en aplicaciones son diversas. Cada uno de estos sistemas es diferente en su configuración con base en su aplicación. Sin embargo, cada uno de ellos cuenta con los elementos básicos previamente descritos.

El arreglo experimental propuesto en este trabajo de tesis, tiene como propósito determinar las características de fluorescencia del tejido como función del ángulo de incidencia del haz de excitación y su relación con las propiedades ópticas.

3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

En esta sección hacemos mención de los tres materiales básicos que utilizamos para la preparación de las muestras de estudio. Posteriormente describimos la metodología que desarrollamos para la elaboración de la película de esmalte y preparación de tejidos epiteliales de estudio.

Rodamina 6G: Con el propósito de reducir el costo del arreglo experimental se emplearon elementos ópticos en el rango del espectro visible, por lo que usamos este colorante para teñir las muestras de tejido ya que fluoresce en el rango de 540-640nm al excitarlo a 532 nm. La solución de rodamina 6G (R6G) tiene las siguientes concentraciones: 5ml H₂O, 6ml metanol y 14.43mg R6G.

Tejido Epitelial: Se utilizó tejido epitelial de cebolla banca ya que es un epitelio de fácil disposición y conservación; además presenta características ópticas similares a otros tejidos biológicos [5]. Las muestras se obtienen de la parte cóncava (i.e. lado interno) de la hoja. Esto debido a que se observó que el epitelio se desprende más fácilmente en la parte interna. Además, las muestras se obtienen de la parte central de cada hoja (ver Fig. 3.1) debido a que esta región del epitelio tiene un grosor constante. Tomamos 5 hojas de 3 diferentes de cebollas y el grosor medido fue de $100 \pm 5 \mu\text{m}$.

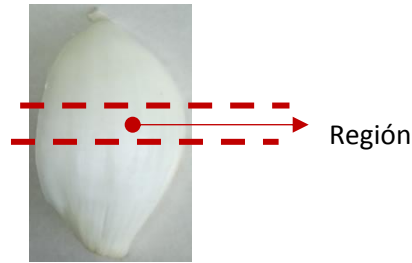


Fig. 3.1 Cebolla blanca

Barniz de uñas: Empleamos esmalte transparente de uñas (principales componentes: polímero acrílico de metiletilcetona, acetato de butilo, acetato de tributilo) de la marca MC NAIL para formar una película delgada usando una técnica tipo serigrafía a manera de referencia. Este material se seleccionó porque tiene poca absorción, como se muestra en el siguiente capítulo y nula o baja dispersión de la luz como podemos ver en la Fig. 3.2

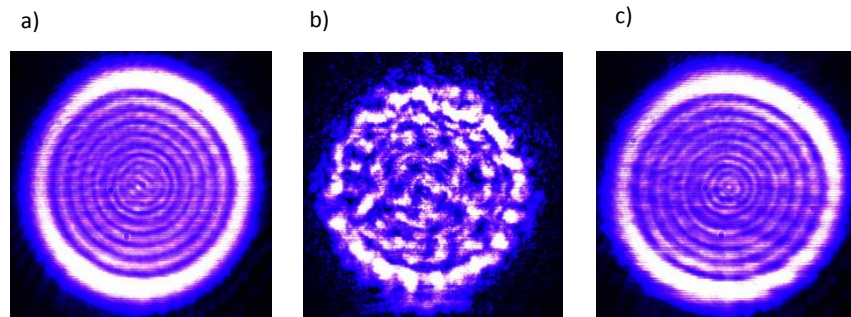


Fig. 3.2 a) Spot del haz incidente sobre la CCD b) Spot observado después de transmitirse a través de una capa de 100 μm de pegamento UHU c) Spot observado después de transmitirse a través de una capa de 100 μm de esmalte de uñas.

En la Fig. 3.2a se muestra los anillos generados por el fenómeno de difracción del spot del láser incidiendo en la cámara CCD. En Fig. 3.2b se muestra con propósitos comparativos, el fenómeno de difracción más la dispersión generada una vez que el haz pasó a través de una película delgada de 100 μm de pegamento UHU. En Fig. 3.2c se observa el fenómeno de difracción más la dispersión generada una vez que el haz pasó a través de una película delgada de 100 μm de esmalte para uñas. Por tanto, podemos asegurar que la película de esmalte mostró una baja dispersión óptica.

3.2.1 DEPOSICIÓN DE UNA PELÍCULA DELGADA FLUORESCENTE

Con el fin de contar con una muestra de referencia apegada a las características del medio descrito en el modelo del capítulo 2, fabricamos una película delgada de esmalte (i.e. matriz) con partículas de R6G (fluoróforos). Se probaron diferentes estrategias y materiales que cumplieran con los requisitos anteriormente descritos (poca absorción y nula o baja dispersión de la luz) la metodología empleada con la que se obtuvo el mejor resultado se describe a continuación:

1. En un portaobjetos limpio se coloca dos tiras de cinta masking tape en forma paralela formando una canaleta (ver Fig. 3.3a). La separación entre las cintas será el ancho de la película, en nuestro caso fue de 5mm aproximadamente. Con el fin de lograr un espesor de 100 μm fue necesario colocar 8 capas de cinta masking para cada tira.
2. En un envase limpio colocamos 5ml de esmalte de uñas con 15 μl de la solución de R6G y se movió con un agitador hasta homologar la mezcla (1 minuto aproximadamente).
3. La mezcla preparada se coloca sobre la canaleta con una jeringa (ver Fig. 3.3b) procurando que la solución se deposite solo en la canaleta y no sobre la cinta.
4. Realizamos el rayado de la mezcla depositada en la canaleta por medio de una espátula de un extremo del portaobjetos al otro, el cual se encontraba inclinado a 45° (ver Fig. 3.3c). La presión ejercida debe ser aquella que nos permita deslizarnos libremente sobre las tiras sin provocar que la mezcla derrame.
5. Cubrimos la película formada para evitar la contaminación de la muestra y se dejó secar por un tiempo aproximado de 5 minutos. Al seguir esta metodología se logra una película con R6G como se muestra en la Fig. 3.3d.

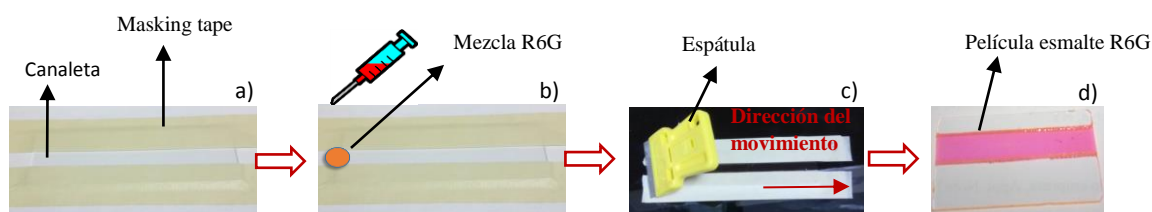


Fig. 3.3 Esquema de elementos empleados en la deposición de una película de esmalte fluorescente.

3.2.2 TINCIÓN DE TEJIDO EPITELIAL SUPERFICIAL

Para llevar a cabo la tinción del tejido epitelial de cebolla se probaron diferentes estrategias. A continuación se detalla la metodología que proporcionó la coloración del tejido más homogénea y con una repetitividad aceptable.

1. Extraemos la muestra de epitelio con un bisturí de la región previamente explicada.
2. Realizamos un corte en la parte central del trozo obtenido y con una pinza separamos una pequeña porción del epitelio, sin dañar el tejido subyacente, obteniendo así una muestra del epitelio con aspecto de una fina película traslúcida.
3. En caso de ser necesario recortamos las muestras con el propósito mantener un área de muestra similar a lo largo distintas mediciones (cuadrado de 5mm por lado).
4. Con una micropipeta de 10 μL (marca Eppendorf Research) se deposita una gota de 8 μL de R6G en el centro del portaobjetos.
5. Colocamos cuidadosamente la muestra de epitelio por el lado de la superficie no hidrófoba sobre la gota de R6G. De este lado se asegura una tinción uniforme del tejido. Al seguir esta metodología se logra una tinción como la observada en la Fig. 3.4.



Fig. 3.4 Tejido epitelial de cebolla teñido con R6G. Imagen obtenida con microscopio con un aumento de 10X

Con la finalidad de validar el modelo matemático descrito en el capítulo 2 se realizaron mediciones del fenómeno de fluorescencia en las muestras anteriormente descritas. Para en el tejido epitelial y la película de esmalte en modo de reflexión se obtuvo el perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Por otra parte, para la película de esmalte en modo de transmisión se obtuvo la variación de la potencia de excitación transmitida en función del ángulo incidencia, en estas mediciones hicieron para diferentes casos (medir la variación de la potencia a distintas longitudes 532 y 560nm, cambiar la longitud de la fuente de excitación y medir la potencia transmitida en la película de esmalte sin y con R6G) estas mediciones se realizaron con la finalidad de entender mejor el fenómeno bajo estudio. Los resultados serán explicados en el capítulo IV.

3.3 ARREGLO EXPERIMENTAL.

El arreglo experimental propuesto para medir el perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación se presenta en la Fig. 3.5.

