ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Trabajo Fin de Máster

Estudio de viabilidad de imágenes hiperespectrales de fluorescencia para el diagnóstico del cáncer de ovario

Feasibility Study of Hyperspectral Fluorescence Imaging for Ovarian Cancer Diagnosis

Para acceder al Título de

Máster Universitario en Ingeniería de Telecomunicación

Autor: Andrea Sánchez Núñez

07 - 2024

ETS de Ingenieros Industriales y de Telecomunicación

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA DE TELECOMUNICACIÓN

CALIFICACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Realizado por: Andrea Sánchez Núñez

Director del TFM: Olga María Conde Portilla, José Alberto Gutiérrez Gutiérrez

Título: "Estudio de viabilidad de imágenes hiperespectrales de fluorescencia para el diagnóstico del cáncer de ovario "

Title: "Feasibility Study of Hyperspectral Fluorescence Imaging for Ovarian Cancer Diagnosis "

Presentado a examen el día:

para acceder al Título de

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA DE TELECOMUNICACIÓN

Composición del Tribunal:

Presidente (Apellidos, Nombre): Juan Pablo Pascual Gutiérrez

Secretario (Apellidos, Nombre): Jesús Ramón Pérez López

Vocal (Apellidos, Nombre): José Ángel García García

Este Tribunal ha resuelto otorgar la calificación de: .....

Fdo: El Presidente **Fdo: El Secretario**

Fdo: El Vocal **Fdo: El director del TFM**

(sólo si es distinto del Secretario)

VºBº del Subdirector
(a asignar por la Secretaría)

Trabajo Fin de Máster Nº

Agradecimientos

Este TFM ha sido realizado gracias a los medios aportados por los proyectos de investigación HyPERfusioCAM (DTS22/00127), INTRACARDIO (DTS17-00055), HYPERfusionTRANS (SUBVTC-2021-0038), FUSIODERM (DTS15/00238), NANOIMOC (PDC2021-121481-I00) financiados por el ISCIII, la Fundación Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL) y el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, cofinanciado con fondos FEDER. El proyecto PERFORMANCE (PID2022-137269OB-C22 financiado por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y por FEDER, UE) y el proyecto PALACE (TED2021-130378B-C21 financiado por MICIU/ AEI /10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU/PRTR).

Centrándome en el ámbito más personal, quiero agradecer a todos mis seres queridos, amigos y profesores por haberme acompañado durante estos seis años de aprendizaje. Han sido años duros, pero me han llevado a ser la persona que soy hoy, tanto en el ámbito académico como en el personal.

A mis tutores, Olga y José Alberto, muchas gracias por haber estado presentes tanto en el TFG como en este Trabajo de Fin de Máster. Me habéis guiado y enseñado todo lo que sé, y este proyecto refleja parte de ese trabajo. Sin embargo, detrás hay muchas horas de esfuerzo con vuestro apoyo constante. Sin vosotros, esto no habría sido posible.

A mi madre, quien siempre ha sido y será un referente para mí. Gracias por enseñarme todo lo que sé, por aguantar mis llantos y alegrías, y por estar siempre ahí. Eres un ejemplo de superación para mí, y nunca podré agradecértelo lo suficiente.

A mi padre, quien, aunque no esté presente todos los días, siempre ha sido un apoyo con una sola llamada telefónica para escucharme y aconsejarme.

A mis amigas y amigos, que siempre me sacaron una sonrisa en los peores momentos y los convirtieron en buenos. En especial, a Peñalba y Esther, que han sido un gran apoyo desde que tengo 3 años. Tengo mucha suerte de haber encontrado amigas como vosotras tan pronto en la vida.

A las amistades hechas en la carrera, donde quiero hacer una mención especial a Mariola, sin quien nunca habría llegado a donde estoy hoy.

A Álvaro, mi novio, por ser la persona que siempre ha estado ahí durante estos años, apoyándome, escuchando mis problemas y haciéndome feliz.

Por último, aunque no se suela decir, a Chispas, mi perro, quien ha estado ahí durante toda mi etapa de estudiante, tumbada encima de mis piernas en cada hora de estudio que me ha llevado hasta aquí.

Gracias a todos.

Resumen

Este trabajo de investigación se centra en la combinación de la técnica de imagen hiperespectral (HSI) y fluorescencia para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de ovario. La investigación abordará la caracterización de la fluorescencia de diferentes marcadores mediante un sistema de imagen hiperespectral (HSI) en el rango VisNIR (400-1000 nm). Se realizarán trabajos preliminares para analizar las necesidades y la viabilidad técnica del sistema de imagen y predecir las posibilidades y limitaciones del uso de la fluorescencia en el diagnóstico de este tipo de cáncer.

Para lograrlo, se establecen los siguientes objetivos específicos: desarrollar fantomas biológicos (*phantoms*), analizar la capacidad del sistema HSI para obtener información detallada, desarrollar métodos de caracterización y calibración para medir y cuantificar la fluorescencia y prospectar su posible uso durante los procedimientos quirúrgicos determinando la cantidad óptima de fluorescencia necesaria para intervenciones exitosas.

Además, el sistema hiperespectral utilizado, permite capturar información espectral detallada en rangos visibles, infrarrojo cercano (400-1000 nm) e infrarrojo de onda corta (1000-1700 nm). Las medidas realizadas con este sistema incluyeron tanto muestras líquidas de DiR como de *phantoms*. En cuanto a los resultados obtenidos de estas medidas, fueron analizados utilizando el lenguaje de programación Python, proporcionando datos sobre las propiedades espectrales y la fluorescencia del DiR bajo diferentes condiciones.

Este estudio aporta una comprensión profunda de las propiedades espectrales del fluoróforo DiR y demuestra el potencial de la tecnología HSI combinada con fluorescencia para mejorar significativamente el diagnóstico y tratamiento del cáncer de ovario. Las técnicas desarrolladas y los hallazgos obtenidos en este trabajo abren nuevas perspectivas para la aplicación de tecnologías avanzadas en el ámbito de la cirugía guiada por fluorescencia, ofreciendo una herramienta valiosa para la medicina personalizada y la mejora de los resultados clínicos en pacientes con cáncer de ovario.

Palabras Clave

- Cáncer de ovario.
- HSI, *Hyperspectral Imaging*, Imagen hiperespectral.
- Fluorescencia.
- Diagnóstico médico.
- Tratamiento del cáncer.
- FGS, *Fluorescence-Guided Surgery,* Cirugía guiada por fluorescencia.
- DiR (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindotricarbocianina).
- Calibración de fluorescencia.
- *Phantoms* de agar.
- Fotoblanqueo, *Photobleaching.*
- Espectroscopia de fluorescencia.

Abstract

This research work focuses on the combination of hyperspectral imaging (HSI) and fluorescence techniques for the diagnosis and treatment of ovarian cancer. The study will address the characterization of the fluorescence of different markers using a hyperspectral imaging system (HSI) in the VisNIR range (400-1000 nm). Preliminary work will be conducted to analyze the needs and technical feasibility of the imaging system and predict the possibilities and limitations of using fluorescence in the diagnosis of ovarian cancer.

To achieve this, the following specific objectives are established: develop biological phantoms, analyze the capability of the HSI system to obtain detailed information, develop characterization and calibration methods to measure and quantify fluorescence, and explore its potential use during surgical procedures by determining the optimal amount of fluorescence needed for successful interventions.

Additionally, the hyperspectral system used allows capturing detailed spectral information in visible, near-infrared (400-1000 nm), and short-wave infrared (1000-1700 nm) ranges. Measurements performed with this system included both liquid DiR samples and phantoms. The results obtained from these measurements were analyzed using the Python programming language, providing data on the spectral properties and fluorescence of DiR under different conditions.

This study provides a deep understanding of the spectral properties of the fluorophore DiR and demonstrates the potential of HSI technology combined with fluorescence to significantly improve the diagnosis and treatment of ovarian cancer. The techniques developed and the findings obtained in this work open new perspectives for the application of advanced technologies in the field of fluorescence-guided surgery, offering a valuable tool for personalized medicine and the improvement of clinical outcomes in patients with ovarian cancer.

Keywords

- Ovarian cancer.
- HSI, *Hyperspectral Imaging.*
- Fluorescence.
- Medical diagnosis.
- Cancer treatment.
- FGS, Fluorescence-Guided Surgery.
- DiR (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine).
- Fluorescence calibration.
- Agar phantoms.
- Photobleaching.
- Fluorescence spectroscopy.

Índice

Capítulo 1 1
1. *Introducción* 1
1.1. Diagnóstico médico mediante técnicas de imagen 1
1.2. Imagen hiperespectral (HSI) 5
1.3. Fluorescencia 8
1.4. Técnica de fluorescencia 10
1.5. *Phantoms* 13
1.6. Objetivos 13
1.7. Estructura del documento 14
Capítulo 2 16
2. *Materiales y métodos* 16
2.1. Preparación de muestras 16
2.1.1. Elaboración de disoluciones 16
2.1.3. Elaboración de *phantoms* 18
2.2. Medidas 23
2.2.1. Equipo de medida: HSI 23
2.2.2. Fuente de luz 26
2.2.3. Estándares de fluorescencia 28
2.2.3. Métricas de medida del DiR 33
2.2.4. Medida de la transmitancia del agar 36
2.3. Procesado 37
Capítulo 3 40
3. *Resultados* 40
3.1. Análisis de las placas FSK5 40
3.2. Análisis de los líquidos con DiR 44
3.3. Análisis de los *phantoms* sólidos 51
3.3.1. Hipótesis 1; Procesado de datos 52
3.3.2. Hipótesis 2; Transmitancia DiR en datos 53
3.3.3. Hipótesis 3; Efectos térmicos en DiR 55
3.3.4. Hipótesis 4; Fotoblanqueo del DiR 58
Capítulo 4 59
4. Conclusión 59

5. Líneas futuras 60
Bibliografía 61

Índice de Figuras

Figura 1. Número de publicaciones en Web of Science [11] por año en ámbitos médicos sobre el HSI, el cáncer de ovario y la fluorescencia desde 1995 hasta 2023 (Fecha de consulta: 30 de mayo de 2024). 3
Figura 2. Número de publicaciones en Web of Science [11] por año en ámbitos sobre el HSI y el cáncer de ovario (Fecha de consulta: 11 de julio de 2024). 4
Figura 3.Número de publicaciones en Web of Science [11] por año en ámbitos sobre la cirugía guiada por fluorescencia y el cáncer de ovario (Fecha de consulta: 11 de julio de 2024). 4
Figura 4. Número de publicaciones en Web of Science [11] por año en ámbitos sobre la cirugía guiada por fluorescencia y el HSI (Fecha de consulta: 11 de julio de 2024). 5
Figura 5. Hipercubo, un conjunto de datos tridimensional de una imagen bidimensional en cada longitud de onda [14]. 7
Figura 6. Penetración de las diferentes longitudes de onda en la piel [15]. 8
Figura 7. Diagrama espectral de emisión y absorción de un típico fluoróforo [18]. 10
Figura 8. Diagrama de Jablonski para describir el proceso de fluorescencia [19]. 11
Figura 9. DiR: pico de excitación a 754 nm y pico de emisión a 778 nm [21] 12
Figura 10. Concentración de DiR libre disuelto en etanol (EtOH) administrado por ICMAB-CSIC debido al proyecto NANOIMOC 12
Figura 11. Distribución de los pocillos para la realización de la primera prueba del phantom sin DiR. 19
Figura 12. Disposición de las muestras de gelatina de agar-agar más etanol puro. 19
Figura 13. Proceso de calentamiento de los 100ml de agua con las respectivas cantidades de agar-agar. 20
Figura 14. Resultado del phantom de agar con etanol puro. 21
Figura 15. Distribución de los pocillos para la realización de la primera prueba con DiR del phantom. 22
Figura 16. Disposición de las muestras de gelatina de agar-agar con etanol más DiR. 22
Figura 17. Resultado del phantom de agar-agar con etanol más DiR. 23
Figura 18. Sistema hiperespectral [31][32][33] 24
Figura 19. Módulos principales del sistema de control [31]. 25
Figura 20. Longitudes de onda centrales de la fuente empleada en el experimento, de Bluebox Optics niji 086 [34]. 27
Figura 21. FSK5 de Thorlabs como método de calibración para comprobar el correcto funcionamiento del equipo [35]. 28
Figura 22. Espectros de las placas FSK5 del datasheet de Thorlabs [36]. 29
Figura 23. Procedimiento detallado del sistema de medición de las placas FSK5. 31
Figura 24. Caracterización de los estándares de fluorescencia: a) elemento opaco que ayuda al confinamiento de la luz; b) medida de placa FSK5 naranja; c) equipo HSI en funcionamiento midiendo la placa FSK5 naranja. 32
Figura 25. Spectralon™ en medida con el sistema hiperespectral. 34
Figura 26. Phantom siendo medido con el HSI. 34

Figura 27. Caracterización en transmitación del agar-agar: a) sistema completo de medida de la transmitancia del agar-agar; b) soporte para los phantoms de agar-agar; c) tapa del soporte para evitar la influencia de la luz exterior. 36
Figura 28. Esquemático del setup realizado para la medición de la transmitancia del agar-agar 37
Figura 29. Espectro de fluorescencia de un compuesto. 38
Figura 30. Espectro de la placa FSK5 naranja medida en el laboratorio frente al espectro del datasheet. 41
Figura 31. Espectro de la placa FSK5 rojo medido en el laboratorio frente al espectro del datasheet. 41
Figura 32. Espectro de la placa FSK5 azul medida en el laboratorio frente al espectro del datasheet. 42
Figura 33. Espectro de la placa FSK5 amarilla medida en el laboratorio frente al espectro del datasheet. 42
Figura 34. Espectro de la placa FSK5 verde medida en el laboratorio frente al espectro del datasheet. 43
Figura 35. Medida del DiR en líquido con distintas concentraciones del fluoróforo medido a 50 ms de exposición. 44
Figura 36. Medida del DiR en líquido con distintas concentraciones del fluoróforo medido a 100 ms de exposición. 45
Figura 37. Medida del DiR en líquido con distintas concentraciones del fluoróforo medido a 150 ms de exposición. 45
Figura 38. Representación normalizada de la medición del DiR en líquido a distintos tiempos de exposición. 46
Figura 39. Variación de la intensidad máxima detectada en las mediciones a diferentes concentraciones de DiR en líquido considerando el máximo de intensidad de fluorescencia. 47
Figura 40. Variación de la intensidad máxima detectada en las mediciones a diferentes concentraciones de DiR en líquido para el área correspondiente a la caída de 3 dB de cada máximo 48
Figura 41. Curva estándar de fluorescencia que muestra la re-absorción de fotones emitidos en concentraciones más altas [41]. 49
Figura 42. longitud de onda central de la intensidad máxima de fluorescencia vs concentración de DiR. 50
Figura 43. Resultado de estudios previos de la relación entre la longitud de onda de la fluorescencia y la concentración del fluoróforo [42]. 50
Figura 44. Espectro de la medida del phantom con DiR 0,5 ml y agua 1,5 ml frente al Spectralon™ empleado como referencia. 51
Figura 45. Análisis en Python del phantom en presencia del DiR entre los 600 nm y 900 nm sin promediado de los datos medidos 53
Figura 46. Espectros resultantes de la medida en transmitancia de los phantoms con agar puro 54
Figura 47. Transmitancia media de los phantoms con agar-agar puro. 54

Figura 48. Resultados de la medida del DiR en líquido previamente calentado para ver sus variaciones. 55
Figura 49. Estudio [44] en el que se demuestra que al aumentar la temperatura del DiR este disminuye sus propiedades fluorescentes. 57

Índice de Tablas

Tabla 1. Cantidades de las combinaciones entre el DiR y el etanol. 17
Tabla 2. Selección de la longitud de onda de la fuente Bluebox Optics niji 086 para la medición de las placas FSK5. 30

Capítulo 1

Introducción

1.1. Diagnóstico médico mediante técnicas de imagen

En la exploración del conocimiento científico, la investigación del cáncer emerge como una necesidad fundamental. Esta afección, caracterizada por la proliferación descontrolada de células anormales, ejerce un impacto considerable en la salud global, convirtiéndose así en un área esencial de estudio en el ámbito académico y científico.

Este término abarca una amplia gama de enfermedades, dado que las células cancerosas pueden surgir en prácticamente cualquier tipo de tejido del cuerpo humano [1]. Dichas células anormales pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático, dando lugar a la formación de metástasis en diferentes regiones del organismo. Esta propagación puede resultar en complicaciones severas que interfieren con el funcionamiento normal de los órganos afectados, lo que puede desembocar en consecuencias graves para la salud [1].

En el año 2020, Europa registró aproximadamente cuatro millones de nuevos casos de cáncer y alrededor de 1,9 millones de muertes atribuibles a esta enfermedad [2]. A pesar de que los europeos constituyen solo una décima parte de la población mundial, el continente europeo concentra cerca del 25% de los diagnósticos anuales de cáncer, lo cual afecta significativamente a las familias y a los sistemas de salud [2].

Esta enfermedad afecta desproporcionadamente a las personas mayores, con el 60% de los nuevos diagnósticos y el 73% de las muertes en 2020 ocurriendo en mayores de 65 años [2]. Las proyecciones indican que el envejecimiento de la población europea podría incrementar los diagnósticos de cáncer hasta en un 18% para el año 2040, con variaciones significativas entre países [2].

En concreto, se estima que casi el 40% de los cánceres son prevenibles mediante modificaciones en el estilo de vida [2]. Sin embargo, el cáncer de ovario es frecuentemente difícil de detectar en sus etapas iniciales debido a la ausencia de síntomas tempranos, manifestándose usualmente en fases avanzadas [3]. Este tipo de cáncer se origina en el ovario, órgano del sistema reproductor femenino responsable de la producción de óvulos [3].

El tratamiento del cáncer de ovario generalmente incluye cirugía y quimioterapia, aunque la estrategia específica depende del tipo y la etapa en la que se encuentra la enfermedad [4]. El abordaje terapéutico puede implicar una cirugía inicial seguida de quimioterapia, o puede comenzarse con quimioterapia antes y después de la cirugía para reducir el tamaño del tumor previo a su extirpación. Esta última opción se considera si se piensa que no es posible eliminar todo el tumor quirúrgicamente al inicio. Tras tres o

cuatro ciclos de quimioterapia, si las exploraciones indican una reducción del cáncer, la cirugía puede volver a ser viable [4].

En ciertos casos, la cirugía no es recomendable debido a condiciones médicas que impiden al paciente tolerar una operación mayor, o porque la cirugía podría causar daños significativos a otros órganos [4]. En tales situaciones, se podría optar únicamente por la quimioterapia. Esto se debe a que la extirpación quirúrgica de pequeños nódulos diseminados en múltiples sitios anatómicos en pacientes con cáncer de ovario metastásico presenta un desafío significativo, lo que contribuye a una tasa de supervivencia baja [5]. La identificación precisa de estas lesiones durante la cirugía es fundamental para lograr una resección completa del tumor y mejorar los resultados clínicos [5]. Sin embargo, actualmente esta identificación se basa principalmente en la inspección visual, lo que puede resultar en la supervisión de tumores ocultos y en recurrencia.

La cirugía guiada por fluorescencia (FGS, *Fluorescence Guided Surgery*) emerge como una solución prometedora al emplear fluoróforos de infrarrojo cercano para proporcionar imágenes sensibles, de alta resolución y en tiempo real [5]. Cabe destacar que al emplear esta tecnología se consigue mayor penetración y menor esparcimiento (*scattering*) en los tejidos humanos, obteniendo una mejora en el contraste de la imagen [6]. Con todo ello, ha demostrado aumentar las tasas de resección tumoral y minimizar el daño al tejido normal, consolidándose como una modalidad de imagen valiosa en la cirugía del cáncer de ovario [5].

Estas imágenes médicas permiten un estudio detallado de la anatomía y fisiología tanto normales como patológicas, visualizando las estructuras internas bajo el tejido y los huesos, diagnosticando anomalías y guiando el tratamiento de este tipo de enfermedades [7].

En este contexto, una de las tecnologías avanzadas en este campo de la visualización es la imagen hiperespectral (HSI, *Hyperspectral Imaging*), que permite la captura de información en múltiples bandas espectrales para cada píxel de la imagen. Utilizando sensores CMOS (CMOS, *Complementary Metal-Oxide Semiconductor*) monocromáticos y técnicas como ruedas de filtros giratorias o filtros sintonizables acústico-ópticos, ofreciendo una herramienta sumamente beneficiosa para el diagnóstico médico [8].

La integración de HSI y fluorescencia en FGS proporciona una capacidad de imagen avanzada, donde HSI puede identificar y diferenciar tejidos con alta precisión, mientras que la fluorescencia proporciona una guía visual en tiempo real durante la cirugía [9]. Esta combinación mejora significativamente la precisión quirúrgica y la eficiencia en la resección tumoral, ofreciendo diagnósticos más precisos y tratamientos más efectivos [9].

En concreto, ofrece múltiples beneficios, entre los cuales se destaca la mejora de la precisión quirúrgica a la hora de delinear el margen tumoral [10]. Esta combinación permite a los cirujanos realizar resecciones tumorales más precisas, reduciendo la probabilidad de recurrencia del cáncer al asegurar que se eliminan todas las células

tumorales. Además, la capacidad de HSI para diferenciar entre distintos tipos de tejidos y la guía visual proporcionada por la fluorescencia resultan en diagnósticos más exactos, cruciales para planificar el tratamiento adecuado [10]. Al minimizar el daño a los tejidos sanos, esta tecnología avanzada puede reducir las complicaciones postoperatorias y mejorar la recuperación del paciente [10].

Considerando los temas mencionados, específicamente la combinación de HSI junto con la fluorescencia para la detección del cáncer de ovario, se ha realizado un estudio de las publicaciones pertinentes en estos ámbitos, que serán explorados con mayor detalle más adelante. Según la plataforma Web of Science, desde el año 1995 se han identificado 16.860 publicaciones que contienen la frase "fluorescencia para medicina", 112.386 publicaciones sobre el cáncer de ovario y 36.553 sobre HSI [11]. Al dividir estas publicaciones por años, tal y como se muestra en la Figura 1, se observa que el interés en cada uno de estos temas ha ido en aumento, evidenciando su creciente importancia y relevancia en el campo de la medicina y la salud humana.

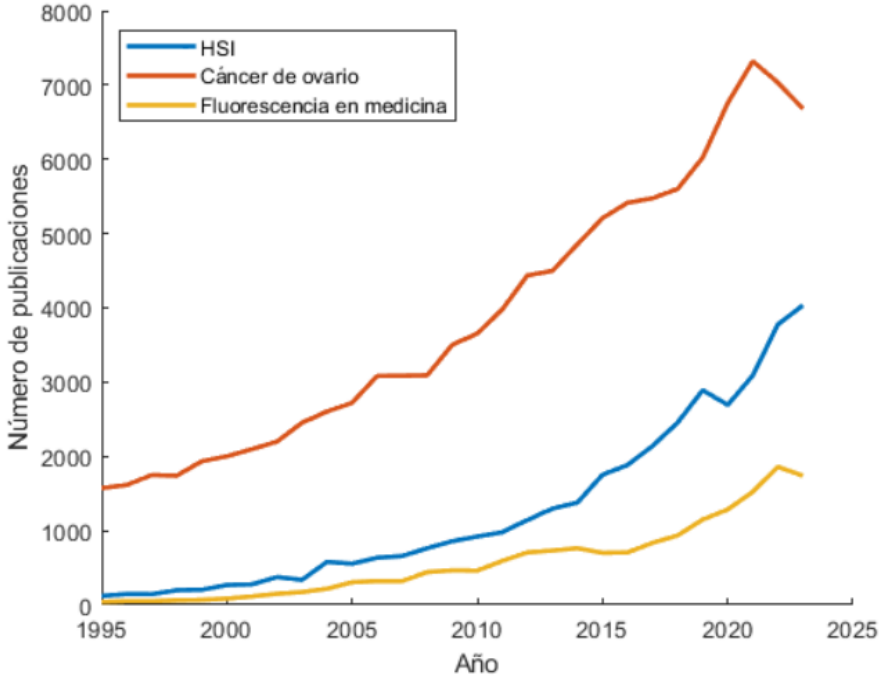


Figura 1. Número de publicaciones en Web of Science [11] por año en ámbitos médicos sobre el HSI, el cáncer de ovario y la fluorescencia desde 1995 hasta 2023 (Fecha de consulta: 30 de mayo de 2024).

Por otro lado, al enfocarse en cada una de estas modalidades de manera conjunta, se decidió realizar un análisis de los estudios llevados a cabo sobre estos temas. Específicamente, se realizó otra búsqueda en Web of Science utilizando las palabras clave “cáncer de ovario” e “imagen hiperespectral”, como se muestra en la Figura 2. Los resultados indican que existen un total de 10 estudios realizados que abordan ambas temáticas de manera conjunta, todos ellos muy recientes, siendo el primero publicado en el año 2018 [11].

