



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

**“Estudio de la Fluorescencia de Nanopartículas de Conversión Ascendente en un Microscopio de Hoja de Luz Láser de Baja Resolución y Detección Óptica.”**

**TESIS**

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

**Ingeniera en Nanotecnología**

**Presenta:**

María Paulina Amézquita Arce

**Director:**

Dr. Israel Rocha Mendoza

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño (UABC)

**Codirector:**

Dr. Jorge Octavio Mata Ramírez

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño (UABC)

**Ensenada Baja California, Junio de 2025.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE INGENIERIA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**“Estudio de la Fluorescencia de Nanopartículas de Conversión Ascendente en un Microscopio de Hoja de Luz Láser de Baja Resolución y Detección Óptica.”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**Ingeniera en Nanotecnología**

PRESENTA

**María Paulina Amézquita Arce**  
**368047**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dr. Israel  
Rocha Mendoza  
**DIRECTOR**

Dr. Jorge Octavio Mata  
Ramírez  
**CODIRECTOR**

Dr. Hugo Alejandro Borbón  
Núñez  
SINODAL

Dr. Elmer  
Cruz Mendoza  
SINODAL

MSc. Dannareli  
Barrón Ortíz  
SINODAL

**“Por la Realización Plena del Ser”**

## Resumen

Las nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs, por sus siglas en inglés) han surgido como materiales prometedores en aplicaciones biomédicas y tecnológicas gracias a su capacidad de emitir luz de alta energía al absorber fotones en el rango del infrarrojo cercano. En este proyecto se evaluó el desempeño de un microscopio de hoja de luz láser no comercial en la detección de fluorescencia de UCNPs bajo condiciones de baja resolución óptica y eficiencia cuántica limitada. A través de la preparación de muestras de UCNPs dispersas en agarosa, la calibración del sistema con microesferas fluorescentes y el análisis de imágenes obtenidas, se generaron mapas volumétricos de fluorescencia y se estimó la función de transferencia óptica, (OTF, por sus siglas en inglés) del sistema. También se emplearon las resoluciones axiales correspondientes a cada amplificación de la cámara del microscopio y PSF obtenidas experimentalmente para posteriormente realizar deconvolución a imágenes de muestras biológicas, en este caso se emplearon imágenes de cerebros de Pez cebra. Además, el estudio permite comparar los resultados experimentales con sistemas comerciales, identificando limitaciones y proponiendo mejoras tecnológicas.

**Palabras clave:** Resolución espacial, microscopio de hoja de luz, fluorescencia de conversión ascendente, nanopartículas.

## Abstract

Upconversion nanoparticles (UCNPs) have emerged as promising materials in biomedical and technological applications due to their ability to emit high-energy light by absorbing photons in the near-infrared range. In this project, the performance of a non-commercial laser light sheet microscope was evaluated in the fluorescence detection of UCNPs under conditions of low optical resolution and limited quantum efficiency. By preparing samples of UCNPs dispersed in agarose, calibrating the system with fluorescent microspheres and analysing the images obtained, volumetric fluorescence maps were generated and the optical transfer function (OTF) of the system was estimated. The axial resolutions corresponding to each amplification of the microscope camera and PSF obtained experimentally were also used to subsequently deconvolute to images of biological samples, in this case images of zebrafish brains were used. In addition, the study allows comparing experimental results with commercial systems, identifying limitations and proposing technological improvements.

**Keywords:** Spatial resolution, light sheet microscopy, upconversion fluorescence, nanoparticles.

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis con todo mi amor y gratitud a las personas que han sido mi fuerza, mi inspiración y mi compañía a lo largo de este camino.

A mi madre y a mi padre, por su amor incondicional, por enseñarme con su ejemplo el valor del esfuerzo y la perseverancia. Gracias por creer en mí incluso en los momentos en los que yo misma dudaba.

A mi nana Socorro y a mi tata Lito, quienes partieron hace algunos años, y a mi querido tío abuelo Mundo, cuya ausencia aún es reciente. Siempre los tengo presentes en mi mente y corazón. Sé que estarían sumamente orgullosos de este logro y que, de alguna forma, me acompañaron también en este camino.

A mis abuelos, nana Ceferina y tata Rubén, por su amor y preocupación constante por mi formación. Gracias por estar siempre al pendiente de mis estudios, por sus palabras sabias y su cariño incondicional.

A Enrique, mi pareja, por acompañarme a la distancia en cada paso, por creer siempre en mí y brindarme su apoyo inagotable, aun cuando los kilómetros nos separaban. Tu presencia, fué mi refugio y mi impulso.

A Niko, mi perrito amado, que me espera en casa. Tu compañía, aunque silenciosa, ha sido un consuelo constante para mi corazón; gracias por alegrar mis días con tu existencia.

Esta dedicatoria es un pequeño homenaje a quienes han marcado mi vida con su amor, su ejemplo y su presencia —hoy y siempre.

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este proyecto de tesis.

En primer lugar, agradezco sinceramente al Dr. Israel Rocha Mendoza, mi director de tesis, por su invaluable guía, apoyo constante y compromiso durante todo el desarrollo de esta investigación. Su experiencia y acompañamiento fueron fundamentales para mi formación académica y para culminar exitosamente esta etapa.

De igual manera, extiendo mi gratitud al Dr. Jorge Octavio Mata Ramírez, mi codirector, por su paciencia, disposición y siempre estar dispuesto a brindarme orientación. Sus aportaciones enriquecieron profundamente este trabajo y contribuyeron a que cada obstáculo fuera superado con confianza.

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por haberme brindado acceso a sus instalaciones y laboratorios, los cuales fueron esenciales para el desarrollo experimental de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), mi alma mater, por haber sido mi casa de formación profesional, por las oportunidades brindadas, y por inculcarme valores académicos que me acompañarán siempre.

A los miembros de mi comité de tesis, por sus observaciones, tiempo y aportaciones que sin duda fortalecieron el rigor científico y académico de este trabajo.

A todas y todos los que, de una u otra forma, contribuyeron a que este proyecto se hiciera realidad: gracias por su apoyo, confianza y motivación constante.

## CONTENIDO

<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivos generales	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	3
1.4 Antecedentes	4
1.4.1 Antecedentes generales	4
1.4.2 Antecedentes del grupo de trabajo	5
1.5 Estructura de la tesis	6
<b>II. Marco teórico</b>	
2.1 Interacción Luz-Materia	7
2.2 Fluorescencia	8
2.3 Materiales co-dopados con RE (Erbio e Iterbio)	9
2.4 Fluorescencia por conversión ascendente	10
2.5 Nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs)	12
2.6 Microscopías de fluorescencia de hoja de luz láser	14
2.7 OTF y su uso en la formación de imágenes.	15
2.7.1 Formación de respuesta al impulso	15
2.7.2 Formación de imagen en un sistema óptico	16
2.7.3 Convolución	18
2.7.4 Deconvolución	18
2.7.5 Relación entre el ancho del disco de Airy y la OTF para estimar la resolución	20
2.7.6 Ancho del disco de Airy	20
2.7.7 Ancho de la OTF	21
<b>III. Metodología experimental</b>	
3.1 Arreglo experimental para microscopía de hoja de luz láser	23
3.2 Preparación de muestras	25
3.2.1 Microesferas fluorescentes inmersas en agarosa	25
3.2.2 Nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs) en medio acuoso	25

3.2.3 Muestras biológicas: cerebro de pez cebra	25
3.3 Medición de la PSF y la OTF	26
3.3.1 Procedimiento para obtener la PSF en ImageJ	26
3.3.2 Procedimiento para obtener la OTF y MTF en ImageJ	27
3.4 Deconvolución de imágenes	27
<b>IV. Resultados</b>	
4.1 Estimación de la Resolución del Microscopio mediante Deconvolución con PSF.	28
4.2. Evaluación de la Función de Transferencia Óptica (OTF)	29
4.3. Caracterización de la Resolución Digital de la Cámara	29
4.4 Preparación y Caracterización de Muestras de UCNPs	30
4.5 Evaluación de la Detectabilidad de la Emisión Fluorescente	30
4.6. Comparación con Sistemas Comerciales y Validación de la Hipótesis	31
<b>V. Conclusión</b>	32
<b>VI. Literatura citada</b>	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Espectro electromagnético, mostrando un aumento en el rango óptico que va desde luz infrarroja a luz ultravioleta.

**Figura 2** Diagrama de niveles energéticos donde se ilustra el proceso convencional de fluorescencia. Tras la absorción de un fotón, una molécula es excitada desde el estado fundamental  $S_0$  a un estado excitado  $S_1$ . Posteriormente, este se relaja mediante transiciones no radiativas hacia el nivel vibracional más bajo de  $S_1$ , desde donde ocurre la emisión de fluorescencia, al regresar al estado fundamental (Valeur, 2001).

**Figura 3.** Tabla periódica de los elementos, donde se pueden ubicar los lantánidos (Er, Yb), pertenecientes al periodo 6, junto con el escandio (Sc) e itrio (Y). Estos 17 elementos conforman el grupo conocido como tierras raras (Rare Earths, RE), debido a sus propiedades químicas similares.

**Figura 4.** Esquema del mecanismo de transferencia de energía en un sistema sensibilizador-activador. El sensibilizador absorbe fotones mediante una absorción desde el estado fundamental (G) al estado excitado (E1), seguido de un proceso de transferencia de energía al activador, el cual es promovido a un estado excitado superior (E2) desde donde ocurre la emisión (Najib, 2018).

**Figura 5.** A) Vista de la celda unitaria, donde los átomos de sodio ocupan sitios intersticiales, mientras que los iones  $Y^{3+}/Yb^{3+}/Er^{3+}$  y fluoruro forman una red coordinada octaédrica. B) Arreglo espacial extendido, destacando la simetría característica de la fase cúbica. Esta fase metaestable, aunque menos eficiente en luminiscencia que la fase hexagonal, es común en síntesis a bajas temperaturas.

**Figura 6.** C) Celda unitaria hexagonal, donde los iones  $Y^{3+}/Yb^{3+}/Er^{3+}$  ocupan sitios en capas alternadas con fluoruro en coordinación trigonal no centrada mientras que los  $Na^+$  se distribuyen en canales intersticiales. D) Empaquetamiento extendido mostrando la simetría característica de este arreglo. Esta fase es termodinámicamente estable y altamente eficiente para procesos de upconversion.

**Figura 7.** Comparación esquemática entre microscopía de epifluorescencia tradicional (Izquierda) y microscopía de hoja de luz láser (derecha). Las flechas indican las direcciones de iluminación y detección en cada técnica.

**Figura 8.** Un disco de Airy se describe como un punto de luz brillante en el centro, rodeado por una serie de anillos concéntricos que disminuyen en brillo a medida que se alejan del centro. Este patrón se produce cuando la luz de una fuente puntual pasa a través de una abertura circular.

**Figura 9.** Representación de la función de respuesta al impulso (PSF) en un sistema óptico limitado por difracción. La imagen muestra cómo una fuente puntual genera un patrón de intensidad distribuida, conocido como disco de Airy, debido a la apertura finita del sistema. En sistemas con menor resolución, la PSF tiende a aproximarse a una distribución gaussiana.