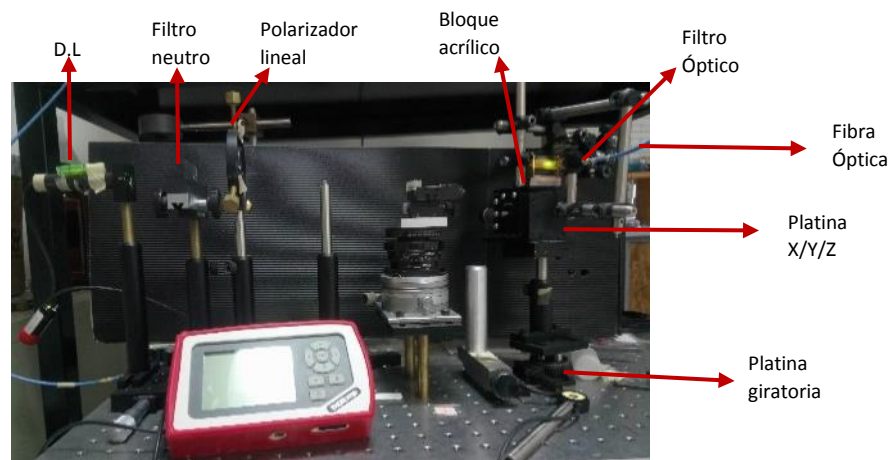


Fig. 3.5 Imagen del arreglo experimental en modo de reflexión para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

En la Fig. 3.5 se observa el arreglo experimental implementado. La muestra bajo estudio se coloca en un portaobjeto, el cual se inserta en un bloque de acrílico ranurado con dimensiones de 2 x 0.5 x 0.5 cm de largo, ancho y espesor, respectivamente. El bloque de acrílico se fija

sobre una platina de desplazamiento x, y, z (MBT616D, Thorlabs U.S) para realizar ajustes de alineación. Esta montura, a su vez, está colocada sobre una platina giratoria (CR1/M-27, Thorlabs U.S.) controlada con una interfaz en Matlab. Lo anterior con el fin de variar la posición angular de la muestra con respecto al haz incidente (fuente de excitación). Para garantizar que el spot del láser siempre incide en la misma posición a pesar del giro de la muestra, la primera superficie del substrato se alineó al eje de rotación de la platina, el cual intersecta el eje óptico del arreglo.

Por otra parte, la fuente de excitación empleada es un diodo láser de 5mW a 532nm (220406057, Lasiris C.A), que se fijó fuera de la plataforma giratoria. Con el propósito de controlar la potencia y el plano de polarización del haz de excitación, colocamos un filtro neutro de densidad variable (OD: valores de densidad óptica) y un polarizador lineal frente al diodo láser.

Para llevar a cabo la medición de fluorescencia en modo de reflexión, utilizamos un espectrofotómetro portátil (USB4000, Ocean Optics), una fibra óptica multimodal (UV/SR-VIS High OH content, Ocean Optics) y un filtro óptico pasalargos con longitud de onda de corte a 550nm (FGL550, Thorlabs U.S). La fibra y el filtro óptico (a la entrada de la fibra) se fijaron sobre la platina giratoria y en posición normal a la muestra. Esto con el fin de conservar el punto de observación normal a la muestra a lo largo del registro del perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia. El registro de los espectros de emisión de las muestras se realizó por medio del programa SpectraSuite de Ocean.

Como se mencionó anteriormente se realizó un arreglo experimental en modo de transmisión para medir la variación de la potencia de excitación transmitida en función del ángulo incidencia como se muestra en la Fig. 3.6.

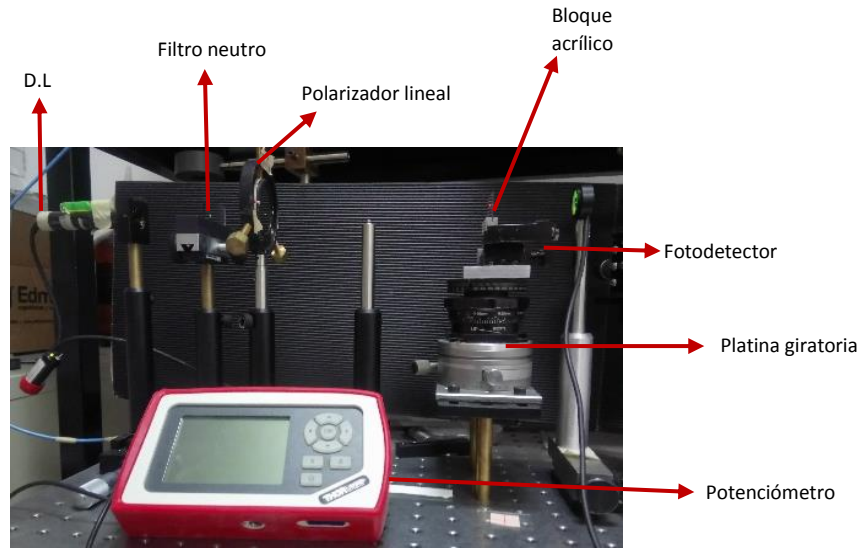


Fig. 3. 6 Arreglo experimental para medir la componente coherente y difusa de la potencia transmitida por la muestra

En la Fig. 3.6 se observa el arreglo experimental implementado. Al igual que el arreglo previo, la muestra se coloca sobre un bloque de acrílico que se encuentra encima de una platina giratoria. Para controlar el ángulo de incidencia del haz sobre la muestra. La fuente de excitación, filtros neutro y polarizador lineal son los mismos que en el montaje original. Para el modo de transmitancia, el fotodetector (S120VC, Thorlabs U.S) se colocó en el eje óptico del arreglo conectado a un potenciómetro (PM320E Thorlabs U.S) para cuantificar la potencia transmitida en función del ángulo de incidencia de la energía de excitación.

3.4 CONCLUSIONES

En el presente capítulo describimos los elementos básicos y la metodología desarrollada para la elaboración de las muestras (tejido epitelial teñido con R6G y película de esmalte con R6G) las cuales se utilizaron validar el modelo matemático utilizado para el análisis del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Por otra parte se presentan los arreglos experimentales propuestos en modo de reflexión (medir la variación de la intensidad de fluorescencia) y

modo transmisión (cuantificar la potencia de excitación transmitida por la muestra) los elementos óptico y mecánicos que se utilizaron para su montaje.

En el siguiente capítulo se presentan los resultados obtenidos en las diferentes mediciones que se realizaron para la muestra de referencia y el tejido epitelial. Se realiza una comparación de los resultados experimentales con el modelo matemático propuesto en el capítulo 2.

3.5 REFERENCIAS

- [1] J. de la Rosa y F.J. Bautista, “Optical properties of paper at 337.1nm”, *Rev. Mex. Fis.* **51** (1), 110–113 (2005).
- [2] Matthias Fischer, “Marine Biofilm Formation Dynamics From Sensor Development To Field”, Diplomado en ingeniería, Chiloniensis Sigillum Collegii Scient. Math. Et. Nat. (2013)
- [3] Gutierrez-Herrera, E., Ortiz, A.E., Doukas, A. y Franco, W, “Fluorescence Excitation Photography of Epidermal Cellular Proliferation”, *Brit. J. Dermatol.* **174**(5), 1086-1091 (2016).
- [4] Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, “Folleto informativo”
Disponible en línea: web.ccadet.unam.mx/contenido/poster%20LUCE.pdf
- [5] W. Wang y C. Li “Measurement of the light absorption and scattering properties of onion skin and flesh at 633 nm”, *Postharvest Biol Tec* **86**, 494-501 (2013)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos en las distintas mediciones que se realizaron con la finalidad de validar el modelo matemático utilizado. En este capítulo se presenta de la siguiente forma: se muestran la caracterización de la muestra de referencia y la fuente de excitación, los resultados obtenidos en la muestra de referencia después los resultados para el tejido epitelial teñido con R6G y al último una comparación de los resultados experimentales con el modelo matemático propuesto.

Con la finalidad de que el lector tenga una idea clara de las distintas mediciones que se realizaron. A continuación se explica breve las mediciones en el orden que se muestran más adelante y la razón de porque se realizaron:

- Caracterización de la muestra de referencia.

Se realizó una medición para conocer el espectro de transmitancia de la película de esmalte con y sin R6G esto para saber si la muestra cumplía con los requisitos descritos en el capítulo II y III (poca absorción y baja o nula dispersión).

- Caracterización de la fuente de excitación.

Variaciones de en la intensidad de potencia de la fuente de excitación, afectan la intensidad de fluorescencia por lo cual fue necesario saber la variación de potencia de excitación en un lapso determinado de tiempo y en distintos días.

- Intensidad de fluorescencia VS. Variación de la fuente de excitación.

Esta medición se realizó para conocer cuál es la respuesta de fluorescencia cuando se tienen variaciones en potencia de la fuente de excitación.

- Mediciones para distintas regiones (muestra de referencia).

Dado las dimensiones de la muestra de referencia era necesario saber si la concentración de fluoróforos era homogénea.

- Medición de la intensidad de fluorescencia en muestra de referencia en distintos días. Con la finalidad de saber que tan repetibles eran las mediciones en distintos días.
- Medición de la intensidad de fluorescencia en muestra de referencia respecto al tiempo.

Ya que la muestra fue sometida a numerosas mediciones, fue necesario saber, si muestra podría verse afectada (degradada) por la incidencia constante de la fuente de excitación.

- Potencia transmitida en la muestra de referencia con una fuente de excitación distinta. Conocer el comportamiento de la luz transmitida cuando se le hace incidir una longitud de onda diferente a la de excitación de la R6G.
- Potencia transmitida en la muestra de referencia: Sin filtro y con filtro óptico. Conocer el comportamiento la potencia transmitida en la muestra de referencia con y sin filtro óptico a distintas longitudes de observación 532 nm y 560 nm respectivamente.
- Potencia transmitida en la muestra de referencia: con y sin R6G. Observar la variación de la potencia transmitida cuando no existen efectos de absorción de la rodamina.
- Orientación del tejido epitelial. Diferencias de colocar el tejido epitelial en dos posiciones distintas.
- Medición de la intensidad de fluorescencia en tejido epitelial en distintos días. Con la finalidad de saber que tan repetibles eran las mediciones en distintos días.

Por otra parte, se realiza un pequeño resumen de los objetivos y la metodología desarrollada en este trabajo de tesis. Se diseñó e implemento un modelo de estudio para el análisis de fluorescencia intrínseca en tejido epitelial superficial. Por lo cual, se realizó un arreglo experimental que permita obtener el perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en

función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Se realizaron mediciones en modo de reflexión y transmisión para entender con claridad el fenómeno bajo estudio.