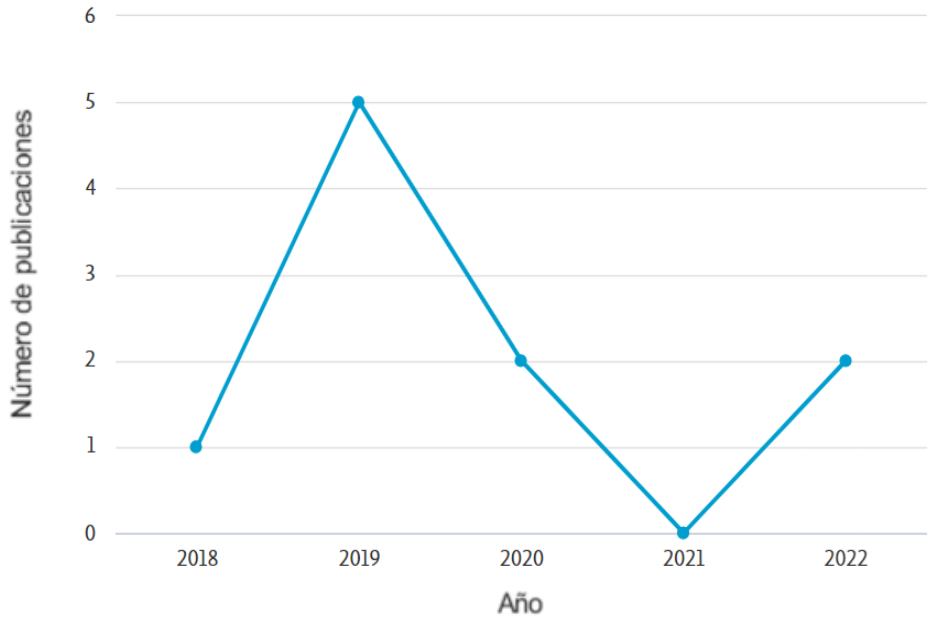


Figura 2. Número de publicaciones en Web of Science [11] por año en ámbitos sobre el HSI y el cáncer de ovario (Fecha de consulta: 11 de julio de 2024).

Además, como se ilustra en la Figura 3, se realizó otra búsqueda en la misma base de datos con las palabras clave “cáncer de ovario” y “cirugía guiada por fluorescencia”. Los resultados muestran que se han realizado 27 estudios sobre este tema, con el primero publicado en el año 2008 [11].

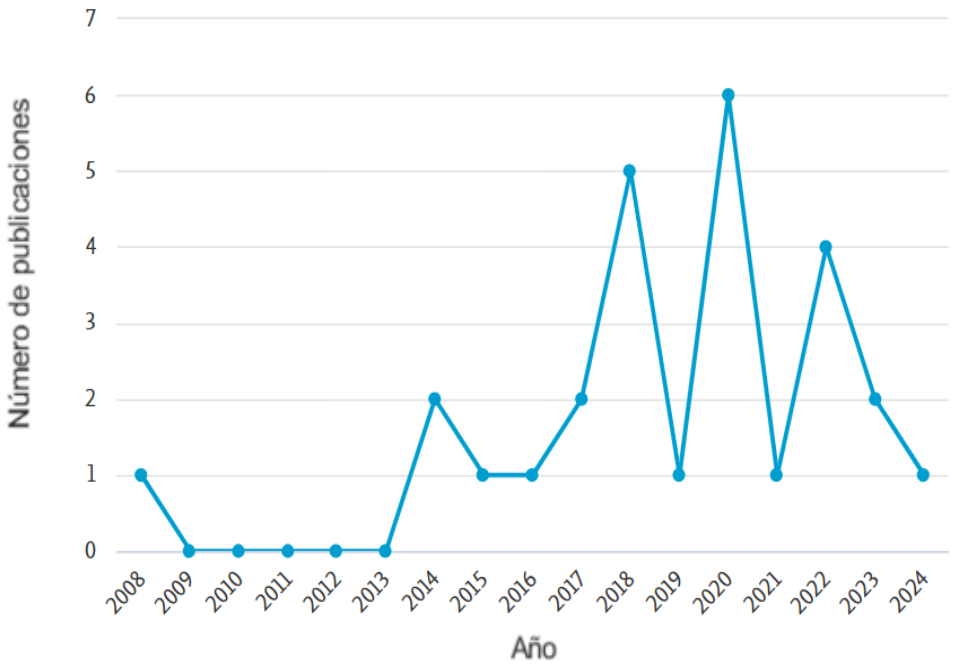


Figura 3.Número de publicaciones en Web of Science [11] por año en ámbitos sobre la cirugía guiada por fluorescencia y el cáncer de ovario (Fecha de consulta: 11 de julio de 2024).

Finalmente, como se observa en la Figura 4, se buscó la última combinación de los temas de este estudio, que son “imagen hiperespectral” y “cirugía guiada por fluorescencia”. Los resultados indican que el primer estudio llevado a cabo sobre estos dos temas fue publicado en 2015 y desde entonces solo se han realizado 6 estudios adicionales.

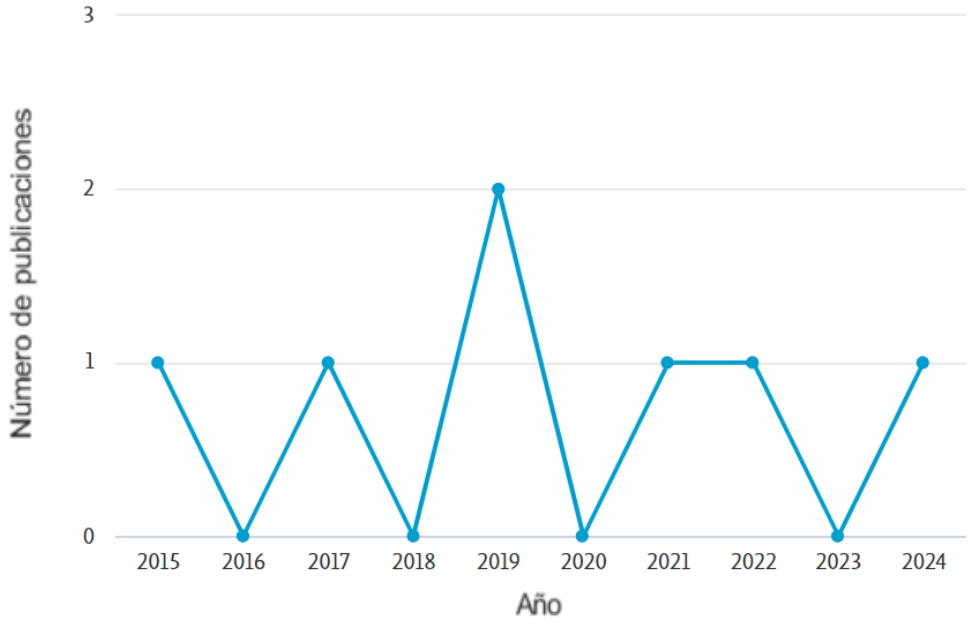


Figura 4. Número de publicaciones en Web of Science [11] por año en ámbitos sobre la cirugía guiada por fluorescencia y el HSI (Fecha de consulta: 11 de julio de 2024).

Con todos estos datos se puede verificar que es un área que ha recibido muy poca atención y que presenta un elevado interés. Además, es importante señalar que se realizó una búsqueda conjunta de las tres palabras clave y no se encontró ningún estudio previo sobre el tema, lo que subraya su relevancia e innovación.

1.2. Imagen hiperespectral (HSI)

La imagen hiperespectral constituye una tecnología avanzada que posibilita la medición tanto de las características espectrales como espaciales de objetos o materiales bajo examen. En el contexto de la medicina, esta tecnología presenta ventajas sustanciales, como su naturaleza no invasiva y la capacidad de obtener datos de manera rápida para cada muestra individual. Este hecho ha generado un notable interés en la comunidad científica y médica, tal como evidencia el creciente número de publicaciones en este ámbito [12]. La destacada atención en el HSI se atribuye a que es una técnica que permite tener de más de 200 canales de color a diferencia de los 3 canales que tiene una cámara regular, permitiendo la evaluación tanto cualitativa como cuantitativa de las propiedades espectrales y espaciales de los objetos medidos [13].

Las cámaras de color convencionales capturan imágenes en solo tres bandas espectrales: rojo, verde y azul [13]. Si bien esto proporciona una representación visual básica, limita la información disponible sobre la composición de los objetos. Los sistemas

hiperespectrales, por otro lado, adquieren datos en un rango mucho más amplio del espectro electromagnético, proporcionando una imagen detallada de la firma espectral de cada material [13].

Este tipo de cámaras tienen un amplio abanico de aplicaciones en diversos campos:

- **Análisis de materiales**: identificación de ingredientes en alimentos y medicamentos, detección de contaminantes, control de calidad en productos textiles y plásticos.
- **Detección de defectos**: identificación de fallas en circuitos impresos, piezas mecánicas y estructuras, mejorando la seguridad y previniendo fallos.
- **Monitorizado ambiental**: evaluación de la calidad del aire y del agua, seguimiento de la salud de los ecosistemas, detección de contaminación y deforestación.
- **Aplicaciones médicas:** Diagnóstico de enfermedades, guía de procedimientos quirúrgicos y desarrollo de nuevos medicamentos personalizados.

En general, el HSI ha sido aplicado en diversos campos, pero en uno de los que más ha destacado es en la medicina, como se podía observar por el número de publicaciones reseñadas en la Figura 1 del apartado anterior.

En este ámbito, un factor crucial es la propagación de la luz en los tejidos, dado que, al ser un medio turbio, experimenta diversos procesos de *scattering* y absorción. Debido a la heterogeneidad de su composición, los tejidos orgánicos presentan variaciones espaciales en sus propiedades ópticas.

Además, los tejidos dependen de su capacidad de absorción, siendo lo suficientemente débiles como para permitir la penetración de la luz dentro de la ventana terapéutica, que abarca entre 600 y 1300 nm [14]. Esto se debe a que es *scattering* es mayor en longitudes de onda baja, y, en mayores longitudes de onda este disminuye y aumenta la absorción. Por lo tanto, en la región de los 1300 nm, el agua se vuelve altamente absorbente. La absorción tisular, determinada por la composición producida por las moléculas del tejido denominadas cromóforos, puede servir como indicador para el diagnóstico de enfermedades, tal y como sucede con la hemoglobina para detectar la aparición de la angiogénesis asociada al incremento celular en el cáncer [14].

Adicionalmente, la luz incidente puede reflejarse directamente en la superficie del tejido o dispersarse aleatoriamente debido a variaciones en la densidad del mismo, lo que proporciona información sobre sus propiedades ópticas en profundidad. Las imágenes de reflectancia y fluorescencia pueden detectar cambios locales en las propiedades de estos tejidos, lo que resulta útil en el diagnóstico de enfermedades como el cáncer [14].

En concreto, HSI presenta una modalidad híbrida que fusiona imágenes y espectroscopía. Al recopilar información espectral en cada píxel mediante un conjunto de detectores bidimensionales (2-D), genera un volumen de datos de más de tres dimensiones que integra información espacial y espectral. En el caso de este estudio, como se tienen 2 dimensiones espaciales y 1 espectral, el volumen de datos recibe el nombre de hipercubo tal y como se ilustra en la Figura 5 [14]. La información espacial permite localizar el origen físico del material de cada espectro en las muestras, lo que facilita una investigación más exhaustiva de las interacciones de la luz con la muestra.

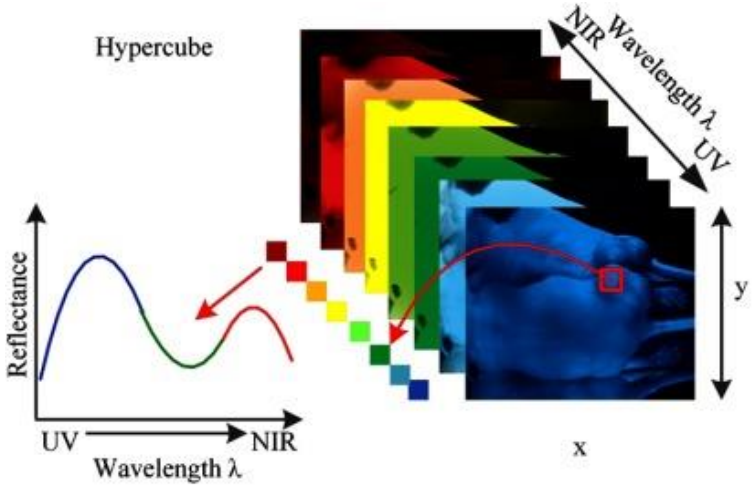


Figura 5. Hipercubo, un conjunto de datos tridimensional de una imagen bidimensional en cada longitud de onda [14].

El rango espectral de los sistemas HSI varía según el tipo de sensor y la aplicación específica. Estos pueden alcanzar el rango espectral visible (VIS, *Visible*) de 400 nm a 700 nm, el infrarrojo cercano (NIR, *Near-InfraRed*) de 700 nm a 1000 nm, como la cámara que se emplea en este estudio, y el infrarrojo de onda corta (SWIR, *Short-Wave InfraRed*) de 1000 nm a 2500 nm.

A diferencia de la luz visible, que penetra tan sólo unos pocos milímetros en la piel, la radiación NIR puede alcanzar profundidades mayores, convirtiéndose en una herramienta óptima en la guía quirúrgica para visualizar estructuras anatómicas cruciales.

Es necesario discutir aquí la relación entre el *scattering* y absorción en este contexto, ya que a medida que disminuye la longitud de onda, aumenta el *scattering* y con ello disminuye la penetración de la luz en el material o tejido. Sin embargo, al incrementar la longitud de onda, la absorción se vuelve más significativa, especialmente la absorción del agua. Esta dinámica es crucial para comprender los principios que rigen la propagación de la luz en diversos medios y sus aplicaciones en sistemas de imágenes hiperespectrales y otros campos de la óptica.

Esto se puede observar en la Figura 6, donde se comprueba la penetración de las diferentes longitudes de onda en la piel [15].

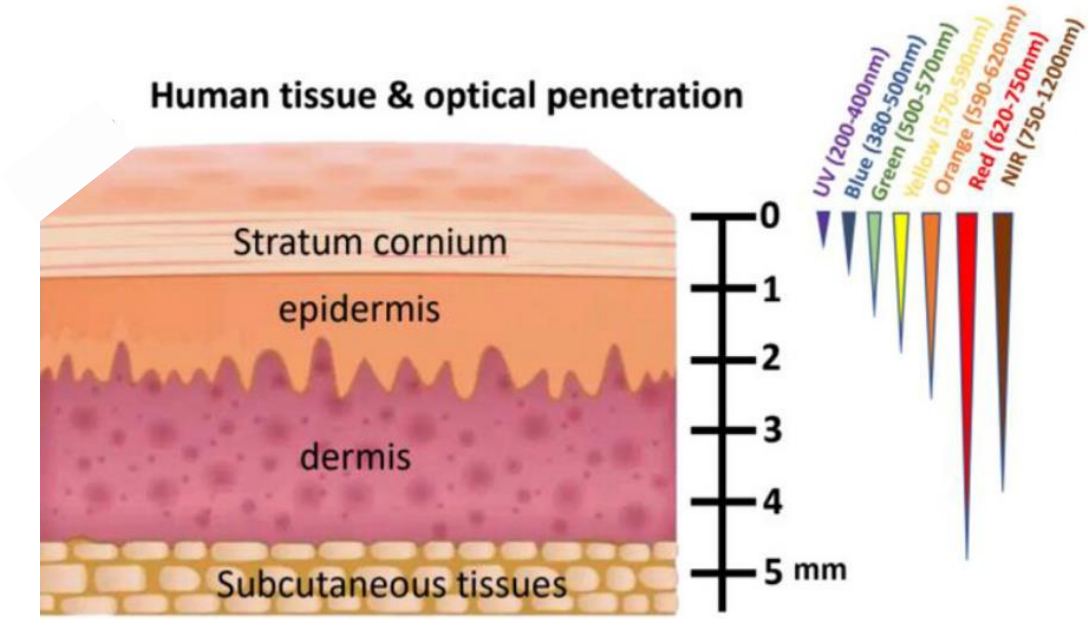


Figura 6. Penetración de las diferentes longitudes de onda en la piel [15].

A modo de ejemplo, la detección del cáncer mediante imágenes ópticas se basa en la alteración de las propiedades ópticas del tejido debido a cambios bioquímicos y morfológicos asociados con las lesiones cancerígenas. La tecnología HSI permite capturar imágenes de áreas extensas de tejido, mostrando un gran potencial en el diagnóstico de varios tipos de cáncer, incluyendo cuello uterino, mama, colon, piel, ovario, próstata, entre otros [15].

1.3. Fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno de luminiscencia que implica la emisión de luz por parte de ciertas moléculas después de ser excitadas electrónicamente, generalmente después de un proceso de absorción de radiación [16]. Este proceso, denominado fotoluminiscencia, se divide formalmente en tres categorías principales: fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia, dependiendo de la capacidad de una molécula para absorber radiación luminosa y excitarse electrónicamente [17].

Este fenómeno implica la absorción de un fotón por un electrón enlazado a una molécula, lo que lo impulsa del estado fundamental al estado excitado. Durante esta transformación, el electrón puede ocupar diversos niveles vibratorios dependiendo de la longitud de onda del fotón absorbido [17]. Los estados excitados son efímeros y los electrones regresan al estado fundamental, liberando energía en forma de calor a través de procesos no radiativos como la relajación vibratoria y la conversión interna [17].

La fluorescencia es un fenómeno radiativo, que implica que los electrones excitados regresen rápidamente al estado fundamental, emitiendo un fotón en el proceso. Este cuanto de luz emitido tiene una longitud de onda mayor que el fotón absorbido debido

a la pérdida de energía durante la relajación vibratoria [17]. Cabe indicar que la energía que falta en este proceso se disipa en el material como energía térmica durante la relajación vibracional del electrón.

El proceso de fluorescencia consta de tres eventos principales que ocurren en diferentes escalas de tiempo. La excitación inicial de la molécula por un fotón que ocurre en femtosegundos, seguida de la relajación vibratoria de los electrones en estado excitado en picosegundos, y finalmente, la emisión de un fotón de longitud de onda mayor y el retorno de la molécula al estado fundamental, lo cual ocurre en un periodo de tiempo de nanosegundos [16].

Por otro lado, la fosforescencia involucra una inversión del espín del electrón durante el cruce entre sistemas al estado excitado triplete, resultando en una emisión retardada de fotones. La fosforescencia se distingue por un mayor desplazamiento de Stokes que la fluorescencia, debido a la disipación adicional de energía durante la relajación fosforescente [17].

La quimioluminiscencia, semejante a la fotoluminiscencia, implica la emisión de luz como consecuencia de una reacción química exotérmica que produce un producto en estado excitado electrónicamente [17]. Si esta reacción es catalizada por enzimas biológicas, se denomina bioluminiscencia. De manera similar, en el ámbito de la investigación biológica, la emisión de luz es una herramienta fundamental, especialmente a través del uso de fluorocromos o fluoróforo. Estos compuestos químicos utilizados en la investigación biológica para la marcación de células y tejidos se distinguen por su capacidad de absorber luz en una longitud de onda específica y emitirla posteriormente en un rango más amplio de frecuencias [18]. Esta propiedad es fundamental para diversas técnicas de detección, como la microscopía de fluorescencia, ampliamente empleada en investigaciones biológicas y biomédicas.

Los espectros de absorción y emisión de los fluoróforos, que indican la intensidad relativa de la fluorescencia, desempeñan un papel crucial en su caracterización y selección para aplicaciones experimentales específicas [18]. Por lo tanto, la comprensión detallada de estos espectros es esencial para asegurar el uso adecuado y efectivo en el contexto de la investigación biológica [18].

Para determinar el espectro de emisión de un fluoróforo, es necesario identificar la longitud de onda de absorción máxima, que coincide con la longitud de onda de excitación máxima, y luego excitar ahí el fluoróforo [18]. Esto permite trazar el espectro de emisión, registrando la intensidad relativa de la fluorescencia en diversas frecuencias. Asimismo, al excitar el fluoróforo con un conjunto de longitudes de onda consecutivas y monitorizar la emisión en la componente espectral de máxima intensidad, se puede generar un gráfico del espectro de excitación [18].

Por otro lado, y tal y como se ilustra en la Figura 7, la Ley de Stokes describe cómo la pérdida de energía vibratoria durante la transición de electrones del estado excitado al estado fundamental lo que provoca un desplazamiento del espectro de emisión hacia longitudes de onda más largas en comparación con el espectro de excitación.

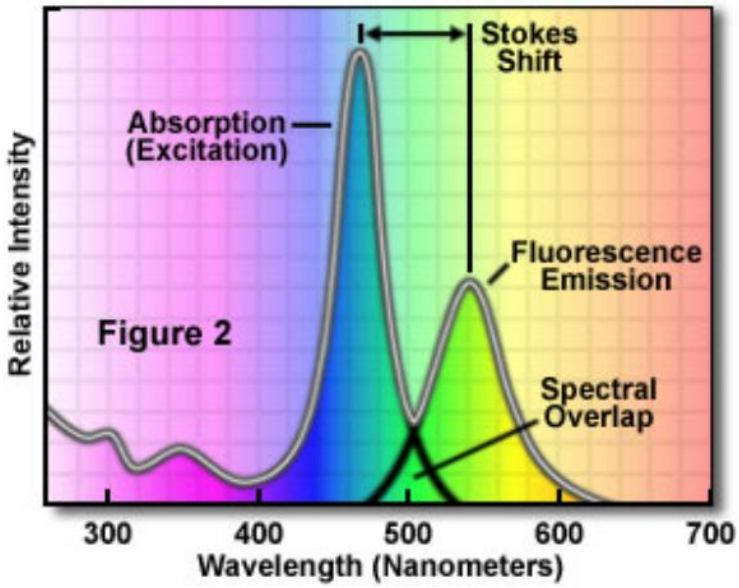


Figura 7. Diagrama espectral de emisión y absorción de un típico fluoróforo [18].

Este principio se utiliza para seleccionar las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas, mediante filtros que permiten maximizar la intensidad de fluorescencia detectada y asegurar el uso eficaz del fluoróforo [18].

1.4. Técnica de fluorescencia

La fluorescencia, un fenómeno óptico en el que los fotones absorbidos en una longitud de onda determinada emiten luz en otra longitud de onda que está asociada con la pérdida de energía debido a vibraciones y relajación, conocida como desplazamiento de Stokes previamente explicado [18]. Mediante el diagrama de Jablonski, y tal y como se muestra en la Figura 8, se puede describir el proceso de fluorescencia, que comienza con la excitación de un electrón a un estado energético superior y su subsiguiente retorno al estado fundamental, liberando energía en forma de fotón [19].

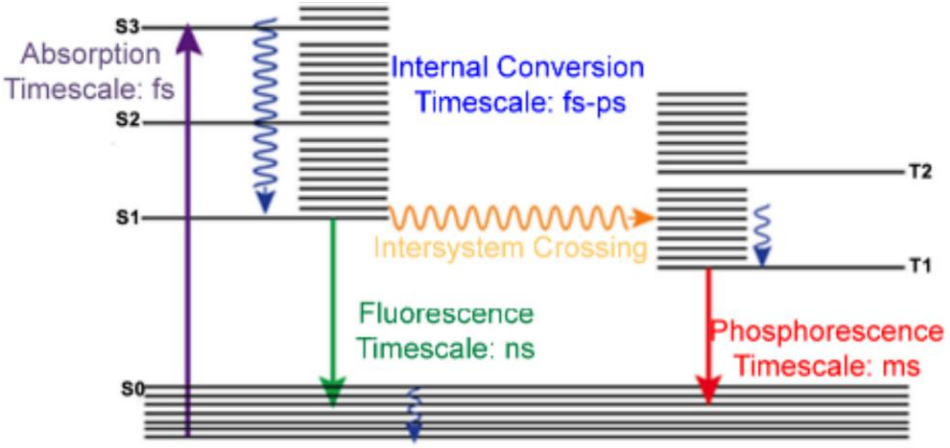


Figura 8. Diagrama de Jablonski para describir el proceso de fluorescencia [19].

La espectroscopia de fluorescencia, ampliamente utilizada en biología y aplicaciones biomédicas, ofrece la capacidad de detectar biomoléculas con una alta resolución espacial y temporal presentando un gran potencial para mejorar la sensibilidad de los métodos de detección basados en la fluorescencia [19].

Además, se han identificado diversas características únicas de la fluorescencia que facilitan el desarrollo de nuevos ensayos de detección del cáncer, tales como su tamaño, forma, alta superficie y propiedades ópticas singulares. Estos atributos, que dependen del material, serán examinados detenidamente en relación con su utilidad en el diagnóstico del cáncer mediante la detección por fluorescencia, centrándose especialmente en sus propiedades ópticas [19].

En el contexto de este estudio, se emplea como material el fluoróforo DiR, también denominado DiIC_18 o yoduro de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindotricarbocianina [20]. DiR es un compuesto lipófilo de cianina con capacidad de fluorescencia en el rango espectral del infrarrojo cercano, reconocido por su utilidad en la marcación de membranas citoplasmáticas [20]. Su aplicación para la obtención de imágenes in vivo en dicho rango de longitud de onda es altamente relevante, dado que la inserción de las dos cadenas largas de 18 carbonos en la membrana celular conduce a una tinción específica y duradera, con una transferencia mínima o nula de tinte entre células [20]. En concreto, y tal y como se ilustra en la Figura 9, este material exhibe un pico de excitación a 754 nm y un pico de emisión a 778 nm [21].

El DiR no interfiere adversamente en la viabilidad celular, ni en su desarrollo, ni en sus propiedades fisiológicas fundamentales [22]. Las células marcadas con este tinte pueden mantenerse viables durante semanas en cultivos y hasta un año en organismos [22]. Aunque habitualmente no se produce transferencia de tinte entre células marcadas y no marcadas, puede ocurrir cierto traspaso en situaciones donde la membrana celular se vea afectada, como sucede durante el proceso de seccionamiento [22].

