



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERIA ELECTRICA

INGENIERÍA ELÉCTRICA-INSTRUMENTACIÓN

**MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE ABSORCIÓN DE MEDIOS
FLUORESCENTES DURANTE EL PROCESO DE FOTOLUMINISCENCIA.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA**

PRESENTA:

MIGUEL REYES ALBERTO

TUTORES PRINCIPALES:

DR. AUGUSTO GARCÍA VALENZUELA
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM

DR. ENOCH GUTIÉRREZ HERRERA
ABB, Inc.

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D.F, NOVIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Qureshi Naser

Secretario: Dr. Padilla Castañeda Miguel A.

1^{er.} Vocal: Dr. García Valenzuela Augusto

2^{do.} Vocal: Dr. Gutiérrez Herrera Enoch

3^{er.} Vocal: Dra. Acevedo Barrera Anays

Lugar donde se realizó la tesis: Instituto de Ciencias Aplicadas y tecnología, UNAM

TUTOR DE TESIS:

NOMBRE

MIGUEL REYES ALBERTO

FIRMA

Agradecimientos

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

Agradecemos la financiación de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN101821 y IN117520).

Miguel Reyes-Alberto estudiante de doctorado del Programa de Doctorado en Ingeniería Eléctrica, Universidad Nacional Autónoma de México y recibió una beca (709696) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México).

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

Agradecemos la financiación del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Simuladores Clínicos y Cirugía Asistida por Computadora, (SECTEI/087/2023)

Agradecemos la financiación del proyecto. Metodología de realidad aumentada multiespectral para la identificación y localización de tejido patológico en intervenciones quirúrgicas guiadas por computadora, CONAHCYT (319585)

Agradecemos la financiación del proyecto. Esquema de neuro navegación quirúrgica por imágenes multiespectrales y simulación biomecánica para resección de tumores cerebrales guiada por computadora, (DGAPA-PAPIIT-TA101422)

Agradezco al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT-UNAM) por permitirme utilizar sus instalaciones y equipo de laboratorio para llevar a cabo este trabajo.

RESUMEN

Conocer la distancia en la que se reabsorbe la luz luminiscente en un medio fluorescente es importante pues determina la profundidad de la que viene la luz emitida por un medio fluorescente. Por un lado, esta distancia fija el espesor óptimo de una película fluorescente como emisor de luz y por otro lado nos advierte la profundidad en un medio fluorescente de la que podemos obtener información a partir de la fluorescencia. Sin embargo, a la fecha no existe ninguna metodología para medir directamente este parámetro. En este trabajo, se propone y prueba un nuevo método relativamente sencillo para determinar el índice de absorción de un medio fluorescente mientras está siendo excitado y a las longitudes de onda de emisión. El método se ha diseñado específicamente para una configuración retroluminiscente y es aplicable a películas fluorescentes lo suficientemente gruesas para que el haz de excitación se extinga antes de alcanzar la siguiente interfase.

El método se basa en un modelo que se ajusta a los datos experimentales, y para este trabajo en particular, se proporcionó un modelo simplificado que asume un coeficiente de extinción constante a lo largo de la trayectoria de la luz emitida en la salida del medio. Se encontró que esta simplificación fue válida para las pruebas experimentales realizadas con películas de nitrocelulosa dopadas con R6G, ya que la relación entre el coeficiente de extinción en la longitud de onda de excitación y en las longitudes de onda de emisión mientras la muestra fluoresce fue de aproximadamente 3 para polarización TE y de 1 para polarización TM.

El método se implementó con una instrumentación relativamente sencilla y de costo relativamente bajo. Sin embargo, es un método laborioso que requiere tomar varios espectros a diferentes ángulos de incidencia de la luz de excitación, se sugiere que podría mejorarse y simplificarse en futuros trabajos.

El método propuesto revela una fuerte anisotropía en el valor del coeficiente de extinción entre las dos polarizaciones de luz en todos los escenarios investigados, lo que requiere una ampliación del modelo propuesto para describir adecuadamente este fenómeno.

El método en principio podría ser aplicable en medios con fluoróforos distintos, como en el caso del yoduro de propidio. Por otro lado, el método puede aplicarse en medios con cierto tipo de dispersión distinta a la de un fluoróforo, como en el caso de partículas de borosilicato

En conclusión, este trabajo presenta un método práctico que permite determinar el índice de absorción, o más en general de extinción, en la banda de emisión de medios fluorescentes mientras ocurre el fenómeno de fluorescencia. El método tiene posibles aplicaciones en distintos escenarios, incluyendo medios biológicos. Destaca del método propuesto la viabilidad de medir en medios con altas concentraciones de fluoróforos en los que la longitud de penetración de la luz que excita el medio puede ser del orden de decenas de longitudes de onda y la facilidad con la que se puede cuantificar la anisotropía en el valor del índice de extinción. En futuros trabajos sería conveniente ampliar y mejorar el modelo propuesto para abordar mejor la anisotropía inducida en el coeficiente de absorción durante el proceso de fluorescencia y casos particulares.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	2
RESUMEN.....	4
ÍNDICE.....	6
Listado de Figuras	8
Listado de Tablas.....	11
1 CAPÍTULO.....	12
INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Planteamiento del problema.....	17
1.2 Objetivo General.....	18
1.3 Objetivos particulares	18
1.4 Organización del documento	18
2 CAPÍTULO.....	20
MARCO TEÓRICO	20
2.1 Interacción luz – materia.....	20
2.2 Ley de Beer-Lambert.....	22
2.3 Esparcimiento, absorción, y fluorescencia.....	23
2.4 Anisotropía en medios fluorescentes	25
2.5 Factores que provocan la disminución de la intensidad de fluorescencia.....	26
2.6 Procesos de reabsorción de energía; ESA & ASE.....	27
2.7 Aplicaciones & Técnicas establecidas en configuración de retroluminiscente.	28
2.8 Estructuras y procesos celulares en tejido: Una visión general	29
3 CAPÍTULO.....	31
METODOLOGÍA Y MODELO ANALÍTICO	31
3.1 Dispositivo y metodología propuestos.....	31
3.2 Modelo analítico	32

4	CAPÍTULO	37
	CARACTERIZACIÓN	37
4.1	Proceso de fabricación de películas fluorescentes	37
4.2	Proceso de fabricación de una muestra líquida fluorescente	38
4.3	Proceso de tinción, tejido con propiedades fluorescentes.....	39
4.4	Montaje experimental	40
4.5	Alineación del sistema	42
4.6	Caracterización de las muestras	44
5	CAPÍTULO	50
	ESTIMACIÓN DEL INDICE DE EXTINCIÓN. COMPARACIÓN TEORÍA VS. DATOS EXPERIMENTALES	50
5.1	Estimación del índice de extinción de un medio fluorescente.....	50
5.2	Comparación Teoría-Experimento. Películas fluorescentes	54
5.3	Comparación Teoría-Experimento. Películas fluorescentes con partículas de borosilicato de 10 μm	61
5.4	Comparación Teoría-Experimento. Solución de Rodamina 6G	63
5.5	Comparación Teoría-Experimento. Solución de yoduro de propidio.....	67
5.6	Comparación Teoría-Experimento. Tejido con propiedades fluorescentes.....	71
6	CAPÍTULO	74
	CONCLUSIONES	74
7	APÉNDICE	77
	PROPAGACIÓN DE LUZ FOTOLUMINISCENTE EN UN MEDIO FLUORESCENTE	77
7.1	Propagación de luz de excitación en un medio fluorescente	77
7.2	Propagación de luz de emisión en un medio fluorescente	80
8	REFERENCIAS	84

Listado de Figuras

Fig. 1. Representación esquemática del diagrama de Jablonski, procesos de excitación y relajación electrónica y su consecuente emisión de luz.	12
Fig. 2 Esquema de un fluoróforo excitado y emitiendo inmerso en un medio translúcido y semi-infinito en una configuración de retrodispersión. El haz excitador llega a la muestra con un ángulo de incidencia oblicuo variable.	32
Fig. 3. Molde en PLA para la elaboración de películas fluorescentes.	38
Fig. 4. Molde en PLA para la elaboración de una muestra líquida fluorescente.....	38
Fig. 5. a) y b) Proceso de colocación y tinción de tejido con solución de R6G. c) Tejido teñido con R6G. Imagen obtenida con microscopio con un aumento de 10x.	39
Fig. 6 a) Vista superior del dispositivo experimental (sin mostrar el soporte de la muestra) en modo de reflexión para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la energía de excitación. b) Vista lateral del dispositivo completo, incluido el soporte de las muestras fluorescentes. c) Variación del espectro de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la luz de excitación en una película de nitrocelulosa con R6G. ND significa filtro de densidad neutra variable, LP filtro óptico de paso largo.....	41
Fig. 7 Procedimiento de alineación a) spot del láser a incidencia normal sobre un papel milimétrico b) Incidencia normal del láser a la muestra c) Muestra desplazada 90° respecto a su eje de giro	43
Fig. 8. Espectros de fluorescencia en tres regiones de una muestra M2.	44
Fig. 9. Espectros de absorbancia (línea azul) y fluorescencia de una muestra M6 con un ángulo de incidencia de 24° (línea roja).	45
Fig. 10. Espectros de emisión de las muestras poliméricas fluorescentes a diferentes concentraciones de R6G (véase la Tabla 1) $\theta_i = 24^\circ$	47
Fig. 11. Intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión máxima en función de la concentración.....	47

Fig. 12 a) Espectros de fluorescencia en película fluorescente en función de la potencia de excitación, longitud de excitación 517 nm. **b)** Variación de la intensidad de fluorescencia a 560 nm en función de la potencia de excitación..... 49

Fig. 13. RMSD en función del valor $\kappa_{1emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE. **a)** M0, **b)** M1, **c)** M2 **d)** M3, **e)** M4, **f)** M5 y **g)** M6..... 53

Fig. 14. Perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación modelado (línea continua) frente a los datos experimentales en una polarización TM **a)** M0, **b)** M1 **c)** M2 **d)** M3, **e)** M4, **f)** M5 y **g)** M6..... 55

Fig. 15. Perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación modelado (línea continua) frente a los datos experimentales en una polarización TE **a)** M0, **b)** M1, **c)** M2 **d)** M3, **e)** M4, **f)** M5 y **g)** M6..... 56

Fig. 16 Variación del índice de extinción a diferentes longitudes de onda de emisión para las 59

Fig. 17 Penetración de la luz en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. **a)** M0, **b)** M1, **c)** M2, **d)** M3, **e)** M4, **f)** M5, y **g)** M6..... 60

Fig. 18 Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia máxima normalizada de película fluorescente con partículas de borosilicato de 10 μm en función del ángulo de incidencia **a)** para luz de excitación polarizada TM (símbolos de estrella) y el mejor ajuste del modelo teórico; **b)** igual que a) pero para luz de excitación polarizada TE. 62

Fig. 19 RMSD en función del valor de $\kappa_{1emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE en películas fluorescentes con partículas de borosilicato de 10 μm 63

Fig. 20 Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia máxima normalizada de solución de R6G en función del ángulo de incidencia **a)** para luz de excitación polarizada TM (símbolos de estrella) y el mejor ajuste del modelo teórico; **b)** igual que a) pero para luz de excitación polarizada TE. 65

Fig. 21 RMSD en función del valor de $\kappa_{1emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE en tejido epitelial de cebolla teñido con R6G..... 66

Fig. 22 a) Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia máxima normalizada, solución de yoduro de propidio en función del ángulo de incidencia para luz de excitación polarizada TM y TE en color rojo y negro, respectivamente. (símbolos de estrella) y el mejor

ajuste del modelo teórico. **b)** RMSD en función del valor de $\kappa_{1emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE en solución de yoduro de propilio. 68

Fig. 23. Espectro de fluorescencia como función el ángulo de incidencia del haz de excitación a) solución de Yoduro de Propilio b) Película fluorescente tipo M2. 70

Fig. 24. Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia máxima normalizada de tejido epitelial teñido con R6G en función del ángulo de incidencia a) para luz de excitación polarizada TM (símbolos de estrella) y el mejor ajuste del modelo teórico; b) igual que a) pero para luz de excitación polarizada TE. 72

Fig. 25. RMSD en función del valor de $\kappa_{1emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE en tejido epitelial de R6G teñida con R6G. 73

Fig. 26 Vista superior del sistema para medir la potencia transmitida en celdas con grosores de 1, 3 5 y 7 mm. 78

Fig. 27 Potencia transmitida en función del grosor de 4 celdas con solución de R6G a) L0 exp, b) L1 exp y c) L2 exp. 79

Fig. 28 Vista superior del dispositivo experimental en modo de reflexión observador y fuente de excitación a incidencia normal para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del espesor del medio activo. 81

Fig. 29 Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia a 561 nm en función del grosor del medio activo. Observado y fuente de excitación están a incidencia normal a) L exp, b)L1 exp y c) L2 exp. 82

Listado de Tablas

Tabla 1. Concentración de las soluciones preparadas y	38
Tabla 2. Datos experimentales para ocho concentraciones de R6G. Polarización TM ...	57
Tabla 3. Datos experimentales para ocho concentraciones de R6G.....	57
Tabla 4. RMSD obtenida del ajuste teórico a diferentes	59
Tabla 5. Longitud de penetración de la luz en función	61
Tabla 6 Datos experimentales para película fluorescente tipo M1 con partículas	63
Tabla 7 Datos experimentales para solución fluorescente tipo M7.....	66
Tabla 8. Datos experimentales para solución de yuduro de popilio	69
Tabla 9. Datos experimentales para tejido teñido con R6G.	73
Tabla 10 Coeficientes del ajuste teórico en solución de R6G	80
Tabla 11 Coeficientes del ajuste teórico en solución de R6G	83

1 CAPÍTULO

INTRODUCCIÓN

La fluorescencia es un caso particular del fenómeno conocido como fotoluminiscencia. Es la propiedad que tienen ciertos materiales de absorber luz y reemitirla a longitudes de onda distintas[1]. Las moléculas que tienen esta propiedad son conocidas como fluoróforos, se encuentran en muchos materiales, como ciertos pigmentos, tintas, colorantes, minerales y medios biológicos.

Este fenómeno se representa gráficamente en el diagrama de Jablonski ver **Fig. 1**. En esta figura se ilustran las transiciones electrónicas más probables durante los procesos de excitación, relajación electrónica y su consecuente emisión de luz.

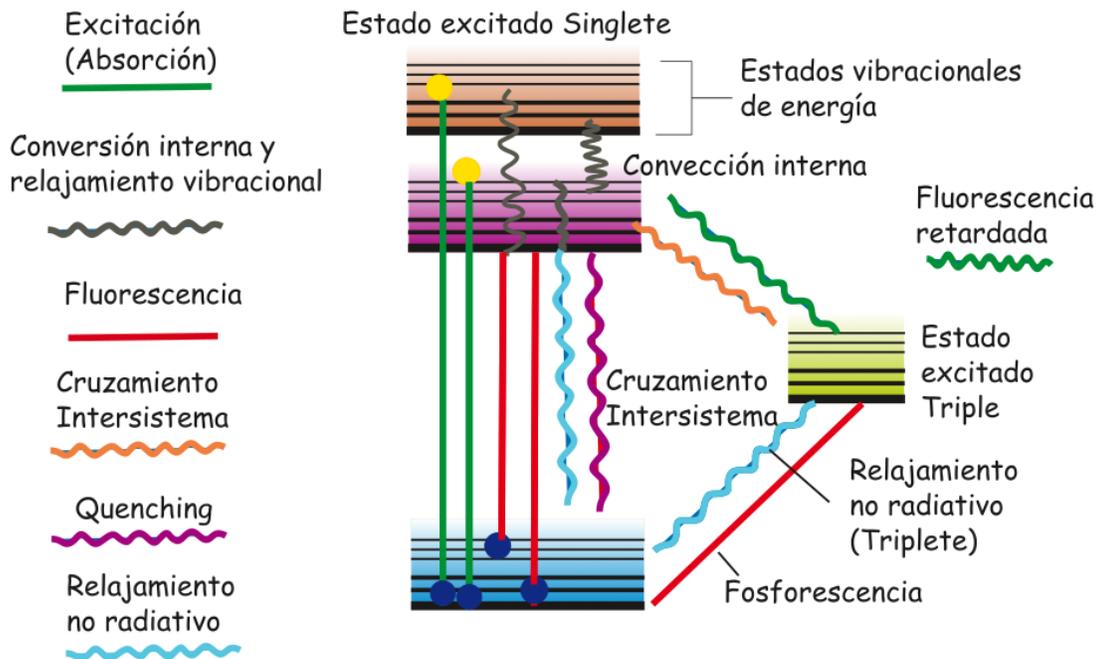


Fig. 1. Representación esquemática del diagrama de Jablonski, procesos de excitación y relajación electrónica y su consecuente emisión de luz.

El fenómeno de fluorescencia pueden detectar concentraciones de femto-molares [2], [3], moléculas únicas [4], [5] o procesos dinámicos en escala de nanosegundos [6] a partir de la emisión de fluorescencia. La fluorescencia, por su alta sensibilidad, es de interés en áreas como la química clínica y diagnóstica [7], [8] y la biología celular y molecular[9]. En la microscopía de fluorescencia se utiliza la emisión de luz para etiquetar y visualizar componentes celulares [10]–[12]. La fluorescencia también se utiliza en la fabricación de pantallas[13], la iluminación [14], [15], el desarrollo de sondas [16] y en diversos láseres[17], [18].

Existen procesos o variables que afectan la emisión de fluorescencia, por ejemplo: cambios en temperatura, pH, viscosidad, variación en el campo eléctrico, entre otros [1]. Cada variable en el proceso de fluorescencia modifica la absorción y emisión de luz. Por tanto, la fluorescencia puede ser utilizada en la fabricación de sensores en diversas áreas [19]–[25]. Un parámetro intrínseco de un material fluorescente es el coeficiente de absorción. El coeficiente de absorción se utiliza para cuantificar la eficacia con la que un material captura la luz. Es una propiedad fundamental que influye directamente en la intensidad de fluorescencia que se puede obtener del material. En principio, un coeficiente de absorción elevado indicaría que el material capta una mayor cantidad de luz, lo que podría resultar en una fluorescencia de mayor intensidad. Por contraparte, si el coeficiente de absorción es reducido, el material absorberá menos luz, lo que potencialmente podría dar lugar a una fluorescencia de menor intensidad[26]. No obstante, es importante destacar que esta suposición no siempre es válida, ya que hay casos en los que materiales fluorescentes con una alta capacidad de absorción pueden estar sujetos a procesos de reabsorción de energía[27]–[29]. Esto se refiere a que la luz emitida por un fluoróforo es absorbida nuevamente por otro fluoróforo cercano, lo que puede reducir la emisión final de la fluorescencia. Esto puede ocurrir especialmente en sistemas donde hay una alta concentración de fluoróforos o equivalentemente cuando estos están muy próximos entre sí. Esto es más crítico cuando existe un traslape importante entre la banda de emisión y la banda de absorción[30]. Los procesos de reabsorción energética son fenómenos generalmente no deseados en la mayoría de las aplicaciones de fluorescencia, ya que puede disminuir la señal fluorescente y generar resultados inexactos [31]. Sin embargo, en ciertos casos específicos y bajo ciertas condiciones, la reabsorción energética puede ser aprovechada y utilizada de

manera ventajosa, ejemplo de ello, la Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET, por sus siglas en inglés: Förster Resonance Energy Transfer). La FRET es un fenómeno de transferencia de energía no radiativa entre dos fluoróforos cuando están muy cercanos entre sí, generalmente a una distancia de unos pocos nanómetros. Esta se basa en la interacción dipolo-dipolo entre los estados electrónicos de los fluoróforos y ocurre en un proceso de transferencia de energía sin emisión de fotones. En principio la FRET involucra dos fluoróforos: un donante y un aceptor. El donante se excita inicialmente con luz de alta energía, y en lugar de emitir luz fluorescente, transfiere parte de su energía al aceptor cercano por un mecanismo de resonancia. El aceptor, a su vez, puede estar emitiendo luz a una longitud de onda diferente a la del donante. En general, la FRET se emplea en aplicaciones como ensayos inmunológicos[32], estudios de interacción proteína-proteína[33] y en técnicas avanzadas de microscopía [34].

En términos generales aplicaciones relacionadas con materiales fluorescentes, es crucial comprender cómo la luz de excitación es absorbida o atenuada. Medir la atenuación de la luz que excita al medio es relativamente fácil y se puede hacer con técnicas estándar de espectroscopia de absorción. Igualmente medir la absorción a longitudes de onda dentro de la banda de emisión de un medio fluorescente mientras este no está excitado y emitiendo se puede hacer por técnicas estándar de espectroscopia de absorción. En general son coeficientes de absorción muy pequeños o despreciables. Sin embargo, puede no ser el caso cuando el medio está excitado y emitiendo luz. De hecho, en muchas aplicaciones de fluorescencia, no se tiene información sobre la absorción de la luz emitida durante el proceso de fotoluminiscencia. A primera vista, esto podría no parecer relevante si los espectros de absorción y emisión del fluoróforo están claramente separados y no se traslapan. Sin embargo, como ya se mencionó la situación puede cambiar cuando consideramos la posibilidad de que el coeficiente de absorción en la banda de emisión pueda ser distinto durante el proceso de emisión que cuando no está emitiendo. Esto es posible debido a efectos de reabsorción energética mientras los fluoróforos están excitados y emitiendo simultáneamente.

Esta posibilidad se vuelve especialmente importante en materiales que contienen una alta concentración de fluoróforos o en casos en los que se busca una alta eficiencia lumínica[14],

[15], [17], [18], [35]. En estas situaciones, no es difícil pensar o imaginarse que debido a fenómenos de reabsorción energética el coeficiente de absorción puede cambiar de manera importante a las longitudes de onda de emisión mientras el material está emitiendo luz. Esto puede ser de interés cuando se calcula la longitud de penetración de la luz. La longitud de propagación de la luz es una medida que indica la distancia por la que la luz emitida puede viajar en un material o medio antes de ser atenuada significativamente. Definimos la distancia de propagación como la distancia a la cual la intensidad de la luz se reduce a una fracción específica de su valor original debido a la absorción y dispersión de la luz en el medio. Específicamente, en este trabajo definimos la distancia de propagación como la distancia a la que la intensidad se reduce a su valor inicial entre el número de Euler ($e \cong 2.718$).

La relación entre la luz incidente y los procesos de absorción y emisión deben considerarse cuidadosamente en el diseño de dispositivos en los que utilizan películas de un medio fluorescente. Por ejemplo, en los láseres sintonizables se depositan diferentes grosores del medio activo (medio fluorescente) y varían la concentración de fluoróforos para obtener la mayor cantidad de luz fotoluminiscente [36]–[38]. Sin embargo, si no se considera el coeficiente de absorción durante el proceso de emisión, el cual determina la longitud de propagación de la luz emitida, es muy posible que se deposite una cantidad del medio activo innecesario o excesivo.

En resumen, en las aplicaciones que involucran materiales fluorescentes, es esencial considerar cómo la longitud de propagación de la luz emitida se ve afectada por la excitación de los fluoróforos durante el proceso de fotoluminiscencia, especialmente en materiales con alta concentración de fluoróforos donde la reabsorción de la luz emitida puede tener un impacto significativo en el coeficiente de absorción.

La medición del coeficiente de absorción de medios fluorescentes presenta algunos retos debido a los procesos simultáneos de absorción y emisión que tienen lugar. Por ejemplo, para obtener el espectro de absorción de una película delgada fluorescente se puede utilizar un espectrofotómetro compuesto por dos monocromadores[1], [39]–[41]. Un monocromador se utiliza para iluminar la película con luz monocromática y el otro monocromador se utiliza para cuantificar la luz transmitida a través de la película a la misma longitud de onda que la

luz incidente. De este modo, se filtra la luz emitida a otras longitudes de onda. El coeficiente de absorción a la longitud de onda elegida se obtiene a partir de la transmitancia a esta longitud de onda, que a su vez se calcula como la relación entre la potencia transmitida y la potencia incidente. Deben tenerse en cuenta las correcciones de la transmitancia debidas a las pérdidas por reflexión sufridas al entrar y salir del material. Para obtener el espectro del coeficiente de absorción de una película delgada se escanea entonces la longitud de onda de la luz incidente y detectada. El mismo sistema de dos monocromadores se puede usar para medir el espectro de fluorescencia de un material. En este caso se fija la longitud de onda de la luz incidente y se escanea la longitud de onda de la luz detectada. Un aparato de espectrofotometría de dos monocromadores se denomina comúnmente espectrofluorómetro. Por supuesto un espectrofluorómetro es un instrumento complicado y costoso [42], [43]. Si se desea medir el coeficiente de absorción a una longitud de onda de emisión, pero mientras el medio fluorescente está excitado a una longitud de onda específica dentro de la banda de absorción, los espectrofluorómetros estándar no ofrecen un método posible para realizar dicha medición, hay que medir el coeficiente de absorción en las longitudes de onda de emisión durante el proceso de fluorescencia. Las técnicas estándar para medir espectros de absorción utilizan luz transmitida a través de la muestra. En muchas ocasiones la muestra no permite la transmisión de luz debido a la forma de la muestra, el tipo de sustrato o porque la absorción es muy alta. En estos casos será necesario utilizar una configuración de retroluminiscencia. Por configuración de retroluminiscencia entendemos que la luz luminiscente debe observarse en el mismo hemisferio desde el que llega la luz de excitación, que está siendo emitida hacia atrás. De hecho existen varias aplicaciones importantes de las técnicas de espectrofluorometría en la configuración de retroluminiscencia [44]–[51]. En esta configuración, la luz radiada por un fluoróforo debe viajar hacia atrás a través de la región de la muestra que está absorbiendo la luz de excitación. Además, una técnica estándar que emplee un espectrofluorómetro mediría el coeficiente de absorción de la misma longitud de onda en la que se está irradiando la muestra. Sin embargo, como ya se mencionó, no hay garantía de que el coeficiente de absorción, a la longitud de onda de emisión en medios fluorescentes (es decir, mientras la muestra está siendo excitada a otra longitud de onda) sea el mismo que cuando no está fluoresciendo. De hecho, hay que tener en cuenta algunos efectos como la reabsorción energética que hemos mencionado anteriormente, procesos

donde existe la posibilidad de que la absorción en estado excitado (ESA, Excited State Absorption, por sus siglas en inglés) sea diferente de la absorción en estado (no excitado) o de los procesos de emisión espontánea amplificada (ASE, Amplified Spontaneous Emission, por sus siglas en inglés), ambos fenómenos ocurren en fluoróforos con alta eficiencia cuántica como el R6G [52]–[58]. La eficiencia cuántica se define como el número de fotones emitidos entre el número de fotones absorbidos. Estos fenómenos son explicados en el Capítulo 2. Así, podemos anticipar que el índice de absorción a la longitud de onda de emisión en medios fluorescentes difiere del medido con una técnica estándar de espectrofluorimetría. La medición de los espectros ESA se ha realizado en el pasado con técnicas bastante complicadas o que encarecen el arreglo experimental, por ejemplo, láseres pulsados [52]–[56], [59] o disposiciones Z-scan [60], [61]. El uso de estas técnicas en medios más complejos, como los tejidos biológicos, con mezclas complejas de cromóforos y partículas dispersantes, parece difícil. Por lo tanto, sería útil desarrollar técnicas alternativas sencillas para medir el coeficiente de extinción a una longitud de onda diferente a la de la luz que irradia y excita la muestra.