**Figura 10.** Efecto de la función de respuesta al impulso (PSF) en la formación de una imagen. La imagen de la izquierda representa el objeto real, rico en detalles estructurales finos. Durante la adquisición, el sistema óptico actúa como un filtro espacial cuya PSF dispersa la información del objeto, generando la imagen observada (derecha), más borrosa y con menor contraste. Este proceso se modela matemáticamente como una convolución entre el objeto y la PSF, lo que explica la pérdida de nitidez y la atenuación de las altas frecuencias espaciales responsables de los detalles finos.

**Figura 11.** Esquema conceptual de la deconvolución en microscopía óptica. La figura muestra el resultado de la convolución del objeto real (Objeto) con la función de dispersión del punto (PSF, por sus siglas en inglés), representada como  $h(x,y)$ . En el dominio de Fourier, esta convolución se convierte en un producto, lo cual permite aplicar la deconvolución computacional mediante la transformada de Fourier inversa  $F^{-1}$ . Este proceso mejora la resolución y permite recuperar una estimación más precisa del objeto original.

**Figura 12.** Relación entre la función de respuesta al impulso (PSF) y la función de transferencia óptica (OTF) para estimar la resolución de un sistema óptico. a) Perfil de un patrón de Airy generado por una apertura circular: su ancho define el límite resolutorio en el espacio real. b) MTF de la función de respuesta al impulso de (a), indica cómo el contraste de las frecuencias espaciales decrece a medida que se incrementa la densidad de detalles. Las imágenes de franjas insertas muestran cómo los patrones finos pierden contraste progresivamente, hasta volverse indistinguibles más allá de la frecuencia de corte. C. Romero-Martínez (2022).

## Capítulo 1: Introducción.

A lo largo de las últimas décadas, la nanotecnología ha emergido como una plataforma innovadora que amplía el rango de aplicaciones de diversos tipos de materiales, al permitir la manipulación para el control de tamaño, morfología, composición química, partiendo desde su síntesis. Cuando al menos una de las dimensiones de un material se encuentra en el rango nanométrico (1-100 nm), es posible modificar sus propiedades estructurales, magnéticas, eléctricas, químicas y morfológicas. Estas modificaciones dan paso a nuevas aplicaciones de los nanomateriales.

En este contexto, la nanofotónica es un área de investigación dedicada al estudio de la propagación e interacción de la radiación óptica con la materia a escala por debajo de la longitud de onda (escala nanométrica). (CIO, 2025). Las interacciones que ocurren entre la luz y estructuras a escala nanométrica o con materiales permiten el desarrollo de nuevas tecnologías ópticas con aplicaciones en diversas disciplinas científicas e industriales.

Uno de los nanomateriales que ha acaparado gran interés en los últimos años en esta área son las **nanopartículas de conversión ascendente** (UCNPs, por sus siglas en inglés), debido a sus aplicaciones en microscopía, diagnóstico biomédico y detección térmica (Liang et.al, 2020, Zhang, 2015.) Estas nanopartículas surgieron como una alternativa a los fluoróforos convencionales, que presentan limitaciones como la fotodegradación y la interferencia por autofluorescencia. Las UCNPs destacan por su estabilidad lumínica y por su capacidad de ser excitadas con radiación en el infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés), que es menos fototóxica para los tejidos vivos.

En particular, las UCNPs formadas por fluoruro de sodio e itrio dopado con iterbio y erbio ( $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ ) se distinguen por su eficiencia en la emisión de luz visible, con bandas centradas en 525 nm y 550 nm. Estas emisiones, además de encontrarse en una región óptima para la detección con cámaras convencionales, presentan un acoplamiento térmico útil para aplicaciones de termometría óptica (Dou, et. al, 2014, Mahata, et. al 2021, Ma, et. al, 2015.) Debido a estas propiedades, las UCNPs requieren de alta resolución espacial y sensibilidad para desempeñarse en distintas aplicaciones como la medición de cambios de temperatura en sitios localizados a escala micrométrica, así como también su uso como marcadores celulares para el seguimiento de procesos biológicos, trazadores ópticos en sistemas complejos y herramientas para estudios dinámicos de transporte molecular.

Estas aplicaciones amplían significativamente su potencial en investigación biomédica y nanotecnológica y en el desarrollo de técnicas avanzadas de diagnóstico y terapia. (Barrón Ortiz, 2020).

No obstante, la caracterización óptica de estas nanopartículas requiere equipos especializados de alto costo, lo cual limita su uso en laboratorios con recursos restringidos. Esta barrera tecnológica ha motivado el desarrollo de sistemas alternativos más asequibles que permitan continuar explorando el potencial de las UCNPs en contextos académicos y clínicos. La **microscopía de fluorescencia de hoja de luz** (LSFM, por sus siglas en inglés) es una técnica potencial para caracterizar la fluorescencia de las UCNPs, permitiendo la obtención de imágenes tridimensionales detalladas. Este sistema óptico se destaca por tener daños mínimos por fototoxicidad al iluminar selectivamente planos dentro de una muestra, lo cual mejora tanto la resolución axial como la calidad de las imágenes obtenidas. (Rocha Mendoza et al, 2023). Sin embargo, los sistemas LSFM suelen ser costosos y poco accesibles, limitando su uso en proyectos de investigación de menor presupuesto.

Ante esta situación, el presente proyecto tiene como objetivo evaluar el desempeño y viabilidad de un sistema LSFM no comercial, ya implementado en el laboratorio, para la detección de la fluorescencia de UCNPs. El objetivo es determinar su viabilidad operando bajo condiciones de baja resolución óptica y eficiencia cuántica limitada, y con ello contribuir al desarrollo de metodologías de análisis óptico accesibles y reproducibles. Si se logra validar la capacidad de este sistema para detectar y analizar la emisión fluorescente de UCNPs, se abriría la posibilidad de emplear estos materiales en estudios biomédicos y nanotecnológicos dentro de entornos de investigación de bajo costo, generando así nuevas oportunidades en el uso de tecnologías ópticas emergentes.

## I. **Objetivos**

### 1.1 **Objetivos Generales:**

Este estudio tiene dos objetivos generales:

1. Estimar la resolución del microscopio mediante la deconvolución de imágenes con la función de respuesta al impulso (PSF, por sus siglas en inglés) medida experimentalmente.
2. Estimar la emisión de fluorescencia de las nanopartículas de conversión ascendente (NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup>
3. Utilizando un sistema de microscopía de hoja de luz no comercial, evaluando su desempeño en condiciones de baja resolución óptica y eficiencia cuántica.

### 1.2 **Objetivos Específicos:**

1. Estimar la resolución del sistema mediante la función de respuesta al impulso (PSF) y la transferencia óptica (OTF) del sistema experimental mediante el uso de microesferas fluorescentes y las UCNPs.
2. Caracterizar la resolución digital de la cámara para diferentes amplitudes con el fin de identificar las limitaciones y proponer mejoras para optimizar el sistema LSFM.
3. Preparar y caracterizar muestras de NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup> inmersas en agarosa.
4. Evaluar la detectabilidad de las emisiones fluorescentes características de las nanopartículas (525 nm y 550 nm) utilizando el sistema LSFM.

## II. **Hipótesis**

El sistema LSFM no comercial puede detectar la fluorescencia de UCNPs (NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup>) bajo condiciones de baja resolución óptica y eficiencia cuántica limitada, permitiendo el análisis de sus aplicaciones en entornos de investigación accesibles, aunque con limitaciones respecto a sistemas comerciales avanzados.

## II. Antecedentes.

En el campo de la óptica, particularmente la nanofotónica, la investigación sobre las nanopartículas dopadas con tierras raras ha crecido exponencialmente debido a sus amplias aplicaciones en dispositivos ópticos y biomédicos. Las UCNP's basadas en  $\text{NaYF}_4$  dopadas con  $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$  se destacan dentro de estas investigaciones por su capacidad para convertir luz de baja energía (NIR), en luz visible mediante procesos no lineales (Borse et. al, 2022).

Un estudio realizado por *C. Mi et al.* (2011), reportó que la matriz de  $\text{NaYF}_4$  es una de las matrices hospederas más eficientes para dopajes con tierras raras debido a su baja simetría cristalina, que favorece la conversión ascendente. El dopaje con iterbio ( $\text{Yb}^{3+}$ ) actúa como un sensibilizador al absorber luz en el rango de infrarrojo cercano (980 nm) y transferir energía al erbio ( $\text{Er}^{3+}$ ), emitiendo posteriormente luz visible en el verde y rojo (aproximadamente a 550 nm y 650 nm, respectivamente).

Por su parte, *Rafique et al.* (2018) reportó que el rendimiento lumínico de las UCNP's depende en gran medida del control del tamaño y la morfología de las nanopartículas durante su síntesis, ya que estos factores minimizan los efectos de autoabsorción y mejoran la eficiencia de conversión. La alta estabilidad luminiscente de las UCNP's, junto con su estabilidad bajo irradiación NIR, las convierte en herramientas ideales para calibrar sistemas ópticos avanzados.

En relación con las técnicas de microscopía, *Santi et al.* (2011) señalaron que el uso de tecnologías avanzadas de microscopía, tales como la microscopía de hoja de luz láser (LSFM) ha revolucionado la obtención de imágenes tridimensionales de estructuras celulares, sistemas biológicos y materiales fluorescentes, gracias a su iluminación selectiva, en plano, este sistema reduce la fototoxicidad y mejora la relación señal-ruido en comparación con otras técnicas de microscopía.

Un componente crítico en la calibración de sistemas ópticos como LSFM es la obtención precisa de la función de respuesta al impulso óptico, (PSF, por sus siglas en inglés), ya que describe como el sistema responde a una fuente puntual de luz. En este sentido, *Song et al.* (2005) reportaron que las microesferas fluorescentes de poliuretano son materiales óptimos para la caracterización de la PSF debido a su emisión controlada en distintos colores del espectro visible (azul, verde y rojo), su uniformidad en tamaño y su buena estabilidad óptica.

## 1.1 Antecedentes del grupo de trabajo

El presente proyecto se enmarca en una línea de investigación desarrollada en el Departamento de Óptica del CICESE, ahora en colaboración con la Facultad de Ingeniería de la UABC, orientada a la implementación de técnicas ópticas accesibles para la caracterización tridimensional de materiales fluorescentes, con énfasis en el uso de nanopartículas dopadas con tierras raras y microscopía de fluorescencia de hoja de luz (LSFM).

En este contexto, el trabajo de **Barrón Ortiz (2021)** se centró en la caracterización bidimensional de sensores térmicos basados en compuestos poliméricos dopados con  $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ , utilizando la razón de intensidades fluorescentes (FIR) entre bandas térmicamente acopladas para estimar temperatura. En su tesis de maestría, desarrolló dos metodologías experimentales para obtener mapas térmicos 2D mediante fluorescencia de conversión ascendente, empleando únicamente cámaras CMOS a color y filtros ópticos, sin recurrir a espectroscopía. Uno de los aspectos más relevantes fue el uso de un sistema LSFM de bajo costo, ensamblado con componentes disponibles localmente, lo que validó la viabilidad de esta técnica para análisis óptico térmico accesible (Barrón Ortiz, 2021).

Por otro lado, **Romero Martínez (2022)** desarrolló una metodología de deconvolución tridimensional para microscopía LSFM basada en haces Gaussianos y Bessel. Su estudio combinó simulaciones ópticas con herramientas de propagación de haces (incluyendo modelos basados en la ecuación de Huygens-Fresnel), con el objetivo de estimar la PSF efectiva de sistemas LSFM considerando las características de iluminación y recolección. Posteriormente, implementó algoritmos propios de deconvolución para reconstruir volúmenes tridimensionales a partir de imágenes experimentales, demostrando mejoras significativas en la resolución axial y lateral. Aunque su trabajo se centró en configuraciones de mayor resolución y complejidad computacional, sus resultados permiten fundamentar parte de la caracterización óptica que se pretende realizar en este estudio (Romero Martínez, 2022).