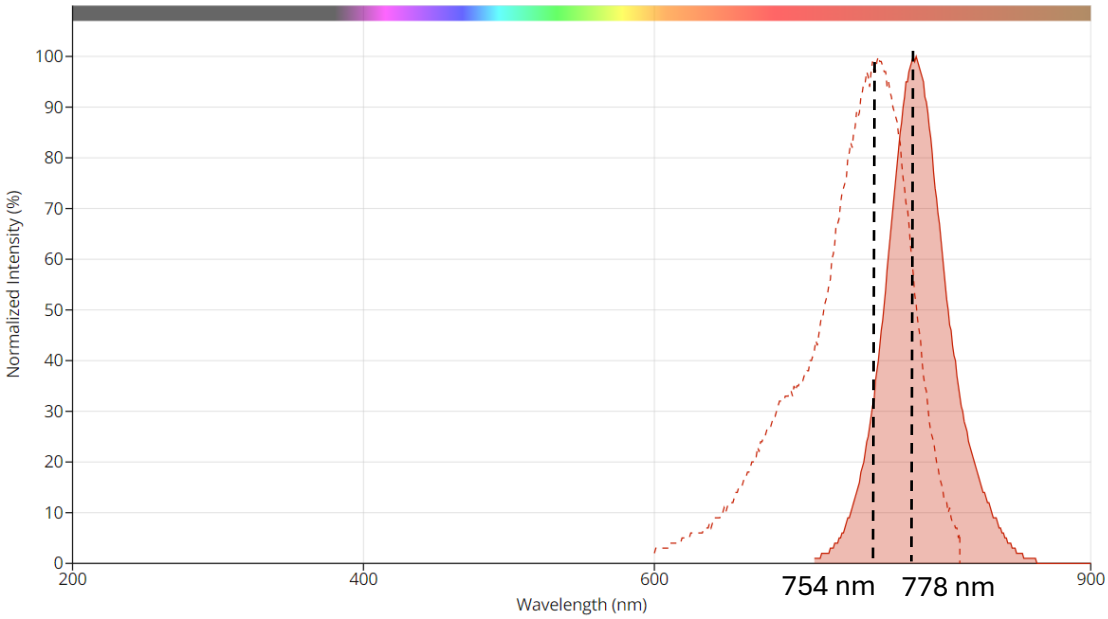


Figura 9. DiR: pico de excitación a 754 nm y pico de emisión a 778 nm [21]

Es importante señalar que para llevar a cabo esta investigación se utilizó una concentración de DiR libre disuelto en etanol (EtOH) a 13,66 µM, donde M se refiere a la concentración en moles por litro de soluto. Esta concentración se muestra en la Figura 10, la cual fue suministrada por el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC) en el marco del proyecto de investigación NANOIMOC (AEI, PDC2021-121481-I00), donde se ha realizado exitosamente una prueba utilizando partículas fluorescentes, lo cual presenta nuevas oportunidades en el campo de la cirugía de imagen para el tratamiento del cáncer de ovario [23].

Figura 10. Concentración de DiR libre disuelto en etanol (EtOH) administrado por ICMAB-CSIC debido al proyecto NANOIMOC

Además, cabe indicar que esta solución puede conservarse en la nevera a 2-8 °C sin experimentar deterioro, siempre y cuando se mantengan en las mismas condiciones que el tinte en su estado original [22].

1.5. *Phantoms*

En el ámbito de la biomedicina, los *phantoms* son modelos físicos diseñados para simular las propiedades de los tejidos humanos o animales [24]. Estos modelos se utilizan extensamente en la investigación y en el desarrollo de tecnologías médicas debido a su capacidad para reproducir, de manera controlada, las propiedades físicas y las características anatómicas y fisiológicas de los tejidos vivos [24].

Los compuestos también son fundamentales en el desarrollo de nuevas tecnologías y procedimientos médicos. Permiten realizar experimentos y entrenamiento en un entorno seguro, facilitando la práctica repetida y el perfeccionamiento de habilidades en procedimientos complejos [24].

De esta forma, estos modelos ofrecen control y reproducibilidad, eliminando riesgos para los pacientes y reduciendo costos asociados con la investigación clínica [24].

Comúnmente, compuestos de materiales de referencia (*background*) como el agar-agar, la gelatina y otros polímeros, los *phantoms* pueden configurarse para replicar las propiedades ópticas, acústicas y mecánicas de los tejidos biológicos. Centrándose en el agar-agar, que es el compuesto que se va a emplear en este estudio, este material es popular debido a su facilidad de manipulación y su capacidad para imitar la consistencia de los tejidos [24].

En el ámbito de este estudio, se emplearán estos elementos para evaluar de manera más realista las propiedades ópticas del fluoróforo DiR en condiciones similares a las del tejido humano. Este enfoque permitirá comprender cómo el DiR puede contribuir en la detección y extirpación de tumores en el cáncer de ovario, mejorando así la precisión y eficacia de los procedimientos quirúrgicos.

1.6. Objetivos

El presente estudio de investigación se enfoca en la evaluación y exploración del potencial resultante de la combinación de la imagen hiperespectral (HSI) y la fluorescencia para enriquecer, tanto el diagnóstico, como el tratamiento del cáncer de ovario.

El objetivo principal de este estudio es realizar un proceso de caracterización lo más exhaustivo posible para validar la técnica de detección. Para ello, primero se desarrolla un modelo para obtener los parámetros necesarios, y luego se variarán las concentraciones del fluoróforo y los parámetros de la cámara hasta determinar las condiciones óptimas que maximicen la precisión y eficacia de la cuantificación de la fluorescencia generada para, en una etapa posterior que cae fuera del ámbito de este TFM, progresar en el diagnóstico del cáncer de ovario para un tratamiento quirúrgico más eficaz. Este proceso permitirá ajustar y calibrar el sistema para obtener resultados consistentes y fiables en diferentes condiciones experimentales.

Con todo ello, se plantean tres subobjetivos. Inicialmente, se propone analizar la capacidad inherente del sistema HSI para visualizar la fluorescencia. Este análisis incluye el ajuste a una curva que modele tanto la emisión, como la excitación del fluoróforo implicado en el proceso. Esta técnica permitirá obtener información detallada y precisa sobre este valor en relación con los parámetros mencionados anteriormente. La aplicación de este método de ajuste matemático facilitará la identificación y cuantificación de los valores óptimos de fluorescencia necesarios para realizar cirugías con éxito, o para analizar los resultados de manera efectiva en el contexto de este tipo de cáncer.

En segunda instancia, se persigue desarrollar un método de calibración destinado a medir de manera precisa los resultados de la fluorescencia obtenidos durante procedimientos quirúrgicos asistidos por esta técnica.

Por último, se busca investigar la cantidad óptima de fluorescencia requerida para llevar a cabo con éxito intervenciones quirúrgicas en casos de cáncer de ovario, o para analizar adecuadamente los resultados subsiguientes.

Estos objetivos se fundamentan en la necesidad de perfeccionar la precisión tanto diagnóstica, como terapéutica, en pacientes afectados por esta patología cancerígena, aprovechando los beneficios ofrecidos por la tecnología HSI y la fluorescencia con el fin de detectar y extirpar el tumor durante operaciones quirúrgicas. La mezcla de ambas tecnologías se erige como una herramienta innovadora y prominente para afrontar los desafíos actuales en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, con el potencial de mejorar significativamente los desenlaces clínicos y la calidad de vida de los pacientes afectados.

1.7. Estructura del documento

Este documento se organiza en varios capítulos para ofrecer una visión clara y detallada del proyecto de investigación sobre la combinación del HSI y la fluorescencia en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de ovario.

- Capítulo 1: Introducción

En este capítulo se proporciona una visión general del diagnóstico médico mediante técnicas de imagen, el impacto del cáncer en la salud global, y se introducen conceptos clave como el HSI y la fluorescencia. Además, se discute la combinación de estas tecnologías y sus beneficios en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de ovario.

- Capítulo 2: Materiales y métodos

Este capítulo describe los recursos utilizados y los procedimientos implementados en el estudio. Se detallan los materiales empleados, los protocolos de recolección de datos y las técnicas analíticas aplicadas, con un enfoque en garantizar la confiabilidad y la validez de los resultados obtenidos.

- Capítulo 3: Resultados

En este capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos a partir de la implementación del proyecto de investigación. Se utilizan figuras para facilitar la visualización de los datos y se discuten los resultados en relación con la literatura existente, destacando las similitudes y diferencias con estudios previos.

- Capítulo 4: Conclusión

Este capítulo sintetiza los hallazgos del estudio, subrayando la eficacia del sistema hiperespectral y de fluorescencia en la calibración y análisis de muestras de DiR. Además, se discuten las implicaciones de los resultados para futuras investigaciones y aplicaciones en la cirugía guiada por fluorescencia, mejorando potencialmente el diagnóstico y tratamiento del cáncer de ovario. También se destacan las nuevas perspectivas aportadas por el estudio y la relevancia de la tecnología HSI y de fluorescencia en aplicaciones biomédicas avanzadas.

Capítulo 2

Materiales y métodos

En este capítulo se describen los recursos utilizados y los procedimientos implementados en el estudio. Se detallan los materiales empleados, los métodos de recolección de datos y las técnicas de análisis aplicadas para alcanzar los objetivos de la investigación. Se enfatiza la importancia de seguir el método científico en cada fase para asegurar la confiabilidad y validez de los resultados.

2.1. Preparación de muestras

En la siguiente sección se va a hablar sobre la técnica de fluorescencia y sus aplicaciones biomédicas. En concreto, este estudio utiliza el tinte fluorescente DiR, eficaz en el espectro infrarrojo cercano y adecuado para imágenes in vivo sin afectar la viabilidad celular. La metodología incluye la preparación de disoluciones y *phantoms* con DiR para obtener medidas precisas, avanzando en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, con un enfoque en la cirugía de imagen.

2.1.1. Elaboración de disoluciones

Para llevar a cabo las medidas del DiR, se preparó de una serie de disoluciones con concentraciones seleccionadas del fluoróforo, diseñadas para evaluar la uniformidad en la muestra y estudiar la variación en el análisis posterior según la cantidad de fluorescencia aplicada. Este proceso implicó la creación de mezclas específicas, en las cuales el DiR se combinaba en diferentes proporciones con etanol, una sustancia elegida por sus propiedades adecuadas para este tipo de experimentos.

Al medir el espectro de un soluto disuelto, es habitual obtener primero una referencia del solvente bajo condiciones experimentales idénticas [25]. Esta referencia se resta posteriormente de la señal de la solución, permitiendo aislar la contribución del soluto, donde se asume que las características espectrales del soluto y del solvente son aditivas [25].

Además, se presupone que la concentración del solvente no varía significativamente con la adición del soluto, es decir, que la mezcla se encuentra en estado diluido [25]. Para evitar errores, es fundamental utilizar solventes que no absorban intensamente en el rango de longitudes de onda empleado [25].

En el caso del etanol, su absorbancia es muy baja a 490 nm, lo que minimiza la posibilidad de errores en los resultados, ya que, como se observó anteriormente, el pico de emisión del DiR se encontraba a 778 nm [25].

En este estudio, las disoluciones se prepararon manteniendo un volumen constante de 2 ml, variando las proporciones de DiR y etanol. Dado que el DiR ya está disuelto en etanol, este proceso consiste en diluirlo para comparar las intensidades de fluorescencia resultantes. Esto es crucial para entender cómo la cantidad de fluoróforo influye en el comportamiento y uniformidad de la muestra. La metodología asegura que cualquier variación observada se pueda atribuir de manera confiable a las diferencias en la concentración del fluoróforo.

En total, en este punto se llevaron a cabo nueve experimentos distintos, cada uno con una combinación específica de estos dos componentes líquidos. Estos casos están claramente detallados en la Tabla 1, que proporciona las cantidades utilizadas en cada mezcla. Este diseño experimental no sólo facilita la comparación directa entre las diferentes disoluciones, sino que también permite identificar cualquier patrón o relación significativa entre la intensidad de la fluorescencia y las proporciones de los componentes.

Nº de concentración	Volumen de DiR (ml)	Volumen de etanol (ml)
1	0	2
2	0,001	1,999
3	0,01	1,99
4	0,1	1,9
5	0,5	1,5
6	1	1
7	1,5	0,5
8	2	0
9	2	0

Tabla 1. Cantidades de las combinaciones entre el DiR y el etanol.

Para la elección de estas concentraciones, se optó por incrementar gradualmente las concentraciones de DiR con el fin de determinar con precisión la cantidad exacta de fluoróforo requerida para alcanzar el límite de detección de fluorescencia. Este enfoque permitió examinar, no solo la variación en los resultados, sino también cualquier tendencia discernible en relación con las demás concentraciones empleadas.

Además, al observar la Tabla 1, se ve que las dos últimas filas presentan la misma cantidad de disolución. Este fenómeno se justifica por la presencia de la fila marcada en rojo, correspondiente a la concentración 9, que fue sometida a un tratamiento especial: el calentamiento del etanol. Este procedimiento se llevó a cabo con el propósito de investigar posibles variaciones en los resultados, anticipando así el experimento futuro que involucra la creación de *phantoms*.

Así, a través de este riguroso proceso experimental, se busca obtener una comprensión profunda y detallada del comportamiento del DiR en diferentes condiciones.

2.1.3. Elaboración de *phantoms*

Un material comúnmente utilizado en la comunidad de investigación biomédica es el denominado "*phantom*", el cual en este estudio actúa como una reproducción artificial de una estructura conocida, en este caso un tejido [26].

En el marco de este estudio, se han empleado *phantoms* con el fin de llevar a cabo medidas del DiR de manera realista. Para alcanzar este propósito, se recurrió a la receta original para la elaboración de gelatina de agar-agar, la cual requiere una dosis de entre 20 y 40 gramos de Agar-agar en polvo por cada litro de agua (H_2O), dependiendo de la consistencia deseada [27].

Cabe indicar, que el agar-agar se utiliza comúnmente para hacer *phantoms* debido a sus propiedades que imitan de manera realista la estructura y consistencia de los tejidos biológicos [28]. Este componente es fácil de manipular y ajustar en términos de concentración, lo que permite la creación de muestras homogéneas y reproducibles. Esto es esencial para estudios como este en el que se investiga cómo la luz y la fluorescencia interactúan con los tejidos en condiciones controladas [28].

Se llevaron a cabo muestras de *phantoms* en una escala reducida para determinar la consistencia óptima necesaria en la confección de estos tejidos ficticios, los cuales serían posteriormente sometidos a medición con DiR. En este contexto, se optó por mezclar 100 ml de agua con cantidades variables de agar-agar (1, 2, 3 y 4 gramos, respectivamente), obteniendo así cuatro concentraciones diferentes de *phantoms*. Dichas mezclas serán posteriormente analizadas mediante HSI para determinar la cantidad óptima de gelatina vegetal requerida para este tipo de mediciones.

Además, dado que estas soluciones serán mezcladas con una concentración de etanol con DiR para medir su fluorescencia, se consideró imprescindible conocer las proporciones de etanol permitidas para la gelatina de agar.

Tras diferentes procesos de pruebas de fabricación, se estableció que la tolerancia máxima de alcohol en agar-agar era del 40% de la disolución, por lo que se determinó inicialmente que el 25% de la disolución fuese etanol, reservando el 75% restante para la gelatina [29].

Una vez definidas las cantidades a emplear en la preparación inicial de las gelatinas, se procedió a realizar una prueba previa con etanol puro con un protocolo estandarizado para cada concentración, sin emplear la disolución de DiR en etanol ya que era limitado.

Después de esta etapa inicial y tras observar los resultados obtenidos, se llevó a cabo el mismo proceso, pero utilizando las muestras que contienen la disolución de etanol con el fluoróforo. Este paso permitirá evaluar cómo interactúan las muestras con el fluoróforo y proporcionará información relevante para el análisis posterior de la fluorescencia.

Como se indicó anteriormente, en la primera etapa del procedimiento, ilustrada en la Figura 11, se seleccionaron pocillos para realizar las mediciones. Estos pocillos fueron marcados con las correspondientes concentraciones de agar-agar y agua.

Figura 11. Distribución de los pocillos para la realización de la primera prueba del *phantom* sin DiR.

Específicamente, se organizó la disposición de las muestras siguiendo el esquema que se muestra en la Figura 12.

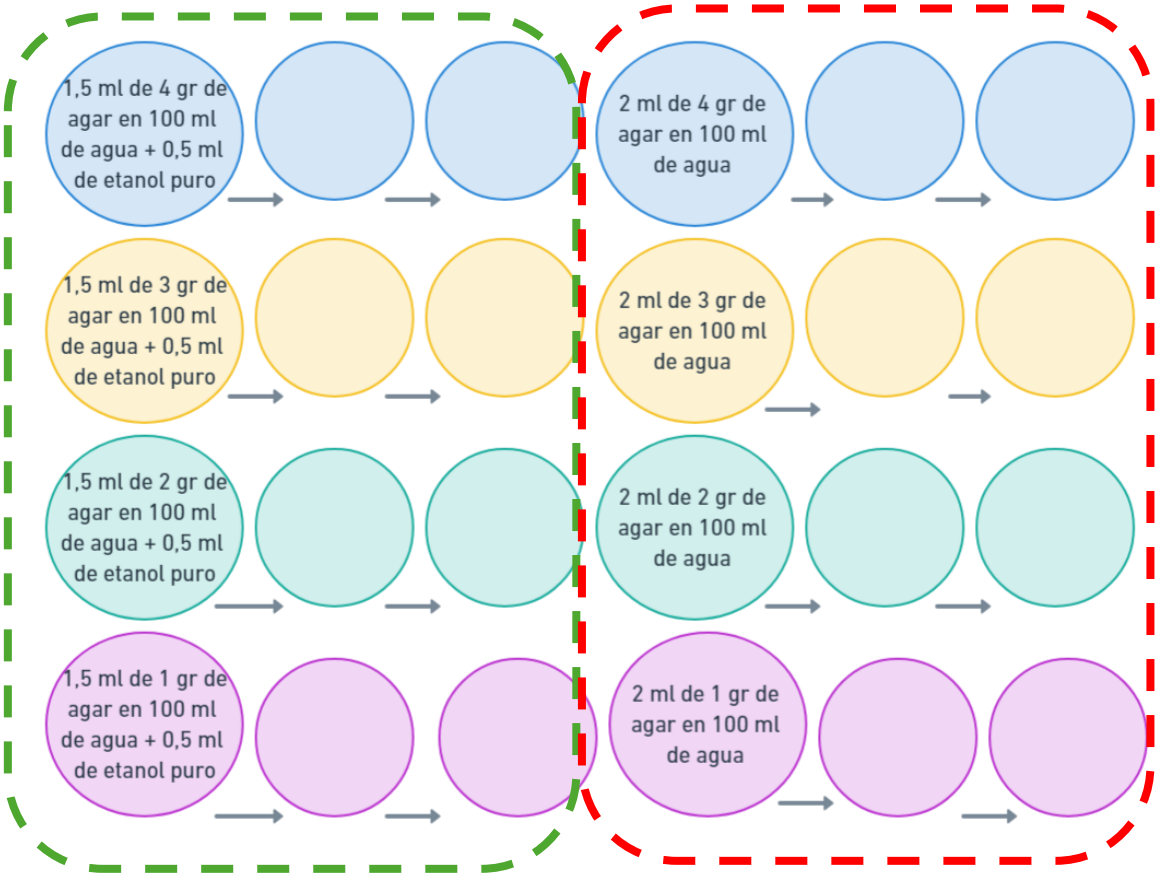


Figura 12. Disposición de las muestras de gelatina de agar-agar más etanol puro.

Se asignó la primera fila a la mezcla de 4 gramos de agar disueltos en 100 ml de agua, la segunda fila a los 3 gramos de agar con 100 ml de agua, y la tercera y cuarta fila a los 2 y 1 gramos de agar disueltos en los 100 ml de agua respectivamente. Además, cabe indicar que las tres primeras columnas, marcadas en verde, serán aquellas muestras que contengan la gelatina con etanol y agar para evaluar como quedaría esa consistencia para los *phantoms* de DiR. Por otro lado, las tres últimas columnas que se encuentran marcadas en rojo son las que sólo contienen gelatina. Este proceso se realiza para observar posteriormente la diferencia de consistencia.

Con todo ello, se decide realizar concentraciones de 2 ml. Por ello, las disoluciones que contengan etanol tendrán 1,5 ml de la gelatina y 0,5 ml de etanol, mientras que las concentraciones que no contengan el etanol serán directamente los 2 ml de la gelatina.

Con todo ello, la receta consta de las siguientes partes:

1) Se prepara el etanol puro vertiendo 0,5 ml con precisión en los pocillos seleccionados empleando micropipetas de alta resolución.

2) Se lleva a cabo la mezcla de los 100 mililitros de agua con la cantidad respectiva de agar-agar en una cazuela, tal y como se observa en la Figura 13. La mezcla se calienta hasta alcanzar una ebullición suave durante un período de 2 minutos, asegurándose de remover constantemente para evitar la formación de grumos [28].

Figura 13. Proceso de calentamiento de los 100ml de agua con las respectivas cantidades de agar-agar.

3) Se extrae una porción de 1,5 ml de la disolución resultante y se agrega a los pocillos previamente preparados con etanol, procediendo a mezclar cuidadosamente. Finalmente, los pocillos restantes se llenaron directamente con 2 ml de la mezcla de gelatina, completando así el proceso de preparación de las muestras.

4) Se deja enfriar en la nevera aproximadamente 2 horas hasta que se observa que ha alcanzado la consistencia deseada, tal y como se ilustra en la Figura 14.

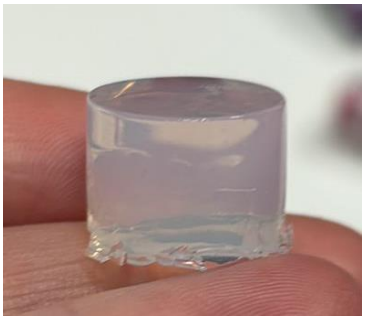


Figura 14. Resultado del *phantom* de agar con etanol puro.

Después de completar el proceso, se determinó que la cantidad óptima de agar-agar para la preparación de los *phantoms* es de 2 gramos por cada 100 mililitros de agua. Esta elección se basó en el hecho de que la solución con 1 gramo resultaba demasiado líquida para cumplir con los criterios de un *phantom* sólido, mientras que las mezclas que contenían 2, 3 y 4 gramos ofrecían consistencias adecuadamente sólidas.

Esta selección se realizó con el objetivo de garantizar una medida precisa posteriormente con el sistema de imágenes de hiperespectral (HSI), considerando que la muestra con menor *scattering* de luz sería la más adecuada para este propósito.

Además, el *scattering* de la luz en las muestras puede afectar las imágenes hiperespectrales debido a que puede alterar la distribución espacial y espectral de la luz que se recoge por el sensor [29]. Cuando la luz se dispersa en diferentes direcciones debido a las irregularidades de la muestra, se dificulta la extracción de parámetros ópticos, ya que introduce una variable adicional que debe considerarse [29].

El objetivo es disponer de un medio con bajo *scattering* para realizar una validación preliminar de la fluorescencia. En el futuro, lo ideal sería contar con *phantoms* con *scattering* controlado para poder validar el equipo en medios turbios.

Con base en los resultados obtenidos en el análisis previo, se inicia la elaboración de los *phantoms* conteniendo el fluoróforo DiR. Este proceso sigue una metodología similar a la empleada para la preparación con etanol puro. En una primera etapa, se definen las concentraciones que serán implementadas en cada uno de los pocillos designados, tal como se ilustra detalladamente en la Figura 15.

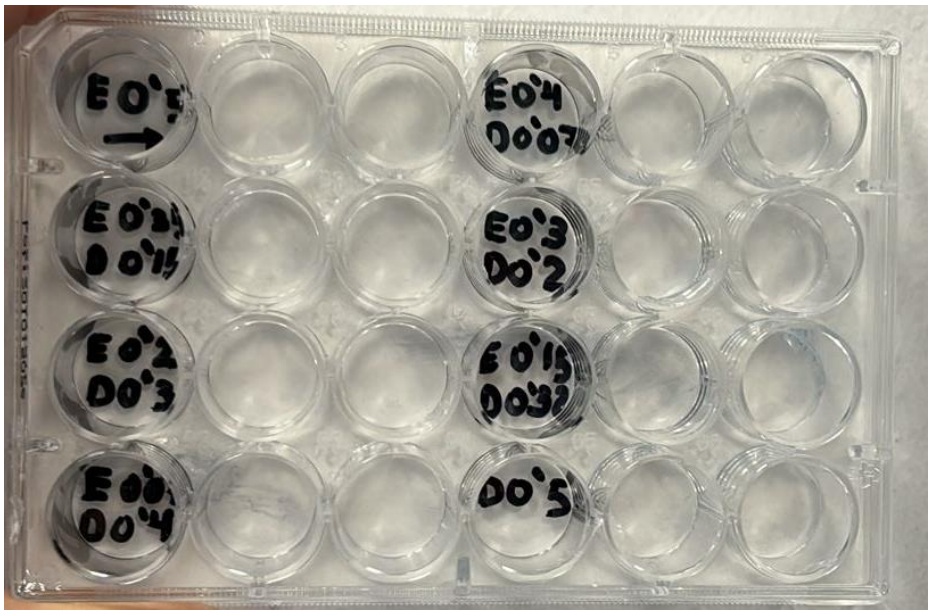


Figura 15. Distribución de los pocillos para la realización de la primera prueba con DiR del *phantom*.

Específicamente, se organizó la disposición de las muestras siguiendo el esquema que se describe en la Figura 16. Cabe indicar que todas ellas llevan 1,5 ml de la gelatina creada con 100 ml de agua 2 gr de agar-agar, y lo único que varía son los 0,5 ml restantes.

