

OBTENCIÓN DE IMÁGENES *IN VITRO* POR FLUORESCENCIA
USANDO PUNTOS DE CARBONO COMO AGENTES DE
CONTRASTE MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL CYTATION 3

María M. Márquez Sosa

Trabajo Dirigido

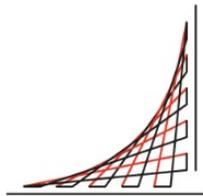
Tutores

Diana C. Rodríguez Burbano, PhD.

Omar E. Olarte Pataquiva, PhD.



Universidad del
Rosario



ESCUELA
COLOMBIANA
DE INGENIERÍA
JULIO GARAVITO

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2021

Agradecimientos

Agradezco a Dios y la Virgen de Guadalupe por guiarme en todo momento de mi vida.

A mi familia, que siempre me apoya y acompaña, en especial, a mis padres Jenny y Agustín... *“Nacimos del mismo árbol y aunque nuestras ramas crezcan en diferente dirección, siempre nos unirán nuestras raíces”*.

A mis amigos, fueron grandes momentos con ustedes, los sueños se cumplen y esta, es nuestra mayor muestra de ello.

Al equipo que tuve en el desarrollo de esta investigación por toda su colaboración, a los profesores Omar Olarte y Álvaro Orjuela, a mis compañeros y a los técnicos, así como también al laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario.

A mi tutora, Diana Rodríguez y al profesor Alejandro Ondo; los aprendizajes, enseñanzas, consejos, ideas y momentos junto a ustedes los llevaré siempre conmigo, ¡Gracias!

A la profesora Sandra Cancino: todo lo que podría decirle lo resumiré en dos palabras, ¡Gracias totales!

Por último, les quiero agradecer a todos los profesores de la Universidad del Rosario y la Universidad Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito por sus enseñanzas y cariño a lo largo de mi vida universitaria.

“El aprendizaje es un proceso que sólo tiene sentido ante situaciones de cambio. Por eso, aprender es en parte saber adaptarse a esas novedades”.

Jean Piaget

Resumen

Durante los últimos años, las tecnologías de imágenes médicas se han desarrollado e implementado como herramientas de gran importancia para uso diagnóstico y terapéutico en el área biomédica. Al centrarnos en la región visible del espectro electromagnético se encuentran las imágenes por fluorescencia, las cuales abarcan una parte muy importante de la investigación clínica, en especial, en el trabajo celular por el uso de fluoróforos endógenos y exógenos como agentes de contraste. Entre los fluoróforos exógenos se encuentran los puntos de carbono, los cuales exhiben excelentes propiedades físico-químicas y ópticas utilizadas ampliamente en trabajo celular. En la gama de equipos que pueden ser utilizados en esta técnica se encuentran los lectores multimodales, calibrados primordialmente para la identificación y uso con fluóforos comerciales, más no para nanomaterial particulado, tal es el caso del equipo Biotek, Cytation 3, el cual actualmente es utilizado a diario en la Universidad del Rosario en trabajo celular. En la presente investigación se tuvo como objetivo obtener imágenes in vitro por fluorescencia utilizando puntos de carbono como agentes de contraste y así sentar bases para futuros estudios usando unidades más complejas. La metodología propuesta abarca la síntesis y caracterización de puntos de carbono, fijación en agarosa para evitar su movimiento, obtención de las imágenes en el Cytation y por último el procesamiento de dichas imágenes. Teniendo como resultado principal imágenes variando la concentración de puntos de carbono desde $1 \mu\text{g/ml}$ hasta $500 \mu\text{g/ml}$ y las condiciones para la captura de las imágenes en el Software Gen5; incluyendo los parámetros de longitud focal, intensidad del LED, tiempo de integración y ganancia de la cámara.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del Problema	1
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Objetivo General	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3. Organización del documento	4
2. ESTADO DEL ARTE	5
2.1. Imágenes científicas	5
2.1.1. Formación de Imágenes	5
2.1.2. Imágenes médicas	7
2.1.3. Imágenes multimodales	9
2.2. Fluorescencia	9
2.2.1. Imágenes por Fluorescencia Óptica	10
2.2.2. Microscopía de Fluorescencia	10
2.2.3. Fluoróforos	11
2.3. Puntos de Carbono	12
2.3.1. Métodos de síntesis de puntos de carbono	12
2.3.2. Utilización de Puntos de Carbono como agentes de contraste	13
2.4. Lectores de placas multimodales	13
2.4.1. Cytation	14
2.5. Procesamiento de Imágenes Digitales	16
2.5.1. Histograma de una Imagen	17
2.5.2. Operadores Morfológicos	18
2.5.2.1. Erosión	18
2.5.2.2. Dilatación	18
2.5.2.3. Apertura y Cierre	19
2.5.2.4. Filtrado morfológico de sombrero superior	20
3. METODOLOGÍA	21
3.1. Síntesis de puntos de carbono	21
3.1.1. Síntesis de puntos de carbono por reacción de microondas	22
3.1.2. Purificación de puntos de carbono	22