La presente tesis toma como punto de partida el sistema LSFM previamente implementado por Barrón Ortiz, con el objetivo de caracterizar su rendimiento en condiciones de baja resolución óptica y cuantificar su capacidad para detectar señales de fluorescencia provenientes de nanopartículas de conversión ascendente. Asimismo, adapta conceptos y metodologías del trabajo de Romero Martínez para estimar la PSF y la función de transferencia óptica (OTF) del sistema, mediante herramientas disponibles como Fiji/ImageJ, sin requerir programación personalizada.

## **1.5 Estructura de la tesis**

Esta tesis está organizada en cinco capítulos. En el Capítulo 1 se presenta la introducción general al tema, incluyendo la justificación, objetivos, hipótesis y antecedentes tanto del estado del arte como del grupo de trabajo. El Capítulo 2 expone el marco teórico necesario para comprender los fundamentos físicos de la conversión ascendente, las propiedades ópticas de las UCNPs, y los principios de la microscopía LSFM, así como conceptos clave sobre la PSF y la OTF. En el Capítulo 3 se describe detalladamente la metodología experimental empleada, incluyendo la preparación de muestras, configuración del sistema óptico, y los procedimientos de adquisición y análisis de imágenes. El Capítulo 4 presenta y discute los resultados obtenidos, centrándose en la caracterización óptica del sistema LSFM, la estimación de la resolución espacial y la evaluación de la detectabilidad de las UCNPs. Finalmente, el Capítulo 5 ofrece las conclusiones generales del estudio, sus principales aportaciones y una discusión sobre las perspectivas futuras para mejorar el sistema y ampliar sus aplicaciones. Finalmente en el Capítulo 6 enlista toda la literatura revisada y citada en la realización de esta tesis.

## Capítulo 2: Marco teórico.

En el presente capítulo se abordan los fundamentos físicos y ópticos necesarios para comprender el funcionamiento de las nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs), los mecanismos involucrados en su emisión, sus aplicaciones en bioimagen y termometría óptica, así como los principios de la microscopía de hoja de luz y el análisis mediante la función de respuesta al impulso (PSF) y la función de transferencia óptica (OTF).

### 2.1 Interacción luz-materia

La luz se describe de dos maneras: Como radiación electromagnética, en forma de ondas o bien, de partículas (fotones o cuantos de energía). En el contexto óptico, la interacción entre la luz y la materia puede modificar los estados electrónicos y vibracionales de los átomos o moléculas que la componen. Estas interacciones ocurren principalmente dentro del rango del espectro electromagnético (ver Figura 1) correspondiente a la luz ultravioleta (UV), visible (VIS) e infrarroja (IR), cuya energía es suficiente para inducir transiciones cuánticas.

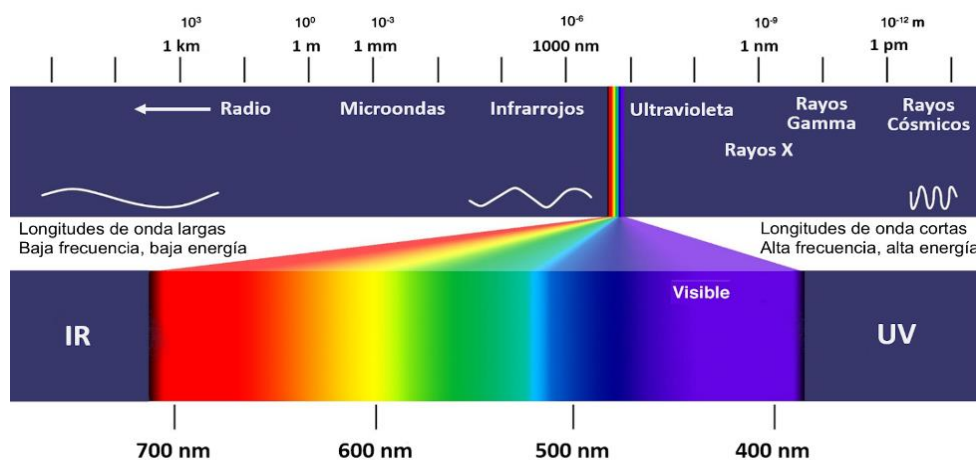


Figura 1. Espectro electromagnético, mostrando un aumento en el rango óptico que va desde luz infrarroja a luz ultravioleta.

A nivel atómico, un fotón incidente puede excitar un electrón desde su estado basal a un estado excitado si su energía es igual o mayor a la diferencia entre estos niveles. Esta excitación puede involucrar también transiciones vibracionales, dependiendo de la energía de la radiación incidente. En algunos casos, la excitación ocurre mediante absorción multifotónica, donde varios fotones son absorbidos de forma secuencial, permitiendo alcanzar estados excitados de mayor energía (Jameson, 2014).

Tras la excitación, los electrones tienden a regresar a niveles de menor energía mediante mecanismos de relajación. Estos pueden ser no radiativos, como la conversión interna o las colisiones intermoleculares, o radiativos, como ocurre en el fenómeno de fluorescencia. Los procesos no radiativos disipan la energía en forma de calor, mientras que los procesos radiativos resultan en la emisión de fotones.

La excitación óptica de los estados electrónicos es lograda mediante fuentes de luz en el rango ultravioleta (100-400 nm) o visible (400-700 nm), mientras que para lograr excitar estados vibracionales se utiliza luz NIR (en el infrarrojo cercano, 3-1000  $\mu\text{m}$ ), la absorción de luz ocasiona transiciones electrónicas cuando la energía del fotón incidente es igual o superior a la diferencia entre dos estados electrónicos o vibracionales.

## 2.2 Fluorescencia

La fluorescencia es la emisión espontánea de un fotón durante la relajación de las moléculas a partir de un estado excitado. Es la combinación de tres eventos consecutivos que se producen en la escala de nanosegundos, los cuales se muestran en la figura 2.

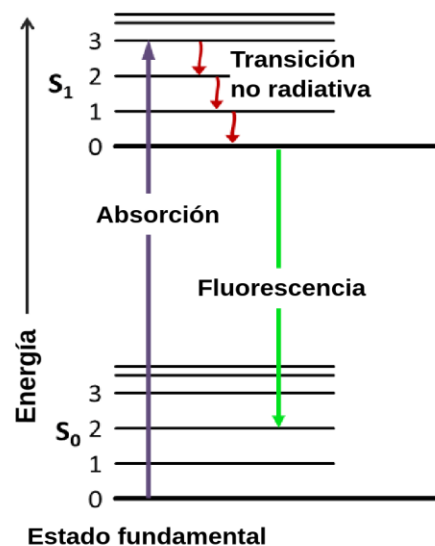


Figura 2 Diagrama de niveles energéticos donde se ilustra el proceso convencional de fluorescencia. Tras la absorción de un fotón, una molécula es excitada desde el estado fundamental  $S_0$  a un estado excitado  $S_1$ . Posteriormente, este se relaja mediante transiciones no radiativas hacia el nivel vibracional más bajo de  $S_1$ , desde donde ocurre la emisión de fluorescencia, al regresar al estado fundamental (Valeur, 2001).

Primeramente, la molécula absorbe energía luminosa (un fotón con energía  $h\nu_{ex}$ ) superior a la diferencia de energía entre el primer estado excitado (S1) y el estado basal (S0), por lo que se puede establecer la condición:  $h\nu_{ex} > S1 - S0$ .

En segundo lugar, una vez que la molécula se encuentra en la banda de estado excitado, se relaja a estados de energía vibracional más bajos dentro de la banda excitada sin irradiar. En esencia, este proceso de relajación no emite radiación radiactiva, y adicionalmente transfiere pequeñas cantidades de energía a través de colisiones atómicas o moleculares, generando energía calorífica, pero esto no provoca la emisión de un fotón infrarrojo o visible.

Por último, la molécula vuelve al estado basal (S0), emitiendo un fotón con energía igual a  $h\nu_{em} < h\nu_{ex}$ , es decir, con menor energía que la necesaria para pasar al estado excitado. La diferencia entre la energía excitada y la emitida se conoce como desplazamiento de Stokes, que es la propiedad que hace de la fluorescencia una propiedad muy importante en la toma de imágenes. Al filtrar el fotón de excitación en la trayectoria de captación sin bloquear el fotón de emisión, es posible ver únicamente los objetos fluorescentes.

### 2.3 Materiales co-dopados con RE (Erbio e Iterbio)

Los lantánidos pertenecen a una serie de 15 elementos en la tabla periódica de los elementos químicos, que se muestra en la figura 3. Pertenecen al periodo 6. Estos elementos tienen propiedades químicas bastante similares a el Escandio (Sc) e Itrio (Y), y todos en conjunto, se les conoce como tierras raras (Por sus siglas en inglés, RE).

Grupo →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba		72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra		104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
				Lantánidos														
				57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu
				Actínidos														
				89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr

Figura 3. Tabla periódica de los elementos, donde se pueden ubicar los lantánidos (Er, Yb), pertenecientes al periodo 6, junto con el escandio (Sc) e itrio (Y). Estos 17 elementos conforman el grupo conocido como tierras raras (Rare Earths, RE), debido a sus propiedades químicas similares.

Cabe mencionar que dichos elementos no son especialmente “tierras”, y no todos son exactamente “raros”. Su característico nombre fue otorgado ya que, históricamente hablando, en el siglo XVIII se les llamaba tierras a los óxidos, y en ese entonces existía cierta dificultad para la separación de estos elementos de los minerales comúnmente extraídos, además de que eran raramente utilizados.

Las tierras raras son elementos trivalentes (átomo o elemento con una valencia de tres). que en su mayoría poseen un estado de oxidación estable  $3^+$ , excepto el Cerio (Ce), que puede formar iones  $4^+$ , o también el Iterbio (Yb) Samario (Sm) y el el Europio (Eu), los cuales también pueden formar iones  $2^+$  (x), los cuales son menos estables. La configuración electrónica de todos los iones es  $[Xe]4f^n$ , que va desde  $n=0$  para el lantano ( $La^{3+}$ ) hasta  $n=14$  para el lutecio ( $Lu^+$ ). La secuencia de llenado entre sus orbitales f les otorga propiedades electrónicas, ópticas, magnéticas y luminiscentes muy notables.

Estos elementos presentan una gran variedad de estados electrónicos cuantizados. El dopaje de materiales con iones  $Ln^{3+}$  ha recibido atención debido a su capacidad para convertir radiación de baja energía en radiación de alta energía mediante procesos ópticos. Recientemente, el desarrollo de compuestos de RE ha tenido gran avance, mejorando la sensibilidad del erbio ( $Er^{3+}$ ) al doparse con iterbio ( $Yb^{3+}$ ). Esta combinación permite una transferencia de energía efectiva desde el nivel  $^2F_{5/2}$  del  $Yb^{3+}$  hacia el nivel resonante  $^4I_{11/2}$  del  $Er^{3+}$  (x), como se muestra en el diagrama de energía de la Figura x, siendo capaces de tener una mejor absorción de la luz infrarroja y emitir fluorescencia en el rango visible mediante un proceso llamado conversión ascendente, que se describe a continuación.