1.1 Planteamiento del problema

El problema que se identificó para trabajar en esta tesis se puede reducir a un problema fundamental o básico. Este es la carencia de una metodología que permita determinar el coeficiente de absorción de un medio fluorescente en la banda de emisión, mientras ocurre el fenómeno de fluorescencia. Planteado en lo general el problema presenta muchos retos por lo que nos limitamos a considerar un medio homogéneo promedio con propiedades fluorescentes, en un semiespacio o equivalentemente una película homogénea suficientemente gruesa para que no transmita luz. Se parte de la hipótesis que en un medio con propiedades fluorescentes el coeficiente de absorción puede cambiar durante el proceso de fotoluminiscencia por procesos de reabsorción energética.

Hasta donde nosotros sabemos este problema no ha sido considerado a la fecha. En general las metodologías actuales se limitan a medir la atenuación de la luz a la longitud de onda de excitación. Sin embargo, la emisión de luz puede cambiar marcadamente el coeficiente de absorción a las longitudes de emisión durante el proceso de fluorescencia. Esto puede tener

relevancia en materiales con alta eficiencia lumínica y es necesario para estimar la longitud de propagación de la luz en el medio. En dispositivos como láseres sintonizables o de iluminación y en ciertas aplicaciones médicas es de interés estimar la profundidad de la que proviene la luz que se obtiene de un medio fluorescente.

1.2 Objetivo General

Proponer, diseñar, implementar y evaluar un método para la determinación del coeficiente de absorción o índice de extinción de medios fluorescentes durante el proceso de fotoluminiscencia.

1.3 Objetivos particulares

Proponer y validar un modelo analítico para el análisis del fenómeno de fotoluminiscencia en películas fluorescentes.

Diseñar e implementar un arreglo óptico para el estudio del fenómeno de fluorescencia en películas homogéneas.

Analizar la dependencia de los espectros de emisión de fluorescencia como función de la concentración, intensidad de excitación y polarización de la luz.

Establecer la metodología con el modelo y el arreglo propuestos para inferir el coeficiente de absorción de medios fluorescentes durante el proceso de fotoluminiscencia.

Explorar la aplicabilidad del método en medios con absorción adicional a la del fluoróforo y turbidez.

1.4 Organización del documento

El presente documento compuesto por 6 capítulos está organizado de la siguiente forma: Capítulo 1. En este capítulo se da una introducción del tema desarrollado y se plantea un enfoque general de la investigación, se plantea el problema a resolver, objetivos y metodología desarrollados. En el Capítulo 2 se explican los conceptos fundamentales relacionados al tema propuesto. En el Capítulo 3 describimos la metodología propuesta y

presentamos el modelo matemático propuesto. En Capítulo 4 describimos el proceso de fabricación de las muestras con propiedades fluorescentes en diferentes escenarios, el dispositivo experimental y la caracterización de películas fluorescentes. En el Capítulo. 5, se presenta el análisis matemático empleado para estimar el índice de extinción y los resultados obtenidos en distintos escenarios de las muestras dopadas con Rodamina 6G (R6G). En el Capítulo 6 se presentan las conclusiones obtenidas al desarrollar este tema de investigación. Finalmente, en el Apéndice presentamos un método para comprobar el comportamiento de la luz de excitación/emisión en un medio fluorescente.

2 CAPÍTULO

MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo describe los conceptos fundamentales relacionados con el tema desarrollado, el fenómeno de fluorescencia y algunos conceptos relacionados, se establecen algunas técnicas empleadas en una configuración de retrodispersión.

2.1 Interacción luz – materia

La interacción de la luz con la materia es un fenómeno que podemos observar cotidianamente, ejemplo de ello; el azul del cielo, el rojo del atardecer o los colores del arcoíris, son manifestaciones de la interacción de la luz con el medio debido al esparcimiento y absorción. Bajo este concepto estudiar la interacción de la luz con la materia dan información de los componentes de un material, esto tiene un enorme campo de aplicaciones como la investigación, industria y medicina[62], [63].

Un parámetro que relaciona estos conceptos, luz-materia, es el índice de refracción (RI, por sus siglas en ingles). El RI depende de las propiedades ópticas del material y la longitud de onda incidente, dependiendo de la longitud de onda, cambiará el valor RI. Se puede definir como la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio. Cada material tiene un valor propio de RI.

La luz que viaja de un medio con un RI a otro distinto experimenta un cambio de dirección, lo que se conoce como refracción. Podemos entender a la refracción como el cambio de dirección de propagación de la luz al pasar de un medio a otro, debido al cambio en su velocidad de propagación. Si la luz viaja de un medio de RI bajo a uno más alto, se desviará hacia la normal, caso contrario de un medio más denso a uno menos denso. Este fenómeno, ya estudiado podemos calcularlo con la ley de Snell, también conocida como la ley de la refracción, donde se establece la relación entre los ángulos de la luz incidente, refractada y los índices de refracción de dos medios:

$$n_1 * \sin(\theta_1) = n_2 * \sin(\theta_2), \quad (1)$$

Donde:

n_1 es el índice de refracción del primer medio.

n_2 es el índice de refracción del segundo medio.

θ_1 es el ángulo de incidencia de la luz.

θ_2 es el ángulo de refracción de la luz.

En general el RI es complejo $n = \tilde{n} + i\kappa$ la parte real del índice de refracción \tilde{n} determina la velocidad de propagación de la luz en un medio, mientras que la parte imaginaria $i\kappa$ describe la atenuación de la luz debido a la absorción o esparcimiento de luz por el material o medio. La parte imaginaria (κ) determina la tasa de atenuación o pérdida de intensidad de la luz debido a la absorción y el esparcimiento del material. Cuanto mayor sea el valor de κ , mayor será la atenuación de la luz medida que viaja a través del material. Es de relevancia especialmente en la óptica no lineal y en la interacción de la luz con materiales altamente absorbentes, como los medios dopados con ciertos iones o en la teoría de guías de onda, en la descripción de metales y en otras áreas donde la absorción de luz desempeña un papel significativo [64]–[66]. También se puede asignar un índice de refracción complejo a medios con esparcimiento. Por ejemplo, un sistema aleatorio de partículas con dimensiones comparables a la longitud de onda. En este caso la parte imaginaria del índice de refracción tiene una contribución por el esparcimiento que dispersa la luz en todas direcciones [67]. Por lo que aun en ausencia de absorción el índice de refracción n de medio turbio es complejo. Dado que la parte real del índice de refracción complejo se denomina comúnmente solo como el índice de refracción, en este trabajo nos referiremos a la parte imaginaria como el índice de extinción. Esta da la posibilidad que además de absorción haya una contribución por esparcimiento. Sin embargo, en este trabajo de tesis son pocos los casos que se consideran con esparcimiento.

2.2 Ley de Beer-Lambert

La Ley de Beer-Lambert describe cómo la intensidad de la luz incidente se reduce o decae a medida que atraviesa un material debido a la absorción por parte de los componentes del material. Cuando la luz incide sobre un material, algunos de los fotones pueden ser absorbidos por las moléculas o partículas presentes en el mismo. Estas moléculas pueden cambiar su estado energético debido a la interacción con la luz, lo que resulta en una disminución en intensidad de la luz que se transmite a través del material.

La Ley de Beer-Lambert establece que la disminución de la intensidad de la luz está relacionada de manera exponencial con la concentración de las especies absorbentes en la muestra y con la longitud del camino óptico que recorre la luz a través del material.

Generalmente, la Ley de Beer-Lambert se expresa como:

$$I = I_0 * e^{-\epsilon cl} \quad (2)$$

Donde:

I es la intensidad de la luz que se transmite a través del material (intensidad transmitida).

I_0 es la intensidad de la luz incidente (intensidad sin absorción).

ϵ es el coeficiente de absorción molar, una constante para cada especie absorbente a una longitud de onda específica.

c es la concentración molar de la especie absorbente en la muestra (mol/L).

l es la distancia que recorre la luz a través del material.

La Ley de Beer-Lambert es válida para soluciones diluidas y condiciones en las que la absorción de la luz es proporcional a la concentración de la especie absorbente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta ley tiene limitaciones en muestras altamente concentradas o en presencia de interacciones moleculares que pueden afectar la absorbancia. En tales casos, pueden requerirse correcciones o consideraciones adicionales para obtener mediciones precisas de la absorción de luz.

Se puede generalizar la Ley de Beer-Lambert en términos del índice de refracción complejo de la siguiente manera. El campo eléctrico de una onda electromagnética plana que se propaga, digamos en la dirección z , en un medio con índice de refracción $n = \tilde{n} + i\kappa$ está dado como,

$$\vec{E} = E_0 \exp[ink_0z] \hat{e} \quad (3)$$

donde E_0 es la amplitud de la onda, k_0 es el número de onda de la onda en el vacío y está dado por $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ siendo λ la longitud de onda en el vacío y \hat{e} es el vector de polarización. La intensidad de esta onda electromagnética se atenúa de la siguiente manera,

$$I(z) = I_0 \exp[-2\kappa k_0z] \quad (4)$$

En este caso el coeficiente de atenuación es (también llamado en ciertos casos coeficiente de extinción)

$$\alpha = 2\kappa k_0 = \frac{4\pi}{\lambda} \kappa \quad (5)$$

Comparando con la Eq. (2) para medios con solo absorción podemos identificar la relación entre κ y el coeficiente de absorción molar ε en estos casos:

$$\varepsilon = \frac{4\pi}{\lambda c} \kappa \quad (6)$$

El coeficiente de absorción, α_{abs} , es el coeficiente absorción molar por la concentración molar es decir $\alpha_{abs} = \frac{4\pi}{\lambda} \kappa$. Entonces claramente en casos con solo absorción, el coeficiente de absorción es proporcional al índice de extinción, y, por lo tanto, es equivalente decir que determinamos el coeficiente de absorción a que determinamos el índice de extinción, pues estos son proporcionales como muestra la ecuación anterior.

2.3 Esparcimiento, absorción, y fluorescencia

El esparcimiento es un proceso vinculado a la interacción de la luz con un entorno determinado. Cuando una onda electromagnética atraviesa dicho medio, entra en contacto con partículas como electrones o átomos, los cuales comienzan a vibrar, dando origen a una radiación electromagnética adicional. En principio, esta nueva radiación se difundirá en múltiples direcciones, y esto dependerá del tamaño de la partícula y de la longitud de onda incidente. En 1871 Rayleigh describió el esparcimiento de luz debido a partículas pequeñas comparadas con la longitud de onda[68]. Mie en 1908, Debye en 1915 y Gans en 1912

describen el esparcimiento de la luz de partículas del tamaño aproximado a la longitud de onda [69] etc. La radiación electromagnética adicional, se conoce como esparcimiento o *scattering* por su traducción del inglés.

La absorción se produce cuando una onda electromagnética incide en una partícula del material, su energía es transferida a un electrón y el electrón se excita pasando a un estado de energía mayor. La absorción de luz puede dar lugar a la excitación o ionización de los átomos o partículas del material, por tanto, puede afectar sus propiedades ópticas y eléctricas. Resultado de este proceso pueden ocurrir varios efectos como; calentamiento del material o reacciones químicas dependiendo de la naturaleza del material y emisión de energía.

Es importante mencionar que la absorción está directamente relacionada con el espectro de absorción del material, que es la medida de la cantidad de luz absorbida en diferentes longitudes de onda. Cada material tiene su propio espectro de absorción característico, determinado por sus propiedades ópticas.

El estudio de la absorción de la luz puede emplearse para distinguir diferentes materiales. En esencia, cada material tiene un espectro de absorción único, lo que implica que a diferentes longitudes de onda la absorción será distinta dependiendo del material. Esto es de gran utilidad ya que es posible identificar diferentes materiales en un compuesto, esto es de interés para distintas áreas[42], [70], [71].

Parámetros como el *scattering* y la absorción son fenómenos que regularmente se estudian por separado. Como ya se explicó, estos parámetros están relacionados con el valor de parte imaginaria del RI de un material, es decir con lo que llamamos el índice de extinción.

El estudio de estos fenómenos es complejo aún en condiciones controladas como las de un laboratorio, además, debemos considerar que actúan simultáneamente. Si consideramos la presencia de elementos como los fluoróforos el problema se complica aún más. Cuando en un medio están presentes partículas fluorescentes absorbiendo y emitiendo luz. Por ejemplo, la absorción por parte de los fluoróforos puede provocar un fenómeno de excitación

electrónica adicional en las moléculas, en el cual los fluoróforos pueden interactuar con los campos electromagnéticos dando lugar a cambios locales en las propiedades ópticas del material.

Respecto al *scattering*, la presencia de fluoróforos puede modificar la velocidad de propagación de la luz incidente dependiendo del tamaño del fluoróforo. En general, la presencia de partículas fluorescentes puede modificar el valor del RI del medio, pueden inducir cambios en la polarizabilidad y en los campos eléctricos locales, modificando el índice de refracción efectivo en el entorno. Los cuales pueden deberse a la concentración, distribución y orientación de los fluoróforos. Estos efectos pueden ser sutiles y de importancia para mejorar técnicas ya establecidas por lo tanto es importante desarrollar técnicas de medición y análisis específicas para detectar y cuantificar dichos cambios.

En general, la presencia de fluoróforos en un material provee la capacidad de modificar el RI del material debido a sus interacciones con la luz. La comprensión y manipulación de estos efectos pueden tener aplicaciones interesantes en campos como, óptica, medicina entre otras. Abriendo nuevas posibilidades para el control y la manipulación de la luz en materiales con propiedades fluorescentes.

2.4 Anisotropía en medios fluorescentes

Un material anisotrópico es aquel que dependiendo de su orientación o dirección sus propiedades ópticas pueden ser distintas. Esto significa que la propagación de la luz, la refracción y polarización, varían dependiendo la orientación del material o dirección de propagación de la luz. Esto se debe a la estructura molecular del material, que puede ser simétrica en algunas direcciones, pero no en otras [72]. En fluorescencia la anisotropía se refiere a la polarización de la luz emitida por una molécula fluorescente. Una de las aplicaciones es medir la orientación molecular mediante la polarización de la luz emitida por una molécula[73].

Cuando una partícula fluorescente es excitada con luz polarizada, la luz emitida por la partícula también estará polarizada. La anisotropía se puede medir comparando la intensidad

de la luz emitida en una dirección paralela al plano de polarización de la luz excitante con la intensidad de la luz de excitación[74]. La anisotropía se suele emplear comúnmente para medir la concentración de proteínas en solución, en áreas como la bioquímica y biológica[75].

2.5 Factores que provocan la disminución de la intensidad de fluorescencia

El apagamiento o disminución de la intensidad de fluorescencia es un fenómeno debido a distintos factores como el fotoblanqueo, degradación, condiciones ambientales y quenching término en inglés. Estos factores son utilizados para distintos fines en el estudio y desarrollo de sensores y métodos de detección.

El fotoblanqueo es la disminución de la intensidad de emisión debido a la exposición prolongada de la luz de excitación. Cuando la exposición a la luz es continua, proporciona suficiente energía para agotar los estados excitados del material fluorescente. Con el tiempo, los electrones localizados en un estado de mayor energía se relajan más rápidamente y la emisión de fluorescencia disminuye.

Con el tiempo, los fluoróforos pueden degradarse debido a distintos factores como; exposición a la luz, la oxidación o reacciones químicas. La degradación de los fluoróforos es un factor que puede disminuir la intensidad de fluorescencia o incluso hacer que desaparezca por completo.

Las condiciones ambientales como el cambio en el pH, las variaciones en la temperatura y la presencia de oxígeno, afectan la intensidad de fluorescencia. Estas condiciones pueden alterar la estructura o propiedades del fluoróforo, resultando en una disminución de la intensidad de fluorescencia.

El quenching, puede ser resultado de varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen reacciones de los estados excitados, formación de clusters, colisiones entre las moléculas y transferencia de energía conocida como FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Förster, por sus siglas en inglés) [1]. En el FRET, el fluoróforo excitado transfiere su energía a un aceptor cercano sin emitir luz. El quenching provee evidencia de interacciones moleculares.

Existen diversas causas, como altas concentraciones de moléculas en el entorno del fluoróforo, interacciones espaciales cercanas entre los fluoróforos o cambios en el entorno molecular que afectan la emisión del fluoróforo. El apagamiento de la fluorescencia por quenching tiene diversas aplicaciones, como en ensayos de detección de biomoléculas, como una estrategia para generar señales de apagado/encendido controladas [30], [76]–[78]

2.6 Procesos de reabsorción de energía; ESA & ASE

Como se definió anteriormente el fenómeno de absorción de la luz se refiere al proceso de atenuación gradual de la luz incidente al propagarse dentro un medio. En este proceso, la energía incidente es transferida a los electrones, átomos o moléculas del material. Existen algunas condiciones donde la energía incidente puede ser reabsorbida. Podemos definir la reabsorción como el proceso donde un electrón o átomo en un estado excitado absorbe nuevamente energía para pasar a un estado energético mayor. Estos procesos pueden ser variados, sin embargo, a continuación, se explicarán dos procesos de reabsorción que pueden presentarse con mayor probabilidad en fluoróforos con eficiencia cuántica.

La Absorción en Estado Excitado (ESA) y la Emisión Espontánea Amplificada (ASE) son fenómenos relacionados a materiales como tintes fluorescentes, los cuales cuando se les hacer incidir energía los electrones excitados del material pasan a un estado energético mayor [52], [53], [57], [79]–[81].

Podemos definir a ESA como el proceso en el cual un material previamente excitado, absorbe energía adicional que obliga a los electrones a elevar el material a estados energéticos aún más altos. ESA es un proceso no radiativo, lo que significa que no hay emisión de luz en el proceso de absorción adicional, contrario a la emisión estimulada o la emisión espontánea.

Los materiales que comúnmente presentan el fenómeno de ESA son fluoróforos empleados en colorantes fluorescentes, son los colorantes orgánicos de alta eficiencia cuántica como las rodaminas 6G y B, fluoróforos ampliamente utilizados en técnicas de microscopía de fluorescencia y biología celular. Estos tienen estructuras químicas que les permiten absorber energía en rangos visible y UV cercano. Además, se han reportado que algunos colorantes

de anilina como son; azul de metileno y verde de indocianina bajo ciertas condiciones pueden inducir la transferencia de energía no radiativa a través de cambios conformacionales [82], [83].

Por otro lado, la ASE es un fenómeno relacionado con la emisión espontánea, con la peculiaridad que ocurre de manera amplificada en un medio activo. La emisión espontánea es un proceso en el cual un material en un estado energético mayor decae a un estado de menor energía emitiendo luz de forma aleatoria. Se debe de entender que la emisión amplificada se logra mediante una instrumentación específica como pueden ser superficies o cavidades que favorezcan dicho fenómeno. Ejemplo donde podemos observar ASE son los láseres sintonizables como aquellos que utilizan R6G que bajo ciertas condiciones de instrumentación es posible lograr la amplificación de la emisión en un rango específico de longitudes de onda [84]–[86].

2.7 Aplicaciones & Técnicas establecidas en configuración de retroluminiscente.

El RI es un parámetro esencial en la determinación de propiedades ópticas y el estado intrínseco de la materia de relevancia en la industria alimentaria [87], procesos de producción [88] y el campo de la biomédica [89], [90]. La estimación de este parámetro se ha estudiado ampliamente [91]–[93]. Sin embargo, en materiales con propiedades fluorescentes existen áreas de oportunidad en la estimación de dicho parámetro. Estos materiales al estar en un estado excitado modifican sus propiedades ópticas y puede variar el RI mientras se presenta el fenómeno de emisión de luz. Estas variaciones pueden llegar a estimarse obteniendo los espectros de absorción y emisión. Sin embargo requiere una instrumentación complicada y costosa [42], [43]. Un aparato de espectrometría de dos monocromadores se denomina comúnmente espectrofluorómetro.

Existen problemas que no pueden resolver los espectrofluorómetros estándar. Por ejemplo, si se desea medir el índice de extinción a una longitud de onda de emisión, pero el medio fluorescente está siendo excitado a una longitud de onda específica dentro de la banda de

absorción, los espectrofluorómetros estándar no ofrecen un método de medición posible. Esto puede ser importante en algunas aplicaciones de la espectrofluorimetría en las que uno puede necesitar conocer la profundidad desde donde se emite la luz fluorescente. Para responder a esta pregunta, hay que medir el índice de extinción en las longitudes de onda de emisión mientras la muestra está siendo excitada una longitud de onda dentro de su espectro de absorción. Esto puede ser particularmente difícil para aplicaciones que utilizan una configuración de retrodispersión. Por configuración de retrodispersión entendemos que la luz luminiscente debe observarse en el mismo hemisferio desde el que llega la luz de excitación.

Existen varias aplicaciones importantes de las técnicas de espectrofluorimetría en la configuración de retroluminiscencia [44]–[51]. Como mencionamos, en esta configuración, la luz radiada por un fluoróforo debe viajar en dirección opuesta a la luz de excitación, es decir a través de la región de la muestra que está absorbiendo la luz de excitación. Una técnica estándar empleada en la medición del índice de extinción mediante un espectrofluorómetro utiliza la misma longitud de onda con la que se irradia la muestra. Sin embargo, no hay garantía de que el índice de extinción medido sea el mismo que el obtenido a la longitud de onda de emisión en medios fluorescentes.

Por lo tanto, sería útil desarrollar técnicas alternativas sencillas para medir el coeficiente de extinción a una longitud de onda diferente a la de la luz que irradia y excita la muestra.

2.8 Estructuras y procesos celulares en tejido: Una visión general

El tejido epitelial es un tejido fundamental que representa más del 60 % de todas las células del cuerpo humano. Los epitelios recubren superficies corporales, internas como externas. Los epitelios varían mucho en cuanto a su conformación y esto dependerá de acuerdo con funciones que desempeñan. El tamaño o grosor promedio del tejido epitelial puede variar dependiendo del tipo de epitelio y su ubicación [94]–[96]. Ejemplo de ello: Epitelio escamoso estratificado tiene un grosor promedio aproximado de 50 a 100 μm . Sin embargo, en las vías respiratorias, el grosor puede ser mucho menor, alrededor de 10 a 30 μm . El epitelio simple plano: se localiza donde la principal función es el intercambio de sustancias, el grosor de este tipo de epitelio puede variar, pero generalmente tiene un espesor de alrededor de 5 a 10

micrómetros. El epitelio cilíndrico simple: se encuentra en órganos como el intestino, donde su función principal es la absorción y la secreción con un grosor aproximadamente 20 a 30 micrómetros.

El tejido epitelial está compuesto por células y diversas moléculas que desempeñan diferentes funciones. Ejemplo de ello, los melanocitos células responsables de la producción de melanina, responsable del color de la piel, el cabello y los ojos. Los melanocitos se encuentran en la capa basal de la epidermis y transfieren la melanina a los queratinocitos para proteger la piel de la radiación ultravioleta. Las células de Langerhans que son células del sistema inmunológico que se encuentran en la epidermis su función consiste en la respuesta inmunológica de la piel al capturar y presentar antígenos a los linfocitos. Los queratinocitos células principales del tejido epitelial, están involucrados en la formación y renovación de la epidermis de la piel [97].

Hoy en día, existe un creciente interés en el desarrollo de herramientas de evaluación que apoyen el diagnóstico de enfermedades crónico-degenerativas. Particularmente, a través de dispositivos basados en técnicas ópticas entre las que se encuentran la espectroscopia de fluorescencia. La espectroscopia de fluorescencia es empleada en análisis de los cambios del entorno molecular en tejidos debidos a alteraciones patológicas [98]–[102].

Los modelos empleados en la interpretación del fenómeno de fluorescencia en tejido contemplan principalmente, propiedades de absorción y dispersión del medio y la estructura intrínseca del material biológico, entre otros [103]–[105]. Sin embargo, a la fecha no ha sido descrito el proceso de emisión en un medio anisotrópico multicapa, lo que puede apoyar a una mejor comprensión de enfermedades crónico-degenerativas. El análisis de este escenario puede explicar y explorar la posibilidad de determinar la profundidad a la que ocurre el fenómeno fluorescente en el tejido. La información de la profundidad a la que ocurre la emisión puede proveer de herramientas de evaluación más exactas y eficaces para asistir el estudio y la evaluación de patologías tales como fibrosis hepática, pie diabético y lesiones cancerígenas en epitelios, por mencionar algunas. Los resultados que se derivan de este trabajo de tesis podrían servir como punto de partida en el estudio de la fluorescencia en tejidos biológicos.

3 CAPÍTULO

METODOLOGÍA Y MODELO ANALÍTICO

En este capítulo se describe la metodología propuesta, se explica un método simplificado para describir cómo varía la intensidad de luz emitida por un medio fluorescente en función del ángulo de incidencia, el estado de polarización y del índice de refracción efectivo.

3.1 Dispositivo y metodología propuestos

El método propuesto está concebido para medir el índice de extinción que experimenta la luz generada en el interior de un medio a medida que se desplaza hacia el exterior. Si la luz se genera (emitida o dispersada) a una distancia z de la interfase, se atenuará exponencialmente en su camino hacia el exterior, siguiendo un compartimiento semejante al descrito por la ley de Beer-Lambert. Supongamos que la luz generada a una profundidad z dentro de la muestra es proporcional a la intensidad de luz de excitación incidente a través de la misma interfaz y a la misma profundidad. La luz incidente que excita el medio también se atenuará al propagarse dentro de la muestra siguiendo una ley de tipo Beer-Lambert con el correspondiente coeficiente de extinción. Si las longitudes de onda de la luz excitante y emitida son diferentes, entonces los coeficientes de extinción correspondientes pueden ser diferentes. Este sería el caso de un medio fotoluminiscente.

El método que aquí se propone consiste en iluminar la muestra con un haz de luz bien colimado, fijando el ángulo de visión normal a la interfase y variando el ángulo de incidencia de la luz excitadora, tal como se ilustra en la **Fig. 2**. La longitud de penetración del haz excitador y el ángulo de incidencia de la luz excitadora son diferentes. La longitud de penetración del haz excitador dependerá del ángulo de incidencia y del coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación, mientras que la atenuación de la luz emitida dependerá únicamente del índice de extinción a la longitud de onda de emisión. La dependencia de la intensidad de la luz emitida en función del ángulo de incidencia de la luz excitadora debería permitir deducir el valor del índice de extinción en la longitud de onda de

emisión. Esta es la idea básica del método propuesto. En principio, podría aplicarse ventajosamente a medios fluorescentes con absorción adicional distinta a la de los fluoróforos. Este método es una variación de un método establecido previamente para medir el RI efectivo de medios con alta dispersión [106], [107].

El método propuesto depende de un modelo teórico que se ajusta a los datos experimentales y así obtener el índice de extinción visto por la luz emitida. En la siguiente sección proporcionamos el modelo.

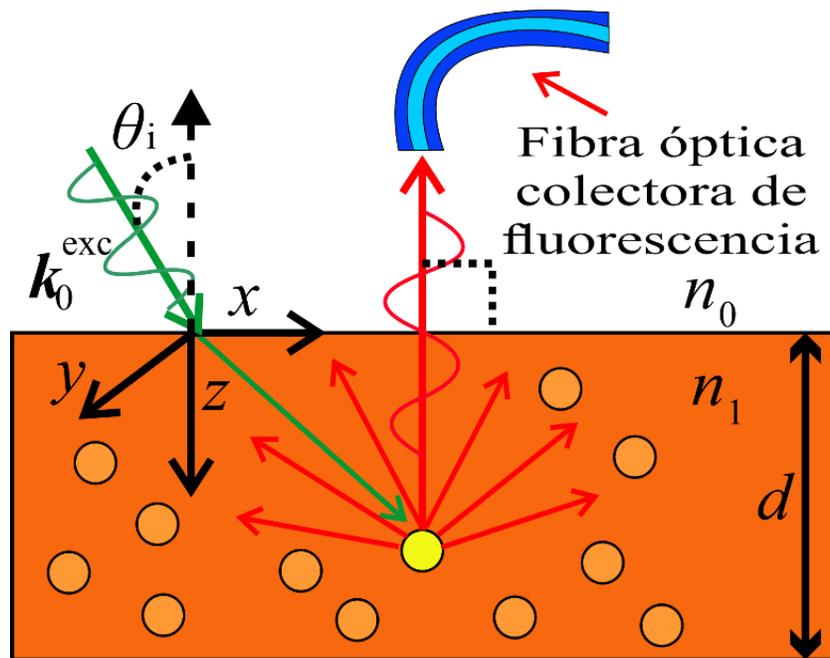


Fig. 2 Esquema de un fluoróforo excitado y emitiendo inmerso en un medio translúcido y semi-infinito en una configuración de retroiluminación. El haz excitador llega a la muestra con un ángulo de incidencia oblicuo variable.

