



**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)

CUIDAD UNIVERSITARIA, CUIDAD DE MÉXICO, ENERO, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



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



*A mis padres  
por siempre estar a mi lado  
ser mi ejemplo a seguir  
y apoyarme en mis proyectos de vida.*

*A mis hermanos  
que han sido un parte fundamental de mi vida  
y me ayudan a ser una mejor persona.*

*A mis amigos y compañeros de generación  
a quienes no listare para no olvidar a alguien  
ustedes siempre me brindaron su conocimiento, experiencia  
pero sobre todo su compañía.*



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

Reyes Alberto Miguel agradece al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE) del CCADET-UNAM y al técnico Selene Rubí Islas Sánchez por la caracterización de las muestras mediante la técnica de espectrofotometría.

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 económico recibido por parte de la Dirección General Asuntos del Personal Académico de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IT100515 durante 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 del fenómeno de fluorescencia en tejido epitelial de cebolla. 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 como función del ángulo de incidencia la fuente de excitación.

La metodología de estudio propuesta, basada en el modelo analítico y el desarrollo de este arreglo óptico, tienen como propósito estudiar y mejorar nuestro entendimiento sobre el fenómeno de fluorescencia en tejidos epiteliales 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.

Para medir la intensidad fluorescencia en tejido epitelial propusimos el uso un fantasma 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, podamos comparar entre un medio dispersor que fluoresce (tejido epitelial con rodamina 6G) y un medio no dispersor que fluoresce (película de esmalte con rodamina 6G).

En la película de esmalte con rodamina 6G se observó que el fenómeno de fluorescencia no es dependiente del modo de polarización de la fuente de excitación. Además, observamos que el tejido epitelial de cebolla muestra un comportamiento birrefringente.

El modelo matemático propuesto para describir el fenómeno de fluorescencia tiene una buena concordancia con los resultados experimentales aunque es indispensable ampliar el estudio del fenómeno de fluorescencia en tejido superficial y ajustar el modelo con el propósito de mejorar su eficacia.

# ÍNDICE

Agradecimientos	VII
Índice	IX
Resumen	VIII
Listado de figuras	XI
Listado de tablas	XV
Capítulo I	
Introducción	
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Técnicas de evaluación empleadas en epitelios.....	2
1.2 Espectroscopia de fluorescencia.....	4
1.2.1 Fluorescencia.....	5
1.3 Potencial herramienta de diagnóstico.....	6
1.4 Motivación.....	7
1.5 Hipótesis.....	8
1.6 Objetivo.....	8
1.7 Metodología.....	9
1.8 Organización del documento.....	9
1.9 Referencias.....	10
Capitulo II	
Modelo matemático	
2.1 Introducción.....	13
2.2 Modelo matemático de fluorescencia.....	16
2.3 Conclusiones.....	23
2.4 Referencias.....	24

### Capitulo III

#### Metodología experimental

3.1	Introducción.....	26
3.2	Preparación de muestras.....	27
	3.2.1 Deposición de una película delgada fluorescente.....	29
	3.2.2 Tinción de tejido epitelial superficial.....	30
3.3	Arreglo experimental.....	31
3.4	Conclusiones.....	34
3.5	Referencias.....	35

### Capitulo IV

#### Resultados

4.1	Introducción.....	36
4.2	Caracterización de la muestra de referencia.....	37
4.3	Potencia transmitida en la muestra de referencia.....	44
4.4	Tejido epitelial.....	48
4.5	Estudio comparativo de resultados teóricos y experimentales.....	51
	4.5.1 Modelo matemático Vs. Perfil de intensidad de fluorescencia de la muestra de referencia.....	52
	4.5.2 Modelo matemático vs. Perfil de intensidad de fluorescencia en el tejido epitelial.....	53
4.6	Conclusiones.....	55
4.7	Referencias.....	56

### Capítulo V

Conclusiones.....	57
-------------------	----

## LISTADO DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Fig. 1.1 Tipos de epitelios a) Epitelio plano b) Epitelio como cubos c) Epitelio como columnas d) Epitelio poliestratificado..... 1

Fig. 1.2 Diagrama de Jablonski. Procesos probables de excitación y relajación.....5

### CAPÍTULO II

Fig. 2.1. Esquema del fenómeno de fluorescencia en una película fluorescente. Donde,  $n_a$ = Índice de refracción del aire,  $n_m$ = Índice de refracción del medio.....13

Fig. 2.2 Esquema de radiación de una fluoróforo inmerso un medio denominado matriz de índice de refracción  $n_m$  y cercano a la frontera con el medio incidente considerado aire de índice de refracción. Donde,  $n_a$ = Índice de refracción del aire,  $n_m$ = Índice de refracción del medio..... 16

### CAPÍTULO III

Fig. 3.1. Cebolla blanca.....28

Fig. 3.2 a) Spot del haz incidente sobre la CCD b) Spot observado después de transmitirse a través de una capa de 100  $\mu\text{m}$  de pegamento UHU c) Spot observado después de transmitirse a través de una capa de 100  $\mu\text{m}$  de esmalte de uñas. ....28

Fig. 3.3 Esquema de elementos empleados en la deposición de una película de esmalte fluorescente.....29

Fig. 3.4 Tejido epitelial de cebolla teñido con R6G. Imagen obtenida con microscopio con un aumento de 10X.....30

Fig. 3.5 a) 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. b) Diagrama del arreglo experimental.....31

Fig. 3.6 Arreglo experimental para medir la componente coherente y difusa de la potencia transmitida por la muestra. b) Diagrama del arreglo experimental.....33

#### CAPÍTULO IV

Fig. 4.1 Espectro de transmitancia en portaobjetos, película de esmalte sin y con R6G.....37

Fig. 4.2. a) Espectro de fluorescencia de la muestra de referencia al variar la potencia de excitación en modo TE, longitud de excitación 532 nm. b) Intensidad de fluorescencia a 560 nm en función de la potencia de excitación en modo TE.....38

Fig. 4.3 Espectro de fluorescencia como función el ángulo de incidencia del haz de excitación de una película de esmalte con Rodamina 6G, longitud de excitación 532nm a) Polarización TM y b) TE de la fuente de excitación.....39

Fig. 4.4. Superficies excitadas en las 3 regiones evaluadas de la película de esmalte con R6G.....40

Fig. 4.5 a) Perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia en 3 regiones de la muestra de referencia. Se emplearon los modos de polarización TE, TM y TMTE (45°). b) Gráfico normalizado de la variación de la intensidad de fluorescencia. Las barras de error representan cambios de intensidad en las 3 regiones.....40

Fig. 4.6 a) Perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia en distintos días de la muestra de referencia. b) Normalización de la variación de intensidad de fluorescencia en una película de esmalte con rodamina R6G distintos días. Las barras de error representan cambios de intensidad en los distintos días.....42

Fig. 4.7 Perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia a distintos lapsos de tiempo 0, 20, 41, 69, 91 minutos b) Normalización del perfil de intensidad de fluorescencia a distintos lapsos de tiempo Las barras de error representan cambios de intensidad en los distintos lapsos de tiempo.....43

Fig. 4.8. Perfil de potencia transmitida como función del ángulo de incidencia en la muestra de referencia, longitud de excitación 670 nm, longitud de observación 670nm, luz coherente + difusa, modos de polarización TM y TE.....45

Fig. 4. 9 Comparación del perfil de potencia transmitida en una película de esmalte con y sin R6G como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Potencia transmitida de luz coherente + difusa en a) modo de polarización TM a una longitud de observación 532 nm y b) modo de polarización TE a una longitud de observación 560nm, ambas a una longitud de excitación 532nm.....46

Fig. 4. 10 Perfil de potencia transmitida en una película de esmalte con RG6 sin filtro como función del ángulo de excitación. Longitud de observación a 532nm, longitud de excitación 532nm, 3 mediciones consecutivas, luz coherente+ difusa. a) Modo de polarización TM b) Modo de polarización TE.....47

Fig. 4.11 Perfil de potencia transmitida en una película de esmalte con RG6 con filtro como función del ángulo de excitación, longitud de observación a 560nm, longitud de excitación 532nm, 3 mediciones consecutivas, luz coherente+difusa. a) Modo de polarización TM. b) Modo de polarización TE.....48

Fig. 4. 12 Orientación del tejido epitelial. a) Vertical b) Horizontal.....49

Fig. 4.13 Espectros de fluorescencia en tejido epitelial en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación cuando el tejido está orientado a) verticalmente y b) horizontalmente. ....49

Fig. 4. 14 a) Variación de la intensidad de fluorescencia como función del ángulo de excitación en tejido epitelial. Cuatro días consecutivos, modos de polarización TM, TE y TMTE, longitud de la fuente de excitación 532nm, longitud de observación 560nm b) Normalización de la variación de la intensidad de fluorescencia en tejido epitelial distintos días. Las barras de error representan cambios de intensidad en las cuatro muestras diferentes.....51

Fig. 4. 15. a) Modelo matemático, perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación b) Datos experimentales, perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación. Muestra de referencia.....53

Fig. 4. 16 a) Modelo matemático, perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación b) Datos experimentales, perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación. Tejido epitelial.....54

## 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 III

Tabla 3.1 Variación porcentual de la potencia de salida de la fuente de excitación durante 30 minutos por 3 días consecutivos.....33

### CAPÍTULO IV

Tabla 4.1 variabilidad de intensidad de fluorescencia para distintas mediciones realizadas (tiempo, regiones y días).....44



# 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 varían mucho en cuanto a su conformación y esto dependerá de acuerdo a funciones que desempeñan, pudiéndose clasificar en tres tipos: revestimiento o barreras selectivas de protección, glandulares y sensoriales. Una forma sencilla de clasificar los distintos tipos de epitelio es por la cantidad de substratos o capas celulares y la forma de las células como son: epitelio plano, epitelio como cubos, epitelio como columnas y epitelio poliestratificado (Ver Fig. 1.1)

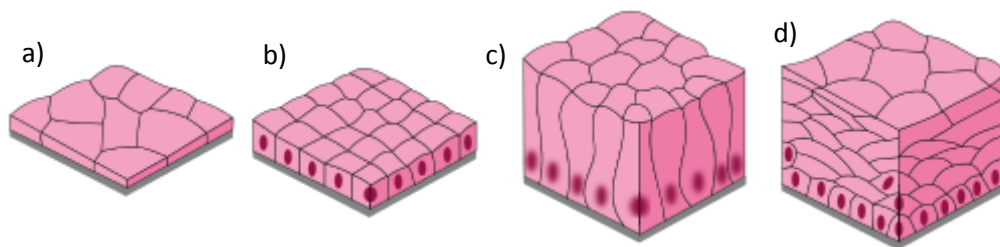


Fig. 1.1. Tipos de epitelios a) Epitelio plano b) Epitelio como cubos c) Epitelio como columnas d) Epitelio poliestratificado [3].

Los epitelios se adaptan estructuralmente para cumplir alguna o varias de las siguientes funciones [2,4]:

- 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 [5].
- 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 [6].
- 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 [7].
- 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 [8].

### 1.1.1 TÉCNICAS DE EVALUACIÓN EMPLEADAS EN EPITELIOS

En general no existe una sola técnica para evaluar las posibles alteraciones patológicas en tejidos. Las técnicas más comunes utilizadas para evaluar las alteraciones patológicas descritas en la sección anterior 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 [9]. 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 diferentes tipos de biopsias. Los tipos más comunes son: biopsia por incisión, biopsia por escisión y biopsia con aguja [10].

Esclerodermia utiliza una técnica denominada capilaroscopia periungueal, cuya importancia radica en que en los pacientes con Esclerosis Sistémica pueden presentar 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 [11].

Dermatitis, una técnica es por medio de la prueba del parche, si el médico considera que tienes dermatitis, puede realizarte la prueba del parche en la piel. En esta prueba se aplican en la piel diversas sustancias, en pequeñas cantidades, y se cubre la zona con cinta adhesiva. Luego, durante distintas visitas de control en los días posteriores, el médico te examinará la piel para saber si se ha producido una reacción a alguna de las sustancias aplicadas. Este tipo de prueba es más precisa si se la realiza al menos dos semanas después de que haya desaparecido la dermatitis. Resulta especialmente útil para detectar una alergia de contacto específica [7,8].

Herpes simple labial puede diagnosticarse 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 VIH [7,8].

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 [12,4]. Por lo tanto, dicha técnica puede resultar en un medio objetivo de evaluación para monitorizar los componentes clave del proceso de cierre de heridas [4], la evolución fibrosis en tejido [13], delimitación de lesiones cancerígenas [4], 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 fluorescencia a consecuencia de la excitación de la muestra. 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. 14), como sistema de fotografía de excitación de autofluorescencia para demarcar lesiones en piel de rápida proliferación celular (Ref. 15) y utilizado como un sistema de biopsia óptica para el análisis de tejidos (Ref. 16), por mencionar algunas.

### 1.2.1 FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un caso particular del fenómeno conocido como 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 [17]. Este fenómeno se representa gráficamente en el diagrama de Jablonski como se muestra en la Fig. 1.2.

