



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS INGENIERÍA DE LOS MATERIALES

ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS OBTENIDAS  
MEDIANTE ÓPTICA NO LINEAL EN LOS REGÍMENES  
CLÁSICO Y CUÁNTICO

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE LOS MATERIALES

P R E S E N T A :

DANYELA ALEJANDRA LUENGAS NOVA

TUTOR

DR. ALFRED U'REN CORTÉS  
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2022





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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**Posgrado en Ciencias e Ingeniería de Materiales - UNAM**

**INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES**

*“Análisis de muestras biológicas obtenidas mediante óptica no lineal en los regímenes clásico y cuántico”*

**TESIS:**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS E  
INGENIERÍA DE MATERIALES**

**PRESENTA**

**DANYELA ALEJADRA LUENGAS NOVA**

**TUTOR PRINCIPAL**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. U'Ren'.

**DR. ALFRED BARRY U'REN CORTÉS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES**

**COMITE TUTOR**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Hector Cruz Ramirez'.

**DR. HECTOR CRUZ RAMIREZ**

**INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jesús Garduño Mejía'.

**DR. JESÚS GARDUÑO MEJÍA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA**

**CIUDAD DE MÉXICO, a 1 de Agosto de 2022**



*« La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10 más.»*

George Bernard Shaw



# Resumen

En este trabajo se estudió procesos ópticos no lineales de segundo orden como lo son: la generación del segundo armónico (SHG, por sus siglas ingles ) y la conversión paramétrica descendente espontánea (SPDC, por sus siglas en ingles) en muestras biológicas de tendón porcino y en el almidón de fécula de maíz.

El SHG es un proceso no lineal de segundo orden que surge en materiales que presentan una  $\chi^2$  y ocurre en la presencia de estructuras moleculares no centro simétricas, su visualización ha permitido la detección de diversas enfermedades como el cáncer [1], el deterioro de los tejidos por la edad [2] o daños mecánicos presentes en las muestras [3], [4]. El SHG es un proceso sensible a la polarización [5] por lo tanto, aquí presentamos un sistema óptico de un microscopio de campo amplio, el cual facilita el estudio y caracterización de la sensibilidad de las muestras. Además de un estudio comparativo de imágenes captadas de SHG con un microscopio confocal marca Zeiss, ambos sistemas ópticos (el microscopio confocal y el sistema casero") son comparados en términos de la definición de la imagen.

La segunda parte de este trabajo corresponde a la detección de coincidencias en parejas de fotones en tejidos de cerdo y en fécula de maíz. Aquí se presenta que no es posible detectar dicha señal o la visualización de este fenómeno para el sistema experimental propuesto en dos longitudes de onda diferentes.



# Agradecimiento

Me gustaría expresar mi gratitud a mi director, el Dr. Alfred U´ren por su motivación, confianza y acompañamiento en este proceso, por aceptar la iniciativa de trabajar conmigo y permitirme ser parte de su equipo de investigación en el laboratorio de óptica Cuántica.

Enseguida quiero agradecer al Dr.Hector Cruz Rámirez por su apoyo conmigo y su compromiso como técnico del laboratorio con todo lo que ello implica, expreso mi total gratitud hacia él, quien hizo posible este trabajo, por todas sus sugerencias e ideas que lo mejoraron de inicio a fin, y especialmente por su atención y tiempo. Así mismo agradezco el apoyo y la paciencia de Zeferino y Tonatiuh por enseñarme a ser una mejor experimentalista cada día.

Quiero darle las gracias al Dr. Roberto Rámirez por darme la oportunidad de una estancia corta en el Centro de investigaciones ópticas CIO. Tiempo en el que por condiciones de la pandemia no se podía ingresar al ICN.

Dedico un párrafo para agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología CONACYT por el financiamiento de la beca de maestría.

Por último siendo lo más importante para mi, agradezco el apoyo incondicional de mis padres, hermanos, tía y padrino por creer en mi en todo momento y ser el motor que me impulsa a crecer cada día.



# Índice general

<b>Resumen</b>	v
<b>Agradecimiento</b>	vii
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Marco teórico</b>	5
2.1. Óptica no lineal	5
2.1.1. Procesos no lineales de segundo orden	5
2.2. <b>Generación del segundo armónico (SHG)</b>	7
2.2.1. Técnicas para el análisis de segundo armónico	8
2.2.2. Parámetros de Stokes	11
2.2.3. Ventajas de SHG sobre otras técnicas	13
2.3. Calidad de la imagen	13
2.3.1. Resolución	13
2.3.2. Apertura numérica	15
2.3.3. La Magnificación	15
2.4. <b>Proceso de Conversión Paramétrica Descendente (SPDC)</b>	15
2.5. Descripción cuántica del proceso SPDC	20
2.5.1. Cuentas accidentales	22
<b>3. Antecedentes Experimentales</b>	25
3.1. Equipo para el montaje experimental	25
<b>4. Medición del Segundo Armónico (SHG) detectado en longitud de onda de 810nm</b>	29
4.1. Montaje Experimental	29
4.1.1. Microscopio de campo amplio	29
4.2. Caracterización del SHG	30
4.2.1. <b>Espectro de la luz colectada de SGH</b>	30
4.3. Comparativo de resolución de la imagen	31
4.3.1. <b>Tejido de cerdo</b>	31
4.3.2. <b>Fécula de maíz</b>	32
4.4. <b>Análisis de Polarización del SGH en tejido de cerdo y fécula de maíz</b>	34

4.4.1. Tejido de cerdo	34
4.4.2. Fécula de Maíz	36
4.5. Análisis de la Orientación de las Fibrillas	37
4.6. Parámetros de Stokes	38
<b>5. Generación de SHG con bombeo en longitud de onda del 1550nm</b>	<b>43</b>
5.1. Montaje Experimental de la detección de SHG	43
5.2. Mediciones del SHG para el tejido de cerdo	44
5.2.1. Polarización del Tejido	45
5.3. Mediciones del SHG en la fécula de maíz	47
<b>6. Medición de la Conversión paramétrica descendente espontánea (SPDC) usando un bombeo de 405nm</b>	<b>49</b>
6.1. Montaje Experimental	49
6.1.1. Registro de cuentas simples en la detección de SPDC	49
6.1.2. Detección de espectros de cuentas en coincidencias de fotones	50
6.2. Medición de espectros ópticos diferentes al SPDC	51
6.3. Filtrado de luz	53
6.3.1. Señales emitidas con BBO	53
6.3.2. Señal emitida por el tejido y la fécula de maíz	55
<b>7. Medición de SPDC en frecuencias del infrarojo</b>	<b>59</b>
7.1. Montaje Experimental de la detección de SPDC	59
7.2. Resultados de la detección de SPDC	60
<b>8. Conclusiones</b>	<b>63</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>64</b>

# 1 Introducción

El colágeno es una proteína presente en tejidos como la piel, los tendones y los huesos; su estructura interna se compone de diversas fibras o cadenas llamadas polipéptidos, las cuales presentan una forma helicoidal [6]. Según su estructura se pueden diferenciar genéticamente cuatro tipos de colágeno: El colágeno tipo I se localiza en la piel, tendones y huesos; las fibras presentes en este tipo de colágeno son de mayor grosor comparado con el colágeno tipo II el cual se encuentra en cartílagos hialinos; el colágeno tipo III esta presente en la piel, arterias y útero. Por último, el colágeno tipo IV es abundante en la piel y en las membranas basilares, este permite la detección de enfermedades neuromusculares o defectos macroestructuales de las fibras [7].

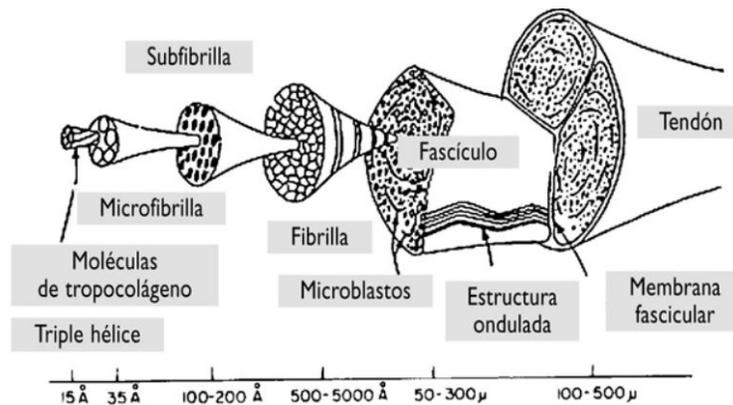


Figura 1.1: Escalas de las partes tendón Tomado [8]

Los tendones poseen tamaños del orden de los 100 a los 500 micrómetros; el grosor de las fibras varía en el rango de 50 a 500 nm [9], las cuales están compuestas de moléculas de colágeno en ordenes inferiores y componen las fibras de colágeno las cuales están en rangos de 50 a 300 micrometros, por lo tanto es posible verlas con luz visible, usar fenómenos ópticos para su visualización.

La generación de segundo armónico fue reportada por primera vez en 1961, en este experimento utilizó un haz láser de Rubi con una longitud de onda de 694 nm sobre un material de cuarzo, como resultado de la incidencia de esta luz obtuvieron un espectro con el doble de la frecuencia, es decir con una longitud de onda de 347 nm [10]. Posteriormente en 1962 se describió este fenómeno usando las ecuaciones de

Maxwell en materiales, lo cual permitió explicar el comportamiento no lineal de la luz. [11].

Así mismo, el estudio escrito por Fine y Hansen [12], publicado en 1971, es uno de los primeros en reportar que los tejidos presentaban una estructura no centro simétrica por lo tanto poseían propiedades que favorecían la generación de fenómenos ópticos no lineales. Por otra parte, en 1986 Freund obtuvo imágenes de tendón de ratón utilizando la SHG con un microscopio de barrido [13].

Sin embargo, fue hasta el inicio del siglo XXI que se hace intensivo el uso de SHG para visualizar la estructura de muestras biológicas, con la estructura de los tejidos se hace un análisis cualitativo y cuantitativo para extraer las características micro y macroestructurales del mismo. El estudio del colágeno presente en los tejidos ha permitido a los investigadores reconocer enfermedades que corresponden a diversos trastornos en la síntesis de éste. La manera de identificar el tipo de enfermedad es realizar un análisis de imágenes respecto a la orientación de las fibras del colágeno, es decir que un patrón anómalo es asociado a enfermedades o daños mecánicos presentes en estas, debido a la desorganización de las cadenas polipeptidas [3], [4], [14]. Además, con los patrones de regularidad se han analizado propiedades mecánicas.

Actualmente, en la literatura se han reportado alrededor de cinco (5) técnicas para la caracterización de muestras de tejidos mediante la señal de la SHG como lo son: la polimetría [15], la transformada de Fourier [4], [14], el análisis de intensidades de píxeles [16], el análisis de imágenes por textura y técnicas de Machine learning [17] que permiten identificar anomalías presentes en el colágeno. Con las imágenes de la SHG, se ha visualizado las redes de colágeno de tejido blando a nivel micro estructural [16] [18], al igual que técnicas como la microscopía de luz polarizada convencional [18], [16], [17] o el análisis de tejidos usando microscopía electrónica de barrido [14], [2].

La visualización de la señal de SHG de los tejidos por lo regular se hace utilizando microscopios de barrido o multifotónicos, sin embargo en este proyecto se construyó un montaje experimental que detecta dicha señal, con el interés de obtener y caracterizar la respuesta de polarización del SHG. Así mismo, con el interés de caracterizar los tejidos biológicos se construyó un segundo montaje experimental que corresponde al proceso inverso del SHG y es la conversión paramétrica descendente espontánea (SPDC, por sus siglas en inglés) este es un proceso óptico no lineal en el que un fotón de bombeo (de mayor energía) es aniquilado dando origen a una pareja de fotones (fotón señal y fotón acompañante) de menor energía, siendo un proceso importante en óptica cuántica, con una gran variedad de aplicaciones, como lo son la criptografía [19], teleportación [20,21] y metrología cuántica [22,23].

Uno de los primeros estudios realizados para la obtención de imágenes por parejas de fotones fue reportado en 1995 por Pittman [24], en este trabajo utilizan un cristal no lineal de borato de bario (BBO) que se corta en un ángulo para que cumpla las condiciones de phase matching tipo II y un divisor de luz polarizado (PBS, por sus siglas en inglés) el cual envía la pareja de fotones en dos caminos diferentes (señal

y acompañante), cada uno con diferente polarización para que se puedan registrar coincidencias de fotones entre dos detectores de conteo de fotones individuales al final de cada camino.

El enredamiento de un estado de dos fotones es análogo al discutido en el famoso artículo de la paradoja EPR escrito por Einstein, Podolsky, y Rosen en 1935. [25], el cual habla de la incompletes de la mecánica cuántica y como una medida en una región A puede alterar instantáneamente la realidad física en otra región B, aunque A y B no interactúen entre si por ningún medio conocido.

Actualmente, existen pocos reportes donde los fotones de SPDC interactúan con las muestras biológicas. El primer trabajo reportado fue por Ono, Okamoto y Takeuchi [26] en 2016, aquí presentan la preservación del entrelazamiento de fotones en la polarización, creado por SPDC, después de que un fotón entrelazado se propaga a través de cortes de tejido cerebral con diferentes espesores. Los autores resaltan que los efectos cuánticos proporcionados por las parejas de fotones pueden alcanzar sensibilidades que solo se logran con efectos cuánticos, como mejoras en la resolución de imágenes por debajo del límite de la longitud de onda clásica, es decir, que la luz cuántica ofrece beneficios sobre las fuentes de luz clásicas al proporcionar un medio para mejorar la resolución de imágenes y sensibilidad de la medición [27]. Sin embargo a la fecha no hay una referencia sobre la generación de fotones de SPDC provenientes del colágeno

Se ha reportado que una de las ventajas del SHG en muestras biológicas es que las fibras al ser una fuente de luz mejoran la resolución de las imágenes [28], por lo tanto, con el SPDC se esperaría un aumento en la resolución de las imágenes para identificar de manera satisfactoria la orientación de las fibrillas. El SPDC se caracteriza por ser una técnica de visualización de imágenes no invasiva, además que para su generación no es necesario utilizar un láser pulsado debido a que es un proceso espontáneo. Como ya se menciona no hay un estudio preliminar donde se mencione el colágeno como una fuente de SPDC, también es un proceso óptico de segundo orden por lo que en este trabajo se buscó generar y detectar parejas de fotones generados por la muestra de tejido y la fécula de maíz.



## 2 Marco teórico

En este capítulo se presenta una descripción de los procesos de óptica no lineal como lo son: la generación del segundo armónico (SHG) y la conversión paramétrica descendente espontánea (SPDC).

### 2.1. Óptica no lineal

La óptica no lineal, es una rama de la física que estudia fenómenos de interacción de materia con luz. Este proceso físico ocurre cuando una onda electromagnética  $\tilde{\mathbf{E}}(t)$  interactúa con los átomos de un material, como respuesta se produce una distribución de carga dentro del mismo, generando una polarización inducida  $\tilde{\mathbf{P}}(t)$ . La forma de la polarización para un campo óptico está expresada en serie de potencias de  $\mathbf{E}(t)$  como:

$$\tilde{\mathbf{P}}(t) = \epsilon_0[\chi^{(1)}\tilde{\mathbf{E}}(t) + \chi^{(2)}\tilde{\mathbf{E}}^2(t) + \chi^{(3)}\tilde{\mathbf{E}}^3(t) + \dots], \quad (2.1)$$

donde  $\epsilon_0$  es la permitividad del vacío,  $\chi^{(1)}$  es conocida como la susceptibilidad lineal, las constantes de proporcionalidad  $\chi^{(2)}$  y  $\chi^{(3)}$  son conocidas como los tensores de las susceptibilidades de segundo y tercer orden, respectivamente.

Aquí el sistema no presenta pérdidas, debido a que la polarizabilidad a un tiempo  $t$  depende solo del valor instantáneo de  $\tilde{\mathbf{E}}(t)$ . Sin embargo, las susceptibilidades no lineales dependen de la frecuencia de los campos aplicados, pero bajo la aproximación de respuesta instantánea, estas pueden tomarse como constantes. La ecuación de onda que describe a un medio óptico no lineal homogéneo puede ser escrita como

$$\nabla^2\tilde{\mathbf{E}} - \frac{n^2}{c^2}\frac{\partial^2\tilde{\mathbf{E}}}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2}\frac{\partial^2\tilde{\mathbf{P}}^{NL}}{\partial t^2}, \quad (2.2)$$

donde  $n$  es el índice de refracción lineal y  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío. El término  $\frac{\partial^2\tilde{\mathbf{P}}^{NL}}{\partial t^2}$  es el término que genera la radiación electromagnética.

#### 2.1.1. Procesos no lineales de segundo orden

La respuesta no lineal de segundo orden puede representarse de la siguiente forma: un campo eléctrico  $\vec{E}$  compuesto por dos frecuencias  $\omega_1$  y  $\omega_2$ , interacciona con un

material y genera una respuesta no lineal en el vector de polarizabilidad  $\vec{P}$ , el cual viene dado como una onda descrita por:

$$\tilde{\mathbf{E}}(t) = \mathbf{E}_1 e^{-i\omega_1 t} + \mathbf{E}_2 e^{-i\omega_2 t} + c.c.,$$

donde c.c. indica complejo conjugado. Asumiendo que en la ecuación (2.1) la contribución de segundo orden a la polarización no lineal de segundo orden es:

$$\tilde{\mathbf{P}}^2(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} \tilde{\mathbf{E}}^2(t), \quad (2.3)$$

tenemos que el vector de polarización no lineal viene dado por:

$$\begin{aligned} \tilde{\mathbf{P}}^2(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} & [\mathbf{E}_1^2 e^{-2i\omega_1 t} + \mathbf{E}_2^2 e^{-2i\omega_2 t} + 2\mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 e^{-i(\omega_1 + \omega_2)t} \\ & + 2\mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2^* e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} + c.c.] + 2\epsilon_0 \chi^{(2)} [\mathbf{E}_1 \mathbf{E}_1^* + \mathbf{E}_2 \mathbf{E}_2^*]. \end{aligned}$$

El primer y segundo término de la ecuación (2.4) se pueden identificar como los correspondientes al fenómeno denominado generación de segundo armónico (SHG). Mientras que el proceso asociado al tercer término es llamado generación de suma de frecuencias (SFG). El cuarto término corresponde a la generación de diferencia de frecuencias (DFG) y el último al proceso de rectificación óptica (OR), el cual es un proceso no radiativo que genera un campo eléctrico estático en el material no lineal [29].

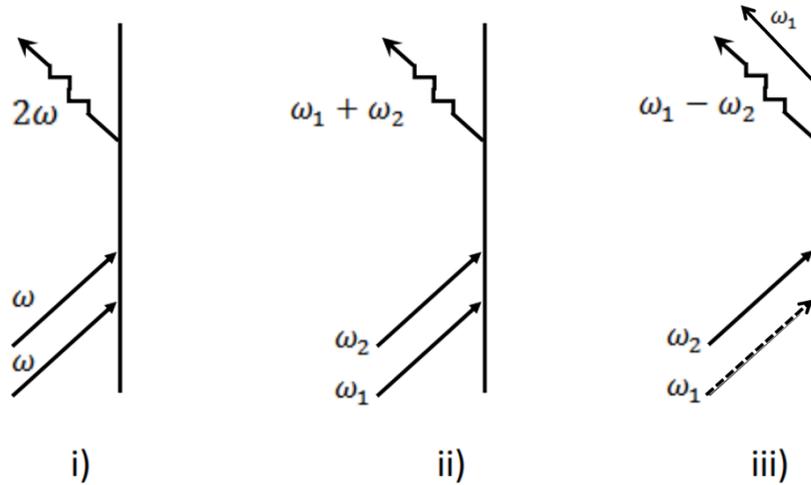


Figura 2.1: Diagramas de Feynman para procesos no lineales de segundo orden. (i) Generación de segundo armónico. (ii) Generación de suma de frecuencias. (iii) Generación de diferencia de frecuencias.

La generación de nuevas frecuencias a través de procesos no lineales puede ser representada por medio de diagramas de Feynman [30], ver Fig. 2.1, que involucran los tres fotones. En la generación de segundo armónico, dos fotones entrantes de la

misma frecuencia  $\omega$  son aniquilados mientras que un fotón es creado con el doble de frecuencia  $2\omega$ . En la generación de suma de frecuencias, dos fotones entrantes con frecuencias  $\omega_1$  y  $\omega_2$ , son aniquilados mientras que un fotón con frecuencias  $\omega_1 + \omega_2$  es creado. En el proceso de generación de diferencia de frecuencias, los dos fotones con frecuencias  $\omega_1$  y  $\omega_2$  dan lugar a un fotón que emerge con una frecuencia de  $\omega_1 - \omega_2$ .

Analizando el diagrama de energías del proceso de generación de diferencia de frecuencias, mostrado en la Fig. 2.2, tenemos que el átomo absorbe un fotón de frecuencia  $\omega_1$  y es llevado a un estado virtual, para posteriormente decaer emitiendo dos fotones, por el proceso emisión estimulada debido a la presencia de un fotón con frecuencia  $\omega_2$ . La emisión de estos dos fotones puede ocurrir incluso si el fotón de frecuencia  $\omega_2$  no es aplicado [29]. La generación de esta pareja de fotones es un caso mucho menos eficiente, debido a que son creados a partir de un proceso de emisión espontánea que decaen de un nivel virtual.

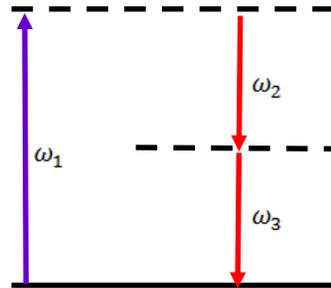


Figura 2.2: Diagrama de energías para el proceso no lineal DFG.

## 2.2. Generación del segundo armónico (SHG)

La generación del segundo armónico es un proceso de óptica no lineal clásico en el que obtenemos fotones del doble de la frecuencia o la mitad de la longitud de onda de los fotones de bombeo como respuesta de segundo orden a la perturbación de un campo eléctrico externo.

La generación del segundo armónico se produce en materiales no lineales o que presentan una no-centrosimetría en su distribución molecular, donde se ve afectada la susceptibilidad  $\chi^{(2)}$  de segundo orden.

La relación entre las intensidades de los fotones de segundo armónico y de los fotones del bombeo, se describe por medio de una relación cuadrática, así:

$$I_{2\omega} = AI_{\omega}^2, \quad (2.4)$$

donde A una constante de proporcionalidad, por lo tanto, la intensidad en función

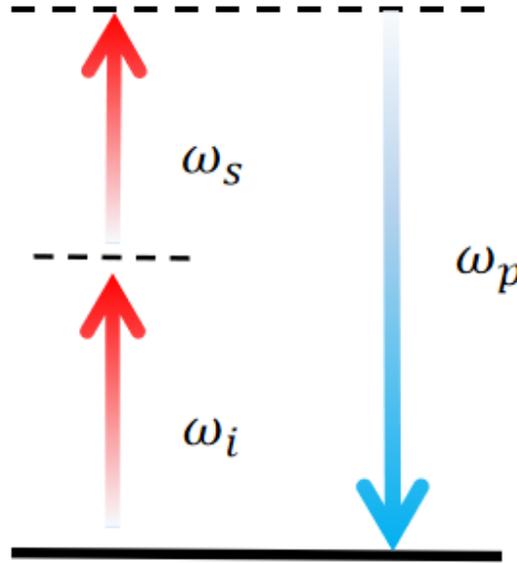


Figura 2.3: diagrama energético

de la longitud del medio está dada por la siguiente expresión

$$I_{2\omega}(L) = A \left( \frac{\omega \chi_{ef}^2}{n_{2\omega} c} \right) I_{\omega}^2 \sin^2 \frac{L \Delta k}{2}, \quad (2.5)$$

donde  $\omega$  es la frecuencia angular de la onda incidente,  $\chi_{ef}^2$  es la susceptibilidad efectiva de segundo orden del material,  $n_{2\omega}$  es el índice de refracción del medio a la frecuencia  $2\omega$  y  $\Delta k = k_{2\omega} - 2k_{\omega}$  es la diferencia de las magnitudes de los vectores de onda del haz incidente y el haz del SHG, siendo  $2k_{\omega} = \frac{n\omega}{c}$  el vector de onda de la luz incidente y  $k_{2\omega}$  el vector de onda del SHG, este último término es el resultado del desfaseamiento entre las ondas de segundo armónico que se generan a través del medio no-lineal de longitud  $L$  y que se propagan de forma colineal con la onda incidente.