3.2.	Caracterización de las propiedades ópticas de los puntos de carbono	23
3.2.1.	Espectrofotometría UV-Vis para la determinación de las propiedades ópticas de los puntos de carbono	23
3.2.1.1.	Filtrado de los espectros de absorción	24
3.3.	Fijación de puntos de carbono en agarosa	24
3.4.	Obtención de imágenes <i>in vitro</i> por fluorescencia	25
3.5.	Procesamiento de imágenes	27
3.5.1.	Corrección de iluminación no uniforme	27
3.5.2.	Análisis estadístico de las imágenes obtenidas	27
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1.	Síntesis de puntos de carbono	28
4.2.	Caracterización de las propiedades ópticas de los puntos de carbono	29
4.2.1.	Puntos de carbono "verdes"	29
4.2.2.	Puntos de carbono "azules"	30
4.3.	Obtención y procesamiento de imágenes <i>in vitro</i> por fluorescencia	31
4.3.1.	Estándares de Referencia	31
4.3.2.	Imágenes por fluorescencia de puntos de carbono	31
4.3.3.	Imágenes por fluorescencia de células	32
5.	CONCLUSIONES	37
6.	RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS	38
6.1.	Recomendaciones	38
6.2.	Trabajos futuros	38
	BIBLIOGRAFÍA	39
	ANEXOS	44

Índice de figuras

2.1. Elementos básicos en la formación de imágenes [35]	5
2.2. Representación esquemática de las ondas electromagnéticas [35]	6
2.3. Espectro electromagnético [35]	7
2.4. Diagrama de Jablonski [4]	9
2.5. Esquema básico del microscopio de fluorescencia [6]	10
2.6. Ventana óptica. Coeficiente de absorción de los componentes más relevantes de un tejido biológico típico [11]	11
2.7. Métodos de síntesis de nanopartículas [57]	12
2.8. Equipo Cytation 3 [64]	14
2.9. Óptica Modular del Cytation [65]	15
2.10. Ejemplificación de los cambios en el histograma de una imagen y su apariencia (Imagen original [76])	17
2.11. Ejemplificación de la saturación en el histograma [77]	18
2.12. Aplicación de operadores morfológicos a imagen de células obtenida por microscopía confocal mediante la utilización de un elemento estructurante en forma de disco	19
2.13. Efecto de la iluminación no uniforme en una imagen [31]	20
3.1. Esquema general de la metodología del proyecto	21
3.2. Microondas MONOWAVE 50 utilizado en la síntesis de puntos de carbono.	22
3.3. Esquema del fraccionamiento de PC por cromatografía por columnas [80]	23
3.4. Comparación de la señal del espectro de absorción original y la señal con el filtro de mediana aplicado para los PC "verdes".	24
3.5. Preparación de las muestras de agarosa y PC	25
3.6. Fijación de PC en agarosa	25
3.7. Obtención de imágenes <i>in vitro</i> por fluorescencia mediante la utilización del equipo Cytation 3 y el software Gen5	26
3.8. Ejemplificación de los histogramas en 3 imágenes de fluorescencia tomadas en el Cytation	26
3.9. Comparación de la imagen original y de la imagen al implementar el filtrado morfológico de sombrero superior	27
4.1. Formación de especies fluorescentes, a la izquierda, de PC "verdes" y a la derecha, de PC "azules" bajo la irradiación con una lámpara UV (λ_{exc} : 365nm)	28
4.2. Resultado obtenido al completar el proceso de cromatografía por columnas	29

4.3. Fraccionamiento de los CD por cromatografía por columnas visto en la pipeta Pasteur	29
4.4. Caracterización de las propiedades ópticas de los PC "verdes" a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	30
4.5. Caracterización de las propiedades ópticas de los PC "Verdes" a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	30
4.6. Imágenes obtenidas en el Cytation de las microesferas de 1 μm	33
4.7. Imágenes obtenidas en el Cytation de los PC "azules" a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	34
4.8. Imágenes obtenidas en el Cytation de los PC "verdes" a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	35
4.9. Imágenes obtenidas en el Cytation de las células con PC a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36
4.10. Diferencias entre las imágenes sin procesar (a) y luego de la corrección de iluminación no uniforme (b)	36
6.1. Diagrama de Gantt de las actividades desarrolladas	45

Índice de tablas

2.1. Características de las modalidades clínicas de imágenes [43][44][31]	8
2.2. Puntos de carbono utilizados como agentes de contraste en ensayos celulares [26]	13
2.3. Rangos de excitación y emisión de los cubos LED utilizados en el Cytation [66]	15
3.1. Materiales utilizados en los puntos de carbono "verdes".	21
3.2. Materiales utilizados en los puntos de carbono "azules".	22
4.1. Áreas bajo la curva de los espectros de emisión y absorción de los PC utilizados	31
4.2. Parámetros para la obtención de imágenes <i>in vitro</i> por fluorescencia utilizando PC	32
4.3. Parámetros para la obtención de imágenes por fluorescencia de células	32