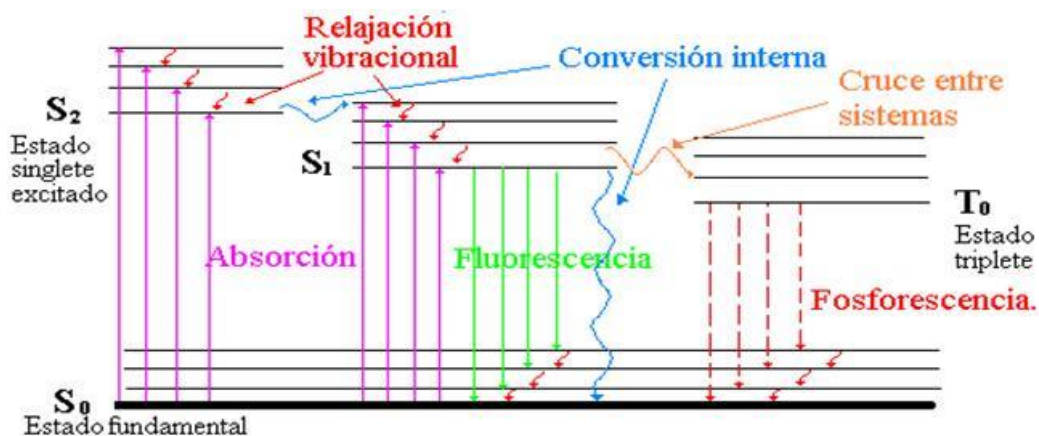


Fig. 1.2. Diagrama de Jablonski. Procesos probables de excitación y relajación [18].

En la Fig. 1.2 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 [19].

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 [20]. A estos elementos se les llama fluoróforos intrínsecos

y en la Tabla 1 se muestran algunos fluoróforos y su longitud de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ).

Tabla 1.1. Típicos fluoróforos intrínsecos y su longitud de onda de excitación y emisión [20].

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) [21].

Tabla 1.2. Fluoróforos extrínsecos utilizados para la espectroscopia de fluorescencia [21].

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 POTENCIAL 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 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 [22]. Se ha propuesto como herramienta auxiliar en el diagnóstico médico de enfermedades como son: diabetes (evaluación de cierre de úlceras), fibrosis hepática (cuantificación de fibrosis), cáncer (delimitación de lesiones), etc. En diferentes investigaciones científicas la espectroscopía de fluorescencia ha presentado

una alta sensibilidad y especificidad cuando es comparada con la histopatología de los tejidos [23,24].

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 [19,25].

Un factor importante en las diferencias asociadas con los estados de enfermedad del tejido, es la presencia de cromóforos 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 [19].

## 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.

En este trabajo de tesis se propone diseñar e implementar una metodología de estudio para el análisis 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. Esto con el fin de explorar en un futuro la posibilidad de aumentar o seleccionar la penetración de exploración.

## 1.5 HIPÓTESIS

Cambios identificados en el ancho espectral o la longitud de onda de máxima fluorescencia del tejido epitelial superficial como función del ángulo de incidencia de la energía de excitación pueden proporcionar información relacionada con diferentes estratos o capas del tejido.

## 1.6 OBJETIVO

Proponer, diseñar e implementar una metodología 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 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

- 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.
- 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 las características ópticas y los espectros de emisión como función de ángulo de excitación.
- Validación del estudio.

## 1.8 ORGANIZACIÓN DEL DOCUMENTO

El presente documento está compuesto por V capítulos. El capítulo I es una breve descripción de los antecedentes de la técnica empleada. Por otra parte, establecimos la hipótesis de nuestro estudio, así como el objetivo y la metodología empleada.

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

En el capítulo III se presenta 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 estudio, así como el diseño experimental empleado.

En el capítulo IV presentaran los resultados teóricos y experimentales obtenidos la caracterización de la muestra de referencia y 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 la validación del modelo matemático propuesto con los resultados obtenidos en la muestra de referencia y tejido epitelial.

En el capítulo V se mencionan las conclusiones más relevantes obtenidas 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] Kamil Danak, “Epitelio” Disponible en línea: <https://es.scribd.com/document/325069927/Epitelio>
- [4] 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
- [5] 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
- [6] Jordi Carbonell Abelló, “Semiología de las enfermedades reumáticas”, Primera Edición, Madrid, España, Ed. Médica Panamericana, 2005.
- [7] Frederik M. Dearborn, “Enfermedades De La Piel”, Primera Edición, India, Ed. B. Jain Publishers Pvt. Ltd. New Delhi (India), 2005
- [8] Thomas P Habif, “Enfermedades de la piel: diagnóstico y tratamiento”, Segunda Edición, Madrid, España, Ed. Madrid:Elsevier 2006.
- [9] U.S. National Library of Medicine, “Endoscopy”, Medical Encyclopedia. Disponible en línea: <https://medlineplus.gov/ency/article/003338.htm>

- [10] Instituto Nacional del Cáncer, “Biopsia”, Diccionario del Cáncer. Disponible en línea: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45164>
- [11] Institut Ferran de Reumatología, S.L., “Esclerodermia (esclerosis sistémica)”, National Library of Medicine, Disponible en línea: <http://www.institutferran.org/esclerodermia.htm>
- [12] 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
- [13] 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
- [14] 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.
- [15] 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).
- [16] 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.
- [17] Hans Beyer, “Manual de química orgánica”, Ed. Reverté 1987.
- [18] D.M. Jameson, *Introduction to Fluorescence*, 1.<sup>a</sup> ed., Ed. CRC Press, New York 2014.
- [19] Luis Guillermo Durango Mercado, “Electrónica orgánica”, Disponible en línea: <http://www.c2o.pro.br/automacao/ar01s20.html>
- [20] 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

- [21] Alan Fersht, “Estructura y mecanismo de los enzimas” Editorial: Reverte, S.A.
- [22] Joseph R. Lakowicz, “Principles of fluorescence spectroscopy”, Disponible en línea: <http://macromoleculas.unq.edu.ar/teoricos/Fluorescencia.ppt>
- [23] Joseph R. Lakowicz, “Principles of fluorescence spectroscopy”, Disponible en línea: <http://macromoleculas.unq.edu.ar/teoricos/Fluorescencia.ppt>
- [24] N. Ramanujan. Spectroscopy fluorescence in vivo, Encyclopedia of analytical chemistry, Ed. Meyers (2000).
- [25] 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.

## CAPITULO II

### MODELO MATEMÁTICO

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo de tesis es proponer una metodología de estudio del fenómeno de fluorescencia intrínseca en tejido superficial 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 el perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

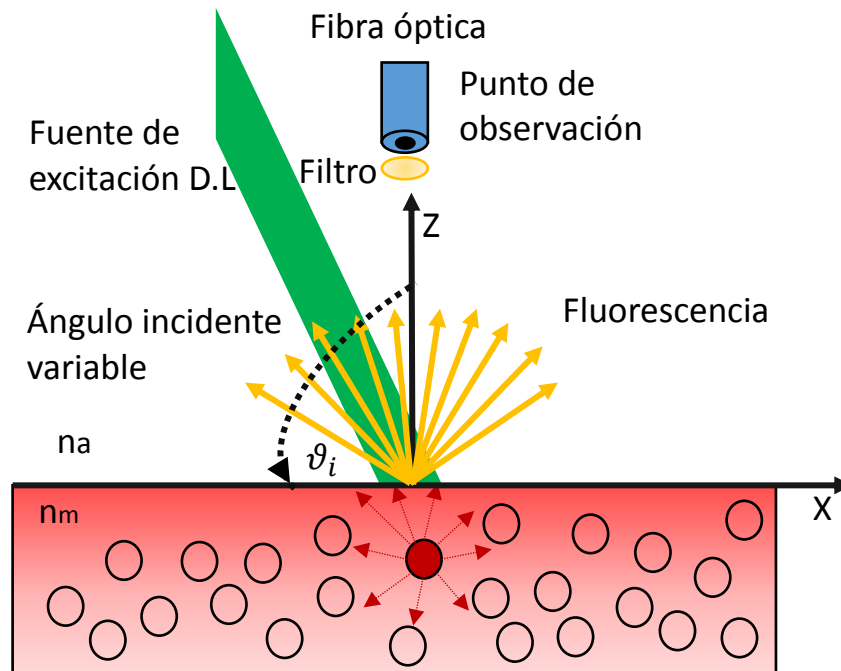


Fig. 2.1. Esquema del fenómeno de fluorescencia en una película delgada fluorescente. Donde,  $n_a$ = Índice de refracción del aire,  $n_m$ = Índice de refracción del medio.

Existen modelos matemáticos reportados en literatura utilizados para describir el fenómeno de fluorescencia en tejidos biológicos. Cada modelo considera ciertas características como: cantidad y concentración de fluoróforos, la estructura intrínseca del material biológico, absorción, dispersión de cada elemento que contenga el tejido biológico, etc. [1-5]. Belarmino Segura Giraldo (Ref. 1) por ejemplo describe un modelo matemático para la detección de precánceres en tejidos de cuello uterino basado en la ley de Beer-Lamber. El tejido es representado como una sola capa, la cual es infinitamente profunda con respecto a la capacidad de penetración de la luz incidente. Se considera a cada molécula asociadas a esta enfermedad capaz de fluorescer y promedia la cantidad de luz que absorben y emiten cada fluoróforo. Con esta información describe la intensidad de fluorescencia cuando la enfermedad está o no está presente.

Por otra parte, Fischer (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 (*función aplicada para describir el crecimiento poblacional del medio celular de interés ver Ref. 6*), para describir el crecimiento de los hongos que forman la biopelícula. Para lo cual, divide en tres fases en las cuales establecen: aparición del hongo, crecimiento y formación de la biopelícula. En cada una de las fases se estima la intensidad de fluorescencia que se obtendrá por el crecimiento de la biopelícula y se estima en qué fase se encuentra la formación de la biopelícula.

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. Por lo general, los modelos matemáticos empleados para describir fluorescencia utilizan el Método Monte Carlo (ver Refs. 2-5) por ser una técnica relativamente sencilla y con buenos resultados. Para geometrías y procesos complejos el Método Monte Carlo resulta ser un método numérico adecuado. Sin embargo, durante la revisión de la literatura, se observó que los modelos matemáticos que se utilizan para describir el fenómeno fluorescencia enfocan su atención a las características del tejido. Si bien esto no es una idea errónea, son pocos aquellos trabajos que toman en cuenta parámetros de optimización tales como 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 aunque no es claro y no cuentan con un trabajo experimental al respecto. Además, se considera que en ciertos casos no es un factor de relevancia. Por esta razón, proponemos un modelo analítico capaz de describir la variación de la intensidad de fluorescencia en tejidos como función de ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

El modelo matemático utilizado en este trabajo es una propuesta publicada en 2014 (ver Ref. 7). Este modelo describe el comportamiento de la luz difusa retroesparcida por “ $n$ ” partículas suspendidas en un medio líquido, llamado matriz., Posteriormente se propaga el campo electromagnético esparcido por esa partícula hasta el detector y se calcula la intensidad correspondiente, finalmente se suma incoherentemente la intensidad debida a cada partícula para así obtener una ecuación que describa el comportamiento de la luz retroesparcida. Este modelo ha sido empleado para determinar parámetros como el índice de refracción (IR) en medios altamente dispersores.

A continuación se describe de forma breve el desarrollo del modelo matemático capaz de emular la intensidad de fluorescencia intrínseca de un tejido en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Esto con el propósito de mejorar nuestra comprensión del fenómeno y que apoye la metodología de estudio del proceso de fluorescencia en tejido epitelial superficial.

El modelo matemático a continuación descrito considera el siguiente escenario. Se excita la muestra mediante un campo electromagnético incidente a cierto ángulo, posteriormente se establece el campo emitido por un fluoróforo, después se propaga el campo electromagnético radiado por el fluoróforo hasta el detector y se calcula la intensidad correspondiente. Por último, se suma incoherentemente la intensidad debida a cada fluoróforo excitado en la muestra para así obtener una ecuación que describa el comportamiento de la fluorescencia del tejido como función del ángulo de excitación.

## 2.2 MODELO MATEMÁTICO DE FLUORESCENCIA

Suponemos un conjunto de fluoróforos inmersos en un material (ver Fig. 2.2) y semi-infinito llamado matriz, el cual tiene un índice refracción  $n_m$ . Los fluoróforos están localizados dentro del semi-espacio  $z < 0$  y se asume que la matriz es no magnética y con una permeabilidad magnética  $\mu_0$ . Además, todos los fluoróforos son considerados como esferas de radio  $a$  y su centro está localizado en  $z < -a$ .