### 2.2.1. Técnicas para el análisis de segundo armónico

En la literatura de microscopía se han reportado diversas técnicas para análisis de imágenes obtenidas con segundo armónico como lo son: la polarimetría, el análisis de transmisión y reflexión de la luz, análisis de intensidades, la transformada de Fourier y Machine learning. A continuación, se presenta una breve descripción de cada una de estas, empleada para el análisis de muestras biológicas

#### 1. La polarimetría

Es una técnica que estudia la respuesta de emisión conforme se rota la polarización del haz incidente, con esta se cuantifica la organización de las fibras [15]

La polarización es una propiedad de la luz que describe como es su forma y la orientación en un lugar geométrico en función del tiempo para un punto

fijo en el espacio. Cuando la luz es refractada en la interfaz de dos medios o reflejada sobre una superficie, el estado de polarización cambia, por lo tanto si la luz esta polarizada esta presenta o describe una curva estacionaria en un tiempo determinado con una orientación y forma definida, por el contrario si su trayectoria es aleatoria en función del tiempo se dice que esta luz no está polarizada.

## 2. **SGH en dirección Forward and Backward de la luz emitida por un tejido biológico.**

Los tejidos tienen propiedades ópticas de esparcimiento, absorción, y emisión de luz. El método de transmisión y reflexión de la luz es una esparcimiento de luz que producen los tejidos, el cual consiste en medir la intensidad relativa de las señales de SHG en la dirección del bombeo y en la dirección backward o la epi-dirección como nombran algunos autores. La transmisión ocurre en la dirección axial del tejido; por el contrario, la reflexión de la luz se da en las direcciones donde alcanza el ángulo sólido. [31].

Esta técnica permite obtener el tamaño de las fibrillas. Se ha reportado que si el tamaño axial es mayor a la longitud de onda del SHG ( $R_{axial} > \lambda_{SHG}$ ) la emisión es principalmente en transmisión, mientras que si el tamaño axial es menor a la longitud de onda  $R_{axial} \ll \lambda_{SHG}$  las emisiones de intensidad son en reflexión esto implica que las imágenes obtenidas de ambas direcciones llegan a mostrar grandes diferencias estructurales, lo que brinda información complementaria y permite diferenciar los tipos de colágeno [28].

Las fibras orientadas lateralmente aparecen principalmente en la dirección reflexión de la luz, mientras que las orientadas axialmente las fibras aparecen principalmente en la dirección transmisión [32]

## 3. **Análisis de intensidad transversal del SGH**

En un tejido de colágeno fibrilar, la intensidad de la señal de SHG total corresponde a la superposición de las intensidades de cada fibra, y la organización estructural del colágeno determina la eficiencia en la emisión de SHG, es por ello que la señal de SHG proporciona información sobre la orientación y la distribución de estas estructuras [28].

El análisis de intensidades es una técnica sencilla y la más reportada en la literatura en la que cada imagen es asociada a una escala de píxeles dependiendo de la intensidad de la luz, por ende es posible asociar una región de la muestra a una cantidad de colágeno [2], [16]. Esta técnica utiliza estadísticas como la media, la desviación estándar, la densidad integrada, la asimetría y la curtosis para su descripción; la asimetría evalúa cuantitativamente la falta de simetría de la forma de la distribución de las intensidades de los píxeles alrededor del valor medio de un histograma y la curtosis mide el pico de la distribución en relación con la longitud y el tamaño de las colas del histograma. Un ejemplo de

este análisis se presenta en los estudios de Raghu Ambekar, Tung Yuen y Kimani Toussaint [4], donde hacen uso de la estadística mencionada para determinar el ángulo de corte de tejidos (el cual depende de la dirección del colágeno), que inicialmente fueron cortados de manera arbitraria.

En este análisis también se determina una medida óptica como lo es el **Contraste** de la imagen el cual es el resultado de la interacción de una luz incidente con la muestra y se representa matemáticamente como el cociente entre el cambio de intensidad en una imagen y su intensidad promedio

$$\text{Contraste} = \frac{\Delta I}{\bar{I}} \quad (2.6)$$

#### 4. Transformada de Fourier

La transformada de Fourier es la transformación matemática de una función espacial o temporal al dominio de frecuencias la cual se define como:

$$\mathcal{F}[x(t)] = X(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)e^{-i\omega t} dt$$

Esta técnica para el análisis de imágenes de tejidos es la más utilizada y reportada en la literatura ya que es un complemento de las otras técnicas mencionadas para hacer una caracterización de las imágenes de forma efectiva, es decir, a partir de una imagen que se encuentra en dos dimensiones aplicar la transformada de Fourier reduce la dimensionalidad y permite obtener información como el ángulo de orientación de las fibras. Su sencillez radica en que su aplicación se hace mediante el uso de diferentes softwares escritos en Matlab o python como se reportan los trabajos de Mayandi Sivaguru y Sushmitha Durgam, [4] [7].

#### 5. Machine Learning

Es una técnica de análisis que consta de la construcción de una red la cual es similar a una red neuronal biológica, que se encarga de detectar patrones por medio de auto aprendizaje, es decir, su arquitectura inicia con una entrada la cual va corresponder a una variedad considerable de imágenes que pasa por un un sistema de nodos llamados neuronas conectadas e interactuando entre sí, cada una de estas capas extrae características de las imágenes de entrada para que luego una imagen de otro conjunto de datos pueda ser clasificado. La topología de la red o las conexiones entre los nodos está determinada por las conexiones entre las neuronas de diferentes capas, a cada conexión se le asigna un peso  $w$  se seleccionan durante el aprendizaje. El propósito del aprendizaje es ajustar los pesos para minimizar el error o función de costo entre la salida esperada y el valor resultante en la neurona de salida.

En muestras biológicas este análisis permite por medio de una red describir si un tejido presenta o no algún tipo de patología, al proveerse de una gran base de datos, sus diagnósticos alcanzan pronósticos con buena precisión alrededor del 80% [33] o el [34]

Sin embargo, para lograr esta clasificación es necesario utilizar un conjunto amplio de imágenes que se encargan de entrenar o alimentar la red para que esta logre clasificar posteriormente. [34]

Los algoritmos de Machine learning han permitido además del estudio e identificación de patologías en las muestras biológicas, el reconocimiento de propiedades elásticas del tejido de colágeno. En el trabajo realizado por Liang, Liu y Sun [34], el modelo entrenado es capaz de identificar la rigidez total del tejido con una precisión de clasificación del 84 %, y predecir las curvas de tensión y deformación anisotrópicas no lineales con errores de regresión promedio de 0.021 y 0.031. su algoritmo se basa en la arquitectura de redes convolucionales profundas, algoritmos que están basados en las librerías de Sklearn [35].

### 2.2.2. Parámetros de Stokes

Los parámetros de Stokes se utilizan para caracterizar la polarización de la luz, por lo tanto, en este trabajo se determinan los vectores de Stokes para investigar las propiedades de polarización de la luz SHG de una muestra biológica y en el almidón de fécula de maíz, donde la señal SHG se genera por la no centrosimetría de su estructura interna.

En 1852 George Gabriel Stokes propuso una descripción matemática de la radiación incoherente o parcialmente polarizada, en términos de su intensidad total (I), (parcial) grado de polarización (p) y los parámetros de forma de la elipse de polarización.

El campo eléctrico que viaja en dirección  $\hat{z}$  con componentes transversales  $\hat{x}$  y  $\hat{y}$  se representan como:

$$\begin{pmatrix} E_x(z, t) \\ E_y(z, t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(-kz + \delta_x) & 0 \\ 0 & \cos(-kz + \delta_y) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_{0x} \\ E_{0y} \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

siendo,  $E_{0x}$  y  $E_{0y}$  las amplitudes del campo eléctrico,  $\delta$  las fases, dada la propagación de campo se genera un vector que describe la propagación en el espacio para encontrar la curva elíptica se normalizan las componentes de campo eléctrico así:

$$\begin{pmatrix} \frac{E_x(z, t)}{E_{0x}} \\ \frac{E_y(z, t)}{E_{0y}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(-kz)(\delta_x) - \sin(-kz) \sin(\delta_x) & 0 \\ 0 & \cos(-kz)(\delta_y) - \sin(-kz) \sin(\delta_y) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

operando,

$$\frac{E_x^2}{E_{0x}^2} + \frac{E_y^2}{E_{0y}^2} - 2 \frac{E_x}{E_{0x}} \frac{E_y}{E_{0y}} \cos(\delta_y - \delta_x) = \sin(\delta_y - \delta_x)^2, \quad (2.9)$$

este comportamiento elíptico de la luz se denomina polarización óptica. Retomando la ecuación [2.9], la intensidad de campo esta descrita como:

$$\langle E_i(t) E_j(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T E_i(t) E_j(t) dt \quad (2.10)$$

integrando o promediando la forma elíptica [2.9](#) y multiplicando por  $4E_{0x}^2E_{0y}^2$  se tiene que

$$4E_{0y}^2 \langle E_x^2(t) \rangle + 4E_{0x}^2 \langle E_y^2(t) \rangle - 8E_{0x}E_{0y} \langle E_x(t)E_y(t) \rangle \cos(\delta_y - \delta_x) = (2E_{0x}E_{0y} \sin(\delta_y - \delta_x))^2 \quad (2.11)$$

aplicando [2.10](#) a [2.7](#)

$$\langle E_i(t)E_j(t) \rangle = \frac{1}{2}E_{0x}E_{0y} \cos(\delta_y - \delta_x) \quad (2.12)$$

sustituyendo [2.12](#) en [2.11](#) y completando los cuadrados

$$(E_{0x}^2 + E_{0y}^2)^2 - (E_{0x}^2 - E_{0y}^2)^2 - (2E_{0x}E_{0y} \cos(\delta_y - \delta_x))^2 = (2E_{0x}E_{0y}(\delta_y - \delta_x))^2 \quad (2.13)$$

y re acomodado términos podemos escribir los parámetros de Stokes  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  para un onda plana en términos de las intensidades como:

$$S_0 = E_{0x}^2 + E_{0y}^2 == E_x E_x^* + E_y E_y^*, \quad (2.14)$$

$$S_1 = E_{0x}^2 - E_{0y}^2 == E_x E_x^* - E_y E_y^*, \quad (2.15)$$

$$S_2 = 2E_{0x}E_{0y} \cos(\delta_y - \delta_x)2 == E_x E_y^* + E_y E_x^* \quad (2.16)$$

y

$$S_3 = 2E_{0x}E_{0y} \sin(\delta_y - \delta_x)2 == i(E_x E_y^* - E_y E_x^*), \quad (2.17)$$

donde,

$$S^2 = S_0^2 + S_1^2 + S_2^2 + S_3^2. \quad (2.18)$$

La generación de la señal SHG depende en gran medida del ángulo en que incide la luz polarizada y la alineación del colágeno. Esto permite cuantificar el ángulo de orientación de las fibras de colágeno [\[36\]](#). En microscopía SHG se hace el cálculo de Jones y se aplica para encontrar la birrefringencia lineal y la anisotropía rotando los estados de polarización de entrada y midiendo las intensidades SHG correspondientes [\[37\]](#). En algunos estudios se ha reportado la caracterización de la polarización que se obtiene de la distribución azimutal de las fibras de colágeno, además se presenta un análisis de la anisotropía (organización de las fibrillas de colágeno) e isotropía (desorganización de las fibrillas de colágeno) de muestras biológicas [\[1\]](#), en otro estudios se ha reportado la visualización de la distribución tridimensional de las fibras de tejido [\[5\]](#). El cambio de intensidad con la que se produce el SHG depende explícitamente de la polarización de la luz incidente sobre la muestra, donde la mayor intensidad en una escala de grises oscila entre una escala de píxeles del blanco (255) a el negro (0). En el trabajo realizado por Mostaçõ y Hackett TL [\[15\]](#) se muestra la dependencia de la intensidad de polarización como función del ángulo de polarización.

### 2.2.3. Ventajas de SHG sobre otras técnicas

- Es una técnica no invasiva, no foto tóxica, que no produce foto blanqueo [38]
- Sirve para sondear la macro estructura molecular.
- Preserva la coherencia del láser de bombeo debido a la capacidad intrínseca del seccionamiento óptico, lo que permite la construcción de imágenes en 3D con mayor profundidad [2].
- Permite la visualización de la estructura de la muestra mientras que otras técnicas de iluminación solo infieren con la estructura, ya que se basan en la absorción, mientras que con SHG son las propias fibras las que generan la luz [28].
- La señal de SHG generada por la muestra provee de información sobre la estructura y orientación molecular así como de la densidad de colágeno presente, lo cual brinda información sobre el estado de salud de los tejidos [34], [39].
- La señal de SHG es altamente dependiente de la orientación de las fibras respecto a la polarización de la luz incidente [40].
- El SHG tiene una ventaja sobre la fluorescencia, ya que esta última crea otros estados electrónicos excitados, por lo que los tejidos son expuestos a más calor lo que provoca un mayor deterioro de las estructuras. [41]

## 2.3. Calidad de la imagen

La calidad de la imagen es uno de los requerimientos claves en el análisis de imágenes biológicas debido a que las fibrillas de los tejidos son de tamaño de orden de los 50nm a 500 nm [9] y su organización es la que ha permitido diagnosticar patologías en los diferentes estudios [7], [4], [18], [1], entre otros. En la mayoría de estos utilizan microscopios de alta precisión [42] capaces de resolver estas fibrillas.

### 2.3.1. Resolución

La resolución de una imagen corresponde al número de píxeles utilizados para construir una imagen. A mayor número de píxeles presentes en una determinada cantidad de área, mayor será la resolución espacial [41].

Existen dos tipos de resoluciones: La resolución axial, la cual es la capacidad de discernir entre dos puntos paralelos a la trayectoria del haz de luz y la resolución la transversal la cual es la capacidad de discernir entre dos puntos perpendiculares a la trayectoria del haz de luz.

La resolución de dos puntos esta limitado por la distancia mínima  $\Delta l$  que se logra al resolverlos.

### Resolución axial

La resolución axial consiste en distinguir dos puntos que se encuentren paralelos a la trayectoria de la luz incidente corresponde a la resolución axial esta a su vez depende de tres factores como lo son: la longitud de onda o frecuencia, el ancho de banda y la longitud del pulso (una longitud de onda más corta puede diferenciar dos estructuras más fácilmente que una longitud de onda más larga). [43]

### Resolución transversal

La resolución lateral, o la capacidad de distinguir entre dos puntos en el plano perpendicular a la luz que incide, esta depende de: la frecuencia, el ancho del haz el ancho de banda y de la rejilla, De la misma forma que la resolución axial, una longitud de onda pequeña discernirá dos puntos más fácilmente que una longitud de onda más grande. De igual forma, un haz más enfocado (de tamaño de spot pequeño) puede distinguir dos puntos mejor que un haz de mayor diámetro. Una vez que se ha alcanzado el punto focal del rayo, el rayo comienza a diverger. La divergencia del haz aumenta el diámetro del spot de tal manera que las estructuras más profundas serán más borrosas y aparecen detalles más grandes que su ancho real. [41]

La resolución del objetivo de microscopio esta dada por la ecuación de Abbe:

$$d = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (2.19)$$

En 1873 Ernst Abbe [44] estableció el formalismo matemático que define el límite físico de la resolución óptica, aunque habían sido vislumbradas poco antes por Emile Verdet. Abbe determinó que que el limite de difracción de la luz, corresponde a la distancia mínima a la que dos puntos cercanos son distinguibles como independientes es tan grande como la mitad de la longitud de onda de la luz utilizada para observar la muestra. [44]

### Resolución de la cámara

La resolución de la cámara se define como la capacidad del sensor de la cámara para muestrear la imagen y el poder de resolución de una cámara científica depende completamente del tamaño del pixel y de cuánto se magnifica. La separación de características de una imagen requiere la presencia de al menos un pixel intermedio con un valor de intensidad diferente. Según el teorema de muestreo de Nyquist la mejor resolución espacial que se puede lograr requiere igualar la resolución limitada por difracción del microscopio a dos píxeles en el sensor. Esto se puede calcular usando la siguiente ecuación:

$$R_{cam} = \frac{\text{Tamaño Pixel}}{\text{Magnificación}}$$

### 2.3.2. Apertura numérica.

La apertura numérica del objetivo, contribuye a la resolución de una imagen y definida por la relación:

$$NA = n \sin \theta,$$

donde  $n$  es el índice de refracción del medio entre la lente y la muestra, y  $\theta$  es el semiángulo subtendido por la lente en su foco. Cuanto mayor sea el ángulo, mayor es la cantidad de luz se puede captar; por tanto, la apertura numérica es una medida de la resolución y de la capacidad de captación de luz del objetivo.

### 2.3.3. La Magnificación

La magnificación determina el tamaño de la imagen en el detector. Existe magnificación en la dirección transversal y magnificación en la dirección longitudinal; Para una lente simple, la magnificación en la dirección transversal viene dada por la relación negativa entre la distancia de la imagen y la distancia del objeto,  $M_{lente} = -\frac{di}{do}$ . El signo negativo explica la inversión de la imagen mediante una lente simple. La magnificación longitudinal, esta dado como el cuadrado del magnificación transversal  $M_{Tra} = -M^2$ .

La magnificación total  $M_T$  de la imagen en un microscopio óptico viene dado por el producto de los magnificación del objetivo y magnificación de los componentes posteriores al objetivo  $M_{sis}$ , así  $M_T = M_{obj} M_{sis}$ .

La magnificación se divide en magnificación útil y magnificación vacío del microscopio. La imagen que forma el microscopio fotónico compuesto posee características que permiten ver mayor cantidad de detalles de la misma. Se define como magnificación útil de un microscopio cuando al ampliar la imagen del objeto a través de un sistema óptico se distinguen una serie de detalles, es decir se resuelven mejor las estructuras. por otro lado, se define magnificación vacío de la imagen de un objeto, aquel que por más ampliación que se haga de la imagen, utilizando oculares de mayores magnificación, se llega a un punto en que ya no se logran distinguir más detalles

. [45]

## 2.4. Proceso de Conversión Paramétrica Descendente (SPDC)

El proceso de conversión paramétrica descendente espontánea (SPDC, por sus siglas en ingles), es un fenómeno de óptica no-lineal de segundo orden, en el que a partir de un fotón que incide sobre un material no lineal, se generan dos fotones donde la suma frecuencias corresponde a la frecuencia del fotón incidente.

En el fenómeno SPDC, un solo fotón de entrada de frecuencia  $\omega_1$ , llamado usualmente fotón de bombeo, interactúa con un cristal no lineal y es convertido en dos fotones con frecuencias menores  $\omega_2$  y  $\omega_3$ , llamados fotones señal (s) y acompañante (i). El efecto SPDC es un tipo especial de diferencia de frecuencias. En el proceso de generación

de diferencia de frecuencias, si el campo a la frecuencia  $\omega_2$  esta presente como campo de entrada, este estimula la generación de diferencia de frecuencias  $\omega_3 = \omega_1 - \omega_2$ , que resulta ser un proceso bastante eficiente llamado *oscilación paramétrica óptica*, un esquema de este proceso se muestra en la Fig. 2.2(a). Cuando no tenemos un campo de entrada a  $\omega_2$ , como se muestra en la Fig. 2.2(b), aún podemos obtener la generación de diferencia de frecuencias  $\omega_3 = \omega_1 - \omega_2$  acompañado por la generación de  $\omega_2$ . Sin embargo, en este caso la generación de diferencia de frecuencias es estimulada por un modo de vacío a la frecuencia  $\omega_2$  como campo de entrada y por consecuencia este proceso es bastante ineficiente. Este proceso de generación de diferencia de frecuencias  $\omega_3$  y  $\omega_2$  a partir de la frecuencia de entrada  $\omega_1$  es denominada fluorescencia paramétrica ó conversión espontánea paramétrica descendente [29]. La etiqueta espontánea se refiere a que el proceso es estimulado por un modo de vacío de frecuencia  $\omega_2$  como campo de entrada y la expresión paramétrica significa que la totalidad de la energía se conserva durante el proceso.

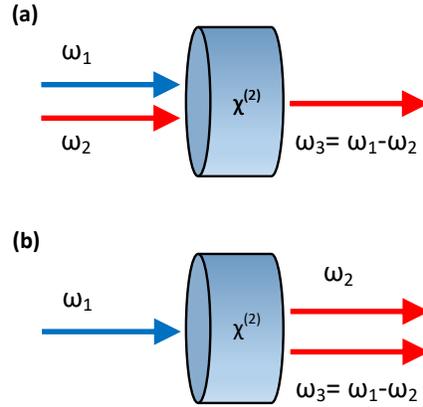


Figura 2.4: a) Proceso de generación de diferencia de frecuencias. b) Proceso de conversión espontánea paramétrica descendente.

Cada fotón producto de la conversión paramétrica descendente espontánea se encuentra correlacionados de manera: espacial, temporal, en frecuencia o polarización respecto de su par, donde cada pareja de fotón señal y acompañante obedece las leyes de conservación de momento y energía, que se expresan de la siguiente forma:

$$\omega_p = \omega_s + \omega_i, \quad (2.20)$$

$$\vec{k}_p = \vec{k}_s + \vec{k}_i, \quad (2.21)$$

donde,  $\omega$  es la frecuencia y  $\vec{k}$  es el vector de onda. Los subíndices  $p$ ,  $i$  y  $s$  hacen referencia a los fotones de bombeo, acompañante y señal, respectivamente. La ecuación (2.21) es llamada *condición de empatamiento de fase*, la cual determina la distribución espacial y espectral de los fotones SPDC. En la mayoría de los materiales el índice de refracción tiende a aumentar con la frecuencia, por debajo de la

## 2.4. PROCESO DE CONVERSIÓN PARAMÉTRICA DESCENDENTE (SPDC)17

frecuencia de resonancia, la conservación de energía (2.21) y la condición de empata-  
miento de fase (2.20) no pueden cumplirse simultáneamente en materiales isotrópicos  
que trabajan en el régimen de dispersión normal. Por lo tanto, La conservación de  
momento y energía, deriva el vector de onda  $k$ , frecuencia  $\nu = h\omega$  donde los fotones  
en un proceso SPDC pueden emerger degenerados si la frecuencia es la misma o no  
degenerados si es diferente, pero debe cumplir siempre que la suma en frecuencias de  
sus partes debe ser igual a la frecuencia de la luz de bombeo. Es de considerar que  
si el vector de onda  $k$  de los fotones es el mismo, la suma es el vector de onda del  
bombeo y los fotones son emitidos del cristal o la responsable de la generación del  
proceso SPDC en la forma de conos simétricos, ver imagen 2.6; en este caso todos los  
fotones de una misma longitud de onda son emitidos formando un cono coaxial con la  
dirección de propagación del haz de bombeo, en este proceso se conserva el momento  
lineal, angular y orbital. Al no suceder esto, es decir los vectores de onda tiene la  
misma polarización que el de bombeo, y ortogonal a la de su compañero, los conos  
resultan ser asimétricos, en este caso hay dos conos (no coaxiales) por cada longitud  
de onda, uno por cada polarización.