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del Problema

Las tecnologías de imágenes médicas (Medical imaging - MI) han emergido como una herramienta poderosa para visualizar, caracterizar y cuantificar procesos fisiológicos y patológicos directa o indirectamente, en el ámbito bioquímico, biológico, diagnóstico y terapéutico [1]. Los enfoques clínicos aprobados y comúnmente utilizados abarcan técnicas avanzadas de imagen tales como la tomografía computarizada (Computed Tomography - CT), la tomografía por emisión de positrones (Positron Emission Tomography - PET), la resonancia magnética nuclear (Magnetic Resonance Imaging - MRI) y las imágenes por fluorescencia óptica (Optical Imaging - OI) para detectar la distribución espacio-temporal de dichos procesos [1]. Una de las principales diferencias de estas tecnologías es la fuente de energía utilizada para el proceso de formación de imágenes.

Al utilizar radiación electromagnética como fuente de energía, centrándose en la región visible del espectro electromagnético, se encuentran las imágenes por fluorescencia, estas son adquiridas por métodos no invasivos de alta resolución fundamentados en la excitación de moléculas y/o partículas fluorescentes (conocidas como fluoróforos) [2] con el fin de visualizar detalles morfológicos a nivel subcelular [3].

Algunos sistemas moleculares poseen la capacidad de emitir luz, fenómeno conocido como *luminiscencia*. Dentro de esta, encontramos la fluorescencia, la cual se describe como un proceso de interacción entre la radiación y la materia en donde un material absorbe radiación de alta energía proveniente de una fuente específica e inmediatamente emite luz cuya energía es menor (mayor longitud de onda)[4][5].

La microscopía de fluorescencia, es un método de imágenes por fluorescencia que utiliza equipos con un conjunto de filtros ópticos conectados entre sí, en la que un rayo incidente de una determinada longitud de onda es absorbido por los fluoróforos que responden emitiendo otra luz. Este método es una herramienta muy importante para la investigación científica, ya que se pueden alcanzar altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica, permitiendo una mejor apreciación de los especímenes [6].

Dentro de las técnicas de diagnóstico basadas en el análisis de la fluorescencia, se utilizan distintos tipos de fluoróforos [7], ya sean endógenos o exógenos [8][9]. Los primeros, representan la forma ideal, en donde la luz se utiliza para excitar los fluoróforos que naturalmente poseen los tejidos ("*autofluorescencia*") [10]. Sin embargo, al incrementar la complejidad del cuerpo, la emisión en conjunto de todas las especies endógenas dificulta la identificación sin-

gular de cada una, debido a la combinación de las propiedades de absorción y emisión en la región Ultravioleta-Visible (UV-Vis) del espectro electromagnético [10][11], motivo por el cual se necesita utilizar fluoróforos exógenos con emisiones o tiempos de vida fluorescente en la longitud de onda donde se minimicen dichas propiedades [12].

Existen varios fluoróforos exógenos comercialmente disponibles, los cuales difieren en sus propiedades ópticas [12] y en donde se busca principalmente biocompatibilidad y selectividad [13]. En este tipo de materiales, se han demostrado deficiencias relacionadas a su baja fotoestabilidad, propiedades estructurales y citotoxicidad, tal es el caso del Cy5.5, Texas Red, Rhodamine 6G y la fluoresceína [14].

En los últimos años se ha estudiado la utilización de nanopartículas (NP) en este ámbito. Las NP, definidas como partículas con un tamaño en el rango de 10-1000nm [15], logran producir una amplia gama de efectos ópticos para una variedad de aplicaciones simplemente manipulando su forma, tamaño y funcionalidad de superficie por diferentes medios [16] [17]. Los puntos de carbono (PC) son un tipo de NP, los cuales están compuestos principalmente de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno [18], en donde se exhibe una alta fotoestabilidad [19], biodetección, biocompatibilidad, baja citotoxicidad [20][21] y excelentes propiedades ópticas de fluorescencia [22], mejorando así las limitaciones de otros fluoróforos disponibles.

En general, las propiedades de los PC dependen en gran medida de los precursores, parámetros de reacción y ruta de síntesis que se utilice. Estos se pueden diseñar y adaptar para abarcar los rayos UV a las regiones del infrarrojo cercano del espectro electromagnético. Además, pueden exhibir propiedades fluorescentes que son dependientes de la longitud de onda de excitación, lo que implica que la longitud de onda de excitación varía de alta energía (UV) a más baja energía (visible o infrarrojo cercano) y, la emisión se desplaza al rojo y viceversa [18]. Dicha propiedad ha desencadenado nuevos campos de estudios en detección, bioimagen, optoelectrónica, bioterapia, catálisis y medicina [9][23]. En consecuencia, convierten a los PC en un vehículo para el bioetiquetado y la formación de imágenes por fluorescencia al actuar como agentes de contraste, convirtiéndolos en una base sólida para diagnósticos [24][25][26].