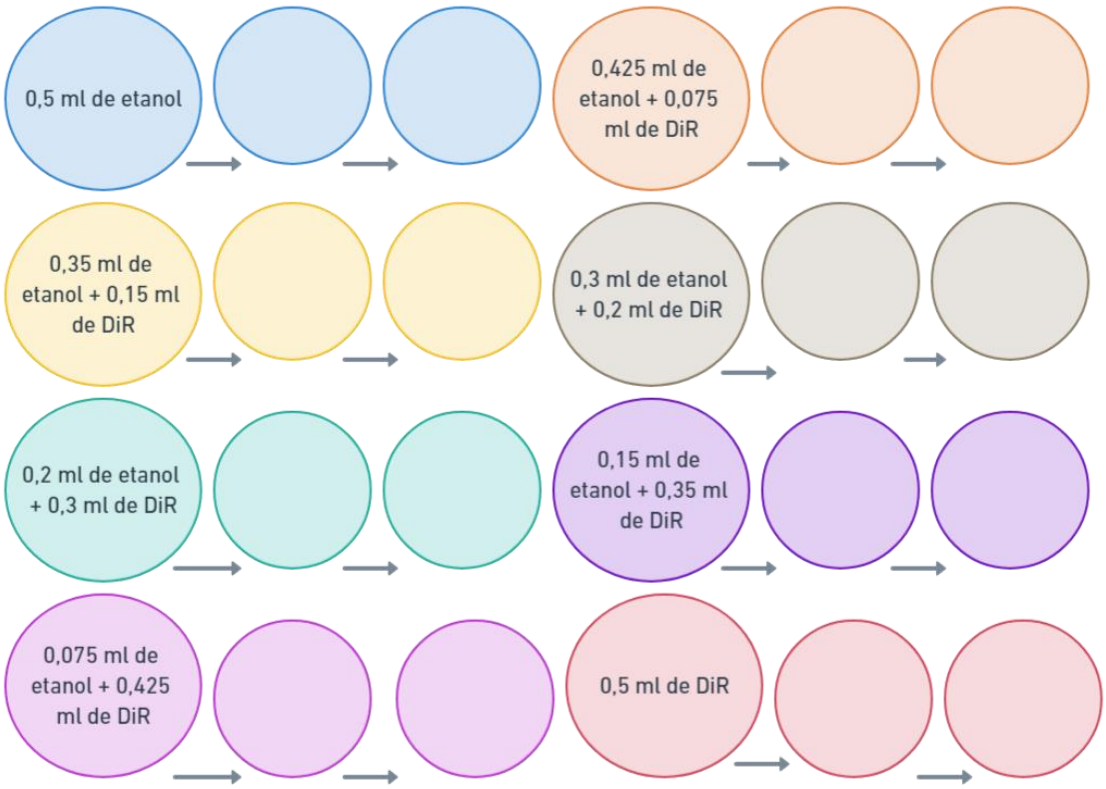


Figura 16. Disposición de las muestras de gelatina de agar-agar con etanol más DiR.

El procedimiento para llenar los pocillos sigue el mismo protocolo empleado anteriormente, cuando no se utilizaba DiR. Este proceso implica las siguientes etapas:

1) Se prepara una solución de etanol con DiR, vertiendo con precisión las cantidades indicadas en los pocillos seleccionados mediante el uso de una pipeta.

2) Se procede a la preparación de la mezcla de 100 mililitros de agua con 2 gramos de agar, calentándola hasta alcanzar una ebullición suave durante un período de 2 minutos, asegurando una mezcla homogénea mediante la agitación constante [29].

3) Se extrae una porción de 1,5 ml de la disolución resultante y se añade a los pocillos preparados previamente con etanol y DiR, realizando una mezcla cuidadosa.

4) Finalmente, se permite que la mezcla se enfríe en la nevera durante aproximadamente 2 horas, hasta que adquiera la consistencia deseada, como se muestra en la Figura 17.

Figura 17. Resultado del *phantom* de agar-agar con etanol más DiR.

2.2. Medidas

2.2.1. Equipo de medida: HSI

Los sistemas hiperespectrales representan una revolución en la tecnología de imágenes, superando las limitaciones de las cámaras de color convencionales [30]. Estos sistemas capturan información en cientos o miles de bandas espectrales, revelando la firma espectral única de cada objeto, lo que permite identificar y cuantificar sus componentes con precisión [30]. Esta capacidad abre un abanico de posibilidades en diversos campos, incluyendo el análisis de materiales, la detección de defectos, el monitoreo ambiental y las aplicaciones médicas.

En concreto, los sistemas hiperespectrales empleados en este estudio se encuentran descritos en las Tesis Doctorales de José Alberto Gutiérrez y Arturo Pardo [31][32][33]. Se corresponden a dos sistemas de imagen, el "Panopticon 2 VISNIR" capaz de trabajar en el VISNIR, es decir, en el rango visible de 380 a 700 nm y en el infrarrojo cercano (NIR) de 700 a 1000 nm; y el "Panopticon 2 SWIR" que trabaja en el infrarrojo de onda corta (SWIR) de 1000 a 1700 nm. Estos sistemas de imagen se muestran en la Figura 18, donde se observan cada una de sus partes [31].

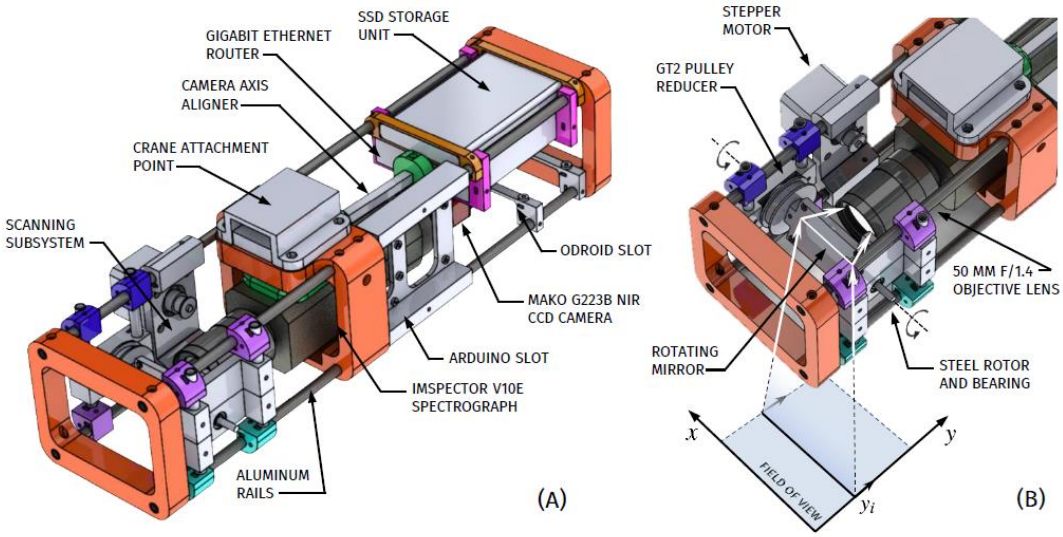


Figura 18. Sistema hiperespectral [31][32][33]

Específicamente, cada sistema de imagen es un instrumento complejo que requiere diversos elementos para funcionar correctamente, por lo que consta de cuatro subsistemas [31].

El primero de ellos, es el subsistema de imagen encargado de la captura, procesamiento y análisis de información espectral [31]. Este subsistema desempeña el papel más relevante ya que es el encargado de la identificación y caracterización de materiales mediante la adquisición de datos espectrales precisos [31]. Los componentes clave de esta parte son:

- Óptica de enfoque: dirige la luz hacia la muestra, garantizando una iluminación uniforme y precisa sobre la superficie a analizar.
- Óptica difractiva: la luz enfocada pasa a través de la óptica difractiva, que la descompone en sus distintas longitudes de onda, creando un espectro característico de la muestra.
- Cámara sensor: captura la imagen hiperespectral transformando la luz descompuesta en una señal eléctrica que se digitaliza para su posterior procesamiento y análisis.

Los parámetros de la cámara, como el tiempo de exposición y la ganancia, pueden ajustarse mediante el subsistema de control. Estos ajustes permiten optimizar la captura de datos espectrales en función de las características de la muestra y las condiciones de iluminación [31].

En segundo lugar, los subsistemas actuadores en este sistema hiperespectral representan un avance significativo en cuanto a la precisión del posicionamiento del espejo rotativo y la flexibilidad para el ajuste remoto de la lente, especialmente en entornos clínicos [31].

Por último, el subsistema de control es el responsable de centralizar y coordinar los demás subsistemas para realizar las medidas [31]. Consiste un sistema embebido con múltiples conexiones y periféricos, para el que se creó un software personalizado con diversos servicios para gestionar cada uno de estos componentes [31].

Por otro lado, una de las partes más significativas de este sistema hiperespectral es el software de control *ad-hoc* creado para gestionar cada uno de los componentes, calibrar los sensores y adquirir los datos, tal y como se muestra en la Figura 19 [31]. Este dispositivo tiene incorporado un software adicional para garantizar el correcto funcionamiento del sistema, permitir al usuario ajustar parámetros y generar datos adecuados para su análisis [31].

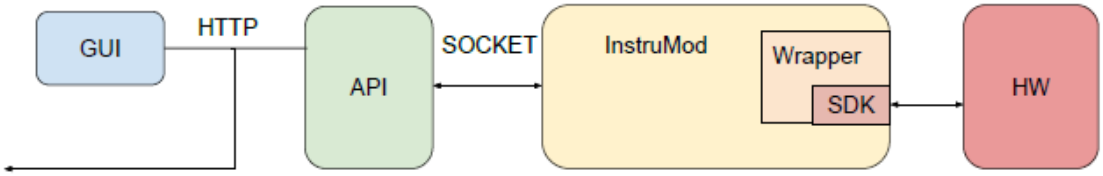


Figura 19. Módulos principales del sistema de control [31].

Este software se ha diseñado de manera modular, con cada componente funcionando de manera independiente para facilitar el mantenimiento y prevenir errores. Los módulos principales incluyen: la instrumentación, que controla la comunicación entre componentes; la API (API, *Application Programming Interface*), que proporciona una conexión HTTP (HTTP, *HyperText Transfer Protocol*) para interactuar con el módulo de instrumentación de forma remota o local a través de una GUI (GUI, *Graphical User Interface*); la GUI, que ofrece una interfaz local al usuario; y el InstruMod, que controla toda la instrumentación del sistema [31].

Este sistema hiperespectral constituye una herramienta fundamental en el desarrollo de este trabajo, ya que permite realizar las medidas necesarias tanto de las muestras de calibración, como de las muestras con fluoróforo DiR.

2.2.2. Fuente de luz

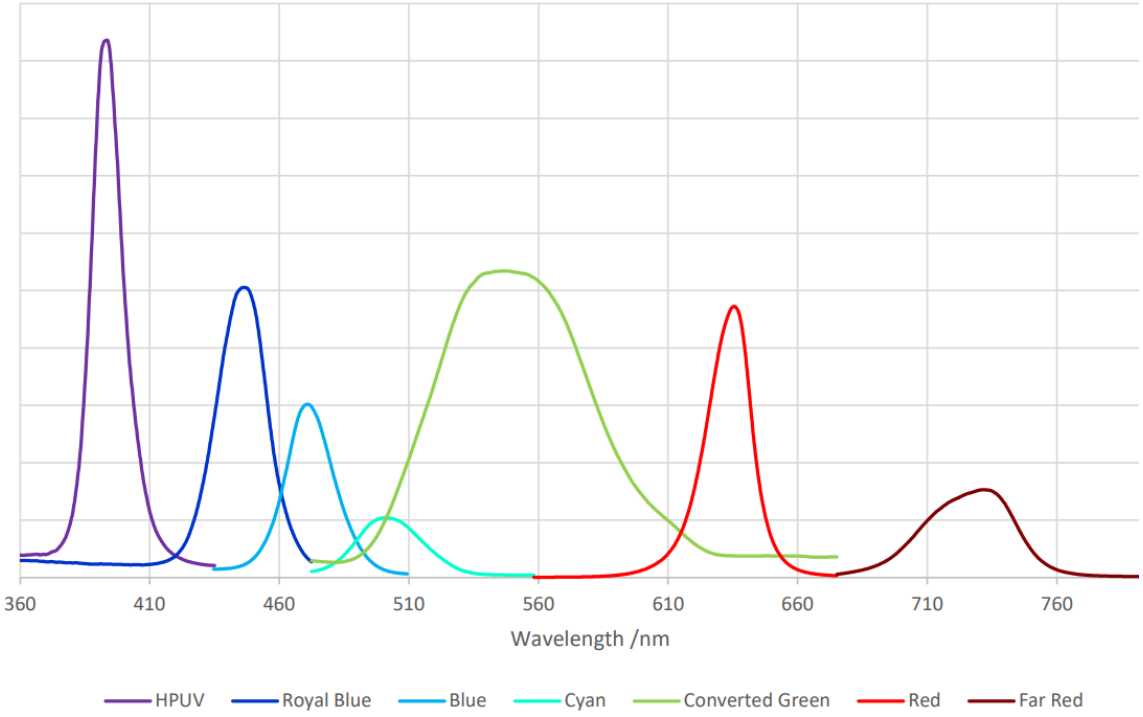
Para los experimentos de fluorescencia previstos en el trabajo, se ha empleado la fuente de luz Bluebox Optics niji 086 que es una herramienta avanzada utilizada en aplicaciones de microscopía y otras técnicas de imagen biomédica [34]. Este sistema se caracteriza por su diseño modular, que permite un alto grado de flexibilidad y precisión en la emisión de luz.

Esta fuente está diseñada con un enfoque modular, permitiendo seleccionar y configurar diferentes módulos de iluminación LED (LED, *Light Emitting Diode*) según las necesidades específicas de su aplicación. Esto facilita la personalización del equipo para el estudio previsto [34].

El sistema incluye múltiples canales de emisión de luz, cada uno con LEDs que cubren diferentes longitudes de onda. Las especificaciones y medidas del sistema indican un rendimiento superior en términos de potencia de salida y precisión de longitud de onda [34]. Las características de los diferentes LEDs disponibles en la fuente son las siguientes:

- HPUV: emite en el rango de 390-400 nm con una potencia medida de 609 mW.
- Royal Blue: emite en el rango de 440-460 nm con una potencia medida de 499 mW.
- Blue: emite en el rango de 465-485 nm con una potencia medida de 292 mW.
- Cyan: emite en el rango de 490-515 nm con una potencia medida de 130 mW.
- Converted Green: emite en el rango de 545-565 nm con una potencia medida de 565 mW.
- Red: emite en el rango de 620-640 nm con una potencia medida de 456 mW.
- Far Red: Emite en el rango de 723-745 nm con una potencia medida de 277 mW.

Estos rangos de longitud de onda se pueden observar más en detalle en la Figura 20, obtenida de la hoja de datos [34].



Channel			Optical Output Power /mW		Centre Wavelength /nm		Bandwidth (FWHM) /nm
			Spec	Measured	Spec	Measured	Measured
1	HPUV	BN7-LED-390HP-002	≥ 330	609	390 - 400	393	15
2	Royal Blue	BN7-LED-440-001	≥ 200	499	440 - 460	446	23
3	Blue	BN7-LED-470-001	≥ 185	292	465 - 485	471	21
4	Cyan	BN7-LED-510-001	≥ 90	130	490 - 515	501	30
5	Converted Green	BN7-LED-550-001	≥ 550	1565	545 - 565	546	71
6	Red	BN7-LED-630-001	≥ 225	456	620 - 640	636	20
7	Far Red	BN7-LED-720-001	≥ 140	277	723 - 745	731	40

Figura 20. Longitudes de onda centrales de la fuente empleada en el experimento, de Bluebox Optics niji 086 [34].

Como se puede comprobar, la capacidad de emitir luz en un rango amplio de longitudes de onda hace que la niji 086 sea buena para aplicaciones de microscopía de fluorescencia ya que se proporciona una iluminación precisa y controlada.

Esta fuente de luz es una herramienta crucial en esta investigación, ya que permite medir la fluorescencia tanto de las placas de referencias estandarizadas de fluorescencia, como de los líquidos y los *phantoms* biológicos. Con esta fuente, se puede seleccionar la longitud de onda adecuada según el rango que se desee medir, asegurando así la precisión y eficacia en la obtención de datos fluorescentes.

2.2.3. Estándares de fluorescencia

En la investigación y diagnóstico biomédico, la precisión en la alineación y evaluación de muestras en sistemas de imagen de fluorescencia es crucial. En este trabajo se emplea el conjunto FSK5 de Thorlabs, que se muestra en la Figura 21, ya que ofrece una solución innovadora mediante un set de portaobjetos fluorescentes, disponibles en cinco colores distintos: azul, verde, amarillo, naranja y rojo [35]. Estos portaobjetos están diseñados específicamente para mejorar la consistencia de la iluminación y la alineación de las muestras, asegurando resultados fiables y precisos en diversas aplicaciones de imagen fluorescente [35].

Figura 21. FSK5 de Thorlabs como método de calibración para comprobar el correcto funcionamiento del equipo [35].

Cada una de las láminas está fabricada con material acrílico fundido. Los portaobjetos del conjunto FSK5 tienen unas dimensiones de 25.4 mm x 76.2 mm y un grosor de 1.7 mm, lo que los hace compatibles con soportes de muestra de 26 mm x 76 mm [36]. Cada set viene con una caja de almacenamiento grabada, que protege los portaobjetos de la contaminación y el polvo, manteniéndolos en óptimas condiciones para su uso [36].

Estos portaobjetos son particularmente útiles para simular una variedad de fluoróforos comunes, ofreciendo diferentes espectros de fluorescencia que facilitan la calibración y el ajuste de los sistemas de imagen [36].

En concreto, en el presente trabajo se llevaron a cabo medidas utilizando el sistema hiperespectral ya explicado. El objetivo principal de estas comprobaciones fue realizar una comparación detallada con los datos proporcionados en las hojas técnicas de los materiales estudiados. Este enfoque permitió verificar la precisión y consistencia de los resultados obtenidos con el sistema hiperespectral frente a las especificaciones indicadas en las hojas de características, *datasheets*.

La comparación de ambos conjuntos de datos es fundamental para evaluar el rendimiento y la exactitud de las herramientas utilizadas en el estudio. Por ello, para llevar a cabo la medición precisa de cada una de las placas del conjunto FSK5 utilizando el sistema HSI, es fundamental primero identificar la longitud de onda central de cada placa. Esta información se verifica consultando la hoja de datos correspondiente, como se ilustra en la Figura 22.

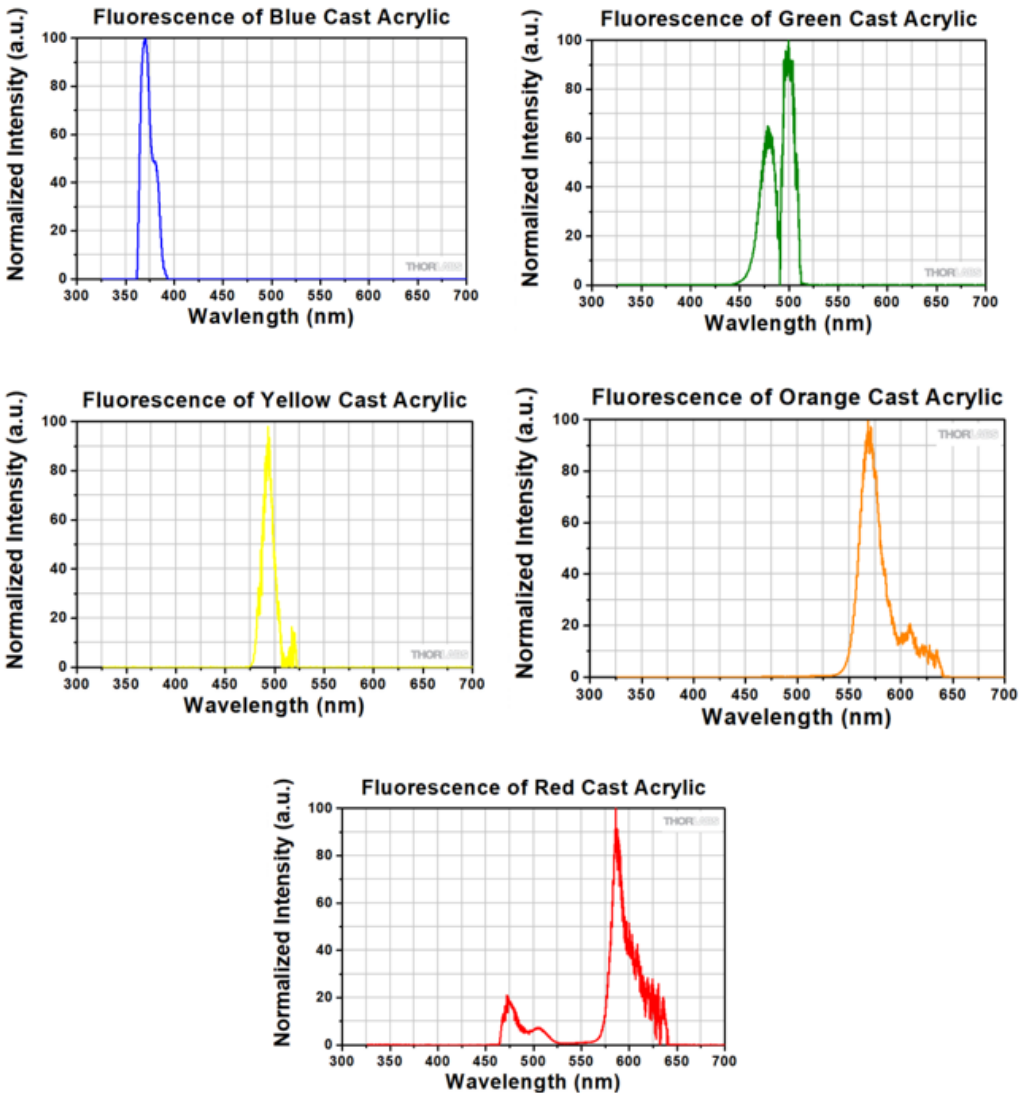


Figura 22. Espectros de las placas FSK5 del *datasheet* de Thorlabs [36].

Los datos proporcionados en el *datasheet* indican que la longitud de onda de excitación de la placa azul es de 365 nm, la del verde es de 470 nm, la del amarillo es de 365 nm, la del naranja es de 565 nm y la del rojo también es de 565 nm.

A continuación, se procederá a realizar la medida de cada una de las placas del conjunto FSK5 en el laboratorio, empleando el sistema HSI "Panopticon 2 VISNIR" anteriormente descrito. Para llevar a cabo este proceso, se utiliza una fuente de luz del laboratorio, descrita previamente, que emite en ocho longitudes de onda diferentes. Inicialmente, es necesario identificar la longitud de onda central de cada espectro, como ya se ha

realizado. Una vez conocido este valor, se debe seleccionar la emisión de la fuente de luz Bluebox Optics niji 086 que más se aproxime a dicha longitud de onda para utilizarla en la medición de cada placa, respectivamente.

Este procedimiento asegura que cada placa sea evaluada con la longitud de onda más adecuada, garantizando así la precisión y la fiabilidad de los resultados obtenidos. Por lo tanto, y tal y como se muestra en la Tabla 2, las longitudes de onda seleccionadas para llevar a cabo la medición de las placas son:

Color de la placa FSK5	Lambda central de FSK5 (nm)	Lambda central de la fuente de luz del laboratorio (nm)
Azul	365	HPUV – 393
Amarillo	365	HPUV – 393
Verde	470	Blue – 471
Naranja	565	Converted Green – 546
Rojo	565	Converted Green - 546

Tabla 2. Selección de la longitud de onda de la fuente Bluebox Optics niji 086 para la medición de las placas FSK5.

Una vez preparadas las placas, se medirá cada una de ellas de forma repetida. Lo primero que debe tenerse en cuenta es que, para realizar las comprobaciones adecuadamente, es fundamental colocar las placas de una manera específica que permita captar toda la luz emitida por la fuente. Para lograrlo, es necesario seguir un procedimiento detallado, tal y como se ilustra en la Figura 23. En esta configuración, la lámina debe disponerse sobre la fuente de luz para que maximice su captura. Además, para medir fluorescencia, es fundamental que la cámara se coloque justo encima de la placa, es decir, a 90º de la misma. Esto se debe a que dicha posición minimiza reflexiones y distorsiones, asegurando que se capture la emisión máxima y más representativa de fluorescencia [37].