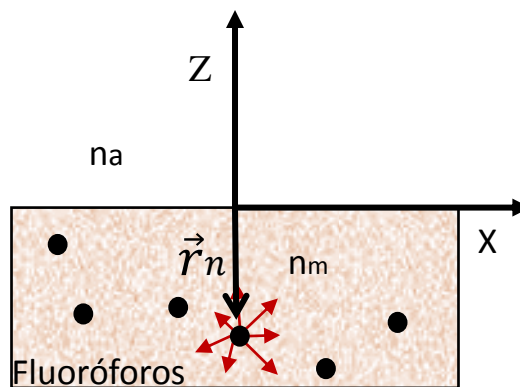


Fig. 2.2 Esquema de radiación de una fluoróforo inmerso un medio denominado matriz de índice de refracción  $n_m$  y cercano a la frontera con el medio incidente considerado aire de índice de refracción. Donde,  $n_a$ = Índice de refracción del aire,  $n_m$ = Índice de refracción del medio.

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.

Primeramente se asume una onda plana monocromática con frecuencia  $\omega$  que incide en la matriz desde el semi-espacio negativo ( $z < 0$ ) a el sistema aleatorio de fluoróforos. El campo



eléctrico emitido por un 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 [8]:

$$\mathbf{E}_n^s(\mathbf{r}; \mathbf{r}_n) = i\omega\mu_0 \int_{V_n} d^3r' \vec{\mathbf{G}}(\mathbf{r}; \mathbf{r}') \cdot \mathbf{J}_n^{\text{ind}}(\mathbf{r}') \quad (1)$$

Donde:

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

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

Para puntos de observación fuera de los fluoróforos ( $r \notin V_n$ ) podemos usar la función de Green diádica [8].

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

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

En general podemos escribir [7]:

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

Donde:

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

$\vec{\mathbf{T}}_n(\mathbf{r}', \mathbf{r}'') \Rightarrow$  Es el operador de transición lineal para el n-ésimo fluoróforo [8]. El cual obedece a la ecuación integral de Lippmann-Schwinger [8]. 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 ejerce sobre los demás.

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

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

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.

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_n^s(\mathbf{r}) = & \frac{-\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[i\mathbf{k}_+ \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_n)]}{k_z} (\mathbf{I} - \hat{\mathbf{k}}_+ \hat{\mathbf{k}}_+) \\ & \cdot \int_{V_n} d^3r_s \exp(-i\mathbf{k}_+ \cdot \mathbf{r}_s) \mathbf{J}_n^{\text{ind}}(\mathbf{r}_s; \mathbf{r}_n) \end{aligned} \quad (5)$$

La Ec. (5) se puede escribir como:

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

Donde:

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

La Ec. (7) se asume que el medio matriz  $n_m$  tiene un índice de refracción efectivo  $n_{eff}$  además es una superposición lineal de ondas planas inhomogéneas viajando en el medio. Tomando en cuentas estas condiciones:  $k_z$  y  $\mathbf{k}_+$  se remplazan con

$\mathbf{k}_{eff} = k_x \hat{\mathbf{a}}_x + k_y \hat{\mathbf{a}}_y + k_z \hat{\mathbf{a}}_z$  y  $k_{eff}$  respectivamente donde  $k_{eff} = \sqrt{k_0^2 n_{eff}^2 - k_x^2 - k_y^2}$ . Con estos cambios debemos reinterpretar 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. Entonces podemos escribir

$$\mathbf{E}_n^s(\mathbf{r}) = -\frac{\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[i\mathbf{k}_{eff} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_n)]}{k_z^{eff}} \mathbf{s}^{\text{eff}}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) \quad (8)$$

De la Ec. (8) 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  $n_{eff}$  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  $z = 0$

Si se considera que el semi-espacio negativo donde la luz incide tiene un índice de refracción diferente  $n_a$  (aire) y se asume como real, se introduce una interfaz plana en  $z = 0$  entre dos índices reales,  $n_a$  y  $n_m$ . 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  $z = 0^-$

Por lo tanto:

$$\mathbf{E}_n^s(\mathbf{r})|_{z=0^-} = \frac{-\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[ik_x x + ik_y y - ik_z^{eff} z_n]}{k_z^{eff}} s^{eff}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) \quad (9)$$

Por otra parte el campo del otro lado de la interface en  $z = 0^+$  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:

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_n^s(\mathbf{r})|_{z=0^+} = & \frac{-\omega\mu_0}{8\pi^2} \int dk_x dk_y \frac{\exp[ik_x(x - x_n) + ik_y(y - y_n) - ik_z^{eff} z_n]}{k_z^{eff}} \vec{\mathbf{t}}(k_x, k_y) \\ & \cdot \mathbf{s}^{eff}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) \end{aligned} \quad (10)$$

Donde:

$$\vec{\mathbf{t}}(k_x, k_y) \cdot \mathbf{s}^{eff}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) = t^{TE} S_{TE}^{eff}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) \hat{\mathbf{S}}_{TE} + t^{TM} S_{TM}^{eff}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) \hat{\mathbf{S}}_{TM} \quad (11)$$

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

$$\hat{\mathbf{S}}_{TE} = (\mathbf{k}^{eff} \times \hat{\mathbf{a}}_z) / |\mathbf{k}^{eff} \times \hat{\mathbf{a}}_z| \quad \text{y} \quad \hat{\mathbf{S}}_{TM} = (\mathbf{k}^{eff} \times \hat{\mathbf{S}}_{TE}) / |\mathbf{k}^{eff} \times \hat{\mathbf{S}}_{TE}| \quad (12)$$

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

Ahora, se introduce el factor  $\exp(ik_z^p z)$  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  $n_a$ . Podemos propagar el campo de la Ec. (8) en el campo lejano y usar el método de fase estacionaria [9] para evaluar el campo. Para este fin, asumimos que el sistema se extiende a lo largo pero finita área sobre  $z = 0$  y llevamos el punto de observación muy lejos comparado a las dimensiones laterales del sistema.

Por lo tanto:

$$E_n^s(\mathbf{r}) = \frac{\omega \mu_0}{8\pi^2} \frac{4\pi^2 i k_p \cos \theta}{2\pi r} \frac{\exp(-i k_z^{eff} z_n)}{k_z^{eff}} \vec{\mathbf{t}}(k_1, k_2) \cdot \mathbf{s}^{eff}(k_1, k_2; \mathbf{r}_n) \quad (13)$$

Donde  $k_1 = k_p \sin \theta \cos \phi$  y  $k_2 = k_p \sin \theta \sin \phi$  son coordenadas del punto de fase estacionaria en el espacio  $(k_1, k_2)$  y  $(r, \theta, \phi)$  son las coordenadas esféricas del punto de observación  $\mathbf{r}$ . Por otra parte:

$$k_z^{eff} = \sqrt{(\omega^2/c^2) n_z^{eff} - k_1^2 - k_2^2} \quad (14)$$

En general la Ec. (13) es complejo  $k_z^{eff} = \text{Re}\{k_z^{eff}\} + \text{Im}\{k_z^{eff}\}$  puesto que  $n_{eff}$  es en general en número complejo para coloides turbios. Incluso en la ausencia de absorción [10], [11]. El perfil de intensidad angular en la zona lejana está dado para magnitud del promedio en el tiempo del vector de Poynting  $\mathbf{S} = \frac{1}{2} \text{Re}(\mathbf{E} \times \mathbf{H}^*)$

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

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

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

Las funciones  $S_{TE}^{eff}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n)$  y  $S_{TM}^{eff}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n) \hat{\mathbf{S}}_{TM}$  son proyecciones de  $\mathbf{s}^{eff}(k_x, k_y; \mathbf{r}_n)$  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 [12].

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

$$t^{TE} = \frac{2 \mu_2 k_z^i}{\mu_2 k_z^i + \mu_1 k_z^t} \quad t^{TM} = \frac{\sqrt{\mu_1 \varepsilon_2} 2 \varepsilon_2 k_z^i}{\sqrt{\mu_2 \varepsilon_1} \varepsilon_2 k_z^i + \varepsilon_1 k_z^t} \quad (15)$$

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. Se asume que todos los fluoróforos son iguales 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

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

Donde:

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

$\langle \cdot \rangle \Rightarrow$  Es el promedio configuracional de las variables apropiadas, y se asume que las dimensiones laterales de la película ocupan un volumen  $V$  tan grande comparado a la profundidad del volumen iluminado.

De la Ec. (13)  $k_1$  y  $k_2$  están en función del ángulo de observación  $\theta$  y  $\emptyset$  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 en el caso bajo estudio. Por otra parte, la fuente de excitación varía angularmente su posición; por tanto, es indispensable considerar en el modelo la dependencia de angular de incidencia del haz de excitación  $\vartheta_i$ , lo que modifica el valor de los coeficientes de Fresnel [12].

También se agrega la variable  $\mu_Z$  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 [13]

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

Donde:

$n_{eff_{Exc}}^2 \Rightarrow$  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  $\rho$  y el radio  $r$ . Sin embargo su valor no depende de la posición angular de la fuente de excitación, se 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:

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

Donde:

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

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

$k_0^{Exc} \Rightarrow$  Vector de onda a la longitud de onda de excitación en el medio.

$k_0^{Emi} \Rightarrow$  Vector de onda a la longitud de onda de emisión en el medio.

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

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

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

Se debe de aclarar que el modelo matemático anteriormente descrito está diseñado para describir el perfil de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación en modo de reflexión. Aunque, con el fin de contrastar el comportamiento experimental y teórico se propuso un arreglo experimental alterno al montaje inicialmente propuesto. Este arreglo experimental tiene el propósito de cuantificar la potencia de excitación transmitida por la muestra como función del ángulo incidencia.

## 2.3 CONCLUSIONES

Se presentó el modelo matemático que se propuso y utilizó en este trabajo de tesis para describir el perfil de fluorescencia como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

El modelo matemático establece una ecuación sencilla (ver Ec. 18) que bajo ciertas consideraciones depende solamente del índice de refracción efectivo de la muestra en las longitudes de onda de excitación ( $n_{eff_{Exc}}$ ) y emisión ( $n_{eff_{Emi}}$ ).

En el siguiente capítulo se presentan la metodología experimental empleada para medir el perfil de intensidad de fluorescencia como 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 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] 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
- [7] H. Contreras-Tello and A y 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)



[8] L. Tsang, J. A. Kong, and K.-H. Ding, "Scattering of Electromagnetic Waves, Theories and Applications", vol. 6. John Wiley & Sons, 2004

[9] A. Ishimaru, "Electromagnetic wave propagation, radiation, and scattering", 1st edition. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice Hall, 1991.

[10] C. F. Bohren and D. R. Huffman, "Absorption and scattering of light by small particles", 1st edition, John Wiley & Sons, Sep 1983.

[11] A. Ishimaru, "Wave Propagation and Scattering in Random Media", 1st edition, Wiley-IEEE Press, Feb. 1999.

[12] J.M. Cabrera, F.J. López y F. Agulló López, "Óptica Electromagnética: Fundamentos" Primera Edición, ed. Addison-Wesley, 2001

[13] 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.

## 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 a analizar, filtros ópticos pasabanda (opcionales, dependerá de las necesidades de cada arreglo) y un detector óptico con el cual registrar la intensidad de 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]. 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. Gutiérrez-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 Espectroscópica (LUCE) del CCADET es un espectrofluorómetro comercial más complejo empleado en estudios de fluorescencia en aplicaciones 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 de tejido como función del ángulo de incidencia del haz de excitación y su relación con las propiedades ópticas del objeto de estudio.

## 3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

En esta sección hacemos mención de los tres materiales 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 H<sub>2</sub>O, 6ml metanol y 14.43mg R6G.

**Tejido Epitelial:** Se utilizó tejido epitelial de cebolla blanca ya que es un epitelio de fácil adquisición 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 más constante. Esto se corroboró tomando 5 hojas de 3 diferentes cebollas y el grosor medido fue de  $100 \pm 5 \mu\text{m}$ .

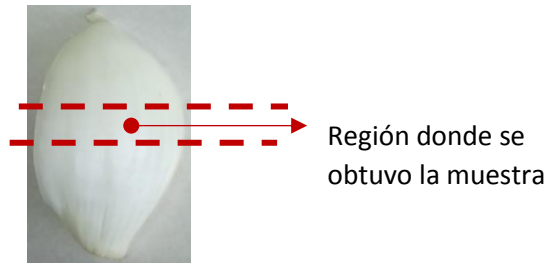


Fig. 3.1 Cebolla blanca

**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 baja o nula absorción, como se muestra en el capítulo IV, así como baja dispersión de la luz como podemos ver en la Fig. 3.2

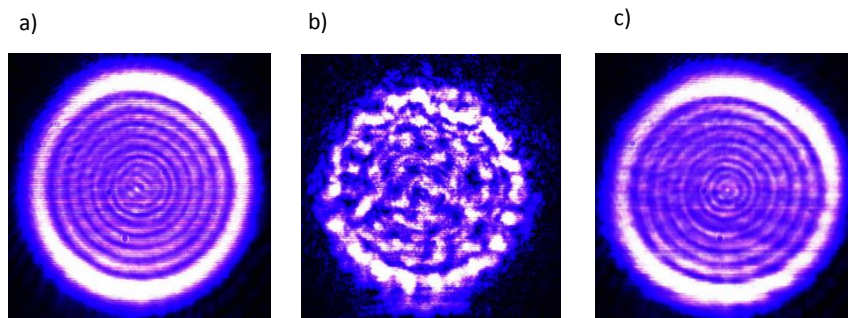


Fig. 3.2. a) Spot del haz incidente sobre la CCD b) Spot observado después de transmitirse a través de una capa de 100  $\mu\text{m}$  de pegamento UHU c) Spot observado después de transmitirse a través de una capa de 100  $\mu\text{m}$  de esmalte de uñas.