Existen una gran cantidad de equipos que son utilizados en imágenes por fluorescencia, tal es el caso de los microscopios confocales, los cuales a diferencia de los microscopios de fluorescencia convencionales, emplean láser como fuente de luz, [27] por lo que se obtienen imágenes con mayor nitidez, contraste y resolución [28]. Su desventaja principal radica en su disponibilidad limitada y su alto costo de utilización. De la misma forma, se encuentran, los *lectores de placas multimodales*, donde, además de fluorescencia pueden detectarse otras aplicaciones como la absorbancia [29]. El equipo Cytation 3 es un ejemplo de estos, el cual combina microscopía digital automatizada, detección de microplacas convencional, captura de imágenes en campo claro, campo claro a color, contraste de fases y fluorescencia [30].

Actualmente, se dispone del equipo Biotek Cytation 3 en el laboratorio de Bioquímica de la Universidad del Rosario. En este, se conocen las condiciones para los fluoróforos comerciales de identificación de componentes subcelulares más no está calibrado para nanomaterial particulado. Por lo cual y teniendo en cuenta las bases anteriormente explicadas, la presente investigación busca desarrollar un protocolo de captación de imágenes *in vitro* por fluorescencia utilizando puntos de carbono con el fin de sentar bases para futuros estudios en los ámbitos de detección, diagnóstico y terapéutico utilizando unidades más complejas, en las que se puede destacar el uso de células.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Determinar las condiciones del equipo Cytation 3 para la obtención de imágenes *in vitro* por fluorescencia usando puntos de carbono como agentes de contraste.

1.2.2. Objetivos Específicos

1. Sintetizar puntos de carbono con diferentes propiedades ópticas de fluorescencia.
2. Caracterizar las propiedades ópticas de los puntos de carbono sintetizados.
3. Captar en función de la concentración imágenes de los puntos de carbono en el equipo Cytation 3.
4. Segmentar los puntos de carbono en las imágenes obtenidas.

1.3 Organización del documento

En este documento se presentan 6 capítulos principales. En el primer capítulo se describe el planteamiento del problema, el cual busca plantear bases orientadas a la obtención de imágenes *in vitro* por fluorescencia utilizando puntos de carbono como agentes de contraste mediante la utilización del lector multimodal Cytation 3 y posteriormente se plantean los objetivos que abarcaran dicha problemática.

El segundo capítulo corresponde al estado del arte, en donde se establecen las bases teóricas necesarias para entender y/o explicar la problemática planteada. En este se describen las tecnologías de imágenes médicas: formación de las imágenes, fuentes de energía, se hace énfasis en las imágenes por fluorescencia óptica, definición de fluorescencia y usos de los fluoróforos en microscopía de fluorescencia. Seguido a esto, la utilización de PC, definición y métodos de síntesis, equipos utilizados para captar imágenes por fluorescencia, uso de lectores de placas multimodales y en especial, el Cytation. Por último, se presentan bases de procesamiento de imágenes digitales, enfocadas al tratamiento lineal, por medio de histogramas, y no lineal, por medio de operadores morfológicos.

En el tercer capítulo se presenta la metodología implementada para el desarrollo de la investigación: procedimientos de síntesis de PC por microondas, purificación, pruebas de caracterización, fijación de los PC en agarosa de bajo punto de fusión, obtención de imágenes *in vitro* por fluorescencia en el Cytation 3 y procesamiento de las imágenes.

En el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos y la discusión de los mismos, seguido por las conclusiones a las que se llegó en base a estos.

Por último, en el capítulo seis se plantean trabajos futuros que pueden desarrollarse como resultado de esta investigación.

Capítulo 2

ESTADO DEL ARTE

En el presente capítulo se expone la perspectiva teórica necesaria para entender la problemática abarcada por la investigación.

2.1 Imágenes científicas

Una imagen puede ser definida como una función bidimensional (2-D) $f(x,y)$, donde x y y representan coordenadas espaciales y, la amplitud de f se conoce como la *intensidad* o *nivel de gris* para cualquier par de coordenadas (x,y) de la imagen en dicho punto. Cuando los valores de x , y y la intensidad f son cantidades discretas, se conoce como **Imagen Digital** [31]. Cada imagen está compuesta por un número finito de *píxeles*, los cuales son un elemento con una ubicación e intensidad específica [32].

Existen diversos tipos de imágenes, que brindan información diferente sobre el área en investigación [33], tal es el caso de las imágenes científicas. Estas se producen dentro de una disciplina científica con un propósito netamente dirigido hacia las ciencias, donde dentro de las ciencias naturales se encuentran las imágenes médicas [34].