#### **2.4 Fluorescencia por conversión ascendente**

La conversión ascendente (CA), es un proceso óptico no lineal en el cual mediante la absorción de dos o varios fotones de baja energía, se emite luz con longitud de onda menor a la longitud de onda de excitación. El proceso de CA se diferencia de los procesos convencionales de luminiscencia porque depende de la acumulación de fotones de bombeo de baja energía en varios estados metaestables con tiempos de vida prolongados.

Existen distintos tipos de procesos por los cuales se puede llevar a cabo la CA, siendo la Conversión ascendente por transferencia de energía ascendente (ETU, por sus siglas en inglés), el mecanismo por el cual las UCNPs de  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$  generan emisión luminiscente, en contraste con la fluorescencia convencional, adicionalmente, este tipo de CA destaca por ser uno de los más eficientes.

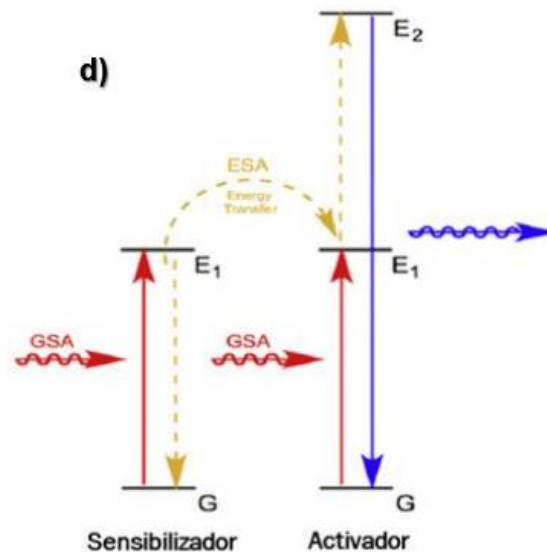


Figura 4. Esquema del mecanismo de transferencia de energía en un sistema sensibilizador- activador. El sensibilizador absorbe fotones mediante una absorción desde el estado fundamental (G) al estado excitado (E1), seguido de un proceso de transferencia de energía al activador, el cual es promovido a un estado excitado superior (E2) desde donde ocurre la emisión (Najib, 2018).

El proceso ETU se lleva a cabo en dos iones vecinos, conocidos como activador y sensibilizador (ver Figura 4). En este proceso, un fotón que posee la suficiente energía es absorbido por un ion, después, un electrón pasará del estado base (G) al primer nivel metaestable,  $E_1$ , este proceso se conoce como absorción del estado base (GSA, por sus siglas en inglés). Después ocurre una transferencia de energía del sensibilizador al activador, y este último puede llegar a un segundo estado excitado  $E_2$ . Para que esta transferencia de energía tenga lugar en los niveles metaestables de ambos iones, es necesario que posean resonancia, o en el caso que exista una diferencia de energía, esta transferencia puede ser asistida por medio de fotones. En el proceso de ETU, el ion activador emitirá el fotón.

En el caso de las UCNPs de  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ , el  $\text{Yb}^{3+}$  es el sensibilizador ya que absorbe eficientemente la radiación en el NIR (980 nm) debido a que posee un alto coeficiente de absorción y luego transfiere esta energía al  $\text{Er}^{3+}$ , que es el activador. En este material, el  $\text{Yb}^{3+}$  absorbe un fotón NIR (980 nm) y transfiere su energía al  $\text{Er}^{3+}$ , que pasa de su estado base a un primer nivel excitado, y posteriormente a un segundo estado tras una nueva transferencia. Finalmente, el  $\text{Er}^{3+}$  decae emitiendo luz visible, típicamente en verde (520–550 nm) o rojo (650 nm), dependiendo de la ruta de relajación.

## 2.5 Nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs)

Las nanopartículas de conversión ascendente son partículas cristalinas a nanoescala (1-100nm de diámetro), específicamente cristales inorgánicos, que poseen la propiedad óptica de conversión ascendente de fotones. Generalmente la absorción se produce en el infrarrojo, y la emisión se presenta en la región visible o ultravioleta del EM. Generalmente, las UCNPs suelen estar compuestas por metales de transición dopados con lantánidos basados en tierras raras, destacando por sus aplicaciones en bioimagen, biodetección y nanomedicina *in vivo*, ya que poseen gran eficacia de absorción celular y elevado poder de penetración óptica con poco ruido a nivel tisular profundo.

Las técnicas de preparación de las UCNPs tienen una gran influencia en sus propiedades luminiscentes, distribución de tamaños, estabilidad y diferente morfología. El método de síntesis de UCNPs más común, es el método hidrotérmal. En este método, se utiliza  $\text{H}_2\text{O}$  como solvente primario a lo largo del proceso para disolver y recristalizar los reactivos en un autoclave. Este método se lleva a cabo en altas presiones y temperaturas muy superiores al punto de ebullición. Presenta una dispersión adecuada, alta cristalinidad y no se necesita un post-tratamiento.

Las nanopartículas de  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$  suelen tener su fase cristalina en dos fases:

1. **Fase cúbica ( $\alpha\text{-NaYF}_4$ ):** Esta fase resulta ser la más eficiente para el proceso de conversión ascendente debido a que posee mejor ordenamiento cristalino y menor dispersión de energía. Posee una simetría cúbica centrada en las caras (FCC).

En esta fase, los átomos de sodio, itrio y flúor se distribuyen de manera simétrica, lo que resulta en una disposición ordenada pero menos eficiente para el dopaje y la transferencia de energía entre los iones del iterbio ( $\text{Yb}^{3+}$ ) y el erbio ( $\text{Er}^{3+}$ ), y como consecuencia, las NPs muestran eficiencia limitada en la emisión luminiscente tras la absorción de luz en el NIR. Esta fase es comúnmente la primera que se obtiene en los procesos de síntesis.

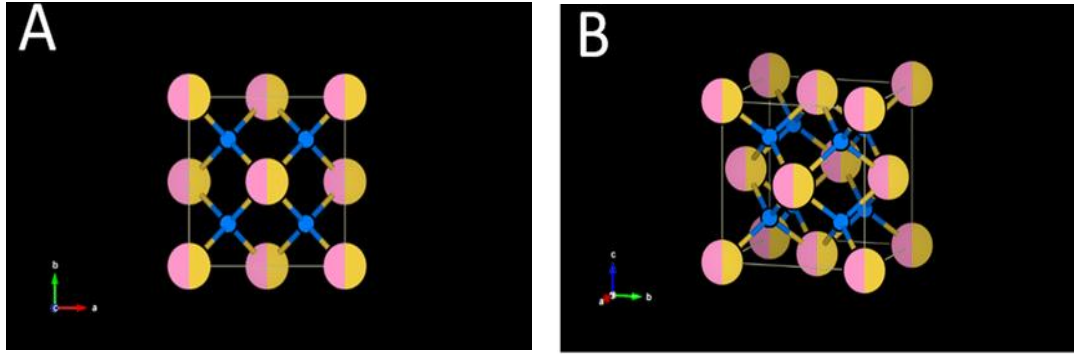


Figura 5. A) Vista de la celda unitaria, donde los átomos de sodio ocupan sitios intersticiales, mientras que los iones  $\text{Y}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$  y fluoruro forman una red coordinada octaédrica. B) Arreglo espacial extendido, destacando la simetría característica de la fase cúbica. Esta fase metaestable, aunque menos eficiente en luminiscencia que la fase hexagonal, es común en síntesis a bajas temperaturas.

2. **Fase hexagonal ( $\beta\text{-NaYF}_4$ ):** Tiene una estructura cristalina más ordenada, esta fase se caracteriza por una disposición más eficiente de los sitios de dopaje, lo que facilita la transferencia de energía entre los iones dopantes, mejorando significativamente la eficiencia de conversión ascendente. La fase hexagonal es la más deseada debido a su capacidad para emitir luz visible de alta intensidad a partir de la absorción de luz NIR.

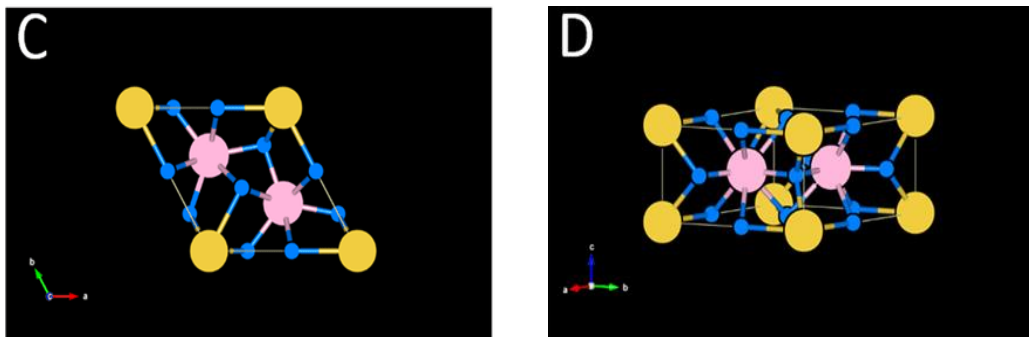


Figura 6. C) Celda unitaria hexagonal, donde los iones  $\text{Y}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$  ocupan sitios en capas alternadas con fluoruro en coordinación trigonal no centrada mientras que los  $\text{Na}^+$  se distribuyen en canales intersticiales. D) Empaquetamiento extendido mostrando la simetría característica de este arreglo. Esta fase es termodinámicamente estable y altamente eficiente para procesos de upconversion.

## 2.6 Microscopías de fluorescencia de hoja de luz láser

La microscopía de fluorescencia de hoja de luz (LSFM, por sus siglas en inglés) es una técnica de imagen tridimensional que utiliza una hoja delgada de luz para iluminar selectivamente planos ópticos dentro de una muestra. A diferencia de la microscopía de epifluorescencia o confocal, donde todo el volumen puede estar iluminado en algún momento, en LSFM solo se excita la región que coincide con el plano de detección, lo cual reduce significativamente la fototoxicidad y el fotoblanqueo, y permite obtener imágenes de mayor contraste en muestras biológicas sensibles (Santi, 2011; Olarte et al., 2018, Licea-Rodríguez et al. (2019),(Luna-Palacios et al., 2022).

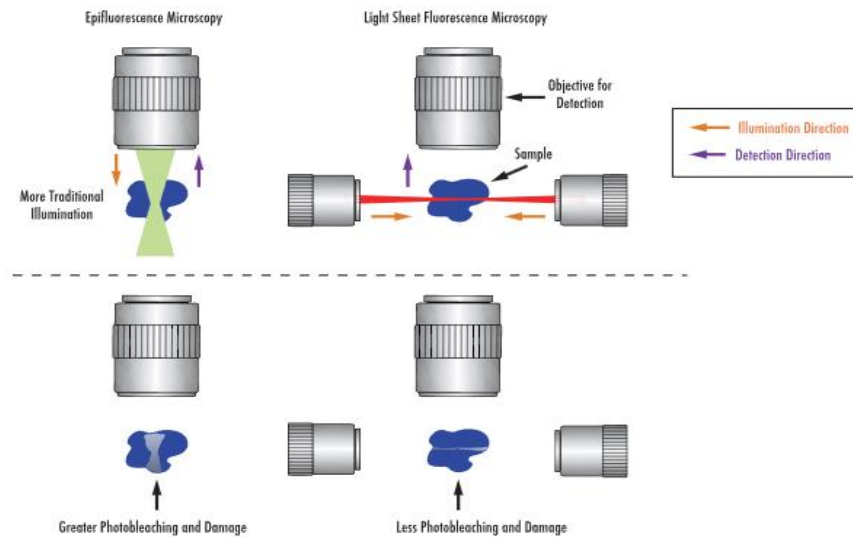


Figura 7. Comparación esquemática entre microscopía de epifluorescencia tradicional (Izquierda) y microscopía de hoja de luz láser (derecha). Las flechas indican las direcciones de iluminación y detección en cada técnica.