El tejido epitelial utilizado es epitelio de cebolla ya que es un material de fácil disposición y conservación el cual por simplicidad del arreglo experimental se tiñó con un fluoróforo ampliamente utilizado en fluorescencia (R6G). Se utilizó una película de esmalte con R6G el cual sirva como referencia.

Por último, los resultados obtenidos con la película de esmalte y el tejido epitelial son comparados con el modelo matemático, el cual validara el estudio desarrollado en este trabajo de tesis.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA DE REFERENCIA Y FUENTE DE EXCITACIÓN.

Se realizaron distintas mediciones para caracterizar la película de esmalte como hemos mencionado anteriormente esta debía cumplir con ciertas características (poca absorción y dispersión). Esto, con la finalidad de utilizarlo como referencia en el estudio de fluorescencia. El material que se utilizó fue un esmalte de uñas transparente el cual se mezcló con rodamina 6G. Posteriormente, se depositó sobre un portaobjetos formando una capa delgada de 100μ que es el ancho aproximado del epitelio de cebolla. Las mediciones que se realizaron para comprobar que el material era el indicado fueron: primero (*esta medición se explicó en el capítulo III pero para un mejor entendimiento del lector se repite nuevamente*) se depositó una capa de esmalte de uñas transparente SIN rodamina 6G y se realizó una medición para observar cuanta luz dispersaba. Para esto, se utilizó una cámara CCD (DCC1645C, Thorlabs U.S) y un haz laser se tomó una fotografía del haz incidente sobre la cámara después se colocó la película del esmalte frente la cámara y se tomó nuevamente una fotografía los resultados los podemos ver en la Fig. 3.2c del capítulo III.

En la Fig. 3.2c se observa el fenómeno de difracción más la dispersión generada una vez que el haz pasó a través de una película delgada de 100 μm de esmalte para uñas. Por tanto, podemos asegurar que la película de esmalte mostró una baja dispersión óptica.

Posteriormente se midió la transmitancia del esmalte CON y SIN rodamina para observar absorción luz. Para ello, se utilizó el equipo “*Espectrofotómetro UV-VIS-NIR Cary 5000*” ubicado Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) se obtuvo el espectro de transmitancia en tres situaciones: El portaobjetos sin muestra, la película de esmalte de uñas transparente y película de esmalte de uñas transparente mezclado con R6G rodamina 6G (ver Fig. 4.1).

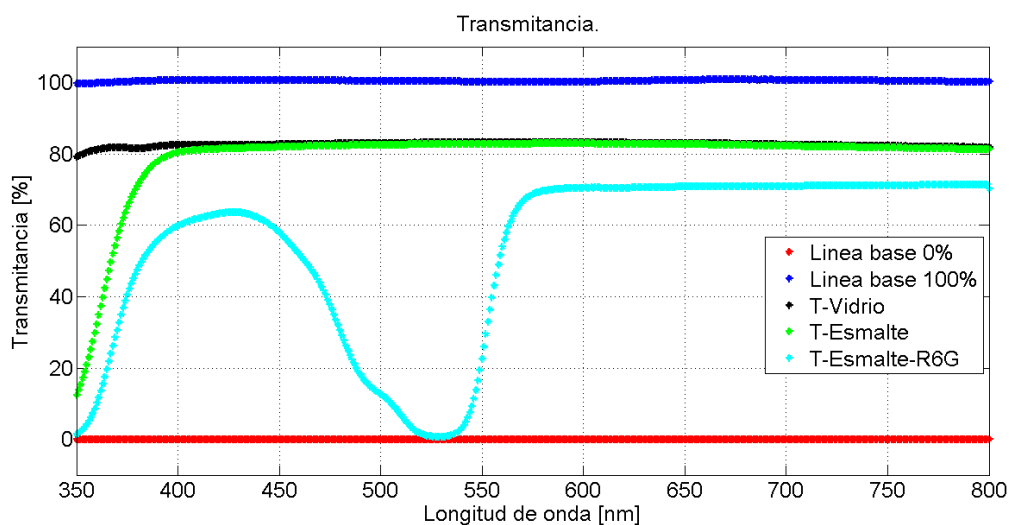


Fig. 4.1 Espectro de transmitancia en distintas muestras de la muestra.

En la Fig. 4.1 se observa el espectro de transmitancia en tres situaciones: el portaobjetos sin muestra, la película de esmalte sin y con R6G. Las líneas azul y roja corresponden a las líneas base 100% y 0% de transmitancia respectivamente. Podemos observar en color negro la transmitancia del portaobjetos lo que indica que en un rango de 400 a 800 nm la transmitancia es constante, la luz que es absorbida solo por el portaobjetos es del 20%. En color verde se observa la transmitancia de la película de esmalte sin R6G como podemos notar en el rango de 400 a 800 nm se sobrepone al espectro del portaobjetos lo que indica que la película de esmalte no tiene absorción si la comparamos respecto al portaobjetos, la luz que se absorbe

es prácticamente del 20%. En color cian observamos el espectro de transmitancia de la película de esmalte con R6G podemos observar que en el rango de 600 a 800 nm es constante y la absorción de la luz es del 30% respecto a la línea base del 100% de transmitancia, pero a longitudes menores a 600nm la muestra de esmalte con R6G la absorción de la luz es considerable mayor comparadas a la línea base de transmitancia en el rango de 500 a 550 nm la absorción de la luz es mayor casi del 80% y en 540 nm la absorción de la luz es prácticamente del 100% lo que indica que la muestra de esmalte con rodamina 6G tiene una gran absorción es este rango y longitud.

Las variaciones en la fuente de excitación es una de las causa en la variación de la intensidad de fluorescencia. Por consiguiente, determinamos las variaciones de la potencia de salida de la fuente de excitación que se utilizó, con el fin de estimar los cambios en la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo asociados a cambios de la fuente. Por esta razón, se encendió la fuente de excitación durante una hora con la finalidad que se estabilizara térmicamente, una vez pasado ese lapso de tiempo se midió la potencia de salida durante 30 minutos se observó que las variaciones en potencia durante tres días consecutivos la variación porcentual de la potencia de salida durante los 30 minutos y los tres días consecutivos se puede ver en la Tabla 4.1.

Tabla 4. 1 Porcentaje de la variación de potencia de salida de la fuente de excitación.

Variación de la potencia. Día 1.	Variación de la potencia. Día 2.	Variación de la potencia. Día 3.	Variación a lo largo de 3 días
1.5%	2.3%	1.43%	7.21%

En la Tabla 4. 1 se observa que el día 2 tiene la mayor variación siendo esta del 2.3% lo que nos indica que en un día de medición las variaciones de la intensidad de fluorescencia pueden ser hasta del 2.3%. Lo que podemos concluir es que las variaciones de intensidad de la fluorescencia debidas a cabios de la potencia de excitación no serán mayores al 2.3% (*siempre y que la relación sea lineal*) en un lapso de 30 min. Sin embargo, en el día a día se observó una variación de hasta 7.21%. Lo que nos indica que mediciones realizadas en distintos días al ser comparadas tendrán una variación mayor en la intensidad de

fluorescencia debida a cambios de potencia de excitación. Dado estas variaciones en la potencia de excitación fue necesario conocer la respuesta de fluorescencia en función de la potencia de excitación, por lo cual, se realizó una medición la cual consistió en variar la potencia de la fuente de excitación y obtener los cambios de la intensidad de fluorescencia asociados a estos cambios los resultados se observan en la Fig. 4.2.

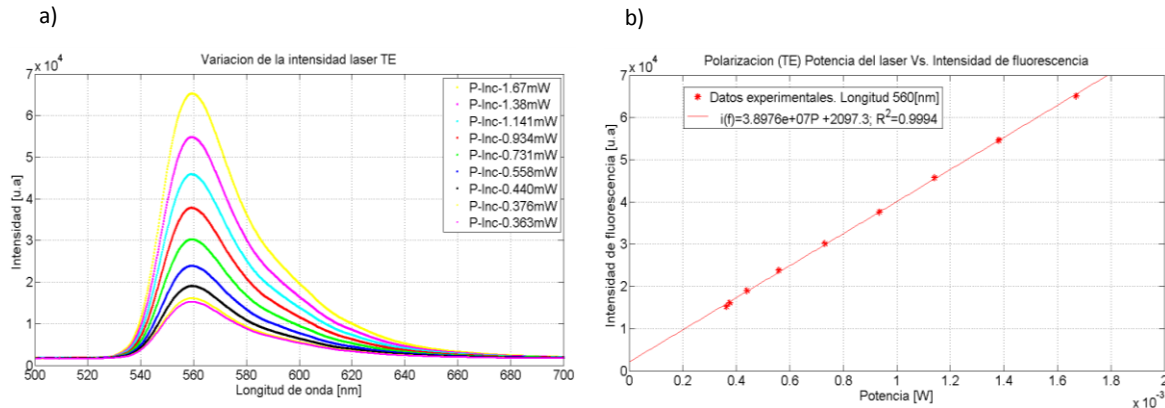


Fig. 4.2 a) Espectro de fluorescencia de película de esmalte con R6G al variar la potencia de excitación (532 nm). b) Intensidad de fluorescencia a 560 nm en función de la potencia de excitación.

En la Fig. 4.2a se observa el espectro de fluorescencia en una película de esmalte con R6G en función de la potencia incidente del láser de excitación. El ángulo de incidencia de la fuente se fijó a 25° . Podemos observar que a menor potencia de la fuente de excitación, menor será la intensidad de fluorescencia de la película. Por otra parte, en la Fig. 4.2b se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a 560 nm en función de la potencia de excitación a 532 nm. En esta se observa que el cambio de la intensidad de fluorescencia en función de la potencia de excitación es lineal. Además, las variaciones de la potencia de excitación no modifican la forma del espectro de fluorescencia y se conserva la longitud de onda de máxima emisión de la muestra; por lo que, cambios de intensidad de fluorescencia de 7.21% puede deberse a variaciones en la potencia de salida laser de excitación, pero estos cambios, solo modificarán la intensidad de fluorescencia y no el perfil angular de intensidad de fluorescencia.