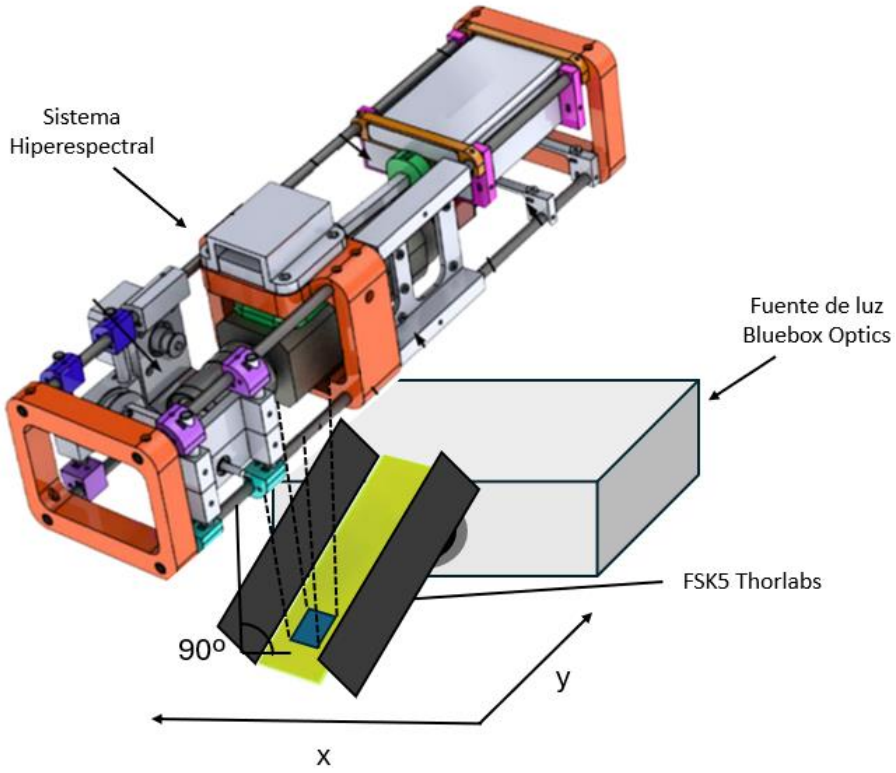


Figura 23. Procedimiento detallado del sistema de medición de las placas FSK5.

Con esta disposición, como también se observa en la Figura 24, se procede a la medida de cada lámina, realizando los ajustes necesarios en la fuente de luz para adaptarla a las diferentes longitudes de onda indicadas previamente. Además, para garantizar que la luz de emisión se mantuviera concentrada únicamente en la placa, fue necesario colocar un elemento opaco que impidiera el paso de la luz en sus bordes, como una cartulina negra en este caso. Este procedimiento aseguró que toda la luz emitida permaneciera confinada en la lámina, permitiendo realizar la medición de manera correcta y precisa, evitando la dispersión de la luz y eliminando posibles interferencias de luz ambiental.

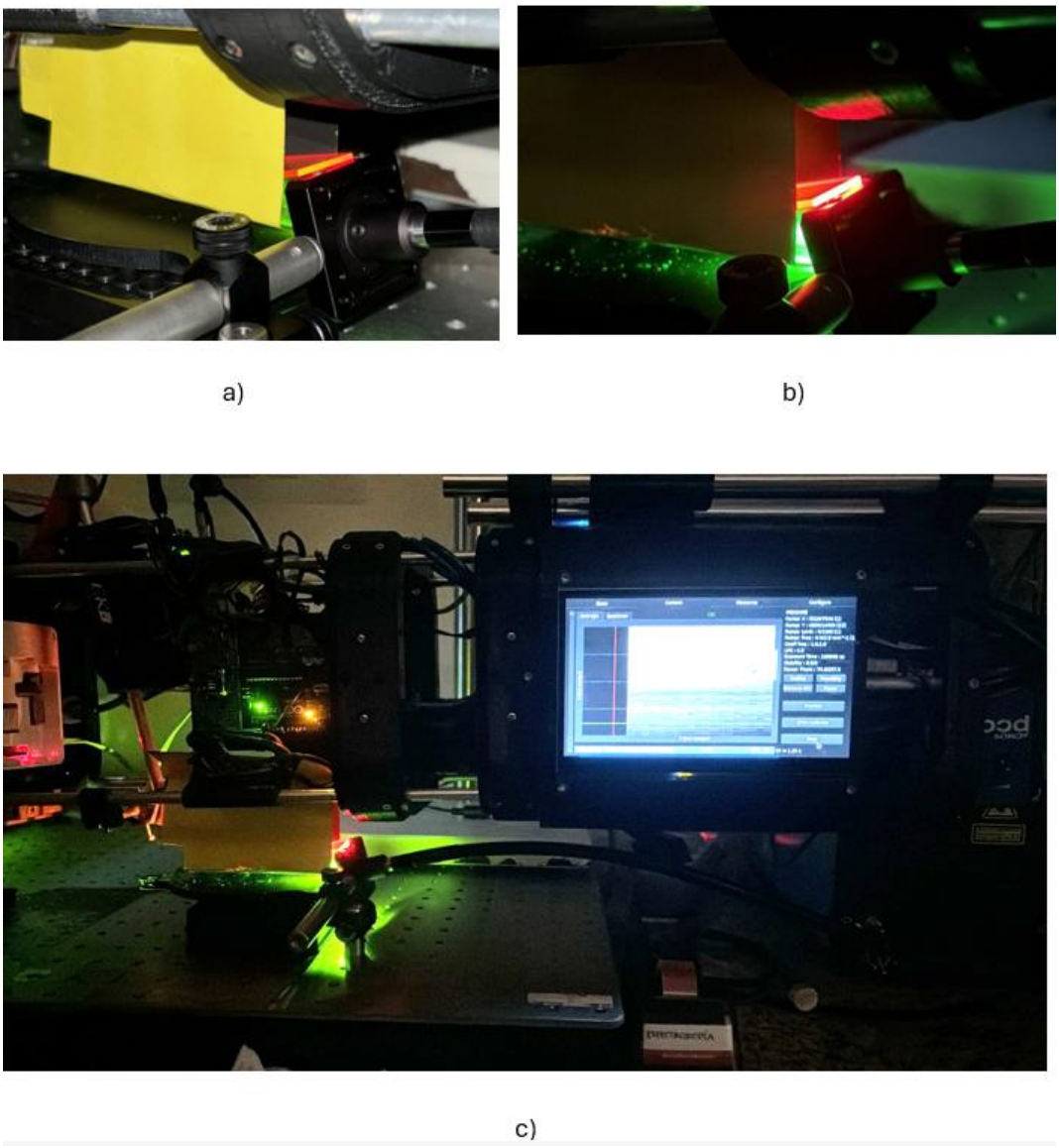


Figura 24. Caracterización de los estándares de fluorescencia: a) elemento opaco que ayuda al confinamiento de la luz; b) medida de placa FSK5 naranja; c) equipo HSI en funcionamiento midiendo la placa FSK5 naranja.

Esta verificación es fundamental antes de proceder con las medidas del compuesto DiR. El proceso de comparación detallada con los datos del *datasheet* confirmará si el HSI puede proporcionar datos precisos y confiables, lo que es esencial para el éxito de las evaluaciones posteriores. Además, si se consigue validar que el sistema funciona de manera óptima con las placas fluorescentes del conjunto FSK5, se establece una base sólida para cualquier análisis subsecuente con DiR, garantizando la fiabilidad y precisión de todos los datos obtenidos en este trabajo.

2.2.3. Métricas de medida del DiR

Para llevar a cabo la evaluación detallada de las muestras preparadas, tanto de los *phantoms* como de las muestras líquidas, se ha utilizado el mismo sistema hiperespectral, el "Panopticon 2 VISNIR". Esta herramienta permitió obtener con precisión los espectros de cada muestra, proporcionando una base de datos que posteriormente será analizada en el apartado de resultados de este documento.

Además, cabe indicar que este estudio se llevó a cabo en dos etapas, como se mencionó anteriormente y se detallará a continuación.

En primer lugar, se realizaron las mediciones de los *phantoms*, y en esta sección se explicará el procedimiento utilizado para su evaluación. Los resultados obtenidos se presentarán en el apartado correspondiente.

En segundo lugar, se analizaron las muestras en formato líquido, que al igual que con los *phantoms*, se describirán las métricas de medición en esta sección, y los resultados serán expuestos en la sección siguiente.

2.2.3.1. Procedimiento de medida del DiR en los phantom

Para llevar a cabo la medida de estas muestras, primero fue necesario establecer una referencia de la fuente de luz utilizando un Spectralon™. Este procedimiento preliminar es crucial, ya que este material es un material estandarizado de reflectancia difusa máxima que asegura la precisión y la calibración de las medidas posteriores [38].

El Spectralon™ es un elemento altamente difusivo y reflectante, comúnmente utilizado en espectroscopia de reflectancia para calibrar instrumentos y validar resultados experimentales, gracias a su capacidad para mantener una reflectancia uniforme en un amplio rango de longitudes de onda (250-2500 nm) [39].

El proceso comienza seleccionando un Spectralon™ de alta calidad, el cual debe ser cuidadosamente limpiado y preparado para evitar cualquier contaminación que pudiera afectar las medidas. En este caso se ha utilizado el "Juego de portaobjetos fluorescentes, conjunto de 5 colores".

Una vez preparado, el Spectralon™ se coloca bajo el foco de la cámara hiperespectral, tal y como se muestra en la Figura 25, permitiendo obtener imágenes que servirán para calibrar las medidas finales de las muestras bajo estudio, permitiendo corregir cualquier desviación y aberración cromática o espectral [38].

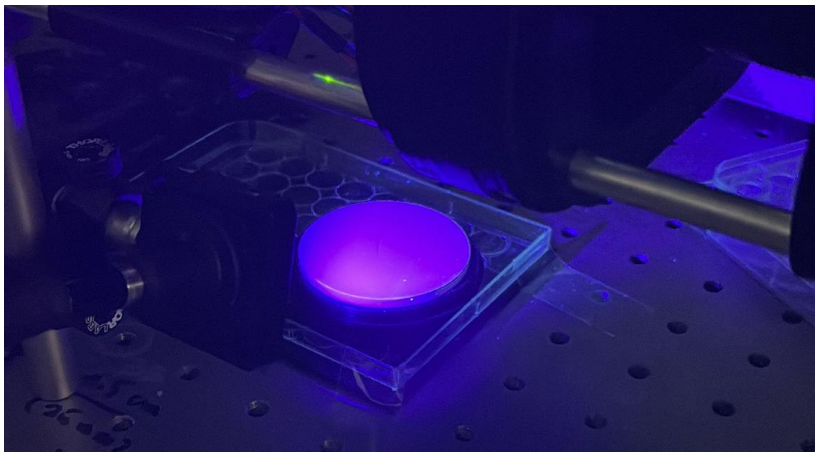


Figura 25. Spectralon™ en medida con el sistema hiperespectral.

Además, la utilización del Spectralon™ ayuda a compensar las variaciones en la iluminación y en las características del detector, proporcionando un punto de referencia consistente a lo largo de todos los experimentos [38]. Este paso es especialmente importante cuando se trabaja con diferentes concentraciones de muestras como ocurre en este estudio, ya que con este método se puede tener la certeza de que las mediciones reflejan con precisión las propiedades intrínsecas de las muestras analizadas.

Seguidamente, se procede a realizar las mediciones de los phantoms. Para llevar a cabo este proceso, se colocó un pocillo debajo de la cámara hiperespectral, asegurándose de que estuviera marcado para garantizar que las muestras se colocaran siempre en la misma posición. Esta precisión en la colocación es crucial, ya que el equipo se había calibrado específicamente en ese punto.

Posteriormente, como se ilustra en la Figura 26, se procedió a posicionar cada uno de los *phantoms* en dicho punto marcado y se llevaron a cabo las medidas con tres tiempos de exposición diferentes: 50 ms, 100 ms y 150 ms. Esta variación en los tiempos de exposición se realizó con el objetivo de llevar a cabo un análisis más exhaustivo en futuras etapas del estudio, permitiendo así evaluar cómo diferentes tiempos de exposición afectan la adquisición de la fluorescencia y la calidad de los datos obtenidos.

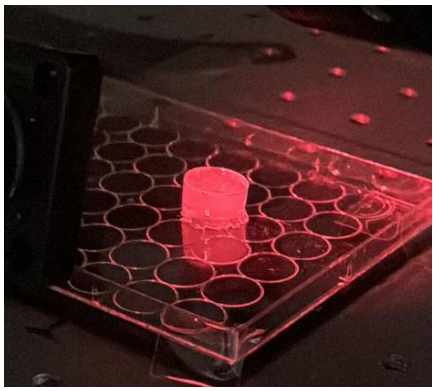


Figura 26. *Phantom* siendo medido con el HSI.

Estas medidas se realizaron utilizando la fuente de luz Bluebox Optics niji 086 y activando el módulo LED *Far Red*, dado que coincide con la longitud de onda de emisión del DiR. Este aspecto es fundamental, ya que la elección de la longitud de onda adecuada para la fuente de luz garantiza que la fluorescencia del DiR se excite de manera óptima.

2.2.3.2. Procedimiento de medida del DiR en líquido

Para realizar las mediciones del DiR en formato líquido, es importante destacar que las mezclas se prepararon justo antes de cada medida para conservar sus propiedades y mantener una temperatura constante, minimizando así cualquier posible alteración y/o artefacto en la medida. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1) Preparación de la mezcla: se realizó la mezcla de etanol con DiR siguiendo las indicaciones proporcionadas en el apartado 2.1.2, como se detalla en la Tabla 1. Esta preparación aseguraba que cada disolución estuviera recién hecha y lista para la medida.

2) Vertido en el pocillo: la disolución recién preparada se vertía en un pocillo, que se colocaba cuidadosamente debajo de la cámara hiperespectral. Es crucial que la estructura donde se realiza la medida se mantenga en la misma posición para todas las muestras. Para lograr esto, se instaló un bloque adicional de pocillos fijo a la mesa, de manera que el que estaba en movimiento siempre se colocara en la misma posición exacta.

3) Medición de la disolución: una vez colocado el pocillo, se procedía a realizar la medida utilizando la fuente de luz con el LED *Far Red*. Este paso es fundamental para captar la fluorescencia específica de este elemento.

4) Almacenamiento de datos: el espectro resultante de cada medida se guardaba para su análisis posterior. Esta documentación detallada es esencial para comparar y evaluar los datos de manera efectiva.

5) Limpieza y repetición: después de cada medida, el pocillo se limpiaba cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de la mezcla anterior. A continuación, se repetían todos los pasos con la siguiente disolución, asegurando que cada muestra se midiera bajo las mismas condiciones.

Este enfoque sistemático y detallado garantiza la precisión y la reproducibilidad de las medidas, proporcionando una base sólida para el análisis de las propiedades fluorescentes del DiR en formato líquido.

2.2.4. Medida de la transmitancia del agar

Se realizó la caracterización de la transmitancia del agar-agar con el objetivo de emplear los resultados en la comprensión de los datos obtenidos con el DiR, que se detallarán en el apartado de resultados. Para ello, se utiliza el esquema ilustrado en la Figura 27a, donde se observa a la derecha de la imagen una fuente de tungsteno halógeno operando en el rango espectral de 360-2000 nm. En concreto, para la caracterización espectral, se emplearon 2 espectrómetros: el espectrómetro MAYA 2000-PRO para medir en el rango de 360-1000 nm.

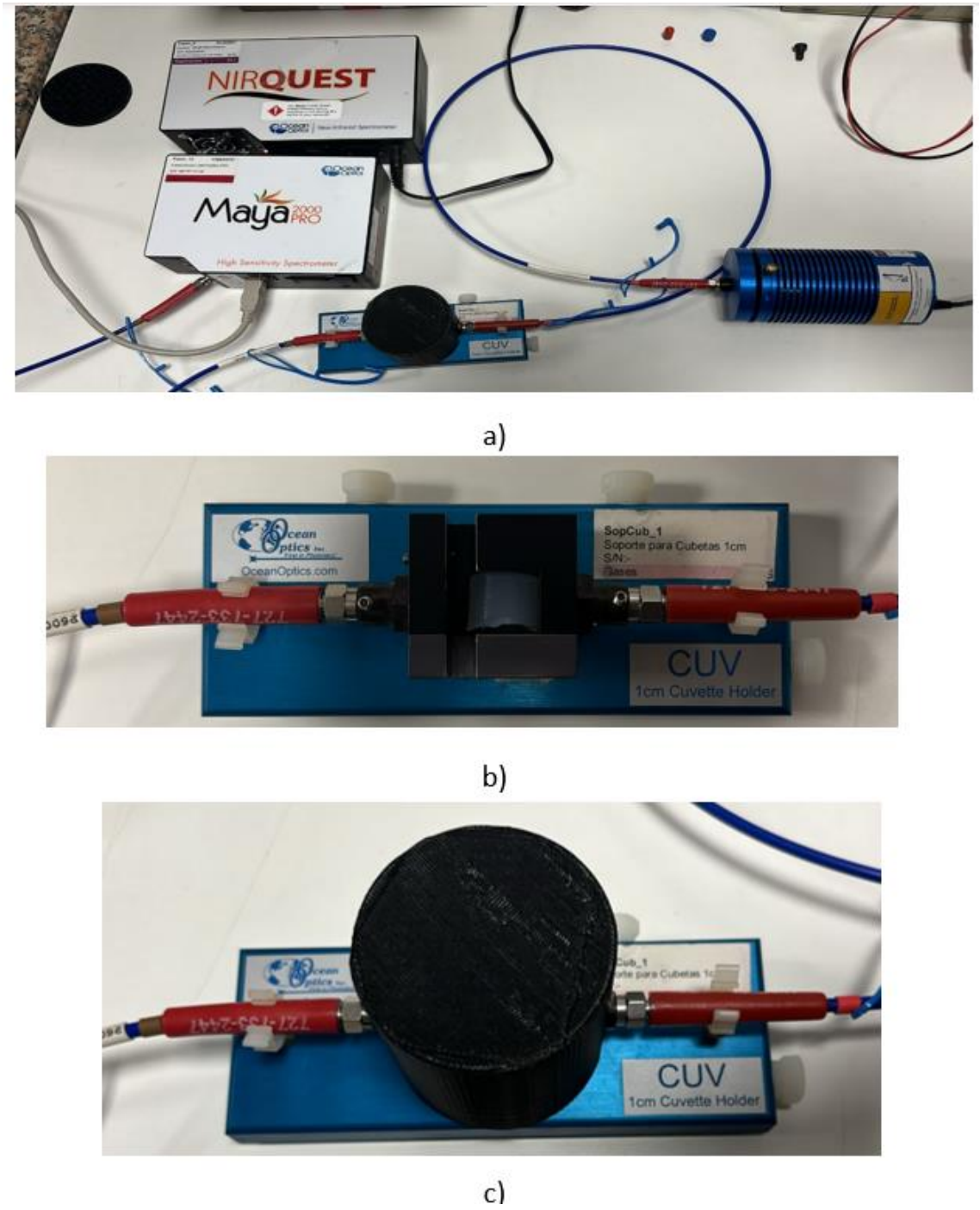


Figura 27. Caracterización en transmitación del agar-agar: a) sistema completo de medida de la transmitancia del agar-agar; b) soporte para los *phantoms* de agar-agar; c) tapa del soporte para evitar la influencia de la luz exterior.

Adicionalmente, se utiliza un soporte para cubetas, tal como se puede ver en la Figura 27b, en el que se irán introduciendo los diferentes *phantoms* para su medición en transmitancia. Es importante destacar que, para asegurar la correcta realización de las medidas, se debe cubrir el soporte con una tapa hecha a medida, como se observa en la Figura 27c.

A modo de aclaración, como se muestra en la Figura 28, se ha creado un esquema para entender mejor este setup.

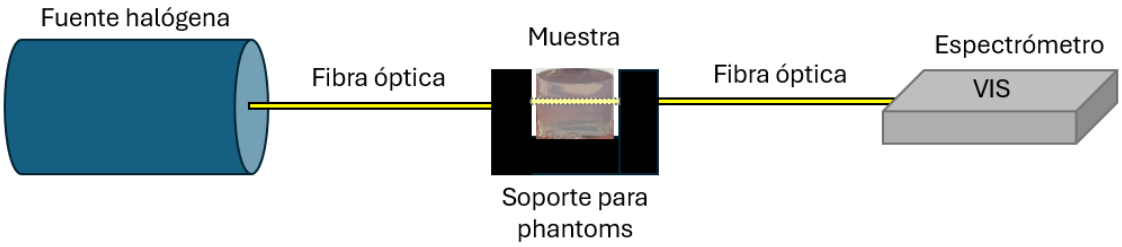


Figura 28. Esquemático del setup realizado para la medición de la transmitancia del agar-agar

2.3. Procesado

Para llevar a cabo el procesado de todos los datos medidos y realizar los cálculos computacionales, se utilizará el lenguaje de programación Python. En este lenguaje, se analizarán los resultados obtenidos y se generarán todas las figuras necesarias para extraer la información relevante, permitiendo visualizar los datos de manera clara y comprensible, facilitando así su posterior análisis en el apartado de resultados del documento. Además, Python ofrece una amplia variedad de bibliotecas y herramientas que optimizan el análisis de grandes volúmenes de datos, garantizando precisión en el manejo de la información medida.

2.3.1. Modelado matemático

Para analizar los datos obtenidos y extraer información relevante de las gráficas de fluorescencia, se debe considerar que al medir fluorescencia con una cámara hiperespectral se obtienen dos gaussianas, tal y como se ilustra en la Figura 29.

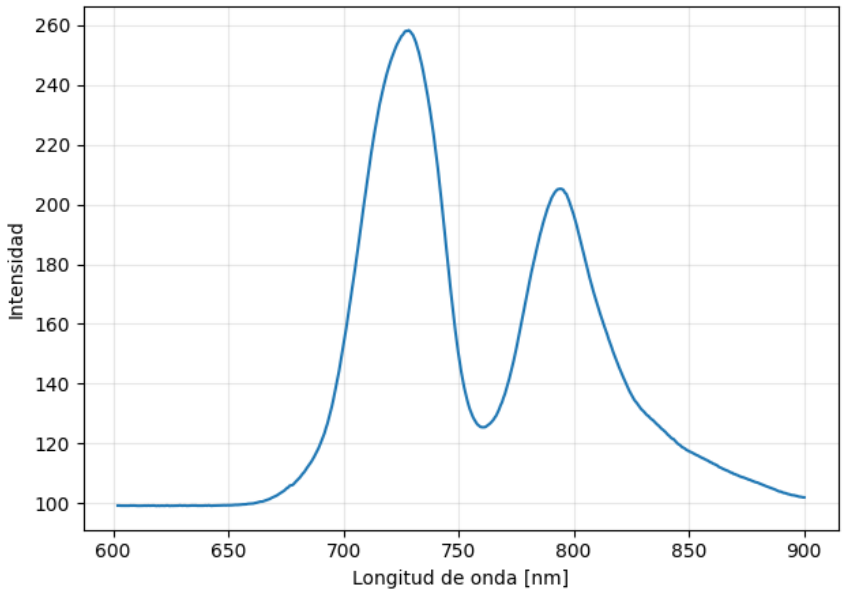


Figura 29. Espectro de fluorescencia de un compuesto.

Al medir fluorescencia, la aparición de dos picos se corresponde a la iluminación de la fuente de excitación y a la fluorescencia emitida.

El primer pico gaussiano corresponde al espectro de la fuente de luz utilizada para excitar la muestra, en este caso el LED de la Bluebox Optics niji 086 . Esta fuente de excitación es absorbida por la muestra, lo que excita las moléculas fluorescentes. En cuanto a la segunda gaussiana, que aparece en longitudes de onda mayore, se corresponde a la fluorescencia emitida por la muestra, en concreto, en la longitud de onda de emisión del fluoróforo DiR.

De esta forma, la combinación de estos dos picos permite distinguir entre la radiación de excitación y la fluorescencia emitida, facilitando un análisis detallado de las propiedades fluorescentes del DiR.

Por esta razón, se utiliza como modelado matemático el ajuste a dos gaussianas cuya expresión es la siguiente (1):

$$f(x) = a_1 e^{-\frac{(x-b_1)^2}{2c_1^2}} + a_2 e^{-\frac{(x-b_2)^2}{2c_2^2}} \quad (1)$$

En esta fórmula, $f(x)$ es la función objetivo, en este caso la suma de dos gaussianas, x es la variable independiente de la función, a_1 y a_2 representan las amplitudes de las dos gaussianas, b_1 y b_2 son las medias, y c_1 y c_2 son las desviaciones estándar que definen el ancho de cada gaussiana [39]. Este ajuste se realiza en Python sobre los datos medidos experimentalmente, lo que permite caracterizar y obtener información relevante como

la longitud de onda central, la intensidad según la concentración, la varianza y la media de cada componente de fluorescencia.

Este modelado permite manejar y caracterizar la información obtenida, ayudando con la creación de gráficas. Estas visualizaciones facilitan el análisis detallado de los datos en el apartado de resultados del documento, asegurando que todas las conclusiones sean fundamentadas en datos precisos.

Capítulo 3

Resultados

En este capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos a partir de la implementación del proyecto de investigación. El análisis se lleva a cabo mediante una combinación de métodos cuantitativos y cualitativos, con el fin de ofrecer una visión completa y robusta de los mismos. Se emplean figuras que facilitan la visualización de los datos y resaltan las tendencias y patrones más relevantes. Asimismo, se discuten los resultados en relación con la literatura existente, destacando las similitudes y diferencias con estudios previos, y aportando nuevas perspectivas al campo de estudio.

3.1. Análisis de las placas FSK5

Con el objetivo de establecer una base sólida y un método eficaz de calibración de fluorescencia, se llevaron a cabo una serie de mediciones detalladas, descritas en el capítulo anterior, utilizando las placas FSK5 de Thorlabs. Es importante recordar que se utilizaron cinco placas distintas, cada una de un color diferente: azul, amarillo, verde, naranja y rojo. Para realizar las medidas de cada una de estas placas, siguiendo el procedimiento descrito en la Tabla 2 de este documento, se empleó la fuente de luz del laboratorio, ajustada a la longitud de onda central específica de cada lámina.

La medida se realizó posicionando la cámara hiperespectral a 90º con respecto a la muestra, lo que permitió obtener datos precisos sobre la emisión de fluorescencia de cada placa.

En esta sección se presentarán de manera detallada los resultados derivados de las mediciones realizadas. Estos se ilustran en las Figuras 30 - 3, donde se pueden ver los espectros obtenidos durante las mediciones de las láminas en el laboratorio. Además, se realiza una comparación de estos espectros con los proporcionados en el *datasheet* de cada una de las placas. Este balance es esencial para verificar la precisión y exactitud de los resultados, asegurando que las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo correctamente. Además, a través de este análisis comparativo, se busca confirmar la validez de los datos recolectados y la eficacia de este método de calibración empleado.