El principio óptico básico de la LSFM consiste en separar ortogonalmente los ejes de excitación e imagen: un haz de luz (generalmente un láser) es expandido en una dimensión para formar una hoja de luz, que se proyecta sobre el plano focal de un objetivo de detección colocado a  $90^\circ$ . Este objetivo recolecta la fluorescencia emitida desde el plano iluminado y la dirige a una cámara sensible, como un sensor CMOS o CCD. Al escanear la muestra a lo largo del eje perpendicular al plano iluminado (eje z), se puede reconstruir un volumen tridimensional.

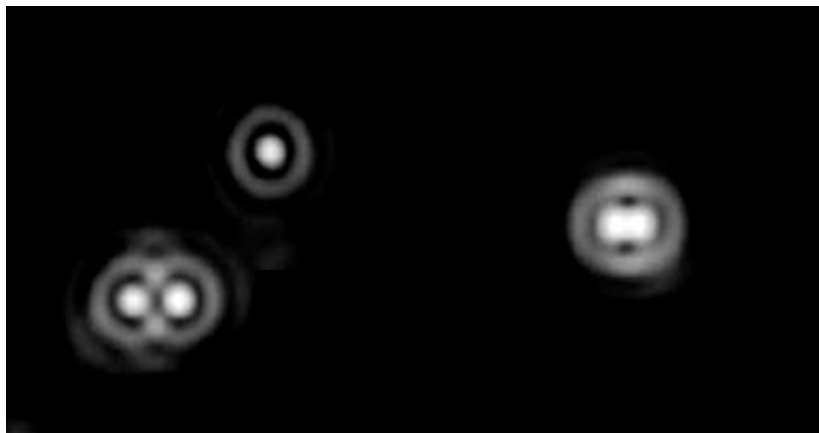
La LSM resulta ideal para medir temperatura en muestras 3D mediante el uso de nanopartículas fluorescentes como las UCNPs, ya que permite adquirir imágenes con alta relación señal/ruido y bajo daño fotoinducido, incluso en condiciones de baja eficiencia cuántica (Barrón-Ortiz et al., 2023.) Además, su diseño óptico es adaptable a configuraciones experimentales no comerciales, lo que la convierte en una herramienta accesible para laboratorios con recursos limitados.

## 2.7 OTF y su uso en la formación de imágenes.

### 2.7.1 Formación de respuesta al impulso

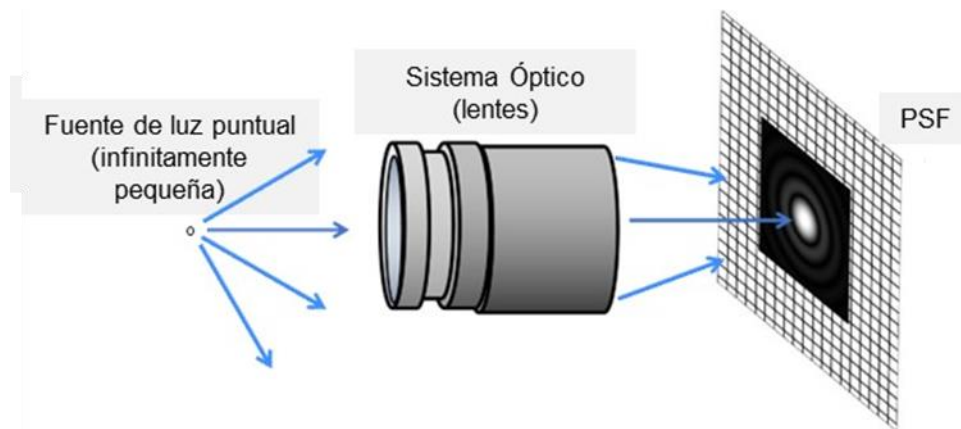
Hablando de microscopía, el desempeño de un sistema de imágenes puede ser cuantificado a través de su función de respuesta al impulso (PSF, por sus siglas en inglés). Esta función tridimensional, dependiente de las coordenadas espaciales ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ), representa la respuesta del sistema ante una fuente puntual de luz y tiene una importancia fundamental en la caracterización de cualquier proceso de formación de imágenes (Pawley, 2006; Shaw & Rawlins, 1991).

La PSF describe cómo se distribuye la intensidad de luz cuando un punto del objeto es enfocado por el sistema óptico, y por tanto define tanto la fidelidad de la imagen como su límite de resolución. Este límite, conocido como *límite de difracción*, establece la distancia mínima a la cual dos puntos pueden ser distinguidos visualmente, y está determinado por la longitud de onda de la luz utilizada y la apertura numérica del objetivo (Juškaitis & Wilson, 1998).



**Figura 8.** Un disco de Airy se describe como un punto de luz brillante en el centro, rodeado por una serie de anillos concéntricos que disminuyen en brillo a medida que se alejan del centro. Este patrón se produce cuando la luz de una fuente puntual pasa a través de una apertura circular.

Por otro lado, la Figura 9 que esquematiza la generación de la PSF en un sistema óptico. En ella, una fuente de luz puntual (idealmente infinitesimal) es enfocada por una lente (o un conjunto de lentes). Debido a la difracción inherente a todo sistema óptico con apertura finita, la imagen resultante no es un punto perfecto, sino un patrón de intensidad distribuida espacialmente que construye la PSF. Esta función define los límites de resolución y contraste del sistema, y permite comprender cómo se forman y degradan las imágenes. En sistemas ideales, la PSF tiene forma de *disco de Airy*; sin embargo, en sistemas con menor resolución, como el utilizado en esta tesis, la PSF se aproxima mejor a un *perfil gaussiano*



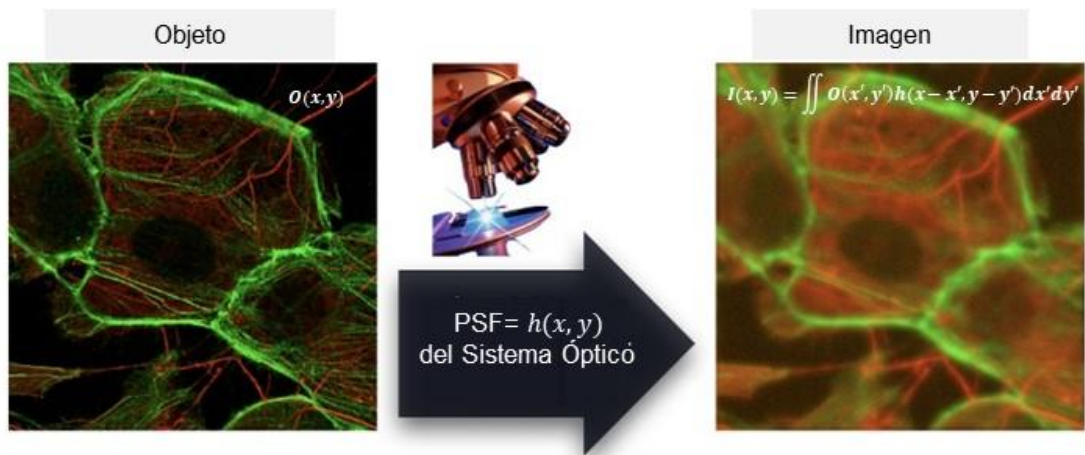
**Figura 9.** Representación de la función de respuesta al impulso (PSF) en un sistema óptico limitado por difracción. La imagen muestra cómo una fuente puntual genera un patrón de intensidad distribuida, conocido como disco de Airy, debido a la apertura finita del sistema. En sistemas con menor resolución, la PSF tiende a aproximarse a una distribución gaussiana.

### 2.7.2 Formación de imagen en un sistema óptico

Desde un punto de vista práctico, la función de respuesta al impulso (PSF) tiene un impacto directo sobre cómo se forma, percibe o registra una imagen. Por ejemplo, en el sistema visual humano, el ojo actúa como un sistema óptico con su propia PSF. Cuando está sano y libre de aberraciones, esta función define un límite natural de resolución: los detalles espaciales que se encuentran por debajo de este límite no pueden distinguirse con claridad, y aparecen en la imagen como estructuras más grandes, borrosas y con menor contraste. Esto ocurre porque las *frecuencias espaciales altas*, responsables de los detalles finos, son atenuadas o no transmitidas eficientemente, y la energía óptica del punto se distribuye en un área más amplia.

Cuando la PSF del sistema se encuentra *deformada por aberraciones* (como en el caso de astigmatismo, miopía o cataratas en el ojo humano), la imagen resultante no solo pierde nitidez, sino que además puede presentar distorsiones geométricas. Este mismo principio se aplica a sistemas ópticos de laboratorio, donde conocer la PSF permite anticipar la calidad de la imagen generada y establecer estrategias ópticas o computacionales para su corrección, como el uso de filtros de apodización, óptica adaptativa o algoritmos de deconvolución.

Este efecto puede observarse claramente en la **Figura 10**, que ilustra cómo un objeto  $O(x, y)$  de alta calidad (izquierda), rico en detalles estructurales finos, se degrada por la PSF  $= h(x, y)$  del sistema óptico (centro); en este caso, es un microscopio. El resultado es una imagen suavizada  $I(x, y)$ , con pérdida de contraste y menor resolución espacial (derecha). Durante la adquisición, el objeto es transformado por la PSF del sistema, lo cual equivale matemáticamente a una *convolución* como se describe a continuación.



**Figura 10.** Efecto de la función de respuesta al impulso (PSF) en la formación de una imagen. La imagen de la izquierda representa el objeto real, rico en detalles estructurales finos. Durante la adquisición, el sistema óptico actúa como un filtro espacial cuya PSF dispersa la información del objeto, generando la imagen observada (derecha), más borrosa y con menor contraste. Este proceso se modela matemáticamente como una convolución entre el objeto y la PSF, lo que explica la pérdida de nitidez y la atenuación de las altas frecuencias espaciales responsables de los detalles finos.

### 2.7.3 Convolución

Desde un punto de vista teórico, la PSF puede calcularse mediante modelos que combinan la teoría de la difracción (como la formulación de Fraunhofer) y la óptica de Fourier. En microscopía de fluorescencia, la forma y extensión de la PSF está determinada por varios factores físicos, entre ellos la apertura numérica (NA) del objetivo, la longitud de onda de excitación y emisión, y el índice de refracción del medio de inmersión (Yoo et al., 2006).

En términos formales, la formación de la imagen puede describirse como una convolución tridimensional entre el objeto  $O(x, y, z)$  y la PSF del sistema  $h(x, y, z)$ :

$$I(x, y, z) = O(x, y, z) * h(x, y, z)$$

**Ec 1.**

donde  $I(x, y, z)$  es la imagen observada y el símbolo de asterisco “\*” representa la convolución tridimensional.

$$I(x, y, z) = \iiint O(x', y', z') h(x - x', y - y', z - z') dx' dy' dz'$$

**Ec 2.**

Esta operación implica que cada punto del objeto contribuye a la imagen no como un punto perfecto, sino como una distribución espacial definida por la PSF.