4.3 MEDICIONES DEL PERFIL DE VARIACIÓN DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN FUNCIÓN DEL ÁNGULO DE INCIDENCIA DE LA FUENTE DE EXCITACIÓN (MUESTRA DE REFERENCIA)

Como se mencionó en el tercer capítulo, la película de esmalte con R6G se depositó sobre un portaobjetos la muestra tiene dimensiones aproximadas de 0.75 x 0.5 cm de largo y ancho respectivamente. Dado estas dimensiones, es necesario saber si la densidad de fluoróforos es homogénea. Una variable en la intensidad de fluorescencia se debe a la cantidad de fluoróforos. Es decir, a mayor el número de fluoróforos excitados mayor será la intensidad de fluorescencia. En la muestra se desconoce si en una región existen una cantidad mayor de fluoróforos que en otra. Lo cual afectara la intensidad de fluorescencia si cada medición se hace incidir el haz de excitación en diferentes regiones. Por esta razón, se dividió la en tres regiones como se observa en la Fig. 4.3.

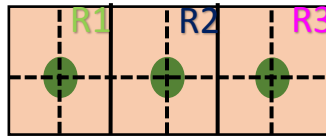


Fig. 4.3 Regiones donde se hizo incidir la fuente de excitación

En la Fig. 4.3 se observa las regiones donde hizo incidir el haz de excitación. El haz de excitación incide en la parte central de cada región, las cuales fueron marcadas con líneas de referencia para procurar en lo mayor mente posible que el haz incidente siempre incidiera en la misma área. Una vez identificado las regiones donde se haría incidir el haz de excitación se realizaron mediciones para saber obtener el perfil angular de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación en cada una de las regiones seleccionadas (ver Fig. 4.4).

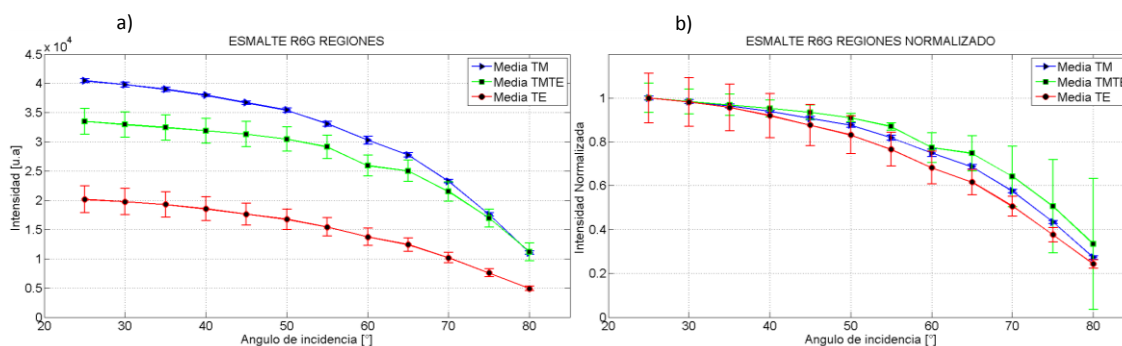


Fig. 4.4 a) Variación de la intensidad de fluorescencia en distintas regiones b) Normalización de la variación de la intensidad de fluorescencia en distintas regiones.

En la Fig. 4.4a se observa la variación de la intensidad de fluorescencia para distintas regiones y modos de polarización de la fuente. Los tres modos de polarizaciones de la fuente empleados fueron TM (Transversal Magnética), TE (Transversal Eléctrica) y 45° que llámanos TMTE. Estos perfiles corresponden a un día de medición. La variación máxima observada en las 3 regiones representa un cambio del 10.15% en intensidad de fluorescencia. De este porcentaje, cierta variación entre cada polarización puede deberse al 2.3% de la variación de potencia de excitación en un día de medición, por lo que podemos asumir que la variación en concentración de fluoróforos es homogénea y que las variaciones de intensidad entre cada región no es relativamente significativa. Podemos observar, un decaimiento en la intensidad de fluorescencia en la polarización TMTE en 60° este decaimiento puede deberse a errores de medición. En la Fig. 4.5b se muestra la normalización del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en las tres regiones para las tres polarizaciones de la fuente. Se observa que el perfil de decaimiento de fluorescencia en las tres polarizaciones es similar y que no existe una diferencia relevante entre las tres polarizaciones de la fuente. Observamos que, las desviaciones estándar de la polarización de la fuente TMTE son grandes a comparación de las demás polarizaciones a partir de los 60° esto puede deberse a errores de medición en esta polarización ya que al momento de normalizar el perfil de decaimiento este error repercute en las desviaciones estándar lo que origina que a partir de este grado sean grandes a comparación de las demás. Para conocer la respetabilidad de las mediciones se obtuvieron perfiles de variación de intensidad de fluorescencia durante cuatro días consecutivos. Con la finalidad de que, estas se hicieran en

las mismas condiciones se eligió la región dos, donde se hizo incidir el haz de excitación para obtener los perfiles de fluorescencia ver la Fig. 4.5.

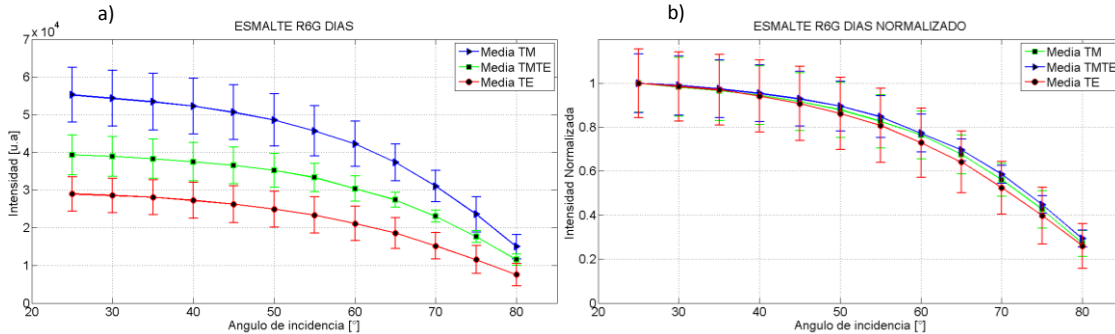


Fig. 4.5 a) Variación de la intensidad de fluorescencia en una película de esmalte con rodamina R6G distintos días
b) Normalización de la variación de intensidad de fluorescencia en una película de esmalte con rodamina R6G distintos días.

En la Fig. 4.5a se observa la variación de la intensidad de fluorescencia para distintos días y modos de polarización de la fuente. La variación máxima observada en los 4 días de mediciones representa un cambio del 15% en intensidad de fluorescencia. Este cambio en la intensidad de fluorescencia puede ser significativo pero el perfil de variación de intensidad de fluorescencia para los distintos modos de polarización de la fuente se conserva. Pero debemos recordar que, la variación máxima en la potencia de excitación de un día es del 2.3% y que la máxima variación de la potencia de excitación de día a día es del 7.21%. Por otra parte, a lo largo de las mediciones se registró un cambio en la temperatura ambiente el cual tuvo en un rango de 21 a 25°C, recordemos que la temperatura es una variable que afecta al fenómeno de fluorescencia. En la Fig. 4.5b se muestra la normalización del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia para los cuatro días de medición, para las tres polarizaciones de la fuente. Se observa que el perfil de decaimiento de fluorescencia en las tres polarizaciones es similar y que no existe una diferencia significativa en el perfil de decaimiento de fluorescencia en las tres polarizaciones de la fuente.

El tiempo en realizar una medición para las tres polarizaciones de la fuente de excitación es aproximadamente de 20 minutos, si se realiza más de una medición en un día sobre la misma región la intensidad de fluorescencia puede variar su intensidad. Por esta razón, se obtuvo el perfil de variación de fluorescencia a diferentes lapsos de tiempo los resultados se observan en la Fig. 4.6. Estas mediciones corresponden a un día de medición.

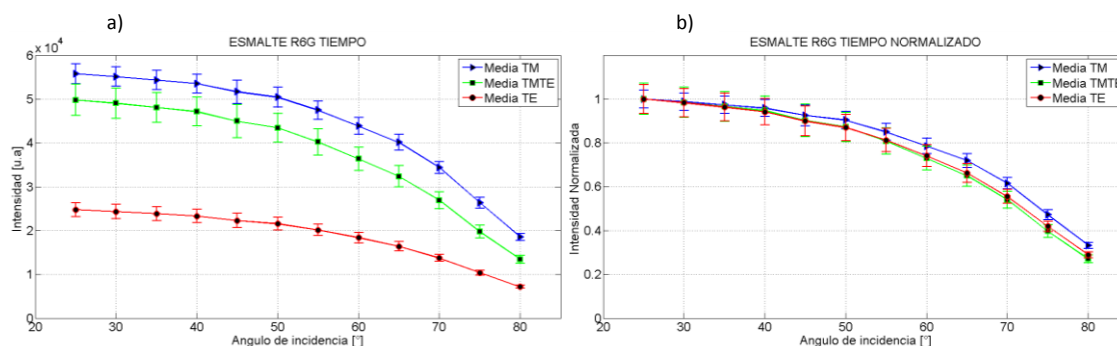


Fig. 4.6 a) Variación de la intensidad de fluorescencia a distintos lapsos de tiempo b) Normalización de la variación de la intensidad de fluorescencia a distintos lapsos de tiempo

En la Fig. 4.6a se muestran la variación de la intensidad de fluorescencia para distintos lapsos de tiempo y modos de polarización de la fuente. La variación máxima observada a lo largo del tiempo es de 6.84% en intensidad de fluorescencia. Observamos nuevamente que los perfiles para las distintas polarizaciones de la fuente tienen el mismo comportamiento lo que es congruente con los resultados obtenidos hasta el momento. En la Fig. 4.6b se muestra la normalización del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia para diferentes lapsos de tiempo, para los diferentes modos de polarización de la fuente. Estos resultados sugieren que la muestra en lapsos de tiempo de por lo menos 91 min no sufre cambios significativos en la intensidad de fluorescencia.