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 $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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 (medio de poca absorción y nula o baja dispersión). 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  $\mu\text{m}$  fue necesario colocar 8 capas de cinta masking para cada tira.
2. En un envase limpio colocamos 5ml de esmalte de uñas con 15 $\mu\text{l}$  de la solución de R6G y se movió con un agitador hasta homogeneizar 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 se derrame sobre las tiras.
5. Cubrimos la película formada para evitar la contaminación de la muestra y se dejó secar por un tiempo aproximado de 10 minutos. Al seguir esta metodología se logra una película con R6G como se muestra en la Fig. 3.3d.

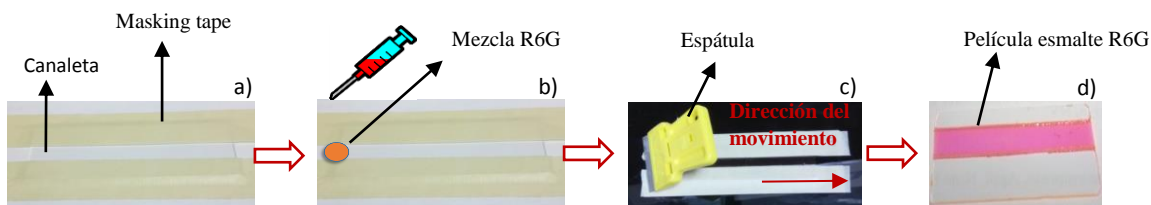


Fig. 3.3 Esquema de elementos empleados en la deposición de una película de esmalte fluorescente.

### 3.2.2 TINCIÓN DE TEJIDO EPITELIAL DE CEBOLLA

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  $\mu\text{L}$  (marca Eppendorf Research) se deposita una gota de 8 $\mu\text{L}$  de la solución 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

Posteriormente, se realizaron mediciones de la intensidad de fluorescencia en ambas muestras descritas y de la potencia de excitación transmitida en la película de esmalte con R6G por medio de los arreglos experimentales descritos a continuación.

### 3.3 ARREGLO EXPERIMENTAL.

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

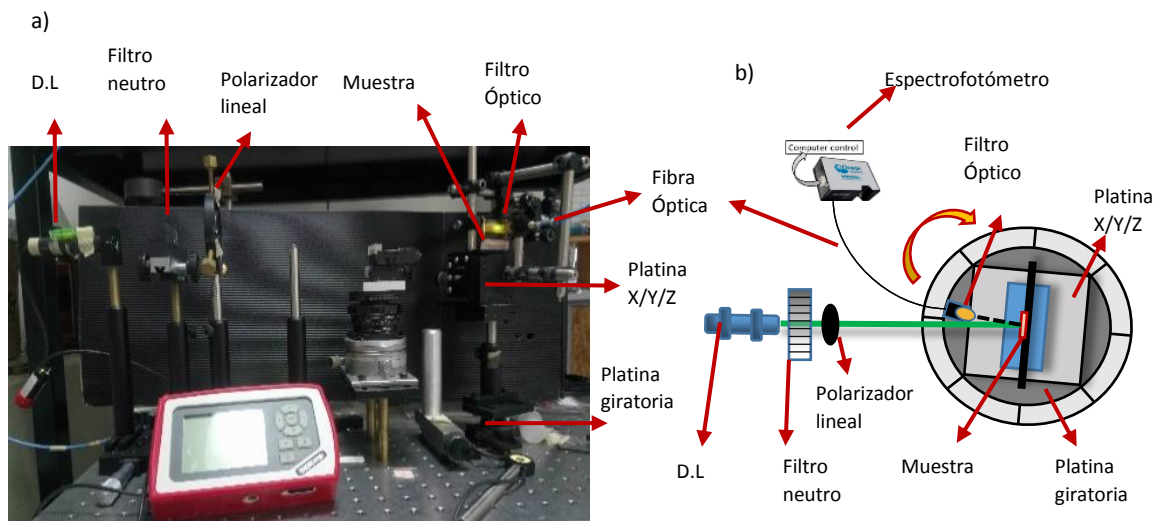


Fig. 3.5. a) Imagen del arreglo experimental en modo de reflexión para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. b) Diagrama del arreglo experimental.

En la Fig. 3.5a y b se observa el arreglo experimental implementado y el diagrama del arreglo experimental, respectivamente. 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 sustrato se alineó al eje de rotación de la platina, el cual intersecta el eje óptico del arreglo.

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.

Por otra parte, las variaciones de la potencia de salida de la fuente de excitación es una de las posibles causas en la variación de la intensidad de fluorescencia. Por consiguiente, determinamos las variaciones de la potencia de la fuente de excitación que se utilizó, con el fin de estimar los cambios en la intensidad de fluorescencia 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 monitorizó la potencia de salida durante 30 minutos. Este proceso de medición se repitió durante tres días consecutivos. La Tabla 3.1 muestra las variaciones porcentuales de potencia  $[(\Delta P/P_{prom}) \times 100]$  encontradas durante 30 minutos, así como la máxima variación encontrada entre los días monitorizados.



Tabla 3.1 Variación porcentual de la potencia de salida de la fuente de excitación durante 30 minutos por 3 días consecutivos.

	Día 1	Día 2	Día 3	Máxima Variación
Variación de Potencia [%]	1.5	2.3	1.43	7.21

Asumiendo una relación lineal entre la fluorescencia y la potencia de excitación, de la Tabla 3.1 pudiéramos decir que las variaciones de intensidad de fluorescencia debidas a cambios de la potencia de excitación no serán mayores a 2.3% en un lapso de 30 min. Sin embargo, en el día a día las variaciones de intensidad de fluorescencia pueden ser de hasta 7.21%.

Como se mencionó anteriormente con el fin de contrastar el comportamiento experimental y teórico se propuso un arreglo experimental alternativo al montaje previamente explicado. Este arreglo experimental tiene el propósito de cuantificar la potencia de excitación transmitida por la muestra como función del ángulo incidencia como se muestra en la Fig. 3.6.

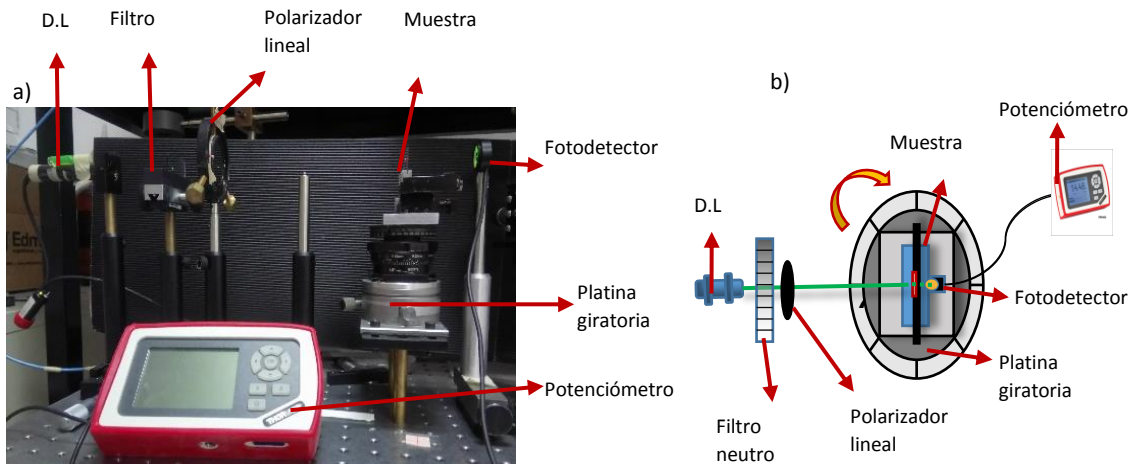


Fig. 3.6. a) Arreglo experimental para medir la componente coherente y difusa de la potencia transmitida por la muestra. b) Diagrama del arreglo experimental.

En la Fig. 3.6a y b se observa el arreglo experimental implementado y diagrama del arreglo experimental, respectivamente. 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, filtro 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 de estudio (tejido epitelial teñido con R6G y película de esmalte con R6G), las cuales se utilizaron para obtener el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación para validar el modelo matemático propuesto. Por otra parte, se presentaron 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), así como los elementos ópticos y mecánicos que se utilizaron para su montaje.

Se determinó que la variación de la potencia de salida de la fuente de excitación en un lapso de 30 minutos pueden ser hasta de 2.3%. Por otra parte, para el día a día se observó una variación de hasta 7.21%. Estas variaciones de potencia de la fuente pueden ser no significativas y ser sustraídas de la intensidad de fluorescencia medida siempre y cuando sea linealmente dependiente de la potencia de excitación.

En el siguiente capítulo se presenta la caracterización de la muestra de referencia (i.e. película de esmalte con R6G), se explica las mediciones realizadas para estimar la dispersión y absorción de luz.

### 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, Chiloniense 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](http://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)

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se muestran y contrastan los resultados experimentales y teóricos obtenidos con la finalidad de validar el modelo analítico sugerido en el estudio del fenómeno de fluorescencia en tejido epitelial. A continuación se hace un breve recordatorio de los objetivos y la metodología propuesta en este trabajo de tesis con la finalidad de que el lector tenga una idea más clara de la relevancia de los resultados mostrados.

Se diseñó e implementó una metodología de estudio para el análisis de fluorescencia en tejido epitelial de cebolla. Para lo cual, se propuso un arreglo experimental que permita el estudio de fluorescencia intrínseca en tejidos como función del ángulo de incidencia del haz de excitación. Se utilizó tejido epitelial de cebolla debido a su fácil acceso, disposición y conservación. Por otra parte, por simplicidad del arreglo experimental y costos del mismo, se tiñó las muestras con R6G, un tinte fluorescente ampliamente utilizado que emite en el rango del visible. Además se utilizó una película de esmalte con rodamina 6G como muestra de referencia. En otras palabras, contar con una muestra con características ópticas conocidas y bajo un escenario semejante el planteado en el modelo matemático.

Este capítulo se organiza de la siguiente forma: Primeramente, mostramos la caracterización y los resultados obtenidos en el medio de referencia (i.e. película de esmalte). En segundo lugar, las mediciones realizadas para cuantificar la potencia de excitación transmitida por la muestra como función del ángulo incidencia y los resultados obtenidos. En tercero lugar, las mediciones realizadas en tejido epitelial y finalmente la validación del modelo matemático sugerido en este trabajo de tesis.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA DE REFERENCIA.

Se caracterizó ópticamente una muestra de esmalte con R6G la finalidad de utilizarla como matriz de la muestra de referencia en el estudio de fluorescencia. El material que se utilizó fue un esmalte de uñas transparente el cual se mezcló con R6G. Posteriormente, se depositó una película de esmalte con R6G de 100 $\mu\text{m}$  (espesor promedio de epitelio de cebolla) de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.2.1. Las mediciones que se realizaron para comprobar que el material era el adecuado para nuestro fin fueron, primero se observó la dispersión generada por la película de esmalte (ver Fig.3.2, capítulo III). Posteriormente se midió la transmitancia de una película de esmalte con y sin R6G para determinar su densidad óptica, OD (ver Fig. 4.1). Para ello, se utilizó el equipo “*Espectrofotómetro UV-VIS-NIR Cary 5000*” ubicado en el Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE).

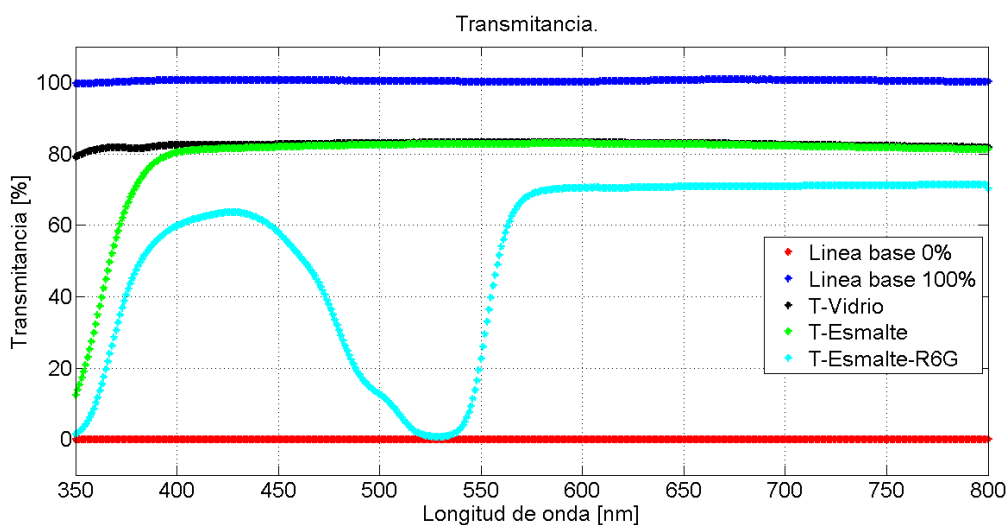


Fig. 4.1. Espectro de transmitancia en portaobjetos, película de esmalte sin y con R6G.