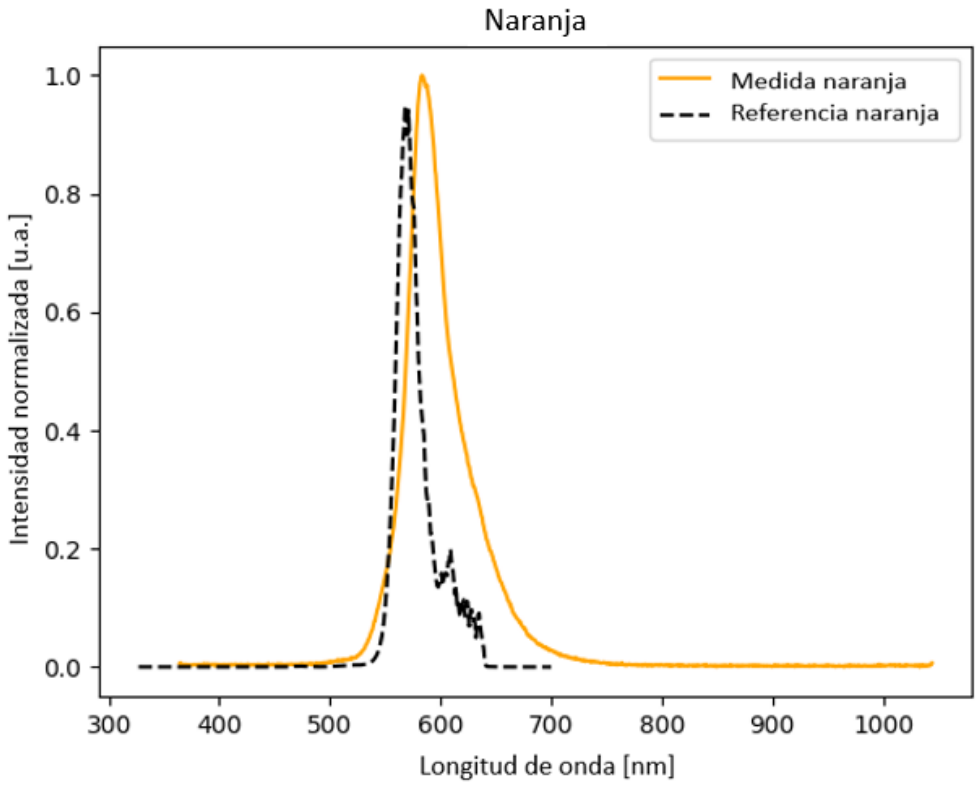


Figura 30. Espectro de la placa FSK5 naranja medida en el laboratorio frente al espectro del *datasheet.*

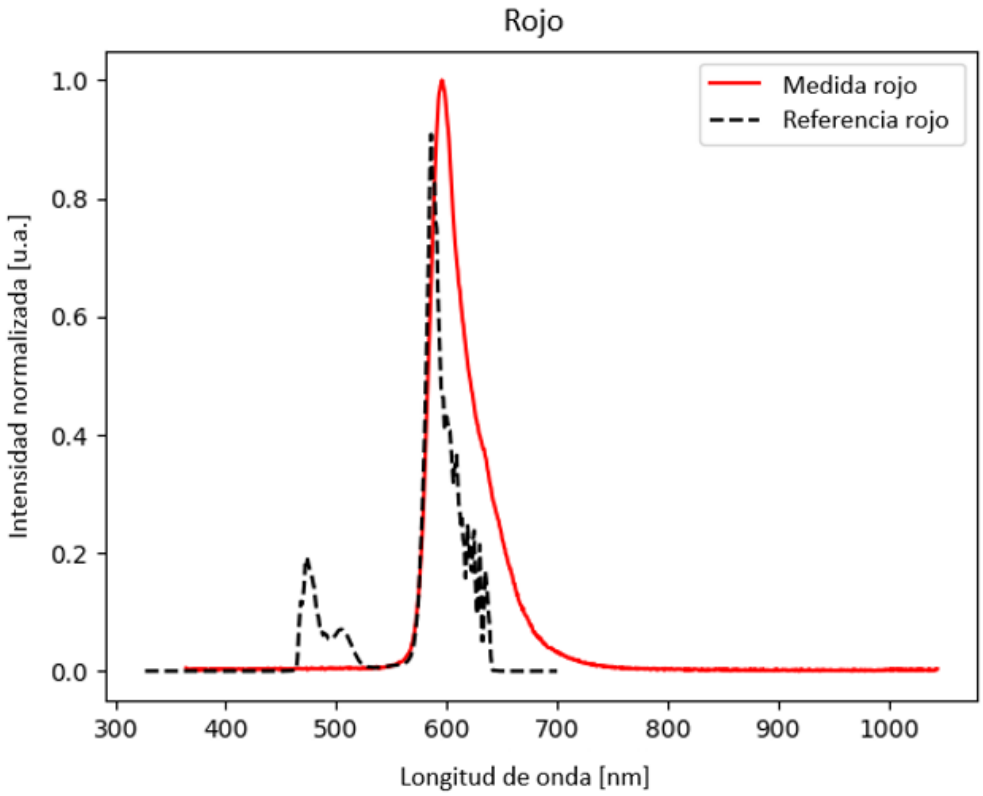


Figura 31. Espectro de la placa FSK5 rojo medido en el laboratorio frente al espectro del *datasheet*.

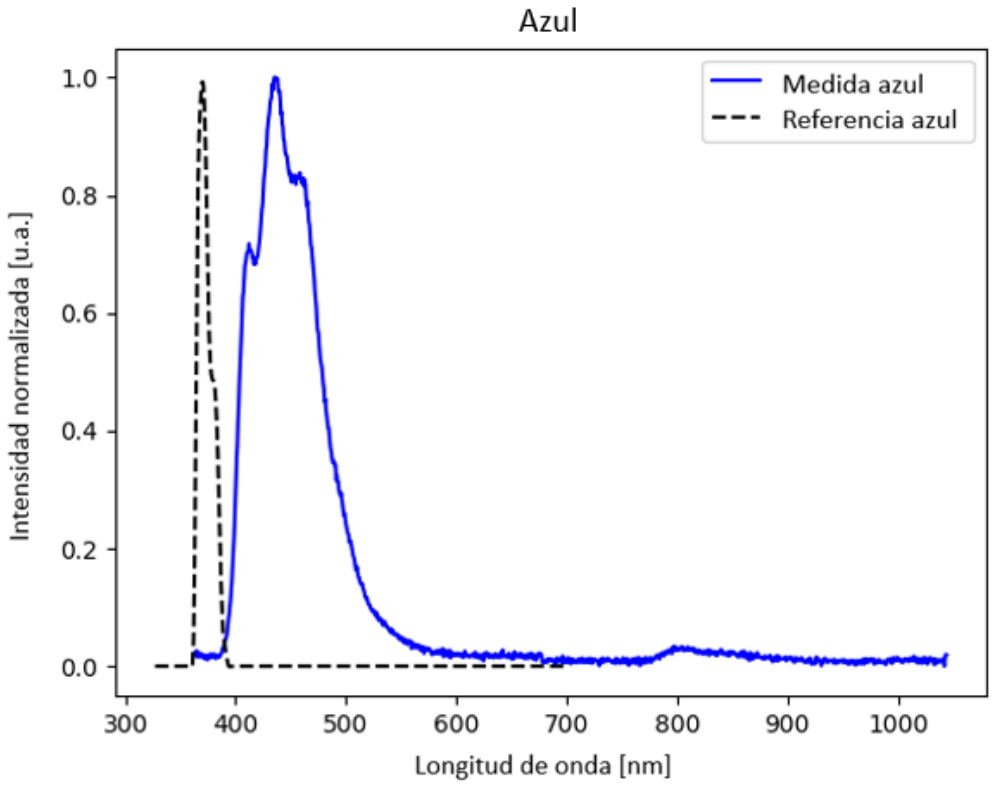


Figura 32. Espectro de la placa FSK5 azul medida en el laboratorio frente al espectro del *datasheet*.

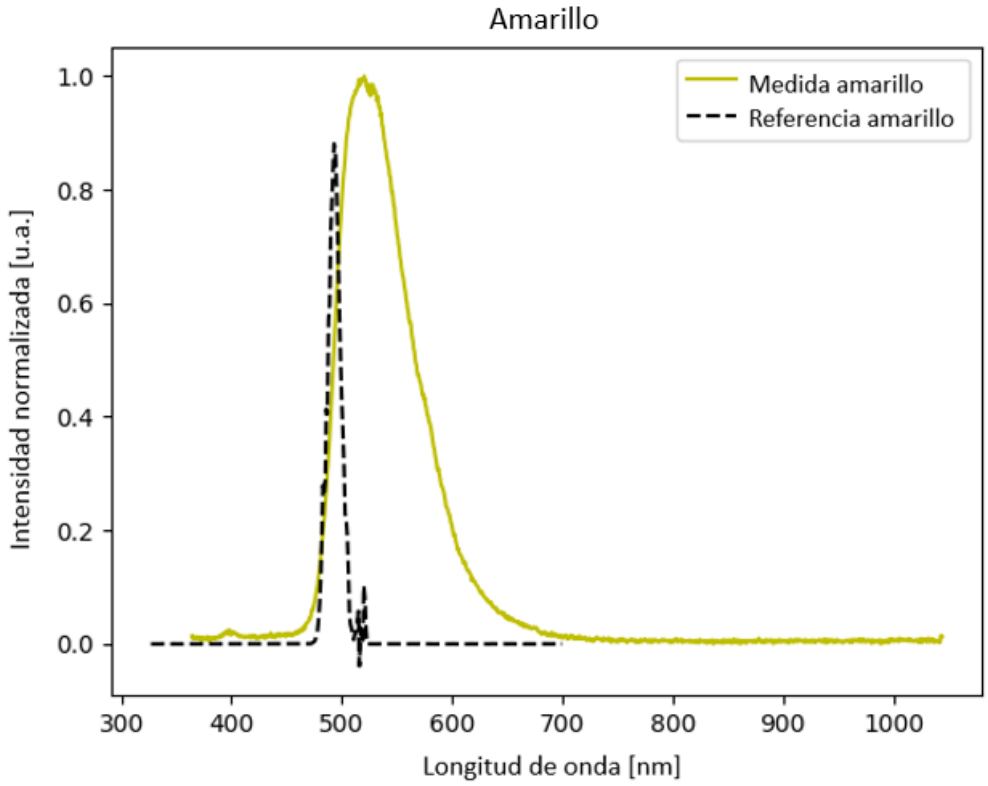


Figura 33. Espectro de la placa FSK5 amarilla medida en el laboratorio frente al espectro del *datasheet*.

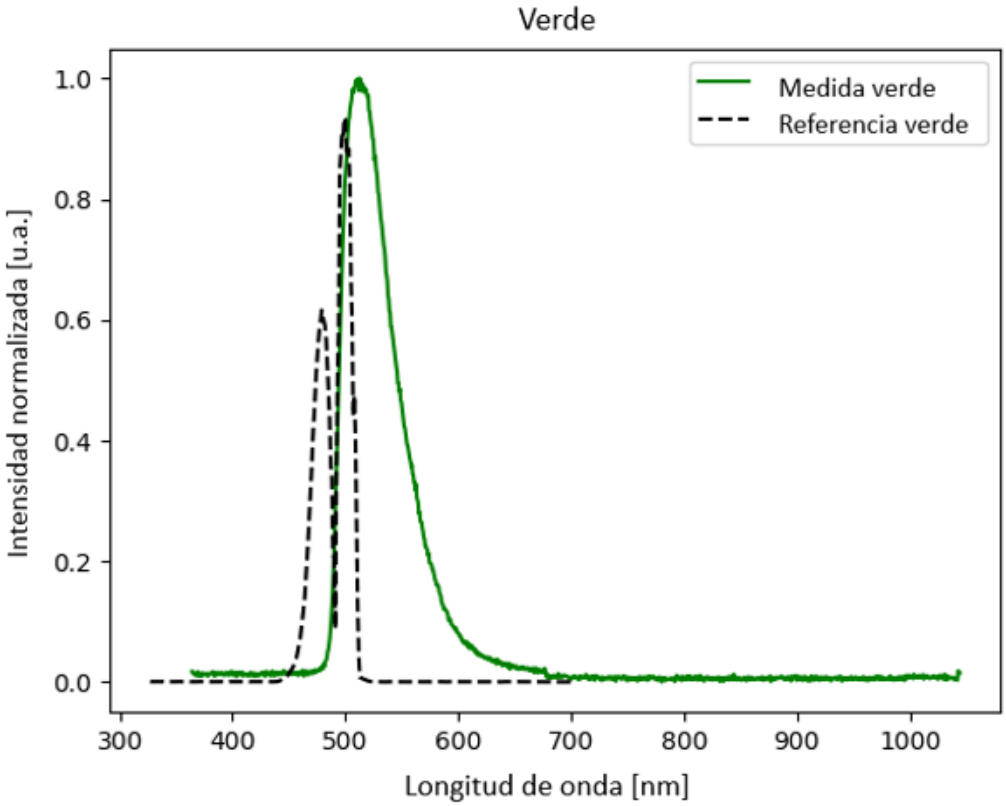


Figura 34. Espectro de la placa FSK5 verde medida en el laboratorio frente al espectro del *datasheet*.

Al analizar cada uno de ellos individualmente, se destacan varios puntos importantes. En las Figura 30 y 31, se presentan los espectros de las placas de color naranja y rojo respectivamente. Estos gráficos muestran que la longitud de onda de emisión máxima tiene una variación de aproximadamente 10 nm en comparación con los datos del *datasheet*, siendo relevante señalar que esta variación se encuentra dentro del rango permitido, tal como se especifica en la hoja de datos de la placa.

A continuación, en las Figuras 33 y 34, se observa una variación similar a la documentada en los casos anteriores. No obstante, en la Figura 32, el espectro medido difiere notablemente del proporcionado en la hoja de datos. Esta discrepancia llevó a investigar más a fondo los resultados obtenidos. Es por ello, que se descubrió que otros usuarios que habían empleado estas gráficas como método de calibración también habían experimentado variaciones similares con estos productos.

Debido a estas inconsistencias, se decidió contactar a Thorlabs para conseguir una explicación sobre los resultados. El fabricante informó que las medidas resultantes pueden variar entre diferentes lotes de fabricación de las placas. Sin embargo, confirmaron que las medidas realizadas en nuestro laboratorio eran correctas y se encontraban dentro de los parámetros esperados. Esta aclaración subraya la importancia de considerar posibles variaciones en la fabricación al interpretar los datos experimentales.

Por último, es importante destacar que el alto grado de concordancia entre los espectros medidos y los espectros de referencia demuestra la eficacia del proceso de calibración y medida llevado a cabo en el laboratorio. En consecuencia, se puede concluir que los procedimientos y las técnicas utilizadas en esta investigación son adecuadas para obtener datos precisos sobre las propiedades espectrales de la fluorescencia que se pretendía medir. Esta confirmación refuerza la validez de los métodos de calibración empleados y asegura la fiabilidad de los resultados obtenidos.

3.2. Análisis de los líquidos con DiR

En este apartado se detallan los resultados obtenidos del fluoróforo DiR en solución líquida. La preparación de estas disoluciones fue previamente explicada en el apartado 2.1.2 de este documento, mientras que las indicaciones del proceso de medición se encuentran en el apartado 2.2.3.2.

Se realizaron medidas a cada una de las muestras que fueron elaboradas con diferentes concentraciones de DiR y a distintos tiempos de exposición. Además, con ayuda de la cámara hiperespectral, se obtuvieron datos almacenados en archivos en formato .h5, los cuales fueron abiertos y procesados utilizando el lenguaje de programación Python.

Inicialmente, se obtuvieron las representaciones de todos los espectros, es decir, las medidas de todas las concentraciones a distintos tiempos de exposición. Los datos se agruparon según el mismo tiempo de exposición, dando como resultado las Figuras 35, 36 y 37, donde se pueden observar las mediciones realizadas para 50 ms, 100 ms y 150 ms en cada una de las disoluciones con diferentes concentraciones de fluorescencia.

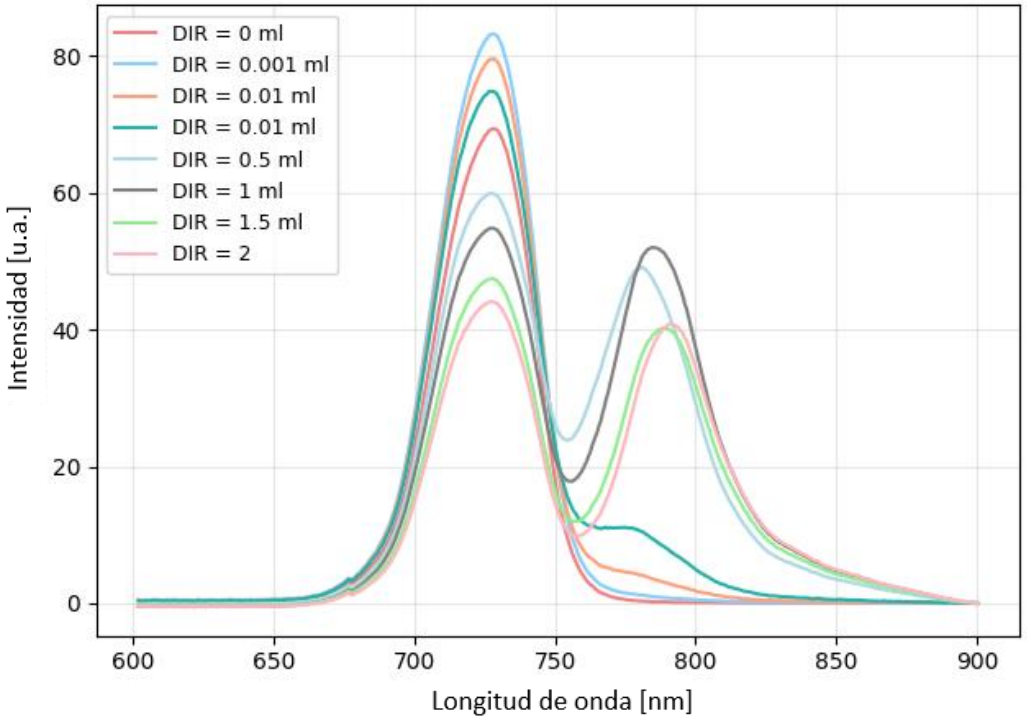


Figura 35. Medida del DiR en líquido con distintas concentraciones del fluoróforo medido a 50 ms de exposición.

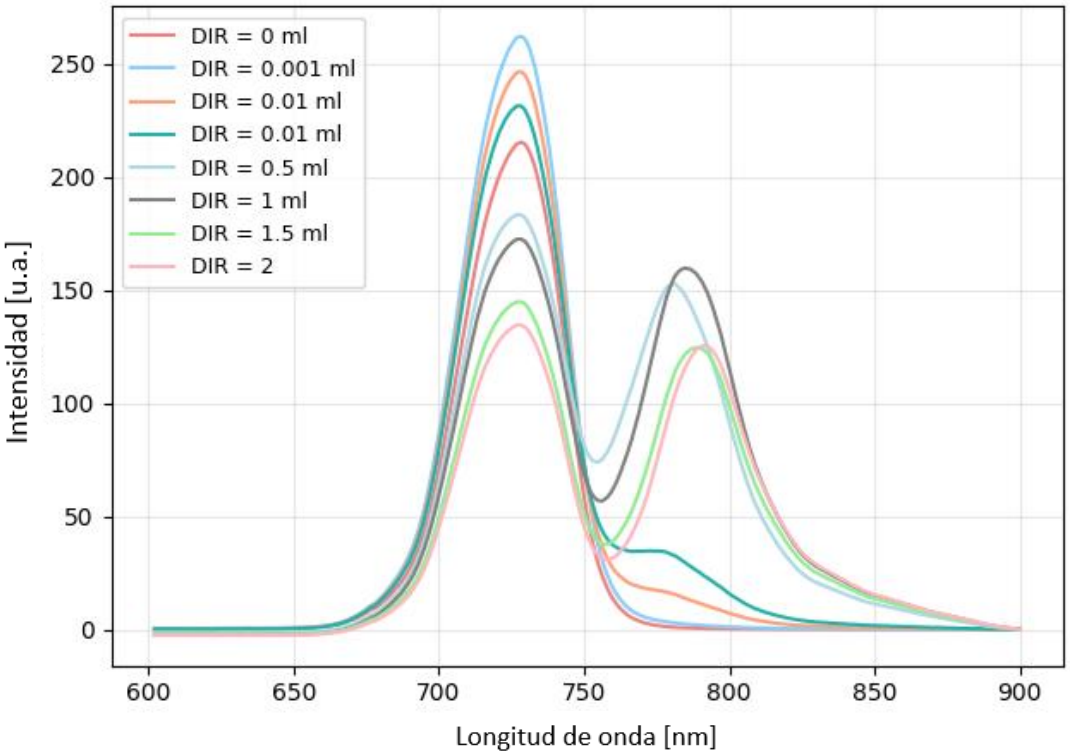


Figura 36. Medida del DiR en líquido con distintas concentraciones del fluoróforo medido a 100 ms de exposición.

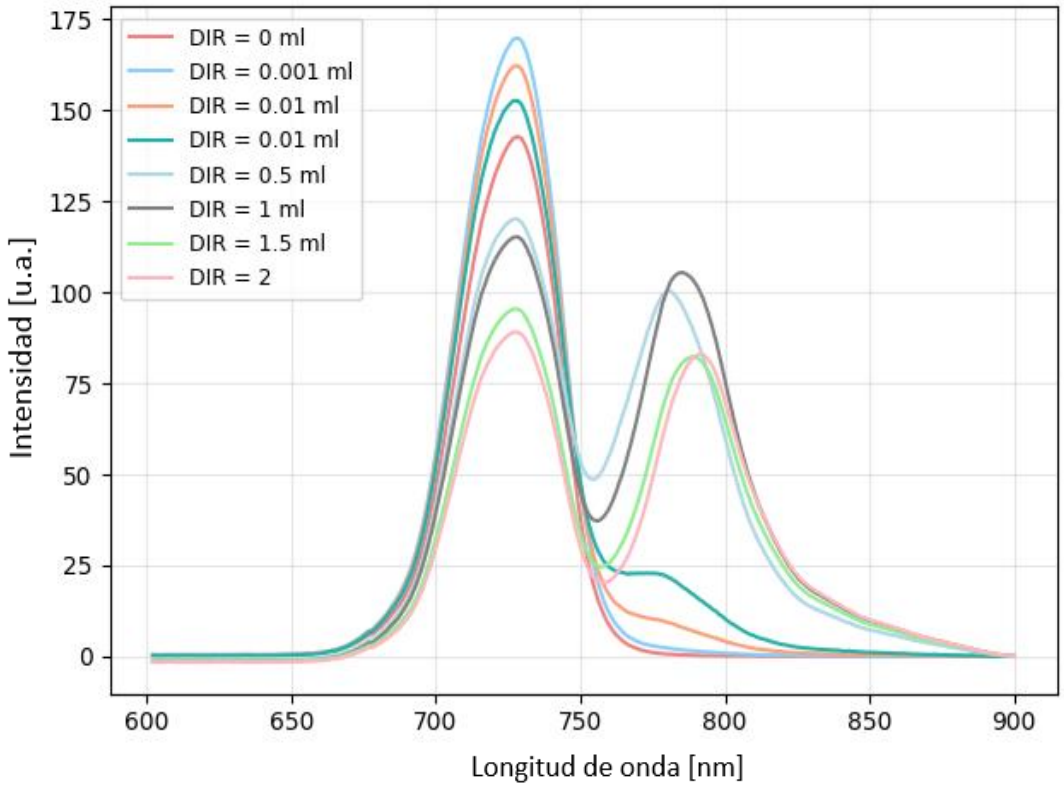


Figura 37. Medida del DiR en líquido con distintas concentraciones del fluoróforo medido a 150 ms de exposición.

Como se puede observar en las figuras anteriores, se presentan los mismos resultados para los distintos tiempos de exposición. Además, cabe destacar que, a menor concentración, la segunda gaussiana casi no se aprecia. A medida que aumentan las concentraciones de fluoróforo, la intensidad máxima de esta segunda gaussiana también aumenta, alcanzando su máximo en la concentración de 1 ml de DiR, y a partir de ese punto, se estabiliza.

A continuación, se analizarán en detalle todas estas observaciones. Como se ilustra en la Figura 38, se puede ver que los resultados son consistentes para diferentes tiempos de exposición. En concreto, cada una de las medidas realizadas para distintas concentraciones en cada tiempo de exposición se ha normalizado dividiéndolo entre el tiempo de exposición correspondiente y se han representado todas juntas en la misma figura.