Estos fotones de salida forman dos conos coaxiales, en el caso de cristales de tipo I,  
o dos conos desplazados, para cristales de tipo II. [46]

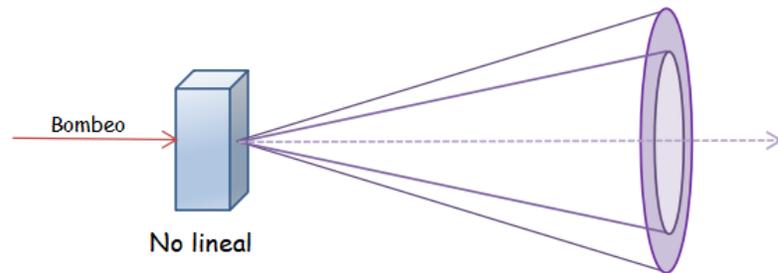


Figura 2.5: Condición de fase tipo I

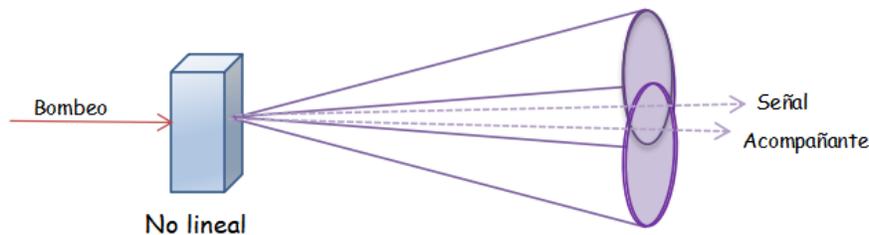


Figura 2.6: Condición de fase tipo II

Una de las propiedades más importantes de los cristales uniaxiales es el llamado  
eje óptico, que es la dirección de propagación de la onda incidente en la que el índice  
de refracción es independiente de la polarización. Existen dos tipos de rayos que se  
pueden propagar en un cristal uniaxial;

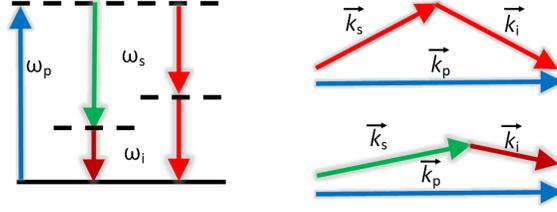


Figura 2.7: Conservación de la energía en el proceso de la conservación

- (i) Rayo ordinario linealmente polarizada perpendicular al plano formado por el eje óptico del cristal y la dirección de incidencia. A esto se le llama eje ordinario (*o*). En este caso, la luz atraviesa el cristal de forma esperada, cumpliendo con la ley de Snell y es su índice de refracción asociado a ella es  $n_o$ .
- (ii) Rayo extraordinario linealmente polarizada paralela al plano formado por el eje óptico del cristal y la dirección de incidencia, la cual es denominada luz extraordinaria y el índice de refracción extraordinario  $n_e$  depende del ángulo entre el vector de onda incidente y el vector del eje óptico del cristal.

Para este tipo de materiales si se cumple que  $n_o > n_e$ , entonces es denominado cristal uniaxial *negativo* y si  $n_o < n_e$  hablamos de un cristal uniaxial *positivo*. Si consideramos todos los escenarios de polarización posibles y factibles para los fotones de bombeo, señal y acompañante que pueden satisfacer la condición de empatamiento de fase para un cristal uniaxial que tiene dispersión normal (por ejemplo un cristal BBO), tenemos los siguientes escenarios:

Tipo	Cristal	$\omega_p$	$\omega_s$	$\omega_i$
Tipo I	Positivo	o	e	e
Tipo I	Negativo	e	o	o
Tipo II	Positivo	o	e	o
Tipo II	Positivo	o	o	e
Tipo II	Negativo	e	e	o
Tipo II	Negativo	e	o	e

Tabla 2.1: Distintas configuraciones de polarización de los fotones SPDC para un cristal uniaxial.

Los cristales BBO generan SPDC Tipo I obtenido de en un cristal uniaxial negativo. En SPDC Tipo I el haz de bombeo  $\vec{k}_p$  tienen polarización extraordinaria, mientras que los fotones generados  $\vec{k}_s$  y  $\vec{k}_i$  tienen polarización ordinaria. Entonces, tenemos que la conservación de momento se puede escribir como:

$$\Delta\vec{k} = \vec{k}_p^e(\omega_p) - \vec{k}_s^o(\omega_s) - \vec{k}_i^o(\omega_i), \quad (2.22)$$

## 2.4. PROCESO DE CONVERSIÓN PARAMÉTRICA DESCENDENTE (SPDC) 19

donde los superíndices  $e$  y  $o$  denotan polarización extraordinaria y ordinaria, respectivamente. Dado que la polarización del bombeo es extraordinaria, la magnitud de su vector de onda depende del ángulo formado entre la dirección de incidencia y el eje óptico, dicho ángulo es usualmente llamado ángulo de empatamiento de fase  $\theta_{pm}$ . Dicha dependencia se describe a través de la siguiente relación:

$$\frac{1}{n_p^2(\omega_{pm})} = \frac{\text{sen}^2(\theta_{pm})}{n_e^2} + \frac{\text{cos}^2(\theta_{pm})}{n_o^2}. \quad (2.23)$$

Los valores de índice de refracción para la luz ordinaria y extraordinaria viajando en cristales uniaxiales pueden ser encontradas en la literatura. Sin embargo, estos valores pueden ser aproximados utilizando las ecuaciones de Sellmeier, que en el caso específico del cristal BBO están dadas por [47] :

$$n_o = \left( 2.7359 + \frac{0.01878}{\lambda^2 - 0.01822} - 0.01354\lambda^2 \right)^{1/2}, \quad (2.24)$$

$$n_e = \left( 2.3753 + \frac{0.01224}{\lambda^2 - 0.01667} - 0.01516\lambda^2 \right)^{1/2}. \quad (2.25)$$

Debido a la simetría azimutal del proceso SPDC Tipo I, los fotones convertidos señal y acompañante son emitidos en dos conos colineales centrados en el eje del bombeo  $\vec{k}_p$ . Se puede encontrar los fotones correlacionados trazando una línea imaginaria desde uno de los extremos del cono señal hasta el extremo opuesto del cono del fotón pasando pasando a través del centro.

De la ecuación (2.22) podemos separar las condiciones de empatamiento de fase longitudinal y transversal, obteniendo el siguiente conjunto de relaciones:

$$k_p^e(\omega_p) = k_s^o(\omega_s) \cos \phi_s + k_i^o(\omega_i) \cos \phi_s, \quad (2.26)$$

$$k_s^o(\omega_s) \text{sen} \phi_s = -k_i^o(\omega_i) \text{sen} \phi_i. \quad (2.27)$$

Los ángulos de emisión de los fotones señal y acompañante son dados por la ecuación de Snell dadas por:

$$\phi_{ei} = \arcsin(n_i \text{sen} \phi_i), \quad (2.28)$$

$$\phi_{es} = \arcsin(n_s \text{sen} \phi_s). \quad (2.29)$$

Utilizando las ecuaciones (2.8)-(2.11) en combinación de los coeficientes de Sellmeier para calcular  $n_p(\lambda_p)$ ,  $n_s(\lambda_s)$  y  $n_i(\lambda_i)$  del BBO, podemos determinar los ángulos de emisión para los fotones señal y acompañante para cada valor del ángulo de empatamiento de fase. Por lo que cambiando la orientación del eje óptico del cristal podemos obtener SPDC Tipo I en configuraciones de emisión no colineal y colineal.

## 2.5. Descripción cuántica del proceso SPDC

En esta sección presentamos la derivación del estado bi-fotónico obtenido en la generación de SPDC. Primero, es necesario derivar el Hamiltoniano  $\hat{H}(t)$  para este proceso. Partimos de la expresión para la energía de un campo clásico de bombeo dentro de un material [47]

$$H(t) = \frac{1}{2} \int_V [\vec{E}_p \cdot \vec{D}_p] dV, \quad (2.30)$$

donde  $\vec{E}_p$  es el vector de campo eléctrico y  $\vec{D}_p$  es el vector de desplazamiento eléctrico que cumplen la constricción  $\vec{D}_p = \epsilon_0 \vec{E}_p + \vec{P}_p$ . Si consideramos que la polarizabilidad del medio depende del campo eléctrico, la podemos escribir como:

$$\vec{P}_p = \vec{P}_p^{(0)} + \underbrace{\epsilon_0 \chi^{(1)} \cdot \vec{E}_p}_{\vec{P}_p^{(1)}} + \underbrace{\epsilon_0 \chi^{(2)} : \vec{E}_s \vec{E}_i}_{\vec{P}_p^{(2)}} + \dots, \quad (2.31)$$

donde  $\vec{P}_p^{(0)}$  es la polarización espontánea del medio,  $\chi^{(1)}$  y  $\chi^{(2)}$  son las susceptibilidades de primer y segundo orden del medio,  $\vec{E}_s$  y  $\vec{E}_i$  son los campos eléctricos señal y acompañante. Se puede demostrar que para una interacción paramétrica dentro de un cristal uniaxial negativo el Hamiltoniano esta dado por [?]:

$$H_I(t) = \int_V 2\epsilon_0 d_{eff}(\vec{r}) \vec{E}_p \vec{E}_s \vec{E}_i dV, \quad (2.32)$$

donde  $d_{eff}(\vec{r})$  es el coeficiente no lineal efectivo de segundo orden. Podemos sustituir en la ecuación (2.32) los vectores por los operadores de campo para los fotones de bombeo  $\hat{E}_p$ , señal  $\hat{E}_s$  y acompañante  $\hat{E}_i$ . En general, podemos expresar cada uno de los operadores de campo como una suma de sus frecuencias positivas y negativas, escribiéndolos como  $\hat{E}_\mu = \hat{E}_\mu^{(+)} + \hat{E}_\mu^{(-)}$  con  $(\mu = p, s, i)$ . Sustituyendo lo anterior en nuestro Hamiltoniano de interacción y manteniendo solo los términos que conservan energía tenemos que el operador Hamiltoniano de interacción para el proceso SPDC tiene la forma:

$$\hat{H}_I = 2\epsilon_0 \int_V d_{eff}(\vec{r}) \hat{E}_p^{(-)} \hat{E}_s^{(+)} \hat{E}_i^{(+)} dV + H.C., \quad (2.33)$$

donde  $H.C.$  es el Hermitiano conjugado. Podemos emplear ahora el operador unitario de evolución temporal para determinar el estado cuántico al tiempo  $t$  dado un estado inicial  $|\Psi_0\rangle$ , el cual esta dado por [47]:

$$|\Psi(t)\rangle = \exp \left[ \frac{1}{i\hbar} \int_0^t dt' \hat{H}_I(t') \right] |\Psi_0\rangle, \quad (2.34)$$

donde  $\hat{H}_I(t)$  es el Hamiltoniano dependiente del tiempo dado por la ecuación (2.33). Para tiempos de interacción que son pequeños en comparación con el tiempo que transcurre entre interacciones paramétricas sucesivas, podemos expandir el exponencial como:

$$|\Psi(t)\rangle \approx \left[ 1 + \frac{1}{i\hbar} \int_0^t dt' \hat{H}_I(t') \right] |\text{vac}\rangle, \quad (2.35)$$

donde se ha considerado el estado inicial como el estado de vacío, el cual está dado por:

$$|\text{vac}\rangle = |0\rangle_s \otimes |0\rangle_i. \quad (2.36)$$

Podemos truncar la expansión de el exponencial en la ecuación (2.34) a primer orden, ya que resulta en emisión de parejas de fotones. Los términos de orden superior en dicha expansión resultan en la emisión de múltiples pares de fotones. Dado que la emisión de SPDC opera en el límite que en la emisión de múltiples pares de fotones es despreciable, podemos prescindir de los términos de orden superior.

Para continuar, asumimos que las tres ondas que interactúan en el proceso SPDC están descritas por ondas planas. Entonces, los operadores de campo eléctrico para los modos señal y acompañante son (con  $\mu = s, i$ ):

$$\hat{E}_\mu(\vec{r}, t) = i \int d\omega_\mu \ell(\omega_\mu) \hat{a}_\mu(\omega_\mu) \exp \left[ i(\vec{k}_\mu(\omega_\mu) \cdot \vec{r} - \omega_\mu t) \right] + H.C., \quad (2.37)$$

donde

$$\ell(\omega_\mu) = \left( \frac{\hbar \omega_\mu}{2\epsilon_0 (2\pi)^3 n^2(\omega_\mu)} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2.38)$$

donde  $\hat{a}_\mu$  representa el operador de aniquilación para el modo  $\mu$ . Por otro lado, el haz de bombeo es tratado clásicamente y lo podemos escribir como:

$$\hat{E}_p(\vec{r}, t) = A_p \int d\omega_p \alpha_p(\omega_p) \exp \left[ i(\vec{k}_p(\omega_p) \cdot \vec{r} - \omega_p t) \right] + C.C., \quad (2.39)$$

donde  $A_p$  y  $\alpha_p(\omega_p)$  representan la amplitud y el perfil espectral del campo de bombeo, respectivamente. Sustituyendo las ecuaciones (2.37) y (2.39) en la ecuación (2.33) para el Hamiltoniano obtenemos:

$$\begin{aligned} \hat{H}(t) = & A_p \int \int \int d\omega_p d\omega_s d\omega_i \ell(\omega_s) \ell(\omega_i) \alpha(\omega_p) \exp \left[ -i(\omega_p - \omega_s - \omega_i)t \right] \hat{a}_s^\dagger(\omega_s) \hat{a}_i^\dagger(\omega_i) \\ & \times \int dV d_{eff}(\vec{r}) \exp \left[ i\{\vec{k}_p(\omega_p) - \vec{k}_s(\omega_s) - \vec{k}_i(\omega_i)\} \cdot \vec{r} \right]. \end{aligned} \quad (2.40)$$

Si sustituimos la ecuación (2.40) en (2.35) y representamos el empatamiento de fase como  $\Delta\vec{k} = \vec{k}_p - \vec{k}_s - \vec{k}_i$  y en frecuencia  $\Delta\omega = \omega_p - \omega_s - \omega_i$  podemos escribir el estado de SPDC como [?]:

$$\begin{aligned}
|\Psi\rangle = & |\text{vac}\rangle + \frac{VA_p t}{i\hbar} \int \int \int d\omega_p d\omega_s d\omega_i \left\{ \frac{1}{t} \int_0^t dt' e^{-i\Delta\omega t'} \right\} \ell(\omega_s) \ell(\omega_i) \alpha(\omega_p) \\
& \times \left\{ \frac{1}{V} \int dV d_{eff}(\vec{r}) e^{i\Delta\vec{k}\cdot\vec{r}} \right\} \hat{a}_s^\dagger(\omega_s) \hat{a}_i^\dagger(\omega_i) |\text{vac}\rangle.
\end{aligned} \tag{2.41}$$

El primer termino dentro de las llaves  $\{*\}$  en la ecuación (2.41), al integrar corresponde a una función delta de Dirac  $\delta(\Delta\omega)$ . Entonces podemos escribir el estado que se produce en el proceso SPDC como:

$$|\psi\rangle = |\text{vac}\rangle + \eta \int \int d\omega_s d\omega_i \ell(\omega_s) \ell(\omega_i) \alpha(\omega_s + \omega_i) \phi(\omega_s, \omega_i) \hat{a}_s^\dagger(\omega_s) \hat{a}_i^\dagger(\omega_i) |\text{vac}\rangle, \tag{2.42}$$

donde el parámetro  $\eta$  absorbe las constantes fuera de la integral y donde

$$\phi(\omega_s, \omega_i) = \frac{1}{V} \int dV d_{eff}(\vec{r}) e^{i\Delta\vec{k}\cdot\vec{r}}, \tag{2.43}$$

es conocida como la función de empatamiento de fase que incorpora las propiedades de dispersión del cristal. Podemos definir la función:

$$f(\omega_s, \omega_i) = \ell(\omega_s) \ell(\omega_i) \alpha(\omega_s + \omega_i) \phi(\omega_s, \omega_i), \tag{2.44}$$

que representa un factor de peso en las probabilidades de los operadores de creación actuando sobre el vacío. Esta función dicta la probabilidad de generar un fotón señal con vector de onda  $\vec{k}_s$  y frecuencia  $\omega_s$  y simultáneamente un fotón con vector de onda  $\vec{k}_i$  y frecuencia  $\omega_s$ . Esta función es denominada función de amplitud espectral conjunta.

Algunas características del proceso son: [30]

- Es paramétrico, puesto que la energía incidente se transfiere totalmente a los fotones generados.
- Es de conversión descendente, debido a que cada uno de los fotones generados tiene una energía mas baja que el fotón incidente.
- Es espontáneo, ya que el par de fotones es generado solo con la interacción del haz de bombeo con el medio.

### 2.5.1. Cuentas accidentales

Las cuentas accidentales como su nombre lo indica son cuentas que registra un detector y no corresponden a cuentas de parejas de coincidencias de fotones. El cálculo de las coincidencias accidentales corresponde al producto de las probabilidades simples, es decir la probabilidad del brazo A  $P_A$  y la probabilidad del brazo B  $P_B$  de observar un evento en cada uno de los detectores, siendo  $P_A = \frac{NA}{N_{obs}}$  (donde NA es el número de conteos individuales en el detector A) lo mismo sucede para B.

En el caso de generar SPDC con un láser de onda continuo (*CW*, por sus siglas en inglés), la tasa de recuentos accidentales es decir, el número de conteos divididos por el tiempo total, se escribe como:

$$R_{acc} = R_A R_B T_w, \quad (2.45)$$

donde,  $R_{acc}$  son los recuentos de fotones accidentales,  $R_A$  las cuentas simples de fotones en el brazo A,  $R_B$  las cuentas simples de fotones en el brazo B y  $T_w$  la ventana temporal de las coincidencias.

Al detectar las parejas de fotones en coincidencias, dichas debe restarse del número total de registros coincidencias para evaluar el grado de coincidencias logrado. Una estimación correcta del número de coincidencias accidentales es crucial en cualquier experimento [48].



# 3 Antecedentes Experimentales

A continuación se presenta una descripción breve de los equipos que se emplearon para la elaboración de los montajes experimentales, esto con el fin de dar al lector una breve descripción del equipo a utilizar.

## 3.1. Equipo para el montaje experimental

Con la finalidad de generar los dos procesos mencionados anteriormente, SHG y SPDC se va utilizar los siguientes materiales:

### 1. OM Objetivos de Microscopio

Un objetivo de microscopio es un sistema de lentes que se encarga de obtener imágenes magnificadas de algún espécimen que se este observando, este es uno de los componentes más importantes de cualquier tipo de microscopio óptico. Existen diversos tipos de objetivos los cuales se pueden clasificar según su magnificación, sus correcciones ópticas, su apertura numérica y su inmersión. La magnificación de los objetivos esta dada según como se magnifica la imagen, la cual va de los 4x a los 100x en objetivos de inmersión en aire; la resolución depende de la apertura numérica del objetivo este valor se encuentra en un rango de 0.2 a 1.6 y corresponde al ángulo sólido del cono de luz que sale de la lente de la pupila. En resumen cada objetivo posee las siguientes características [41]

- a) Magnificación ( $M$ )
- b) Distancia de trabajo ( $WD$ )  
Es la distancia entre la pupila del objetivo y el plano focal.
- c) Distancia focal efectiva ( $EFL$ )
- d) Apertura numérica ( $NA$ )
- e) Diámetro de la pupila de entrada ( $EP$ )

El tamaño de salida del spot de un objetivo es una medición importante para caracterizar la luz, para esto se utiliza la relación [2.19], la cual establece que si al objetivo entra un spot de tamaño  $EP$ , entonces el valor obtenido será el máximo enfoque sobre la muestra a una distancia máxima de trabajo  $WD$  de la pupila de salida del objetivo con tamaño  $d$ . Por otro lado, si

el spot de entrada al objetivo es de menor tamaño a  $EP$ , entonces su diámetro de enfoque  $d_s$  estará dada por la siguiente expresión:

$$d_s = \frac{4(EFL)\lambda}{\pi D} \quad (3.1)$$

$$= \frac{(EFL)\lambda}{r}, \quad (3.2)$$

donde  $EFL$  corresponde a la distancia de la lente al plano de enfoque, y  $D$  es diámetro del spot de entrada.

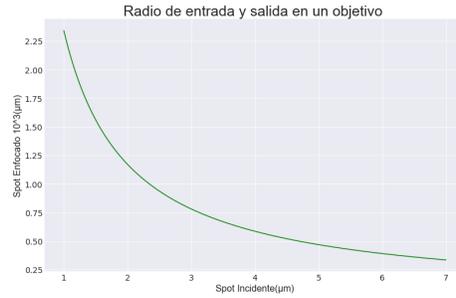


Figura 3.1: Relación de radios con un objetivo PLAN del fabricante THORLABS [49] con  $M = 40X$ ,  $WD = 0.6mm$ ,  $EFL = 4.5mm$ ,  $NA = 0.65$  y  $EP = 5.9mm$

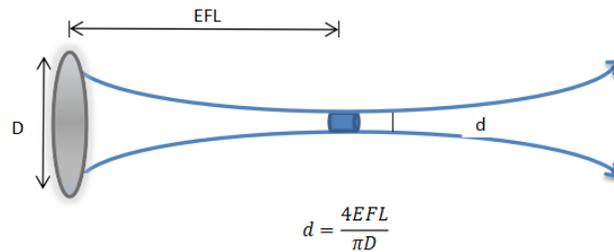


Figura 3.2: Enfoque del tamaño de spot según la ecuación Airy

En el objetivo de Thorlabs [49] de 40x con corrección PLAN el spot de entrada es tres ordenes de magnitud mayor al spot que enfoca sobre la muestra.

## 2. PBF Filtros

Su funcionalidad consiste en hacer un filtrado que diferencia y discrimina algunas frecuencias. Su función principal es seleccionar una franja del espectro de luz con determinada longitud de onda, mientras bloquea otras. Existen diversos tipos de filtros espectrales, como: infrarrojos, ultravioleta, polarizadores, entre otros, sin embargo, los filtros que se emplean en este experimento son: pasa bandas, pasa altas y pasa bajas. Los filtros pasa bandas se definen por su rango

de longitud de onda transmitido [50]; los filtros pasa altas transmiten longitudes de onda superiores a la longitud de onda de corte  $\lambda_c$  y bloquean las longitudes de onda inferiores a  $\lambda_c$ ; de manera inversa los filtros pasa bajas transmiten longitudes de onda inferiores a su  $\lambda_c$  y bloquean el resto de señal. como se ve en la figura 3.3, estos filtros tienen una precisión de orden milimétrico.

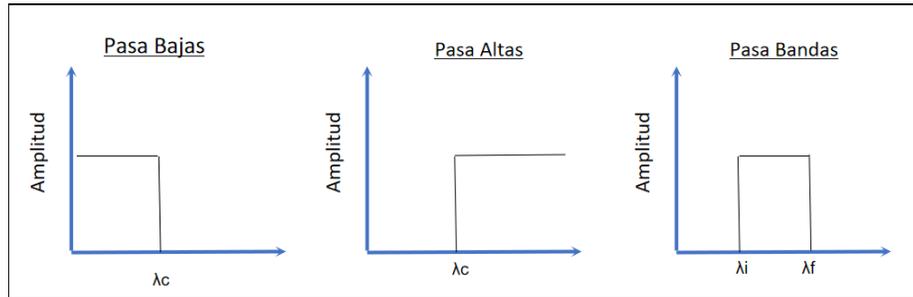


Figura 3.3: Tipos de filtrado

Los filtros ópticos están construido de recubrimientos ultraduros (UHC) para componentes ópticos de películas delgadas. Los filtros pasa banda ópticos UHC exhiben cualidades mecánicas excepcionales, soportando múltiples usos con luz incidente y radiación, con resistencias extremas a la intensidad de la luz, la humedad y el calor. [49].

### 3. Placa de media onda:

Las placas retardadoras son cristales birrefringentes lo suficientemente delgados como para causar una diferencia de fase entre los rayos ordinarios y extraordinarios de luz polarizada. El material birrefringente que generalmente se emplea es el cuarzo, la mica o calcita; estos materiales poseen dos índices de refracción, por lo que tienen un eje extraordinario y un eje ordinario. La componente de polarización a lo largo del eje ordinario viaja a través del cristal con una velocidad  $v_o = c/n_o$ , mientras que la componente de polarización a lo largo del eje extraordinario viaja con una velocidad  $v_e = c/n_e$ . Esto conduce a una diferencia de fase entre los dos componentes cuando salen del cristal. Cuando  $n_e < n_o$ , como sucede en la calcita, el eje extraordinario se denomina eje rápido y el eje ordinario se llama eje lento. Para  $n_e > n_o$  la situación se invierte.

Supongamos una onda polarizada linealmente con un vector de polarización  $P$  es el vector a lo largo del eje rápido de la placa de ondas. Sea  $z$  el eje de propagación de la onda. El campo eléctrico de la onda incidente descrito en la ecuación (2.7).