En la Fig. 4.1 se observa el espectro de transmitancia del sustrato de vidrio (i.e. portaobjetos, T-Vidrio) y del sustrato con película de esmalte sin (i.e. T-Esmalte) y con R6G (i.e. T-Esmalte-R6G). La línea azul y roja corresponden a las líneas base 100% y 0% de transmitancia, respectivamente. Podemos observar en color negro la transmitancia del

sustrato de vidrio. Esta indica que en el rango de 400 a 800 nm la transmitancia es constante y que la luz absorbida y/o reflejada es del 20% ( $OD = 0.1$ ). En color verde se observa la transmitancia de la película de esmalte SIN rodamina 6G. Como podemos notar, en el rango de 400 a 800 nm, esta se sobrepone al espectro de transmitancia del portaobjetos lo que indica que la película de esmalte no absorbe en el espectro visible. 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 la absorción y la reflexión de la luz es de aproximadamente 30% ( $OD = 0.5$ ) respecto a la línea base del 100% de transmitancia, pero a longitudes menores a 600nm es posible apreciar el espectro de absorción característico de la rodamina 6G

Como se mencionó en el capítulo anterior, variaciones en la potencia de excitación afectan la intensidad de fluorescencia. Por esta razón, se determinó la respuesta en fluorescencia en la muestra de referencia como función de la potencia excitación tal y como se observan en la Fig. 4.2.

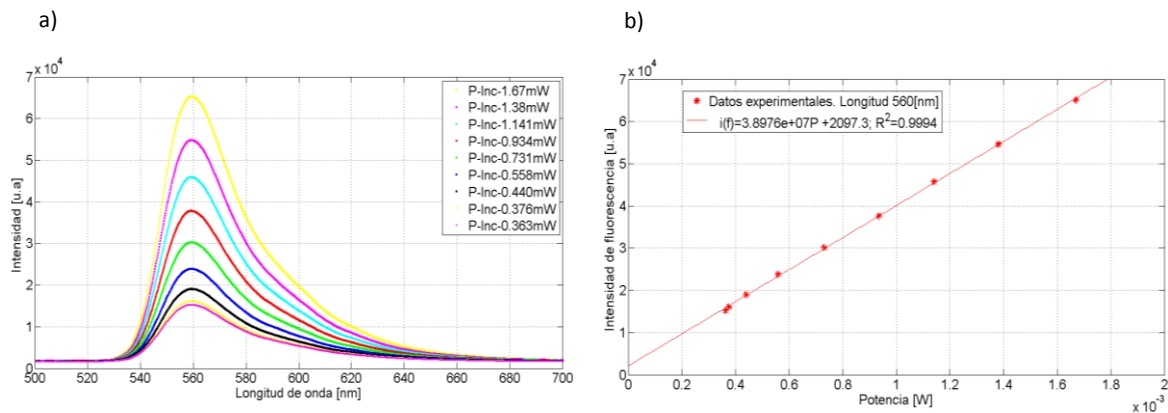


Fig. 4.2. a) Espectro de fluorescencia de la muestra de referencia al variar la potencia de excitación en modo TE, longitud de excitación 532 nm. b) Intensidad de fluorescencia a 560 nm en función de la potencia de excitación en modo TE.

La Fig. 4.2a muestra los espectros de fluorescencia de la muestra de referencia como función de la potencia del láser de excitación en modo de polarización TE. El ángulo de incidencia de la fuente se fijó a  $25^\circ$  respecto a la normal de la película de esmalte. Podemos observar que a menor potencia de excitación, menor intensidad de fluorescencia. Por otra parte, en la Fig. 4.2b se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de 560 nm como función de la potencia de excitación (532 nm). Se observa que el cambio de la

intensidad de fluorescencia como 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 tanto, cambios de intensidad de fluorescencia por debajo de 7.2% sin variaciones en el perfil emisión o corrimientos del espectro puede deberse a cambios en la potencia de salida láser de excitación.

El espectro de fluorescencia como función del ángulo de incidencia del haz de excitación (polarización TM y TE) en la película de esmalte con R6G se observa en la Fig. 4.3.

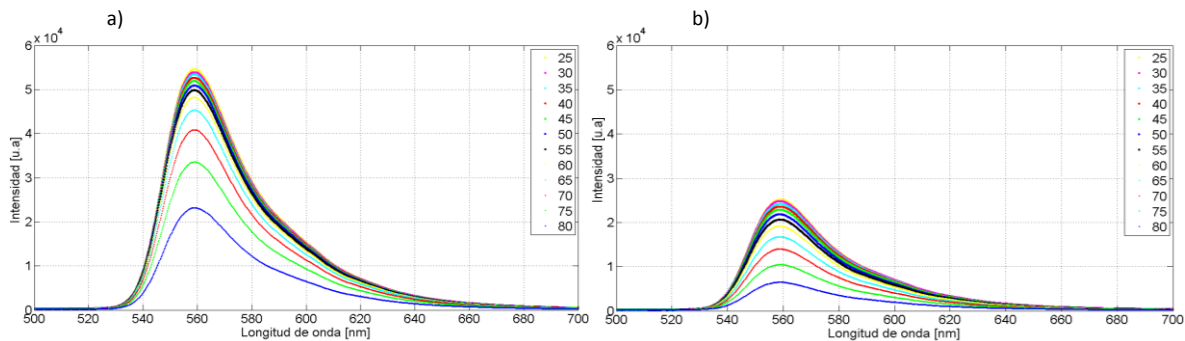


Fig. 4.3. Espectro de fluorescencia como función el ángulo de incidencia del haz de excitación de una película de esmalte con Rodamina 6G, longitud de excitación 532nm a) Polarización TM y b) TE de la fuente de excitación.

En la Fig. 4.3a y b se muestran los espectros de fluorescencia de la muestra de referencia para dos modos de polarización TM (Magnético Transversal) y TE (Eléctrico Transversal), respectivamente. Se puede observar que la intensidad de fluorescencia disminuye como 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 varía. Esto sugiere que en la película de esmalte con R6G el ancho del espectro de fluorescencia no es dependiente del ángulo de incidencia ni del modo de polarización de la fuente de excitación.

Como se mencionó en el tercer capítulo, la película de esmalte con R6G se depositó sobre un portaobjetos. Tomando en cuenta la metodología de fabricación propuesta y las dimensiones de la película de 75 x 5 x 0.1 mm, fue necesario determinar si la técnica de fabricación empleada permite obtener películas con una distribución homogénea de R6G aceptable. Para evaluar dicha distribución se midió la intensidad de fluorescencia en 3 distintas regiones de la película (ver Fig. 4.4). Bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y potencia de excitación, una distribución homogénea de R6G proporcionará igual intensidad de fluorescencia en dichas regiones.

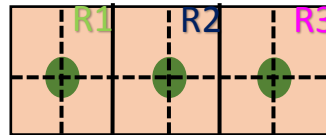


Fig. 4.4. Superficies excitadas en las 3 regiones evaluadas de la película de esmalte con R6G.

Para estimar dicha distribución, se realizaron mediciones para obtener el perfil de intensidad de fluorescencia en distintas regiones como se puede ver en la Fig. 4.5.

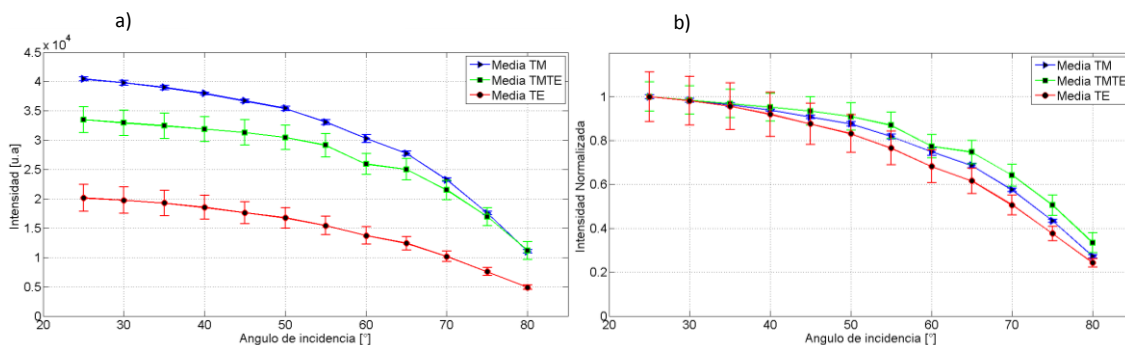


Fig. 4.5. a) Perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia en 3 regiones de la muestra de referencia. Se emplearon los modos de polarización TE, TM y TMTE (45°). b) Gráfico normalizado de la variación de la intensidad de fluorescencia. Las barras de error representan cambios de intensidad en las 3 regiones.

En la Fig. 4.5a se observa la variación de la intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia para cada modo de polarización empleado en cada región de estudio de



la película. Los tres modos de polarizaciones de la fuente empleados fueron TM, TE y  $45^\circ$  que llamamos TMTE. Con el fin de realizar las mediciones bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, estos perfiles de intensidad se tomaron de manera consecutiva. La variación máxima observada en las 3 regiones representó un cambio del 12% en intensidad de fluorescencia. De este cambio en intensidad, podemos considerar que al menos un 1.4% de la variación se debe a la potencia de excitación (ver Tabla 3.1). Por tanto, asumiendo que el cambio observado se debe a la no homogeneidad en la distribución de R6G, podemos decir que el máximo cambio observado en la distribución de esta fue igual o menor al 11% entre regiones.

Por otra parte, podemos observar un decaimiento atípico en la intensidad de fluorescencia en  $60^\circ$  para la polarización TMTE. Este decaimiento fue atribuido a un error de medición. Además, en la Fig. 4.5b se muestra los perfiles normalizados de la variación de la intensidad de fluorescencia en las tres regiones para las tres polarizaciones. En ella se observa que el perfil de decaimiento de fluorescencia en las tres polarizaciones empleadas no presenta diferencias significativas, razón por la cual se consideró que el error de medición observado no afecta las conclusiones del presente trabajo.

Para conocer la reproducibilidad del fenómeno de fluorescencia en la muestra de referencia se registraron los perfiles de intensidad de fluorescencia durante cuatro días consecutivos. Esto con la finalidad de evaluar posibles cambios de intensidad como función del ángulo de incidencia en distintas condiciones de temperatura y humedad. Para el registro de fluorescencia se eligió la región central de la película (i.e. región dos), donde se hizo incidir el haz de excitación para obtener los perfiles de fluorescencia (ver Fig. 4.6).

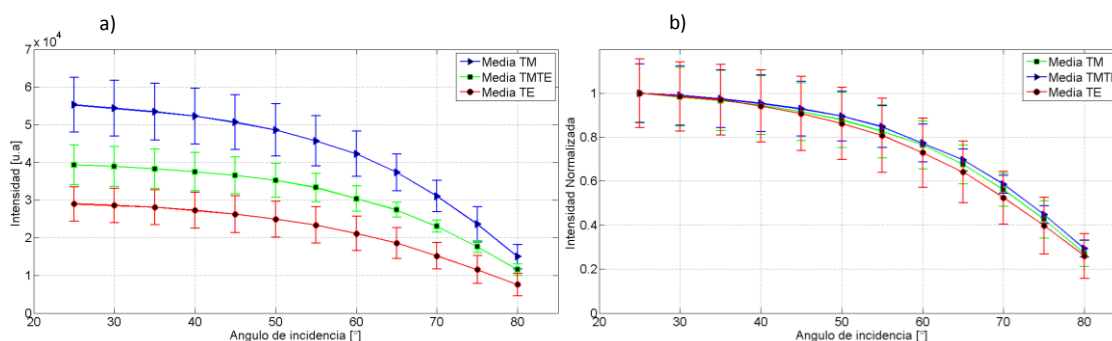


Fig. 4.6. a) Perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia en distintos días de la muestra de referencia. b) Normalización de la variación de intensidad de fluorescencia en una película de esmalte con rodamina R6G distintos días. Las barras de error representan cambios de intensidad en los distintos días.

En la Fig. 4.6a se observa la variación de la intensidad de fluorescencia para distintos días y los 3 modos de polarización de la fuente empleados previamente. La variación máxima observada en los 4 días de mediciones representa un cambio del 13% en intensidad. A lo largo de las mediciones se registraron cambios de temperatura y humedad relativa en un rango de 21 a 25°C y 72.2 a 82.1%, respectivamente. Por otra parte, debemos recordar que la variación máxima observada en la potencia de excitación en el día a día fue de 7.21%, lo que sugiere que los cambios debidos a variaciones de temperatura y humedad estuvieron alrededor del 6%. En la Fig. 4.6b se muestra la normalización del perfil de intensidad de fluorescencia para los tres modos de polarizaciones de la fuente a lo largo de los cuatro días de medición. En esta se observa que los perfiles de decaimiento de fluorescencia para las tres polarizaciones son similares y que no existe una diferencia significativa entre ellos.