3.2 Modelo analítico

Suponemos un frente de onda plana incidiendo a un ángulo θ_i desde un semiespacio de RI n_0 en un medio fluorescente n_1 de espesor d . En general, ambos, n_0 y n_1 son función de la longitud de onda de la luz. Sin embargo, en nuestro caso, el medio de incidencia es el aire donde asumimos que $n_0 \cong 1$, en todas las longitudes de onda. El RI del medio es un número complejo $n_1 = \tilde{n}_1 + i\kappa_1$. No existe una convención universal sobre cómo nombrar las partes reales e imaginarias del índice de refracción. Aquí nos referiremos a la parte real \tilde{n}_1 , como

el índice de refracción, y a la parte imaginaria κ_1 , como el índice de extinción o absorción. El índice de extinción viene dado por 4π veces el índice de extinción dividido por la longitud de onda en el vacío. La onda incidente se refractará entrando en el medio fluorescente y se atenuará a medida que se propaga en su interior. Supongamos que el campo eléctrico excitante en un punto en el espacio \mathbf{r} y el tiempo t , está dada por,

$$\mathbf{E}_{exc} = E_0 \exp(i\mathbf{k}^{exc} \cdot \mathbf{r} - i\omega_{exc}t) \hat{\mathbf{e}} \quad (7)$$

donde $\hat{\mathbf{e}}$ es el vector de polarización, E_0 es la amplitud del campo, \mathbf{k}^{exc} el vector de onda y ω_{exc} es la frecuencia radial. ω_{exc} puede expresarse en términos de la longitud de onda de la luz de excitación en el vacío, λ_{exc} . Tenemos que $\omega_{exc} = 2\pi c / \lambda_{exc}$, donde c es la velocidad de la luz en el vacío. Colocando los ejes de coordenadas como se muestra en la Fig. 1, tenemos que fuera del medio fluorescente, \mathbf{k}^{exc} viene dado $\mathbf{k}^{exc} = k_0^{exc} \sin \theta_i \hat{\mathbf{a}}_x + k_0^{exc} \cos \theta_i \hat{\mathbf{a}}_z$. donde $k_0^{exc} = n_0 \omega_{exc} / c$. $\hat{\mathbf{a}}_x$ y $\hat{\mathbf{a}}_z$ son vectores unitarios a lo largo de los ejes x y z respectivamente. Dentro del medio 1, el vector de onda de la onda excitante viene dado por,

$$\mathbf{k}^{exc} = k_0^{exc} \sin \theta_i \hat{\mathbf{a}}_x + k_0^{exc} \sqrt{(n_1^{exc})^2 - \sin^2 \theta_i} \hat{\mathbf{a}}_z \quad (8)$$

donde $n_1^{exc} = \tilde{n}_1^{exc} + i\kappa_1^{exc}$ es el índice de refracción del medio 1 en la longitud de onda de excitación, es decir, $n_1^{exc} = n_1(\omega_{exc})$. Dado que es un número complejo, el componente del vector de onda dentro del medio 1, $k_z^{exc} = k_0^{exc} \sqrt{(n_1^{exc})^2 - \sin^2 \theta_i}$, también es complejo. La amplitud de la onda refractada en medio 1 se multiplica por el coeficiente de transmisión de la interfaz. Asumiremos que la interfaz es plana, y por lo tanto, las fórmulas de Fresnel dan el coeficiente de transmisión para la polarización correspondiente [108], [109]. Si ignoramos cualquier reflexión en la interfaz posterior del medio fluorescente $z = d$ a la intensidad de la onda electromagnética dentro del medio 1, I_{exc} viene dada por el promedio temporal del vector de Poynting, como se muestra en la Ec. (9) [110].

$$I_{exc} = T_{01}(\theta_i) I_0 \exp \left[-2k_0^{exc} \text{Im} \left(\sqrt{(n_1^{exc})^2 - \sin^2 \theta_i} \right) z \right] \quad (9)$$

Donde $T_{01}(\theta_i)$ es la transmitancia de la interfaz del medio 0 al medio 1 en el ángulo de incidencia θ_i , e I_0 es la intensidad de la onda incidente en el medio 0.

Ahora supongamos que el medio 1 es un medio fluorescente con un espectro de emisión bien definido. Por lo general, el espectro de emisión es independiente de la longitud de onda de excitación [1]. Supongamos también que la luz emitida en un punto \mathbf{r} dentro del medio es proporcional a la intensidad de la onda excitante en ese mismo punto en el espacio y con un factor de eficiencia dependiendo del fluoróforo, su densidad, el medio circundante y la frecuencia de excitación, digamos $\gamma(\omega_{exc})$. La luz se emite en el punto \mathbf{r} en todas las direcciones, pero la luz que llega a un fotodetector en medio 0 se habrá atenuado debido a la absorción en su salida de la muestra a lo largo del eje z . Para simplificar, asumiremos que el índice de absorción en todas las longitudes de onda de emisión, λ_{emi} , es constante dentro del medio 1. Aunque esto se puede justificar en medios turbios absorbentes o no luminiscentes, podría ser una sobre simplificación en el caso de los medios fluorescentes, ya que el índice de absorción a una profundidad z puede depender del número de fluoróforos excitados y esto, en general, decaerá exponencialmente con la profundidad. Sin embargo, supondremos que es una aproximación razonable considerarlo constante cuando el índice de extinción es mayor en la longitud de onda de emisión que en la longitud de onda de excitación. Entonces, la luz emitida desde el punto \mathbf{r} se atenuará en su camino hacia el detector por un factor $T_{10}(0) \exp[-2k_0^{emi} \kappa_1^{emi} z]$, donde $\kappa_1^{emi} = \text{Im}(n_1^{emi})$, z es la distancia a la interfaz desde el punto \mathbf{r} , $T_{10}(0)$ es la transmitancia del medio 1 al medio 0 en incidencia normal, y n_1^{emi} es el índice de refracción complejo n_1 a la longitud de onda de emisión, es decir. $n_1^{emi} = n_1(\omega_{emi})$.

Dicho lo anterior, la intensidad de la luz recibida en el detector, con ángulo incidencia cero (i.e. normal), desde una capa delgada dentro del medio fluorescente de ancho dz , a una profundidad z , viene dada por:

$$dI_{det}(z, \theta_i) = \gamma(\omega_{exc}) T_{10}(0) T_{01}(\theta_i) I_0 \exp[-2\{k_0^{emi} \text{Im}(n_1^{emi}) + k_0^{exc} \text{Im}(\sqrt{(n_1^{exc})^2 - \sin^2 \theta_i})\}z] dz \quad (10)$$

Integrando I_{det} a lo largo de z en el medio 1, es decir, desde la interfaz con el medio 0 en $z = 0$ a $z = -d$ obtenemos:

$$I_{det}(\theta_i) = \frac{I_0 \gamma(\omega_{exc}) T_{10}(0) T_{01}(\theta_i) \{1 - \exp[-\beta(\theta_i)d]\}}{2\beta(\theta_i)}, \quad (11)$$

Dónde

$$\beta(\theta_i) = k_0^{emi} \text{Im}(n_1^{emi}) + k_0^{exc} \text{Im}\left(\sqrt{(n_1^{exc})^2 - \sin^2 \theta_i}\right). \quad (12)$$

Este modelo matemático describe el perfil de intensidad de fluorescencia del medio en función del ángulo de incidencia de la energía de excitación en el modo de retroluminiscencia. Si el espesor del medio y su índice de absorción en las longitudes de onda de excitación y emisión son tales que el término exponencial en la Ec. (11), satisface la condición $\exp[-\beta(\theta_i)d] \ll 1$, podemos despreciarlo, lo que supone un medio fluorescente de espesor infinito.

El método propuesto en este trabajo consiste en variar el ángulo de incidencia de la energía de excitación y medir la emisión fluorescente a lo largo de la normal a la interfaz. Posteriormente, se ajusta el modelo propuesto a los datos experimentales para determinar la parte imaginaria de n_1^{emi} , es decir, $\text{Im}(n_1^{emi}) = \kappa_1^{emi}$. En la práctica, podemos trabajar con intensidades normalizadas definidas como la intensidad en un ángulo de incidencia θ_i dividido por la intensidad en un ángulo de referencia especificado, $I(\theta_i) = I_{det}(\theta_i)/I_{det}(\theta_{ref})$. Luego, para obtener κ_1^{emi} , podemos trazar $I(\theta_i)$ para $\theta_i > \theta_{ref}$ y ajustar $I(\theta_i)$ para determinar el valor de κ_1^{emi} . La ventaja de trabajar con una intensidad normalizada es que no necesitamos conocer el valor de los factores $I_0 \gamma(\omega_{exc}) T_{10}(0)$ en la Ec. (11).

La intensidad normalizada $I(\theta_i) = I_{det}(\theta_i)/I_{det}(\theta_{ref})$ predicha por la Ec. (11) depende sólo de la relación $\frac{\kappa_1^{emi}}{\kappa_1^{exc}}$. Por lo tanto, para obtener κ_1^{emi} necesitamos saber κ_1^{exc} , pero este valor se puede medir fácilmente por transmisión a incidencia normal a través de una muestra de ancho finito a la longitud de onda de excitación y utilizando la ley de Beer-Lambert.

El modelo propuesto asume que la luz de excitación y de emisión se atenúan al propagarse dentro del medio 1 siguiendo una ley de tipo Beer-Lambert. En el Apéndice mostramos un método simple y directo donde comprobamos que la luz de excitación y emisión en el medio

1 y que viaja de regreso al detector en el modo 0 tiene un comportamiento exponencial. El método propuesto en el apéndice parte de consideraciones sencillas y puede ser aplicado en medios diluidos o densidades muy bajas.

4 CAPÍTULO

CARACTERIZACIÓN

En este capítulo se explicará el proceso de manufacturación de muestras dopadas con R6G. Se elaboraron diferentes escenarios como son: Películas sólidas con R6G, un contenedor con solución de R6G y tejido epitelial teñido con R6G. Por otra parte, se explica el montaje experimental, su proceso de alineación y las pruebas ópticas realizadas para la caracterización de películas fluorescentes.

4.1 Proceso de fabricación de películas fluorescentes

Se preparó una dilución patrón de 0.0149 g de R6G en 15.0 ml de una suspensión de nitrocelulosa (esmalte de uñas topcoat). La dilución resultante corresponde a una concentración húmeda de 2.1×10^{-3} M (moles por litro). Además de la solución patrón, preparamos siete diluciones. La incertidumbre en la concentración de las ocho muestras se estimó en torno al 1%. Se depositaron 0.5 g de cada solución en recipientes rectangulares fabricados en PLA con una impresora 3D, montado sobre un portaobjetos de vidrio, como se muestra en la **Fig. 3**. Después de 24 hrs de secado a temperatura ambiente, se obtuvieron películas de 10×36 mm.

Las películas fluorescentes resultantes no presentaban una dispersión significativa. Su espesor no era totalmente uniforme en todas las muestras. Los espesores se midieron en diferentes posiciones con un micrómetro de 1 μm de resolución (734xfl-1 Starrett, USA) mostrando una variación de 6 μm . El espesor en el centro de las muestras, utilizadas en este trabajo, y sus concentraciones húmedas nominales se indican en la **Tabla 1**.

La determinación de κ_1^{exc} para cada muestra a partir de medidas de transmitancia, se realizó asumiendo el espesor dado en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Concentración de las soluciones preparadas y espesor promedio de películas fluorescentes.

Tipo de muestra	Concentración húmeda nominal ($\times 10^{-3} \text{ M}$)	Espesor de la muestra (μm)
M0	2.1	145
M1	1.6	154
M2	0.54	135
M3	0.30	138
M4	0.21	148
M5	0.16	154
M6	0.13	148
M7	0.0080	161

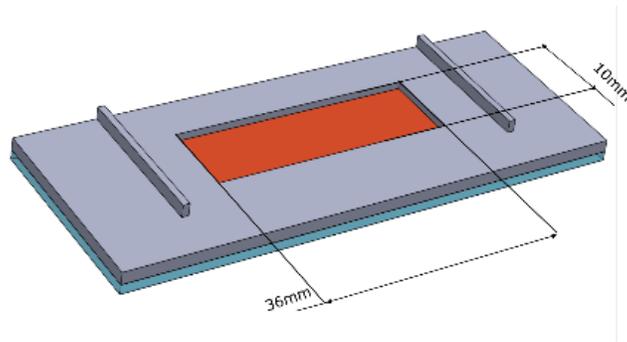


Fig. 3. Molde en PLA para la elaboración de películas fluorescentes.

4.2 Proceso de fabricación de una muestra líquida fluorescente

En impresora 3D se elaboró un molde de casete rectangular con una ventana ver **Fig. 4** en PLA para colocar solución del medio activo, el cual está montado sobre un portaobjetos y de tapa un cubreobjetos. El recipiente tiene dos huecos que facilitan el llenado del recipiente. Las dimensiones son 12 x 12 x 1 mm el cual es llenado con la solución de R6G a la concentración deseada.

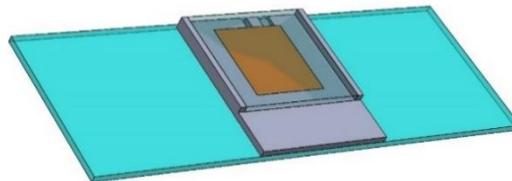


Fig. 4. Molde en PLA para la elaboración de una muestra líquida fluorescente.

4.3 Proceso de tinción, tejido con propiedades fluorescentes.

Para llevar a cabo la tinción del epitelio de cebolla, se extrae el tejido de la parte cóncava interna de una hoja de cebolla, con una micropipeta se depositan 15 μL de solución de R6G en el centro de un portaobjetos como se muestra en **Fig. 5a**, se coloca cuidadosamente el tejido por el lado de la superficie no hidrófoba sobre la gota de R6G y se hace una ligera presión en las orillas del tejido como se puede ver en la **Fig. 5b**. Al seguir esta metodología se logra una tinción como la observada en **Fig. 5c**. Se debe aclarar que 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 [111]. Además, las muestras se obtienen de la parte central de cada hoja debido a que esta región del epitelio tiene un grosor más homogéneo. Esto se corroboró tomando 5 hojas de 3 diferentes cebollas y el grosor medido fue de $150 \pm 10 \mu\text{m}$.

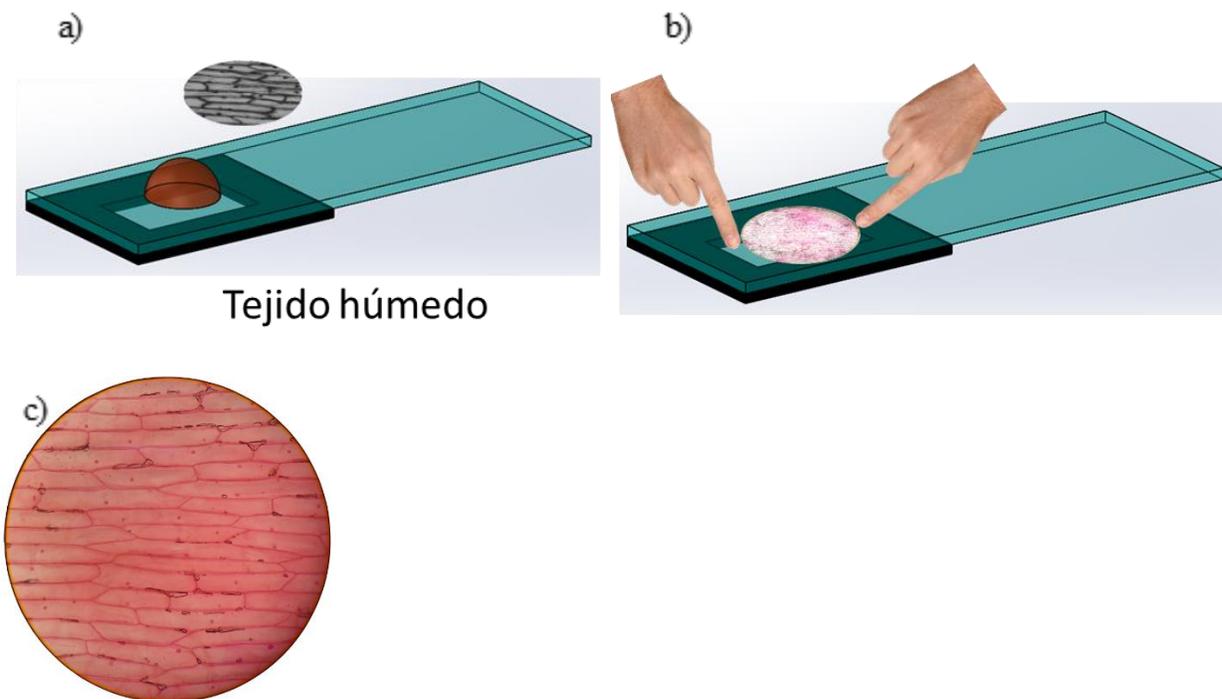


Fig. 5. a) y b) Proceso de colocación y tinción de tejido con solución de R6G. c) Tejido teñido con R6G. Imagen obtenida con microscopio con un aumento de 10x.

4.4 Montaje experimental

En la **Fig. 6a** y **Fig. 6b** mostramos el diagrama de vista superior del arreglo óptico y el soporte de la muestra. La muestra se monta con su superficie vertical (véase la **Fig. 6b**) en una platina giratoria motorizada (PRMTZ8/M, Thorlabs Inc. NJ) controlada con una interfaz MATLAB (Licencia 40816183). Se fijó un diodo láser (DL) de 7 mW a 517 nm (1264216, Edmund Inc. NJ) fuera de la platina giratoria apuntando hacia el eje de rotación de la muestra, como se ilustra en la **Fig. 6a**. El ángulo de incidencia se varió girando la muestra. Para garantizar que el punto láser incidiera siempre en la misma posición sobre la muestra, a pesar de la rotación de ésta, la primera superficie de la película se fijó tangente al eje de rotación. Para controlar la potencia incidente y la polarización del haz láser de excitación, colocamos delante del DL un filtro de densidad neutra (DN) variable para reducir la intensidad y evitar el blanqueamiento de la muestra y un polarizador lineal (WP25M-VIS, Thorlabs Inc. NJ). Para el registro de la fluorescencia en modo de reflexión normal a la superficie de la muestra, utilizamos una fibra óptica y un espectrofotómetro portátil (USB4000, Ocean Optics Inc. NJ). Los parámetros utilizados al registrar los espectros de luz luminiscente fueron, tiempo de integración 100 ms, n° de barridos promediados 4, anchura de la caja 40 píxeles. Para recoger la luz emitida por la película fluorescente se utilizó una fibra óptica multimodo con una apertura numérica de 0.22, (UV/SR-VIS de alto contenido en OH, Ocean Optics Inc. NJ) y un filtro óptico de paso largo (filtro PL) con una longitud de onda de corte de 550 nm (FGL550, Thorlabs Inc. NJ). El filtro elimina la luz de la fuente de excitación que entra en la fibra óptica debido a la dispersión espuria en la superficie de la muestra. La fibra y el filtro LP se fijaron en la platina giratoria y se colocaron con visión normal respecto a la superficie de la muestra para mantener el ángulo de observación (visión normal) durante todo el registro de la intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia.

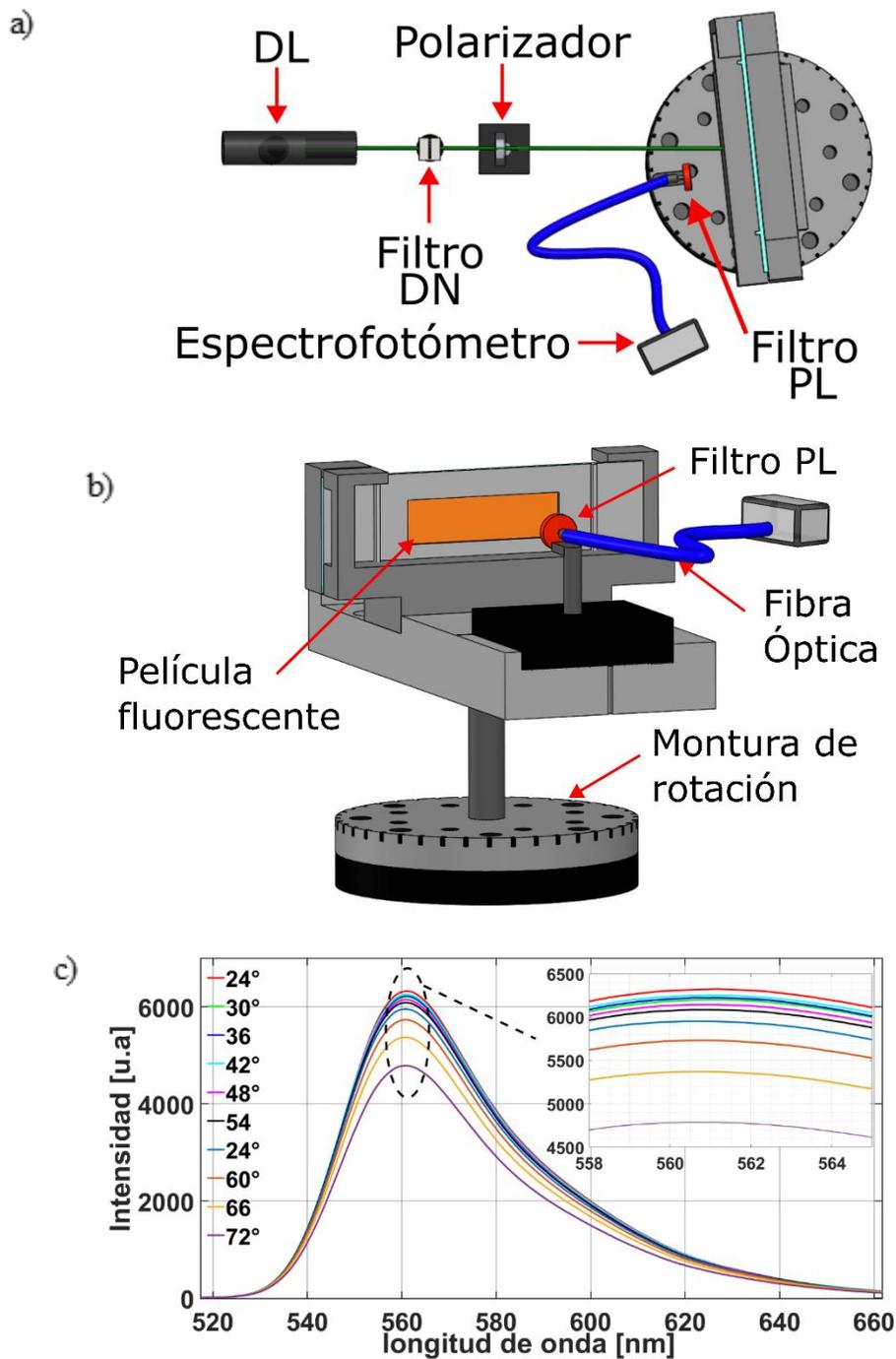


Fig. 6 a) Vista superior del dispositivo experimental (sin mostrar el soporte de la muestra) en modo de reflexión para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la energía de excitación. b) Vista lateral del dispositivo completo, incluido el soporte de las muestras fluorescentes. c) Variación del espectro de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la luz de excitación en una película de nitrocelulosa con R6G. ND significa filtro de densidad neutra variable, LP filtro óptico de paso largo.

En la **Fig. 6c**, mostramos 10 espectros de fluorescencia recolectados con diferentes ángulos de incidencia. Podemos ver que la intensidad de los espectros disminuye a medida que aumenta el ángulo de incidencia. En el recuadro de la **Fig. 6c**, podemos apreciar que la localización del máximo de los espectros permanece en una longitud de onda fija.

4.5 Alineación del sistema

En esta sección presentaremos el proceso de alineación del sistema. Se debe aclarar que, la fuente de excitación (diodo laser) y la montura de desplazamiento angular, están sobre platinas de desplazamiento lineal (x/y) con la finalidad de realizar ajustes finos en la alineación del sistema.

El proceso de alineación consiste en fijar el DL e identificar su camino óptico. Frente a él DL, se coloca la platina giratoria, localizando el centro o eje de rotación con ayuda de una plomada. Sobre la planita, colocamos una montura impresa en 3D en forma de casetera en donde colocan las muestras.

Para garantizar que el haz del DL está alineado con el eje de rotación de la platina de desplazamiento angular, se prepara un blanco de referencia, Este blanco es un portaobjetos que tiene pegado un papel milimétrico, en donde se coloca una marca o indicador donde incide el haz del DL. Como se muestra en la **Fig. 7a** el blanco se coloca a incidencia normal (ver **Fig. 7b**). Posteriormente, se varía la posición angular de la platina giratoria hasta 90° y el haz incidente sobre el blanco no debe cambiar su posición pese al desplazamiento angular de la platina.

En 90° el haz incidente debe ser rasante a la primera superficie como se muestra en la **Fig. 7c**. En caso de existir un desplazamiento, este se elimina ajustando con las platinas de desplazamiento lineal del DL o de la platina de desplazamiento angular.

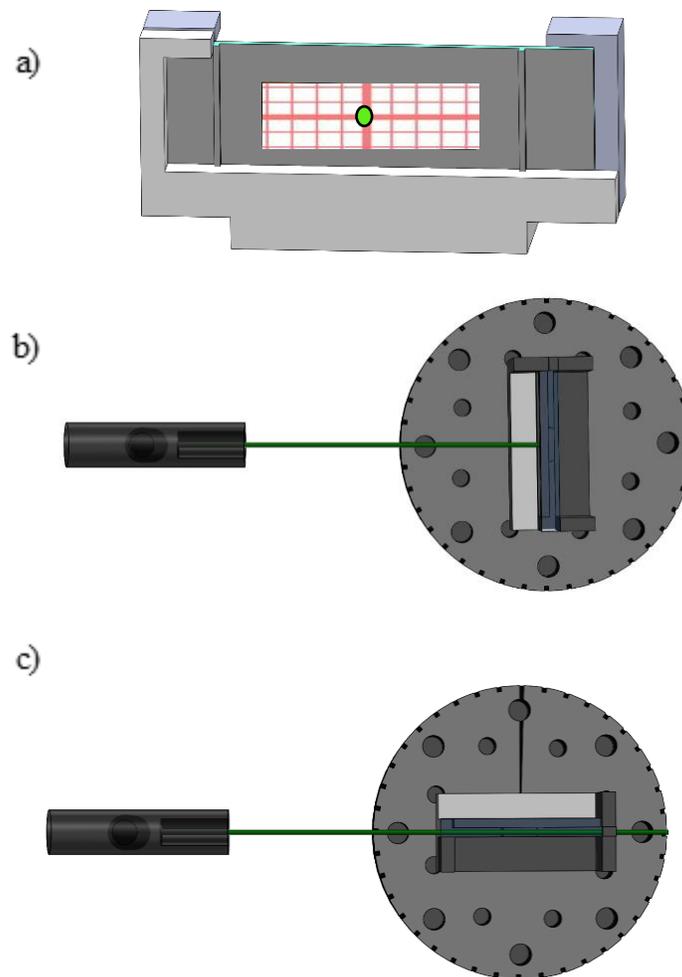


Fig. 7 Procedimiento de alineación **a)** spot del láser a incidencia normal sobre un papel milimétrico **b)** Incidencia normal del láser a la muestra **c)** Muestra desplazada 90° respecto a su eje de giro

El filtro óptico neutro y el polarizador lineal se fijan entre el diodo laser y la platina giratoria a incidencia normal respecto al DL como se muestra en la **Fig. 6a**. la fibra y el filtro óptico paso largos, se colocan sobre la montura impresa en 3D que se encuentra en la platina de desplazamiento angular. Sin la muestra en la montura impresa, se gira la platina 180° para cerciorarse que el spot del láser incida completamente en el núcleo o centro de la fibra para comprobar esto se midió la potencia y se colocó en la posición donde esta tuviera una máxima potencia.