2.1.1. Formación de Imágenes

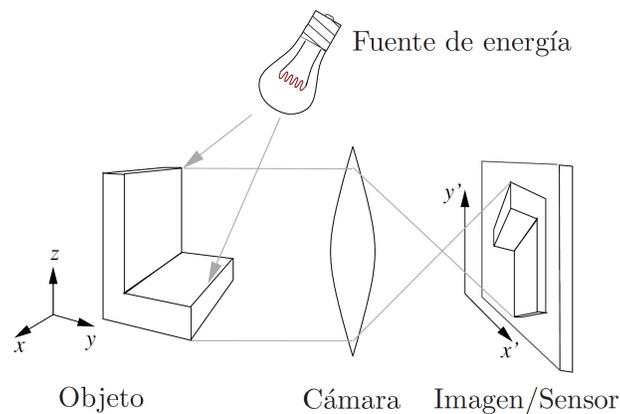


Figura 2.1: Elementos básicos en la formación de imágenes [35]

En general, se tienen cuatro elementos en la formación de imágenes (Figura 2.1): El primero es una fuente de energía la cual es irradiada hacia la escena principal donde se encuentran los objetos de interés, posteriormente, la radiación es reflejada o absorbida por dichos objetos hacia un elemento, conocido como cámara, la cual se encarga de preparar o modificar esta radiación para proyectar la imagen en uno o más sensores encargados de traducir dicha información y proporcionar la imagen digital [31][35].

Existe diversidad de fuentes de energía, las cuales son elegidas de modo que se extraiga la información buscada en el entorno: Energía acústica, basada en ondas mecánicas que se transmiten en un medio, siendo el caso más utilizado el ultrasonido, energía cinética en forma de haces de partículas, energía mecánica en barrido por contacto y energía electromagnética [35].

El enfoque de la presente investigación abarca la energía electromagnética, en esta fuente se encuentran ondas transversales creadas como resultado de las vibraciones entre un campo eléctrico de magnitud E y un campo magnético de magnitud M (Figura 2.2) [35]. Dichas ondas son perpendiculares entre si y pueden ser descritas en términos de su longitud de onda (λ), frecuencia (ν) o energía (E). La longitud de onda y la frecuencia están relacionadas por la ecuación 2.1 [31].

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2.1)$$

Donde c es una constante determinada por las propiedades del medio en el que la onda está en movimiento, en este caso, es la velocidad de la luz ($2,998 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$).

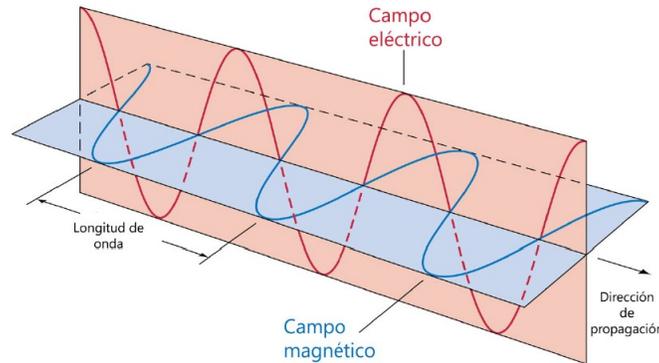


Figura 2.2: Representación esquemática de las ondas electromagnéticas [35]

Adicionalmente, la energía de las ondas electromagnéticas está dada por la ecuación 2.2

$$E = h \cdot \nu \quad (2.2)$$

Donde h es la constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34} J \cdot s$).

El espectro electromagnético, en general, es la forma de clasificar y ordenar las ondas electromagnéticas de acuerdo a sus diferentes longitudes de onda y frecuencias (Figura 2.3).

Las ondas electromagnéticas se pueden considerar como ondas sinusoidales propagadas con una longitud de onda λ , o como una corriente de partículas sin masa, las cuales se mueven

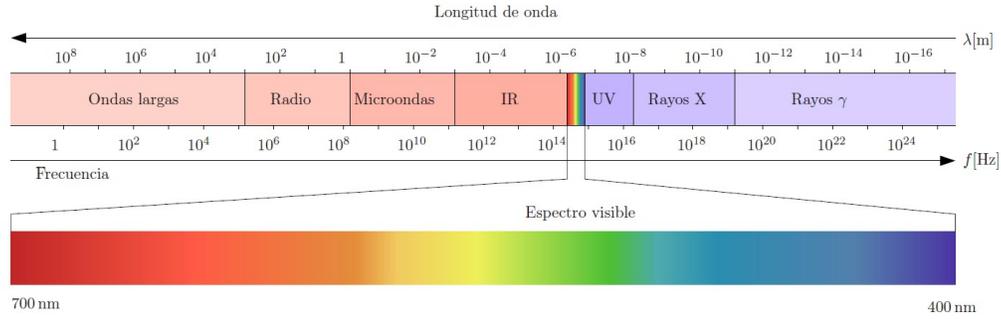


Figura 2.3: Espectro electromagnético [35]

en un patrón ondulado a la velocidad de la luz. Cada una de estas partículas es portadora de energía electromagnética, llamada *fotones* [31].

Tal como se observa en la expresión 2.2 la energía es proporcional a la frecuencia, así como también, siguiendo la expresión 2.1 la frecuencia es inversamente proporcional a la longitud de onda, por tanto, las frecuencias más altas transportan más energía por fotón [31].