El tiempo requerido para realizar la medición de una muestra, en los tres modos polarizaciones TE, TM y TMTE, es aproximadamente de 20 minutos. Con el fin de estimar la variabilidad en la intensidad de fluorescencia a lo largo de un periodo de medición de 110 minutos, se midió el perfil de intensidad de la fluorescencia como función del ángulo de excitación, sobre la misma región (i.e. región dos) de la muestra de referencia, en 5 instantes de tiempo: 0, 20, 41, 69 y 91 minutos (ver la Fig. 4.7).

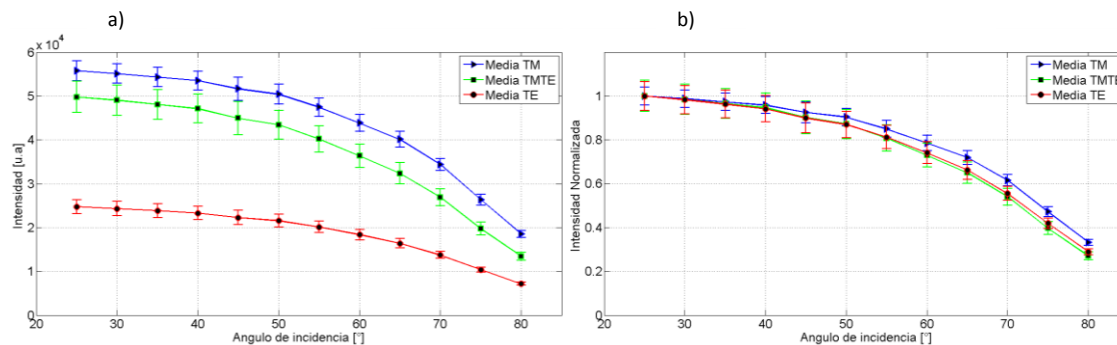


Fig. 4.7. a) Perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia a distintos lapsos de tiempo 0, 20, 41, 69, 91 minutos b) Normalización del perfil de intensidad de fluorescencia a distintos lapsos de tiempo. Las barras de error representan cambios de intensidad en los distintos lapsos de tiempo.

En la Fig. 4.7a se muestra que la variación máxima observada a lo largo de 5 ciclos de medición de la intensidad de fluorescencia (110 minutos) es de 9%. Donde podemos considerar que al menos un 1.4% de la variación se debe a la inestabilidad del láser de excitación (ver Tabla 3.1). Lo que indica que la variabilidad de la intensidad de fluorescencia en un lapso de tiempo de por lo menos de 110 minutos será del 8% lo que sugiere una posible degradación de la rodamina, ya que los cambios de temperatura y humedad no son significativos en esta ventana de tiempo. En la Fig. 4.7b se muestra la normalización de los perfiles de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia a distintos lapsos de tiempo. Observamos nuevamente que los perfiles de intensidad respecto ángulo de incidencia para los distintos modos de polarización tienen el mismo comportamiento, esto se observó en las distintas mediciones (tiempo, regiones y días) lo que indica que la polarización de la fuente de excitación no afecta ni el espectro de fluorescencia (ver Fig. 4.2) ni el perfil de fluorescencia en las mediciones.

Los resultados obtenidos hasta el momento se muestran en la Tabla 4.1, la variabilidad de fluorescencia obtenida en las distintas mediciones durante la caracterización de la película de referencia.

Tabla 4.1. Variabilidad de intensidad de fluorescencia para distintas mediciones realizadas (tiempo, regiones y días)

	Variabilidad encontrada [%]	Variabilidad del láser [%]	Variabilidad [%]
<b>Regiones</b>	12	1.4	11
<b>4 días</b>	13	7.2	6
<b>110 min</b>	9	1.4	8

En resumen, como se puede observar en la tabla 4.1, los cambios en la intensidad de fluorescencia para las distintas regiones de la muestra de referencia fueron menores al 11%. Además, mediciones realizadas en distintos días presentaron cambios menores al 6% y mediciones realizadas en un lapso de tiempo de 110 min tuvieron cambios máximos del 8%. Por tanto, los cambios de intensidad de fluorescencia observados en la película de esmalte presentaron una variación máxima del 11%, razón por la cual se consideró apropiada como modelo de referencia. Además, al no encontrar diferencia en el perfil de fluorescencia entre los modos de polarización de la fuente de excitación aseveramos que la fluorescencia de la película con R6G no es dependiente del modo de polarización de la fuente. Por otra parte, no observamos cambios en el ancho espectral ni en la longitud central de fluorescencia lo que indica que estos dos parámetros no proporcionan información de cambios en la profundidad de penetración de luz.

### 4.3 POTENCIA TRASMITIDA EN LA MUESTRA DE REFERENCIA.

Con el fin de comprender mejor el fenómeno bajo estudio, se realizaron pruebas adicionales al montaje experimental inicialmente propuesto. Primero, se realizó una medición que consistió en cambiar la longitud de onda de la fuente de excitación a 670 nm y medir la potencia transmitida por la muestra de referencia en la longitud de onda de observación de 670nm (ver Fig. 4.8).

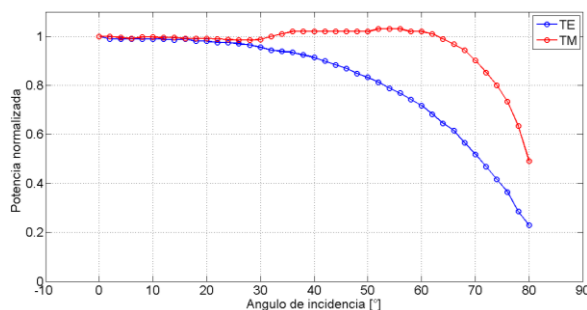


Fig. 4.8. Perfil de potencia transmitida como función del ángulo de incidencia en la muestra de referencia, longitud de excitación 670 nm, longitud de observación 670nm, luz coherente + difusa, modos de polarización TM y TE.

En la Fig. 4.8 se muestran los perfiles normalizados de la potencia transmitida de la luz coherente + difusa como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación en los modos de polarización TM y TE. Al igual que en los perfiles de intensidad de fluorescencia en modo de reflexión, pudimos observar que el perfil de potencia de la polarización TM se encuentra por encima de la polarización TE. Por otra parte, contrario a los perfiles de intensidad de fluorescencia, se observa el efecto de la superficie en la polarización TM donde la potencia a  $55^\circ$  tiene un aumento aproximado del 3% lo que se conoce como el ángulo de Brewster. Esto sugiere que a una longitud de onda donde no hay absorción por parte de la R6G (ver Fig. 4.1) se pueden apreciar los efectos de transmitancia de la superficie para el modo TM.

Para confirmar lo anterior, se realizó otra medición con una película de esmalte sin R6G y se midió la potencia transmitida como función del ángulo de excitación, las cuales se compararon con la potencia transmitida de la muestra de referencia (ver Fig. 4.9). Para estas mediciones se colocó el filtro óptico (i.e. filtro pasalargos) para eliminar la contribución de la fuente, en tanto que las longitudes de onda de observación fueron en 532 y 560nm para la película de esmalte sin R6G y la muestra de referencia, respectivamente. En tanto que la longitud de onda de excitación es 532nm en ambas mediciones y se realizaron consecutivamente.

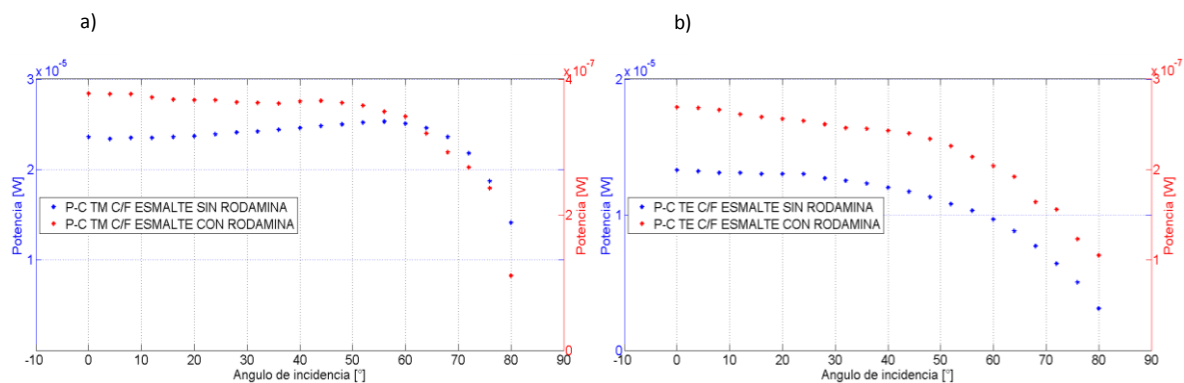


Fig. 4.9. Comparación del perfil de potencia transmitida en una película de esmalte con y sin R6G como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Potencia transmitida de luz coherente + difusa en a) modo de polarización TM a una longitud de observación 532 nm y b) modo de polarización TE a una longitud de observación 560nm, ambas a una longitud de excitación 532nm.

En la Fig. 4.9 se muestra en color rojo el perfil de potencia transmitida de la luz difusa + coherente de la muestra de referencia y en color azul el correspondiente a la muestra de esmalte sin R6G. En la Fig. 4.9a, a diferencia de la muestra con R6G, la transmisión del haz polarizado en TM a través de la película de esmalte sin R6G muestra el efecto de la superficie y por ende el ángulo de Brewster, mismo comportamiento que se observó cuando la longitud de onda de excitación no pertenece al espectro de absorción característico (e.g. 670nm) de la R6G como se muestra en la Fig. 4.1. Además, observamos que la potencia transmitida por la película sin R6G es dos órdenes de magnitud mayor que la potencia transmitida por la película con R6G. Esto se debe a la absorción y esparcimiento de la rodamina.

En la Fig. 4.9b observamos en color rojo y azul el perfil de la potencia transmitida en función del ángulo de incidencia para las películas de esmalte con y sin rodamina 6G, respectivamente, cuando la polarización de la fuente es TE. El comportamiento en ambos perfiles se observó previamente en la Fig. 4.8 donde se muestra que la potencia a 0° es máxima y posteriormente decae lentamente como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

Con base a los resultados obtenidos previamente se procedió a medir la potencia transmitida en la muestra de referencia bajo dos escenarios. Primero, se realizó una medición en este caso con la fuente de excitación a 532nm, se retiró el filtro óptico (i.e filtro pasalargos) y la longitud de observación es a 532nm los resultados se muestran en la Fig. 4.10.

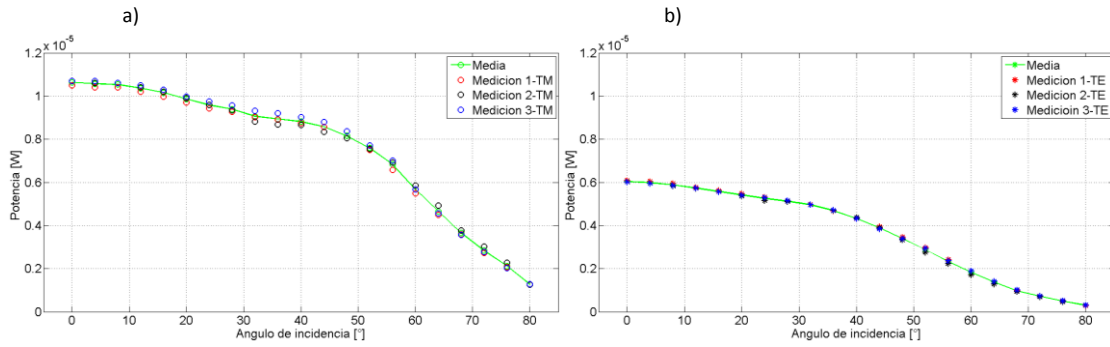


Fig. 4.10. Perfil de potencia transmitida en una película de esmalte con RG6 sin filtro como función del ángulo de excitación. Longitud de observación a 532nm, longitud de excitación 532nm, 3 mediciones consecutivas, luz coherente + difusa. a) Modo de polarización TM. b) Modo de polarización TE.

En las Figs. 4.10a y b se muestra los perfiles de la potencia transmitida de la luz difusa + coherente como función del ángulo de incidencia de excitación para las polarizaciones TM y TE, respectivamente. Tres mediciones consecutivas fueron realizadas para cada modo de polarización. Como podemos ver en la polarización TM no se observa el ángulo de Brewster como se mostró en las Figs. 4.8 y 4.9. Lo anterior se puede deber a que la emisión de fluorescencia impide observar el efecto de la superficie. Por esta razón, se retiró el filtro óptico (i.e filtro pasalargos).