El efecto de la placa de media onda es introducir un término de cambio de fase entre las componentes  $\hat{f}$  y  $\hat{s}$  de la onda, de modo que la onda al salir del cristal está dada por:

$$E(\cos \theta \hat{\mathbf{f}} - \sin \theta \hat{\mathbf{z}})e^{i(kz - \omega t)} = E[\cos(-\theta)\hat{\mathbf{f}} + \sin(-\theta)\hat{\mathbf{z}}]e^{i(kz - \omega t)},$$

por lo tanto, la placa de media onda rota el vector de polarización en un ángulo de  $2\theta$

4. **(BS) Divisor de haz** El divisor de haz (BS, por sus siglas en inglés) es un cristal capaz de dividir la luz en dos caminos, es decir, una parte de la luz incidente a través de la cara del cubo se refleja y la otra parte se transmite.
5. **APD Fotodiodo de avalancha** Los fotodiodos de avalancha están hechos de materiales de silicio (Si) o de Indio, Galio y Arsénico (InGaAs). Los APD que se utilizan en el desarrollo de este trabajo son de Silicio cubren el rango espectral de 400 nm a 1100 nm, así mismo los APD de InGaAs cubren un rango de 950 nm a 1550 nm [51]. Un fotodiodo de avalancha (APD) proporciona una mayor sensibilidad que un fotodiodo estándar. Su uso es para la detección de luz de bajo nivel extremo y el conteo de fotones. En general, los fotodiodos de avalancha utilizan un mecanismo de ganancia interno para aumentar la sensibilidad con la que detectan fotones. Para su funcionamiento se aplica un alto voltaje de polarización inversa a los diodos para crear un campo eléctrico fuerte. Cuando un fotón incidente genera un par electrón-hueco, el campo eléctrico acelera los electrones, lo que conduce a la producción de electrones secundarios por ionización. La avalancha de electrones resultante puede producir un factor de ganancia de varios cientos de veces.

### Especificaciones

- a) Eficiencia máxima de detección de fotones PDE @780nm: 70 % típico
  - b) Área activa: 180 $\mu$ m
  - c) Suministro único de +5V
  - d) Linealidad sobre alta tasa de conteo
6. **Etiquetador de tiempos (ID 800)** Es un contador de coincidencias en intervalos de tiempo. Este sistema se utiliza para transferir los eventos registrados en picosegundos. Cuenta con 8 canales de medición que permiten registrar cuentas simples detectadas en cada canal y las tasas de coincidencias entre los canales, además permite registrar los eventos mediante el uso de una interfaz gráfica o software. [52]
  7. **Monocromador** Un monocromador es un dispositivo capaz medir espectralmente los modos ópticos mediante un sistema integrado de monocromador y cámara intensificada. [53]

# 4 Medición del Segundo Armónico (SHG) detectado en longitud de onda de 810nm

En este capítulo se presentan los resultados experimentales de la generación de segundo armónico producido en muestras biológicas de tendón porcino y en fécula de maíz con un sistema óptico análogo a un microscopio de campo amplio y un microscopio confocal LSM 710 NLO de la marca Zeiss.

Las muestras de tejido de cerdo fueron suministrado por el equipo de investigación del Dr. Kimani C Toussaint, quien en la mayoría de sus investigaciones trabaja con un bombeo centrado en 810 nm, por tal razón tomamos como punto de partida esta longitud de onda con el fin de replicar parte de sus resultados.

## 4.1. Montaje Experimental

### 4.1.1. Microscopio de campo amplio

En la Figura [4.1](#) se muestra el arreglo experimental empleado para la SHG en el rango óptico visible. El haz de bombeo utilizado es un láser pulsado Ti:Za que produce pulsos 70 fs a una tasa de repetición de 80 MHz, operando en una longitud de onda central de  $\lambda_p = 810$  nm. La polarización del láser es manipulada por una placa retardadora de media onda simbolizada con la letra F, lo cual nos permite controlar la intensidad de la SHG, con la finalidad de obtener una señal intensa de SHG. El haz de bombeo es enfocado sobre la muestra biológica utilizando objetivos de microscopio como lo son: objetivo de 40X con NA de 0.61 y un objetivo de 20x con NA de 0.4 ambos tipo PLAN. La señal SHG que ha de producirse en la muestra biológica es colectada utilizando objetivos con iguales características a los empleados en la iluminación. El haz de bombeo remanente es bloqueado utilizando dos filtros pasa altas centrado en 700 nm y un pasa bandas de 810 - 10 nm. Finalmente, la señal de SHG producida en el plano de la muestra es detectada utilizando una cámara CCD.

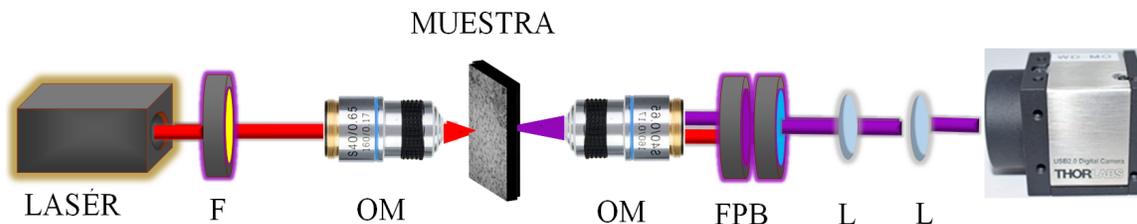


Figura 4.1: Esquema de la generación del segundo armónico. F:  $\frac{\lambda}{2}$ , OM, objetivo de microscopio, FPB: filtros pasa bandas y pasa bajas, L: lente plano convexa

## 4.2. Caracterización del SHG

### 4.2.1. Espectro de la luz colectada de SGH

Lo primero que se hizo para verificar que se estaba midiendo la señal de SHG en la muestras de tejido fue obtener su espectro usando un bombeo centrado en 810 nm y una potencia de 150 mW. Para esto, en vez de la cámara CCD se colocó un espectrómetro donde la señal detectada fue recolectada con una fibra.

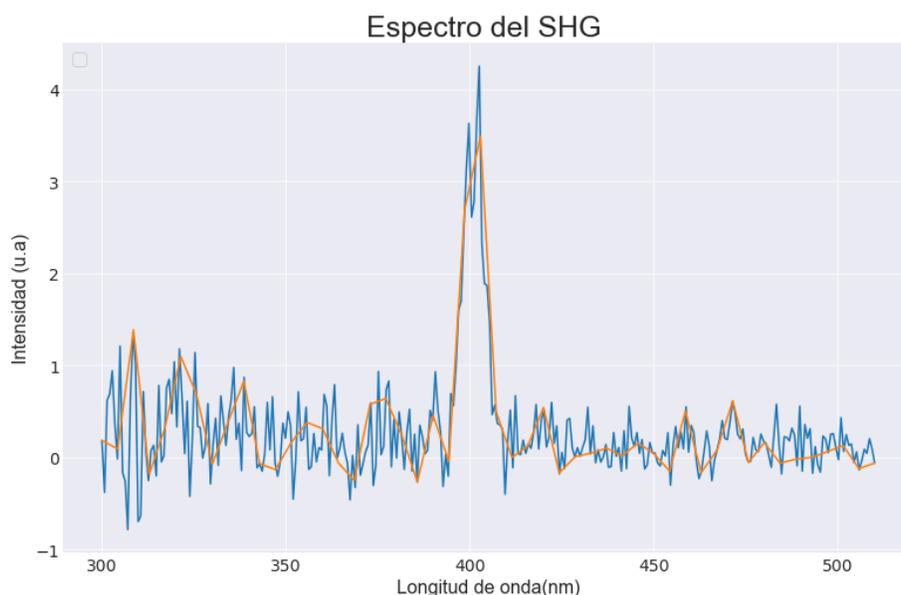


Figura 4.2: Espectro del SHG. Línea de color naranja es un promedio de los picos de la curva azul.

El resultado nos indicó que efectivamente se estaba midiendo la SHG, dado que la señal registrada por el espectrómetro está centrada alrededor de 405 nm como se aprecia en la Figura: [4.2](#) y presenta una señal con baja emisión, debido a la sensibilidad de la emisión de la señal a la potencia incidente. Es válido recalcar que ambas curvas son de la misma señal, la curva naranja está suavizada

## Montaje con el microscopio LSM 710 Zeiss

Se utilizó un láser de Titanio zafiro, marca Coherent, modelo Chameleon con 3.0 W de máxima potencia promedio, tasa de repetición de 80 MHz, duración de pulso de 140 fs y rango de sintonizabilidad de 680 a 1080 nm. Se emitió un haz con una longitud de onda de 810nm al microscopio LSM 710 Zeiss [42], el cual es filtrado espacialmente y colimado antes de enviarlo al escáner x-y accionado por un galvanómetro, para cubrir la muestra mediante un rasterizado. Posteriormente, el haz se refleja mediante un divisor de haz dicróico, el cual después de pasar a través de un sistema lentes (lentes de escaneo y tubo), se enfoca en la muestra usando un objetivo de iluminación de 20x y 40x. La señal transmitida de la muestra es recogida por un condensador y se recopila mediante un filtrado espectral utilizando un filtro pasa bandas seguido de un filtro pasa bajas que solo transmite la SHG. Finalmente, la intensidad de la señal deseada se registra con un fotomultiplicador.

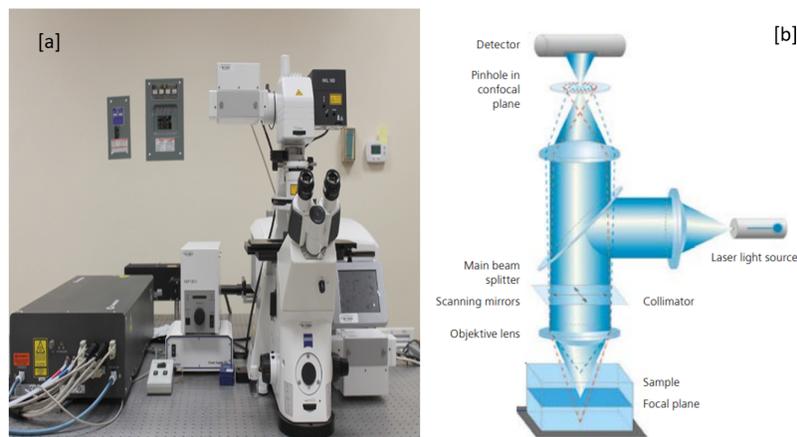


Figura 4.3: Sistema de detección de SHG microscopio LSM 710 Zeiss [42] en transmisión y láser de Titanio zafiro, marca Coherent, modelo Chameleon.[a] Imagen captada del centro de investigaciones ópticas CIO, donde se tomaron las mediciones con el microscopio. [b] Esquema del microscopio. Tomado del manual [54]

## 4.3. Comparativo de resolución de la imagen

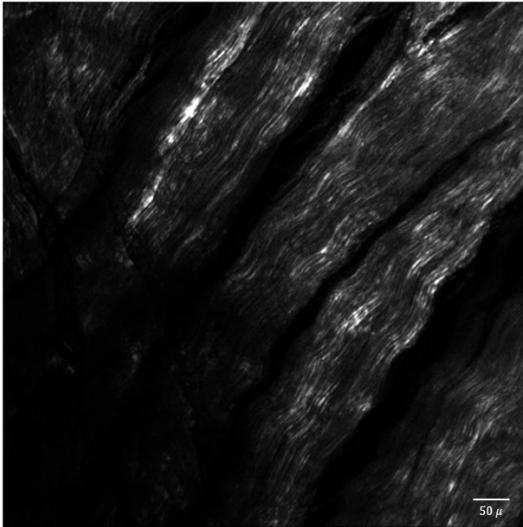
### 4.3.1. Tejido de cerdo

En los dos microscopios se colocó las muestras de tejido y la fécula de maíz para comparar la resolución de la imagen emitida por la señal de SHG en la misma región de la muestra, debido a que la calidad de la imagen es uno de los requerimientos necesarios en el análisis de imágenes biológicas, es válido recalcar que el orden del tamaño de las fibrillas de los tejidos son de los 50 nm a 500 nm [9] dimensiones que se necesitan definir y su organización es la que ha permitido diagnosticar patologías en

los diferentes estudios [7], [4], [18], [1]. Para este comparativo se utilizó un objetivo de 40x el sistema óptico completo presenta una magnificación de 86x y usando un objetivo de 20x la magnificación del sistema óptico es de 43.5x.

Las figuras 4.4 y 4.5 son las imágenes de la señal de la SHG de tejido de cerdo captadas con el objetivo de 20x y 40x respectivamente.

### Microscopio



### Arreglo

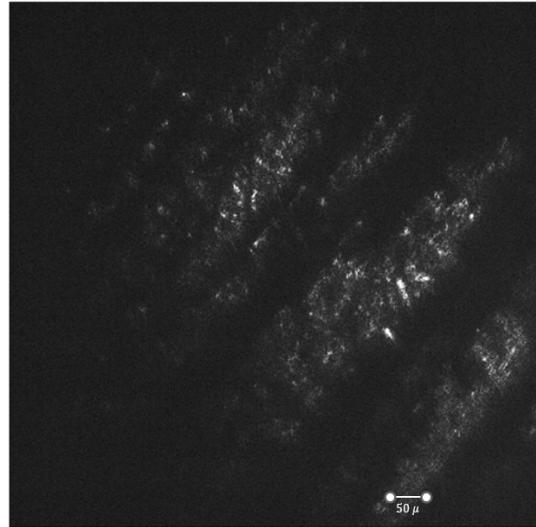


Figura 4.4: Comparativo del microscopio utilizando para la recolección un objetivo de microscopio de 20x

Las imágenes emitidas por el tejido logran resolver las fibrillas, como se aprecia en el comparativo [4.4] y [4.5], sin embargo, en la imagen que corresponde al sistema óptico propuesto en este trabajo [4.1] no se logra resolver las fibrillas y tampoco logra discernir la orientación de las mismas, debido a que la imagen que nosotros presentamos es una imagen de campo completo y el microscopio utiliza técnicas de escaneo para la reconstrucción de la imagen lo que permite obtener una buena resolución de las mismas sin afectar el límite de difracción.

#### 4.3.2. Fécula de maíz

Así mismo, usando un objetivo de 20x se obtuvo la señal de SHG emitida por la fécula de maíz la cual se presenta en [4.6]

En la figura [4.6] se evidencia que en ambos montajes es posible discernir la estructura geométrica del almidón, sin embargo la resolución del microscopio permite ver microesferas bien definidas, mientras que en el arreglo propuesto se ve una imagen plana con algunas distorsiones en la formación de la misma, esto ocurre dado que es

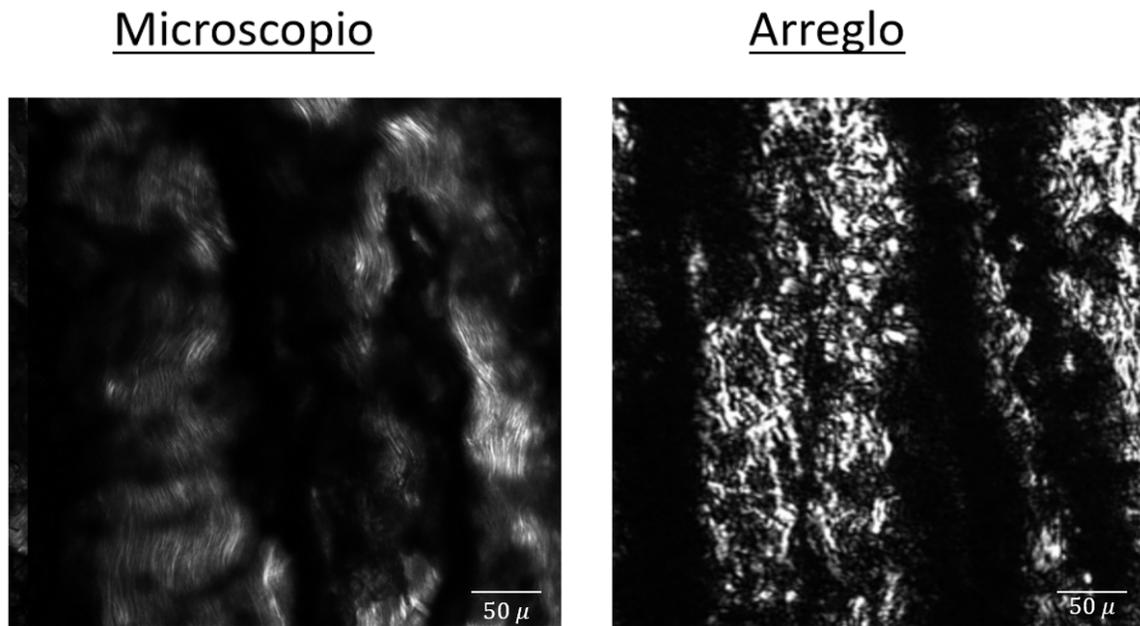


Figura 4.5: Comparativo del microscopio utilizando para la recolección un objetivo de microscopio de 40x

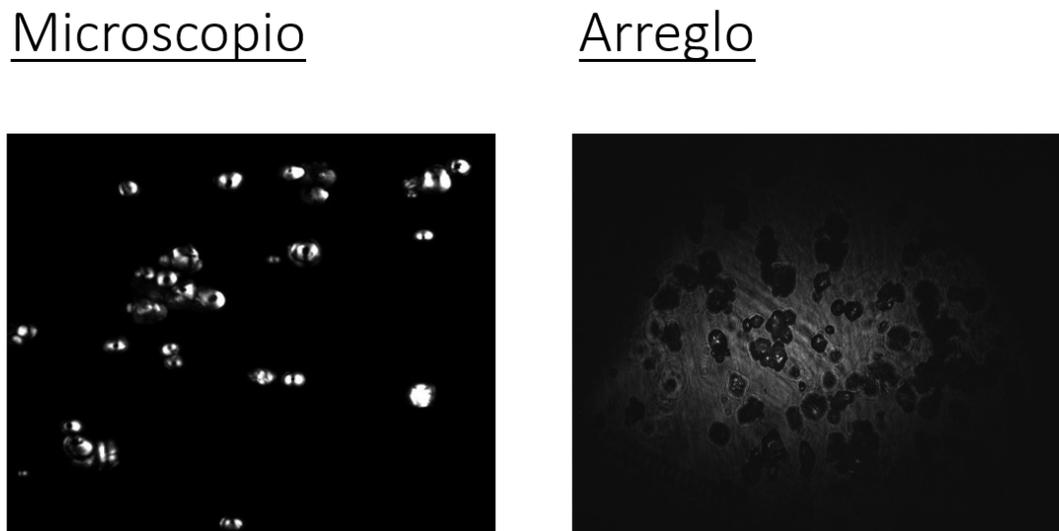


Figura 4.6: Comparativo del microscopio utilizando para la recolección un objetivo de microscopio de 20x en la fécula de maíz

una toma de campo amplio y existe una interferencia óptica de la luz entre los planos tridimensionales que no permiten la visualización o la formación de la imagen en la tercera dimensión, es decir que en la imagen del arreglo se define únicamente un plano y se alcanza a ver luz que se difracta de otros planos.

## 4.4. Análisis de Polarización del SGH en tejido de cerdo y fécula de maíz

Este análisis consiste en determinar como cambia la respuesta del SHG del tejido de cerdo y la fécula de maíz al variar la luz polarizada del bombeo se colocó una lámina de media onda (representada por la letra F) para hacer un estudio de polarimetría, como se muestra en la figura [4.1](#)

El análisis de imagen fue realizado con python, donde en cada imagen de las figuras [4.7](#) para el caso del tejido y [4.9](#) en el caso de la fécula fue representada como una matriz que se le encontró su máximo valor total de intensidad se promediaron sus filas con mayor información y luego las columna del promedio final, dichos valores fueron graficados en la figura [4.8](#) para el tejido y en la figura [4.10](#) en la fécula de maíz, respectivamente .

### 4.4.1. Tejido de cerdo

En el caso del tejido de cerdo para incidir luz polarizada en el tejido, esta fue rotada en el rango de los  $0^\circ$  a los  $90^\circ$  cada  $10^\circ$ , cuyos resultados se presentan a continuación en las figuras [4.7](#) y [4.8](#)

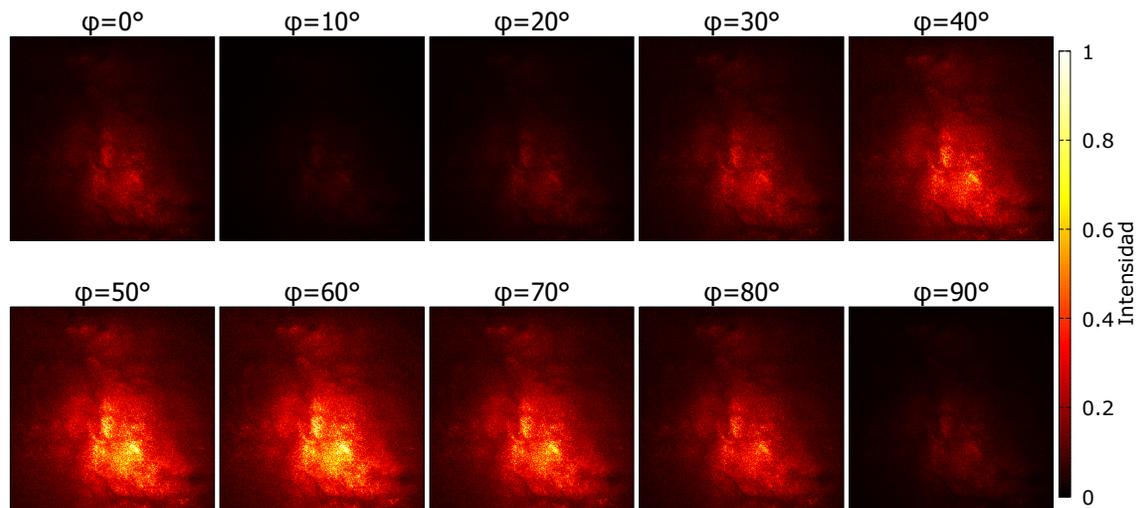


Figura 4.7: Mapa de calor que representa el cambio en la intensidad de la generación de segundo armónico de una muestra de tejido, variando la polarización de la luz incidente.

En la figura [4.7](#) se ilustra como se ven las diez imágenes de la SHG emitidas por el tejido correspondientes a cada uno de los ángulos de la polarización de la luz incidente, este mapa de calor nos permite identificar de manera visual como cambia

#### 4.4. ANÁLISIS DE POLARIZACIÓN DEL SGH EN TEJIDO DE CERDO Y FÉCULA DE

la intensidad de la señal al variar la polarización del bombeo, así mismo, en la figura 4.8 se representa una construcción de la respuesta de la intensidad total de luz de la señal de SHG polarizada de las imágenes de tejido presentadas en 4.7.

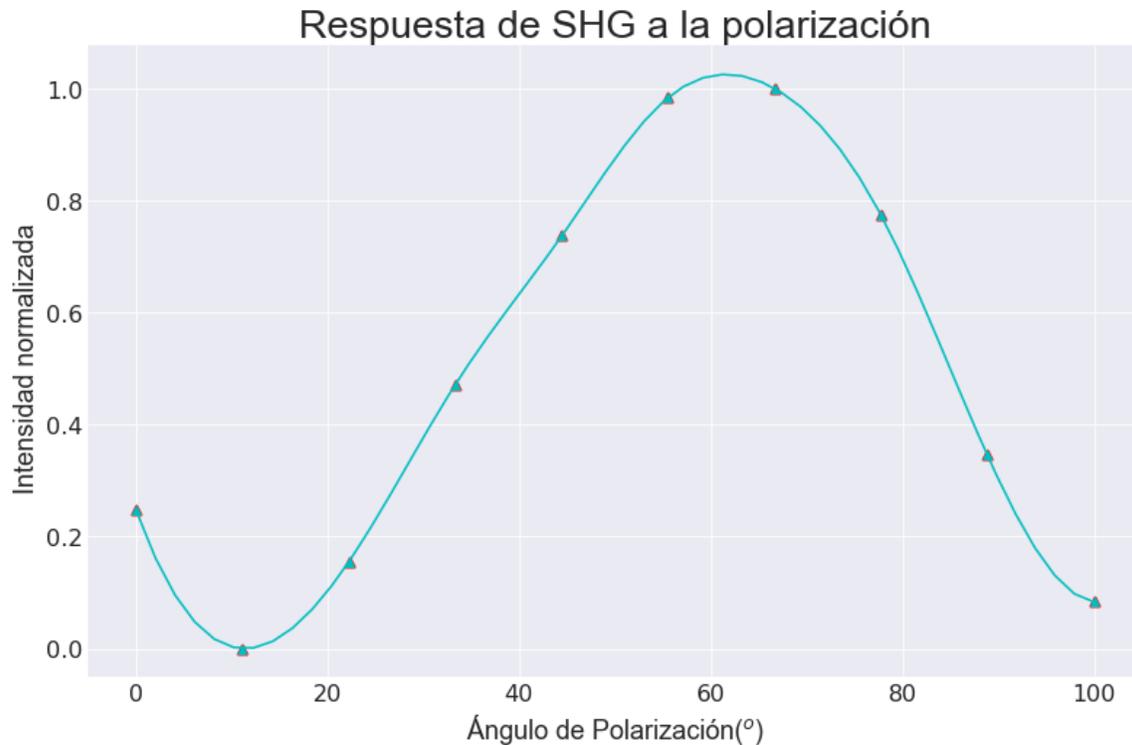


Figura 4.8: Intensidad de la generación de Segundo armónico de una muestra de tejido, variando la polarización de la luz incidente.