En la presente investigación se tuvo como enfoque el espectro visible (400 - 700 nm), específicamente en las imágenes por fluorescencia óptica, las cuales no son utilizadas para un sistema tan complejo como lo es el ser humano, pero sus aplicaciones abarcan estudios clínicos desde organismos pequeños (animales) hasta componentes subcelulares.

2.1.2. Imágenes médicas

Las imágenes médicas se refieren a métodos que visualizan de forma no invasiva procesos biológicos en tiempo real [36], abarcando desde la parte macro (ej. estructuras y órganos) hasta la escala celular y subcelular (ej. células, proteínas y ADN), con el fin de visualizar, caracterizar, diagnosticar, monitorear o tratar procesos fisiológicos y/o patológicos [1].

A diferencia de las imágenes fotográficas en las que se utilizan cámaras para capturar la intensidad de la luz y/o el color de los objetos, cada tecnología médica utiliza un conjunto diferente de sensores para captar la información anatómica y funcional sobre la estructura en estudio [32]. En la actualidad al momento de su representación, un gran porcentaje de imágenes médicas son digitales, utilizadas en nivel de gris o en color [31].

Los enfoques clínicos comúnmente utilizados abarcan técnicas avanzadas de imagen tales como la tomografía computarizada (CT), la tomografía por emisión de positrones (PET), la resonancia magnética nuclear (MRI) y las imágenes por fluorescencia óptica (OI), estas han demostrado permitir la visualización de diferentes fenómenos *in vivo*, tal es el caso de la biodistribución de los sistemas terapéuticos [37], la administración de fármacos [38][39] y las plataformas con enfoque teranóstico (combinación terapia-diagnóstico) [40][41][42].

Adicionalmente, en los últimos años, con el incremento de la interacción entre la biología molecular y las tecnologías de imágenes médicas se ha llevado al diseño de un número creciente de nanosensores para muchos iones y metabolitos, a causa de que al expresarse o incorporarse en las células, estas se vuelven auto-informativas para el metabolito en cuestión [36].

Tabla 2.1: Características de las modalidades clínicas de imágenes [43][44][31]

Modalidad	Formación de Imágenes	Características principales	Agentes de contraste	Profundidad de penetración	Resolución (tamaño del voxel)	Sensibilidad	Aplicaciones	Desventajas
Resonancia Magnética Nuclear (MRI)	Utiliza campos magnéticos (0.5-7 T) para polarizar los núcleos de hidrógeno de las moléculas de agua en tejidos humanos. Se coloca al paciente en un poderoso imán y pasa ondas, del rango de radio del espectro electromagnético, a través del cuerpo del individuo en pulsos cortos. Cada pulso hace que se emita un pulso de respuesta por los tejidos.	Versatilidad, alto contraste, concentración de metabolitos, perfusión, caracterización del microambiente, seguimiento celular a corto y mediano plazo.	Partículas de óxido de hierro, gadolinio, ferritina, proteínas ricas en lisina, protamina.	No hay límite.	$<1-3 \text{ mm}^3$	Moderada	Anatomía, patología, metabolismo, intercambio químico, fisiología, función, intervención, celular y molecular.	No compatible con pacientes con implantes, presencia de ruido acústico.
Tomografía por emisión de positrones (PET)	Las imágenes son producidas a través de la detección de isótopos radiactivos que emiten positrones a medida que se desintegran. Cuando un positrón encuentra un electrón, ambos son destruidos y se emiten rayos gamma.	Proliferación de injertos, viabilidad tisular, imágenes longitudinales en serie y posibilidades de diferenciación.	F-fluorodesoxiglucosa (FDG), 18-F-9-guanina (FHBG), FDOPA.	No hay límite.	$3-5 \text{ mm}^3$	Alta	Metabolismo, fisiología, función celular y molecular.	Radiación ionizante, etiquetas biopeligrosas.
Tomografía por emisión de fotón único (SPECT)	Técnica de tomografía que utiliza rayos gamma para detectar sondas radiactivas.	Distribución de células inyectadas.	Radioisótopos: Tc-99m, NIS, receptores de dopamina.	No hay límite.	-5 mm^3	Alta	Metabolismo, fisiología, función celular y molecular.	Radiación ionizante, seguimiento celular a muy corto plazo.
Rayos X y Tomografía computarizada (CT)	La tomografía utiliza un anillo de detectores que rodean un individuo y giran alrededor del mismo y una fuente de rayos X. Los rayos atraviesan el objeto y se recogen en el extremo opuesto por los detectores del anillo. Este procedimiento se repite cada vez que la fuente va girando.	Emparejamiento multimodal con PET, SPECT.	Microcápsulas de bario, nanopartículas de oro.	No hay límite.	$<1 \text{ mm}^3$	Alta	Anatomía, patología, intervención vascular, biopsias.	Radiación ionizante, no recomendable en tejido suave.
Ultrasonido	Las imágenes son generadas por los reflejos y ecos de ondas de sonido (1 a 5 MHz) oscilantes en los tejidos.	Proporciona imágenes en tiempo real, menor costo que otras modalidades y no utiliza radiación ionizante.	Microcápsulas, microburbujas y liposomas.	Dependiente de la resolución espacial del equipo.	1 mm^3	Moderada	Anatomía, patología, intervención vascular, biopsias.	Dependencia de la resolución espacial y profundidad de penetración, campo de visión limitado.