Finalmente, para garantizar que la fibra está a incidencia normal y el sistema en general se encuentra alineado, se acopla una fuente de luz blanca en el otro extremo de la fibra la cual genera un spot en el papel milimétrico, Una vez que se tiene dos haces, el spot de la fuente

de excitación @ 517 nm y spot de luz blanca, se hace un desplazamiento angular hasta los 90 grados y ambos haces deben mantenerse concéntricos y no debe desplazarse de su posición. Por último, se conecta el espectrofotómetro a la fibra para obtener los espectros de fluorescencia en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación.

4.6 Caracterización de las muestras

Comprobamos la concordancia de las características de las películas producidas con el medio de estudio descrito en el modelo mediante la evaluación de su absorbancia óptica y homogeneidad. El modelo considera un medio translúcido con un conjunto de partículas fluorescentes uniformemente distribuidas. Para verificar la homogeneidad en la distribución de las partículas de R6G a través de la muestra, obtuvimos consecutivamente, con un ángulo de incidencia fijo, los espectros de fluorescencia de tres regiones diferentes de la muestra. La distancia entre cada medición fue aproximadamente de 5 mm. Los espectros de la muestra tipo M2 se muestran en la **Fig. 8**. Podemos apreciar en el recuadro de la

Fig. 8 que la diferencia entre los tres espectros es inferior al 1.5%. El resto de las muestras presentaron características similares. Por tanto, podemos considerar que la distribución de las partículas del R6G en las muestras es homogénea.

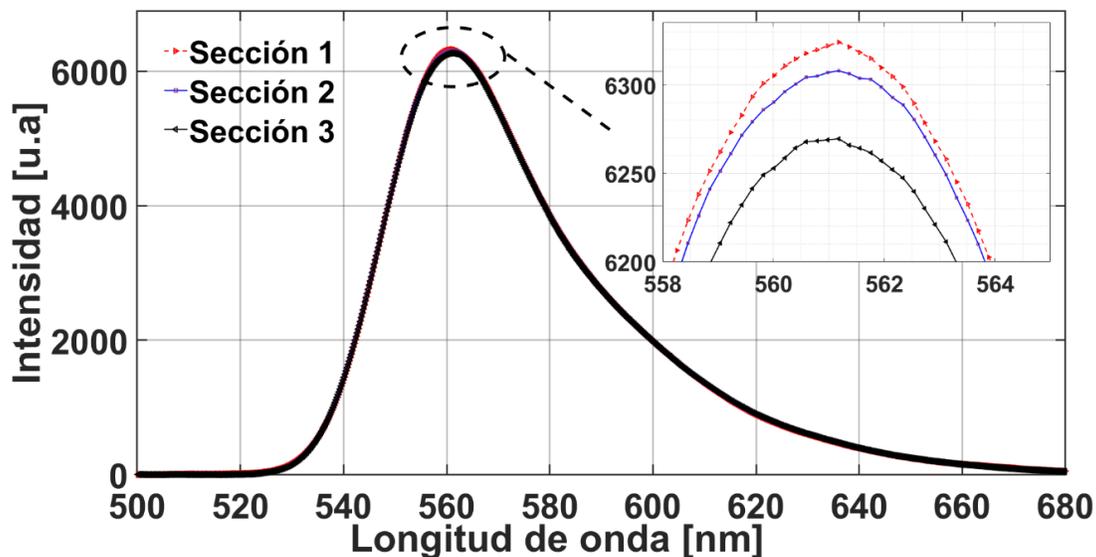


Fig. 8. Espectros de fluorescencia en tres regiones de una muestra M2.

Los espectros de absorbancia de las películas se obtuvieron con un espectrofotómetro UV-VIS-NIR estándar Cary 5000. La **Fig. 9** muestra los espectros de absorbancia de la muestra tipo M6. En el mismo gráfico mostramos también los espectros de fluorescencia de la muestra tipo M6 obtenidos con nuestra disposición a un ángulo de incidencia de 24° . Podemos ver que las longitudes de onda de máxima absorción y emisión están desplazadas entre sí unos 30 nm. El espectro de absorción de la **Fig. 9** muestra que la película de polímero con R6G es translúcida para longitudes de onda superiores a 580 nm. Los espectros trazados en la **Fig. 9** indican que el índice de extinción a la longitud de onda de excitación (e. i. 517 nm) es mayor o mucho mayor que para las longitudes de onda de emisión. Además, podemos observar una región donde se superponen los espectros entre 530 y 550 nm. Podría pensarse que esto implica que la reabsorción de los fotones emitidos se produce sólo en un pequeño intervalo de longitudes de onda en torno a los 550 nm. Sin embargo, más adelante veremos que la reabsorción de la luz emitida es mucho mayor de lo que podría sugerir la superposición de curvas en la **Fig. 9**. Posiblemente se deba a procesos de absorción en estado excitado (ESA).

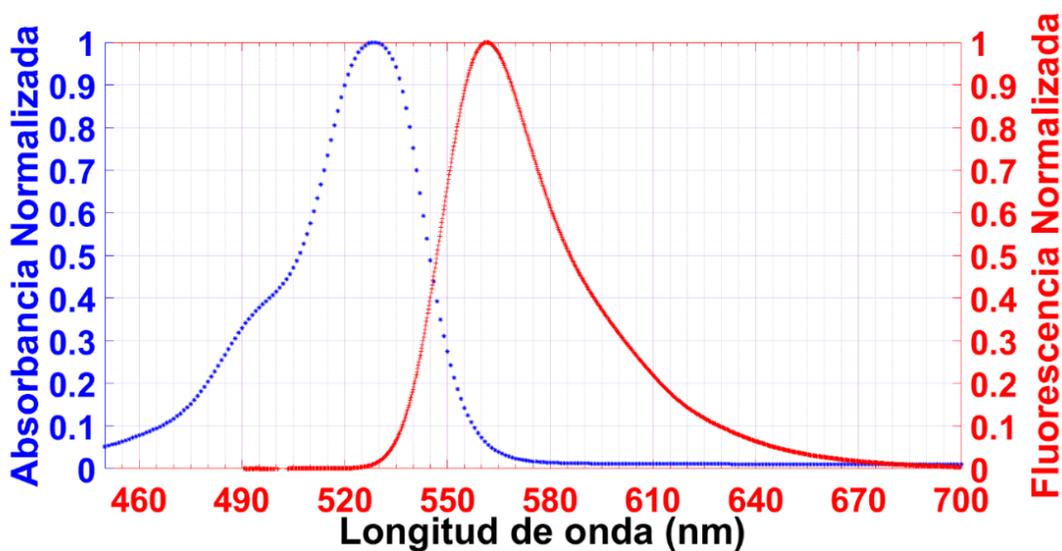


Fig. 9. Espectros de absorbancia (línea azul) y fluorescencia de una muestra M6 con un ángulo de incidencia de 24° (línea roja).

En la **Fig. 10**, representamos los espectros de fluorescencia normalizados de las 8 muestras. Podemos ver que al disminuir la concentración de R6G, el pico de máxima emisión se desplaza a longitudes de onda más cortas. Trabajos previos reportan este comportamiento

conocido como desplazamiento de Stokes [78], [112]. **La Fig. 11** muestra la intensidad de fluorescencia en la longitud de onda de máxima emisión en función de la concentración (ver **Tabla 1**). Podemos ver que para las muestras M1 a M5, la intensidad máxima de fluorescencia permanece relativamente constante. También podemos ver que la intensidad máxima es claramente menor para las muestras con menor concentración de R6G, M6 y M7. La razón es que para estas muestras de concentraciones más pequeñas y un espesor de película de unos 140 μm , una parte de la potencia óptica incidente no se absorbe dentro de la película y se transmite. Sin embargo, podemos ver que la intensidad máxima emitida para la muestra de mayor concentración, M0, también es menor que para las muestras M1-M5. La reducción de la intensidad de fluorescencia con el aumento de la concentración de R6G se ha observado anteriormente [78], [113]. La razón es que aparecen fuertes efectos de apagado cuando dos moléculas se acercan mucho entre sí. A medida que aumenta la concentración de fluoróforos, también aumenta la probabilidad de encontrar pares muy próximos [30].

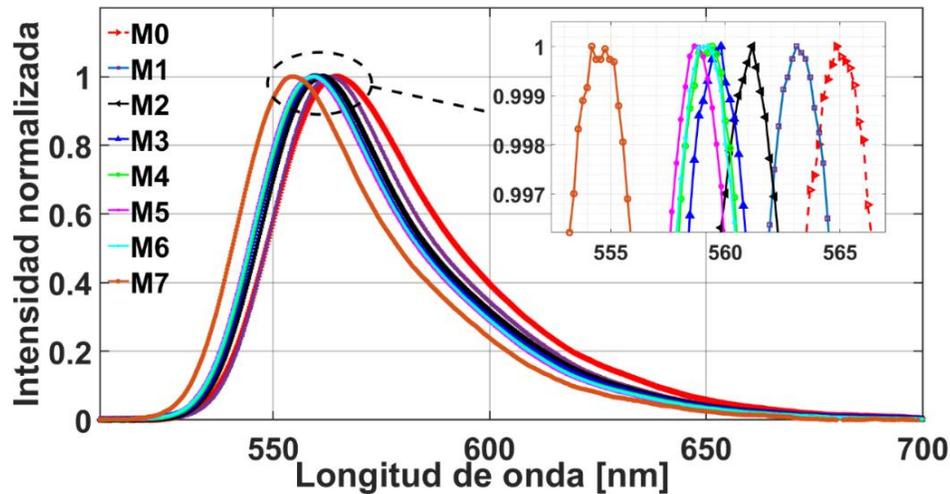


Fig. 10. Espectros de emisión de las muestras poliméricas fluorescentes a diferentes concentraciones de R6G (véase la **Tabla 1**) $\theta_i = 24^\circ$.

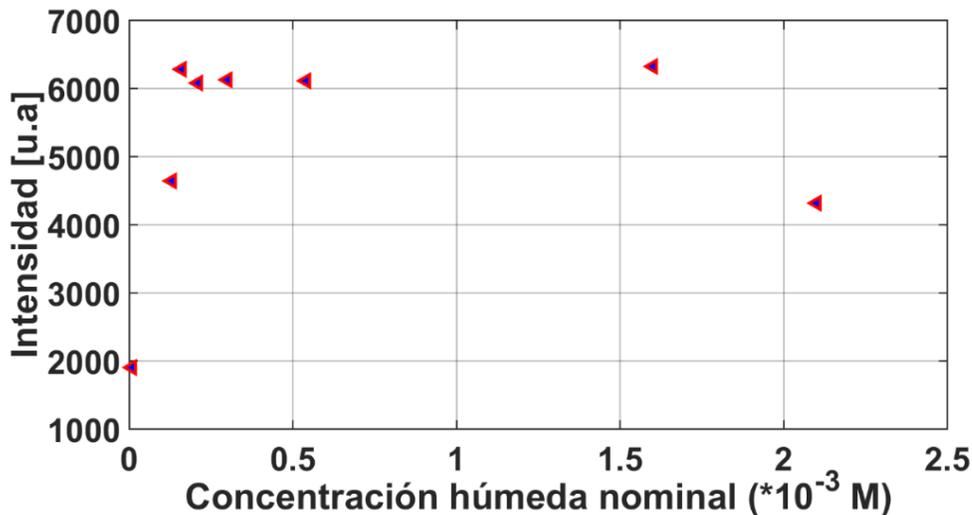


Fig. 11. Intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión máxima en función de la concentración

Por último, la parte real del índice de refracción de todas nuestras muestras se midió con un refractómetro de Abbe (DTM-N, ATAGO, Japón), el valor medido @ 589 nm fue de $\tilde{n}_1 = 1.502 \pm 0.001$. El valor medido presenta una discrepancia de menos del 1% con respecto al índice de refracción de la nitrocelulosa reportado en la Ref [114], principal componente del esmalte de uñas [115]. Esta diferencia puede deberse a los elementos desconocidos que componen la solución del barniz utilizado. Teniendo en cuenta que la variación del índice de refracción de la nitrocelulosa en el intervalo de 510 a 580 nm es inferior al 1% [114], supusimos que la parte real del índice de refracción de las películas de nitrocelulosa con R6G

en el intervalo de 517 a 589 nm era constante e igual al valor medido a 589 nm. Por otro lado, se caracterizó la intensidad de la fuente de excitación, se registró un 2 % de variación en un lapso de 110 min y en 4 días distintos de 7.2 % por lo que asumimos que la fuente de excitación es estable. Además, se varió la potencia incidente en las películas fluorescentes en los gráficos de la **Fig. 12a** se observa que 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. La intensidad en la emisión es lineal en función de la potencia incidente como se observa en la **Fig. 12b**. 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.

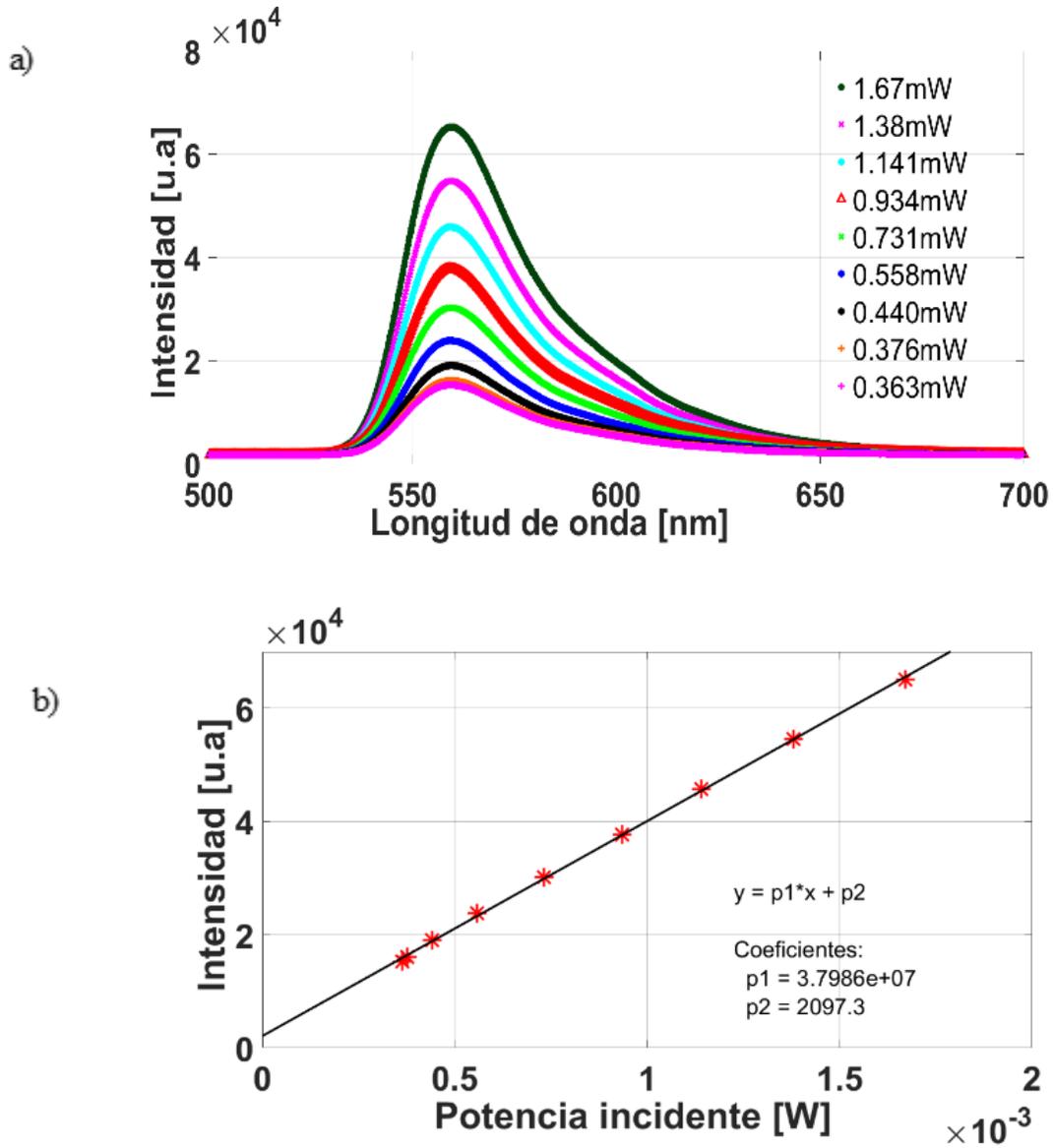


Fig. 12 a) Espectros de fluorescencia en película fluorescente en función de la potencia de excitación, longitud de excitación 517 nm. **b)** Variación de la intensidad de fluorescencia a 560 nm en función de la potencia de excitación.

5 CAPÍTULO

ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE EXTINCIÓN. COMPARACIÓN TEORÍA VS. DATOS EXPERIMENTALES

En este capítulo se explica el análisis para la estimación del índice de extinción. Además, se muestra la validación del modelo teórico para películas fluorescentes en distintas concentraciones de R6G y se muestran casos particulares en escenarios de la comparación teórica del modelo simplificado vs. datos experimentales.

5.1 Estimación del índice de extinción de un medio fluorescente

Se elaboraron distintas muestras y se registraron sus perfiles de fluorescencia en función del ángulo de incidencia. El valor del índice de extinción en la longitud de onda de excitación κ_{exc} se estimó experimentalmente para cada muestra midiendo la transmitancia a la incidencia normal del rayo láser excitante a través de las muestras y utilizando la ley de Beer-Lambert. Luego, medimos los espectros de fluorescencia de $\theta_i = 24^\circ$ a $\theta_i = 74^\circ$ en pasos de $\Delta\theta_i = 2^\circ$.

El haz incidente excitante a una longitud de onda de 517 nm se polarizó linealmente en polarización TE (S) y TM (P). Registramos los espectros de fluorescencia para las dos polarizaciones. Estas son las polarizaciones canónicas para mediciones de reflexión desde interfaces planas.

El índice de extinción en la longitud de onda de la emisión máxima $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$, durante el proceso de emisión, se estimó siguiendo el procedimiento explicado en el Capítulo 3. Es decir, trazamos la intensidad normalizada en la longitud de onda de la emisión máxima versus el ángulo de incidencia θ_i , se usó como intensidad medida para un ángulo de incidencia de 24° . Luego, determinamos el valor de $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$, ajustando el modelo dado en la Ec. (11).

Nuestras muestras M0-M5 transmitieron mucho menos del 1% de la potencia incidente, mientras que M6 y M7 transmitieron menos del 3.6% y 3.5%, respectivamente. Asumimos que el término exponencial en la Ec. (11) era insignificante al realizar los ajustes, lo que equivale a asumir un grosor infinito. Esta es una suposición segura para las muestras M0-M6, pero podría no ser así para M7. El mejor ajuste se encontró minimizando $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ por medio de la desviación cuadrática media (RMSD) para dentro del rango de $1 \times 10^{-6} \leq \kappa_1^{emi}(\lambda_{max}) \leq 0.095$. El RMSD viene dado por,

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p (\hat{x}_j - x_j)^2}{p}}, \quad (13)$$

Donde p es el número de datos en una curva, \hat{x}_j es la intensidad normalizada medida para el n -ésimo ángulo de incidencia y x_j el valor calculado con el modelo. Para todas las muestras, obtuvimos diferentes valores $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ de polarización TE y TM de la luz excitante. Esto se ilustra en los gráficos de la **Fig. 10**, que corresponden a las distintas concentraciones ver **Tabla 1**. En la **Fig. 13**, graficamos el valor del RMSD en función del valor de $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ para ambas polarizaciones. Podemos ver mínimos claros en las curvas que indican que se logra un buen ajuste para cada polarización. Además, podemos observar que dependiendo de la concentración los mínimos locales no siguen un patrón lo que nos hace pensar que existe una rugosidad aleatoria en las películas. Sin embargo, la ubicación del mínimo para polarización TE es diferente que para polarización TM. Los mejores ajustes se muestran en la **Fig. 14** para TM y **Fig. 15** para polarización TE. La diferencia en los valores de $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ que se ajustan a las curvas experimentales indica una fuerte anisotropía del medio fluorescente. Este análisis se realizó para todas las concentraciones y el comportamiento fue similar. Esta anisotropía ha sido observada antes por varios investigadores en soluciones de R6G[116]–[118]. Las posibles razones detrás de esta anisotropía se discuten en las referencias citadas. Además, el proceso de secado de las películas en nuestro método de preparación de muestras también puede inducir un RI complejo anisótropo de las muestras.

No obstante, en el caso de un medio anisotrópico biaxial con el eje de anisotropía perpendicular a la interfaz, como sería el caso de nuestras películas fluorescentes, las ecuaciones que se presentaron en el Capítulo 3 para nuestro modelo no experimentan cambios cuando se trata de la polarización TE[119], [120]. Sin embargo, para la polarización TM, el índice de refracción complejo sería un tensor y el índice de refracción que ve la luz varía en función de la dirección de propagación, y es necesario realizar una adaptación a nuestro modelo para describir este escenario en particular. Sin embargo, desde una perspectiva numérica, la influencia angular en el índice de refracción no es importante para determinar al ángulo de refracción dentro de la película fluorescente. En otras palabras, la anisotropía observada en la fluorescencia no implica que el modelo sea incorrecto; sino que es una primera aproximación. Podemos suponer que la parte imaginaria del índice de refracción es dependiente del estado de polarización, pero independiente del ángulo de excitación.

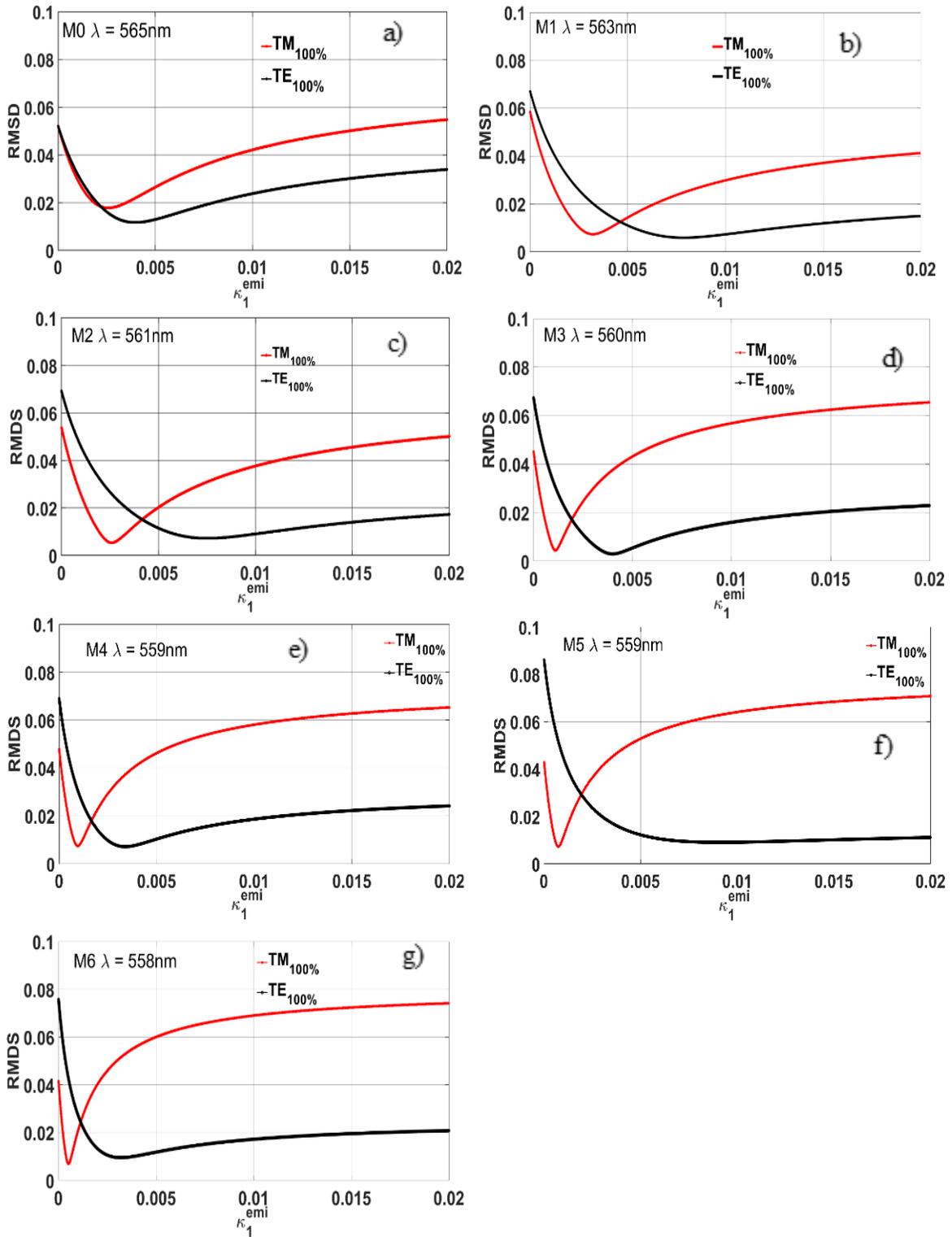


Fig. 13. RMSD en función del valor $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE. a) M0, b) M1, c) M2 d) M3, e) M4, f) M5 y g) M6.

5.2 Comparación Teoría-Experimento. Películas fluorescentes

En general, el modelo pudo ajustarse muy bien a las curvas experimentales de la intensidad normalizada frente a θ_i para todas las muestras etiquetadas de M0 a M6 (un total de 21 muestras) ver **Fig. 14** y **Fig. 15**, excepto para dos muestras que se descartaron posteriormente debido a un probable error en su fabricación. Para las tres muestras etiquetadas como M7, el modelo no se ajustaba bien a las curvas experimentales, lo que significa que nuestra suposición de un espesor infinito no era una buena aproximación en este caso. No se pudo encontrar un valor mínimo de la RMSD. La razón es que el índice de extinción era demasiado pequeño para el espesor de la muestra, de modo que se permitían múltiples reflexiones del haz excitante. El modelo del Capítulo 3 utilizado para probar el método asume un medio semi-infinito por lo tanto, no considera reflexiones múltiples.