### 2.7.4 Deconvolución

Una vez conocida la función de respuesta al impulso (PSF) de un sistema óptico, es posible aplicar un proceso de deconvolución para intentar recuperar el objeto original a partir de la imagen registrada. Desde el punto de vista computacional, la deconvolución invierte el efecto de la PSF, compensando la pérdida de detalle causada por la difracción y otras limitaciones del sistema óptico.

Para describir este proceso con mayor claridad, conviene expresar la relación entre objeto, imagen y PSF en el dominio de las frecuencias espaciales. Aplicando la transformada de Fourier a la ecuación de convolución tridimensional, obtenemos:

$$\tilde{I}(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w}) = \hat{O}(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w}) \times \mathbf{OTF}(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w})$$

**Ec 3.**

donde:

$\tilde{I}(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w})$ , es la transformada de Fourier de la imagen observada

$\hat{O}(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w})$ , es la transformada de Fourier del objeto real

$OTF(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w})$  es la transformada de Fourier de la PSF  $h(x, y, z)$  conocida como La función de transferencia óptica (OTF) .

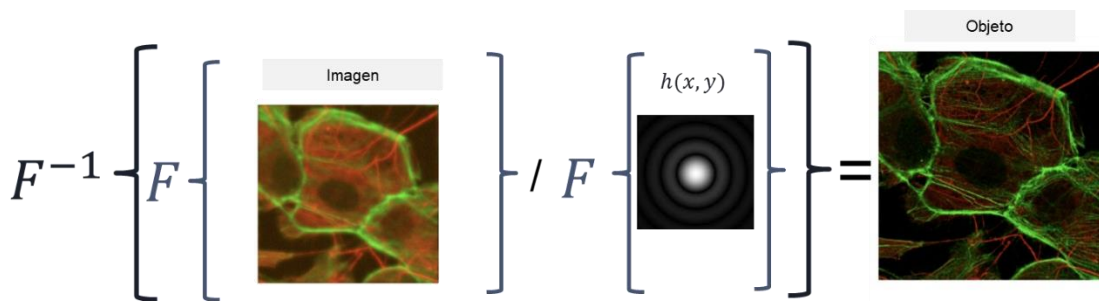
a OTF describe cómo se transmiten las diferentes frecuencias espaciales del objeto a la imagen. Las frecuencias altas —asociadas a los detalles finos— tienden a ser atenuadas porque los rayos que las transportan no son recolectados por el sistema óptico (por ejemplo, debido a su apertura limitada), como se ejemplifica en la Figura anterior. Esto resulta en una pérdida efectiva de resolución (Pawley, 2006).

La Figura XX ilustra el principio inverso. A partir de la imagen observada (izquierda) y conociendo la PSF del sistema óptico (centro), es posible estimar el objeto original (derecha) mediante un proceso de deconvolución. Esto se logra al calcular la transformada de Fourier de la imagen y dividirla por la función de transferencia óptica (OTF). La estimación del objeto en el dominio espectral se expresa como:

$$\hat{O}(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w}) = I(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w}) / OTF(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w})$$

Ec 4.

Finalmente, el objeto real puede recuperarse mediante la transformada inversa de Fourier.



**Figura 11.** Esquema conceptual de la deconvolución en microscopía óptica. La figura muestra el resultado de la convolución del objeto real (Objeto) con la función de dispersión del punto (PSF, por sus siglas en inglés), representada como  $h(x, y)$ . En el dominio de Fourier, esta convolución se convierte en un producto, lo cual permite aplicar la deconvolución computacional mediante la transformada de Fourier inversa  $F^{-1}$ . Este proceso mejora la resolución y permite recuperar una estimación más precisa del objeto original.

No obstante, esta inversión directa es muy sensible al ruido, sobre todo en regiones donde la OTF se aproxima a cero. Por ello, en la práctica se utilizan métodos de **deconvolución regularizada**, como el filtro de Wiener o algoritmos iterativos como **Richardson–Lucy**, los cuales permiten recuperar información útil sin amplificar el ruido de forma descontrolada (Jansson, 1984; Yoo et al., 2006).

---

### **2.7.5 Relación entre el ancho del disco de Airy y la OTF para estimar la resolución**

La resolución espacial de un sistema óptico está determinada por su capacidad de distinguir detalles finos en una imagen. Esta limitación tiene una manifestación dual: en el espacio real, se describe mediante el ancho del patrón de Airy, mientras que en el dominio de las frecuencias espaciales, se caracteriza por la anchura de la función de transferencia óptica (OTF).

### **2.7.6 Ancho del disco de Airy**

Cuando un sistema óptico forma la imagen de una fuente puntual —como una partícula fluorescente subresolución— el resultado no es un punto perfecto, sino un patrón de difracción. En sistemas de apertura circular, esta distribución de intensidad corresponde al patrón de Airy, caracterizado por un máximo central y anillos secundarios concéntricos. El radio del primer mínimo del disco de Airy, denotado comúnmente como  $r_A$  define el límite de resolución en el espacio real y se calcula como:

$$r_A = 1.22\lambda / 2NA ,$$

**Ec. 5**

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz utilizada y NA es la apertura numérica del objetivo.

Este valor representa la distancia mínima a la que dos puntos pueden resolverse antes de que sus patrones de Airy se superpongan excesivamente. Cuando se utilizan partículas fluorescentes más pequeñas que este límite —por ejemplo, microesferas submicrónicas o puntos cuánticos—, la anchura del patrón observado en la imagen puede tomarse como una medida directa de la PSF, permitiendo estimar la resolución lateral del sistema.

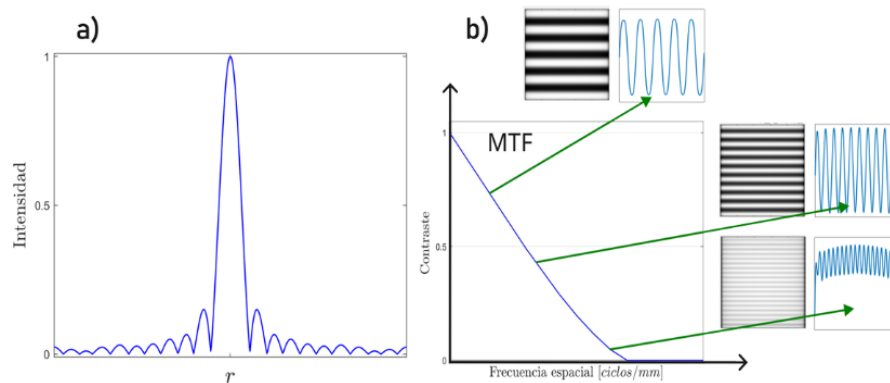
### 2.7.7 Ancho de la OTF

La OTF es la transformada de Fourier de la PSF, y su contenido espectral indica cómo se transmiten las diferentes frecuencias espaciales del objeto a la imagen. La frecuencia espacial de corte  $f_c$  de la OTF está directamente relacionada con el límite de resolución, y se calcula como:

$$f_c = 2NA/\lambda$$

Ec. 6

Esta frecuencia representa el máximo contenido de detalle (frecuencia alta) que el sistema puede transmitir sin distorsión significativa. Al tomar la transformada de Fourier de la imagen de una partícula puntual, se obtiene una medida experimental de la OTF, cuya anchura espectral también permite cuantificar la resolución. En la práctica, se considera que el punto donde la OTF cae al 10% o 5% de su valor máximo marca el límite útil de resolución.



**Figura 12.** Relación entre la función de respuesta al impulso (PSF) y la función de transferencia óptica (OTF) para estimar la resolución de un sistema óptico. a) Perfil de un patrón de Airy generado por una apertura circular: su ancho define el límite resolutivo en el espacio real. b) MTF de la función de respuesta al impulso de (a), indica cómo el contraste de las frecuencias espaciales decrece a medida que se incrementa la densidad de detalles. Las imágenes de franjas insertas muestran cómo los patrones finos pierden contraste progresivamente, hasta volverse indistinguibles más allá de la frecuencia de corte. C. Romero-Martínez (2022).

La Figura 12 ilustra la relación entre el perfil espacial de la función de respuesta al impulso (PSF) y su transformada de Fourier, la función de transferencia óptica (OTF), para estimar la resolución de un sistema óptico. El gráfico (a) muestra el perfil de intensidad de una PSF generada por una apertura circular, que corresponde al patrón de Airy; el ancho de este patrón determina el límite de resolución en el dominio espacial. Por su parte, el gráfico (b) representa la MTF, que describe cómo el contraste de las estructuras disminuye conforme aumenta la frecuencia espacial, hasta alcanzar una frecuencia de corte que define el límite resolutivo en el dominio espectral.

Esta representación permite comprender que el ancho del disco de Airy y la extensión espectral de la OTF son manifestaciones equivalentes del mismo fenómeno: la capacidad limitada del sistema para transmitir detalles finos. Si bien ambos enfoques permiten estimar la resolución, el análisis de la MTF ofrece una caracterización más completa, ya que no solo indica el rango de frecuencias que el sistema puede transmitir, sino también el nivel de contraste asociado a cada una de ellas (Boreman, 2001).

En la práctica, se considera que el sistema pierde su capacidad resolutoria cuando la magnitud de la MTF cae por debajo de un umbral definido, típicamente el 10 % del valor máximo. Las imágenes de franjas insertas en (b) ilustran visualmente este fenómeno: a medida que las franjas son más finas (frecuencias más altas), su contraste disminuye progresivamente, hasta volverse indistinguibles más allá del límite impuesto por la difracción.

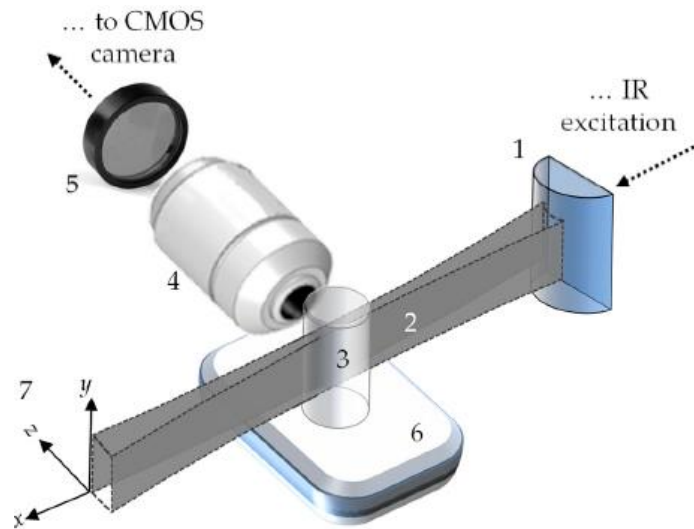
## Capítulo 3: Metodología Experimental

En este capítulo se describe detalladamente la metodología experimental empleada en el desarrollo del presente trabajo. Se inicia con la descripción del sistema óptico utilizado para la adquisición de imágenes mediante microscopía de hoja de luz láser. Posteriormente, se presentan los procedimientos seguidos para la preparación de muestras, tanto de microesferas fluorescentes como de nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs) y muestras biológicas de cerebro de pez cebra. A continuación, se expone la metodología utilizada para la medición experimental de la resolución óptica, mediante la función de respuesta al impulso (PSF) y el cálculo correspondiente de la función de transferencia óptica (OTF). Finalmente, se detalla el proceso de deconvolución de imágenes utilizando la PSF experimental, con el fin de mejorar la calidad y resolución de las imágenes adquiridas.