Cuando el colágeno tipo I es excitado con luz polarizada lineal, la señal SHG presenta un comportamiento periódico que depende del ángulo de polarización [5], esto implica que a medida que cambia el estado de polarización la señal de la generación del segundo armónico se ve afectada y eso es notable en el cambio de intensidad, como se aprecia en la figura 4.8 donde su pico de máxima intensidad está a los  $60^\circ$  y su periodo aproximadamente es de  $90^\circ$  grados. Es válido mencionar que dado que es una imagen de campo amplio, aquí se presenta un promedio de las propiedades de la señal de SHG que se produce en toda la muestra y dada la baja resolución de nuestro sistema óptico no se pueden resolver las fibrillas que permiten hacer estudios más detallados.

Su pico máximo implica que hay una mayor cantidad de fibras que están alineadas con la polarización del láser y esto nos permitiría deducir que las fibras presentan una orientación preferencial.

Las gráficas muestran que la organización de las fibras en los distintos tejidos producen una curva de polarización característica. Al comparar estas curvas es posible inferir cambios en la estructura de los tejidos, aunque hay que hacer énfasis que esta técnica suele ser más útil en tejidos con una alta direccionalidad.

#### 4.4.2. Fécula de Maíz

Posteriormente, se cambió la muestra del tejido de cerdo por una de fécula de maíz, la cual fue bombeada con un haz de luz polarizado que se roto un ángulo de  $20^\circ$  en el rango de los  $0^\circ$  y  $100^\circ$ . La señal emitida para cada ángulo se midió con una cámara CCD.

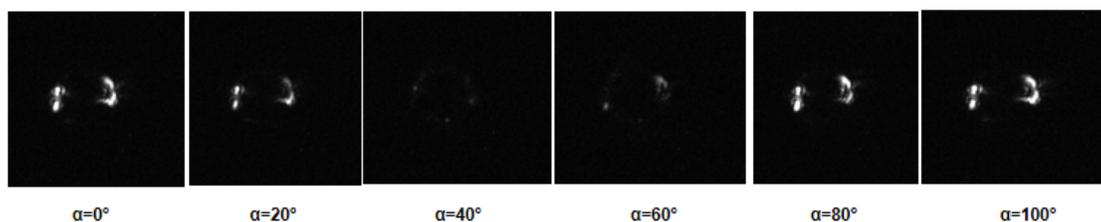


Figura 4.9: Cambio en la intensidad de la generación de segundo armónico de una muestra de fécula de maíz, variando la polarización de la luz incidente.

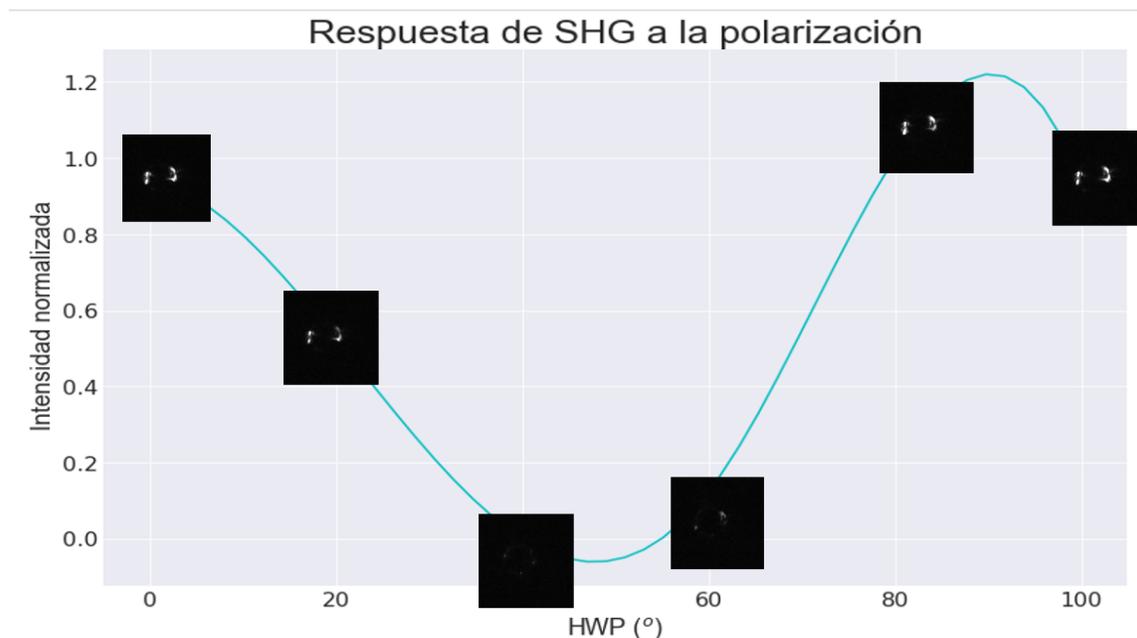


Figura 4.10: Cambio del ángulo polarización en la fécula de maíz

Como se aprecia en la figura [4.10](#), el almidón de maíz es sensible al cambio de la polarización similar a la señal del tejido. Su periodo se repite aproximadamente cada  $100^\circ$ , así mismo, el ángulo de los  $40^\circ$  se corresponde a la señal más débil emitida por la fécula. Esta misma respuesta de SHG al cambio de polarización también es

representada en la figura [4.9](#).

En las moléculas de almidón podemos notar que la señal emitida por un único grano de la fécula presenta una estructura que esta alineada con la luz a  $90^\circ$

En ambos resultados en el de la fécula y el tejido de cerdo se deduce que hay una clara sensibilidad a la dependencia de polarización a la señal de emisión de SHG y esa dependencia esta ligada a la estructura y composición molecular de las muestras. En el caso de los tejidos las regiones presentadas nos permiten decir que hay una mayor cantidad de fibrillas orientadas en una misma dirección, por que si estuvieran desordenadas implicaría que las fibrillas emiten luz en varias direcciones haciendo que la señal captada de SHG fuese menos o constante. Y en el caso de la fécula su estructura molecular es sensible a cambios.

## 4.5. Análisis de la Orientación de las Fibrillas

En las imágenes obtenidas en el microscopio se procedió hacer el análisis de la orientación de la fibrillas en dos partes diferentes de la muestra, nuevamente se usaron los mismos dos objetivos microscopio (20x y 40x) para enfocar sobre el tejido.

En una de las imágenes obtenidas para el objetivo de 20x se obtuvo la orientación de las fibrillas usando una vectorización promedio en dos regiones distintas como se muestra en la figura [4.11](#). Así mismo usando un objetivo de 40x para enfocar sobre el tejido se halló la orientación de las fibrillas en cuatro regiones distintas tal como se presenta en la figura [4.12](#).

Para encontrar la orientación de las fibrillas se escogió una pequeña región dentro de la imagen tomada con el microscopio a esta región o área se le calculo el ángulo de orientación promedio respecto al eje horizontal de las fibrillas utilizando el software Fiji ImageJ. Así mismo tomando el ángulo de referencia se procedió a calcular en los histogramas de direccionalidad ver figuras [4.13](#) y [4.11](#), por otro lado, en la tabla [4.1](#) se presenta el área de cada región el ángulo de orientación y la dispersión de las fibrillas.

Objetivos	Dirección $^\circ$	Dispersión	Área
20x Región1	48.55	13.26	3621
20x Región1	52.55	13.26	3768
40x Región1	17.70	2.63	4156
40x Región2	-54.64	11.86	3782
40x Región3	-5.31	4.75	3360
40x Región4	-71.30	6.54	3416

Tabla 4.1: Información de las regiones donde se hizo el calculo para hallar el ángulo de orientación de las fibrillas para las dos imágenes escogidas.

Usando el objetivo de 20x para enfocar sobre la muestra se notó que la imagen

evidenciaba una organización o una anisotropía en toda la imagen por lo que solo se halló la dirección de las fibrillas de dos pequeñas áreas; enfocando con el objetivo de 40x se tomó una imagen con una notable isotropía.

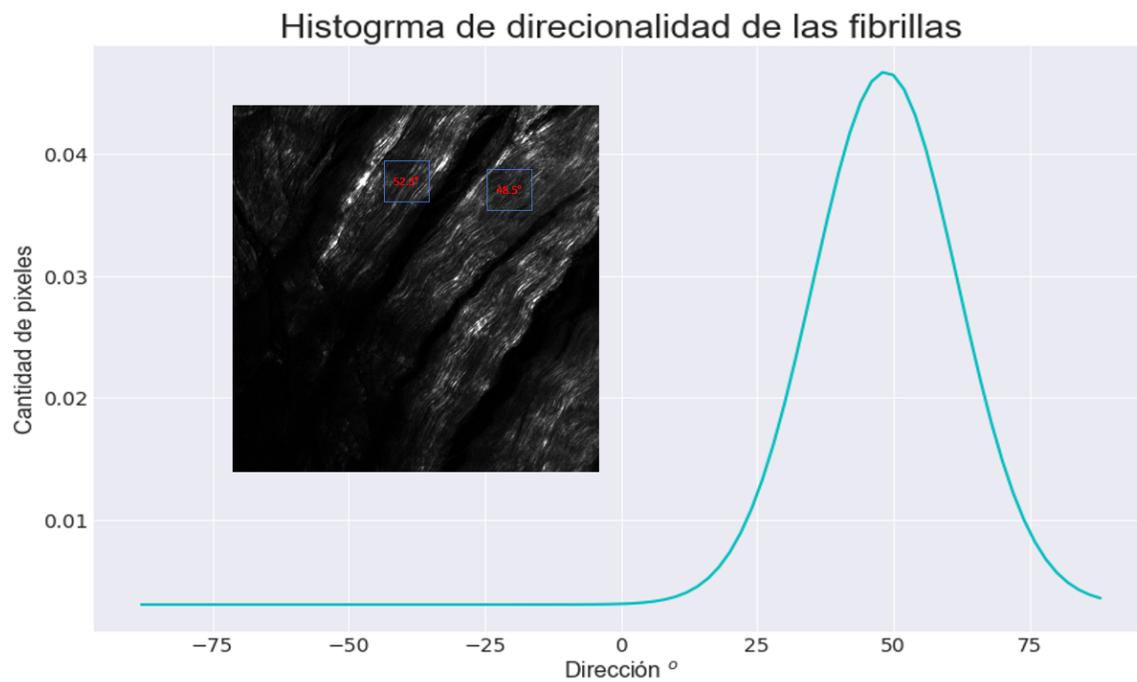


Figura 4.11: Orientación de las fibrillas de tejido en una región anisotrópica.

En la figura 4.11 se presenta el histograma de direccionalidad para dos pequeñas regiones de la imagen obtenida con el microscopio, aquí se encontró que las fibras estaban en una dirección de  $50^\circ$  en promedio por lo que se asume que tienen una dirección preferencial.

En la figura 4.13 se obtuvo el histograma de direccionalidad de cuatro regiones en toda la imagen, esto se hizo con el fin de corroborar la isotropía de la imagen, obteniendo cuatro ángulos distintos de inclinación de las fibrillas. En esta figura se puede observar que hay un desorden predominante en las fibrillas, muestra una región que presenta deterioro. Aquí las fibras muestran una contracción, lo que conlleva a que estas pierdan sus propiedades estructurales. En los histogramas de direccionalidad se ve reflejado en que no existe una dirección preferencial global.

## 4.6. Parámetros de Stokes

Los parámetros de Stokes fueron medidos colocando una placa de cuarto de onda posterior a la señal emitida por la muestra como se aprecia en el siguiente esquema 4.14

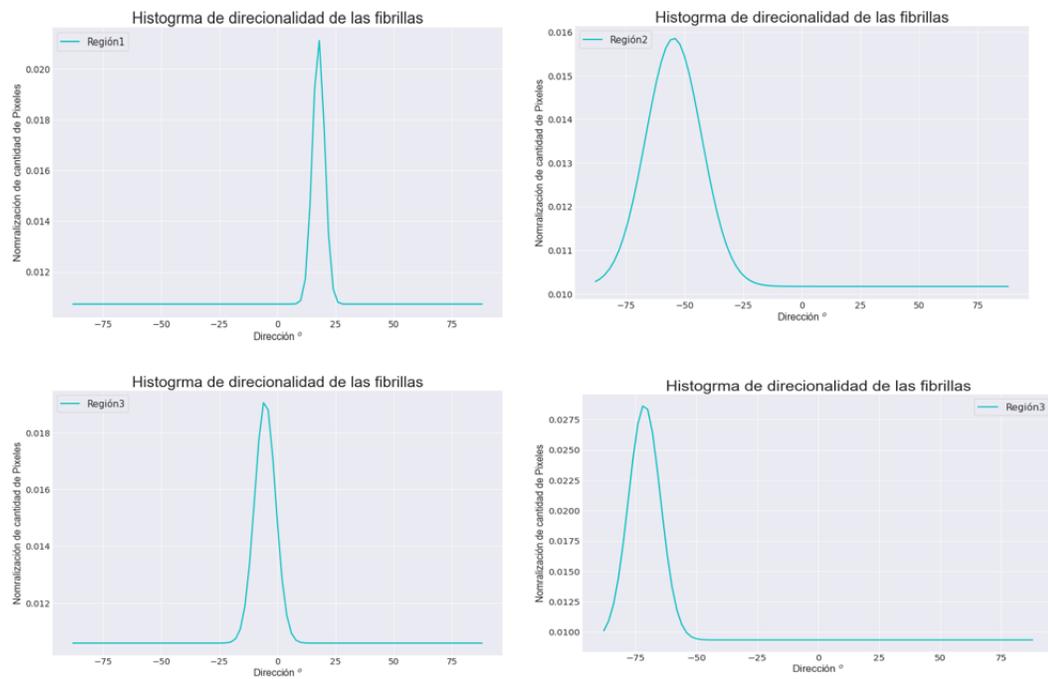


Figura 4.12: Histogramas de direccionalidad de las fibras en una región del tejido que presenta isotropía

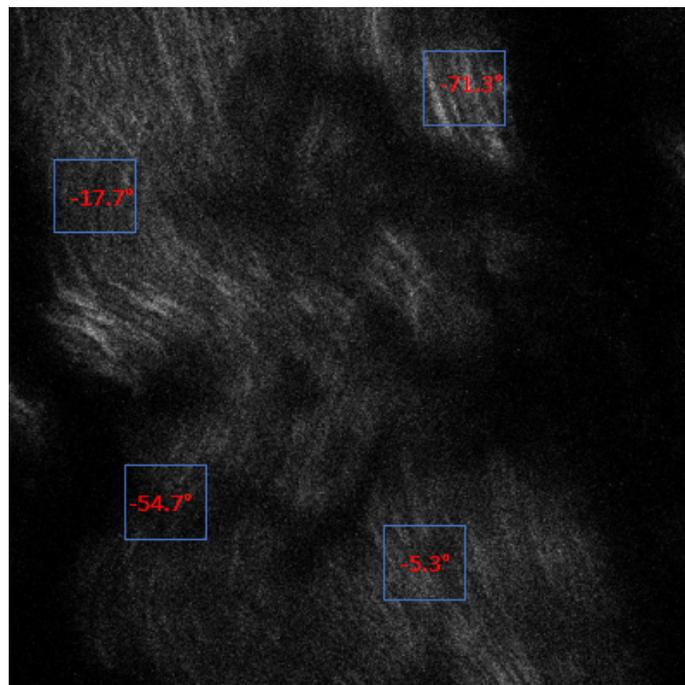


Figura 4.13: Orientación de las fibrillas de tejido en una región isotrópica

Los parámetros de Stokes además de ser cantidades observables corresponden a la forma estándar de obtener información sobre la polarización de un haz de luz.

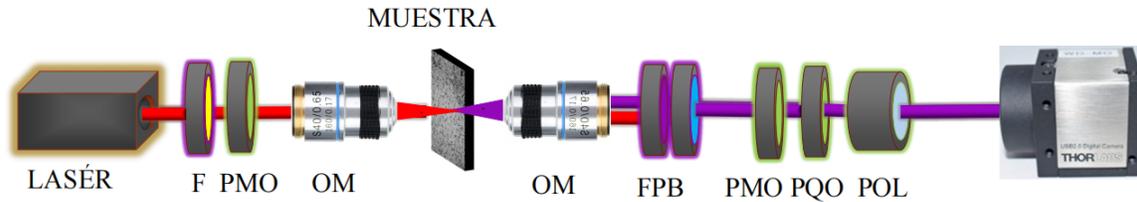


Figura 4.14: Montaje experimental para la medición de los parámetros de Stokes. Usando un láser centrado en 810 nm, se incide sobre un F: Filtro pasa altas centrado en 700 nm y una Placa de  $\frac{\lambda}{2}$  PMO, un objetivo de microscopio OM es utilizado para iluminar la muestra y otro objetivo de microscopio OM para recolectar la señal, se colocan dos filtros un pasa bajas 639 nm y un pasa bandas 400 - 40 nm, posteriormente, una placa de  $\frac{\lambda}{2}$  y una lámina de  $\frac{\lambda}{4}$ , finalmente un polarizador. La señal fue recogida con una cámara CCD

Primero se presentan las imágenes correspondientes a cada una de las cuatro proyecciones para medir los parámetros de Stokes. También presentamos los valores obtenidos de dichos parámetros  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  además del grado de polarización  $p$ . Vemos que la señal de SHG presenta preferencialmente una polarización vertical, similar a la del láser lo cual es lo que esperamos de un proceso coherente. Los resultados también indican que un porcentaje importante de la señal registrada esta depolarizada, suponemos que esto es debido a la dispersión de la luz que produce el mismo tejido. Sin embargo, estos valores solo nos dan información sobre el estado promedio de la señal de SHG, y no sobre la estructura interna de las fibras de colágeno

Para conseguir información de la estructura interna de las moléculas responsables de la generación de segundo armónico debemos hacer un análisis pixel a pixel de la imagen, para hacer los cálculos necesarios de dicho análisis, es necesario medir la intensidad en cuatro pares de ángulos, que luego son procesados y analizados con un programa escrito en Python, la estructura del programa se basó en el método de análisis de Fourier usando una placa de cuarto de onda y un polarizador. Esta lámina se rotó 8 veces dando pasos de  $22.5^\circ$  del ángulo  $0^\circ$  al ángulo  $157.5^\circ$ , se registraron los 8 valores de intensidad a partir del conjunto de imágenes tomadas por la cámara CCD. Posteriormente se obtuvo la distribución de polarización del vector de Stokes. Como se aprecia en la imagen [4.16](#) En la figura [4.16](#), a partir del conjunto de imágenes medidos se pudo determinar que el tipo de polarización emitido parece ser circular debido a que no hay cambios abruptos en la señal de la intensidad de salida de  $S_1/S_0$  respecto al de  $S_2/S_0$ . Sin embargo, dado que la resolución del sistema no permite distinguir las fibras, los resultados de la estructura y orientación de las fibras, decimos que los resultados en general que esta técnica permite, son ambiguos.

Tanto la fécula como el tejido presentan una sensibilidad a la polarización que se representa por la curva sinusoidal y es debido a que su estructura esta .ªlineada.ª en su mayoría presentan una orientación preferencial y esta orientación se corresponde con la polarización del láser. Dado que el arreglo aún es algo rudimentario es necesario

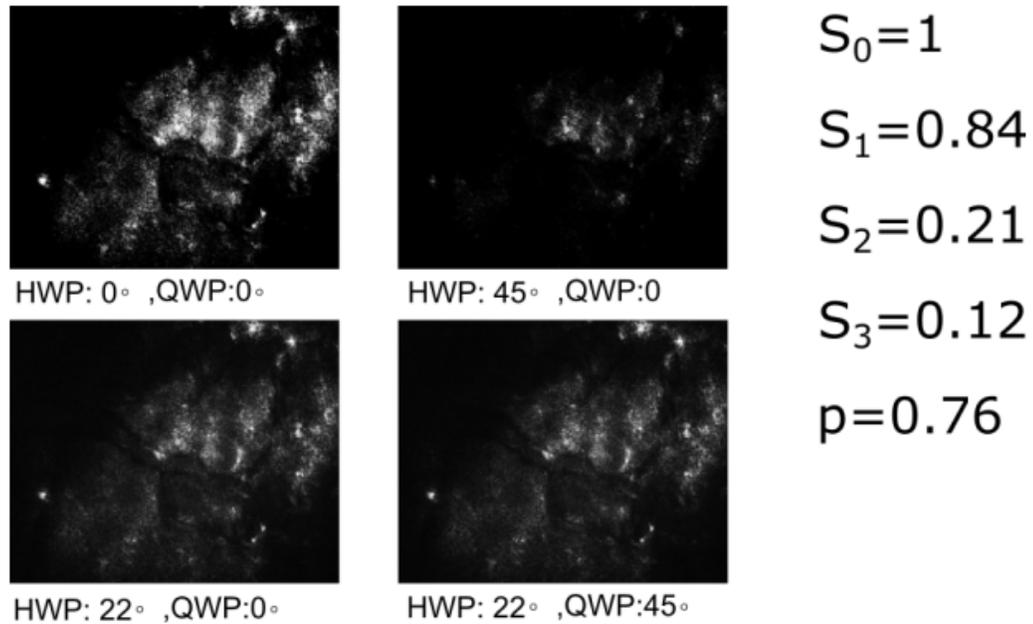


Figura 4.15: Parámetros de Stokes de una muestra de tejido dan información del SHG, sin embargo no brindan información sobre la estructura interna de las fibras de colágeno

que estas mediciones sean sobre un conjunto de fibras y no se necesite una gran resolución. No obstante nuestro sistema necesita mejorar la resolución, ya que las técnicas de análisis de textura, Fourier y machine-learning son altamente dependientes de la resolución. Así mismo, para mejorar nuestro análisis de parámetros de Stokes es necesario contar con una resolución óptima que permita definir las fibrillas y así mismo su orientación, tal como se ven en las imágenes captadas por el microscopio, ver los comparativos [4.4](#).

Así mismo, con el arreglo experimental que se propuso fue posible realizar mediciones complementarias a un microscopio confocal caso específico de la sensibilidad a cambios en la polarización. La versatilidad del arreglo permitió llevar a cabo esta técnica de caracterización que en un microscopio comercial serían muy complicadas y costosas de realizar.