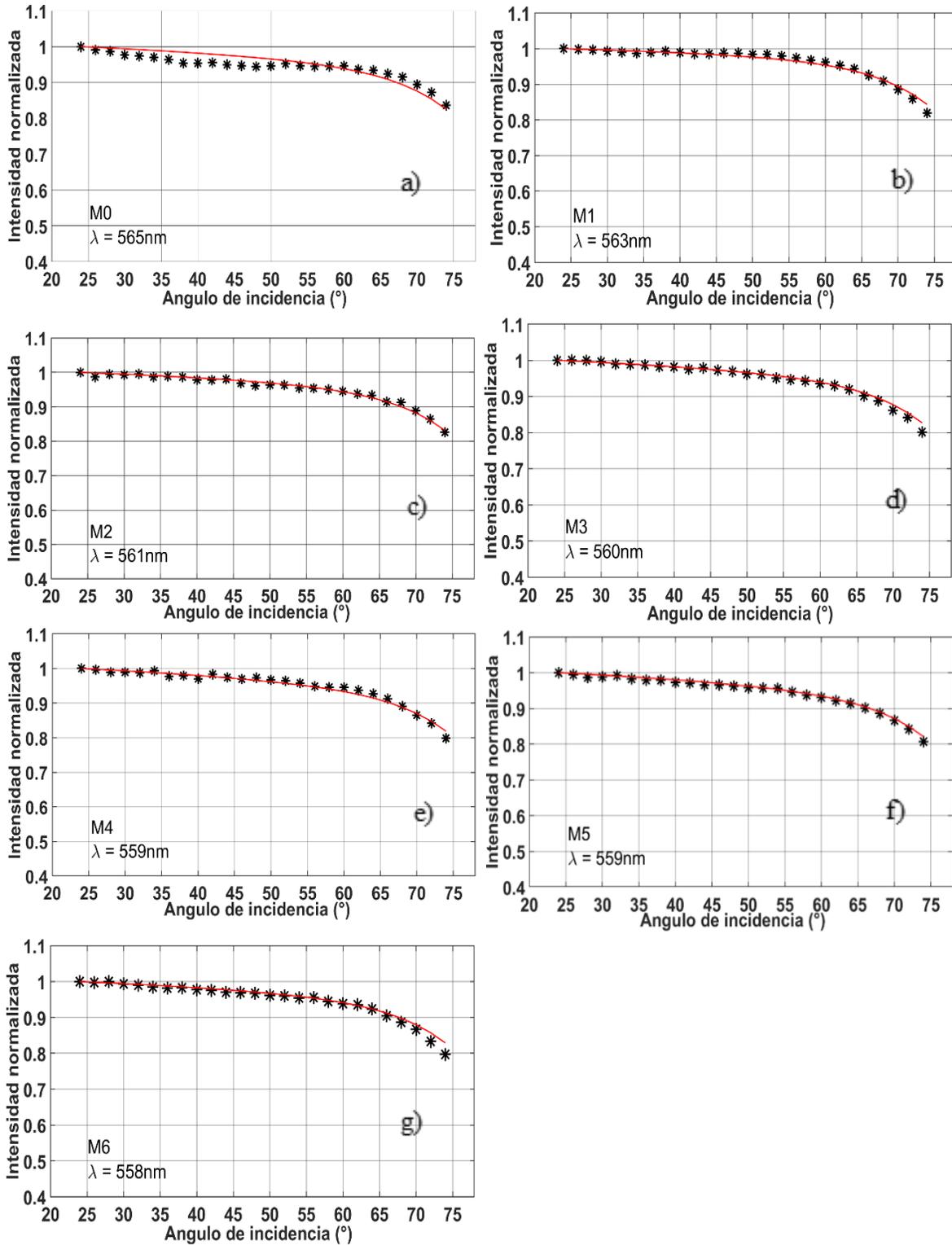


Fig. 14. Perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación modelado (línea continua) frente a los datos experimentales en una polarización TM a) M0, b) M1 c) M2 d) M3, e) M4, f) M5 y g) M6.

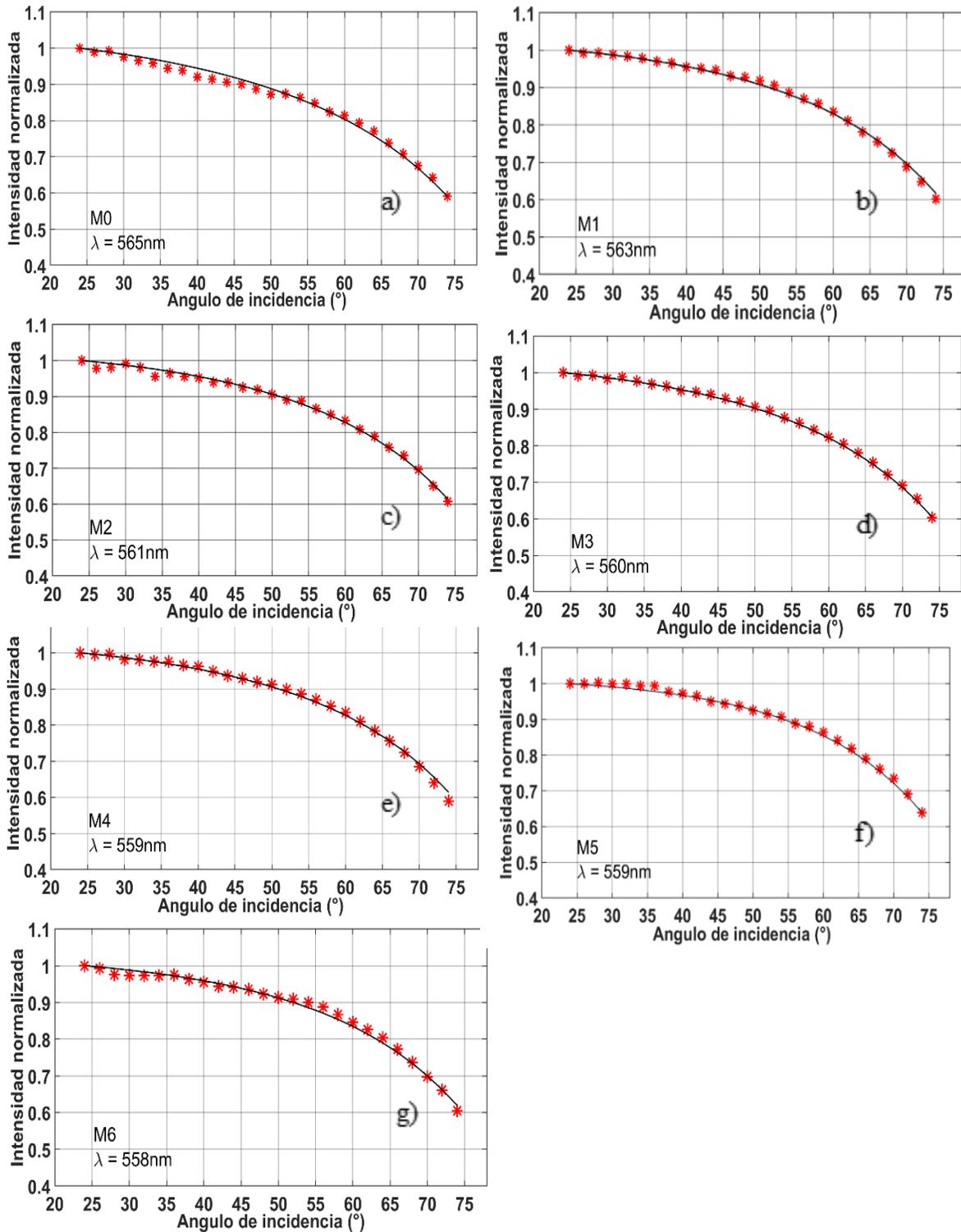


Fig. 15. Perfil de intensidad de fluorescencia en función del ángulo de excitación modelado (línea continua) frente a los datos experimentales en una polarización TE **a)** M0, **b)** M1, **c)** M2 **d)** M3, **e)** M4, **f)** M5 y **g)** M6.

En las **Fig. 14** y **Fig. 15** mostramos las curvas experimentales y sus ajustes para luz excitadora polarizada TE y TM, respectivamente, a 7 concentraciones M0 a M6 (Ver **Tabla 1**)

La **Tabla 2** y **Tabla 3** resume los resultados obtenidos para κ_1^{exc} y $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ para cada tipo de muestra para una polarización TM y TE respectivamente (véase la **Tabla 1**)

Tabla 2. Datos experimentales para ocho concentraciones de R6G.
Polarización TM

Muestra	Pico de emisión (nm)	κ_1^{exc}	$\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$	RMSD	Cociente $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})/\kappa_1^{exc}$
M0	565	0.0030	0.0026	0.0178	0.9
M1	563	0.0025	0.0032	0.0073	1.3
M2	561	0.0026	0.0026	0.0053	1
M3	560	0.0015	0.0011	0.0045	0.8
M4	559	0.0012	0.0010	0.0074	0.8
M5	559	0.0011	0.00074	0.0038	0.7
M6	558	0.0008	0.00058	0.0065	0.8
M7	554	0.0002	-	-	-

Tabla 3. Datos experimentales para ocho concentraciones de R6G.
Polarización TE

Muestra	Pico de emisión (nm)	κ_1^{exc}	$\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$	RMSD	Cociente $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})/\kappa_1^{exc}$
M0	565	0.0030	0.0047	0.0156	1.6
M1	563	0.0025	0.0080	0.0074	3.2
M2	561	0.0026	0.0071	0.0088	2.8
M3	560	0.0015	0.0041	0.0048	2.7
M4	559	0.0012	0.0037	0.0071	3.1
M5	559	0.0011	0.0031	0.0085	2.8
M6	558	0.0008	0.0030	0.0111	3.8
M7	554	0.0002	-	-	-

Como podemos ver en los valores de RMSD de la **Tabla 2** y **Tabla 3**, el modelo se ajusta adecuadamente a la intensidad normalizada de fluorescencia en función del ángulo de incidencia del haz de excitación para las muestras M0 a M6. Para estas muestras el valor RMSD es inferior a 0.016.

La última columna de la **Tabla 3** enumera los valores de la relación $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max}) / \kappa_1^{exc}$. Podemos ver que todos son notablemente mayores que uno. Esto hace viable la hipótesis de que κ_1^{emi} es aproximadamente constante a lo largo de la película (véase el Capítulo 3). Por tanto, podemos tomar los valores determinados para κ_1^{emi} como razonablemente precisos. Esto significa que el índice de extinción en la longitud de onda de máxima emisión es mayor que en la longitud de onda de excitación. Esto es muy diferente de lo que habríamos concluido ingenuamente a partir de la **Fig. 9**. Para las muestras M1 a M5 en polarización TE la relación $\kappa_1^{emi} / \kappa_1^{exc}$ es aproximadamente 3 y para una polarización TM es de 1. Para la muestra M0 es menor y para M6 mayor que para M1-M5. Esto podría deberse a que M0 tiene un comportamiento diferente debido a la alta concentración de R6G y se favorecen los procesos de decaimiento no radiativo (ver **Fig. 11**), y M6 puede estar algo afectada por reflexiones múltiples dentro de la película, como fue el caso de M7 para la que no se pudo aplicar el método. En cualquier caso, la relación $\kappa_1^{emi} / \kappa_1^{exc}$ es muy diferente de lo que cabría esperar a partir de las mediciones de κ_1^{emi} utilizando el espectrofluorómetro (véase la **Fig. 9**). La razón es probablemente un fuerte efecto ESA. Ahora bien, esto también es cierto para otras longitudes de onda de emisión. De hecho, el método propuesto puede utilizarse para obtener los espectros $\kappa_1^{emi}(\lambda)$ durante el proceso de emisión, simplemente seleccionando otras longitudes de onda para medir la intensidad de fluorescencia frente a θ_i y repitiendo el procedimiento. Para ilustrar esto, presentamos en la **Fig. 16** gráfico de los valores determinados para κ_1^{emi} a seis longitudes de onda diferentes a través de la banda de emisión de R6G para las muestras M3 y M6. En la **Tabla 4** registramos los valores del RMSD obtenidos para los mejores ajustes del modelo a las correspondientes curvas experimentales de la intensidad de fluorescencia normalizada frente a θ_i . Podemos ver que los valores de κ_{emi} son bastante constantes entre 560 nm y 600 nm. Para una longitud de onda menor de 550 nm el valor es mayor. Esto puede deberse a que 550 nm ya se encuentra dentro de la banda de absorción del medio fluorescente (véase la **Fig. 9**). Para longitudes de onda menores, la fluorescencia emitida era demasiado pequeña para aplicar el método con seguridad.

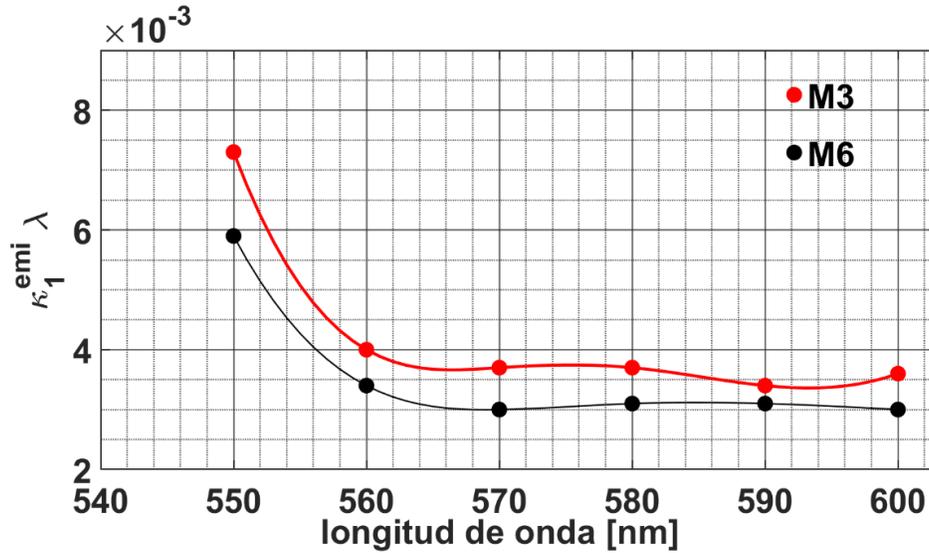


Fig. 16 Variación del índice de extinción a diferentes longitudes de onda de emisión para las muestras tipo M3 (rojo) y M6 (negro).

Tabla 4. RMSD obtenida del ajuste teórico a diferentes longitudes de emisión para las muestras tipo M3 y M6

Longitud de onda (nm)	RMSD	
	M3	M6
550	0.0031	0.0087
560	0.0030	0.0088
570	0.0039	0.0090
580	0.0056	0.0088
590	0.0044	0.0088
600	0.0055	0.0085

Por otra parte, se estimó la longitud de penetración de la luz incidente d en las películas fluorescentes por medio de la siguiente expresión:

$$d = \frac{1}{2\text{Im}(k_0 * k_z^{exc})} \tag{14}$$

donde $k_0 = 2\pi/\lambda_{exc}$ & $k_z^{exc} = \sqrt{((n_1^{exc})^2 - n_0^2) * \sin \theta_i}$

Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 17** donde se gráfica la longitud de penetración de la luz en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación para las muestras tipo M0-M6 y en la **Tabla 5** se resume los resultados obtenidos donde se observa la máxima de penetración de la luz en cada una de las muestras elaboradas.

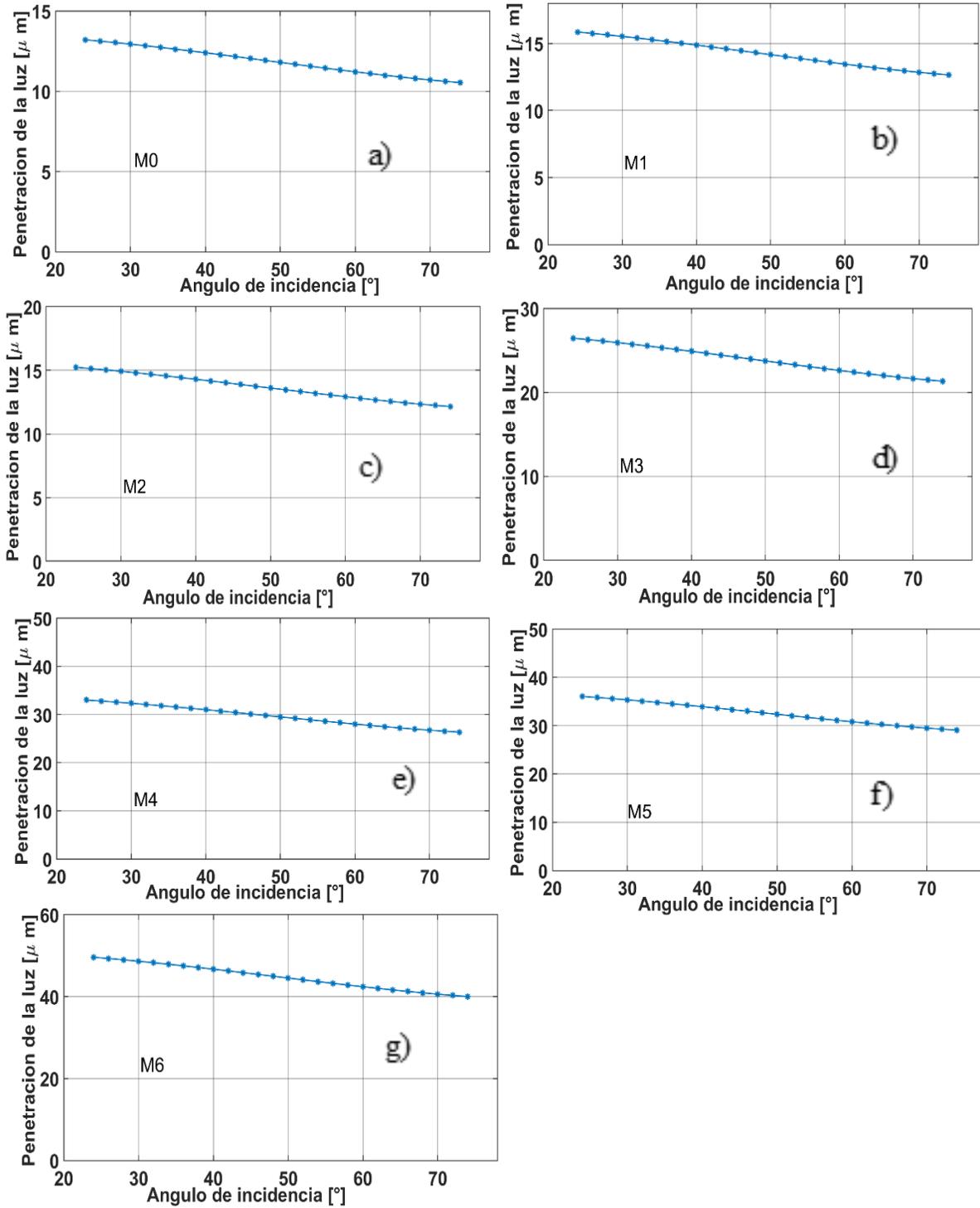


Fig. 17 Longitud de penetración de la luz en función del ángulo de incidencia de la fuente de excitación. a) M0, b) M1, c) M2, d) M3, e) M4, f) M5, y g) M6

Tabla 5. Longitud de penetración de la luz en función del ángulo de incidencia para 7 concentraciones M0-M6 (ver **Tabla 1**)

Concentración	Longitud de penetración de la luz (μm)
M0	13.2
M1	15.8
M2	15.2
M3	21.3
M4	26.3
M5	29.1
M6	40.0

Como podemos observar en **Tabla. 5** se muestra la máxima longitud de penetración a 24° del ángulo de incidencia de la fuente de excitación, podemos observar que este valor aumenta conforme la concentración disminuye.

5.3 Comparación Teoría-Experimento. Películas fluorescentes con partículas de borosilicato de $10 \mu\text{m}$

En principio, este método podría utilizarse en medios fluorescentes con absorción adicional distinta a la de un fluoróforo. En este caso, el valor de κ_1^{emi} , será la suma de la contribución de los fluoróforos y de otras moléculas absorbentes presentes en el medio. También podría utilizarse con medios fluorescentes con cierto tipo de *scattering*. Concretamente en medios en los que la dispersión se produce mayoritariamente en la dirección de propagación. En este caso, la atenuación de la luz dentro del medio se deberá principalmente a la absorción y podría utilizarse el presente método. Este es el caso de algunos medios biológicos a longitudes de onda ópticas, ya que ciertas células biológicas dispersan la luz principalmente en la dirección frontal [121]. Bajo esta idea se realizó una mezcla tipo M2 a la cual se le agregó el 1% en peso respecto a la mezcla de partículas de borosilicato (grandes en comparación con la longitud de onda).

Esto se ilustra en el gráfico de la **Fig. 18**, donde se muestran los mejores ajustes de 8 mediciones en **Fig. 18a** polarización TM y **Fig. 18b** polarización TE. Se observó un

desplazamiento en el pico máximo de emisión de 561 a 568 nm para una concentración de R6G tipo M1 ver **Tablas 2-3**. Esto puede deberse debido a las reflexiones de las partículas pudieran favorecer la amplificación del medio activo aumentando la probabilidad de presentarse fenómenos de ASE y ESA. El mejor ajuste se encontró minimizando $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ por medio de la desviación cuadrática media (RMSD) fue de 0.0147 y 0.0119 para polarización TE y TM, respectivamente. En la **Fig. 19** y **Tabla 6** se muestra los resultados obtenidos.

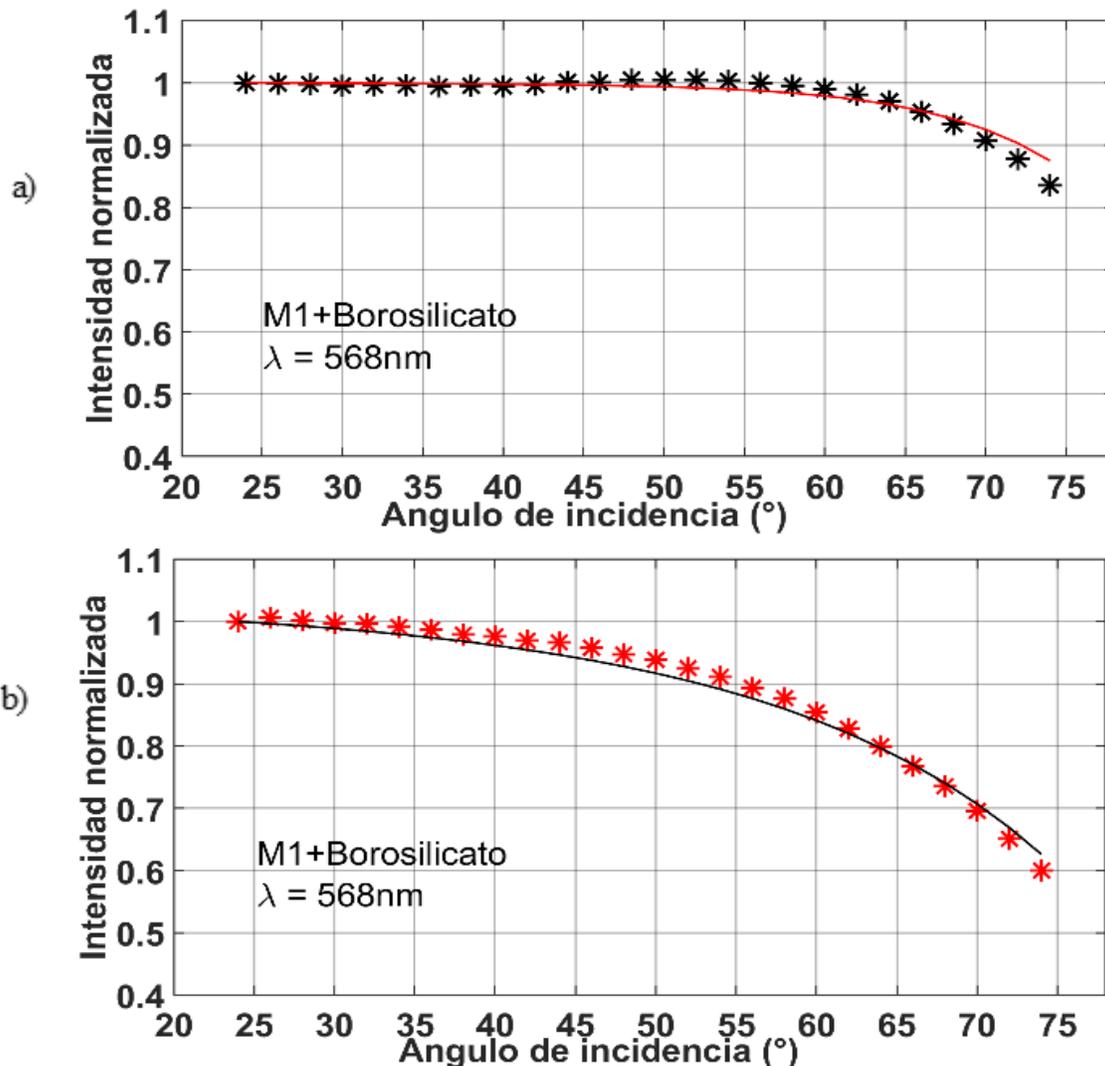


Fig. 18. Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia máxima normalizada de película fluorescente con partículas de borosilicato de $10\ \mu\text{m}$ en función del ángulo de incidencia **a)** para luz de excitación polarizada TM (símbolos de estrella) y el mejor ajuste del modelo teórico; **b)** igual que a) pero para luz de excitación polarizada TE.

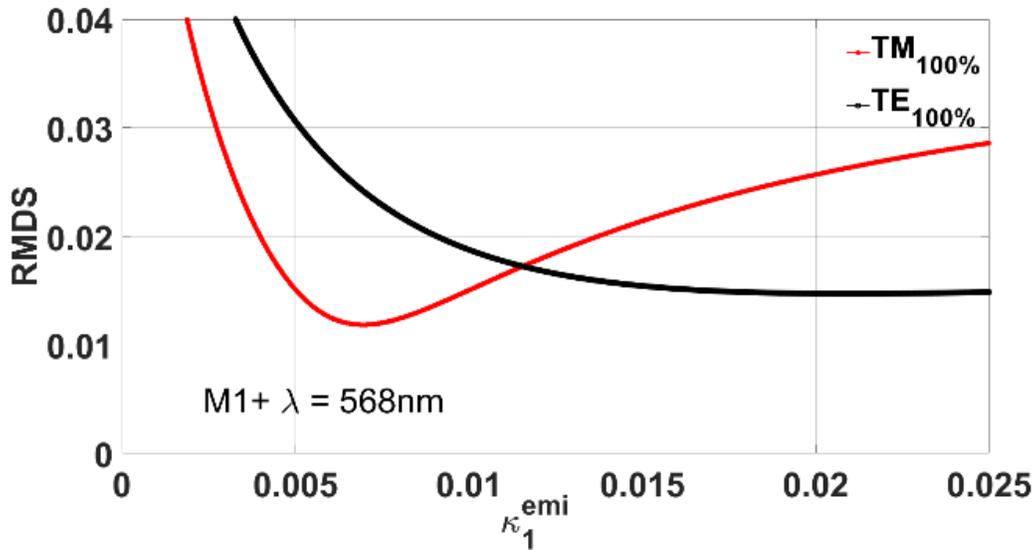


Fig. 19 RMSD en función del valor de $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE en películas fluorescentes con partículas de borosilicato de 10 μm

Tabla 6 Datos experimentales para película fluorescente tipo M1 con partículas de borosilicato.

Muestra borosilicato	Pico de emisión		RMSD	Cociente $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max}) / \kappa_1^{exc}$
	(nm)	κ_1^{exc}		
M1 TE	568	0.0027	0.0147	6
M1 TM	568	0.0027	0.0119	2

5.4 Comparación Teoría-Experimento. Solución de Rodamina 6G

Irregularidades en la superficie de las películas fluorescentes pueden ser factor relevante, al no estar considerado implícitamente en el modelo. Para garantizar que la primera superficie del medio fluorescente, fuera lo más homogénea posible, se elaboró un recipiente para contener una mezcla de agua, etanol y R6G a una concentración tipo M7 (ver **Tabla 1**).