En general para cualquier medición ya sea distintas regiones, días o tiempo, el espectro de fluorescencia en la película de esmalte con rodamina 6G se observa en la Fig. 4.7.

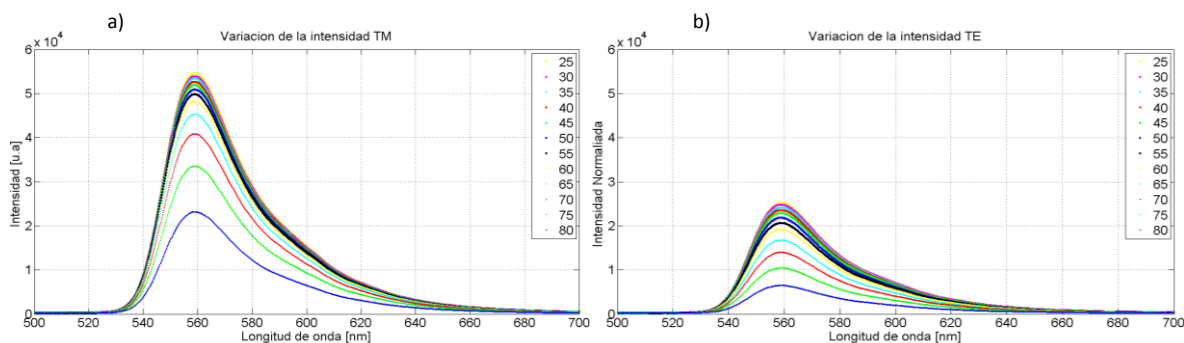


Fig. 4.7 Espectro de fluorescencia en función el ángulo de incidencia del haz de excitación a) Polarización TM
b) Polarización TE.

En la Fig. 4.7a y b se observa la variación del espectro de fluorescencia en función del haz de luz de excitación, para dos polarizaciones de la fuente de excitación. En las distintas mediciones que se realizaron el comportamiento fue similar exceptuando algunas variaciones en la intensidad de fluorescencia las cuales pueden ser atribuidas a cambios en la temperatura, variación en la potencia de excitación. Como se puede observar la intensidad de fluorescencia en el espectro disminuye su intensidad en función del ángulo de incidencia. De los espectros de fluorescencia en ambas polarizaciones TM y TE se calcularon los anchos espectrales para cada ángulo de incidencia y en ambos casos se encontró que el ancho espectral no depende del ángulo puesto que para cada espectro el ancho fue constante.

Como se mencionó en los capítulos II y III. Se realizaron pruebas en modo de transmisión para entender mejor el fenómeno bajo estudio. Una medición consistió en cambiar la longitud de onda de la fuente de excitación a 670 nm y medir la potencia transmitida en la película de esmalte con rodamina ver Fig. 4.8.

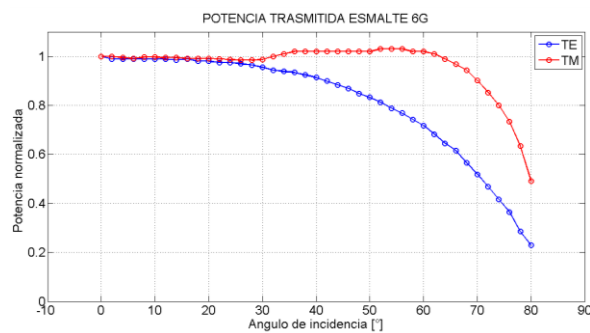


Fig. 4.8. Perfil de variación de potencia transmitida en función del ángulo de incidencia de excitación.

En la Fig. 4.8a y b se muestra el perfil de variación de potencia transmitida de la fuente de excitación y modos de polarización de la fuente. Los datos experimentales están normalizados. Lo primero que podemos observar es que la polarización TM se encuentra encima de la polarización TE, este comportamiento se observó a lo largo de las mediciones de intensidad de fluorescencia en modo de reflexión lo que es congruente con las mediciones obtenidas, sí solo, se compara la forma del perfil de variación. Por otra parte, se observa que la polarización TE parte de una mayor potencia y decae lentamente en función del ángulo de excitación, caso contrario cuando la polarización es TM donde se observa que empieza en un valor de potencia sube lentamente hasta 55° y posteriormente la potencia decae. Se observa en TM, el ángulo de Brewster este comportamiento que no se observa en los espectros de intensidad fluorescencia, lo que nos indica que ha esta longitud de onda de excitación se aprecian los efectos de la superficie de la muestra. Esta diferencia en las polarizaciones nos indica que si existe el efecto por la superficie de la muestra que corresponden a los coeficientes de Fresnel como se plantea en el desarrollo teórico del modelo matemático.

Otra medición que se realizó, fue medir la luz transmitida en la película de esmalte con R6G pero ahora la fuente de excitación es a 532nm, se retiró el filtro óptico y la longitud de observación es a 532nm los resultados se muestran en la Fig. 4.9.

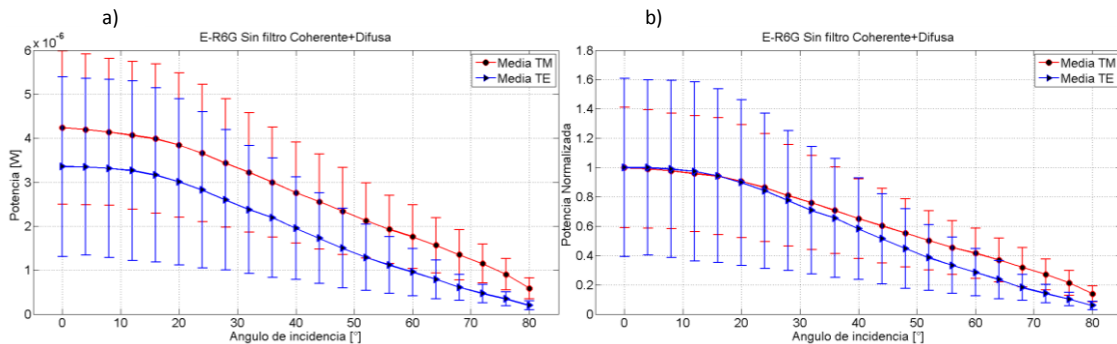


Fig. 4.9 a) Perfil de variación de la potencia transmitida en una película de esmalte R6G. SIN filtro b) Normalización del perfil de variación de la potencia transmitida en una película de esmalte R6G. SIN filtro.

En la Fig. 4.9a se muestra el perfil de variación de potencia transmitida de la fuente de excitación y modos de polarización de la fuente. Estas mediciones corresponden a tres días consecutivos. Como podemos ver en ambas polarizaciones la potencias empiezan en un valor

de potencia mayor a cero grados y van decayendo casi linealmente, caso contrario de cómo sucedía cuando la fuente de excitación es de una longitud de onda mayor como se muestra en la Fig. 4.8 donde se observa claramente los efectos de la superficie. Por otra parte, se observa que ambos perfiles en las distintas polarizaciones son congruentes con los demás resultados obtenidos, la polarización TM se encuentra encima de TE. Las variaciones estándar en ambos gráficos son grandes pero en estas mediciones no se consideró que fuera un factor importante, ya que, lo que se buscaba era observar el comportamiento del perfil de variación de potencia, lo cual nos diera una visión más amplia de fenómeno bajo estudio. Se normalizaron los perfiles de variación de potencia transmitida para poder compararlos como se observa en la Fig. 4.9b donde notamos que no existe diferencia significativa entre los perfiles de variación de potencia transmitida en ambas polarizaciones este mismo comportamiento se observa en los perfiles de variación de intensidad de fluorescencia.

De forma complementaria se realizó otra medición pero ahora se coloca el filtro óptico, la longitud de observación es a 560nm. La longitud de fuente de excitación es a 532nm los resultados se muestran en la Fig. 4.10.

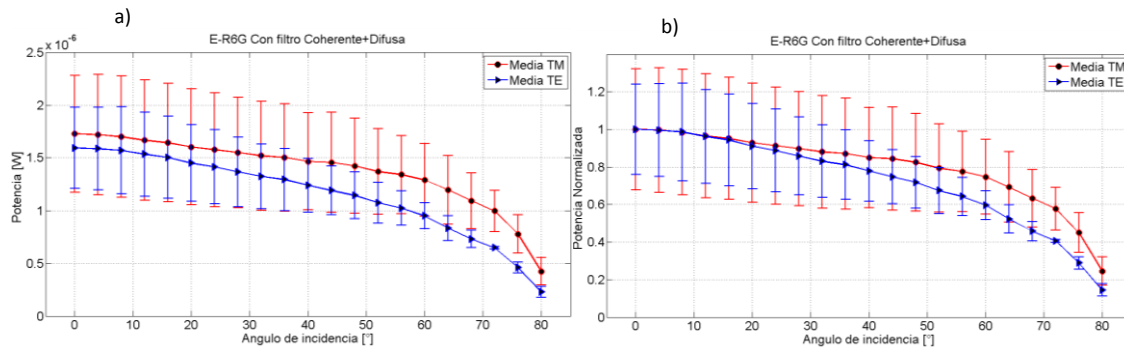


Fig. 4.10 a) Perfil de variación de la potencia transmitida en una película de esmalte R6G CON filtro b) Normalización del perfil de variación de la potencia transmitida en una película de esmalte R6G CON filtro.