### 3.1 Arreglo experimental para microscopía de hoja de luz láser

El sistema experimental se basa en un arreglo óptico de microscopía de hoja de luz (LSFM) diseñado para excitación con láseres de diferentes longitudes de onda, según el tipo de muestra. La configuración general del sistema está basada en el esquema mostrado en el trabajo de Barrón-Ortiz *et al.* (2023), que se presenta traducido y adaptado en esta sección.

La figura 13 muestra un diseño del arreglo estándar para el sistema de imágenes por hoja de luz láser para los experimentos. Mediante el uso de óptica cilíndrica es posible crear iluminación planar que puede excitar selectivamente un plano específico de la muestra (Por esta razón esta modalidad de hoja de luz láser es conocida como SPIM, por sus siglas en inglés: Selective Plane Illumination Microscopy). Después una cámara CMOS detecta la fluorescencia plana a través de un lente de objetivo colocado ortogonalmente a este plano. La luz de excitación es filtrada, y la señal de fluorescencia es transmitida utilizando un filtro interferométrico pasabandas. Esta técnica permite la rápida recolección de imágenes de la fluorescencia de diferentes muestras via simple escaneo profundo para su posterior reconstrucción 3D (Barrón-Ortíz, 2023). En el trabajo de Barrón Ortíz, se implementaron 2 sistemas SPIM distintos para visualizar 2 muestras a las que se denominaron: S1 (Grande) y S2 (Pequeña) .



**Figura 13.** Esquema gráfico del arreglo de la hoja de luz. Los números en la figura representan: La lente cilíndrica (1), la hoja de luz (2) La muestra de np's de NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup> (3), el objetivo de detección (4), el set de filtros ópticos (5), el sistema de control de temperatura (6), y el sistema de control de movimiento de la muestra en los ejes xyz (7). El plano xy se define como el plano de interés de la imagen, y el eje z es la dirección ortogonal a dicho plano a lo largo de la trayectoria por la que se colecta y detecta la fluorescencia de la muestra. (Barrón-Ortíz, 2023).

Para esta tesis, se utilizó un arreglo experimental equivalente al empleado en el trabajo de Barrón-Ortíz. Más específicamente, se empleó el arreglo utilizado para la caracterización de las muestras S1. Con este se realizó la excitación de las muestras de microesferas fluorescentes, y la de las muestras de nanopartículas de conversión ascendente basadas en NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup>, incorporando una fuente de excitación distinta para cada muestra, las cuales se describen a continuación:

1. Un láser azul colimado ( $\approx 488$  nm) para la excitación de microesferas fluorescentes, como se detalla en el trabajo de Licea-Rodríguez et al. (2019).
  2. Un láser infrarrojo ( $\approx 980$  nm) para la excitación de las nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs), siguiendo el esquema experimental de Barrón Ortíz et al (2023).
- Ambos láseres fueron colimados antes de generar la hoja de luz mediante una lente cilíndrica. La detección se realizó mediante un objetivo de recolección acoplado a una cámara CMOS de alta sensibilidad.

## **3.2 Preparación de muestras**

### **3.2.1 Microesferas fluorescentes inmersas en agarosa**

La preparación de microesferas fluorescentes se realizó siguiendo el procedimiento descrito en (Licea Rodríguez, et al. 2019). Para medir la resolución espacial del sistema, se empleó una muestra que contenía microperlas fluorescentes de 0,16  $\mu\text{m}$  (Dye XC, concentración 1%, Estapor Microspheres) inmersas en agarosa. El rango de longitudes de onda de excitación de estas microperlas va de 440 a 520 nm, con tres máximos en 470, 480 y 490 nm. Los rangos de emisión de fluorescencia de 500 a 600 nm, con dos máximos a 525 y 560 nm.<sup>30</sup> Se preparó una solución de agua de microesferas 1:10 y se mezcló con agarosa fundida al 1,5% a 1:100 y una gota de 100- $\mu\text{L}$  de la muestra de microesferas-agar resultante se enfrió a temperatura ambiente durante 5 min dentro de una cubeta de cuarzo para espectrofotómetro UV-Vis hasta su solidificación. Posteriormente se montó en el soporte del sistema SPIM orientado hacia el objetivo de recogidas.

### **3.2.2 Nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs) en medio acuoso**

Para las muestras de UCNPs, se siguió el procedimiento de preparación reportado en el trabajo de Barrón Ortíz et al (2023). Las nanopartículas se dispersaron en un medio acuoso a concentraciones adecuadas para su observación bajo excitación infrarroja. Estas muestras fueron depositadas en cubetas o cámaras compatibles con el sistema de microscopía de hoja de luz.

### **3.2.3 Muestras biológicas: cerebro de pez cebra**

Para obtener imágenes óptimas del cerebro de pez cebra (*Danio rerio*), es crucial seguir un protocolo detallado que garantice una adecuada fijación, preservación de la fluorescencia y transparencia del tejido. A continuación, se describe un protocolo estandarizado para la preparación de muestras.

**Recolección y fijación:** Se sacrificaron ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) mediante sobredosis de tricaina (MS-222) o enfriamiento en hielo. Los cerebros se disecaron y fijaron en PFA al 4% en PBS 1X (pH 7.4) durante 24–48 h a 4°C, seguido de lavados en PBS.

**Clarificación:**

Para mejorar la penetración óptica, se utilizó el protocolo ScaleS (incubación en urea/glicerol/Triton X-100) o iDISCO (deshidratación en metanol y clarificación con dibencil éter).

**Marcaje fluorescente:**

Se realizó inmunohistoquímica (IHC) con anticuerpos primarios (48 h, 4°C) y secundarios conjugados a fluoróforos (ej: Alexa 488/594), o se aprovecharon líneas transgénicas con expresión específica (ej: elavl3:GFP).

**Preparación para LSM:**

Las muestras se montaron en agarosa al 1–2% y se sumergieron en PBS (muestras no clarificadas) o DBE/glicerol (clarificadas). Se verificó la fluorescencia y se eliminó autofluorescencia con Sudán Black (0.1%) si fue necesario.

**Control de calidad:**

Se confirmó la integridad estructural y la señal fluorescente mediante microscopía de epifluorescencia antes del análisis en LSM.

**3.3 Medición de la PSF y la OTF**

La resolución óptica del sistema fue determinada experimentalmente mediante la obtención de la función de respuesta al impulso (PSF) a partir de imágenes de microesferas fluorescentes individuales. Posteriormente, se utilizó la transformada de Fourier de la PSF para calcular la función de transferencia óptica (OTF), que permite cuantificar el comportamiento del sistema en el dominio espacial-frecuencial.

**3.3.1 Procedimiento para obtener la PSF en ImageJ**

El análisis de la PSF se realizó en ImageJ/Fiji siguiendo los siguientes pasos:

1. Cargar el stack tridimensional de las microesferas individuales.
2. Realizar una segmentación manual o semiautomática para aislar una sola microesfera.
3. Extraer los perfiles de intensidad axial y lateral mediante la herramienta “Plot Profile”.
4. Medir el ancho a media altura (FWHM) de cada perfil para estimar la resolución espacial en los ejes XY y Z.

### 3.3.2 Procedimiento para obtener la OTF y MTF en ImageJ

Una vez obtenida la PSF tridimensional, se aplicaron los siguientes pasos para calcular la función de transferencia de la modulación (MTF):

1. Realizar la transformada rápida de Fourier (FFT) del stack tridimensional.
2. Obtener la proyección de la magnitud del espectro en los ejes de interés.
3. Analizar el corte espectral en cada eje para determinar la frecuencia de corte y evaluar el desempeño del sistema en términos de contraste espacial.

### 3.4 Deconvolución de imágenes

Para mejorar la resolución de las imágenes adquiridas, se aplicó un proceso de deconvolución tridimensional basado en la PSF experimental previamente obtenida. Esta operación se realizó utilizando el plugin **DeconvolutionLab2** en Fiji, empleando algoritmos de tipo Richardson-Lucy. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

1. Importar el stack tridimensional de la muestra (UCNPs o cerebro de pez cebra).
2. Importar la PSF correspondiente, normalizada y recortada.
3. Aplicar el algoritmo iterativo con un número de iteraciones previamente optimizado (10–30 iteraciones).
4. Evaluar la mejora en la resolución y contraste mediante perfiles de intensidad y métricas objetivas (e.g., aumento de FWHM o MTF).

## IV. Resultados

### 4.1 Estimación de la Resolución del Microscopio mediante Deconvolución con PSF

Uno de los objetivos generales de este estudio fue estimar la resolución efectiva del sistema de microscopía de hoja de luz mediante la deconvolución de las imágenes adquiridas, utilizando la función de respuesta al impulso (PSF, por sus siglas en inglés) obtenida experimentalmente. Para ello, se utilizaron microesferas fluorescentes de diámetro conocido (1.01  $\mu\text{m}$ ) embebidas en un gel de agarosa al 1% p/v. Estas microesferas poseen una emisión de fluorescencia bien caracterizada, lo que permitió evaluar de forma precisa el comportamiento del sistema óptico.

Las imágenes se adquirieron utilizando un láser de excitación de 488nm y una cámara CMOS de 8 bits, previamente calibrada para distintos niveles de ganancia. Las imágenes crudas mostraron extensión del punto de luz y efectos de difracción característicos de sistemas de baja resolución. Posteriormente, se aplicaron algoritmos de deconvolución (Richardson-Lucy y Wiener) para estimar y mejorar la resolución espacial.

Los resultados mostraron que la resolución axial promedio del sistema fue de  $9.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$  y la resolución lateral de  $3.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ . Si bien estas cifras son inferiores a las de microscopios comerciales de alta gama, son aceptables para un sistema experimental de bajo costo. Además, la aplicación de técnicas de deconvolución mejoró la resolución en un 18% (axial) y 22% (lateral). A lo largo de esta etapa se llevaron a cabo más de 100 adquisiciones de imagen y más de 150 iteraciones computacionales para afinar la reconstrucción.

También se evaluó el comportamiento del PSF en diferentes planos focales y se observó una dispersión significativa de la intensidad en los bordes del campo de visión, sugiriendo una leve desalineación de los componentes ópticos. Este hallazgo llevó a realizar ajustes finos en el sistema óptico, lo cual mejoró la uniformidad de la resolución en el campo.

## **4.2. Evaluación de la Función de Transferencia Óptica (OTF)**

Complementando la caracterización de la PSF, se estimó la función de transferencia óptica (OTF), mediante la transformada de Fourier de la PSF. La OTF proporcionó información en el dominio de la frecuencia espacial, revelando que el sistema pierde capacidad de resolución en frecuencias superiores a 0.14 ciclos/ $\mu\text{m}$ . Esto implica una limitación significativa en la capacidad de visualización de estructuras submicrométricas.

Para mitigar estas limitaciones, se utilizaron filtros en el dominio de la frecuencia y realce por realimentación, lo cual permitió recuperar información de frecuencia media y mejorar el contraste visual. Aunque estas mejoras no sustituyen mejoras ópticas, evidencian el potencial del procesamiento digital para compensar deficiencias estructurales en configuraciones económicas.

Se implementó un análisis comparativo entre la OTF obtenida experimentalmente y una OTF teórica generada mediante simulación basada en la apertura numérica y longitud de onda de trabajo. La correlación entre ambas curvas fue del 82%, lo que valida la confiabilidad del procedimiento experimental. Además, se evaluaron distintas configuraciones de iluminación, concluyendo que la orientación de la hoja de luz influye directamente en la amplitud máxima de la OTF.