Para que el modelo fuera capaz de describir este escenario. El modelo se modificó para considerar el coeficiente de transmisión en 3 medios: aire, vidrio y mezcla de R6G. La deducción de esta expresión se encuentra en [122]–[124].

La parte real del índice de refracción de agua y etanol se midió con un refractómetro de Abbe el valor medido de $\tilde{n}_1 = 1.34 \pm 0.01 @ 589 \text{ nm}$. El valor medido presenta una discrepancia

de menos del 1% con respecto al índice de refracción del agua principal elemento de la mezcla reportado en la Ref. [125]. Asumimos que la contribución de R6G en una muestra tipo M7 no debe modificar significativamente la parte real. El valor del índice de extinción en la longitud de onda de excitación κ_{exc} se estimó experimentalmente para la muestra tipo M7 midiendo la transmitancia a incidencia normal del rayo láser excitante a través de las muestras y utilizando la ley de Beer-Lambert. Los resultados obtenidos se ilustran en los gráficos de la **Fig. 20**, donde se muestran los mejores ajustes de 9 mediciones en **Fig. 18a** para una polarización TM y **Fig. 20b** para una polarización TE. El mejor ajuste se encontró minimizando $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ por medio de la desviación cuadrática media (RMSD) fue de 0.0036 y 0.0051 para una polarización TE y TM, respectivamente. Como se muestra en la **Fig. 20**. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 7**.

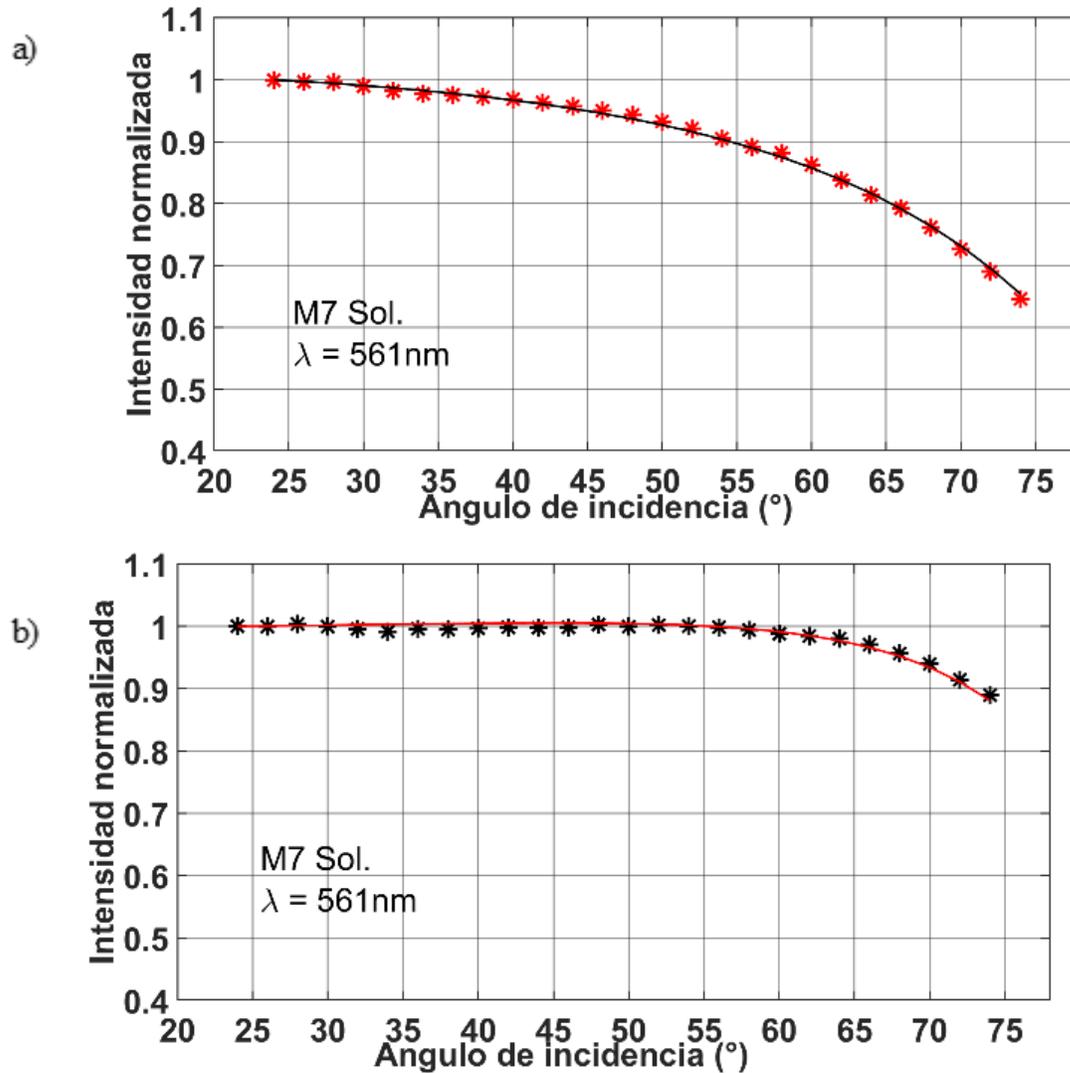


Fig. 20 Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia máxima normalizada de solución de R6G en función del ángulo de incidencia **a)** para luz de excitación polarizada TM (símbolos de estrella) y el mejor ajuste del modelo teórico; **b)** igual que a) pero para luz de excitación polarizada TE.

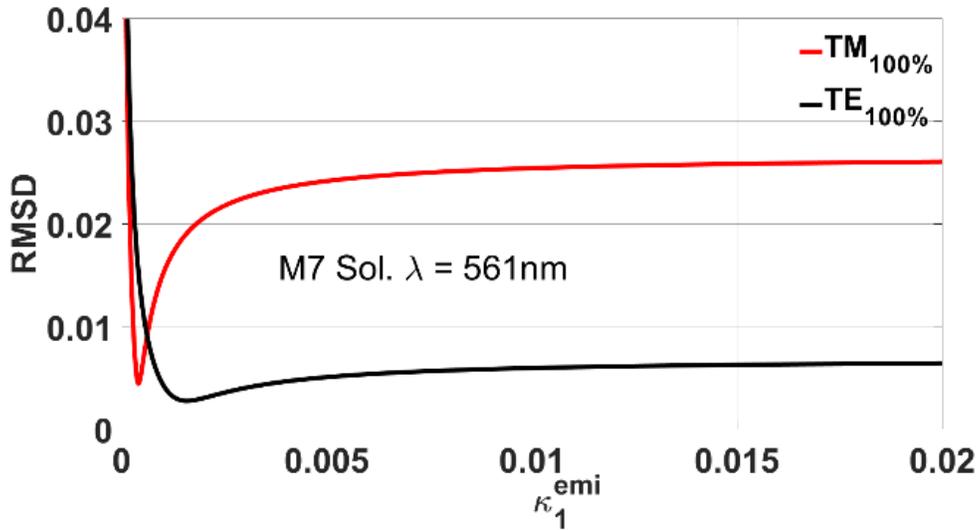


Fig. 21 RMSD en función del valor de $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE en tejido epitelial de cebolla teñido con R6G

Tabla 7 Datos experimentales para solución fluorescente tipo M7.

Muestra Sol. R6G	Pico de emisión		RMSD	Cociente $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ / κ_1^{exc}
	(nm)	κ_1^{exc}		
TE	561	0.00006	0.0028	27
TM	561	0.00006	0.0044	5

Podemos observar que existe un buen ajuste teórico en las muestras líquidas, el error disminuye un orden comparado con las películas. Sin embargo, aún no tenemos explicación satisfactoria de porque el cociente $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max}) / \kappa_1^{exc}$ es grande suponemos que la luz de excitación a la concentración M7 favorece el fenómeno de múltiples reflexiones ocasionando fenómenos de reabsorción en particular ASE explicado en el Capítulo 2.

5.5 Comparación Teoría-Experimento. Solución de yoduro de propidio

En principio, este método podría utilizarse en medios con otros tipos de fluoróforos. Con esta idea en mente, utilizamos yoduro de propidio (PI, por sus siglas en ingles), fluoróforo usado para detectar células muertas en una población, dado que el yoduro de propidio no es permeable a las células vivas. En solución acuosa, tiene un máximo de excitación/emisión a 535 y 617 nm, respectivamente [126].

En este caso se usó una mezcla de 5 ml de agua y 0.0005 g de PI, para las mediciones se utilizó un contenedor para solución (ver Capítulo 4.2). En la **Fig. 22a** se muestran los gráficos obtenidos. La parte real del índice de refracción se midió con un refractómetro de Abbe, el valor medido de $\tilde{n}_1 = 1.33 \pm 0.01 @ 589 \text{ nm}$. Asumimos que la contribución de PI no es significativa en la parte real. El valor del índice de extinción en la longitud de onda de excitación κ_{exc} se estimó experimentalmente para la muestra, midiendo la transmitancia a la incidencia normal del rayo láser excitante a través de las muestras utilizando la ley de Beer-Lambert. En este caso no se logró un buen ajuste teórico en polarización TE dado que no se encontró un mínimo local ver **Fig. 22b**. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 8**.

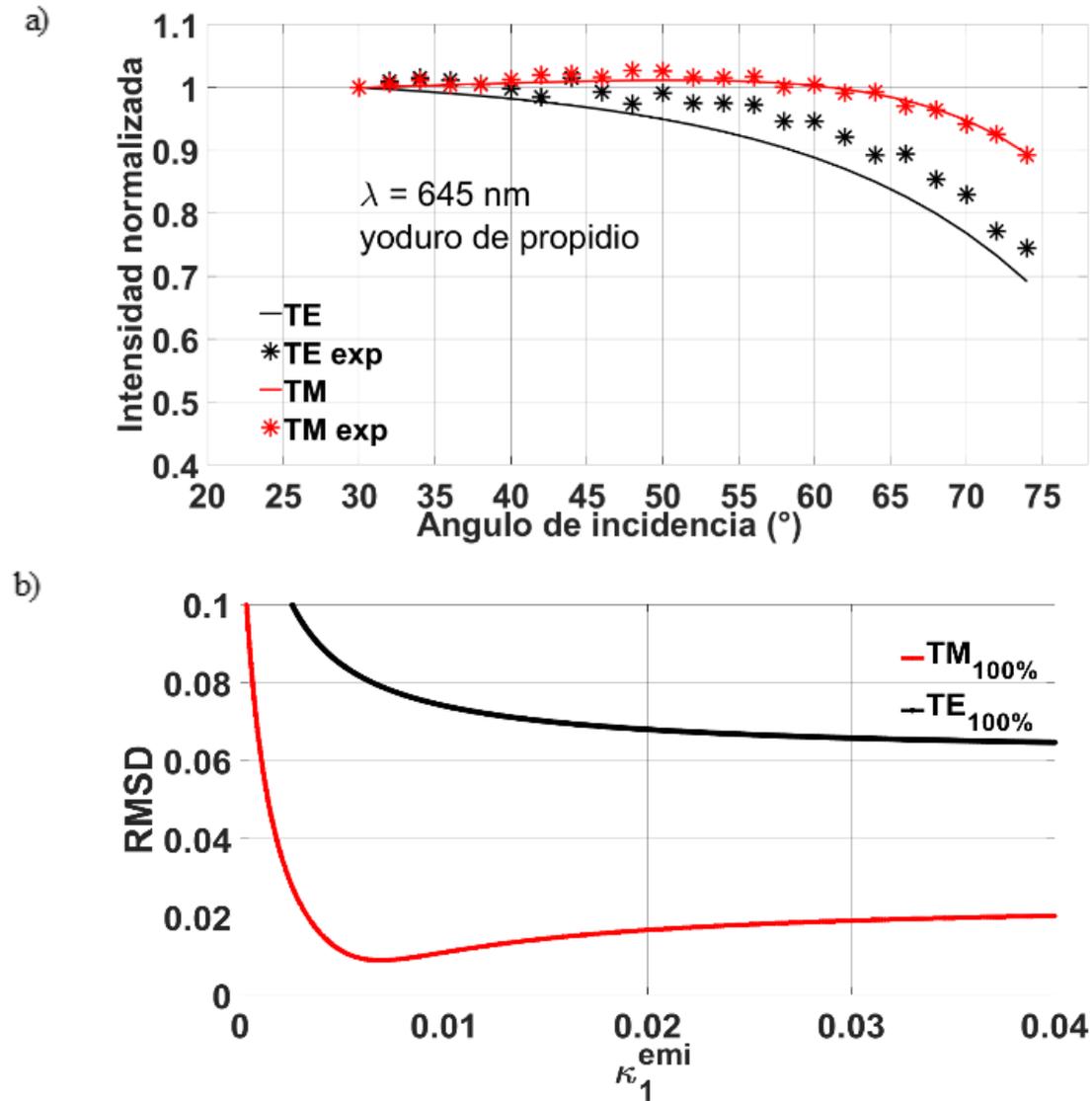


Fig. 22 a) Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia máxima normalizada, solución de yoduro de propidio en función del ángulo de incidencia para luz de excitación polarizada TM y TE en color rojo y negro, respectivamente. (símbolos de estrella) y el mejor ajuste del modelo teórico. b) RMSD en función del valor de $\kappa_1^{\text{emi}}(\lambda_{\text{max}})$ para luz de excitación polarizada TM y TE en solución de propilio.

Tabla 8. Datos experimentales para solución de yuduro de popilio

Muestra PI	Pico de emisión			RMSD	Cociente $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ $/\kappa_1^{exc}$
	(nm)	κ_1^{exc}	$\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$		
TE	645	0.00006	-	-	-
TM	645	0.00082	0.0069	0.0044	8

En este caso se observó que la eficiencia de emisión de luz emitida por el fluoróforo de Yoduro de Propidio fue baja, la razón probable es que la matriz o concentración utilizada no fue la indicada para obtener la máxima emisión. La intensidad de luz obtenida fue mínima, si la comparamos con las películas fluorescentes de R6G, solo para casos demostrativos ver **Fig. 23**, se muestra los espectros de fluorescencia obtenidos con Yoduro de Propidio y una película de R6G a una concentración tipo M2, podemos observar que la diferencia de intensidad de fluorescencia es significativa. La relación señal a ruido en este caso, pudo ser una razón de que el modelo no tuviera un ajuste en el modo de polarización TE. Sin embargo, no descartamos errores de fabricación o pensar en una estratificación del fluoróforo lo que implicaría una extensión del modelo. Es necesario realizar un mayor número de muestras con este fluoróforo o algún otro elemento fluorescente.

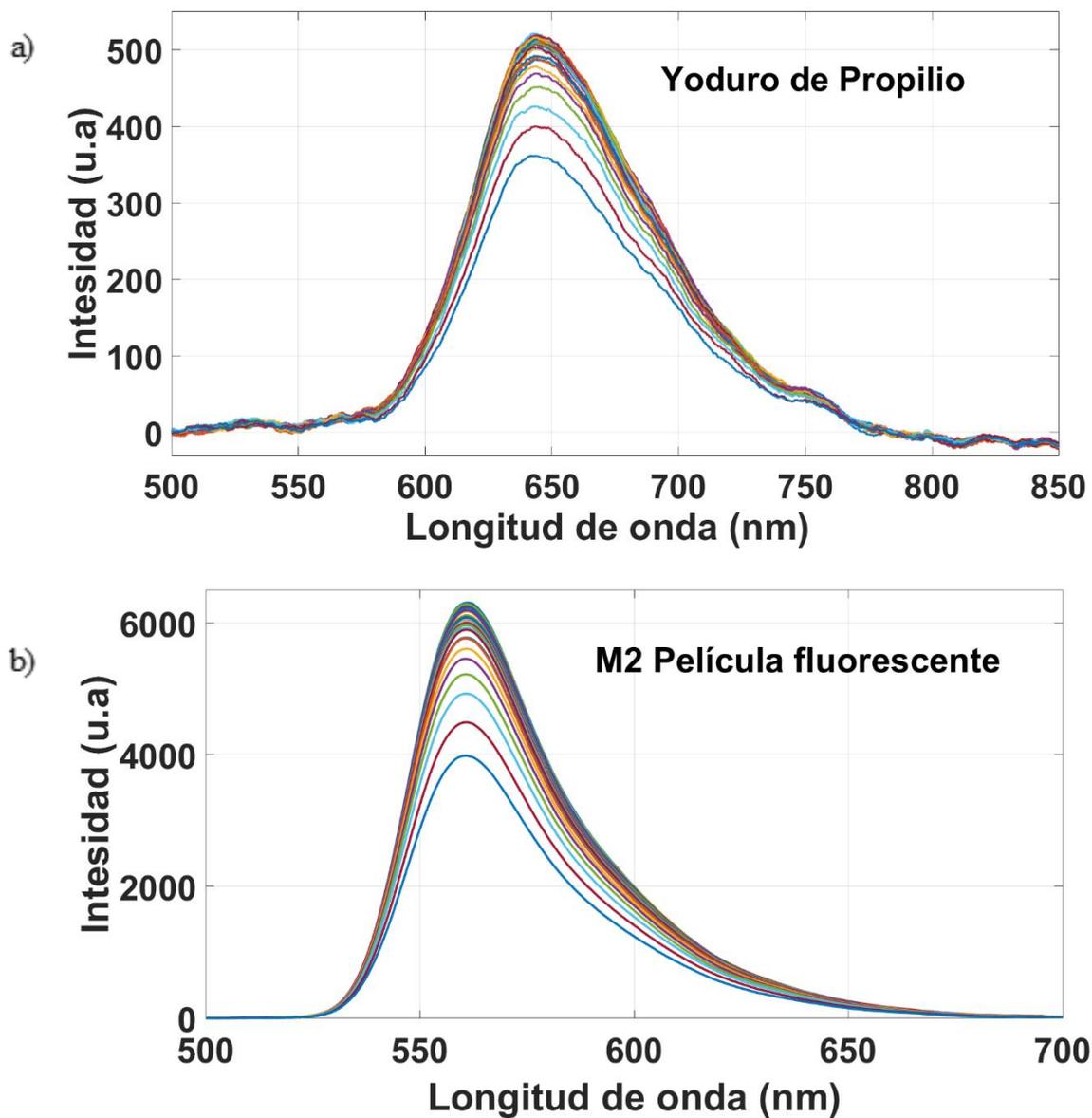


Fig. 23. Espectro de fluorescencia como función el ángulo de incidencia del haz de excitación
a) solución de Yoduro de Propilio b) Película fluorescente tipo M2.

5.6 Comparación Teoría-Experimento. Tejido con propiedades fluorescentes.

En principio, este método podría utilizarse en medios con absorción y *scattering* adicional distinta a la del fluoróforo. El valor de κ_1^{emi} , será la suma de una contribución de los fluoróforos y otra de las moléculas absorbentes adicionales presentes en el medio. La atenuación y el *scattering* de la luz dentro del medio se deberá principalmente a la absorción y podría utilizarse el presente método [121]. 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 [111], el tamaño aproximado de las células de cebolla es de 50 μm , la dispersión producida por este tipo de células se produce mayoritariamente en la dirección de avance. En este caso se usó 15 μl de una mezcla de H_2O , metanol y R6G. En la **Fig. 24** se muestran los gráficos obtenidos. La parte real del índice de refracción se obtuvo con una prueba experimental de fórmulas de efectividad para coloides turbios[127] donde se estimó que la parte real del índice de refracción del epitelio de cebolla tiene un valor medido de $\tilde{n}_1 = 1.35 \pm 0.01$. Asumimos que la contribución de la solución de R6G no es significativa en la parte real. El valor del índice de extinción en la longitud de onda de excitación κ_{exc} se estimó experimentalmente para la muestra midiendo la transmitancia a la incidencia normal del rayo láser excitante a través de las muestras y utilizando la ley de Beer-Lambert.

El mejor ajuste se encontró minimizando $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ por medio de la desviación cuadrática media (RMSD) fue 0.0051 para una politización TE. Los resultados obtenidos se presentan en la **Fig. 25** y **Tabla 9**.

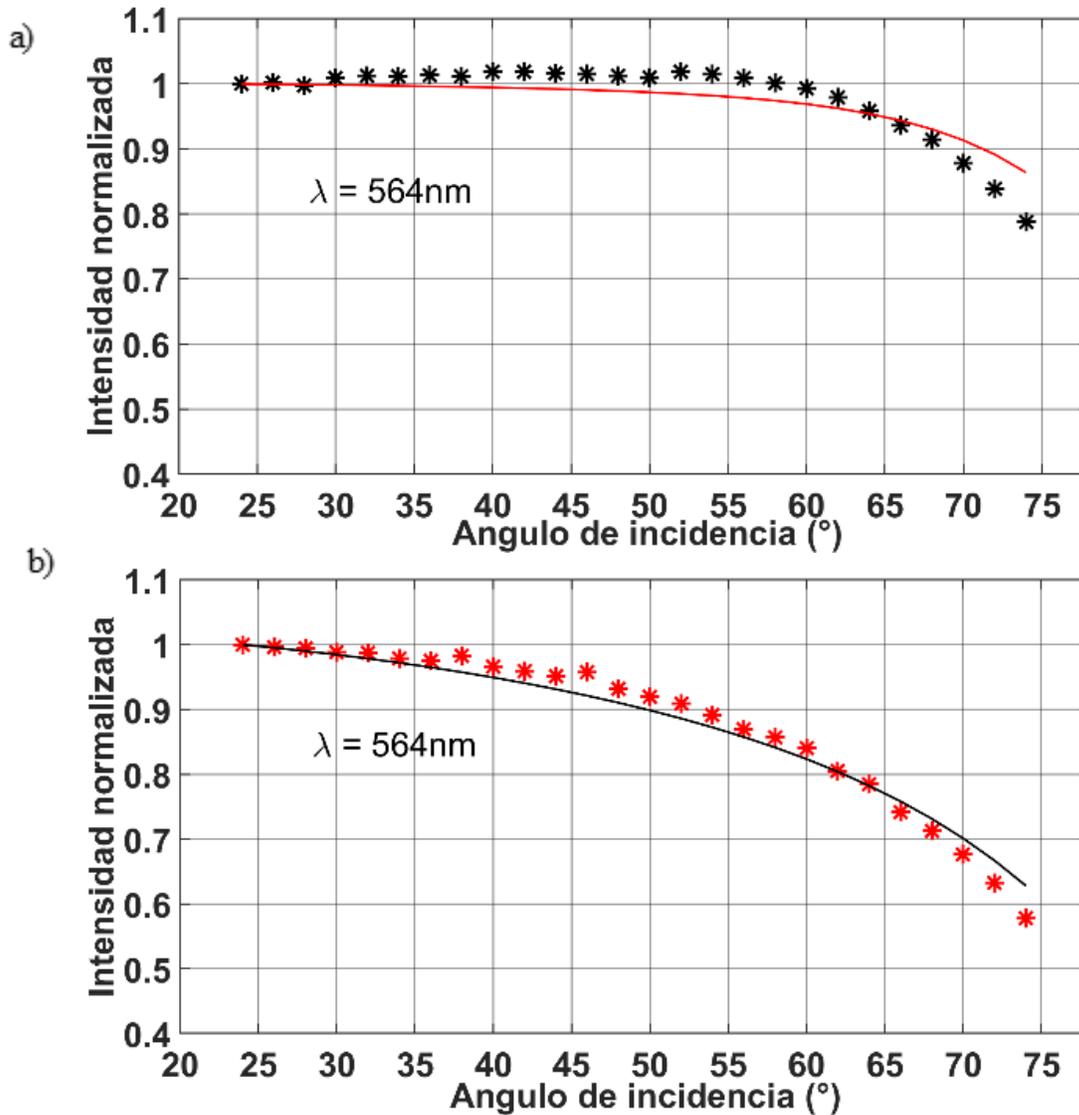


Fig. 24. Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia máxima normalizada de tejido epitelial teñido con R6G en función del ángulo de incidencia **a)** para luz de excitación polarizada TM (símbolos de estrella) y el mejor ajuste del modelo teórico; **b)** igual que a) pero para luz de excitación polarizada TE.

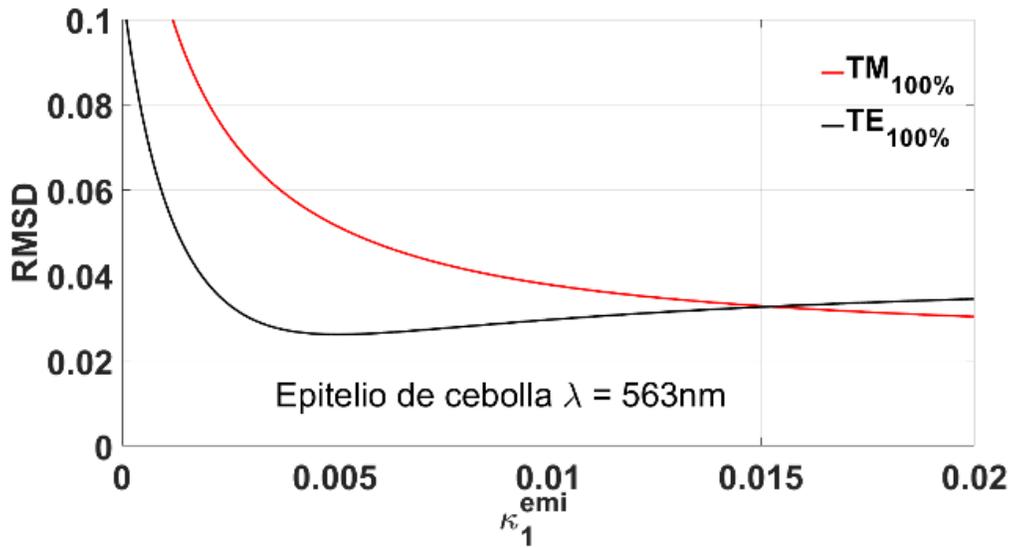


Fig. 25. RMSD en función del valor de $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ para luz de excitación polarizada TM y TE en tejido epitelial de R6G teñida con R6G.

Tabla 9. Datos experimentales para tejido teñido con R6G.

Muestra Tejido	Pico de emisión			RMSD	Cociente $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ / κ_1^{exc}
	(nm)	κ_1^{exc}	$\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$		
TE	563	0.0011	0.0051	0.0262	4.6
TM	563	0.0011	--	--	--

En este caso, no se encontró un mínimo local para polarización TM, el mejor ajuste de $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$ corresponde a un valor de 0.095 este valor no tendría sentido físicamente, una posible explicación podría ser la inhomogeneidad del tejido y las irregularidades de la primera superficie. En principio podemos pensar que este método no aplica para tejidos o este tipo de tejido como originalmente habíamos pensado, sin embargo, planteamos la idea que podemos usar este método para conocer la rugosidad o irregularidades del medio. Supongamos un medio en el que conocemos el $\kappa_1^{emi}(\lambda_{max})$, este método puede aplicarse para medir el coeficiente de transmisión de la frontera y caracterizar la superficie.

6 CAPÍTULO

CONCLUSIONES.

Hemos propuesto y probado un método relativamente sencillo para determinar el índice de absorción de un medio fluorescente mientras está excitado. El método se diseñó para una configuración retroluminiscente y puede aplicarse a películas gruesas para las que no es posible realizar mediciones de transmisión o equivalentemente para un semiespacio del medio fluorescente.