2.1.3. Imágenes multimodales

Las imágenes multimodales se refieren a la producción simultánea de señales para más de una técnica de formación de imágenes [45].

Existe una gran cantidad de equipos para la obtención de imágenes de estructuras a nivel microscópico, tal es el caso de los *lectores de placas multimodales*, en los que se puede detectar absorbancia y fluorescencia [29] los cuales serán ejemplificados en la sección 2.3.

En la obtención de imágenes multimodal, se tiene la necesidad de combinar información morfofuncional, esto puede abordarse adquiriendo imágenes asincrónicas y fusionándolas mediante técnicas de manipulación de imágenes digitales o adquiriendo simultáneamente imágenes (sincrónicas) y fusionándolas automáticamente [46]. Estas imágenes permiten examinar más de un fluoróforo a la vez, de modo que los eventos celulares se puedan examinar simultáneamente o se pueda seguir la progresión de estos eventos en tiempo real [45][44].

Entre las técnicas comúnmente usadas y aprobadas de imágenes multimodales en el ámbito médico se pueden destacar el MRI, SPECT, PET, CT y ultrasonido, tal como se explica en la tabla 2.1.

2.2 Fluorescencia

La fluorescencia es un mecanismo de interacción entre la radiación UV-Vis y la materia en el cual un material absorbe radiación de alta energía proveniente de una fuente específica e inmediatamente emite luz cuya energía es menor (mayor longitud de onda)[4][5].

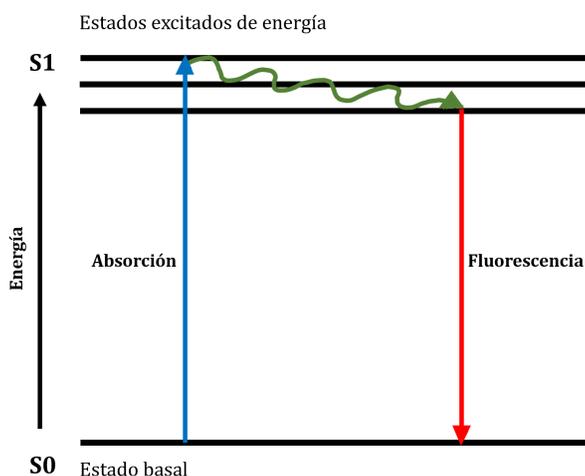


Figura 2.4: Diagrama de Jablonski [4]

Este fenómeno puede ser explicado mediante el diagrama de Jablonski (Figura 2.4), este explica que: los electrones de las moléculas se encuentran en su estado basal (S0), al ser irradiadas con fotones de luz, pasan a un estado de excitación (S1) con un mayor contenido de energía. En este estado, se mantienen un tiempo determinado en el cual las moléculas interactúan con su entorno y sufren cambios conformacionales. Como consecuencia de esto, la energía se disipa creando un estado de menor energía (S1') [4][5] y se emite un fotón de luz de menor energía (mayor longitud de onda) generando el efecto de fluorescencia.

En general, presenta ventajas en técnicas como la microscopía, al tener la posibilidad de incorporar moléculas fluorescentes a muestras, de tal forma que solo estas sean vistas en el microscopio, o en otros casos, añadir varios tipos de moléculas, los cuales pueden ser distinguidos al variar la longitud de onda de excitación [5].

2.2.1. Imágenes por Fluorescencia Óptica

Las imágenes por fluorescencia, son un método no invasivo de alta resolución que implica la formación de imágenes con fotones fluorescentes. Este consiste en la excitación de fluoróforos [2] utilizando luz con una longitud de onda específica (de mayor energía) a las propiedades de absorción de estas especies [47] y la fluorescencia emitida (de menor energía) es detectada por una cámara con dispositivo de carga acoplada; con el fin de visualizar detalles morfológicos con resolución a nivel subcelular [3].

Existen diversas ramas de esta técnica tales como: la microscopía de fluorescencia, microscopía confocal, citometría de flujo y clasificación celular, las cuales han demostrado tener una amplia cantidad de aplicaciones en estudios metabólicos, diagnósticos cardiovasculares, oftalmológicos y oncológicos [48][31].

En la microscopía confocal, se emplea láser como fuente de luz con el fin de obtener intensidades muy altas [27], lo cual permite captar imágenes con mayor nitidez, contraste y resolución [28]. La desventaja principal de esta modalidad radica en su disponibilidad limitada y su alto costo de utilización [5]. Por lo cual, se busca emplear métodos más simples y accesibles, como la microscopía de fluorescencia.