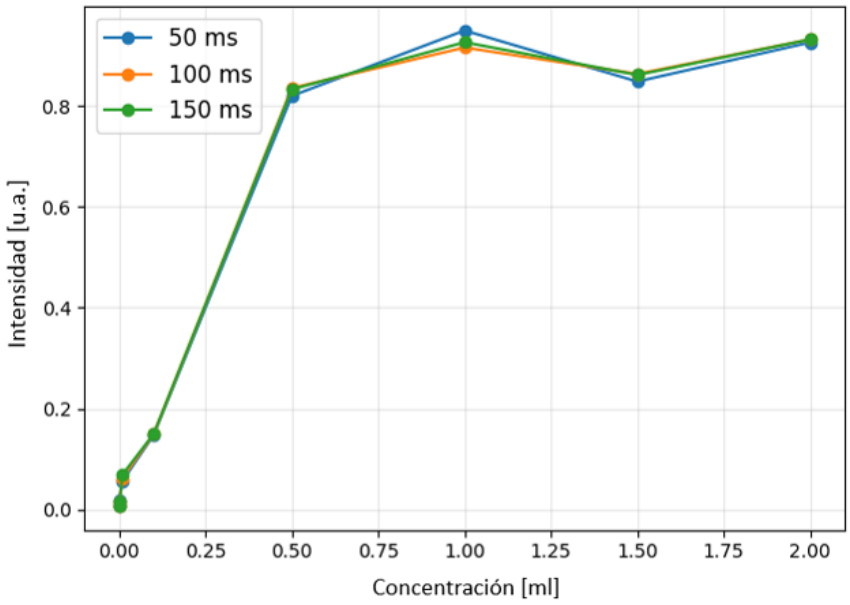


Figura 38. Representación normalizada de la medición del DiR en líquido a distintos tiempos de exposición.

La figura anterior demuestra que se observa una relación lineal constante entre el tiempo de exposición y la intensidad recogida. Esto significa que, para las concentraciones de fluoróforo analizadas, la intensidad de la fluorescencia detectada aumenta proporcionalmente al tiempo de exposición. En otras palabras, duplicar el tiempo de exposición resulta en una duplicación de la intensidad de la señal recogida, siempre y cuando el sistema no haya alcanzado un estado de saturación o estacionario. Esta relación lineal sugiere que, dentro del rango de tiempos de exposición utilizados, el sistema está operando dentro de su rango lineal de respuesta. Esto indica que tanto el detector como el fluoróforo están funcionando de manera eficiente, sin sobrecarga ni pérdida significativa de señal.

Por otro lado, se estudia la intensidad máxima detectada en función de la concentración de DiR empleada. Para ello, se utiliza el método de las dos gaussianas, previamente

explicado, para obtener todos los datos relevantes asociados. Este método permite identificar los picos de máxima intensidad de las segundas gaussianas en los datos medidos. Esos valores, como se puede ver en la Figura 39, se representan conjuntamente en una única gráfica para analizar su variación.

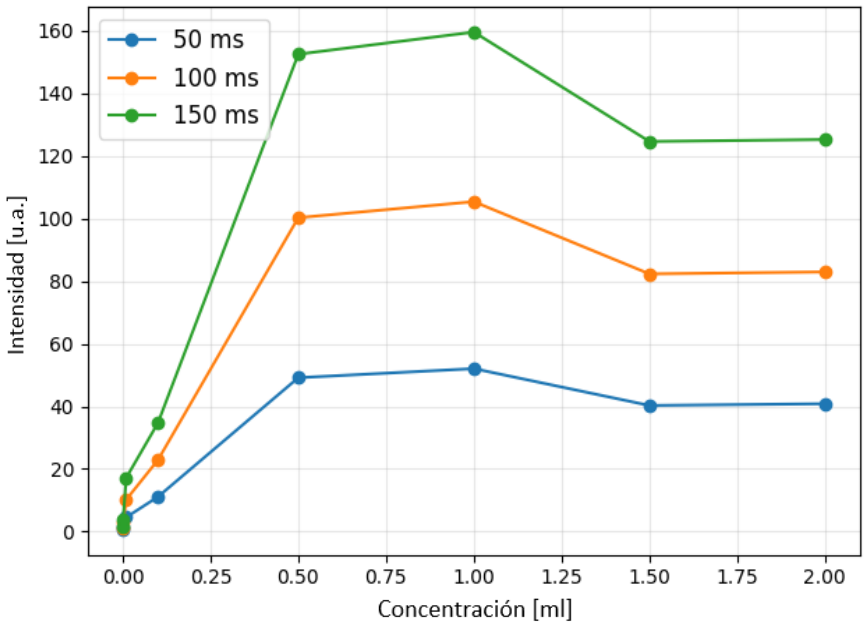


Figura 39. Variación de la intensidad máxima detectada en las mediciones a diferentes concentraciones de DiR en líquido considerando el máximo de intensidad de fluorescencia.

Para asegurarse de que el cálculo anterior era correcto, se decidió realizar una gráfica similar, pero en lugar de utilizar el pico máximo de fluorescencia, se tomó el área correspondiente a la caída de 3 dB de cada máximo. Estos valores se representaron nuevamente en una única gráfica para diferentes concentraciones y en cada uno de los tiempos medidos. Esta nueva representación, como se ilustra en la Figura 40, permite verificar la consistencia y precisión de los resultados obtenidos previamente, proporcionando una visión más completa de la relación entre la concentración de DiR y la intensidad de fluorescencia en diferentes condiciones experimentales.

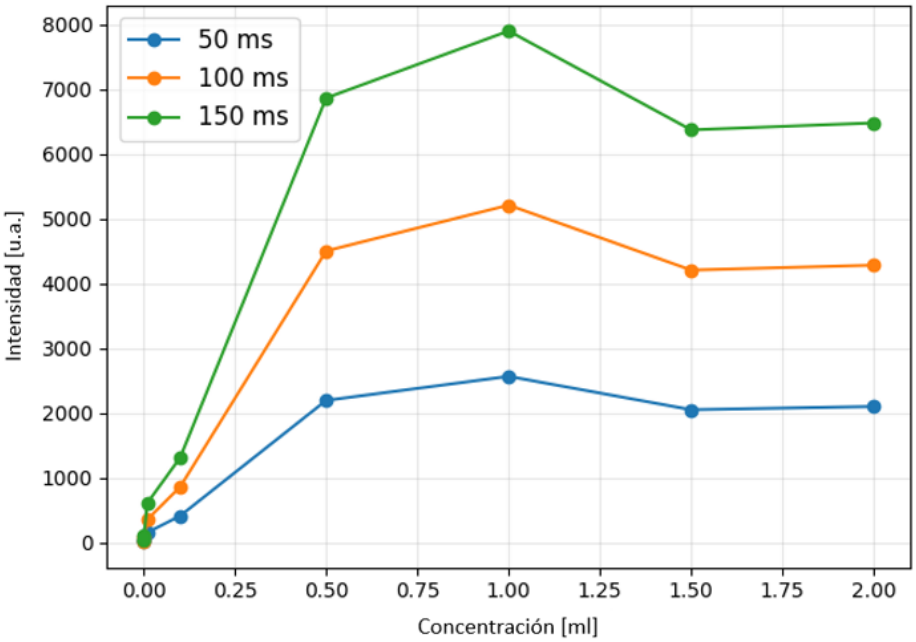


Figura 40. Variación de la intensidad máxima detectada en las mediciones a diferentes concentraciones de DiR en líquido para el área correspondiente a la caída de 3 dB de cada máximo

Las figuras anteriores muestran que la intensidad de la fluorescencia medida para diferentes tiempos de exposición (50 ms, 100 ms y 150 ms) sigue un patrón constante. En las muestras con bajas concentraciones de DiR, no se detecta fluorescencia. A medida que la disolución presenta mayores concentraciones de este fluoróforo, se detecta una mayor fluorescencia hasta alcanzar el punto en el que la concentración contiene 1 ml de DiR y 1 ml de etanol. En este punto, se observa que la gráfica se estabiliza, lo que demuestra que la fluorescencia llega a un límite en el que ya no puede aumentar, independientemente de si se añade más concentración del fluoróforo utilizado.

Una observación importante es la estabilización de la intensidad en concentraciones más altas, lo que puede explicarse mediante el fenómeno de "*dynamic quenching*". Este proceso, en español conocido como enfriamiento dinámico, ocurre cuando las moléculas de fluoróforo en estado excitado colisionan con otras moléculas (quenchadores) antes de emitir un fotón de fluorescencia [40]. Estas colisiones no radiactivas transfieren la energía de excitación del fluoróforo al quenchador, disipándola como calor en lugar de luz fluorescente. Este proceso reduce la eficiencia cuántica de la fluorescencia, ya que se emiten menos fotones.

Buscando en otros estudios, se encontró que a medida que aumenta la concentración de DiR, la intensidad de fluorescencia también aumenta hasta un cierto punto, después del cual se estabiliza o incluso disminuye ligeramente. Esto se debe a que, a concentraciones más altas, las colisiones entre moléculas de fluoróforo se vuelven más frecuentes, intensificando el *quenching* dinámico, como se ilustra en la Figura 41.

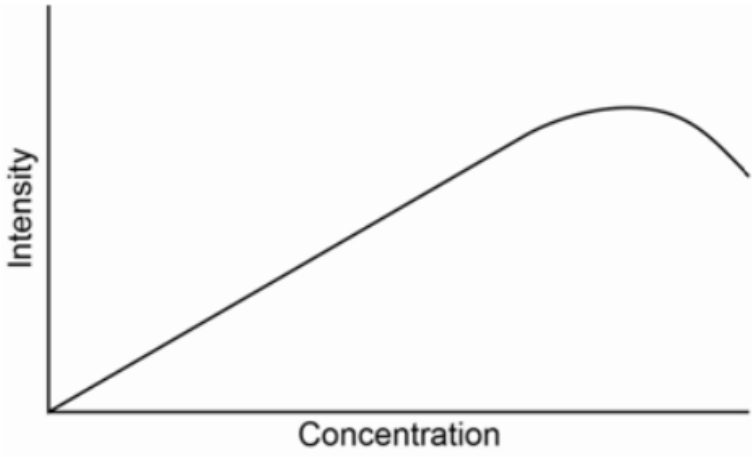


Figura 41. Curva estándar de fluorescencia que muestra la re-absorción de fotones emitidos en concentraciones más altas [41].

Además, la dependencia de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de exposición sugiere que, aunque aumentar el tiempo de exposición inicialmente incrementa la intensidad detectada, a concentraciones altas de DiR el efecto de *quenching* dinámico limita la emisión de fluorescencia [40]. En otras palabras, a mayor concentración y mayor tiempo de exposición, el *quenching* dinámico se vuelve más pronunciado, resultando en una estabilización de la intensidad máxima alcanzada.

Por último, resultó interesante estudiar la variación de la longitud de onda central de la fluorescencia en función de la concentración de DiR. Como se muestra en la Figura 42, este estudio revela que a medida que aumenta la concentración, la longitud de onda central de la intensidad máxima de fluorescencia también incrementa. Esta relación sugiere que las propiedades espectrales del fluoróforo se ven afectadas por su concentración en la muestra, lo que puede deberse a interacciones intermoleculares y efectos de agregación que desplazan el pico de emisión hacia mayores longitudes de onda.

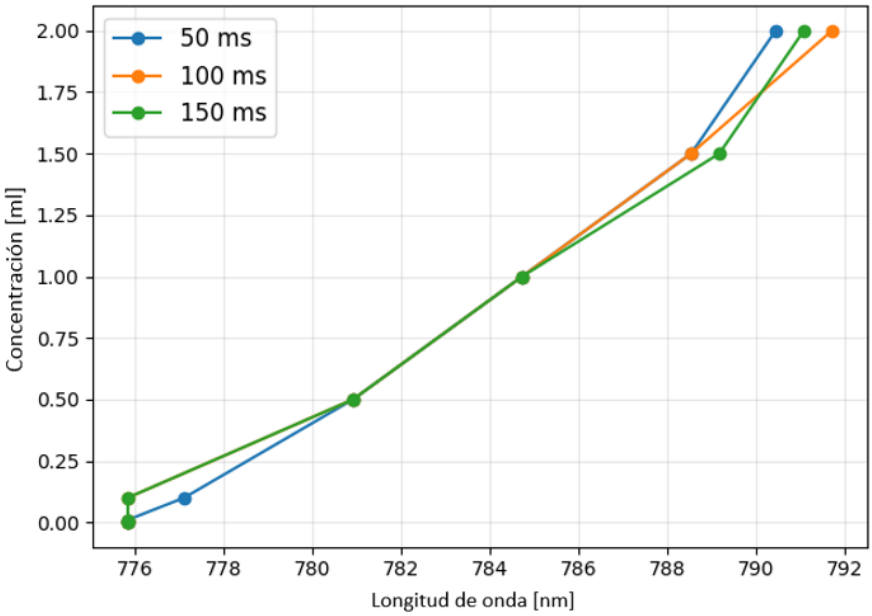


Figura 42. longitud de onda central de la intensidad máxima de fluorescencia vs concentración de DiR.

Para comprender los resultados de la figura anterior, se realizó una búsqueda bibliográfica de estudios previos, encontrando la información mostrada en la Figura 43. Esta figura ilustra la relación entre la longitud de onda de la fluorescencia y la concentración del fluoróforo [42]. Se justifica que la longitud de onda central de la fluorescencia aumenta linealmente con la concentración. Este comportamiento puede explicarse por la formación de agregados y la absorción en el estado excitado a mayores concentraciones, lo que desplaza el pico de emisión hacia longitudes de onda mayores [42]. Estos hallazgos son consistentes con estudios que utilizan la técnica de lente térmica de doble haz para medir el rendimiento cuántico de fluorescencia de soluciones.

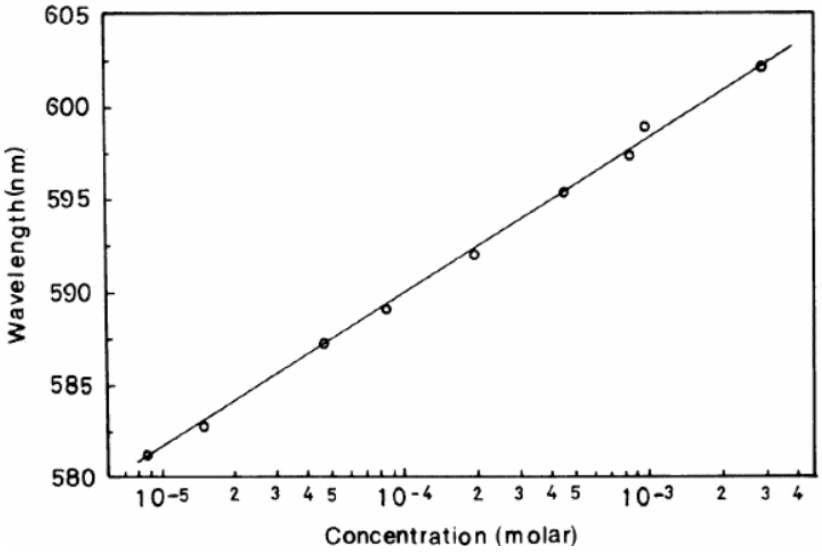


Figura 43. Resultado de estudios previos de la relación entre la longitud de onda de la fluorescencia y la concentración del fluoróforo [42].

Finalmente, cabe indicar que, en este apartado, se analizaron los resultados del fluoróforo DiR en solución líquida. Se observaron las intensidades de fluorescencia para diversas concentraciones y tiempos de exposición. Los resultados mostraron que la fluorescencia aumenta con la concentración hasta un punto de estabilización debido al *quenching* dinámico, que reduce la eficiencia cuántica de la fluorescencia. Además, la longitud de onda central de la fluorescencia se desplazó linealmente hacia mayores longitudes con el aumento de la concentración, probablemente debido a la formación de agregados y absorciones en el estado excitado.

3.3. Análisis de los *phantoms* sólidos

En el presente apartado se detallan los resultados obtenidos a partir del análisis de los *phantoms* desarrollados durante este proyecto de investigación. La creación de estos *phantoms*, así como el meticuloso proceso de preparación y las metodologías empleadas, han sido descritos en el capítulo anterior. Para llevar a cabo este estudio, se utilizó también el sistema "Panopticon 2 VISNIR". Siguiendo el procedimiento ya descrito, se efectuaron las medidas de cada uno de los *phantoms* para diferentes concentraciones de DiR ya documentados en la Figura 13 de este trabajo.

Con todo ello, y empleando el lenguaje de programación Python para el procesado y análisis de datos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 44.

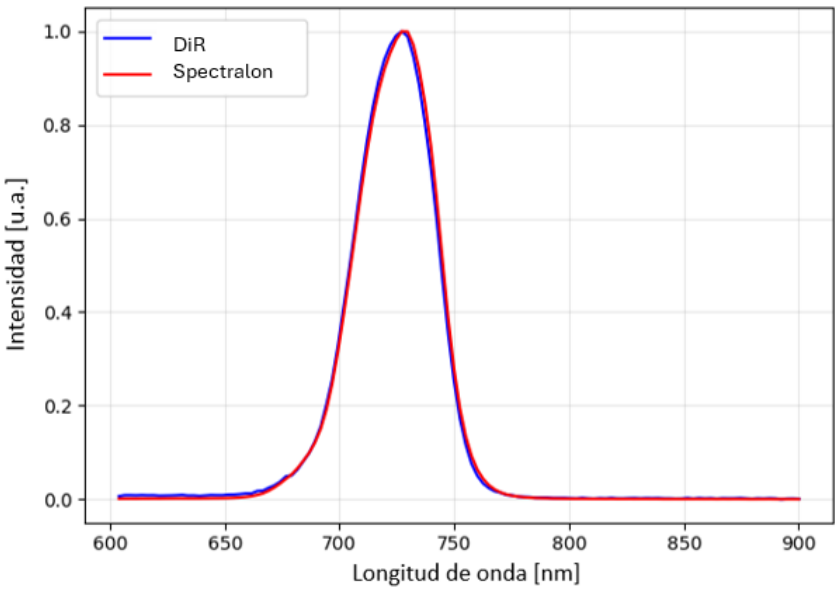


Figura 44. Espectro de la medida del *phantom* con DiR 0,5 ml y agua 1,5 ml frente al Spectralon™ empleado como referencia.

En la Figura 44 se muestra el espectro medido del *phantom* que contenía 1,5 ml de agua y 0,5 ml de DiR, es decir, la muestra con la mayor concentración de DiR y, en teoría, la que debería presentar la mayor fluorescencia. Además, cabe indicar que este espectro se ha representado junto al Spectralon™, que se utilizó como referencia y que los que

presentaban menores concentraciones de DiR tenían los mismos efectos. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que no hay fluorescencia en los *phantoms*, ya que no se observa una segunda gaussiana en la longitud de onda de 780 nm, donde se encuentra el pico de excitación del fluoróforo DiR, ni existen diferencias con la referencia medida.

Esta observación genera varias hipótesis sobre por qué no se es capaz de detectar fluoróforos en los *phantoms*. Estas hipótesis se detallan a continuación:

Hipótesis 1) Durante el procesado de los datos en Python, la gran cantidad de datos puede requerir un promediado, lo que podría afectar la visualización final del espectro medido.

Hipótesis 2) La transmitancia del agar-agar puro podría ser absorbente en las longitudes de onda de fluorescencia del DiR, impidiendo la detección adecuada.

Hipótesis 3) Los cambios de temperatura a los que se somete el DiR durante la preparación de las gelatinas podrían afectar su fluorescencia.

Hipótesis 4) El fotoblanqueo (*photobleaching*) del DiR podría estar ocurriendo, reduciendo la señal fluorescente detectable.

Estas hipótesis requieren una investigación más detallada para determinar la causa exacta de la ausencia de fluorescencia en los *phantoms* medidos.

3.3.1. Hipótesis 1; Procesado de datos

En primer lugar, se decidió no realizar un promediado en el procesamiento de datos de Python entre las longitudes de onda en las que se esperaba encontrar la fluorescencia, es decir, entre 600 y 900 nm. Para ello, se realizó el cálculo que muestra la fórmula (2), donde se realiza la división del Spectralon™ entre el espectro resultante de la medida del DiR para comprobar si sólo está presente la fuente de luz o hay algo de fluorescencia.

$$División = \frac{\text{Spectralon™}}{Espectro\ del\ DiR} \tag{2}$$

Realizando esta operación y como se ilustra en la Figura 45, se puede comprobar que el problema no radicaba en un procesado incorrecto de los parámetros medidos en el laboratorio. La Figura 45 muestra que, durante ese rango de longitud de onda, la señal se mantiene estable, situándose de forma constante en torno a uno. Esto indica que el procesado de los datos se llevó a cabo correctamente y que la ausencia de fluorescencia no se debía a errores en esta etapa.

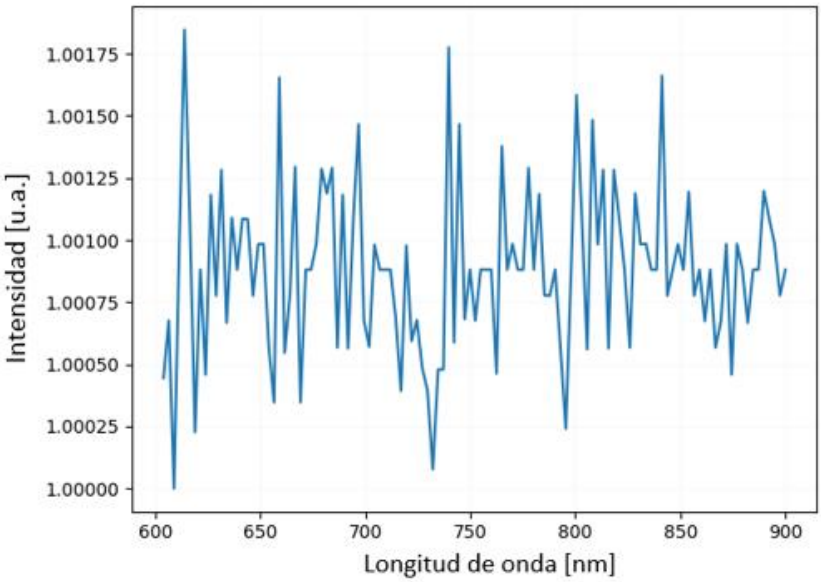


Figura 45. Análisis en Python del phantom en presencia del DiR entre los 600 nm y 900 nm sin promediado de los datos medidos

3.3.2. Hipótesis 2; Transmitancia DiR en datos

Una vez comprobado que el procesado de datos era correcto, se procedió a estudiar la segunda hipótesis sobre la ausencia de fluorescencia en los *phantoms*. Esta hipótesis sugería que el agar-agar podía estar absorbiendo la fluorescencia, impidiendo su detección en las mediciones realizadas. Para evaluar esta posibilidad, se planteó el experimento de caracterización de transmitancia del agar-agar descrito en el capítulo anterior.

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.4 de este documento, se configuró un montaje específico para medir la transmitancia del agar-agar. Para ello, se prepararon *phantoms* que contenían únicamente agar-agar, sin la presencia de DiR, y se realizaron las mediciones correspondientes, siguiendo el método explicado anteriormente.

Como se muestra en la Figura 46, se han representado las medidas de cada uno de siete *phantoms* realizados.

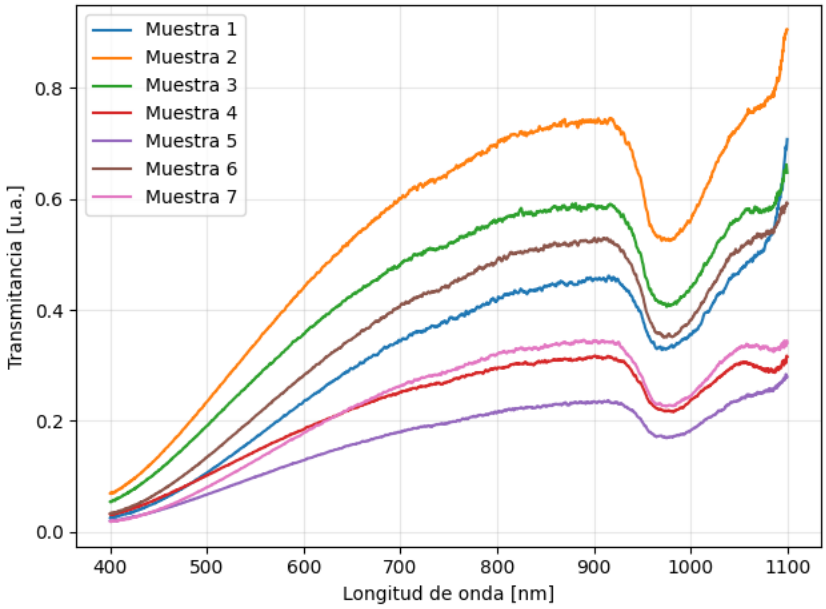


Figura 46. Espectros resultantes de la medida en transmitancia de los phantoms con agar puro

Teniendo en cuenta la variación observada en los resultados obtenidos, se decidió crear la Figura 47, donde se puede apreciar el espectro resultante de la transmitancia del *phantom* de agar-agar puro. Para ello, se calculó la media de los espectros de las muestras anteriores y se añadió un sombreado que indica la posible variación que estos espectros podrían alcanzar.

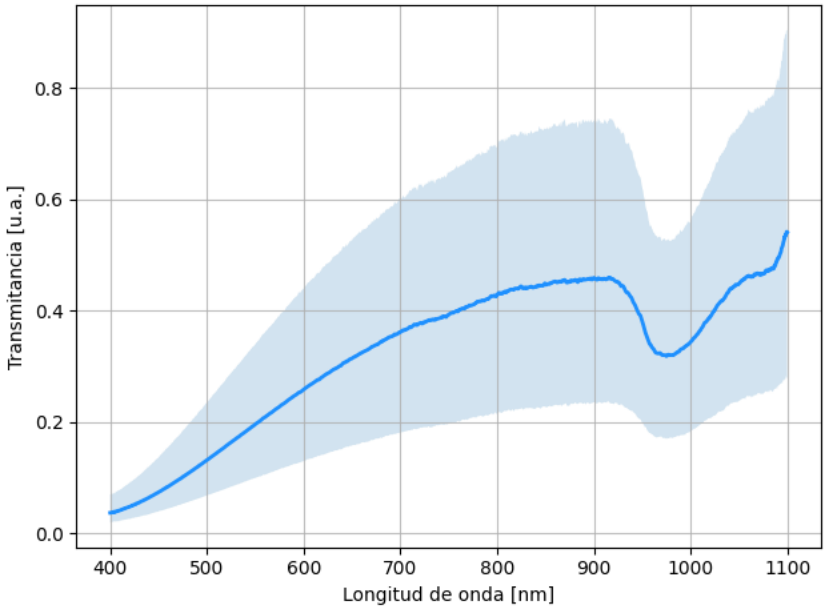


Figura 47. Transmitancia media de los *phantoms* con agar-agar puro.