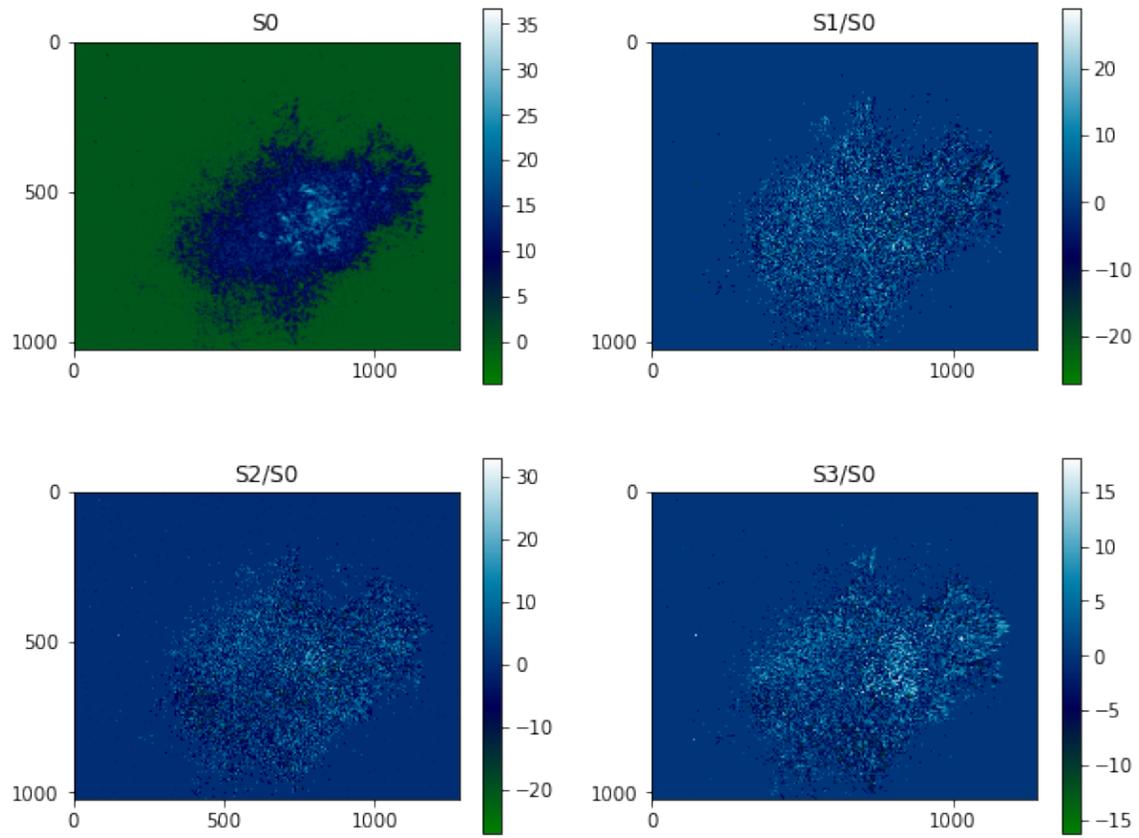


Figura 4.16: Parámetros de Stokes para una muestra de tejido

# 5 Generación de SHG con bombeo en longitud de onda del 1550nm

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para la generación de SHG en una muestra biológica de tendón porcino y en la fécula de maíz, utilizando un láser pulsado centrado en 1550 nm. Inicialmente se presenta el montaje experimental, seguido de las pruebas realizadas para detectar el fenómeno. Además de la dependencia de polarización de la señal de SHG.

Una de las principales motivaciones que nos llevo a la mediciones presentadas en este capítulo, fue reafirmar la hipótesis de que si una muestra de tejido de cerdo o la fécula de maíz producían SHG, entonces, se podría medir SPDC, por lo tanto, utilizamos este láser casero y el único disponible dentro del laboratorio en frecuencias del infrarojo.

## 5.1. Montaje Experimental de la detección de SHG

En este montaje se utilizó un láser de fibra pulsado que tiene como medio activo una fibra dopada con Erblio en una longitud de onda centrada en 1550 nm y con 35 mw de potencia. Para incidir la luz sobre una muestra de tejido de porcino se empleó una lente esférica de 8 mm de distancia focal tipo C. Así mismo la luz emitida por el tejido fue colectada con un objetivo de microscopio de 20x con una apertura numérica de 0.65. Para discernir la luz correspondiente de la señal de SHG y la luz del bombeo se colocó un filtro pasa bajas centrado en 930nm, posteriormente se colocó un dichroico el cual transmite longitudes de onda en 1550nm y refleja luz alrededor de los 780nm. Para obtener la imagen de la muestra se colocó un telescopio en el camino de la luz reflejada y la imagen se visualizó con una cámara CCD. Antes del telescopio con un espejo abatible se enfoca la señal a una fibra de 50 m de longitud que va al monocromador que esta conectado con la cámara ICCD para medir el espectro de la señal de SHG.

El láser utilizado esta en esta alongitud de onda El espectro del láser de fibra dopado de Erblio que se utilizó en este experimento se aprecia en la figura [5.3](#). El

El espectro de este láser se caracteriza por tener dos picos centrados en 1550 nm y en 1580 nm, y un ancho de banda de aproximadamente 55 nm.

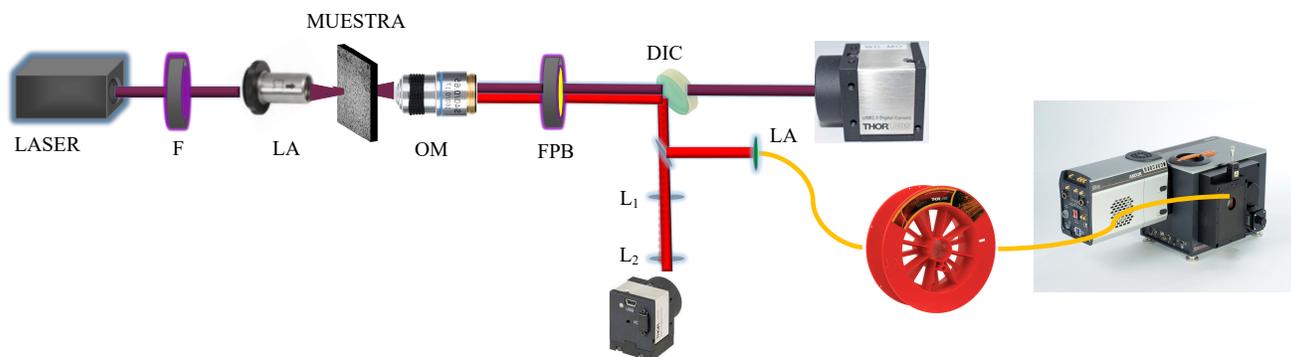


Figura 5.1: Esquema de la generación de segundo armónico con un láser centrado en 1500 nm. Se incide con un láser de fibra dopada de Herbio. Se utiliza una lamina de media onda F, una lente asférica tipo C LA para iluminar la muestra y un objetivo de microscopio OB para recolectar la señal, se colocan dos filtros un pasa altas de 950 nm y un pasabandas 1550 - 80, posteriormente un espejo dicroico que que transmite longitudes en 1500 nm y refleja longitudes menores a 1000 nm.

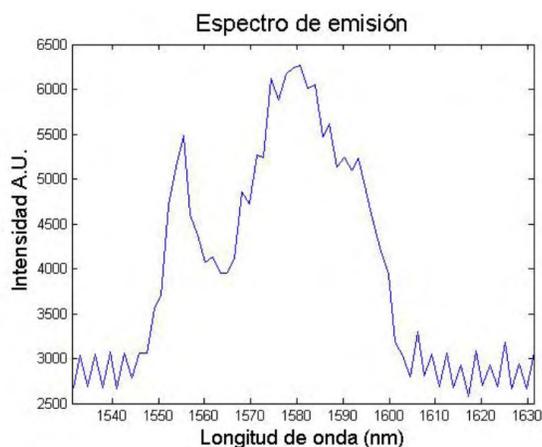


Figura 5.2: Espectro del láser de fibra pulsado

## 5.2. Mediciones del SHG para el tejido de cerdo

El espectro detectado por la señal SHG para tres regiones diferentes de la muestra se presenta en la imagen [5.3](#)

En la gráfica [5.3](#) se puede notar que para esta longitud de onda también se genera una señal de SHG como se reportó en el capítulo anterior de la detección de SHG al incidir un haz bombeo centrado en 810 nm. Esta señal presenta dos picos centrados en 775 nm y 790 nm aproximadamente, estos máximos son causados por el ancho del

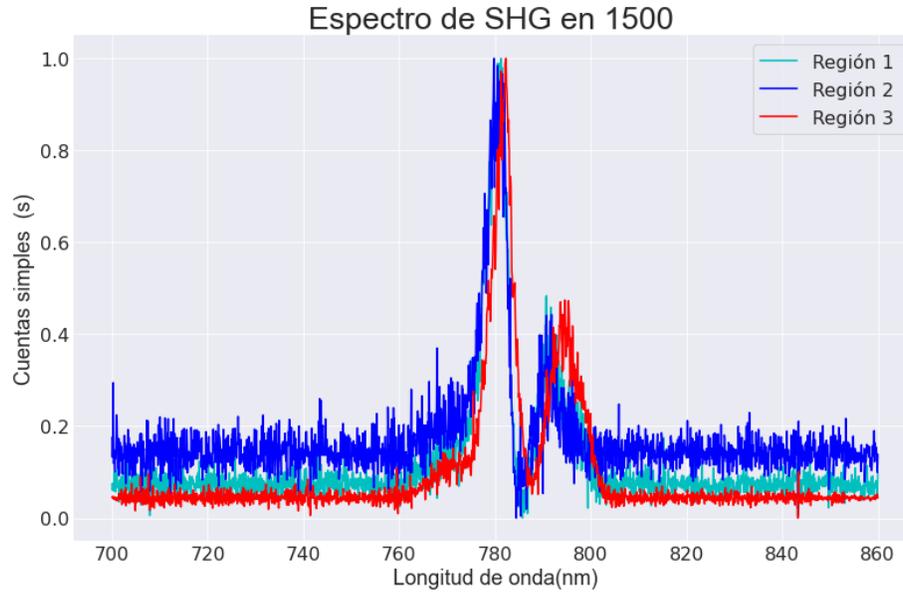


Figura 5.3: Espectro de la generación de segundo armónico en tejido porcino para diferentes zonas del material

espectro del láser de fibra como se ve en la figura 5.2. Así mismo, el corrimiento que se muestra entre los tres espectros que se corresponde a cada región son producidos por pequeños cambios en la potencia del láser.

### 5.2.1. Polarización del Tejido

La polarización del tejido se midió colocando una lamina  $\lambda/2$  onda para cambiar la polarización de la luz de bombeo que incide sobre la muestra. En las figuras 5.4 y 5.6 se evidencia las imágenes obtenidas ante el cambio de la polarización. Así mismo en los gráficos 5.5 y 5.7 se realizó una construcción de la intensidad máxima de cada una de las imágenes obtenidas al cambiar el ángulo de polarización.

El tejido presenta una respuesta notoria al cambio de la polarización en la señal de SHG. En la región 1 de la gráfica 5.5 su nivel intensidad más alto tiene un periodo de  $90^\circ$  y su nivel de menor intensidad esta centrado alrededor de los  $45^\circ$ . En la región 2 representada en la gráfica 5.7 su nivel de menor intensidad se encuentra en los  $50^\circ$  y su nivel intensidad máxima presenta un periodo de  $90^\circ$ , aunque ambas gráficas reportan mínimos y máximos de intensidad en longitudes de onda cercanas, la intensidad normalizada que se corresponde a cada ángulo es distinta, por ejemplo en un ángulo de  $10^\circ$  en la región 1 la intensidad esta 0.6 UA mientras que en la región 2 esta en 0.9 UA, esto indica que cada región del tejido presenta diferente sensibilidad a la incidencia de luz polarizada que posiblemente es ocasionado uno por la orientación de las fibrillas o dos por la cantidad de colágeno distribuido en el tejido.

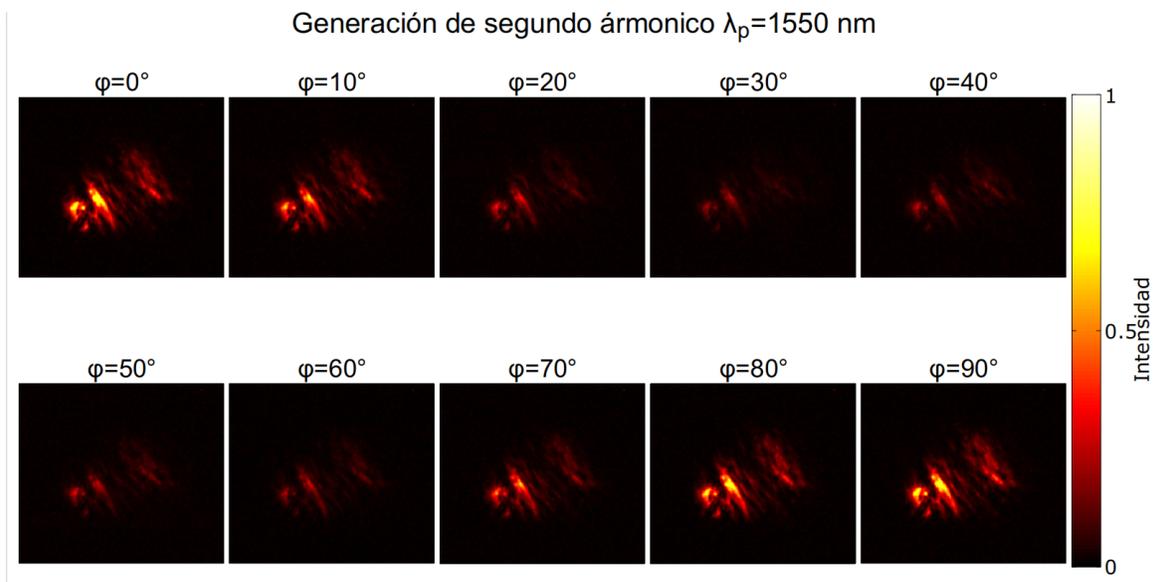


Figura 5.4: Respuesta de Polarización del tejido en región 1 Imágenes de campo amplio del tejido



Figura 5.5: Respuesta de Polarización del tejido de cerdo en región 1 en función a como cambia la intensidad

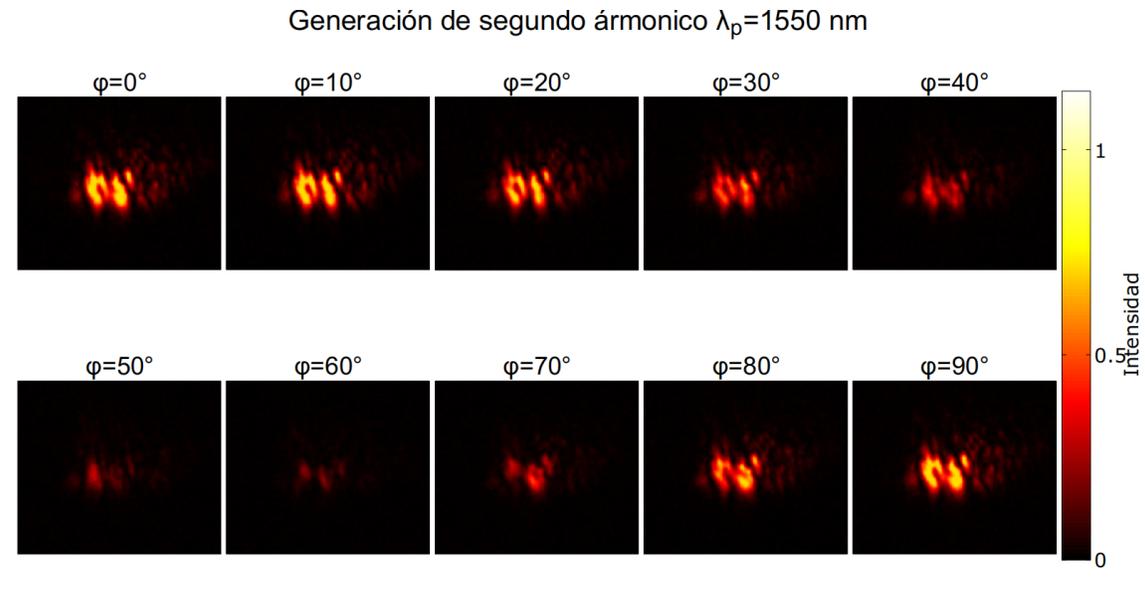


Figura 5.6: Respuesta de Polarización del tejido de cerdo en región 2 Imágenes de campo amplio del tejido



Figura 5.7: Respuesta de Polarización del tejido en región 2 en función a como cambia la intensidad

### 5.3. Mediciones del SHG en la fécula de maíz

De igual forma al cambiar la muestra de tejido por la fécula se obtuvo el espectro en dos regiones diferentes, como se ve en la figura [5.8](#)

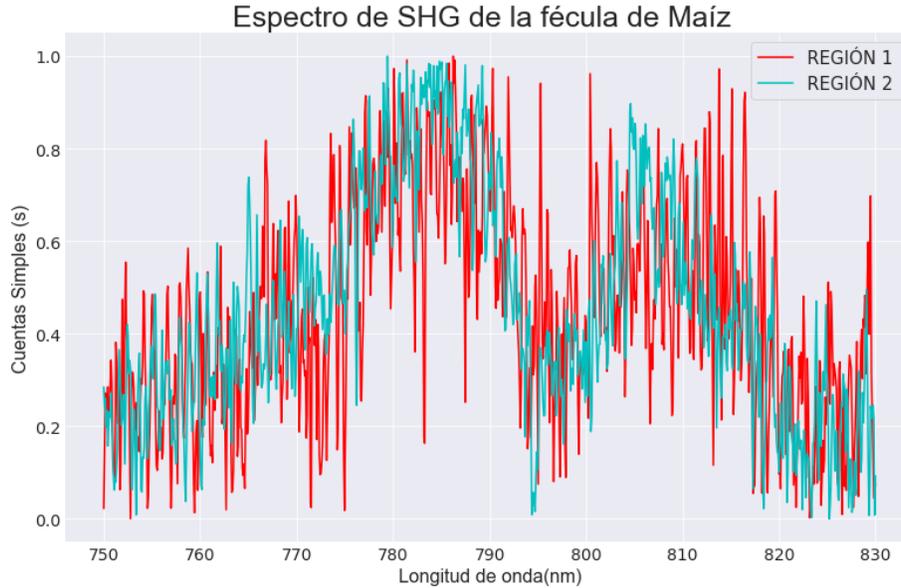


Figura 5.8: Espectro de la generación de segundo armónico en fécula de maíz para dos regiones

Como resultado se mostró que efectivamente hay una señal de SHG emitida por la fécula de maíz que se corresponde a dos picos producido por la señal del bombeo del láser. cuyos máximos está en  $808 \pm 20$  nm y  $784 \pm 15$  nm aproximadamente. La señal es baja, pero es suficiente para ser detectada por nuestro sistema.

En la fécula fue más complicado medir la señal debido a que el enfoque era muy alto, y la potencia del láser era baja, además algunas veces se detectaba la señal de un único grano y no de un cumulo, estos tres factores hicieron más complicada la detección de la señal de SHG.

Unos de los resultados más importantes de este capítulo es que efectivamente las muestras biológicas de tendón de cerdo y la fécula de maíz generan segundo armónico al trabajar en longitudes de onda de 1550 nm, del mismo modo que en el capítulo 4 es posible medir la sensibilidad a cambios de polarización.

# 6 Medición de la Conversión paramétrica descendente espontánea (SPDC) usando un bombeo de 405nm

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para la generación de SPDC en muestras biológicas de tendón de cerdo y en fécula de maíz. Inicialmente se colocó el montaje experimental para la detección de cuentas simples y en coincidencias de parejas de fotones, seguido de las pruebas realizadas para registrar el espectro del fenómeno óptico.

Usamos una fuente de bombeo centrada en 405 nm dado que como se mostró en el capítulo anterior se ve la señal de SHG y buscamos afirmar la hipótesis de: dado que un tejido presenta una señal de SHG es posible hacer la medición del mismo tejido pero de SPDC, fenómeno que hasta la fecha no esta reportado.

## 6.1. Montaje Experimental

### 6.1.1. Registro de cuentas simples en la detección de SPDC

Lo primero que se hizo para detectar el SPDC fue obtener cuentas simples y en coincidencias de parejas de fotones. Con este fin se hizo un montaje en el cual se utilizó un láser de onda continua CW centrado en una longitud de onda 405 nm marca cristaLaser, con 150 mW de potencia. La luz colimada se enfocó sobre la muestra con varios objetivos de microscopio para cambiar la ventana de iluminación sobre la misma y el plano de enfocamiento, de igual forma la luz emitida por el tejido fue recolectada con varios objetivos que cambiaban el ángulo sólido de recolección. Seguido a esto se utilizó un filtro pasa bajas centrado en 680 nm con un ancho de 25nm (Semrock FF01 680 / SP-25) y un filtro pasa bandas con una longitud de onda de corte de 405 nm y un ancho de 20 nm (Semrock FF01-405 / 20). Posteriormente, se colocó un divisor de haz 50:50 por donde viajaban los fotones señal y acompañante por distintos caminos, cada uno por una fibra multimodo de la misma longitud y núcleo, las cuales estaban por separado conectadas a dos detectores APDs. Posteriormente, la salida del pulso emitido por cada detector fue registrado por un etiquetador de tiempo (ID800) como se muestra en el esquema de la figura [6.1](#).

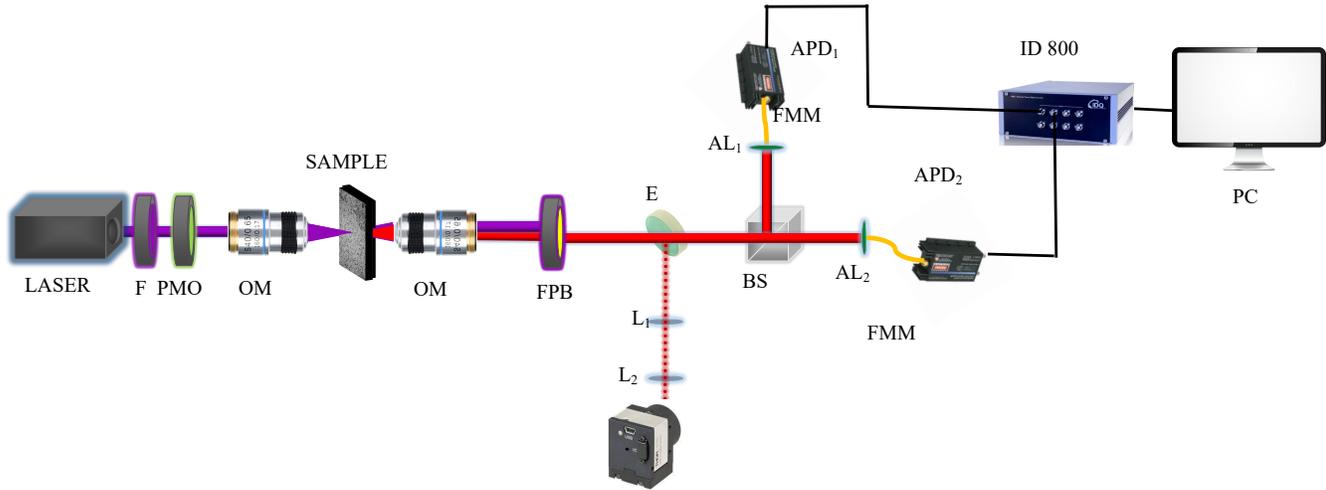


Figura 6.1: Esquema de la generación de la conversión paramétrica descendente usando el detector Id800. F: filtro pasa bajas, PMO: lámina de  $\frac{\lambda}{2}$ , OM: objetivo de microscopio, FPB: filtros pasa bandas y pasa altas, L: lente plano convexa, E:espejo abatible, FMM: fibras multimodo, BS:divisor de haz, APD: foto detectores

Al incidir la luz sobre 4 zonas del tejido se registraron las siguientes mediciones de la tabla 6.1.

C. Simples A	C. Simples B	C.Coincidencias/s	C. Accidentales/s
500000	480000	2700	1200
600000	650000	2500	1950
480000	420000	2400	1008
600000	650000	2500	1950

Tabla 6.1: Cuentas simples en cuatro regiones diferentes del tejido

En las cuentas de fotones obtenidas con dos APDs se notó que las cuentas de la ventana de coincidencias eran bajas, dado el número de coincidencias de las cuentas accidentales. Obteniéndose alrededor de 500 mil cuentas simples en cada brazo y 2500 cuentas de coincidencias, las cuales son bajas al ser comparadas con las que se registraron en la medición para un cristal BBO como se ha reportado en la sección 6.3.1 y en la literatura [29].