El método depende de un modelo que debe ajustarse a los datos experimentales. Para el presente trabajo hemos proporcionado un modelo simplificado basado en las siguientes suposiciones: 1) La intensidad de luz que excita al medio fluorescente (homogéneo) decae exponencialmente al propagarse dentro de éste, 2) localmente la intensidad de fluorescencia es proporcional a la intensidad de la luz que excita a los fluoróforos, y 3) la luz emitida por los fluoróforos decae exponencialmente al propagarse dentro del medio excitado en su trayecto de salida. Esta última suposición implica que el índice de extinción (el cual es afectado por el grado de excitación del medio) es constante a lo largo de la trayectoria de salida de la luz emitida por el medio. Esto podría ser una simplificación excesiva válida sólo cuando el índice de extinción en la longitud de onda de emisión es mayor que en la longitud de onda de excitación. Sin embargo, éste fue el caso de las pruebas experimentales realizadas con películas de nitrocelulosa dopadas con R6G. Encontramos que para una polarización TE el cociente entre el índice de extinción en la longitud de onda de excitación y el índice de extinción en las longitudes de onda de emisión, durante el proceso de emisión, es de aproximadamente 3, y para polarización TM es de 1. Esto significa que, en un semiespacio de un medio fluorescente, la luz emitida proviene de una región más cercana a la interfaz de lo que se pensaba.

Se estimó que la longitud de penetración de la luz para concentraciones tipo M6 es de $50\mu\text{m}$ y se reduce conforme la concentración del fluoróforo aumenta, como en las muestras tipo M0 donde la longitud de penetración fue de $13\mu\text{m}$. Estos valores pudieran parecer bajos; sin embargo en trabajo futuro se puede implementar este método en tejidos biológicos donde a

50 μm por debajo de la superficie existe información relevante para el área médica, en particular en el área de la dermatología [128]–[131]. El modelo podría mejorarse para tener en cuenta los casos en los que κ_{emi} es menor que κ_{exc} .

La implementación del método propuesto con el espectrofotómetro utilizado en este trabajo permite determinar el espectro de κ_{emi} a través de la banda de emisión de un medio fluorescente. Aunque el método es algo laborioso en su versión actual, ya que deben tomarse varios espectros a diferentes ángulos de incidencia de la luz excitadora, requiere una instrumentación relativamente sencilla.

Las pruebas realizadas con yoduro de propidio sugieren que, en principio, este método podría utilizarse en medios con un fluoróforo diferente. Las muestras fluorescentes realizadas con partículas de borosilicato (grandes en comparación con la longitud de onda). Sugiere que la metodología desarrollada también podría utilizarse con medios fluorescentes con cierto tipo de dispersión. Concretamente, en medios en los que la dispersión se produce principalmente en la dirección de avance de la luz. En este caso, la atenuación de la luz dentro del medio se deberá tanto a la absorción y scattering de las partículas podría utilizarse el presente método. Este es el caso de algunos medios biológicos a longitudes de onda ópticas, ya que ciertas células biológicas dispersan la luz principalmente en la dirección frontal. Queda para futuros trabajos probar y utilizar el método en tales escenarios.

En general, el ajuste teórico-experimental en los escenarios investigados en este documento se observó que el valor de κ_{emi} para dos polarizaciones era distinto, es decir, se observó una fuerte anisotropía. Además, el proceso de secado de las películas en nuestro método de preparación de muestras también puede inducir un RI complejo anisótropo de las muestras. Sin embargo, para el índice de refracción biaxial con el eje de anisotropía perpendicular a la interfaz, como debiera ser el caso aquí, las fórmulas presentadas en el Capítulo 3 para nuestro modelo no cambian para la polarización TE. Por lo que la medición del índice de extinción usando el modelo propuesto en esta tesis es más exacto en polarización TE que en polarización TM. Sin embargo, en vista de la fuerte anisotropía encontrada, se decidió presentar el análisis correspondiente para polarización TM. Es necesario en el futuro ampliar el modelo propuesto para determinar la exactitud del modelo para describir el fenómeno en

este caso particular. También es necesario ampliar el modelo para considerar la dependencia del índice de extinción con la profundidad en el medio fluorescente.

7 APÉNDICE

PROPAGACIÓN DE LUZ FOTOLUMINISCENTE EN UN MEDIO FLUORESCENTE

7.1 Propagación de luz de excitación en un medio fluorescente

El modelo asume que la luz de excitación se atenuará al propagarse dentro de un medio activo siguiendo una la ley tipo Beer-Lambert, esto se comprobó midiendo la potencia transmitida en de diferentes grosores de una solución de R6G, las mediciones se realizaron con el montaje experimental mostrado en la **Fig. 26** el arreglo está conformado por una fuente de excitación diodo láser (DL) de 7 mW a 517 nm (1264216, Edmund Inc. NJ), celdas con cuatro grosores distintos (ver Cap. 4) y un sensor de potencia (S120VC, Thorlabs Inc. NJ), la longitud de medición y excitación fueron iguales, estos elementos están en el mismo camino óptico a incidencia normal, la separación del sensor de potencia y las celdas fue de 20 cm esto con la finalidad de evitar que la radiación debida por fluorescencia llegara al detector de potencia y solo medir la intensidad de luz a la longitud de excitación @517 nm, las celdas de 1, 3, 5 y 7 mm fueron rellenas con diferentes concentraciones de 0.01, 0.03 y 0.06 mM de solución de R6G que se etiquetaron como L0 exp, L1 exp y L2 exp.

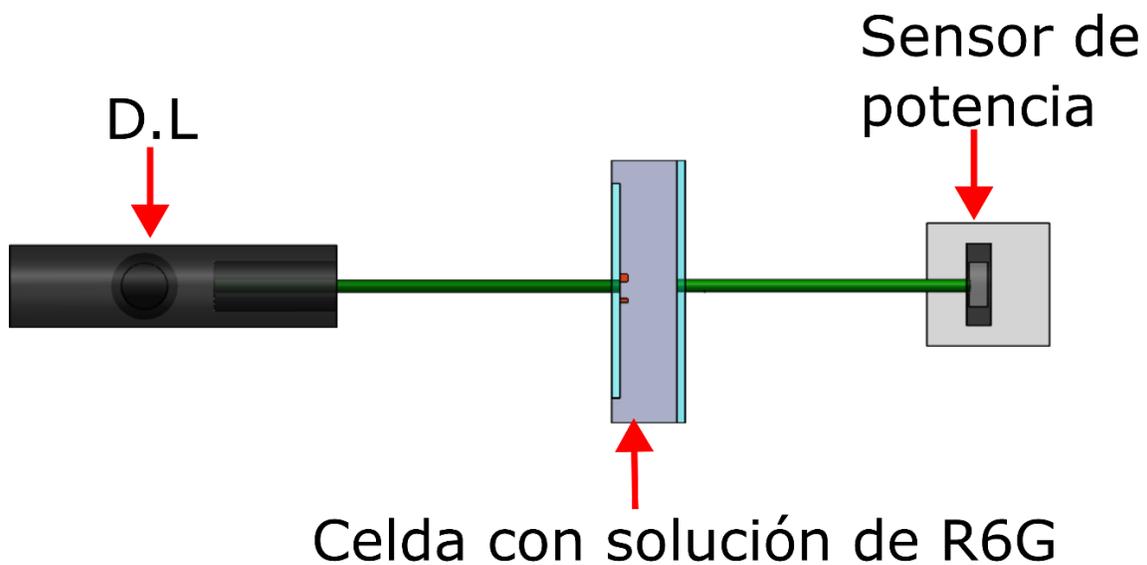


Fig. 26 Vista superior del sistema para medir la potencia transmitida en celdas con grosores de 1, 3 5 y 7 mm.

En **Fig. 27** se muestra como decae la potencia de luz en función del grosor del medio activo en tres concentraciones. En la **Tabla 10** se muestra la ecuación y coeficientes del ajuste realizado.

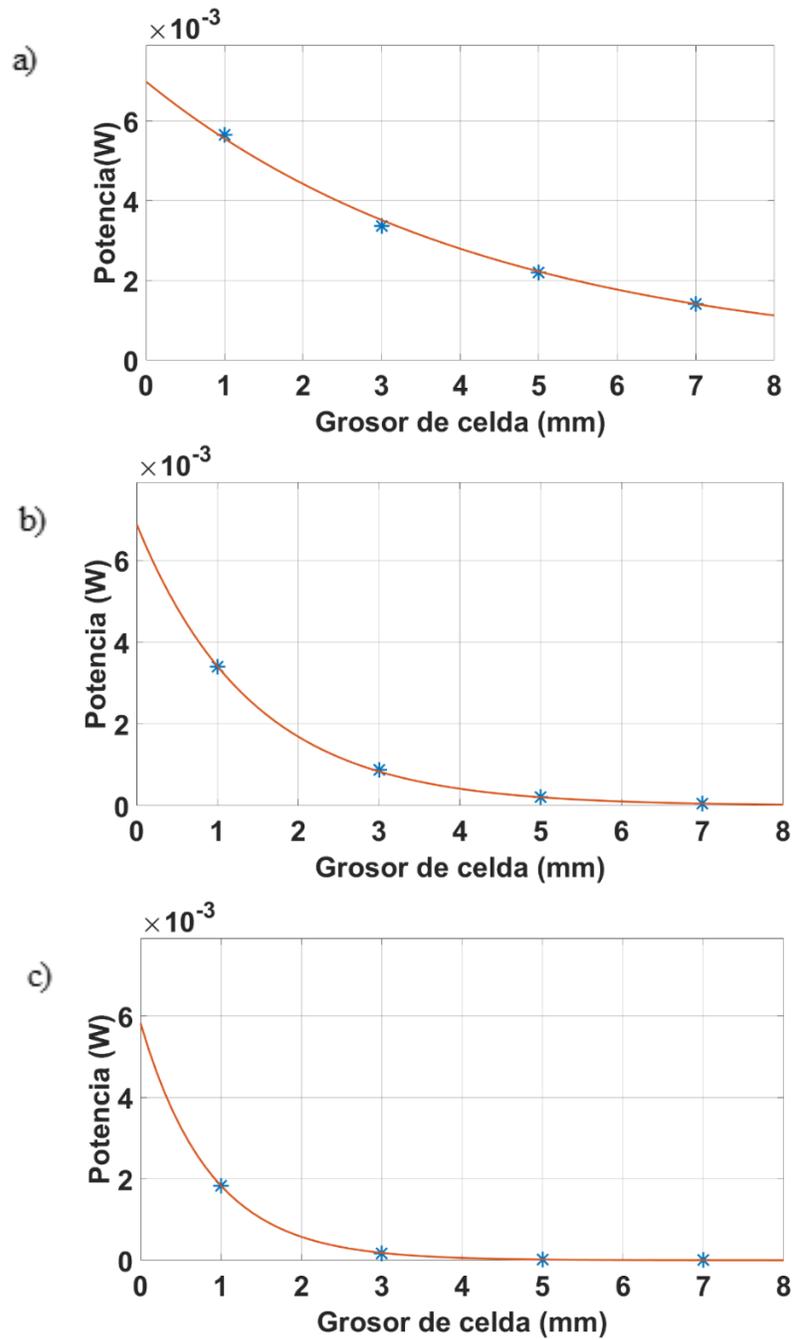


Fig. 27 Potencia transmitida en función del grosor de 4 celdas con solución de R6G
a) L0 exp, b) L1 exp y c) L2 exp

Tabla 10 Coeficientes del ajuste teórico en solución de R6G en función del grosor del medio activo longitud de excitación y de observación 517nm

Muestra	Ecuación de ajuste $f(x) = a \cdot \exp(b \cdot x)$
L exp	a=0.0070 mW b=-0.23 mm ⁻¹
L1 exp	a=0.0068 mW b=-0.70 mm ⁻¹
L2 exp	a=0.0058 mW b=-1.12 mm ⁻¹

7.2 Propagación de luz de emisión en un medio fluorescente

El modelo supone que la luz de emisión en el medio 1 y viaja al medio 0 donde se encuentra el observador decae exponencialmente siguiendo una la ley tipo Beer-Lambert en la **Fig. 28** mostramos diagrama del arreglo experimental para medir espectros de fluorescencia en función del grosor del medio activo, la disposición óptica es que la fuente de excitación y el observador están a incidencia normal.

Este arreglo mide espectros de fluorescencia en función del grosor del medio activo y de la concentración. El arreglo consta de una fuente diodo láser (DL) de 7 mW a 517 nm (1264216, Edmund Inc. NJ), fibra óptica (UV/SR-VIS de alto contenido en OH, Ocean Optics Inc. NJ), un espectrofotómetro portátil (USB4000, Ocean Optics Inc. NJ), filtro óptico de paso largo (filtro PL) con una longitud de onda de corte de 550 nm (FGL550, Thorlabs Inc. NJ), divisor de haz 50/50 y un recipiente cilíndrico donde depositamos la solución de R6G, este recipiente cilíndrico puede modificar el grosor o espesor del medio activo de 0 a 20 mm, el recipiente es una jeringa de 20 ml a cual se le retiro el pivote y se colocó un vidrio, en la jeringa cerca del vidrio se le coloco una manguera para drenar o llenar la jeringa, al mover la posición del embolo de la jeringa podemos modificar el grosor del medio activo y registrar espectros de fluorescencia en función de la profundidad del medio, para estas mediciones se utilizaron concentraciones L0 exp, L1 exp y L2 exp, en la **Fig. 29** mostramos como varia la intensidad de fluorescencia a 560 nm en función de la profundidad.

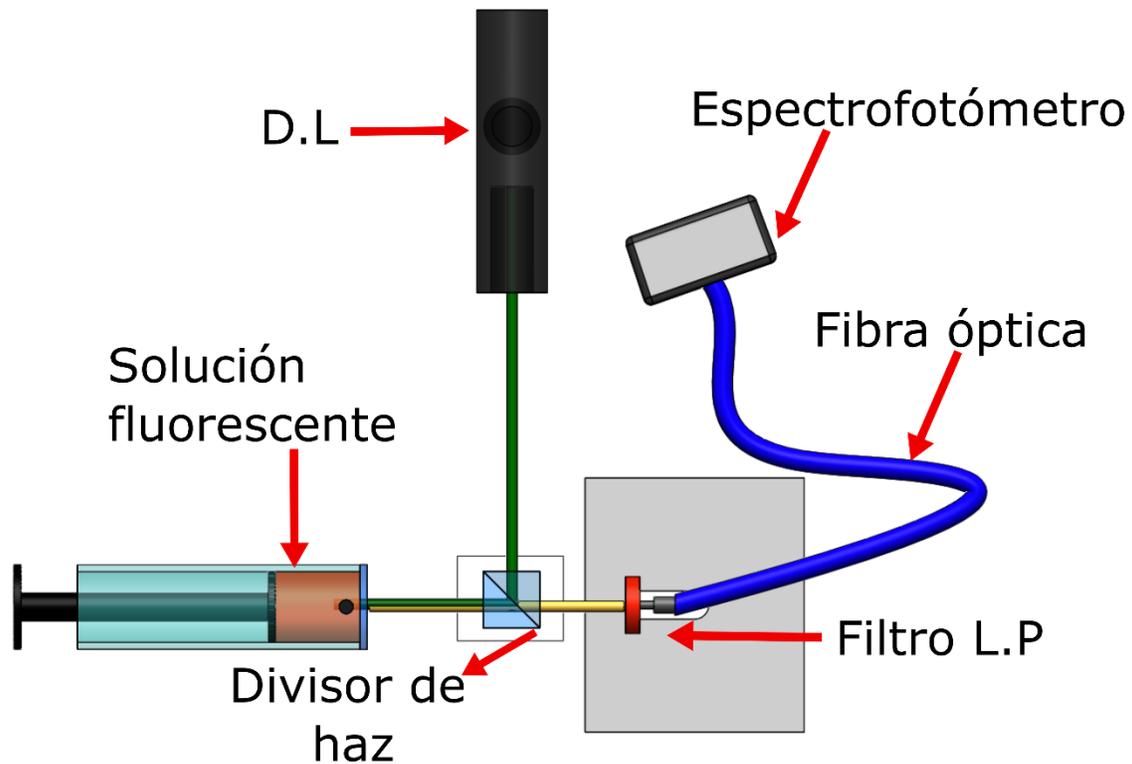


Fig. 28 Vista superior del dispositivo experimental en modo de reflexión observador y fuente de excitación a incidencia normal para medir el perfil de intensidad de fluorescencia en función del espesor del medio activo.

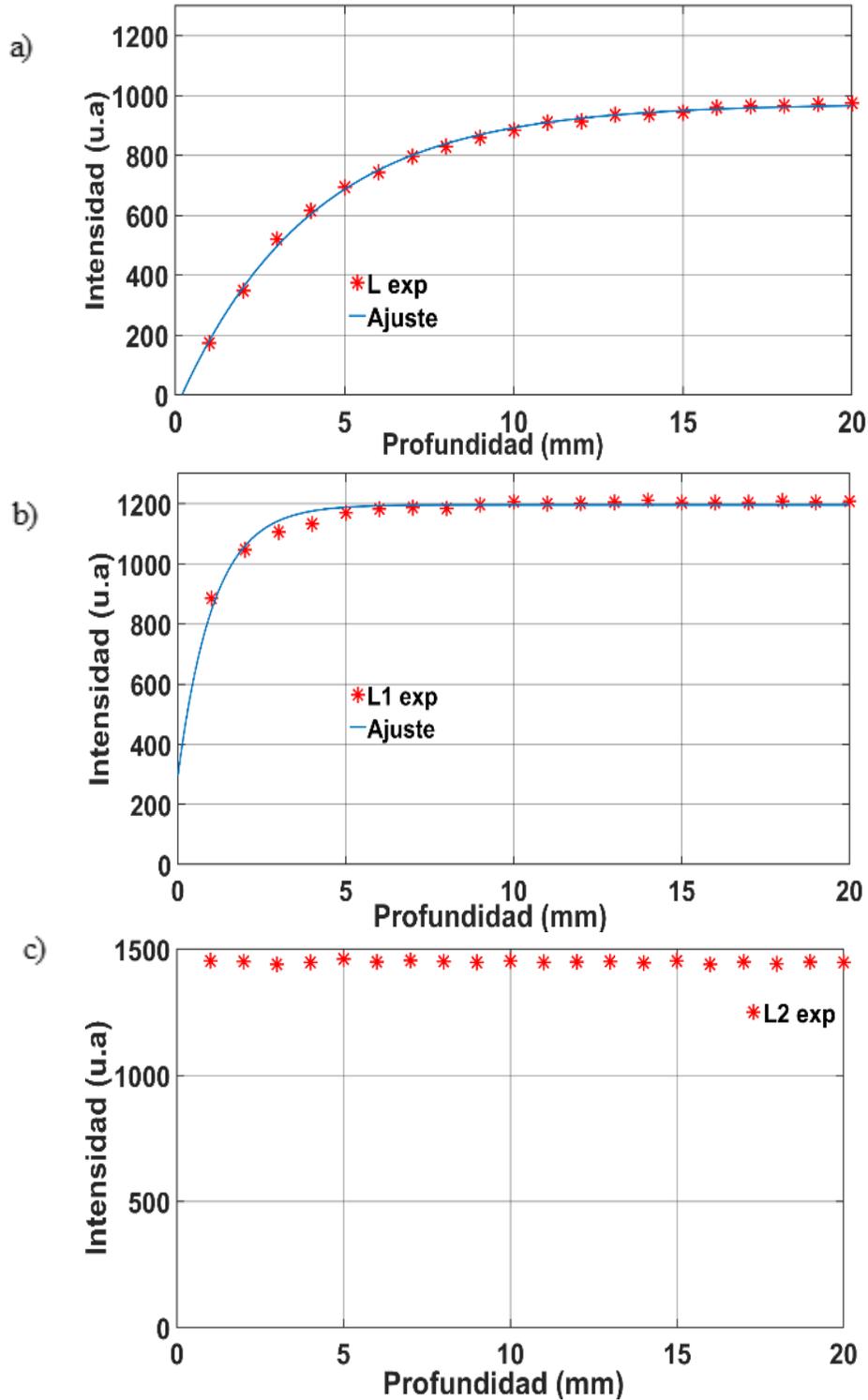


Fig. 29 Datos experimentales de la intensidad de fluorescencia a 561 nm en función del grosor del medio activo. Observado y fuente de excitación están a incidencia normal
a) L exp, b) L1 exp y c) L2 exp

En **Fig. 29** se observa en marcadores color rojo los datos experimentales y en línea color azul el ajuste teórico, la ecuación y los coeficientes se observan en la **Tabla 11**. En el gráfico podemos observar cómo varía de forma exponencial la intensidad de fluorescencia en función de la profundidad del medio activo para las concentraciones L_{exp} y $L1_{exp}$, respectivamente, lo que pudiera confirmar la suposición del modelo, la luz emitida por el fluoróforo en un punto r dentro del medio 1 en profundidad z puede decaer exponencialmente con la profundidad hacia el detector en el medio 0. Entonces, la luz emitida desde el punto r se atenúa en su camino hacia el detector por un factor $T_{10}(0) \exp[-2k_0^{emi} \kappa_1^{emi} z]$.

Tabla 11 Coeficientes del ajuste teórico en solución de R6G en función del grosor del medio activo longitud de excitación 517nm y observación 561 nm

Muestra	ecuación de ajuste $f(x)=c*(1-\exp(b*x))+d$
L_{exp}	$b=-0.25 \text{ mm}^{-1}$ $c=1021 \text{ u.a}$ $d=-48.7 \text{ u.a}$
$L1_{exp}$	$b=-0.94 \text{ mm}^{-1}$ $c=900 \text{ u.a}$ $d=296.2 \text{ u.a}$
$L2_{exp}$	- ($\gg 1 \text{ mm}^{-1}$)

En general para los experimentos realizados en la **Fig. 26** y **Fig. 28** podemos observar que la luz de excitación y emisión decaen de forma exponencial siguiendo la ley tipo Beer-Lambert lo que confirma que la suposición en del modelo es correcta.

8 REFERENCIAS

- [1] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [2] A. Refaat *et al.*, «In vivo fluorescence imaging: success in preclinical imaging paves the way for clinical applications», *J. Nanobiotechnology*, vol. 20, n.º 1, Art. n.º 1, dic. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01648-7.
- [3] S. Zha, H. Li, G.-L. Law, K.-L. Wong, y A. H. All, «Sensitive and responsive upconversion nanoprobe for fluorescence turn-on detection of glucose concentration», *Mater. Des.*, vol. 227, p. 111800, mar. 2023, doi: 10.1016/j.matdes.2023.111800.
- [4] Z. Farka, M. J. Mickert, M. Pastucha, Z. Mikušová, P. Skládal, y H. H. Gorris, «Advances in Optical Single-Molecule Detection: En Route to Supersensitive Bioaffinity Assays», *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 59, n.º 27, pp. 10746-10773, 2020, doi: 10.1002/anie.201913924.
- [5] A. S. Oshchepkov, M. S. Oshchepkov, M. V. Oshchepkova, A. Al-Hamry, O. Kanoun, y E. A. Kataev, «Naphthalimide-Based Fluorescent Polymers for Molecular Detection», *Adv. Opt. Mater.*, vol. 9, n.º 6, p. 2001913, 2021, doi: 10.1002/adom.202001913.
- [6] Z. Wang *et al.*, «Through-Space Charge Transfer: A New Way to Develop a High-Performance Fluorescence Sensing Film towards Opto-Electronically Inert Alkanes», *Angew. Chem.*, vol. 134, n.º 35, p. e202207619, 2022, doi: 10.1002/ange.202207619.
- [7] C. Yan, Y. Zhang, y Z. Guo, «Recent progress on molecularly near-infrared fluorescent probes for chemotherapy and phototherapy», *Coord. Chem. Rev.*, vol. 427, p. 213556, ene. 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2020.213556.
- [8] M. Rezazadeh, S. Seidi, M. Lid, S. Pedersen-Bjergaard, y Y. Yamini, «The modern role of smartphones in analytical chemistry», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 118, pp. 548-555, sep. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.06.019.
- [9] J. V. Jun, D. M. Chenoweth, y E. James Petersson, «Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications», *Org. Biomol. Chem.*, vol. 18, n.º 30, pp. 5747-5763, 2020, doi: 10.1039/D0OB01131B.
- [10] A. L. Mattheyses, S. M. Simon, y J. Z. Rappoport, «Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist», *J. Cell Sci.*, vol. 123, n.º 21, pp. 3621-3628, nov. 2010, doi: 10.1242/jcs.056218.

- [11] L. A. Munishkina y A. L. Fink, «Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1768, n.º 8, pp. 1862-1885, ago. 2007, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.03.015.
- [12] A. B. T. Ghisaidoobe y S. J. Chung, «Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, n.º 12, Art. n.º 12, dic. 2014, doi: 10.3390/ijms151222518.
- [13] X. Chen *et al.*, «A review on wire-arc additive manufacturing: typical defects, detection approaches, and multisensor data fusion-based model», *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 117, n.º 3, pp. 707-727, nov. 2021, doi: 10.1007/s00170-021-07807-8.
- [14] B. Zhao y Z. Tan, «Fluorescent Carbon Dots: Fantastic Electroluminescent Materials for Light-Emitting Diodes», *Adv. Sci.*, vol. 8, n.º 7, p. 2001977, 2021, doi: 10.1002/advs.202001977.
- [15] D. Camejo, A. Frutos, T. C. Mestre, M. del Carmen Piñero, R. M. Rivero, y V. Martínez, «Artificial light impacts the physical and nutritional quality of lettuce plants», *Hortic. Environ. Biotechnol.*, vol. 61, n.º 1, pp. 69-82, feb. 2020, doi: 10.1007/s13580-019-00191-z.
- [16] C. A. Briones-Vázquez y A. Álvarez-Hernández, «Sondas fluorescentes, una revisión general: propiedades, diseño y aplicaciones», *Pädi Bol. Científico Cienc. Básicas E Ing. ICBI*, vol. 9, n.º 17, jul. 2021, Accedido: 28 de julio de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/595/5952727006/html/>
- [17] «Laser-Induced Fluorescence Emission (L.I.F.E.) as Novel Non-Invasive Tool for In-Situ Measurements of Biomarkers in Cryospheric Habitats | Protocol (Translated to Spanish)». Accedido: 28 de julio de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.jove.com/es/v/60447/laser-induced-fluorescence-emission-life-as-novel-non-invasive-tool?language=Spanish>
- [18] J. Gu *et al.*, «Degradation of Rhodamine B in aqueous solution by laser cavitation», *Ultrason. Sonochem.*, vol. 68, p. 105181, nov. 2020, doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105181.
- [19] H. Liu, J. Ding, K. Zhang, y L. Ding, «Construction of biomass carbon dots based fluorescence sensors and their applications in chemical and biological analysis», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 118, pp. 315-337, sep. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.05.051.
- [20] L. Chen, D. Liu, J. Peng, Q. Du, y H. He, «Ratiometric fluorescence sensing of metal-organic frameworks: Tactics and perspectives», *Coord. Chem. Rev.*, vol. 404, p. 213113, feb. 2020, doi: 10.1016/j.ccr.2019.213113.