En particular, se observó que el agar-agar presenta un pico de absorbancia a 980 nm, bastante alejada de la longitud de onda de emisión del DiR, localizada en 780 nm. Esto indica que la propia absorción del agar-agar no está influyendo en las medidas de

fluorescencia, ya que no es absorbente en la longitud de onda central de emisión del DiR. Por lo tanto, la ausencia de fluorescencia observada no puede atribuirse a la absorción por el aga-agar, descartando así esta hipótesis como causa del problema.

3.3.3. Hipótesis 3; Efectos térmicos en DiR

La tercera hipótesis sobre la inviabilidad de utilizar *phantoms* de agar-agar para medir el fluoróforo DiR se relaciona con los cambios de temperatura provocados durante la preparación de las gelatinas. Para evaluar esta posibilidad, se decidió preparar una muestra líquida con 2 ml de DiR, correspondiente al apartado 9 de la Tabla 1 de este documento. Además, para realizar una comparación con el DiR que no ha sido calentado se realiza la medida en líquido con una disolución idéntica sin calentar que corresponde al apartado 8 de la Tabla 1 del documento.

La disolución se preparó siguiendo el procedimiento previamente descrito y se midió con el sistema hiperespectral. Posteriormente, los datos fueron analizados utilizando Python, obteniendo la gráfica que se muestra en la Figura 48. Esta gráfica ilustra los cambios de temperatura a diferentes tiempos de exposición, proporcionando información clave sobre el impacto de la temperatura en las mediciones de fluorescencia.

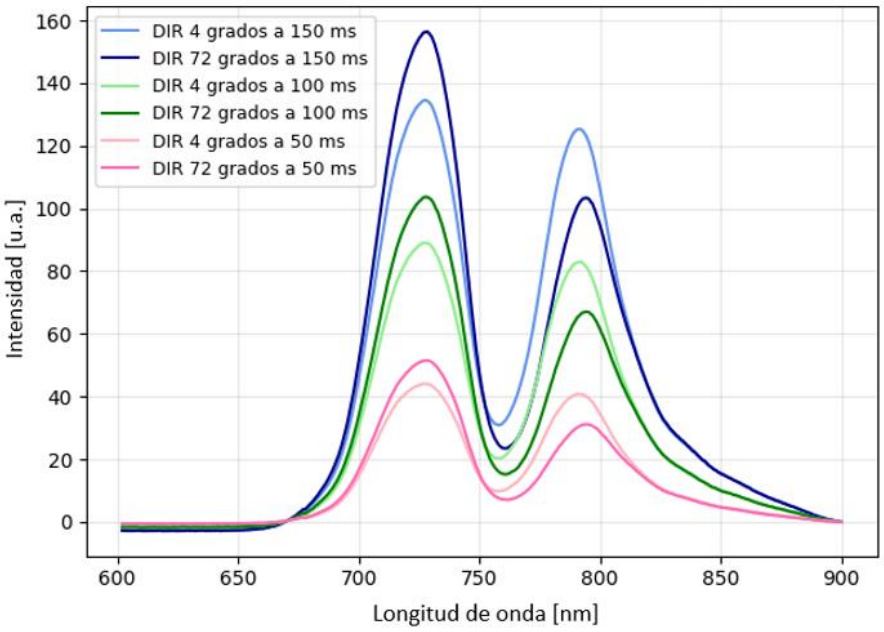


Figura 48. Resultados de la medida del DiR en líquido previamente calentado para ver sus variaciones.

Como se observa en la figura anterior, la medida se realizó a tres tiempos de exposición diferentes. En concreto, la medida de 50 ms se representa en color rosa, la de 100 ms en verde y la de 150 ms en azul. Además, las mediciones del DiR sin calentar, conservado a 4°C en el frigorífico, se muestran en tonos claros, mientras que las medidas del DiR calentado hasta 72°C se representan en tonos oscuros.

La decisión de calentar la disolución de DiR hasta esa temperatura se tomó debido a que el fluoróforo estaba mezclado en etanol, cuyo punto de ebullición es de 78,37°C [43]. Se optó por no alcanzar esta temperatura para evitar la evaporación del etanol.

Con base en los resultados obtenidos y mostrados en la figura proporcionada, se puede observar que al someter el fluoróforo DiR a un cambio de temperatura, específicamente al calentarlo, se produce una disminución significativa de su fluorescencia. Esto se evidencia por la disminución del máximo en la segunda gaussiana.

Además, se comprobó que la relación entre los máximos cuando el DiR no ha sido calentado y cuando ha sido calentado es aproximadamente constante para los tres tiempos de exposición analizados. Para verificar esto, se realizó la resta entre el valor de intensidad máxima de la fuente y la intensidad máxima de la fluorescencia, tanto para el fluoróforo calentado como para el no calentado, para cada tiempo de exposición. Luego, se calculó el cociente entre la intensidad del DiR frío y la del DiR caliente.

Los cocientes obtenidos para cada tiempo de exposición son los siguientes: 0,174 a 150 ms, 0,167 a 100 ms y 0,162 a 50 ms. Estos valores indican que la fluorescencia disminuye de manera similar para cada uno de los tiempos medidos, demostrando que el calentamiento del DiR afecta su fluorescencia de forma consistente a través de diferentes tiempos de exposición.

Para comprobar que los resultados obtenidos eran correctos, se realizó una búsqueda de los artículos científicos actuales sobre el tema. Con esto, se encontró que en varios estudios ya se había demostrado que al someter al fluoróforo del DiR a temperaturas elevadas este presentaba una disminución en sus efectos fluorescentes.

En un estudio sobre este tema se presentó la gráfica que se observa en la Figura 49, donde se puede ver que el artículo proporciona una gráfica que muestra cómo la fluorescencia disminuye con el aumento de la temperatura, donde se presenta la eficiencia cuántica absoluta de fotoluminiscencia de una muestra realizada en ese estudio [39]. Esta gráfica muestra una tendencia bien definida que coincide con estudios previos, donde la eficiencia cuántica de fluorescencia disminuye de 5% a 77 K (-196 °C) a 1% a 300 K (27 °C) [44].

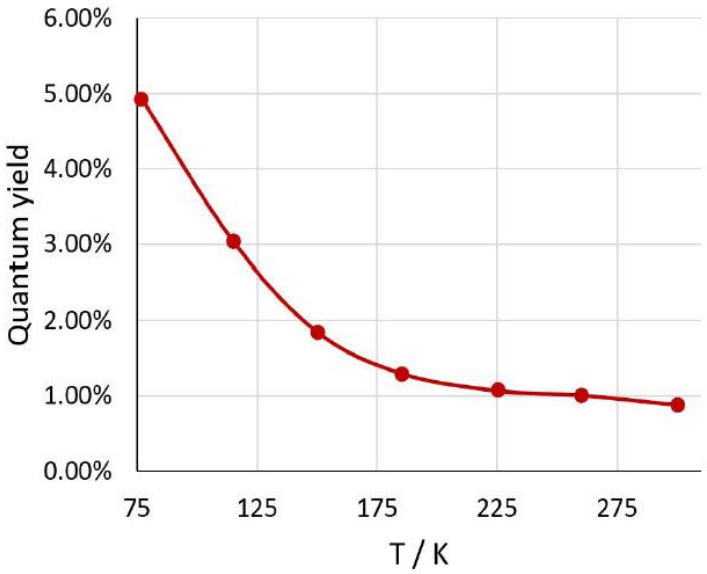


Figura 49. Estudio [44] en el que se demuestra que al aumentar la temperatura del DiR este disminuye sus propiedades fluorescentes.

Además, cabe indicar que a temperaturas superiores a 400 K (127 °C), la eficiencia cuántica de fluorescencia generalmente continúa disminuyendo de manera significativa [43]. Este fenómeno se debe a que, a temperaturas elevadas, los procesos de desactivación no radiativa se vuelven más predominantes, reduciendo la eficiencia de emisión de fluorescencia. La absorción de energía térmica aumenta la probabilidad de que las moléculas en estado excitado vuelvan al estado fundamental sin emitir fotones, lo que disminuye la eficiencia cuántica de fluorescencia [45].

Además, en otro estudio previo se explica que la disminución de la fluorescencia del fluoróforo DiR al ser calentado se debe principalmente a dos factores [46]. En primer lugar, el aumento de la colisión molecular; a temperaturas más altas, las moléculas se mueven más rápidamente y colisionan con mayor frecuencia, lo que incrementa la probabilidad de que la energía de excitación se disipe como calor en lugar de emitirse como luz fluorescente [46]. En segundo lugar, la disminución de la eficiencia cuántica; la eficiencia cuántica de un fluoróforo, que es la proporción de fotones emitidos por fotones absorbidos, tiende a disminuir con el aumento de la temperatura [46]. A medida que aumenta la temperatura, es más probable que la energía excitada se pierda a través de procesos no radiactivos.

Con todo esto, se ha comprobado que al someter este fluoróforo a un calentamiento se produce una disminución significativa en sus propiedades fluorescentes. La reducción en la eficiencia fluorescente del DiR al ser sometido a temperaturas elevadas es uno de los factores críticos que ha contribuido a que los *phantoms* de agar-agar preparados con DiR no hayan mostrado fluorescencia en los experimentos. Esta observación es de gran relevancia, ya que subraya la importancia de controlar las condiciones térmicas durante el uso de fluoróforos en aplicaciones prácticas para asegurar resultados óptimos.

3.3.4. Hipótesis 4; Fotoblanqueo del DiR

La cuarta hipótesis que se planteaba sobre por qué los *phantoms* de agar-agar con DiR no emitían fluorescencia era el fotoblanqueo. Este fenómeno, conocido en inglés como *photobleaching*, es un proceso en el cual las moléculas fluorescentes pierden su capacidad de emitir luz debido a la exposición prolongada a la luz excitadora [47].

El mecanismo de *photobleaching* involucra principalmente la descomposición química de los fluoróforos, donde la exposición repetida a la luz excitadora provoca reacciones químicas que resultan en la pérdida de su capacidad fluorescente [47].

Varios factores influyen en la tasa de *photobleaching*: la intensidad y la duración de la iluminación son cruciales, ya que una iluminación intensa y prolongada acelera este proceso [45]. La presencia de oxígeno también puede aumentar la tasa de este fenómeno debido a la formación de especies reactivas de oxígeno [47]. También, las propiedades del medio, como el agar-agar, juegan un papel importante en la estabilidad del fluoróforo.

Las consecuencias del fotoblanqueo en experimentos con agar-agar son significativas. La reducción de la señal fluorescente afecta la sensibilidad y precisión de las mediciones, y en estudios de imagen o seguimiento a largo plazo, este fenómeno puede resultar en la pérdida de información crítica [47].

Para mitigar el fotoblanqueo, se pueden tomar varias medidas. Utilizar fluoróforos que sean más resistentes a este fenómeno como los fluoróforos basados en rodaminas ya que son ideales para la microscopía confocal y de superresolución en células vivas debido a su brillantez, estabilidad, excelente permeabilidad de membrana y rápida cinética de etiquetado [48]. Además, incorporar antioxidantes en el medio de agar-agar para neutralizar las especies reactivas de oxígeno, junto con realizar experimentos a bajas temperaturas para reducir la tasa de reacciones químicas que conducen al fenómeno, son medidas efectivas [47].

En resumen, el fotoblanqueo es un desafío importante en estudios que utilizan fluoróforos en medios de agar-agar, y comprender sus mecanismos y factores influyentes es crucial para diseñar experimentos que minimicen sus efectos y aseguren resultados precisos y reproducibles.

Capítulo 4

Conclusión

En este trabajo se han presentado y analizado los resultados de la implementación del proyecto de investigación enfocado al análisis de viabilidad en la combinación de la imagen hiperespectral (HSI) y la fluorescencia para mejorar el diagnóstico, y con ello el tratamiento mediante cirugía, del cáncer de ovario.

Se ha establecido una base sólida y un método eficaz de calibración de fluorescencia utilizando las placas estandarizadas FSK5 de Thorlabs. Las mediciones realizadas demostraron concordancia, y también desviaciones, entre los espectros obtenidos en el laboratorio y los proporcionados en las hojas de datos de las placas. Las variaciones fueron contrastadas con el fabricante, Thorlabs, que las valoró como factibles debido a las diferencias en lotes de fabricación. A pesar de algunas variaciones menores, se validó la precisión y consistencia del sistema hiperespectral empleado.

Se observó que la intensidad de la fluorescencia del fluoróforo DiR aumenta con la concentración hasta estabilizarse, debido al fenómeno de *quenching* dinámico, que reduce la eficiencia cuántica de la fluorescencia. Además, se identificó que la longitud de onda central de la fluorescencia se desplaza linealmente hacia mayores longitudes con el aumento de la concentración, posiblemente debido a la formación de agregados y absorciones en el estado excitado.

Los *phantoms* de agar-agar con DiR no mostraron fluorescencia detectable, lo cual se investigó a través del análisis y discusión de varias hipótesis. Se concluyó que el calentamiento del DiR reduce significativamente su fluorescencia, y que la ausencia de señal fluorescente en los *phantoms* se debe principalmente al fotoblanqueo y a las condiciones térmicas durante la preparación.

El estudio ha demostrado la eficacia del sistema hiperespectral y de fluorescencia en la calibración y análisis de muestras de DiR. La investigación subraya la importancia de controlar las condiciones experimentales, como la temperatura y el fotoblanqueo, para obtener resultados fiables. Los hallazgos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones en la cirugía guiada por fluorescencia, mejorando potencialmente el diagnóstico y tratamiento del cáncer de ovario.

Este trabajo no solo valida los métodos empleados, sino que también aporta nuevas perspectivas al campo de estudio, destacando la relevancia de la tecnología HSI y de fluorescencia en aplicaciones biomédicas avanzadas.

Líneas futuras

Para avanzar en la investigación sobre la combinación del HSI y la fluorescencia en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de ovario, se proponen las siguientes líneas de investigación futura:

1) Exploración de métodos avanzados de fabricación de *phantoms*: Se podría investigar y probar métodos nuevos para fabricar *phantoms* usados en simulaciones biomédicas, utilizando materiales alternativos como siliconas y plastilinas, además de añadir elementos como partículas de dióxido de titanio y polímeros. Esto permitiría crear *phantoms* que imiten mejor las propiedades de diferentes tipos de tejidos, optimizando su utilidad en la investigación y la educación biomédica.

2) Exploración de nuevos fluoróforos para marcación celular: Se podría explorar el uso de fluoróforos alternativos para marcar estructuras y orgánulos celulares, como el verde de indocianina (ICG). También se podrían desarrollar y validar protocolos experimentales para evaluar estos fluoróforos en modelos biológicos, mejorando la capacidad de imagen y análisis de estructuras celulares específicas.

3) Aplicación de sistemas hiperespectrales en imagen biomédica: Se podría investigar cómo usar sistemas hiperespectrales en imagenología biomédica, combinando varios fluoróforos para aprovechar al máximo sus capacidades. Esto incluiría investigar cómo integrar múltiples fluoróforos, desarrollar algoritmos y técnicas de procesamiento de imagen para extraer información multiespectral, y evaluar la precisión de estos sistemas para diferenciar y cuantificar varios marcadores biológicos en aplicaciones clínicas y de investigación.

Estas líneas de investigación futura buscan no sólo mejorar la tecnología existente, sino también expandir su aplicación clínica para ofrecer diagnósticos más precisos y tratamientos más efectivos para el cáncer.

Bibliografía

[1] «What is cancer?» Accedido: 30 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.cancer.org.au/cancer-information/what-is-cancer

[2] «Cáncer en Europa: cinco cosas que nos dicen los datos - Comisión Europea». Accedido: 30 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news-and-updates/cancer-europe-5-things-data-tells-us-2022-01-13_en

[3] «Ovarian Cancer: Symptoms, Diagnosis & Treatment», Cleveland Clinic. Accedido: 30 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/4447-ovarian-cancer

[4] «Opciones de tratamiento para el cáncer de ovario recién diagnosticado | Apuntar al cáncer de ovario». Accedido: 30 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://targetovariancancer.org.uk/about-ovarian-cancer/your-situation/ive-just-been-diagnosed/treatment

[5] S. Kashiwagi y H. S. Choi, «Ovarian cancer-targeted near-infrared fluorophores for fluorescence-guided surgery», Annals of Translational Medicine, vol. 11, n.o 6, mar. 2023.

[6] Vahrmeijer, A. L., Hutteman, M., van der Vorst, J. R., van de Velde, C. J. H., & Frangioni, J. V. (2013). Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. Nature Reviews Clinical Oncology, 10(9), 507-518.

[7] S. Hussain et al., «Modern Diagnostic Imaging Technique Applications and Risk Factors in the Medical Field: A Review», Biomed Res Int, vol. 2022, p. 5164970, jun. 2022.

[8] «Imágenes hiperespectrales: una descripción general | Temas ScienceDirect». Accedido: 29 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hyperspectral-imaging

[9] V. V. Tuchin, Ed., Handbook of Optical Biomedical Diagnostics, Second Edition: Volume 1: Light-Tissue Interaction. Bellingham, WA: SPIE Press, 2016

[10] G. Lu y B. Fei, "Medical hyperspectral imaging: a review," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 19, no. 1, pp. 010901, Jan. 2014.

[11] «Web of Science». Accedido: 30 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.webofscience.com/wos/alldb/basic-search

[12] J. Y. Huang, Ed., Hyperspectral Imaging : A Perspective on Recent Advances and Applications. IntechOpen, 2023. Accedido: 30 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: https://directory.doabooks.org/handle/20.500.12854/113360

[13] S. Serranti y G. Bonifazi, «Hyperspectral imaging and its applications», en Optical Sensing and Detection IV, SPIE, abr. 2016, pp. 146-165. doi: 10.1117/12.2234976.

[14] G. Lu y B. Fei, «Medical hyperspectral imaging: a review», J Biomed Opt, vol. 19, n.o 1, p. 010901, ene. 2014.

[15] B. W. Pogue et al., «AAPM Task Group Report 311: Guidance for performance evaluation of fluorescence-guided surgery systems», Medical Physics, vol. 51, n.o 2, pp. 740-771, 2024.

[16] «Molecular Expressions Microscopy Primer: Specialized Microscopy Techniques - Fluorescence - Basic Concepts in Fluorescence». Accedido: 30 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html

[17] «What is the difference between fluorescence, phosphorescence and luminescence?», Enzo. Accedido: 30 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.enzo.com/note/what-is-the-difference-between-fluorescence-phosphorescence-and-luminescence/

[18] «Fundamentos de la excitación y emisión de la fluorescencia | Olympus LS». Accedido: 30 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/primer/lightandcolor/fluoroexcitation/

[19] A. B. Chinen, C. M. Guan, J. R. Ferrer, S. N. Barnaby, T. J. Merkel, y C. A. Mirkin, «Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence», Chem. Rev., vol. 115, n.o 19, pp. 10530-10574, oct. 2015, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00321.

[20] «DiR - Biotio». Accedido: 31 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://biotium.com/product/dir-diic187-or-11-dioctadecyl-3333-tetramethylindotricarbocyanine-iodide/

[21] «Espectro [DiR] | Bioquest de AAT». Accedido: 31 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/dir

[22] «how to prepare a stock solution of the DiR dye in ethanol. - Buscar con Google». Accedido: 31 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp00282.pdf

[23] «NANOIMOC». Accedido: 31 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.secpho.org/casos/nanoimoc/

[24] G. Menikou y C. Damianou, «Acoustic and thermal characterization of agar based phantoms used for evaluating focused ultrasound exposures», Journal of Therapeutic Ultrasound, vol. 5, n.o 1, p. 14, jun. 2017.

[25] «Can be ethanol used as a dissolvent in spectrophotometry, when the wavelength for sample is λ = 490 nm? (orange color)», Quora. Accedido: 3 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.quora.com/Can-be-ethanol-used-as-a-dissolvent-in-spectrophotometry-when-the-wavelength-for-sample-is-λ-490-nm-orange-color

[26] «What Is A Phantom? How Does It Work?» Accedido: 3 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.spect.com/blog/what-is-a-phantom-how-does-it-work

[27] «Gelatina en polvo 60 gr - María Lunarillos». Accedido: 3 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.marialunarillos.com/1303-gelatina-en-polvo.html

[28] A. Llos, «Pairing alcohol and gelling agents in pastry», Jordi Bordas. Accedido: 3 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://jordibordas.com/en/blog/como-combinar-alcoholes-y-gelificantes-en-pasteleria/

[29] «Gelatina vegetal: cómo hacer gelatina con agar-agar», Entrenosotros | Consum. Accedido: 3 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://entrenosotros.consum.es/gelatina-vegetal

[30] A. Femenias Llaneras y S. Marín, «Hyperspectral Imaging», 2021, pp. 363-390. doi: 10.1002/9781119759522.ch15.

[31] J. A. Gutiérrez Gutiérrez, «Contribuciones a la traslación de instrumentación fotónica al ámbito clínico», Contributions to the translation of photonic instrumentation to the clinical field, ene. 2024, Accedido: 4 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/31878

[32] J. A. Gutiérrez-Gutiérrez, A. Pardo, E. Real, J. M. López-Higuera, y O. M. Conde, «Custom Scanning Hyperspectral Imaging System for Biomedical Applications: Modeling, Benchmarking, and Specifications», Sensors, vol. 19, n.o 7, Art. n.o 7, ene. 2019.

[33] A. Pardo Franco, «Luz, máquinas, y cáncer: sistemas de imagen y técnicas de procesado para el diagnóstico de medios dispersivos mediante imágenes de amplio campo de visión», Light, machines, and cancer: imaging systems and processing techniques for wide-field diagnostics in scattering media, jun. 2022.

[34] Bluebox Optics, "Bluebox Optics niji 086 System Test Information," Mar. 2023. [En línea]. Available: https://blueboxoptics.com/niji-086. [Accedido: 29/06/2024].

[35] «Fluorescent Microscope Slides and Alignment Targets». Accedido: 4 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.thorlabs.com

[36] «T-FSK5 - Fluorescent Microscope Slides, Set of 5 Colors», Fosco Connect. Accedido: 4 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en:

https://www.fiberoptics4sale.com/products/t-fsk5-fluorescent-microscope-slides-set-of-5-colors

[37] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. New York, NY, USA: Springer, 2006.

[38] «Spectralon® Diffuse Reflectance Standards - Diffuse Reflectance», Labsphere. Accedido: 6 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.labsphere.com/product/spectralon-diffuse-reflectance-standards/

[39] «Estándares de reflectancia Spectralon® de Labsphere para calibración de equipos». Accedido: 6 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.photonicsonline.com/doc/labspheres-spectralonreg-reflectance-standard-0001

[40] «Función gaussiana», Wikipedia, la enciclopedia libre. 9 de diciembre de 2023. Accedido: 17 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Funci%C3%B3n_gaussiana&oldid=155914008

[41] «Fluorescence Lifetimes and Dynamic Quenching», Chemistry LibreTexts. Accedido: 22 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Exercises%3A_Physical_and_Theoretical_Chemistry/Data-Driven_Exercises/Fluorescence_Lifetimes_and_Dynamic_Quenching

[42] «3.6: Variables that Influence Fluorescence Measurements», Chemistry LibreTexts. Accedido: 22 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Molecular_and_Atomic_Spectroscopy_(Wenzel)/3%3A_Molecular_Luminescence/3.6%3A_Variables_that_Influence_Fluorescence_Measurements

[43] C. V. Bindhu, S. Harilal, G. K Varier, R. Issac, V. P. N. Nampoori, y C. P. G. Vallabhan, «Measurement of the Absolute Fluorescence Quantum Yield of Rhodamine B Solution Using a Dual-Beam Thermal Lends Technique», Journal of Physics D: Applied Physics, vol. 29, p. 1074, ene. 1999, doi: 10.1088/0022-3727/29/4/022.

[44] «ALCOHOL ETÍLICO – Grupo Español IIC». Accedido: 21 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.ge-iic.com/fichas-tecnicas/disolventes/alcohol-etilico/

[45] «Photobleaching in Fluorescence Imaging - ES». Accedido: 21 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/protocols-troubleshooting/troubleshooting/photobleaching.html

[46] A. J. Ramponi y J. A. Caird, «Fluorescence quantum efficiency and optical heating efficiency in laser crystals and glasses by laser calorimetry», Journal of Applied Physics, vol. 63, n.o 11, pp. 5476-5484, jun. 1988, doi: 10.1063/1.340372.

[47] M. Tesa, S. Thomson, and A. Gakamsky, "Temperature-Dependent Quantum Yield of Fluorescence from Plant Leaves," Application Note AN_P41, Edinburgh Instruments, 09 April 2018.

[47] B. Valeur and M. N. Berberan-Santos, “Molecular Fluorescence: Principles and Applications”, 2nd ed., Wiley-VCH, 2012.

[48] J. R. Lakowicz, “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, 3rd ed., Springer, 2006.