El segundo escenario fue realizar esta misma series de mediciones colocando el filtro óptico (i.e filtro pasalargos). Por lo que en esta ocasión la longitud de observación es a 560nm, mientras que la longitud de onda de la fuente de excitación se mantuvo en 532nm. Los resultados se muestran en la Fig. 4.11.

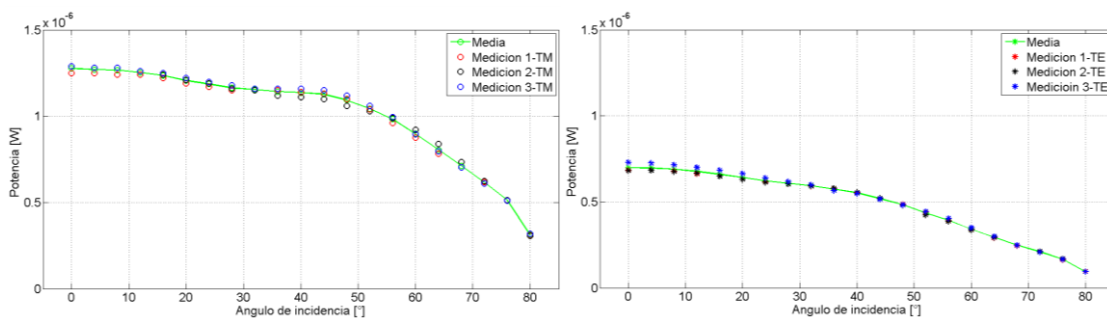


Fig. 4.11. Perfil de potencia transmitida en una película de esmalte con RG6 con filtro como función del ángulo de excitación, longitud de observación a 560nm, longitud de excitación 532nm, 3 mediciones consecutivas, luz coherente+ difusa. a) Modo de polarización TM. b) Modo de polarización TE.

En las Figs. 4.11a y b se muestran los perfiles de la potencia transmitida de la luz difusa + coherente como función del ángulo de incidencia de excitación para las polarizaciones TM y TE, respectivamente. Como en el caso anterior vemos nuevamente que en la polarización TM no se observa el ángulo de Brewster.

En resumen, los resultados obtenidos en la Figs. 4.8 y 4.9 indican que si la longitud de onda de excitación no está dentro del espectro de absorción de la R6G (ver Fig. 4.1) se puede observar los efectos de la superficie. Por otra parte, el incremento en potencia transmitida en la polarización TM fue del 3% cuando se utilizó una fuente de excitación a 670 nm y de 6% cuando usamos la película de esmalte sin R6G. Estos cambios en potencia son bajos, Esto sugiere que la fluorescencia de la R6G impide distinguir los efectos de frontera. Esto puede ser una razón del porque no se aprecian en los efectos de trasmisión de la superficie en las Figs. 4.10 y 4.11.

#### 4.4 TEJIDO EPITELIAL

Con el montaje experimental propuesto para medir la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de la fuente de excitación, se realizaron mediciones con tejido epitelial. Primeramente, observamos que las muestras de tejido epitelial de cebolla al momento ser desprendidas de una capa y someterlas a un proceso de calentamiento causado por la incidencia del haz láser, estas empiezan a perder humedad lo que disminuye la intensidad de fluorescencia de la R6G. Con base en lo observado, estimamos que una vez preparada la muestra y sometida al proceso de excitación se tenía un tiempo de 20 minutos antes de que la intensidad de fluorescencia se viera disminuida significativamente. Por tanto, se tomó la decisión de emplear una nueva muestra para cada ciclo de medición (i.e. registro fluorescencia estimulada en los modos de polarización TE, TM y TMTE).

Por otra parte, observamos de los espectros de fluorescencia de las muestras de tejido que la reflectancia de la luz de excitación depende de la orientación del tejido (ver Fig. 4.12) los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.13.



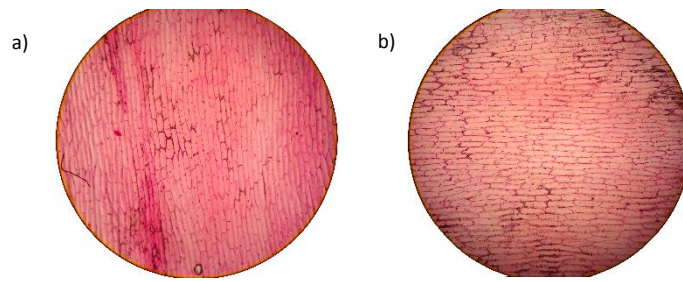


Fig. 4.12. Orientación del tejido epitelial. a) Vertical b) Horizontal

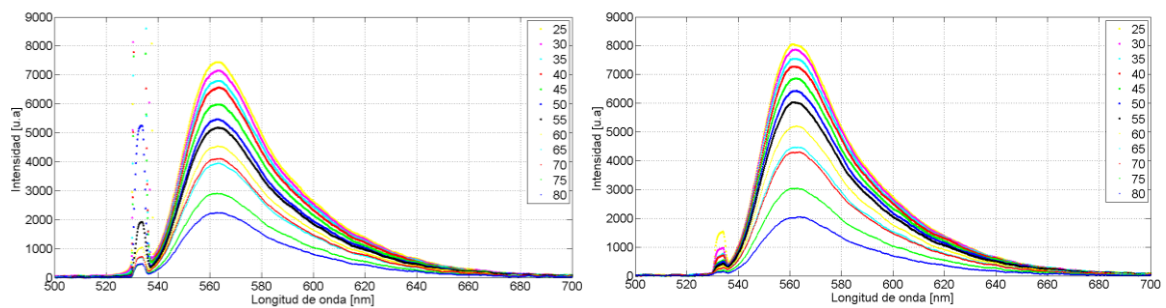


Fig. 4.13. Espectros de fluorescencia en tejido epitelial en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación cuando el tejido está orientado a) verticalmente y b) horizontalmente.

En la Fig. 4.13 se muestran los espectros de fluorescencia del tejido epitelial con orientación vertical y horizontal en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación polarizada en modo TM. Solo se muestra este modo de polarización porque en la polarización TE ocurre la misma situación. En ambos espectros se observa claramente la contribución de la fuente de excitación de 532 nm. Sin embargo, como se observa en la Figs. 4.13a y b, cuando la orientación del tejido es vertical la reflectancia de la muestra tiene una mayor intensidad que en el tejido orientado horizontalmente. Este comportamiento resulto ser un reto a superar debido a que en las primeras mediciones la orientación del tejido siempre se colocaba en una posición vertical, donde el espectrofotómetro se satura complicando la medición. Posteriormente se observó que colocando el tejido en posición horizontal se podían hacer las mediciones sin correr riesgo de dañar el espectrofotómetro.

Por otra parte, se calculó el ancho espectral para cada espectro de cada ángulo y en ambas orientaciones se obtuvo un ancho espectral constante, lo que indica que el ancho espectral no es dependiente del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Además, la orientación

del tejido no afecta la forma del espectro ni el perfil de decaimiento de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de excitación de la fuente. Una vez corroborado que la orientación del tejido no sería una variable a considerar, todas las mediciones posteriores se realizaron con la orientación del tejido en horizontal. Aún no contamos con una explicación de este comportamiento, desde el punto de vista de la orientación de las células. No obstante, es posible observar que la orientación horizontal favorece la reflectancia y posiblemente la penetración. Sin embargo, a pesar de observar un aumento del 7.5% de la intensidad de fluorescencia en la orientación horizontalmente, no es posible concluir que se debió a una mayor penetración del haz ya que se puede también atribuir a las características propias de las distintas muestras. Por tanto, es indispensable estudiar con más detenimiento este fenómeno y determinar si la orientación del tejido favorece la penetración.

Con el fin de estimar la semejanza del perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación en diferentes muestras de epitelio de una cebolla se tomaron los espectros de cuatro muestras como se observa en la Fig. 4.14.

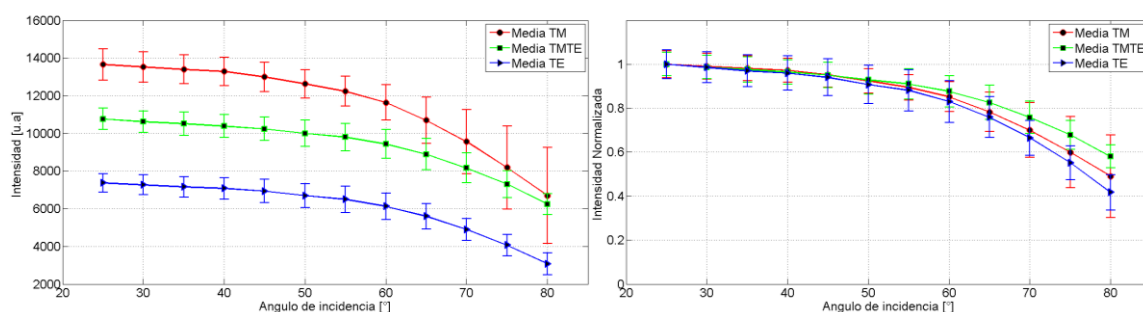


Fig. 4. 14. a) Variación de la intensidad de fluorescencia como función del ángulo de excitación en tejido epitelial en cuatro muestras diferentes, modos de polarización TM, TE y TMTE, longitud de la fuente de excitación 532nm, longitud de observación 560nm b) Normalización de la variación de la intensidad de fluorescencia en tejido epitelial distintos días. Las barras de error representan cambios de intensidad en las cuatro muestras diferentes.

En la Fig. 4.14a no se observa una diferencia notoria en los perfiles de fluorescencia como función del ángulo de excitación para cada modo de polarización de la fuente para las 4 muestras. Después se normalizaron los perfiles de la intensidad de fluorescencia para los diferentes modos de polarización y se observó un cambio en el perfil de decaimiento de fluorescencia de acuerdo al modo de polarización. Este resultado contrasta con los perfiles

obtenidos de la película de referencia mostrados en la Fig. 4.6. Los cambios observados en el perfil de fluorescencia a consecuencia del modo de polarización sugieren que el tejido es un medio birrefringente, lo cual explicaría el cambio de reflectancia en función de la orientación del tejido (ver Fig. 4.13).

## 4.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE RESULTADOS TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES

El modelo matemático propuesto en este trabajo de tesis fue programado en Matlab. Por facilidad para el lector, a continuación escribimos nuevamente la Ec. 18 del capítulo II y mostramos una vez más que, bajo las consideraciones empleadas en el modelo, la intensidad de fluorescencia como función del ángulo de excitación depende solamente del índice de refracción efectivo de la muestra en las longitudes de onda de excitación ( $n_{eff_{Exc}}$ ) y emisión ( $n_{eff_{Emi}}$ ).

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

### 4.5.1 MODELO MATEMÁTICO VS. PERFIL DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LA MUESTRA DE REFERENCIA

Primeramente, estimamos el índice de refracción efectivo de excitación  $n_{eff_{-Exc}} = \text{Re}\{n_{Exc}\} + \text{Im}\{n_{Exc}\}$  de la muestra de referencia (i.e. película de esmalte con R6G). La parte real del índice de refracción efectivo se midió utilizando un refractómetro tipo ABBE de la marca ATAGO. El valor obtenido a 589 nm fue  $\text{Re}\{n_{Exc}\} = 1.4942$ . Tomando en cuenta que los cambio en el índice de refracción en un rango de 60 nm en polímeros como PVA

(Polyninyl alcohol) son menores del 3% [1], partimos del supuesto que el valor de la parte real del índice de refracción efectivo no varía significativamente y se considera constante para nuestro propósito en rango de 532 a 589 nm. Por otra parte, el valor imaginario del índice de refracción efectivo se estimó mediante la ley de Beer-Lamber [2], midiendo la luz incidente y transmitida en la película de esmalte con R6G a 0° grados. El valor obtenido fue  $\text{Im}\{n_{Exc}\} = 0.00538$ .

Suponemos que la parte real del índice de refracción efectivo de emisión ( $\text{Re}\{n_{Emi}\}$ ) no debe variar significativamente al valor de índice de refracción de excitación. Además por simplicidad tomamos el mismo valor que el índice de refracción real de excitación  $\text{Re}\{n_{Emi}\} = 1.4942$ . En lo que se refiere a la parte imaginaria del índice de refracción efectivo de emisión  $\text{Im}\{n_{Emi}\}$ , esta se fue ajustando su valor hasta observar un comportamiento parecido al decaimiento de intensidad de los datos experimentales. El valor que mejor ajustó para la parte imaginaria el índice de refracción efectivo de emisión fue de  $\text{Im}\{n_{Emi}\} = 0.00005$ .

Se hace una comparación (ver Fig. 4.15) entre el modelo matemático y los datos experimentales obtenidos del perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación de la muestra de referencia. Estos corresponden a los datos respecto al tiempo para dos modos de polarización de la fuente de excitación TM y TE (ver Fig. 4.7).