En la Fig. 4.10a se muestra el perfil de variación de potencia transmitida de la fuente de excitación y modos de polarización de la fuente. Estas mediciones corresponden a tres días consecutivos. Se observa que el comportamiento en los perfiles para ambas polarizaciones cambian ligeramente la forma en como decae la potencia comparándolos en el caso anterior ver Fig. 4.9, para la polarización TM ligeramente se curva la forma del perfil cuando el ángulo de incidencia aumenta. Por otra parte, en la polarización se TE observa casi el mismo

comportamiento pero el decaimiento de potencia es más suave este comportamiento se observó cuando se cambió la longitud de onda de excitación ver Fig. 4.8. Nuevamente observamos que la polarización es TM esta se encuentra por encima de TE. En la Fig. 4.10b se normalizan los perfiles de variación de la potencia transmitida para los modos de polarización de la fuente, existe una variación en los perfiles para las distintas polarizaciones pero no se observa tan claro cuando se cambió la fuente de excitación, pero no se observa que el perfil de variación de intensidad de fluorescencia decaiga casi linealmente como en la medición anterior ver Fig. 4.9.

De los resultados obtenidos en las Figs. 4.8, 4.9 y 4.10 sugieren que la rodamina 6G tiene una gran absorción de la luz incidente, lo que no permite observar los efectos de la superficie. Por esta razón, se realizó otra medición en esta ocasión se elaboró una película de esmalte pero no se agregó rodamina R6G se midió la luz transmitida y se compararon con las mediciones de la luz transmitida en una película de esmalte con rodamina 6G. Los resultados se observan en la Fig. 4.11.

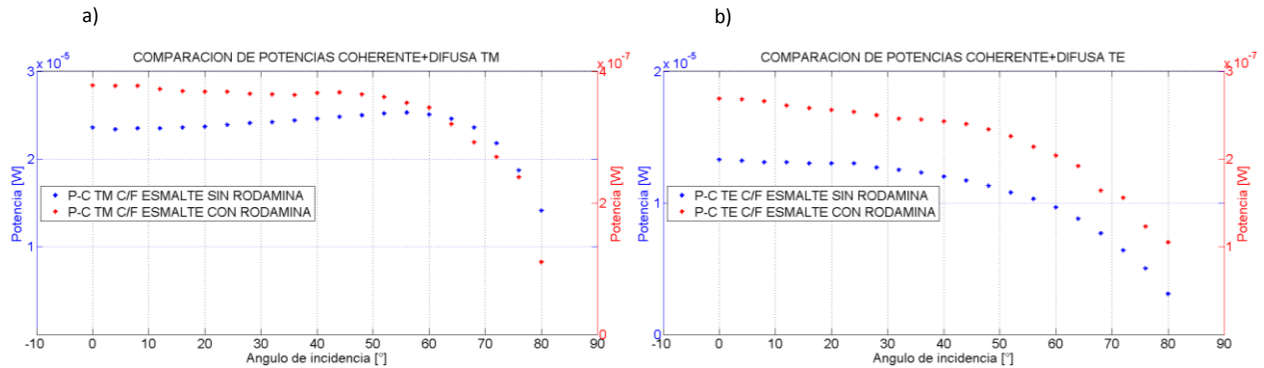


Fig. 4.11 Comparación del perfil de variación de la potencia de luz transmitida en una película de esmalte CON y SIN rodamina 6G. a) modo de polarización de la fuente de excitación TM b) Modo de polarización de la fuente de excitación TE.

En la Fig. 4.11a y b se observan los perfiles de variación de potencia transmitida de la fuente de excitación y modos de polarización. En la Fig. 4.11a observamos en color rojo el perfil de variación de la potencia transmitida en la película de esmalte con rodamina 6G cuando la polarización de la fuente es TM se observa que el perfil es similar al obtenido en la Fig. 4.10a donde el perfil de la variación de la potencia decae lentamente en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Además, en este perfil no se aprecian los efectos de la

superficie de la película. Por otro lado en color azul observamos el perfil de variación de la potencia transmitida en la película de esmalte sin rodamina 6G, en este perfil la potencia crece lentamente hasta los 55° y posteriormente decae, este comportamiento se observó en la Fig. 4.8 cuando se cambió la longitud de la fuente de excitación, podemos observar el ángulo de Brewster. Ambas mediciones se realizaron el mismo día y consecutivamente, por lo que, podemos descartar errores por variación de la potencia de excitación. Si observamos la intensidad de potencia en ambos gráficos podemos notar que el orden de magnitud es distinto, lo que indica que el filtro óptico, no está filtrando adecuadamente o que la intensidad de la fuente de excitación es muy grande, como consecuencia, la intensidad de luz que llega al sensor proveniente de la fuente es mayor. Por otra parte, que la absorción de la rodamina 6G es tal, que inhibe los efectos de la superficie por esta razón no observamos el ángulo de Brewster en las otras mediciones ver Figs. 4.9 y 4.10. Estos resultados son una posible explicación porque cuando se obtiene los perfiles de variación de la intensidad de fluorescencia no se observa diferencia entre las polarizaciones de la fuente de excitación.

En la Fig. 4.11b observamos en color rojo y azul el perfil de variación de la potencia transmitida en la película de esmalte con y sin rodamina 6G respectivamente cuando la polarización de la fuente es TE. El comportamiento en ambos perfiles se observó Figs. 4.8 y 4.10 donde se observa que la potencia a 0° es máxima y posteriormente decae lentamente en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

4.4 MEDICIONES DEL PERFIL DE VARIACIÓN DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN FUNCIÓN DEL ÁNGULO DE INCIDENCIA DE LA FUENTE DE EXCITACIÓN (TEJIDO EPITELIAL)

Con el montaje experimental para medir la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de la fuente de excitación, se procedió a realizar mediciones ahora con el tejido epitelial. Dado el tejido epitelial es un material inhomogéneo y al momento de desprender el epitelio de la hoja de cebolla este empieza a perder humedad lo que afecta a la intensidad de

fluorescencia, cada medición realizada es una muestra diferente por lo que no podemos hablar de respetabilidad.

El primer resultado obtenido midiendo los perfiles de variación de potencia transmitida de la fuente de excitación, es que depende de la orientación del tejido será la cantidad de luz que se reflejada de la fuente de excitación y que sea captada por el espectrofotómetro. Se midieron los espectros de fluorescencia en dos casos (ver Fig. 4.12).

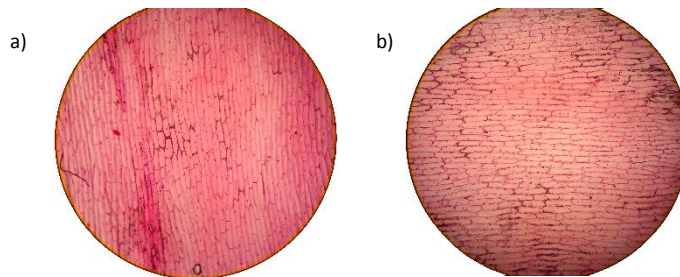


Fig. 4.12 Orientación del tejido epitelial. a) Horizontal b) Vertical.

En la Fig. 4.12a se muestra la posición en la que se coloca el tejido sobre el portaobjetos la posición es vertical y en Fig. 4.12b la posición del tejido es horizontal. Se tomaron los espectros de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación en ambos casos y se obtuvieron los siguientes resultados (ver Fig. 4.13).

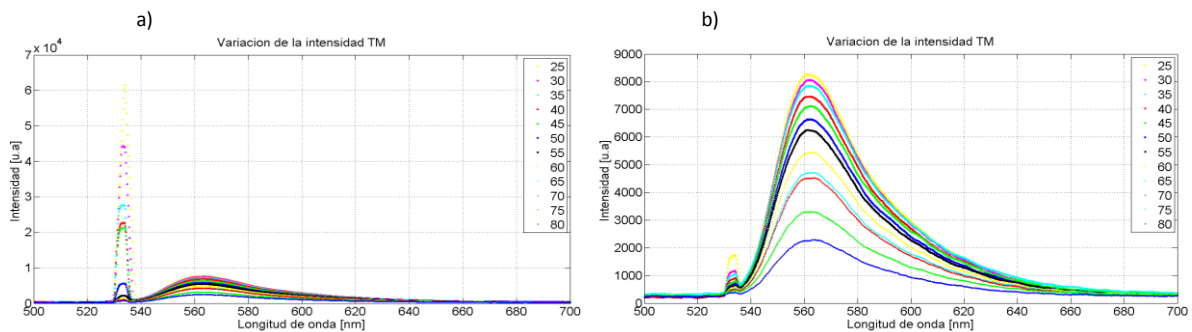


Fig. 4.13 Espectros de fluorescencia en tejido epitelial.
a) Orientación del tejido vertical. b) Orientación del tejido horizontal.

En la Fig. 4.13 se muestran los espectros de fluorescencia del tejido epitelial en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación cuando la polarización de la fuente es TM. En la Fig. 4.13a la orientación del tejido es vertical. Se observa, un pico alrededor de 532nm este pico es debido a la contribución de la fuente de excitación, es la luz que es reflejada por

la muestra y es captado por el espectrofotómetro, podemos ver que la intensidad de luz reflejada por la fuente de excitación es de varios ordenes más a la intensidad de fluorescencia de la rodamina 6G. En la Fig. 4.13b el pico a 532nm debido a la contribución de la fuente es mucho menor a la intensidad de fluorescencia de la rodamina 6G. Este comportamiento resulto ser una complicación cuando se obtuvieron los espectros de fluorescencia, ya que, las primeras mediciones la orientación del tejido siempre se colocaba en una posición vertical, en esta, el espectrofotómetro se satura lo cual complicaba la medición de los espectros de fluorescencia, porque, existía la posibilidad de dañar el espectrofotómetro utilizado. Hasta el momento que, se observó que colocando el tejido en posición horizontal se podían hacer las mediciones sin correr riesgo de dañar el espectrofotómetro.