### 6.1.2. Detección de espectros de cuentas en coincidencias de fotones

Dentro de este estudio se busco resolver espectralmente la señal obtenida en la fécula de maíz y en en el tejido, por lo tanto, se utilizó un diseño experimental similar al descrito en la sección 6.1.1, el cambio que se hizo para detectar el espectro

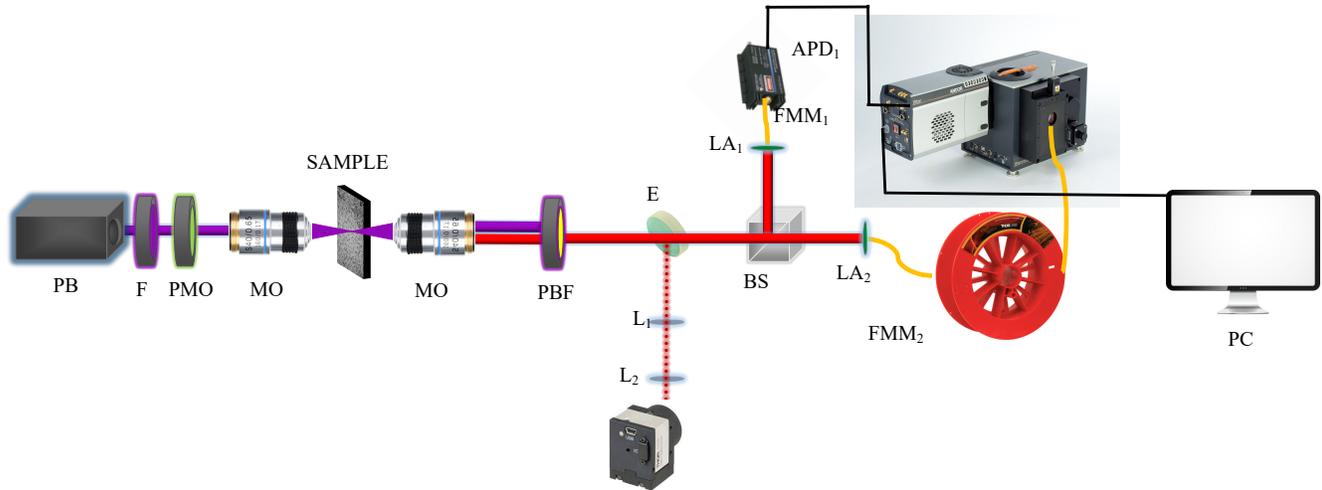


Figura 6.2: Esquema de la generación de la conversión paramétrica descendente cuya finalidad es medir espectros de cuentas en coincidencia de la parejas de fotones. F: filtro pasa bajas, PMO: lámina de  $\frac{\lambda}{2}$ , OM: objetivo de microscopio, FPB: filtros pasa bandas y pasa altas, L: lente plano convexa, E:espejo abatible, BS:divisor de haz , APD: foto detectores, FMM: fibra multimodo

del SPDC fue Posterior al divisor de haz 50:50 que se encarga de separar los fotones señal y acompañante. Por un lado, los fotones señal fueron recolectados con una fibra multimodo y llevados a un detector de fotones individuales de silicio (APD) que a su vez estaba conectado a la cámara intensificada ICCD para abrir la ventana de detección. En el otro camino, los fotones acompañante viajaban por una fibra de 50 m de longitud la cual estaba conectada al monocromador para medir el espectro de coincidencias de parejas de fotones.

## 6.2. Medición de espectros ópticos diferentes al SPDC

Como segunda prueba se midieron los espectros de cuentas simples en el tejido y en la fécula de maíz reportados en las figuras 6.3 y 6.4 utilizando un monocromador y la cámara ICCD para un solo brazo proveniente de la luz emitida por las muestras. En la primera figura 6.3 se compara el espectro de un cubreobjetos sin muestra con el espectro de la fécula de maíz. En la figura 6.4 se muestran dos espectros que caracterizan el tejido de cerdo, la diferencia radica en que uno de los espectros se enfocó sobre el tejido con un objetivo de 40x y en el otro se incidió el haz directo del láser.

Los espectros mostrados en las gráficas 6.4 y 6.3 fueron obtenidos con un sistema espectrográfico constituido por un monocromador y una cámara intensificada, como se describe en la figura 6.2. Este sistema espectroscópico funciona uniendo secciones espectrales a trozos de 40 nm de ancho, cuya transmisión máxima de dicha sección se

encuentra en el punto medio de la ventana espectral. Por lo anterior, la forma de las gráficas, donde se mide un espectro mayor a 40 nm, contiene varios mínimos y máximos locales; consecuencia de la unión de todas las ventanas espectrales necesarias para obtener el espectro completo de la señal bajo estudio. Por ejemplo, las figuras 6.4 y 6.3 están compuestas por 9 mediciones unidas por el software de la cámara con un traslape de 20 %.

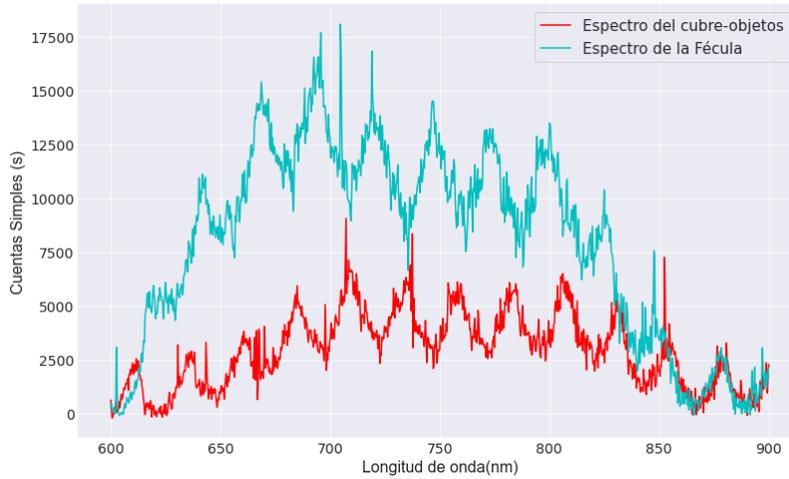


Figura 6.3: Espectro de la Fécula de Maíz

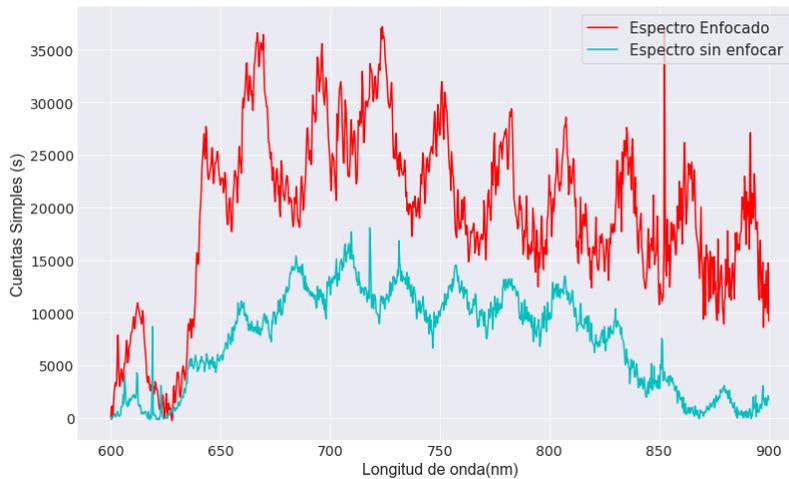


Figura 6.4: [a]. Espectro de tejido de cerdo enfocado con el objetivo de 40x (Curva de color Rojo). [b]. Espectro de tejido de cerdo sin enfocar (curva de color azul)

Podemos ver que en la figura 6.3 se obtiene el espectro proveniente de la medición de la fécula de maíz. Además de la contribución hecha por cubreobjetos que es de menor proporción al de la fécula de maíz. Como se puede observar este espectro óptico tiene un ancho de banda significativamente mayor al de un proceso SPDC, muy

diferente al que se presenta en en la subsección [6.3.1](#) para el cristal BBO.

La figura 6.4 a dibujada de color rojo corresponde al espectro obtenido con el objetivo de 40x, donde, se puede notar que hay un decaimiento en la señal y posiblemente evidencia un daño en la muestra debido al grado de enfocamiento y al tiempo de exposición de la luz sobre el tejido (es decir, que al captar el espectro de 600 nm a 900 nm se enfocó por un tiempo prolongado en el tejido). Por lo anterior y a sabiendas que la eficiencia del proceso SPDC no depende del grado de enfocamiento se opto por incidir un spot de mayor tamaño sobre la muestra, obteniendo así el espectro mostrado en la figura 6.4 b de color azul. El ancho de banda se corresponde a una señal que posiblemente es fluorescencia, dado que en este es un proceso no paramétrico (en el cual no se conserva la energía de los fotones); su tiempo medio de vida es mucho más largo que el SPDC, además de que la irradianza de este fenómeno esta en un ángulo sólido diferente, es decir que la fluorescencia se genera en todas las direcciones.

De las gráficas anteriores podemos concluir que hay un fenómeno óptico que no permite discernir una señal de SPDC, por lo que es necesario realizar un conjunto de mediciones que nos permita aislar la señal de otras. Para esto, se proponen 3 tipos de filtrado de luz: espacial, temporal y espectral con el fin de poder visualizar el SPDC.

## 6.3. Filtrado de luz

### Condiciones del sistema óptico, filtrados de luz

El objetivo con estos filtrados es determinar si la señal medida corresponde al SPDC proveniente del tejido de cerdo y de la fécula de maíz, teniendo en cuenta que se incide con un haz láser de longitud de onda de 405 nm, por ende se espera encontrar un espectro de cuentas simples y coincidencias con el doble de longitud de onda, si es proceso degenerado, es decir con un máximo en 810 nm.

#### 6.3.1. Señales emitidas con BBO

El filtrado espectral consiste en discriminar las longitudes de onda que no corresponden a la luz con la longitud de onda esperada, para ello se utilizó un filtro pasa altas con longitud de onda de corte en 600 nm representados por la línea azul. Con el mismo filtro se midió el espectro de un BBO para comparar tal como se presenta en la imagen [6.5](#).

Este comparativo sugiere que el espectro de cuentas simples por segundo, respecto de la longitud de onda emitido por la fécula de maíz es proveniente a otro fenómeno diferente al SPDC, debido a que su ancho de banda del espectro de la fécula de maíz va de los 600 nm a los 900 nm, diferente a como sucede con un espectro de un cristal BBO el cual presenta un pico centrado en 810 nm que corresponde a la emisión del

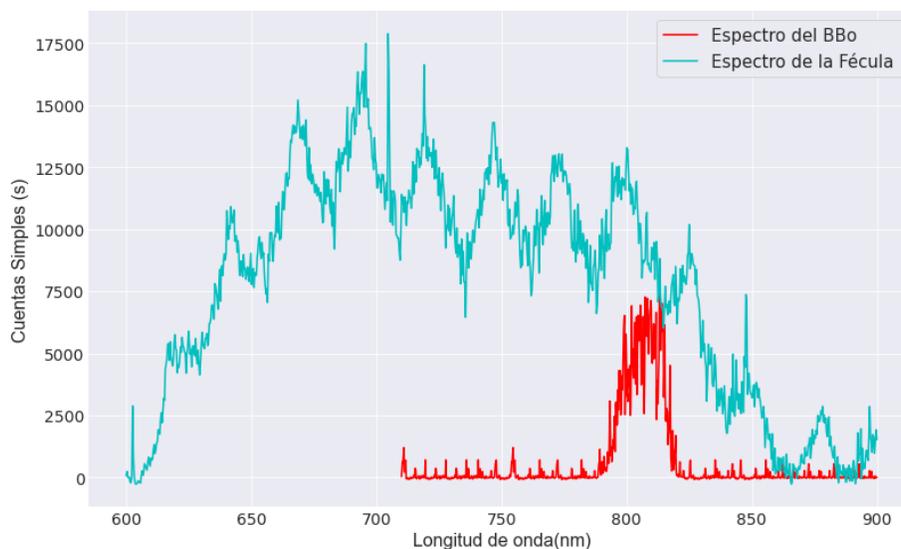


Figura 6.5: Espectro de la Fécula de maíz representado por la línea azul y espectro del BBO

SPDC, Ver la figura [6.5](#)

Así mismo, la intensidad de la señal de SPDC del BBO es más baja que la emitida por la señal de la fécula registrada en la curva de color azul, además si se compara la curva del BBO de la gráfica [6.5](#), respecto de la curva del espectro del cobre objetos en la gráfica [6.3](#) (ambas de color rojo), estas señales son de intensidad similar, por lo tanto, la señal de solo el cobre objetos no permite visualizar la señal de SPDC de la fécula, ni del tejido.

## Filtrado temporal

El filtrado temporal consiste en compensar un retraso temporal (delay) óptico del fotón señal con un retraso temporal electrónico por donde viaja el fotón acompañante con el fin de que ambos lleguen al mismo tiempo de la detección. Debido a que si dos fotones no llegan al mismo tiempo no se pueden registrar la cuentas de coincidencias por segundo. Como ya se mencionó en el montaje experimental se utilizó una fibra de 50 m de longitud, la cual estaba conectada a un monocromador esto produjo un delay óptico, es decir que la luz que viaja por uno de los brazos se retrasa un  $\delta t$ , tal que tuvo que ser compensado con un delay electrónico, para esto, cada pulso es procesado por una secuencia de módulos NIM que discrimina los pulsos entrantes, controla su ancho e introduce un retardo electrónico, que garantiza la superposición de la puerta de detección en la cámara intensificada ICCD. Así mismo, para la calibración del delay se utilizó como fuente de SPDC un cristal de BBO, el cual genera SPDC tipo I y permite obtener una ventana de coincidencias, con esto se estableció el delay adecuado para detectar SPDC, tal como se aprecia en la gráfica [6.6](#)

La figura [6.6](#) representa 7 espectros de la generación de SPDC del cristal BBO,

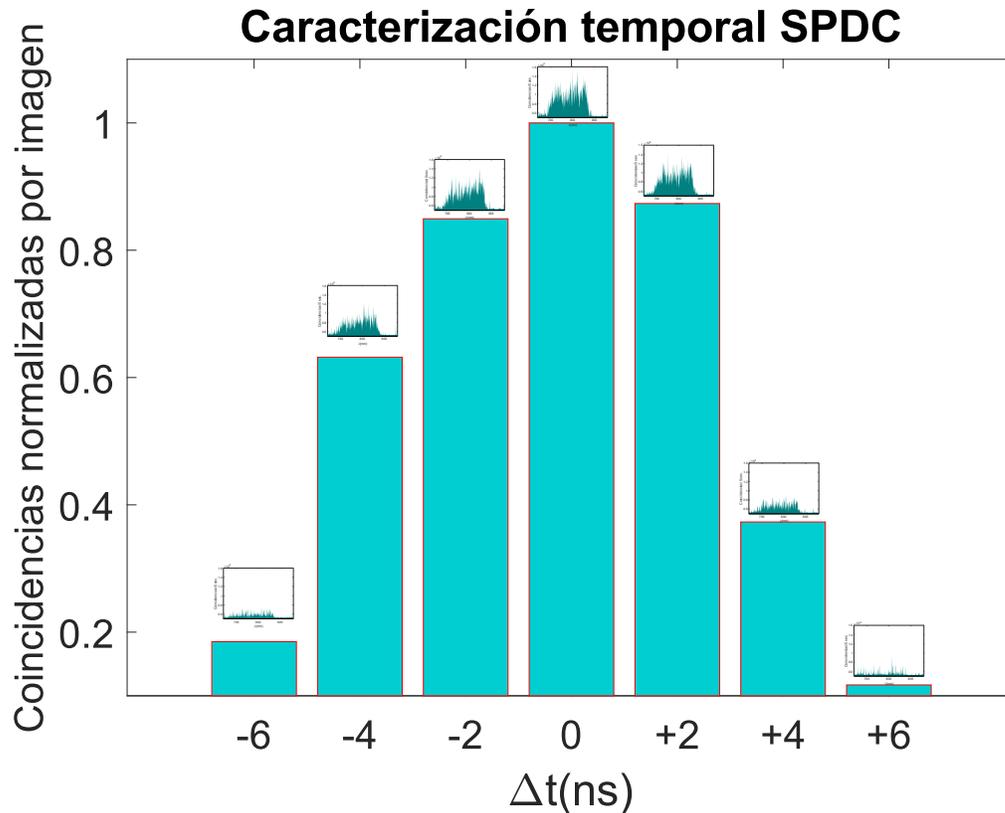


Figura 6.6: Distribución normalizada de los espectros de coincidencias con distinto retardos ópticos

con lo cual se aprecia que el pico situado a un  $\Delta t = 0$  se corresponde con el retraso de 142 ns, en este punto las coincidencias son máximas y fuera de esa ventana de tiempo la señal de SPDC decae.

En la figura [6.7](#) se muestran los espectros del BBO, donde la señal de SPDC es máxima cuando no hay diferencia temporal entre los fotones señal y acompañante  $\Delta t = 0$  ns diferente a como sucede para una ventana temporal de  $\Delta t = 12$  ns donde no hay señal de SPDC. Además su ancho de banda va alrededor de los 790 nm a los 825 nm.

### 6.3.2. Señal emitida por el tejido y la fécula de maíz

Posteriormente, se cambio el cristal BBO por las muestras de tejido biológico en el sistema temporal de calibración, y se midió el espectro de coincidencias por segundo con el retraso temporal electrónico encontrado en 142 ns, en el rango de la longitud de onda de los 770 nm a los 830 nm, dado que se utiliza un filtro pasabandas (810-40 nm). Sin embargo, como se aprecia en la figura [6.8](#) no hay cambio en la cuentas de coincidencias por segundo al cambiar el retaso temporal electrónico contrario a como

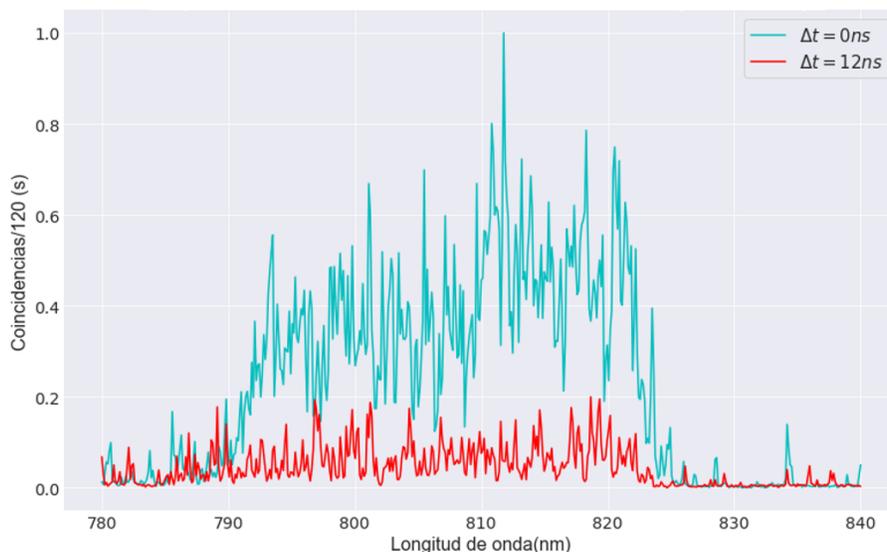


Figura 6.7: Espectros de un retraso temporal sobre un cristal BBO, línea azul representa el espectro sin retraso temporal y la línea roja corresponde al espectro fuera del retraso temporal

sucedió con el cristal BBO, por lo tanto, no es posible la visualización del SPDC con el filtrado temporal, nuevamente la idea de que la presencia de otro fenómeno óptico es predominante se confirma con estos espectros.

### Medición de coincidencias en diferentes condiciones de excitación y recolección

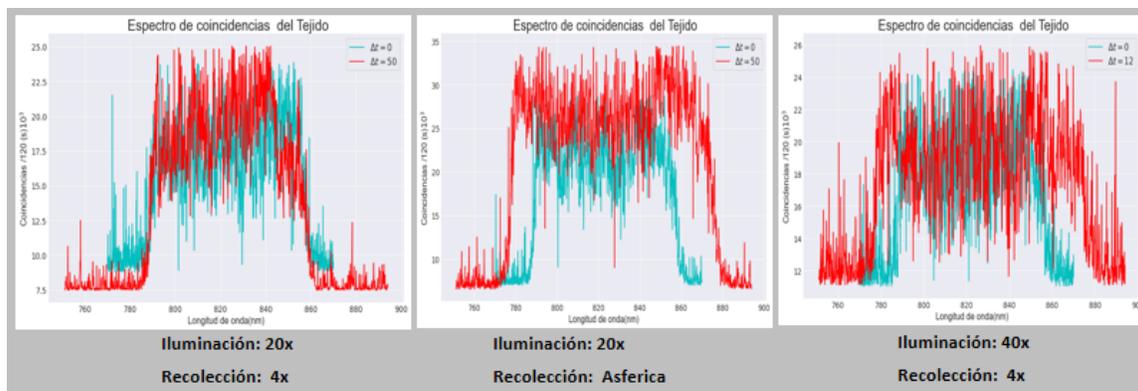


Figura 6.8: Espectros de coincidencias/segundo respecto a la longitud de onda emitido por la muestra de tejido biológico.

Al realizar el filtrado espacial se hizo un cambio de objetivos antes y después de la muestra, esto con el fin de cambiar el ángulo sólido de iluminación y de recolección. Primero se enfocó sobre el tejido con un objetivo de 20x luego se cambió la iluminación con un objetivo de 40x, aquí se disminuyó el tamaño del spot de incidencia sobre

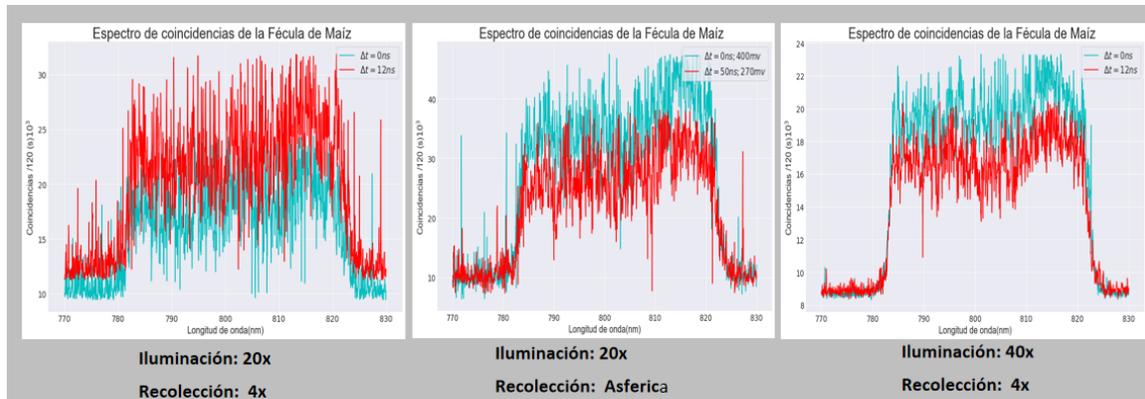


Figura 6.9: Espectros de coincidencias/segundo respecto a la longitud de onda emitido por fécula de maíz.

la muestra, para la recolección de la luz generada o emitida por la muestra, para esto se usaron una lente asférica de 8 mm de distancia focal y un objetivo de 4x como se muestra en la figura [6.8](#). También se cambio la muestra de tejido por una muestra de fécula de maíz la cual se enfocó e ilumino con los mismo objetivos usados en el tejido, como aparece en la figura [6.9](#).

En las tres imágenes no hubo cambio significativo de los espectros al variar la iluminación o la recolección de las imágenes con el tejido, se obtuvo que todas las cuentas de coincidencias por segundo son de alrededor del treinta mil (30.000 cuentas/s). Así mismo, se hicieron las medidas teniendo en cuenta el retraso temporal electrónico donde no se evidenció ningún cambio, y en ninguna se registró un cambio de intensidad significativo, por el contrario se corroboró que es imposible detectar SPDC ya que la señal del otro fenómeno óptico es mayor.

Además, al revisar el número de cuentas de coincidencias por segundo al cambiar el objetivo de 40x y el de 20x no hay un cambio significativo en las cuentas detectadas, por lo tanto bajo las condiciones de medidas establecidas no es posible medir SPDC en tejidos, ni en la fécula de maíz.

## Tejido desenfocado

Como prueba final de detección de SPDC en el tejido se desenfocó el spot que incide sobre la muestra para esto se cambia el esquema y en vez de usar un objetivo como fuente de iluminación se deja pasar el haz láser colimado. La medición de los espectros en coincidencias por segundo se presenta en la figura [6.10](#).