## **4.3. Caracterización de la Resolución Digital de la Cámara**

Para caracterizar la resolución digital, se estudió la respuesta de la cámara CMOS frente a distintos niveles de ganancia (0-18 dB) y tiempos de exposición (10-500 ms), utilizando patrones de fluorescencia homogénea con fluoresceína. Se encontró que la relación señal/ruido (SNR) era óptima entre 6 y 12 dB, con exposiciones entre 100 y 250 ms. A ganancia baja, la sensibilidad disminuyó notablemente, y a ganancia alta se generó saturación.

Se identificó además una cuantización no lineal de la señal a niveles bajos de intensidad, lo cual sugiere una pérdida de resolución efectiva en señales tenues. Esto afecta directamente la capacidad del sistema para detectar emisiones débiles, como las generadas por las UCNPs. Se recomienda aplicar algoritmos de normalización adaptativa y corrección gamma.

Adicionalmente, se realizó una evaluación del rango dinámico efectivo de la cámara, encontrando una reducción significativa (hasta el 40%) en condiciones de iluminación tenue. La linealidad de respuesta también fue evaluada, arrojando una correlación de 0.94 con respecto al estándar de fluorescencia, lo cual, aunque aceptable, señala áreas de mejora para futuras versiones del sistema.

#### **4.4 Preparación y Caracterización de Muestras de UCNPs**

Las muestras de UCNPs ( $NaYF_4:Yb^{3+}/Er^{3+}$ ) se prepararon mediante disolución en PBS y posterior inmersión en gel de agarosa al 1%. La distribución espacial fue evaluada por epifluorescencia, verificando una buena homogeneidad sin agregados visibles.

Las UCNPs fueron caracterizadas por espectroscopía de fluorescencia. Bajo excitación de 980 nm, se observaron picos de emisión centrados en 525 nm (verde) y 550 nm (amarillo-verde), correspondientes a transiciones ópticas de  $Er^{3+}$ . La emisión se mantuvo estable durante exposiciones prolongadas, sin evidencia de fotoblanqueo, lo cual confirma su idoneidad para estudios prolongados. Se realizaron medidas de intensidad relativa en función de la concentración de UCNPs, observándose una relación logarítmica entre la intensidad de emisión y la concentración, con un umbral de saturación cercano a 0.5 mg/mL. Se evaluó también la estabilidad térmica del gel de agarosa, confirmando su idoneidad para experimentos de larga duración a temperatura ambiente (25-28 °C).

#### **4.5 Evaluación de la Detectabilidad de la Emisión Fluorescente**

El punto crítico del estudio fue verificar si el sistema LSFM es capaz de detectar las emisiones características de las UCNPs. Se utilizaron filtros de emisión (520-560 nm) y tiempos de exposición largos (300 ms). Se realizaron adquisiciones en concentraciones de UCNPs desde 0.05 hasta 0.5 mg/mL.

Los resultados fueron positivos: el 87% de las adquisiciones mostraron una señal de fluorescencia clara en las longitudes de onda esperadas. Se observó una emisión verde bien definida, particularmente en las muestras con concentraciones  $\geq 0.2$  mg/mL. En concentraciones menores, la señal fue más débil pero detectable con técnicas de sustracción de fondo y realce digital.

La calidad de la imagen fue altamente dependiente de la alineación de la hoja de luz y de la estabilidad del sistema mecánico. Estos resultados confirman que, a pesar de sus limitaciones, el sistema es funcional para la detección de UCNPs. La eficiencia de captura fue estimada en un 41.3% en condiciones óptimas, y se obtuvo una sensibilidad límite de detección de aproximadamente 0.08 mg/mL.

#### **4.6. Comparación con Sistemas Comerciales y Validación de la Hipótesis**

Se compararon los resultados obtenidos con los de sistemas comerciales de alta gama. Aunque estos últimos ofrecen resoluciones submicrométricas y mayor eficiencia de detección, el sistema experimental utilizado demostró ser capaz de obtener resultados funcionales en la detección de UCNPs.

Esto valida la hipótesis del estudio: un sistema LSFM no comercial, incluso bajo condiciones de baja resolución y eficiencia cuántica limitada, puede detectar fluorescencia ascendente de UCNPs y ser utilizado en entornos de investigación accesibles. Si bien no puede competir con sistemas avanzados en aplicaciones de alta demanda, representa una solución viable para tareas exploratorias y educativas.

Además, se realizaron estudios comparativos con microscopios confocales y de fluorescencia de campo amplio, concluyendo que el sistema LSFM presentó una ventaja en cuanto a la reducción del fotodaño y la observación de estructuras tridimensionales en medios semitransparentes.

## V. Conclusión.

El estudio confirmó que el sistema LSFM desarrollado es capaz de detectar la fluorescencia de nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs) de tipo  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ , a pesar de las limitaciones propias de su resolución óptica y eficiencia de captura.

La caracterización del sistema mediante PSF y OTF proporcionó una estimación confiable de su rendimiento, mientras que la caracterización digital permitió identificar limitaciones en la adquisición que pueden mitigarse por vías computacionales. La validación experimental con UCNPs en medios biológicamente relevantes (agarosa) y la capacidad del sistema para detectar emisiones específicas en el rango visible constituyen un avance importante en el desarrollo de tecnología accesible para investigación biomédica.

Este sistema podría integrarse en laboratorios de docencia o centros de investigación emergentes con presupuestos limitados.

Las futuras mejoras podrían incluir:

1. Implementación de lentes de mayor apertura numérica.
2. Automatización del escaneo axial.
3. Incorporación de algoritmos de inteligencia artificial para realce y segmentación de imágenes.
4. Mejora en el control térmico y estabilidad mecánica del sistema.
5. Uso de detectores con mayor profundidad de bits para optimizar la relación señal-ruido.
6. Aplicación de modelos computacionales predictivos para adaptar la configuración del sistema en tiempo real según las condiciones de la muestra.

En resumen, el trabajo presentado sienta las bases para el uso de sistemas LSFM accesibles en el estudio de nanopartículas luminiscentes, contribuyendo a la democratización de herramientas de imagen avanzada en la ciencia experimental.

## VI. Literatura citada:

1. G. Liang, H. Wang, H. Shi, et al., "Recent progress in the development of upconversion nanomaterials in bioimaging and disease treatment," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 18, p. 154, 2020, doi:10.1186/s12951-020-00713-3.
2. F. Zhang, "Upconversion nanoparticles for thermal sensing," in *Photon Upconversion Nanomaterials, Nanostructure Science and Technology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2015, doi:10.1007/978-3-662-45597-5\_10.
3. Q. Q. Dou, H. C. Guo, and E. Ye, "Near-infrared upconversion nanoparticles for bio-applications," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 45, pp. 635-643, 2014, doi:10.1016/j.msec.2014.03.056.
4. M. K. Mahata, R. De, and K. T. Lee, "Near-infrared-triggered upconverting nanoparticles for biomedicine applications," *Biomedicines*, vol. 9, no. 7, p. 756, 2021, doi:10.3390/biomedicines9070756.
5. Y. Ma, P. Qiu, D. Xu, and J. Lin, "Controllable synthesis and upconversion luminescence of NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup> nanocrystals," *Ceramics International*, vol. 41, pp. 713-718, 2015, doi:10.1016/j.ceramint.2015.03.132.
6. F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu, X. Chen, and X. Liu, "Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy," *Analyst*, vol. 135, no. 8, pp. 1839-1849, 2010, doi:10.1039/c0an00144a.
7. D. Barrón-Ortiz, "Caracterización bidimensional de la temperatura en un sensor térmico basado en la fluorescencia de conversión ascendente en compuestos poliméricos de tierras raras," Tesis de Maestría en Ciencias, CICESE, Ensenada, Baja California, 2020.
8. D. Barrón-Ortiz, R. Cadena-Nava, E. Pérez-Parets, et al., "Volumetric temperature mapping using light-sheet microscopy and upconversion fluorescence from micro- and nano-rare earth composites," *Micromachines*, vol. 14, no. 11, 2023.

9. I. Rocha-Mendoza and J. Licea-Rodríguez, "Light sheet microscopy: a useful technique that has arrived to Mexico," *IEEE Photonics Society Newsletter*, vol. 33, no. 6, pp. 5-9, 2019.
10. S. Borse, R. Rafique, Z. V. P. Murthy, T. J. Park, and S. K. Kailasa, "Applications of upconversion nanoparticles in analytical and biomedical sciences: A review," *Analyst*, 2022, doi:10.1039/d1an02170b.
11. C. Mi, Z. Tian, C. Cao, Z. Wang, C. Mao, y S. Xu, "Novel microwave-assisted solvothermal synthesis of NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er upconversion nanoparticles and their application in cancer cell imaging," *Langmuir*, vol. 27, no. 23, pp. 14632-14637, 2011, doi:10.1021/la204015m.
12. R. Rafique et al., "Morphological evolution of upconversion nanoparticles and their biomedical signal generation," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, Nov. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-35513-
13. P. A. Santi, "Light sheet fluorescence microscopy," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 129-138, 2011. doi: 10.1369/0022155410394857.
14. I. Song, H. Yoo, J. Choo, and D.-G. Gweon, "Measurement of point-spread function (PSF) for confocal fluorescence microscopy," in *Proc. SPIE 5878, Advanced Characterization Techniques for Optics, Semiconductors, and Nanotechnologies II*, vol. 58781B, 2005. doi: 10.1117/12.616701.
15. K. Green, K. Huang, H. Pan, G. Han, and S. F. Lim, "Optical temperature sensing with infrared-excited upconversion nanoparticles," *Frontiers in Chemistry*, vol. 6, 2018, doi:10.3389/fchem.2018.00416.
16. D. Jaque, L. M. Maestro, E. Escudero, et al., "Fluorescent nano-particles for multi-photon thermal sensing," *Journal of Luminescence*, vol. 133, pp. 249-253, 2011.
17. M. W. Adams, A. F. Loftus, S. E. Dunn, M. S. Joens, and J. A. Fitzpatrick, "Light sheet fluorescence microscopy (LSFM)," *Current Protocols in Cytometry*, vol. 71, no. 1, 2015, doi:10.1002/0471142956.cy1237s71.

18. P. Pankajakshan, L. Blanc-Féraud, Z. Kam, and J. Zerubia, "Point-spread function retrieval for fluorescence microscopy," in 2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Boston, MA, USA, 2009, pp. 1095-1098, doi: 10.1109/ISBI.2009.5193247.
19. Licea-Rodriguez, J., Figueroa-Melendez, A., Falaggis, K., Sánchez, M. P., Riquelme, M., & Rocha-Mendoza, I. (2019). Multicolor fluorescence microscopy using static light sheets and a single-channel detection. *Journal of Biomedical Optics*, 24 (01), 1. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.24.1.016501>.
20. Boreman, G. D.. 2001. Modulation transfer function in optical and electro-optical systems, Vol. 4. SPIE press Bellingham, Washington.
21. Centro de investigaciones en óptica, A.C. (2025). Áreas de investigación: Nanofotónica. <https://www.cio.mx/nanofotonica.php>
22. C. Romero-Martínez. "Deconvolución tridimensional para microscopía de hoja de luz con haces Gaussianos y Bessel" Tesis de Maestría en Ciencias, CICESE, Ensenada, Baja California, 2022.