Se realizaron varias mediciones con las cuales se puede afirmar que en ambos casos, los espectros de fluorescencia son comparables, la orientación del tejido no afecta la forma del espectro ni el perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación de la fuente. Una vez que se verifico que la orientación del tejido no sería una variable a considerar o al menos para efectos de esta tesis, todas las mediciones posteriores se realizaron con la orientación del tejido en horizontal. Aun no se tiene explicación concreta del porqué de este comportamiento. Por otra parte, se calcularon los anchos espectrales para el tejido en ambos casos, se obtuvo que el ancho espectral no varía su valor dentro de los primeros 55° posterior a este ángulo aumenta por lo menos 15nm, ya que, este aumento no se observó en la película de esmalte con R6G lo asociamos directamente al tejido, pero aún no se tiene una explicación que explique este comportamiento.

Para conocer si el comportamiento del perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación se repetía en distintas mediciones se tomaron espectros durante cuatro días consecutivos los perfiles se observan en la Fig. 4.14.

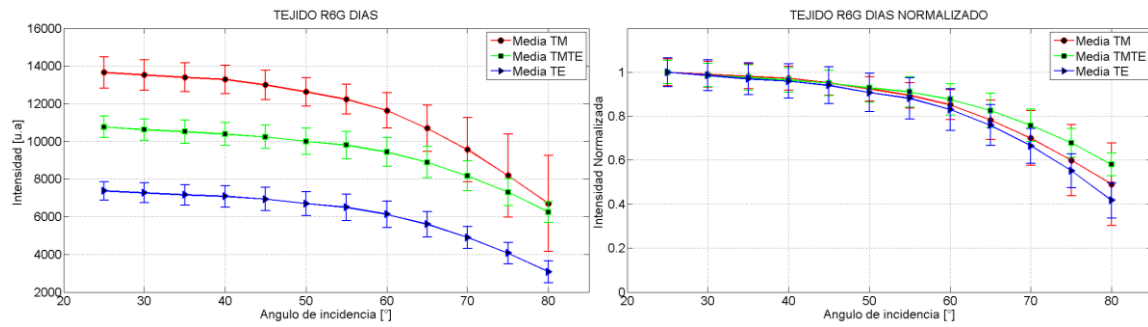


Fig. 4. 14 a) Variación de la intensidad de fluorescencia en tejido epitelial distintos días b) Normalización de la variación de la intensidad de fluorescencia en tejido epitelial distintos días.

En la Fig. 4.14a se observan los perfiles de la variación de la intensidad de fluorescencia para distintos días y modos de polarización de la fuente. En estas mediciones, propiamente no se puede hablar de respetabilidad ya que cada día es un tejido diferente. Además que, el tejido epitelial sufre de un proceso de deshidratación, lo que afectaba la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, por lo cual no se podía utilizar la misma muestra para otra medición, durante las mediciones se estimó que una vez preparada la muestra se contaba con un rango de tiempo aproximado de 15 min antes de que la intensidad de fluorescencia se viera afectada por este proceso. Sin embargo, en cada medición se observó que los perfiles de fluorescencia para cada polarización de la fuente de excitación tenían el mismo comportamiento como podemos observar en la Fig. 4.14a.

En la Fig. 4.14b se normalizaron los perfiles de la variación de la intensidad de fluorescencia para distintos días y modos de polarización de la fuente. Como se observa entre las distintas polarizaciones no existe una diferencia notable en el perfil de la variación de fluorescencia, este resultado es congruente con los perfiles obtenidos en la película de esmalte con R6G ver Fig. 4.6.

4.5 MODELO MATEMÁTICO VS. PERFIL DE VARIACIÓN DE POTENCIA TRANSMITIDA DE FLUORESCENCIA EN FUNCIÓN DEL ÁNGULO DE EXCITACIÓN (MUESTRA DE REFERENCIA)

El modelo matemático propuesto en este trabajo de tesis fue programado en Matlab dado las consideraciones empleadas en su desarrollo es un modelo matemático sencillo el cual tomado ciertas consideraciones como, la densidad de número de fluoróforos ρ y el radio r al no dependen del ángulo de incidencia de la fuente de excitación y se consideran como una constantes ver Ec. 18 del capítulo 2. Solo depende, del índice de refracción efectivo de excitación (n_{eff_Exc}) y emisión (n_{eff_Emi}).

El índice de refracción de excitación $n_{eff_Exc} = \text{Re}\{n_{Exc}\} + \text{Im}\{n_{Exc}\}$ de la película de esmalte con rodamina 6G se estimó. La parte real del índice de refracción se midió utilizando un refractómetro tipo ABBE de la marca ATAGO número de serie 093049 el valor que se obtuvo es de $\text{Re}\{n_{Exc}\} = 1.4942$. Debe de aclararse, que este índice de refracción es a una longitud de onda de 589nm esta longitud de onda es diferente a la fuente de excitación del montaje experimental que es a 532nm hacemos la suposición que el valor del índice de refracción no debe variar significativamente o al menos no debe tener una variación mayor al 10%. La parte imaginaria del índice de refracción se estimó midiendo la luz incidente y transmitida en la película de esmalte con R6G a 0° grados. Se aplicó la ley de Beer-Lamber [1] el valor estimado es de $\text{Im}\{n_{Exc}\} = 0.00538$.

El índice de refracción efectivo de emisión $n_{eff_Emi} = \text{Re}\{n_{Emi}\} + \text{Im}\{n_{Emi}\}$ la parte real se hace la suposición que no varía respecto al de emisión por lo tanto $\text{Re}\{n_{Emi}\} = 1.4942$. La parte imaginaria del índice de refracción de emisión $\text{Im}\{n_{Emi}\}$ se fue variando su valor hasta observar un comportamiento parecido a los datos experimentales. El valor que se estimó para el índice de refracción de emisión imaginario es de $\text{Im}\{n_{Emi}\} = 0.0005$.

Se hace una comparación como se muestra en la Fig. 4.15 entre el modelo matemático y los datos experimentales. Los datos utilizados corresponden a la media potencia transmitida de la película de esmalte con R6G (ver Fig. 4.10)

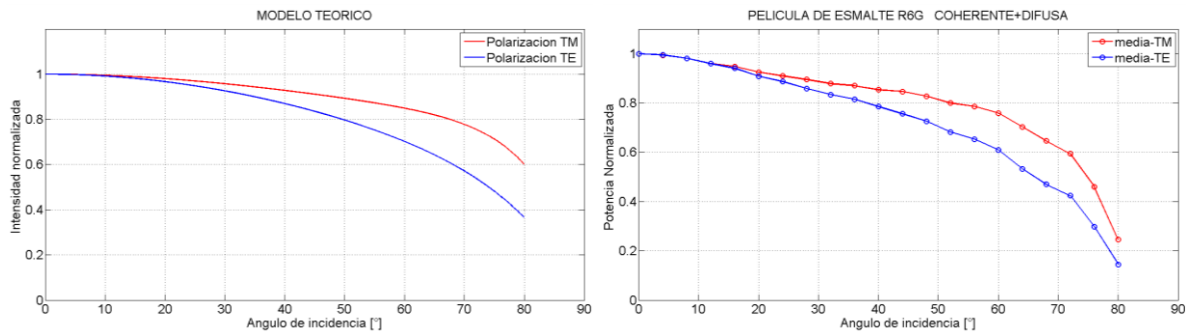


Fig. 4. 15. Modelo matemático Vs. Perfil de variación de potencia transmitida de fluorescencia en función del ángulo de excitación. Esmalte con rodamina 6G.

En la Fig. 4.15 se hace una comparación del modelo matemático contra los datos experimentales obtenidos del perfil de variación de potencia transmitida de fluorescencia en función del ángulo de excitación y dos modos de polarización de la fuente. Como se mencionó el capítulo II el modelo matemático debe ajustarse para poder hacer la comparación. Para comprensión del lector se recuerda que los coeficientes de Fresnel deben ser multiplicados por la función “ $e^{-2\text{Im}(K_z h)}$ ”. Como se observa, el modelo matemático predice en la forma de decaimiento de los perfiles para las polarizaciones de la fuente de excitación, vemos que en ambos casos el teórico como el experimental, la polarización TM se encuentra por encima de la polarización TE.

4.5.1 MODELO MATEMÁTICO R6G VS. PERFIL DE VARIACIÓN DE INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA EN FUNCIÓN DEL ÁNGULO DE EXCITACIÓN (TEJIDO EPITELIAL)

Se hace una comparativa del modelo matemático con los datos experimentales obtenidos del perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación y dos modos de polarización de la fuente para el tejido epitelial. Como hemos mencionado anteriormente el modelo matemático solo requiere del índice de refracción de excitación y emisión. En este caso, el índice de refracción de emisión la parte real se obtuvo con la ayuda del M.C. Gesuri Morales Luna alumno de doctorado [2] quien estimo que la parte real del índice de refracción del epitelio de cebolla tiene un valor de $\text{Re}\{n_{Exc}\} = 1.35$.

La parte imaginaria nuevamente se estimó utilizando la ley de Beer-Lamber el valor aproximado es de $\text{Im}\{n_{Exc}\} = 0.0047$.

Se hace la suposición que el índice de refracción de emisión real no difiere significativamente con el valor para el índice de refracción de excitación por lo tanto $\text{Re}\{n_{Emi}\} = 1.35$ el índice de refracción imaginario de emisión fue el que se varió hasta tener un comportamiento similar a los datos experimentales (ver Fig. 4.16).