- [21] Y.-H. Shin, M. T. Gutierrez-Wing, y J.-W. Choi, «Review—Recent Progress in Portable Fluorescence Sensors», *J. Electrochem. Soc.*, vol. 168, n.º 1, p. 017502, ene. 2021, doi: 10.1149/1945-7111/abd494.
- [22] M. Chern, J. C. Kays, S. Bhuckory, y A. M. Dennis, «Sensing with photoluminescent semiconductor quantum dots», *Methods Appl. Fluoresc.*, vol. 7, n.º 1, p. 012005, ene. 2019, doi: 10.1088/2050-6120/aaf6f8.
- [23] K. Xue *et al.*, «A Sensitive and Reliable Organic Fluorescent Nanothermometer for Noninvasive Temperature Sensing», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 143, n.º 35, pp. 14147-14157, sep. 2021, doi: 10.1021/jacs.1c04597.
- [24] «Molecular Mechanism of Viscosity Sensitivity in BODIPY Rotors and Application to Motion-Based Fluorescent Sensors | ACS Sensors». Accedido: 2 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssensors.9b01951>
- [25] G. Yang, J. Zhao, S. Yi, X. Wan, y J. Tang, «Biodegradable and photostable Nb2C MXene quantum dots as promising nanofluorophores for metal ions sensing and fluorescence imaging», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 309, p. 127735, abr. 2020, doi: 10.1016/j.snb.2020.127735.
- [26] «Quantitative Effects of Pigmentation on the Re-absorption of Chlorophyll a Fluorescence and Energy Partitioning in Leaves - Ospina Calvo - 2019 - Photochemistry and Photobiology - Wiley Online Library». Accedido: 2 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/php.13149>
- [27] «Ultralong Room-Temperature Phosphorescence with Second-level Lifetime in Water Based on Cyclodextrin Supramolecular Assembly | ACS Nano». Accedido: 3 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.3c04971>
- [28] Y. Li, W. Li, H. Zhang, Y. Liu, L. Ma, y B. Lei, «Amplified light harvesting for enhancing Italian lettuce photosynthesis using water soluble silicon quantum dots as artificial antennas», *Nanoscale*, vol. 12, n.º 1, pp. 155-166, 2020, doi: 10.1039/C9NR08187A.
- [29] C. Corbella Bagot, E. Rappeport, A. Das, T. Ba Tis, y W. Park, «True FRET-Based Sensing of pH via Separation of FRET and Photon Reabsorption», *Adv. Opt. Mater.*, vol. 10, n.º 15, p. 2200242, 2022, doi: 10.1002/adom.202200242.
- [30] A. Penzkofer y W. Leupacher, «Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions», *J. Lumin.*, vol. 37, n.º 2, pp. 61-72, may 1987, doi: 10.1016/0022-2313(87)90167-0.

- [31] L. Cisse *et al.*, «Quantitative study of the substituent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra of coumarins», *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 33, n.º 2, p. e4014, 2020, doi: 10.1002/poc.4014.
- [32] M. Cardoso Dos Santos, W. R. Algar, I. L. Medintz, y N. Hildebrandt, «Quantum dots for Förster Resonance Energy Transfer (FRET)», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 125, p. 115819, abr. 2020, doi: 10.1016/j.trac.2020.115819.
- [33] J. Liao, V. Madahar, R. Dang, y L. Jiang, «Quantitative FRET (qFRET) Technology for the Determination of Protein–Protein Interaction Affinity in Solution», *Molecules*, vol. 26, n.º 21, Art. n.º 21, ene. 2021, doi: 10.3390/molecules26216339.
- [34] M. Skruzny, E. Pohl, y M. Abella, «FRET Microscopy in Yeast», *Biosensors*, vol. 9, n.º 4, Art. n.º 4, dic. 2019, doi: 10.3390/bios9040122.
- [35] M. Xue *et al.*, «Monitoring energy distribution of nonradiative energy transfer and reabsorption process in an upconversion nanoparticle detection system», *J. Lumin.*, vol. 210, pp. 175-181, jun. 2019, doi: 10.1016/j.jlumin.2019.02.007.
- [36] M. A. Ameen, M. A. Saeed, y A. S. Mahmood, «Dip-coating sol–gel preparation and characterization of Rhodamine 6G-doped nanostructured TiO₂ thin films on structural and spectroscopic properties», *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 101, n.º 3, pp. 655-671, mar. 2022, doi: 10.1007/s10971-022-05738-8.
- [37] A. Dey, A. Pramanik, S. Biswas, U. Chatterjee, y P. Kumbhakar, «Tunable and low-threshold random lasing emission in waveguide aided Rhodamine-6G dye incorporated silica embedded thin films», *J. Lumin.*, vol. 251, p. 119252, nov. 2022, doi: 10.1016/j.jlumin.2022.119252.
- [38] E. K. Hassan, «Structural and Optical Analysis of Rhodamine 6G Thin Films Prepared by Q-switched Nd: YAG Pulsed Laser Deposition», *NeuroQuantology*, vol. 18, n.º 3, pp. 45-50, 2020, doi: 10.14704/nq.2020.18.3.NQ20149.
- [39] D. Santos-Cruz, M. L. Olvera-Amador, F. J. de Moure-Flores, y J. Santos-Cruz, «Comparative Analysis of CdS Thin Films deposited by CBD and RF-Sputtering», en *2019 16th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control (CCE)*, sep. 2019, pp. 1-6. doi: 10.1109/ICEEE.2019.8884544.
- [40] N. Higashi, A. Ikehata, y Y. Ozaki, «An attenuated total reflectance far-UV spectrometer», *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 78, n.º 10, p. 103107, oct. 2007, doi: 10.1063/1.2796928.
- [41] B. P. Kafle, «Chapter 2 - Theory and instrumentation of absorption spectroscopy: UV–VIS spectrophotometry and colorimetry», en *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, B. P. Kafle, Ed., Elsevier, 2020, pp. 17-38. doi: 10.1016/B978-0-12-814866-2.00002-6.

- [42] Z. Shi, C. W. K. Chow, R. Fabris, J. Liu, y B. Jin, «Applications of Online UV-Vis Spectrophotometer for Drinking Water Quality Monitoring and Process Control: A Review», *Sensors*, vol. 22, n.º 8, Art. n.º 8, ene. 2022, doi: 10.3390/s22082987.
- [43] J. R. Albani, *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2008.
- [44] A. Romarowski *et al.*, «Super-resolution imaging of live sperm reveals dynamic changes of the actin cytoskeleton during acrosomal exocytosis», *J. Cell Sci.*, vol. 131, n.º 21, p. jcs218958, nov. 2018, doi: 10.1242/jcs.218958.
- [45] S. López-Molina *et al.*, «In vivo nanoscale analysis of the dynamic synergistic interaction of Bacillus thuringiensis Cry11Aa and Cyt1Aa toxins in Aedes aegypti», *PLOS Pathog.*, vol. 17, n.º 1, p. e1009199, ene. 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1009199.
- [46] «Review of applications of fluorescence excitation spectroscopy to dermatology - Franco - 2016 - British Journal of Dermatology - Wiley Online Library». Accedido: 22 de septiembre de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjd.14221>
- [47] P. A. Valdés, X. Fan, S. Ji, B. T. Harris, K. D. Paulsen, y D. W. Roberts, «Estimation of brain deformation for volumetric image updating in protoporphyrin IX fluorescence-guided resection», *Stereotact. Funct. Neurosurg.*, vol. 88, n.º 1, pp. 1-10, 2010, doi: 10.1159/000258143.
- [48] E. Gutierrez-Herrera, C. Sánchez-Pérez, A. Perez-Garcia, M. A. Padilla-Castaneda, W. Franco, y J. Hernández-Ruiz, «Endogenous Fluorescence Dissimilarity Assessment of Four Potential Biomarkers of Early Liver Fibrosis by Preservation Media Effect», *J. Fluoresc.*, vol. 30, n.º 2, pp. 249-257, mar. 2020, doi: 10.1007/s10895-019-02484-z.
- [49] A. Ortega-Martinez, J. J. Musacchia, E. Gutierrez-Herrera, Y. Wang, y W. Franco, «Design and implementation of a dual-wavelength intrinsic fluorescence camera system», en *Design and Quality for Biomedical Technologies X*, SPIE, mar. 2017, pp. 143-148. doi: 10.1117/12.2253063.
- [50] E. Gutierrez-Herrera, A. E. Ortiz, A. Doukas, y W. Franco, «Fluorescence excitation photography of epidermal cellular proliferation», *Br. J. Dermatol.*, vol. 174, n.º 5, pp. 1086-1091, 2016, doi: 10.1111/bjd.14400.
- [51] Y. Wang, E. Gutierrez-Herrera, A. Ortega-Martinez, R. R. Anderson, y W. Franco, «UV fluorescence excitation imaging of healing of wounds in skin: Evaluation of wound closure in organ culture model», *Lasers Surg. Med.*, vol. 48, n.º 7, pp. 678-685, 2016, doi: 10.1002/lsm.22523.

- [52] H. Goudket, T. H. Nhung, B. Ea-Kim, G. Roger, y M. Canva, «Importance of dye host on absorption, propagation losses, and amplified spontaneous emission for dye-doped polymer thin films», *Appl. Opt.*, vol. 45, n.º 29, pp. 7736-7741, oct. 2006, doi: 10.1364/AO.45.007736.
- [53] F. Brandl, S. Bergwinkl, C. Allacher, y B. Dick, «Consecutive Photoinduced Electron Transfer (conPET): The Mechanism of the Photocatalyst Rhodamine 6G», *Chem. – Eur. J.*, vol. 26, n.º 35, pp. 7946-7954, 2020, doi: 10.1002/chem.201905167.
- [54] K. Trejgis, F. Tian, J. Li, A. Bednarkiewicz, y L. Marciniak, «The role of surface related quenching in the single band ratiometric approach based on excited state absorption processes in Nd³⁺ doped phosphors», *Mater. Res. Bull.*, vol. 139, p. 111288, jul. 2021, doi: 10.1016/j.materresbull.2021.111288.
- [55] A. Ogunsipe, «Solvent Effects on the Spectral Properties of Rhodamine 6G: Estimation of Ground and Excited State Dipole Moments», *J. Solut. Chem.*, vol. 47, n.º 2, pp. 203-219, feb. 2018, doi: 10.1007/s10953-017-0706-8.
- [56] S. Park, M. Kim, J.-C. Vial, y K. Kyhm, «Stimulation Emission Depleted Photoacoustic», *Opt. Express*, vol. 27, n.º 20, pp. 27841-27850, sep. 2019, doi: 10.1364/OE.27.027841.
- [57] K. Cyprych, Z. Kopczyńska, F. Kajzar, I. Rau, y J. Mysliwiec, «Tunable wavelength light emission and amplification in Rhodamine 6G aggregates», *Adv. Device Mater.*, vol. 1, n.º 2, pp. 69-73, abr. 2015, doi: 10.1179/2055031615Y.0000000004.
- [58] P. Venkateswarlu, M. C. George, Y. V. Rao, H. Jagannath, G. Chakrapani, y A. Miahnahri, «Transient excited singlet state absorption in Rhodamine 6G», *Pramana*, vol. 28, n.º 1, pp. 59-71, ene. 1987, doi: 10.1007/BF02846809.
- [59] G. Wang, A. A. Baker-Murray, y W. J. Blau, «Saturable Absorption in 2D Nanomaterials and Related Photonic Devices», *Laser Photonics Rev.*, vol. 13, n.º 7, p. 1800282, 2019, doi: 10.1002/lpor.201800282.
- [60] S. Jeyaram, «Nonlinear optical responses in organic dye by Z-scan method», *J. Opt.*, vol. 51, n.º 3, pp. 666-671, sep. 2022, doi: 10.1007/s12596-022-00834-y.
- [61] A. Gaur, M. A. Mohiddon, y V. R. Soma, «Strong two-photon absorption in ErFeO₃ thin films studied using femtosecond near-infrared Z-scan technique», *J. Appl. Phys.*, vol. 127, n.º 17, p. 173104, may 2020, doi: 10.1063/5.0004346.
- [62] S. Mohan, E. Kato, J. K. Drennen, y C. A. Anderson, «Refractive Index Measurement of Pharmaceutical Solids: A Review of Measurement Methods and Pharmaceutical Applications», *J. Pharm. Sci.*, vol. 108, n.º 11, pp. 3478-3495, nov. 2019, doi: 10.1016/j.xphs.2019.06.029.

- [63] R. Khan, B. Gul, S. Khan, H. Nisar, y I. Ahmad, «Refractive index of biological tissues: Review, measurement techniques, and applications», *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 33, p. 102192, mar. 2021, doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102192.
- [64] Y. Wei, H. Zhou, J. Dong, y X. Zhang, «Compact and fast-response optical switch based on complex refractive index engineering», *Opt. Lett.*, vol. 48, n.º 11, pp. 2929-2932, jun. 2023, doi: 10.1364/OL.489936.
- [65] A. K. Shakya y S. Singh, «Design of a novel refractive index BIOSENSOR for heavy metal detection from water samples based on fusion of spectroscopy and refractive index sensing», *Optik*, vol. 270, p. 169892, nov. 2022, doi: 10.1016/j.ijleo.2022.169892.
- [66] V. Pilla, P. R. Impinnisi, y T. Catunda, «Measurement of saturation intensities in ion doped solids by transient nonlinear refraction», *Appl. Phys. Lett.*, vol. 70, n.º 7, pp. 817-819, feb. 1997, doi: 10.1063/1.118232.
- [67] «Full dynamic corrections to the Maxwell Garnett mixing formula and corresponding extensions beyond the dipolar approximation - ScienceDirect». Accedido: 30 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022407323000961>
- [68] «Scattering, Rayleigh | Elsevier Enhanced Reader». Accedido: 11 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/B9780323908009000391?token=D03D96742302C206CAEB42E68D144ACDF957BF70CEBC8D62A7105AF9163CD18D63929B7599909E86C7F87F1B5FD9AD02&originRegion=us-east-1&originCreation=20230511172423>
- [69] O. Theimer y C. A. Plint, «Light scattering by nearly perfect crystals», *Ann. Phys.*, vol. 3, n.º 4, pp. 408-422, abr. 1958, doi: 10.1016/0003-4916(58)90027-7.
- [70] P. H. Pathak y R. J. Burkholder, *Electromagnetic Radiation, Scattering, and Diffraction*. John Wiley & Sons, 2021.
- [71] A. Acevedo-Barrera y A. Garcia-Valenzuela, «Analytical approximation to the complex refractive index of nanofluids with extended applicability», *Opt. Express*, vol. 27, n.º 20, pp. 28048-28061, sep. 2019, doi: 10.1364/OE.27.028048.
- [72] M. Čepič, «Knitted patterns as a model for anisotropy», *Phys. Educ.*, vol. 47, n.º 4, p. 456, jul. 2012, doi: 10.1088/0031-9120/47/4/456.
- [73] J. R. Albani, *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2008.

- [74] G. de Vito *et al.*, «Effects of excitation light polarization on fluorescence emission in two-photon light-sheet microscopy», *Biomed. Opt. Express*, vol. 11, n.º 8, pp. 4651-4665, jul. 2020, doi: 10.1364/BOE.396388.
- [75] R. C. Groza, A. Calvet, y A. G. Ryder, «A fluorescence anisotropy method for measuring protein concentration in complex cell culture media», *Anal. Chim. Acta*, vol. 821, pp. 54-61, abr. 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.03.007.
- [76] «Theoretical Study of the Mechanism of Aggregation-Caused Quenching in Near-Infrared Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecules: Hydrogen-Bond Effect | The Journal of Physical Chemistry C». Accedido: 11 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jpcc.9b06388>
- [77] H. He, D.-W. Sun, Z. Wu, H. Pu, y Q. Wei, «On-off-on fluorescent nanosensing: Materials, detection strategies and recent food applications», *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 119, pp. 243-256, ene. 2022, doi: 10.1016/j.tifs.2021.11.029.
- [78] M. Barzan y F. Hajiesmaeilbaigi, «Investigation the concentration effect on the absorption and fluorescence properties of Rhodamine 6G dye», *Optik*, vol. 159, pp. 157-161, abr. 2018, doi: 10.1016/j.ijleo.2018.01.075.
- [79] P. Venkateswarlu, M. C. George, Y. V. Rao, H. Jagannath, G. Chakrapani, y A. Miahnahri, «Transient excited singlet state absorption in Rhodamine 6G», *Pramana*, vol. 28, n.º 1, pp. 59-71, ene. 1987, doi: 10.1007/BF02846809.
- [80] R. Abumosa, B. Al-Asbahi, y M. AlSalhi, «Optical Properties and Amplified Spontaneous Emission of Novel MDMO-PPV/C500 Hybrid», *Polymers*, vol. 9, n.º 12, p. 71, feb. 2017, doi: 10.3390/polym9020071.
- [81] S. Park, M. Kim, J.-C. Vial, y K. Kyhm, «Stimulation Emission Depleted Photoacoustic», *Opt. Express*, vol. 27, n.º 20, p. 27841, sep. 2019, doi: 10.1364/OE.27.027841.
- [82] J. C. Dean, S. Rafiq, D. G. Oblinsky, E. Cassette, C. C. Jumper, y G. D. Scholes, «Broadband Transient Absorption and Two-Dimensional Electronic Spectroscopy of Methylene Blue», *J. Phys. Chem. A*, vol. 119, n.º 34, pp. 9098-9108, ago. 2015, doi: 10.1021/acs.jpca.5b06126.
- [83] «Viscosity Effects on Excited-State Dynamics of Indocyanine Green for Phototheranostic - Liao - 2022 - Chemistry – An Asian Journal - Wiley Online Library». Accedido: 18 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/asia.202200112>
- [84] «Atoms | Free Full-Text | “Amplified Spontaneous Emission” in Micro- and Nanolasers». Accedido: 18 de septiembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-2004/9/1/6>

- [85] «Controlling and Optimizing Amplified Spontaneous Emission in Perovskites | ACS Applied Materials & Interfaces». Accedido: 18 de septiembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsami.0c08870>
- [86] N. Feng *et al.*, «Light-Emitting Device Based on Amplified Spontaneous Emission», *Laser Photonics Rev.*, vol. 17, n.º 7, p. 2200908, 2023, doi: 10.1002/lpor.202200908.
- [87] E. Pacheco de Delahaye, A. Rojas, y N. Salinas, «Caracterización físico-química de cremas de leche», *Rev. Fac. Agron.*, vol. 25, n.º 2, pp. 303-317, jun. 2008, Accedido: 5 de marzo de 2021. [En línea]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0378-78182008000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- [88] X. Quan y E. S. Fry, «Empirical equation for the index of refraction of seawater», *Appl. Opt.*, vol. 34, n.º 18, pp. 3477-3480, jun. 1995, doi: 10.1364/AO.34.003477.
- [89] H. Tang *et al.*, «Estimation of Refractive Index for Biological Tissue Using Micro-Optical Coherence Tomography», *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 66, n.º 6, pp. 1803-1809, jun. 2019, doi: 10.1109/TBME.2018.2885844.
- [90] E. Wolf, «Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data», *Opt. Commun.*, vol. 1, n.º 4, pp. 153-156, sep. 1969, doi: 10.1016/0030-4018(69)90052-2.
- [91] «Optical device and methodology for optical sensing of hemolysis in hypotonic media - IOPscience». Accedido: 23 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6501/ab8430/meta>
- [92] «Probing bio-tissue films by optical internal reflectivity: modeling and measurements». Accedido: 23 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://opg.optica.org/ao/fulltext.cfm?uri=ao-60-27-8588&id=459218>
- [93] A. Acevedo-Barrera, O. Vázquez-Estrada, y A. García-Valenzuela, «Optical reflectivity of an interface with random refractive-index-contrast patterns», *Appl. Opt.*, vol. 59, n.º 13, pp. D221-D229, may 2020, doi: 10.1364/AO.383166.
- [94] «Inicio. Atlas de histología Vegetal y Animal». Accedido: 16 de junio de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- [95] M. Megias, P. Molist, y M. A. Pombal, «EPITELIOS de REVESTIMIENTO».
- [96] A. L. García-López, E. A. Uria-Galicia, y E. Ortiz-Ordoñez, «Estudio Histológico de Boca, Esófago, Estómago e Intestino de *Polystira albida* (Gastropoda: Turridae)», *Int. J. Morphol.*, vol. 25, n.º 4, pp. 767-774, dic. 2007, doi: 10.4067/S0717-95022007000400015.

- [97] «Tejido epitelial | Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular, 2e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical». Accedido: 16 de junio de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1506§ionid=98182304>
- [98] «UV fluorescence excitation imaging of healing of wounds in skin: Evaluation of wound closure in organ culture model - PubMed». Accedido: 23 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27075645/>
- [99] E. Gutierrez-Herrera, A. E. Ortiz, A. Doukas, y W. Franco, «Fluorescence excitation photography of epidermal cellular proliferation», *Br. J. Dermatol.*, vol. 174, n.º 5, pp. 1086-1091, may 2016, doi: 10.1111/bjd.14400.
- [100] W. Lohmann y E. Paul, «In situ detection of melanomas by fluorescence measurements», *Naturwissenschaften*, vol. 75, n.º 4, pp. 201-202, abr. 1988, doi: 10.1007/BF00735581.
- [101] N. Ramanujam *et al.*, «Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths», *Photochem. Photobiol.*, vol. 64, n.º 4, pp. 720-735, oct. 1996, doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb03130.x.
- [102] M. Fischer, M. Wahl, y G. Friedrichs, «Design and field application of a UV-LED based optical fiber biofilm sensor», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 33, n.º 1, pp. 172-178, mar. 2012, doi: 10.1016/j.bios.2011.12.048.
- [103] B. Segura Giraldo, «Espectroscopía óptica de fluorescencia aplicada al soporte de diagnóstico médico de precánceres de tejidos de cuello uterino», 2009, Accedido: 23 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/7031>
- [104] «(PDF) Simulador Monte Carlo Para El Estudio De La Propagación De La Luz En El Tejido». Accedido: 23 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/234064704_Simulador_Monte_Carlo_Para_El_Estudio_De_La_Propagacion_De_La_Luz_En_El_Tejido
- [105] J. Campoy, R. Alcarria, y A. P. González-Marcos, «Study of the optical behavior of skins using Monte Carlo techniques», *Rev. Int. Méto. Numér. Para Cálculo Diseño En Ing.*, vol. 31, n.º 3, sep. 2015, doi: 10.1016/j.rimni.2014.04.004.
- [106] H. Contreras-Tello y A. García-Valenzuela, «Refractive index measurement of turbid media by transmission of backscattered light near the critical angle», *Appl. Opt.*, vol. 53, n.º 21, pp. 4768-4778, jul. 2014, doi: 10.1364/AO.53.004768.
- [107] A. García-Valenzuela y H. Contreras-Tello, «Optical model enabling the use of Abbe-type refractometers on turbid suspensions», *Opt. Lett.*, vol. 38, n.º 5, pp. 775-777, mar. 2013, doi: 10.1364/OL.38.000775.
- [108] E. Hecht, *Optics*. Pearson Education, Incorporated, 2017.

- [109] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics*. Wiley, 2012.
- [110] M. Born y E. Wolf, *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. CUP Archive, 2000.
- [111] W. Wang y C. Li, «Measurement of the light absorption and scattering properties of onion skin and flesh at 633nm», *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 86, pp. 494-501, dic. 2013, doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.07.032.
- [112] E. Novoa-Ortega, M. Dubnicka, y W. B. Euler, «Structure–Property Relationships on the Optical Properties of Rhodamine Thin Films», *J. Phys. Chem. C*, vol. 124, n.º 29, pp. 16058-16068, jul. 2020, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c05139.
- [113] Y. Lu y A. Penzkofer, «Absorption behaviour of methanolic rhodamine 6G solutions at high concentration», *Chem. Phys.*, vol. 107, n.º 2, pp. 175-184, sep. 1986, doi: 10.1016/0301-0104(86)85002-9.
- [114] C. Cai, X. Han, X. Niu, y W. Liu, «Research on Optical Properties and Micro-processing Characteristics of Collodion Thin Film», *Def. Technol.*, vol. 9, n.º 3, pp. 167-170, sep. 2013, doi: 10.1016/j.dt.2013.09.017.
- [115] «The Chemistry of Nail Polish - Polymers, Plasticisers and Pigments | SciTech Connect». Accedido: 6 de abril de 2021. [En línea]. Disponible en: <http://scitechconnect.elsevier.com/chemistry-nail-polish-polymers-plasticisers-pigments/>, <http://scitechconnect.elsevier.com/chemistry-nail-polish-polymers-plasticisers-pigments/>
- [116] M. Nandimath, R. F. Bhajantri, y J. Naik, «Spectroscopic and color chromaticity analysis of rhodamine 6G dye-doped PVA polymer composites for color tuning applications», *Polym. Bull.*, vol. 78, n.º 8, pp. 4569-4592, ago. 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03332-y.
- [117] T. D. Ebralidze, N. A. Ebralidze, y E. S. Kitsmarihvili, «Anisotropic photoinduction in Rhodamine 6G dye-painted gelatin film», *Appl. Opt.*, vol. 46, n.º 33, pp. 7993-7996, nov. 2007, doi: 10.1364/AO.46.007993.
- [118] L. Deng *et al.*, «Controllable growth of substrate-scale 2D ReSe₂ thin films and their application for molecular detection via the SERS technique», *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 24, n.º 23, pp. 14479-14487, 2022, doi: 10.1039/D2CP01215D.
- [119] F. Brehat y B. Wyncke, «Calculation of the refractive indices and direction of refracted rays as functions of the angle of incidence, in uniaxial and biaxial crystals», *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 26, n.º 2, pp. 293-301, feb. 1993, doi: 10.1088/0022-3727/26/2/018.
- [120] G. D. Landry y T. A. Maldonado, «Complete method to determine transmission and reflection characteristics at a planar interface between arbitrarily oriented biaxial media», *JOSA A*, vol. 12, n.º 9, pp. 2048-2063, sep. 1995, doi: 10.1364/JOSAA.12.002048.

- [121] V. Twersky, «Interface Effects in Multiple Scattering by Large, Low-Refracting, Absorbing Particles*», *JOSA*, vol. 60, n.º 7, pp. 908-914, jul. 1970, doi: 10.1364/JOSA.60.000908.
- [122] L. D. Landau, E. M. Lifshitz, V. B. Berestetskii, y L. P. Pitaevskii, *Física teórica. Electrodinámica de los medios continuos*. Reverte, 2021.
- [123] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics*. John Wiley & Sons, 2021.
- [124] E. Hecht, *Optics*. Pearson Education, Incorporated, 2017.
- [125] G. M. Hale y M. R. Querry, «Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- μ m Wavelength Region», *Appl. Opt.*, vol. 12, n.º 3, p. 555, mar. 1973, doi: 10.1364/AO.12.000555.
- [126] «Propidium Iodide - MX». Accedido: 1 de junio de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>
- [127] G. Morales-Luna, H. Contreras-Tello, A. García-Valenzuela, y R. G. Barrera, «Experimental Test of Reflectivity Formulas for Turbid Colloids: Beyond the Fresnel Reflection Amplitudes», *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, n.º 3, pp. 583-595, ene. 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b10814.
- [128] A. O. González, A. I. C. Martínez, y T. I. Selva, «Manejo de la biopsia selectiva del ganglio centinela en melanoma en el laboratorio de anatomía patológica: preanalítica y analítica», *Arch. Patol.*, vol. 1, n.º 3, Art. n.º 3, jun. 2020, Accedido: 24 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://archivosdepatologia.com/index.php/ArchPat/article/view/28>
- [129] «Applications and future directions for optical coherence tomography in dermatology* | British Journal of Dermatology | Oxford Academic». Accedido: 24 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://academic.oup.com/bjd/article/184/6/1014/6697827?login=true>
- [130] «Characterization and ex vivo evaluation of excised skin samples as substitutes for human dermal barrier in pharmaceutical and dermatological studies - Kocsis - 2022 - Skin Research and Technology - Wiley Online Library». Accedido: 24 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/srt.13165>
- [131] A. Dubois, «Line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) for dermatology», en *Biophotonics Congress: Optics in the Life Sciences 2023 (OMA, NTM, BODA, OMP, BRAIN) (2023)*, paper DTu2A.1, Optica Publishing Group, abr. 2023, p. DTu2A.1. doi: 10.1364/BODA.2023.DTu2A.1.