Al desenfocar sobre el tejido se encontró que no hay un cambio significativo en las cuentas de coincidencias por segundo, además tampoco cambia el espectro al salirse del retraso temporal como si ocurrió con el cristal BBO, ver figura [6.7](#).

Con las condiciones experimentales que presentamos encontramos que hay un fenómeno de fluorescencia, que no permite ver la señal de SPDC, lo que nos condujo a realizar un conjunto de mediciones para aislar la señal sin éxito.

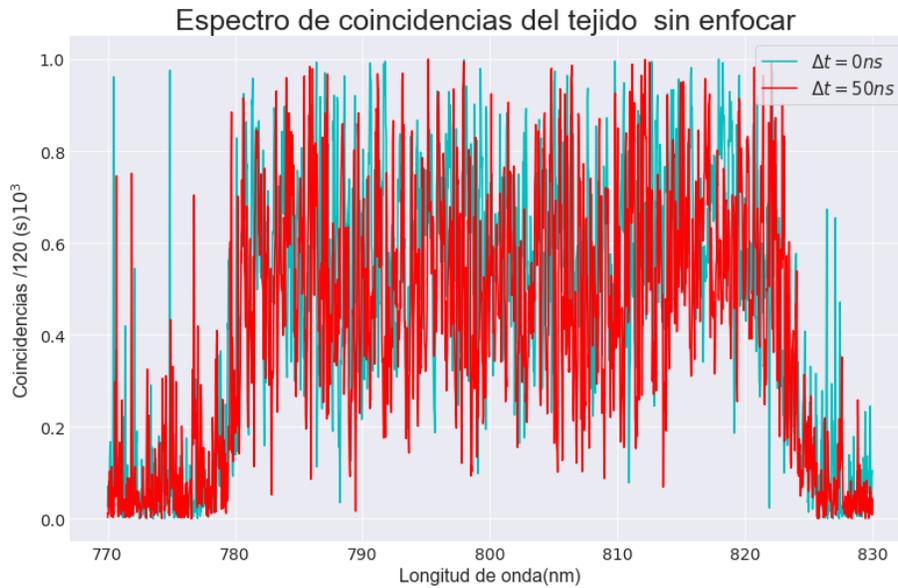


Figura 6.10: Espectros de coincidencias/segundo emitido por el tejido respecto a la longitud de onda. La muestra es iluminada sin un objetivo objetivo de 20x y es recolectada con una lente esférica

El resultado presentado en la figura [6.5](#) es importante por que indica que la señal de cuentas simples de luz de un cristal BBO el cual en la literatura es considerado como uno de los más eficientes para emitir o detectar SPDC es menor que el emitido por el tejido de cerdo por lo que nos hace reafirmar la existencia de otra señal de luz proveniente de un fenómeno físico distinto al SPDC.

# 7 Medición de SPDC en frecuencias del infrarojo

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para la generación de SPDC proveniente de tejido de cerdo, utilizando un láser de onda continua centrado en 775 nm.

En primer lugar, se trabajó en esta longitud de onda por que de antemano nuestros resultados del capítulo 5 evidenciaron que se produce SHG si se trabaja con un bombeo de 1550 nm, esto nos permitiría reafirmar la hipótesis que nos llevo a proponer este experimento, que si hay SHG se puede esperar la detección de SPDC, así mismo en el capítulo 6 se mostró que al usar un bombeo centrado en 405 nm apareció un fenómeno de fluorescencia que impidió la detección de SPDC, por lo tanto este estudio se limitó a buscar una región donde no apareciera fluorescencia. Otra razón por la cual se decidió trabajar en esta región, fue por la disposición de los filtros y óptica disponible en el laboratorio para garantizar la medición en 1550 nm.

## 7.1. Montaje Experimental de la detección de SPDC

En este montaje se utilizó un láser CW centrado en 775 nm de longitud de onda y 100 mW de potencia. La luz colimada se enfocó sobre las muestras con varios objetivos para cambiar la ventana de iluminación sobre la misma, y la luz emitida por el tejido fue recolectada con una lente esférica de 8 mm de distancia focal tipo C, seguido a esto se utilizó un filtro pasa altas (Semrock FF01 900 / LP) con una longitud de onda de corte de 900 nm, y un filtro pasa bandas centrado en 1550 nm y un ancho de banda de 40 nm (Semrock 01-1550 / 40). Posteriormente, se colocó un divisor de haz 50:50 que se encarga de separar los fotones señal y acompañante. Dichos fotones fueron colectados cada uno por una fibra monómodo y llevados a un contador de fotones InGaAs y la salida del pulso emitido por cada InGaAs fue detectada con un contador de tiempo (ID800) como se muestra en la figura [7.1](#)

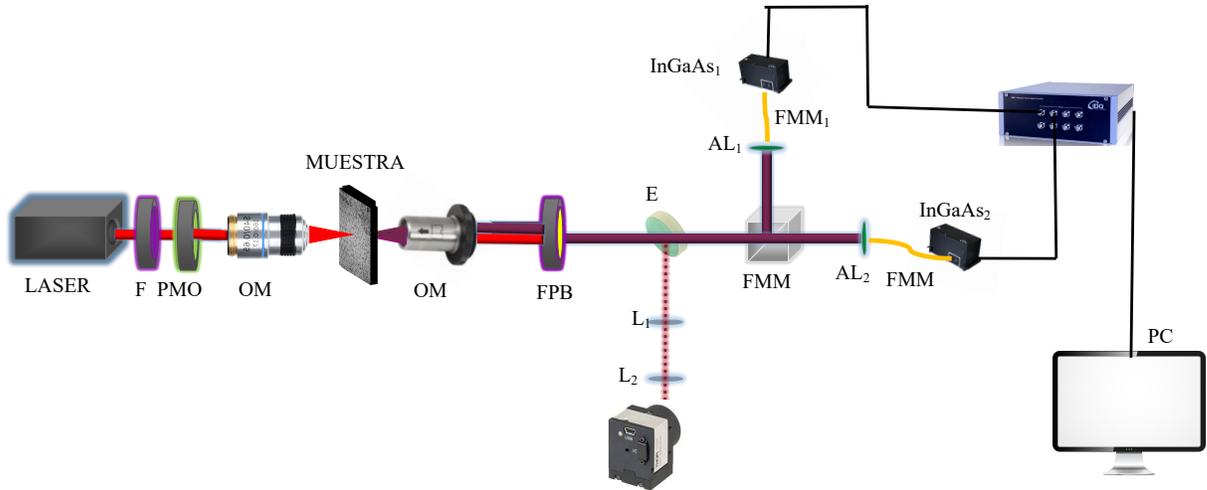


Figura 7.1: Esquema de la generación de segundo armónico con un láser entrado en 1500nm

## 7.2. Resultados de la detección de SPDC

En las mediciones se obtuvieron los siguientes registros de la tabla 7.1 al incidir el bombeo de 775 nm sobre 5 regiones del tejido, donde la imagen estaba completamente enfocada por un objetivo de microscopio de 40x y dos mediciones donde la imagen estaba desenfocada. En la figura 7.2 cada histograma presenta las cuentas simples de cada brazo junto con las cuentas de coincidencias/s.

C. Simples A	C. Simples B	C. Coincidencias	C. Accidentales
52000	58000	32	27.2
62500	51700	30	16.2
45200	51300	23	11.6
Sin enfocar			
57300	44500	22	12.7
63500	54150	44	17.2

Tabla 7.1: Registro de cuentas de fotones al incidir con un bombeo de 780nm

Los histogramas 7.2 podemos ver que las cuentas en las 5 regiones son similares y son muy bajas comparadas con las cuentas simples, por otro lado al colocar una lámina de  $\frac{\lambda}{2}$  no se aprecian cambios de polarización como se reportó en los capítulos del SHG. Además en el registro de la tabla 7.1 se observa que gran parte de las cuentas de coincidencias son accidentales.

También se intentó medir los espectros utilizando el sistema del monocromador con la cámara intensificada, tal como se hizo en el capítulo anterior de SPDC, pero el registro de las cuentas simples y en coincidencias fueron bajas, lo que impidió detec-

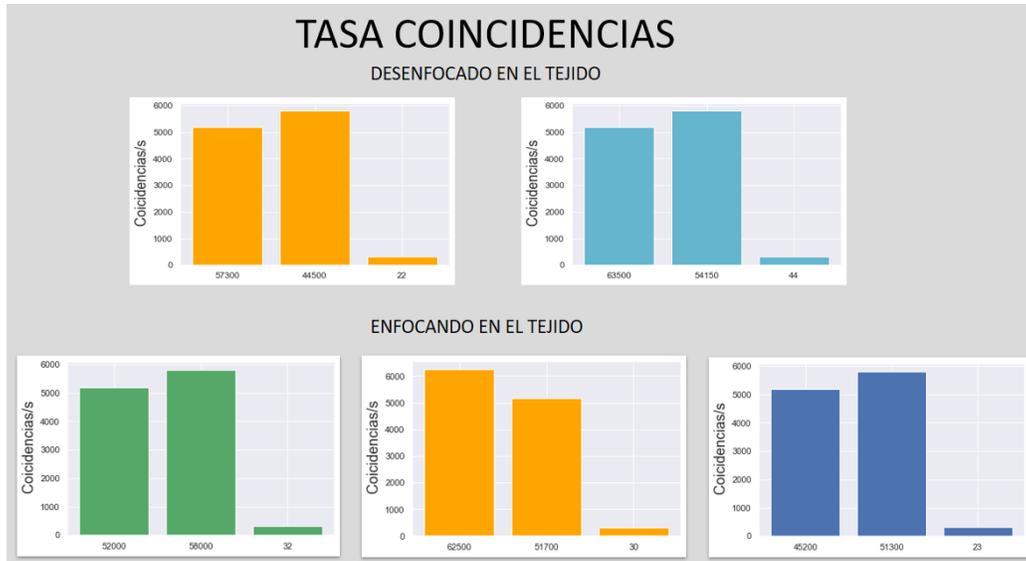


Figura 7.2: Histograma de de la tasa de coincidencias para la generación de SPDC

tar alguna señal proveniente del tejido en este sistema, en otras palabras se esperaba obtener una señal alrededor de 1550 nm si fuera una emisión degenerada y como resultado no se logró visualizar el espectro que indicara la señal de SPDC.

Uno de los principales factores que afectaron la medición fue la óptica que se utilizó. Caso específico los detectores InGaAs presentan un 25 % de eficiencia disminuyendo la eficiencia de la medida, así mismo el monocromador y la cámara es un espectrómetro "débil", por lo tanto requería de mayor cantidad de potencia o intensidad de luz para emitir el espectro que nos indicará a que fenómeno pertenecía la luz que se midió con el contador de tiempos ID 800.

Al trabajar con un bombeo centrado 405 nm y esperar una detección de SPDC centrada en 810 nm se midió un fenómeno de fluorescencia que no se pudo filtrar y esto impidió hacer la medición, por lo tanto se decidió trabajar en otra longitud de onda, donde no se generara este fenómeno óptico, así que al intentar medir el SPDC en 1550 nm como se presentó en este capítulo, no se pudo detectar por la baja emisión de señal que se obtuvo.



## 8 Conclusiones

En este trabajo se pudo concluir que no es posible medir la conversión paramétrica descendente (SPDC) proveniente de muestras biológicas de tejido de cerdo, ni en la fécula de maíz para las condiciones experimentales establecidas en este proyecto, es decir, con la utilización de dos láseres de onda continua cw, centrados en 405 nm y en 775 nm de longitudes de onda; tampoco para muestras de tejido de cerdo que eran de un grosor de 300  $\mu\text{m}$ .

Con este proyecto se determinó que los espectros medidos corresponden a la fluorescencia proveniente de las muestras empleadas. Y que con ninguno de los 3 filtrados ópticos de luz es posible medir las coincidencias de las parejas de fotones. Es decir que con los tres filtrados (espacial, espectral y temporal) se ratifica que no es posible aislar la señal de fluorescencia como se especifica a continuación: con el primer filtrado espectral se concluye que la intensidad de luz no aumenta, ni disminuye al usar los filtros pasa-bandas y pasa-altas, ni tampoco se puede identificar la señal de SPDC; en el segundo filtrado después de haber caracterizado el correcto retraso temporal para generar parejas de fotones, al usar un cristal BBO donde si se evidencia como cambia el espectro en cuanto se hace mayor o menor el retraso temporal del óptimo, no hay un cambio significativo al variar la ventana temporal en los espectros de las muestras biológicas o en la fécula de maíz, por lo tanto es imposible distinguir las cuentas de coincidencias de las parejas de fotones, en un retraso temporal corto respecto del óptimo, ni en un retraso temporal largo o alejado del óptimo; finalmente como última prueba al cambiar los objetivos de medición tanto en la iluminación como en la recolección de la luz se encontró que no es posible medir SPDC dado que no hay variaciones significativas de los espectros con retrasos temporales.

Al usar un láser de bombeo de 405 nm se observó un mayor deterioro de las muestras, lo cual es una desventaja para un futuro análisis y estudio de tejidos biológicos o almidones. Sin embargo, este deterioro se disminuye utilizando longitudes de onda mayores, por lo que en este trabajo se incidió con un bombeo de 780 nm en el tejido y la fécula de maíz con el fin de generar una señal del SPDC alrededor de 1550 nm, sin embargo con las características y condiciones del montaje que se presentó en el último capítulo no se obtuvo una señal generada que correspondiera a este proceso óptico, ni tampoco fue posible medir su espectro debido a la baja eficiencia en la detección de cuentas simples y en coincidencias de parejas de fotones.

En el caso de la generación del segundo armónico la señal es fuertemente dependiente a cambios en la polarización de bombeo, su intensidad se ve afectada por el cambio de dirección en el vector de polarización.

En las mediciones de SHG con el microscopio construido en este proyecto que capta imágenes de campo amplio se encontró que con dicho sistema óptico no es posible discernir la orientación de las fibrillas porque no se logran resolver. Sin embargo funciona como un sistema alternativo al microscopio comercial en el que se permite hacer mediciones de la respuesta de polarización emitida por la señal de SHG.

El último resultado de este trabajo, se presenta la respuesta de la señal del SHG utilizando una longitud de onda de 1550 nm, donde nuevamente se reafirma que la composición de tejido hace que la señal de emisión del SHG dependa de la polarización la luz incidente.

# Bibliografía

- [1] V. Tsafas, E. Gavgiotaki, M. Tzardi, E. Tsafa, C. Fotakis, I. Athanassakis, and G. Filippidis, "Polarization-dependent second-harmonic generation for collagen-based differentiation of breast cancer samples," *Journal of Biophotonics*, vol. 13, no. 10, p. e202000180, 2020.
- [2] W. Lee, A. O. Moghaddam, Z. Lin, B. L. McFarlin, A. J. Wagoner Johnson, and K. C. Toussaint, "Quantitative classification of 3d collagen fiber organization from volumetric images," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 39, no. 12, pp. 4425–4435, 2020.
- [3] L. Liang, M. Liu, and W. Sun, "A deep learning approach to estimate collagenous tissue 1 nonlinear anisotropic stress-strain responses from 2 microscopy images," 2017.
- [4] R. A. Tung Yuen Lau and J. Kimani C. Toussaint, "quantification of collagen fiber organization using three-dimensional fourier transform-second-harmonic generation imaging"," *OPTICS EXPRESS*, vol. 20, pp. 21821–21832, 2012.
- [5] P. J. Campagnola., "second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics. "," *Anal. Chem*, vol. 83 (9), p. 606, 1962.
- [6] s D. J. Prockop y N. A. Guzmán, ".el colágeno"," *Educación Médica, TIEMPOS MEDICOS*, vol. 191, pp. 53–63, 1981.
- [7] A. Bazaga, M. Roldán, C. Badosa, C. Jiménez-Mallebrera, and J. M. Porta., *A Convolutional Neural Network for the automatic diagnosis of collagen VI-related muscular dystrophies*. Cambridge University Press, 2019.
- [8] B. E. Kastelic J, Galeski A, "la estructura multicompuesta del tendón"," *Connect Tissue Res*, vol. 6(1), pp. 11–23, 1978.
- [9] M. A. L. Pacheco. Tesis mestria en ciencias Cinvestav, 2017.
- [10] C. P. P. Franken, A. Hill and G. Weinreich., "generation of optical harmonics. "," *Phys.Rev.Lett.* 7 (4), vol. 7 (4), pp. 118–119, 1961.
- [11] N. Loembergen and P. Pershan., "light waves at boundary of nonlinear media. "," *Phys.Rev.Lett*, vol. 128 (2), p. 606, 1962.

- [12] W. H. S. Fine, "Optical second harmonic generation in biological system," *APPLIED OPTICS*.
- [13] I. Freund and M. Deutsch, "Second-harmonic microscopy of biological tissue," *Opt. Lett.*, vol. 11, p. 94–96, 1986.
- [14] W. Lee and K. C. T. Jr, "Quantitative analysis of the effect of environmental-scanning electron microscopy on collagenous tissues," *Scientific Reports*, vol. 8:8491, 2018.
- [15] H. T. Mostaço-Guidolin L, Rosin NL, "Imágenes de colágeno en tejido cicatricial: desarrollos en microscopía de segunda generación armónica para aplicaciones biomédicas," *Int J Mol Sci*, vol. 18 (8), p. 1772, 2017.
- [16] E. Hase, T. Minamikawa, K. Sato, D. Yonekura, M. Takahashi, and T. Yasui, "Quantitative evaluation of both histological and mechanical recovery in injured tendons using fourier-transform second-harmonic-generation microscopy," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 27, no. 4, pp. 1–8, 2021.
- [17] Y. V. Kistenev, D. A. Vrazhnov, V. V. Nikolaev, E. A. Sandykova, and N. A. Krivova, "Analysis of collagen spatial structure using multiphoton microscopy and machine learning methods," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 84, pp. 108–123, 2019.
- [18] P. Provenzano, K. Eliceiri, J. Campbell, D. Inman, J. White, and P. Keely, "Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion," *BMC medicine*, vol. 4, p. 38, 02 2006.
- [19] A. V. Sergienko, M. Atatüre, Z. Walton, G. Jaeger, B. E. A. Saleh, and M. C. Teich, "Quantum cryptography using femtosecond-pulsed parametric down-conversion," *Physical Review A*, vol. 60, pp. R2622–R265, 1999.
- [20] T. Jennewein, G. Weihs, and A. Zeilinger, "Photon statistics and quantum teleportation experiments," *Jornal Phys. Soc. Jpn. 72*, vol. 72, no. Suppl.C, pp. pp. 168–173, 2003.
- [21] R. Jin, M. Takeoka, U. Takagi, R. Shimizu, and M. Sasaki, "Highly efficient entanglement swapping and teleportation at telecom wavelength," *Scientific Reports*, vol. 5, no. 9333, 2015.
- [22] A. V. Sergienko, "Quantum metrology with entangled photons," *IOS Press*, no. CXLVI, 2001.
- [23] B. Bell, S. Kannan, A. McMillan, A. S. Clark, W. Wadsworth, and J. G. Rarity, "Multiphoton quantum metrology with entangled photons," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 111, no. 093603, 2013.
- [24] Y. Shih, "Entangled biphoton source—property and preparation," *Reports on Progress in Physics*, vol. 66, no. 6, pp. 1009–1044, 2003.

- [25] B. P. A. Einstein and N. Rosen, "can quantum-mechanical description of physical reality be considered complete' ?"," *PHYSICAL REVIEW A*, vol. 47, pp. 777–780, 1935.
- [26] T. Ono, R. Okamoto, and S. Takeuchi, "An entanglement-enhanced microscope," *Nature communications*, vol. 4, p. 2426, 09 2013.
- [27] D. J. Lum, M. D. Mazurek, A. Mikhaylov, K. M. Parzuchowski, R. N. Wilson, R. Jimenez, T. Gerrits, M. J. Stevens, M. T. Cicerone, and C. H. Camp, "Witnessing the survival of time-energy entanglement through biological tissue and scattering media," *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, pp. 3658–3670, Jun 2021.
- [28] W. W. Williams RM, Zipfel WR, "interpretación de imágenes de segunda generación armónica de fibrillas de colágeno"," *Biophys J*, vol. 2, pp. 88 (2): 1377–86, 2005.
- [29] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics Third Edition*. Chicago: Academic Press, 2008.
- [30] M. Fox, *Quantum Optics: An Introduction*.
- [31] V. Tsafas, E. Gavgiotakis, M. Tzardi, E. Tsafa, C. Fotakis, I. Athanassakis, and F. George, "Polarization-dependent second-harmonic generation for collagen-based differentiation of breast cancer samples," *Journal of Biophotonics*, vol. 13, p. e202000180, 07 2020.
- [32] A. B.-G. C. H. C. P. P. M. V. Y. S.-P. A. P. M. A. E. K. y. F. L. Maxime Rivard, Mathieu Laliberté, ".el origen estructural de la segunda generación armónica en la fascia"," *Biomed.Optar.Express*, vol. 2, pp. 26–36, 2011.
- [33] O. S. K. A. V. B. D. A. YURY V. KISTENEV, VIKTOR V. NIKOLAEV and E. A. SANDYKOVA, ".application of multiphoton imaging and machine learning to lymphedema tissue analysis"," *Biomedical OPTICS EXPRESS*, vol. 10, pp. 3353–3368, 2019.
- [34] "A deep learning approach to estimate chemically-treated collagenous tissue non-linear anisotropic stress-strain responses from microscopy images," *Acta Biomaterialia*, vol. 63, pp. 227–235, 2017.
- [35] L. de SCikit-learn, *Machine Learning in Python*. [urlhttps://scikit-learn.org/stable/](https://scikit-learn.org/stable/).
- [36] K. F. Mazumder N, "Stokes polarimetry-based second harmonic generation microscopy for collagen and skeletal muscle fiber characterization.," *Lasers Med Sci*, vol. 36(6), pp. 1161–1167, 2020.
- [37] Q. J. F. M. R. C. T. P. K. F. Mazumder N, Hu CW, "La revelación de la estructura molecular y la orientación con el vector de stokes resolvió la microscopía de segunda generación armónica.," *Métodos*, vol. 66, p. 237–245, 2014.

- [38] Freund and M. Deutsch., "Second-harmonic microscopy of biological tissue," *Optics Letters.*, vol. 11, pp. 94–96, 1981.
- [39] M. R. M. Raghu Ambekar Ramachandra Rao and K. C. Toussaint, "fourier transform-second-harmonic generation imaging of biological tissues"," *OPTICS EXPRESS*, vol. 17, pp. 14534–14542, 2009.
- [40]
- [41] J. B. Pawley, "handbook of biological and confocal microscopy", *3dr edition*, 1995.
- [42] I. company Carl Zeiss Microscopy, *Microscopios.* url <https://www.zeiss.com.mx/microscopia/home.html>.
- [43] H. E., *Optic.*
- [44] E. Abbe, *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung.* <https://doi.org/10.1007/BF02956173>.
- [45] C. E. M. Arenas, *Microscopy.*
- [46] H. C. Ramírez, ".acondicionamientos del enredamiento espacial en parejas de fotones producidas por conversión perimétrica descendente "," *Tesis Doctoral*, pp. 1–144, 2014.
- [47] M. Born and E. Wolf, "Principles of optics, 8th ed.,"
- [48] A. A. H. Mónica B. Agüero and M. G. Kovalsky., "measuring the entanglement of photons produced by a nanosecond pulsed source.", *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 31, pp. 3088–3096, 2014.
- [49] Thorlabs, *THORLABS Fabricante.* url <https://www.thorlabs.com/>.
- [50] semrock Techonologies, *Semrock.* url <https://www.semrock.com/>.
- [51] E. Techonologies, *Excelitas.* url <https://www.excelitas.com/>.
- [52] photonic solutions, *ID 800, Detector de coincidencia s.* url <https://www.photonicsolutions.co.uk/upfiles/id800-specs.pdf>.
- [53] a. . C. Oxford Instruments, note = url <https://andor.oxinst.com/products/kymera-and-shamrock-spectrographs/shamrock-500i>, *Monocromador Shamrock 500i.*
- [54] M. from Carl Zeiss, "A new dimension in confocal laser scanning microscopy lsm 710,"