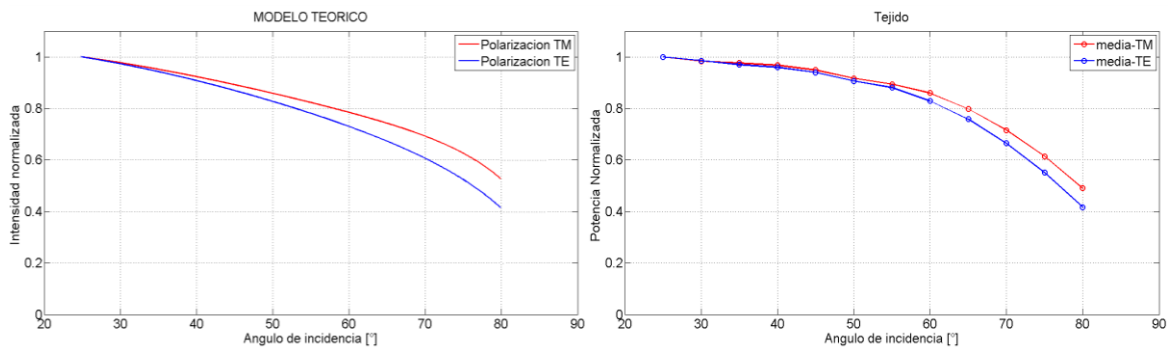


Fig. 4.16. Modelo matemático Vs. Perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación. Tejido epitelial.

En la Fig. 4.16 se observa la comparación del modelo matemático y los datos experimentales del perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación y modos de polarización de la fuente de excitación. Observamos que la polarización TM se encuentra sobre la polarización TE. Además, el modelo matemático predice que la polarización TE a un ángulo de 80° la intensidad de luz baja aproximadamente un 50% su intensidad, esto, lo observamos en los datos experimentales. Por otra parte, cuando la polarización es TM observamos que a 80° el modelo predice que la intensidad de fluorescencia esta alrededor del 40% esto también se observa también en los datos experimentales.

Cuando se hace la comparación del modelo matemático con los datos experimentales ya sea para tejido epitelial o la película de esmalte, vemos que existen diferencias notorias. Pero, observamos que el modelo matemático predice un hasta cierto punto, como es que, decae el perfil de variación en intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación lo que indica que se debe trabajar más en el desarrollo matemático del modelo. Pero en primera

instancia, este modelo se puede aplicar para describir el fenómeno de fluorescencia intrínseca en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

4.6 CONCLUSIONES

En el presente capítulo se presentaron los resultados obtenidos de las distintas mediciones realizadas en el tejido epitelial con R6G y la muestra de referencia. Se mostraron los resultados obtenidos de la caracterización de la muestra de referencia donde se encontró que la muestra sin R6G tiene una absorción del 20% de la luz, la cual es comparable con la absorción de del portaobjetos donde se depositan las muestras, por lo que podemos concluir, que el esmalte de uñas transparente es un material adecuado para usarlo como muestra de referencia. Por otra parte se observó que la película de esmalte con R6G tiene una gran absorción de la luz en un rango de 500-540nm. Esto nos indica que la muestra de rodamina tiene una gran absorción de la luz en este rango.

La fuente de excitación tiene variaciones en la intensidad de potencia máxima en un día de medición del 2.3% y en distintos días hasta del 7.21% lo que indica, que cambios en la intensidad de fluorescencia pueden deberse a los cambios de la potencia de la fuente. Sin embargo, se demostró que la intensidad de fluorescencia en función de la potencia de la fuente es lineal por lo que solo afectara la intensidad de fluorescencia, más no, el espectro de emisión de las muestras.

Por otra parte las mediciones del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación para la muestra de referencia tienen una buena respetabilidad independientemente del día que se realicen, el tiempo de incidencia de la fuente de excitación o la región donde se haga incidir el haz de la fuente de excitación. Se observan cambios en la intensidad de fluorescencia pero estos pueden ser atribuidos a cambios en la temperatura ambiente, la variación de la potencia de excitación o errores de medición. En general para los distintos modos de polarización de la fuente de excitación el decaimiento de la intensidad de fluorescencia se conservó y siempre obtuvieron el mismo comportamiento.

Con las mediciones realizadas en modo de transmitancia se pudo observar que cuando se incidió un haz láser (670nm) que no excita a la R6G, se pueden observar los efectos de la

superficie, ya que, se aprecia claramente el ángulo de Brewster y existe una diferencia significativa en la respuesta del perfil de variación de fluorescencia para los diferentes modos de polarización de la fuente de excitación, caso que no se observó, cuando se midió la intensidad de fluorescencia en modo de reflexión para la muestra de referencia y tejido epitelial. Este comportamiento también, se observó cuando se hizo incidir un haz laser (532nm) en una película de esmalte sin rodamina. Ambos resultados, indican que la absorción de la R6G inhibe los efectos de la superficie ya que en las mediciones en modo de reflexión, nunca se pueden observar ni el ángulo de Brewster ni diferencia significativa entre los distintos modos de polarización de la fuente. Por otra parte, el filtro óptico utilizado, no está filtrando adecuadamente o la contribución de la fuente de excitación es tan grande que simplemente la densidad óptica del filtro no es la adecuada. Además, el ancho espectral no se ve afectado por el ángulo de incidencia de la fuente, ya que, se calculó para cada ángulo de incidencia y el valor permaneció constante.

Se encontró que dependiendo de la orientación del tejido epitelial la contribución de la fuente de excitación será muy grande o pequeña a comparación de la intensidad de fluorescencia, después de realizar distintas pruebas se puede asegurar que no afecta el espectro de fluorescencia o su perfil de variación de la intensidad de fluorescencia.

Durante las mediciones en el tejido epitelial se observó que la pérdida de humedad afecta considerablemente el perfil de intensidad de la fluorescencia de las mediciones realizadas se estima que se tiene un lapso de 15 minutos antes que la pérdida de humedad afecte el perfil de variación de la intensidad del fenómeno de fluorescencia.

La comparación del modelo matemático con los datos experimentales, en primera instancia es buena. Ya que en ambos casos, describen con cierta similitud el perfil de decaimiento de la intensidad (o potencia) de la fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación para los distintos modos de polarización de la fuente de excitación. Lo que indica que el modelo matemático propuesto puede ser utilizado para describir el fenómeno de fluorescencia intrínseca.

4.7 REFERENCIAS

[1] Belarmino Segura Giraldo, “Espectroscopía óptica de fluorescencia aplicada al soporte de diagnóstico médico de precánceres de tejidos de cuello uterino”, Tesis doctoral, Facultad de ingeniería y arquitectura Depto. de eléctrica, electrónica y computación.

[2] Gesuri Morales Luna, Agosto 2015, “Reflectividad de coloides turbios: Teoría-Experimento” Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES

De manera en general se estableció: proponer, diseñar e implementar un modelo de estudio para el análisis de fluorescencia de tejido epitelial superficial. Por lo cual, se desarrolló un montaje experimental de espectroscopia de fluorescencia, este, es capaz de medir la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Se empleó, un modelo matemático analítico el cual se modificó, para aplicarlo en el fenómeno de fluorescencia intrínseca en tejido epitelial superficial, con el cual validamos los resultados obtenidos.

Para los distintos modos de polarización de la fuente de excitación en la película de esmalte con R6G y tejido epitelial teñido con R6G. Se observó, que la respuesta en los perfiles de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación, para fines prácticos son iguales, la única diferencia es la intensidad de fluorescencia.

Se encontró que si la absorción de la luz en un material es grande, inhibe los efectos de la superficie y no son observados. Esta situación, la apreciamos claramente cuando se cambió la longitud de la fuente de excitación en la película de esmalte con rodamina 6G a 670nm a esta longitud no existe absorción de la luz por el fenómeno de fluorescencia y se observó claramente que los efectos de la superficie, ya que la respuesta de la luz transmitida en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación, aparece el ángulo Brewster y existe diferencia notable entre las dos polarizaciones de la fuente. Este comportamiento también se observó, cuando a una película de esmalte sin rodamina 6G se le hizo incidir una fuente de excitación a 532nm, donde se aparecen los efectos de la superficie y se observa claramente el ángulo Brewster. En estas dos mediciones, se observaron los efectos de la superficie y la aparición del ángulo Brewster en ambos casos no existe absorción de la luz por la muestra bajo estudio y existe una diferencia notable cuando la fuente se polariza en distintos modos. Por estas razones, podemos afirmar que la absorción de la luz inhibe los efectos de la superficie.

Se encuentra que la contribución de la fuente de excitación es grande, cuando se miden los espectros de fluorescencia en modo de reflexión, esta se ve afectada por la orientación del tejido, en este trabajo de tesis se observó dos casos en particular, el tejido en horizontal y vertical como se ve en la Fig. 4.12, se realizaron distintas pruebas para discriminar si la orientación del tejido afectaba la forma o intensidad de los espectros de fluorescencia, no se obtuvo información concluyente afirmara que el espectro de fluorescencia se viera afectado por la orientación del tejido.

Se observó que el ancho espectral para la película de esmalte con R6G es constante en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Pero, en el tejido epitelial el ancho espectral aumenta a partir de los 50° aproximadamente 15 nm. Hasta el momento no se cuenta con una explicación que explique la razón de esta situación.

Durante las mediciones se observaron cambios en la intensidad de fluorescencia pero estas pueden estar ligadas a cambios de temperatura, humedad o variaciones en la potencia de la fuente de excitación. Pero, cada perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación de la fuente que se obtuvo. En todos los casos, conservo su forma y comportamiento. Lo que indica una buena respetabilidad de las mediciones realizadas.

El modelo matemático analítico utilizado para validar el fenómeno bajo estudio describe en buena forma el comportamiento del perfil de variación de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación, aun se debe trabajar en su desarrollo pero en primera instancia describe en buena forma la como es que varía la fluorescencia intrínseca del tejido y la muestra de referencia, para las dos polarizaciones de la fuente de excitación. En ambos casos teórico y experimental, la polarización TM se encuentra sobre la polarización TE. Además, se observa cómo es que el perfil de decaimiento en la intensidad de fluorescencia decae lentamente en función del ángulo de incidencia de fuente de excitación.