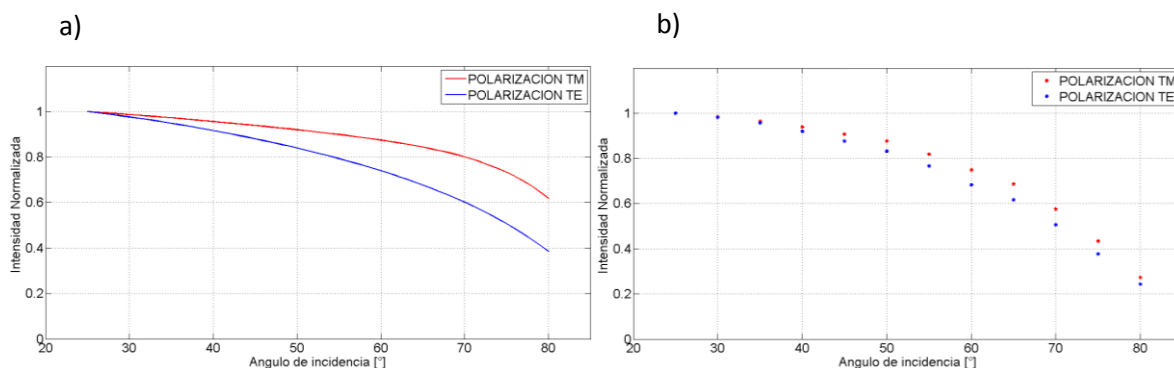


Fig. 4. 15. a) Modelo matemático, perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación b) Datos experimentales, perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación. Muestra de referencia.

Primeramente, en la Fig. 4.15a y b podemos observar los resultados teórico y experimental, respectivamente. En ambos casos, la polarización TM se encuentra por encima de la polarización TE. Además se observa que el modelo predice que la intensidad de fluorescencia disminuye como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Sin embargo, es notable que en el modelo matemático existe una diferencia entre las dos polarizaciones TM y TE, caso contrario a los datos experimentales donde no se observa diferencia. Como se mencionó anteriormente, esto indica que en un medio homogéneo (i.e. muestra de referencia) el fenómeno de fluorescencia no es dependiente del modo de polarización de la fuente de excitación. Este mismo comportamiento se observó a lo largo de las distintas mediciones que se realizaron (regiones, días y tiempo). Además el modelo matemático predice un decaimiento de la intensidad de fluorescencia a  $80^\circ$  del 40 y 60% para TE y TM, respectivamente, a diferencia de los datos experimentales donde se observa que a  $80^\circ$  la intensidad de fluorescencia tiene un disminución aproximada del 80%. Con base a la comparación del modelo y los datos experimentales en la muestra de referencia, podemos decir que el modelo matemático debe mejorarse para que tenga una mejor aproximación al fenómeno bajo estudio.

#### 4.5.2 MODELO MATEMÁTICO VS. PERFIL DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN EL TEJIDO EPITELIAL

Se estimó el índice de refracción efectivo de excitación  $n_{eff-Exc} = \text{Re}\{n_{Exc}\} + \text{Im}\{n_{Exc}\}$  del tejido epitelial. En este caso, la parte real del índice de refracción efectivo de emisión  $\text{Re}\{n_{Exc}\}$  se obtuvo con una prueba experimental de fórmulas de efectividad para coloides turbios [3] donde se estimó 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-Lambert donde el valor obtenido fue  $\text{Im}\{n_{Exc}\} = 0.0047$ .

Nuevamente se hace la suposición de que la parte real del índice de refracción efectivo de emisión no difiere significativamente con el valor para el índice de refracción de excitación por lo tanto  $\text{Re}\{n_{Emi}\} = 1.35$  nuevamente. En lo que se refiere a la parte imaginaria del

índice de refracción de emisión  $\text{Im}\{n_{Emi}\}$ , se fue ajustando su valor hasta observar un comportamiento parecido al decaimiento de intensidad de los datos experimentales. El valor que mejor ajustó para el índice de refracción de emisión imaginario fue de  $\text{Im}\{n_{Emi}\} = 0.0007$  (ver Fig. 4.16).

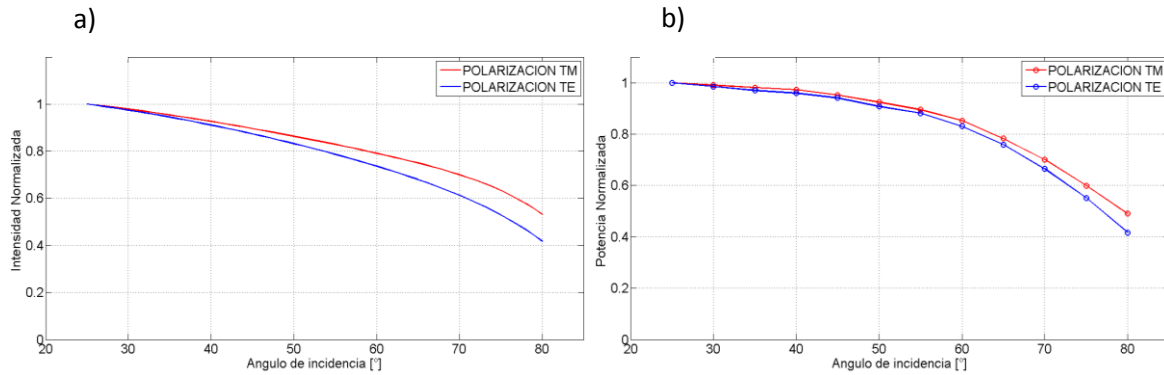


Fig. 4. 16. a) Modelo matemático, perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación  
b) Datos experimentales, perfil de variación de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación. Tejido epitelial.

En la Fig. 4.16a y b se observa el ajuste del modelo matemático y los datos experimentales, respectivamente, del perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación y para los modos de polarización de la fuente de excitación. Observamos que la polarización TM se encuentra sobre la polarización TE. Además, el modelo matemático predice un decaimiento de la intensidad de fluorescencia a  $80^\circ$  del 48 y 58% para TE y TM, en cada caso. Esto se observa en los datos experimentales del tejido epitelial, donde la disminución de la intensidad de fluorescencia es del 50 y 60%, respectivamente.

El modelo matemático muestran una buena concordancia con los resultados experimentales ya que, como se observó, predice el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación para los modos de polarización TE y TM de forma aproximada. Por tanto, podemos concluir que hemos implementado una metodología de estudio para el análisis de fluorescencia de tejido epitelial superficial. Sin embargo, aunque en primera instancia, este modelo es aplicable como herramienta de estudio del fenómeno de fluorescencia intrínseca en tejido epitelial superficial, es indispensable ampliar el estudio de este fenómeno en tejido y ajustar el modelo con el propósito de mejorar su eficacia.

## 4.6 CONCLUSIONES

En el presente capítulo se presentó la caracterización de una película de esmalte de referencia y se contrastaron los resultados experimentales y teóricos obtenidos de la muestra de referencia y el tejido epitelial.

En la caracterización de la muestra de referencia (i.e. película de esmalte con R6G) se encontró que la intensidad de fluorescencia es una función lineal de la potencia de excitación. Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos del perfil de fluorescencia como función del ángulo de excitación para distintas regiones de la muestra de referencia y repetitividad en distintos días y a lo largo de ventanas de tiempo de 110 min, se concluyó que: la técnica de fabricación de la película de esmalte con R6G proporciona una distribución homogénea aceptable de la rodamina y que las variaciones de la intensidad de fluorescencia debidas a la potencia de excitación, temperatura, humedad relativa y al proceso de degradación de rodamina en un lapso de 110min por la incidencia del láser en una misma región no son significativos.

El ancho espectral y la longitud de máxima fluorescencia de la película con R6G no son dependientes del ángulo de incidencia ni del modo de polarización de la fuente puesto que no se encontraron cambios en estas. Además la emisión de la R6G impide ver los efectos de la superficie predichos en el modelo analítico.

De acuerdo con la contribución de la fuente de excitación en los espectros de fluorescencia en tejido epitelial registrados sugieren que la orientación del tejido altera la profundidad de penetración la luz incidente. Particularmente se observó que para un tejido con una orientación horizontal se obtuvo un incremento en la intensidad de fluorescencia del 7.5%, lo que sugiere una mayor penetración de la energía de excitación. Por otra parte, las mediciones de los perfiles de intensidad de fluorescencia realizadas durante distintos días en tejido epitelial mostraron un comportamiento semejante entre ellos. Sin embargo, cuando se normalizaron los perfiles se observó un cambio en la velocidad de decaimiento del perfil de fluorescencia dependiente del modo de polarización de la fuente lo que sugiere nuevamente que el tejido es un medio birrefringente. Por tanto, es indispensable ampliar el estudio de este

fenómeno y determinar si la orientación del tejido favorece la penetración de la energía incidente. Además, en los espectros de fluorescencia como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación en el tejido epitelial de cebolla no se observaron cambios en el ancho espectral ni en la longitud central de fluorescencia. Esto indica que no es posible determinar cambios en la profundidad de penetración de la luz a través de estos parámetros.

Por otra parte, en esta primera aproximación, el modelo matemático mostró una buena concordancia con los datos experimentales para el caso de la película delgada de esmalte con R6G y el tejido epitelial con R6G. En ambos casos describe con buena similitud el perfil de decaimiento de la intensidad de la fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación para los modos de polarización TE y TM. Lo anterior indica que el modelo matemático propuesto puede ser utilizado para describir el fenómeno de fluorescencia en tejido como función del ángulo de incidencia de la energía de excitación. Sin embargo, es necesario ampliar el estudio del fenómeno de fluorescencia en tejido superficial y ajustar el modelo con el propósito de mejorar su eficacia.

## 4.7 RERERENCIAS

[1] Disponible en línea en: [https://refractiveindex.info/?shelf=organic&book=polyvinyl\\_alcohol&page=Schnepf](https://refractiveindex.info/?shelf=organic&book=polyvinyl_alcohol&page=Schnepf)

[2] 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, 2009

[3] Gesuri Morales-Luna, Humberto Contreras-Tello, Augusto García-Valenzuela, and Rubén G. Barrera, “Experimental Test of Reflectivity Formulas for Turbid Colloids: Beyond the Fresnel Reflection Amplitudes” *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016



# CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis propusimos, diseñamos e implementamos una metodología de estudio para el análisis de fluorescencia en tejido epitelial superficial como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Para ello, propusimos el uso de un modelo matemático que emule el fenómeno óptico de fluorescencia intrínseca en tejido superficial.

Con el fin de contar con una muestra de referencia apegada a las características del medio descrito en el modelo propuesto en el capítulo 2, se fabricó una película delgada de esmalte con partículas de un colorante fluorescente, la rodamina 6G (R6G). De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización de la muestra de referencia se determinó que: la técnica de fabricación de la película de esmalte con R6G proporciona una distribución homogénea aceptable de la rodamina y que las variaciones de la intensidad de fluorescencia de la película debidas a cambios en la potencia de excitación, temperatura, humedad relativa y al proceso de degradación de rodamina en un lapso de 110min por la incidencia del láser en una misma región no son significativas ya que el cambio máximo encontrado fue de 11%.

La fluorescencia de la película con R6G no es dependiente del ángulo de incidencia ni del modo de polarización de la fuente. Además, la emisión de la R6G impide ver los efectos de la frontera predichos en el modelo analítico.

Por otra parte, observamos que en los espectros de fluorescencia de las muestras de tejido epitelial de cebolla teñido con R6G, la reflectancia depende de la orientación del tejido. Mostramos que la orientación horizontal del tejido favorece la reflectancia y posiblemente la penetración ya que se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia del 7.5%. Sin embargo, no fue posible confirmar que se debió a una mayor penetración del haz ya que se puede también atribuir este incremento de intensidad a la variabilidad en el proceso de teñido de las muestras de tejido. Aun no contamos con una explicación clara del fenómeno

observado; por tanto, es indispensable profundizar en el estudio de este fenómeno y determinar si la orientación de los tejidos puede favorecer la penetración de la energía y su proceso de exploración y evaluación.

Determinamos también que para la muestra de referencia como para el tejido epitelial de cebolla la longitud de onda de máxima emisión y el ancho espectral de las muestras permanecen sin cambio al variar el ángulo de incidencia de la fuente de excitación. Por ello, se descarta la posibilidad de emplear estos parámetros en la estimación de la profundidad de penetración como función de ángulo de incidencia. Por ello se rechaza la hipótesis planteada. Por tanto, es necesario ampliar el estudio del fenómeno de fluorescencia en tejido y explorar nuevas posibilidades en el estudio estratificado de tejido epitelial superficial.

Por último, al contrastar los resultados teóricos del modelo matemático con los resultados experimentales, podemos concluir que el modelo propuesto predice en buena medida el perfil de intensidad de fluorescencia como función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación tanto para la película de esmalte como para el tejido epitelial de cebolla, ambos con R6G. En consecuencia, podemos aseverar que el modelo matemático sugerido puede ser empleado en el estudio de la fluorescencia de tejido epitelial superficial como parte de la metodología de estudio propuesta. Lo anterior, abre las puertas a una nueva línea de investigación en el laboratorio de Fotomedicina de la Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico del CCADET en el Hospital General de México.