2.2.2. Microscopía de Fluorescencia

En la microscopía de fluorescencia, se utilizan equipos con un conjunto de filtros ópticos conectados entre sí [49], tal como se observa en la figura 2.5: Comienza con un *filtro de excitación* el cual se encarga de seleccionar las longitudes de onda para excitar los fluoróforos de la muestra, luego el *divisor de haz dicroico* refleja la luz en la banda de excitación y la transmite a la banda de emisión y por último, el *filtro de emisión* deja pasar solo las longitudes de onda de interés emitidas por el fluoróforo [50][51].

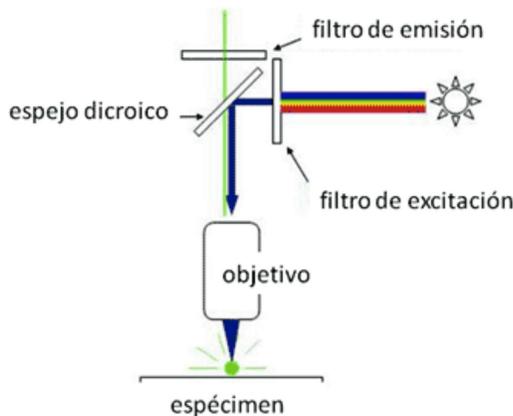


Figura 2.5: Esquema básico del microscopio de fluorescencia [6]

2.2.3. Fluoróforos

Un fluoróforo es una molécula o parte de ella, que emite fluorescencia después de ser excitada por medio de irradiación de radiación electromagnética [7].

La óptica aplicada a la biomedicina y/o bioingeniería requiere del estudio de la interacción radiación electromagnética-tejido biológico. Desde el punto de vista óptico, los tejidos se pueden definir como medios turbios multicapa, es decir, presentan, además de absorción, esparcimiento, reflexión, transmisión y otros fenómenos que condicionan la propagación de la radiación [52].

Dentro de las técnicas de diagnóstico basadas en el análisis de la fluorescencia, se utilizan distintos tipos de fluoróforos [7], ya sean endógenos o exógenos [8][9]. Los primeros, representan la forma ideal, en donde la luz se utiliza para excitar los fluoróforos que naturalmente poseen los tejidos (*"autofluorescencia"*) [10], brindando la posibilidad de obtener información sin necesidad de utilizar otros biomarcadores [53]. Ejemplos de estas moléculas son la melanina, aminoácidos como la tirosina, proteínas como el colágeno, la elastina, vitaminas y lípidos [7][53].

Al incrementar la complejidad del cuerpo, la emisión en conjunto de todas las especies endógenas dificulta la identificación singular de cada una, debido a la combinación de las propiedades de absorción y emisión en la región Ultravioleta-Visible (UV-Vis) del espectro electromagnético [10][11], motivo por el cual se necesita utilizar fluoróforos exógenos con emisiones o tiempos de vida fluorescente que se puedan distinguir claramente en la ventana óptica de transparencia biológica (Figura 2.6) [12].

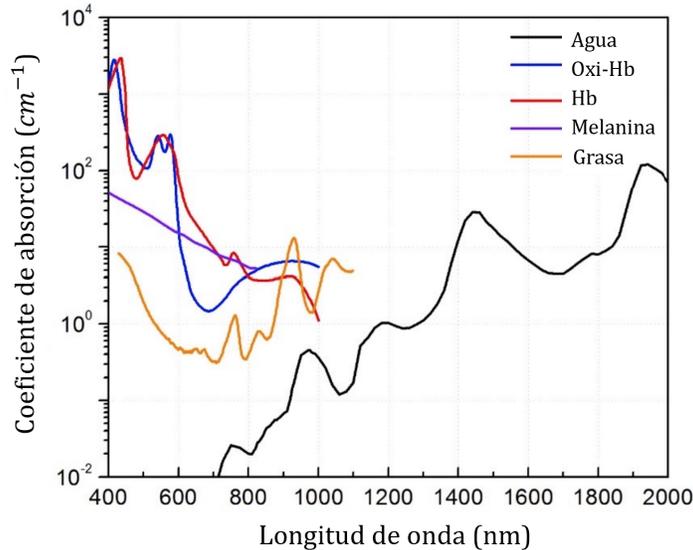


Figura 2.6: Ventana óptica. Coeficiente de absorción de los componentes más relevantes de un tejido biológico típico [11]

Existen varios fluoróforos exógenos comercialmente disponibles, los cuales difieren en sus propiedades ópticas [12]. En este tipo de materiales, se ha demostrado que existen desventajas y deficiencias relacionadas a su baja fotoestabilidad, resultando en una respuesta óptica reducida [54]. Además, carecen de propiedades estructurales para construir un sistema que imparta funcionalidades multimodales (localización, diagnóstico y terapéutico) sin afectar sus

propiedades ópticas [55]. A su vez, se han reportado fluoróforos citotóxicos tales como el Cy5.5, Texas Red, Rhodamine 6G y la fluoresceína [14].

En los últimos años se ha estudiado la utilización de nanopartículas (NP) en este ámbito. Las NP, son partículas con un tamaño en el rango de 10-1000nm [15], dentro de las que por su amplia gama de efectos ópticos, funcionalización, tamaño y forma se destacan los puntos de carbono [16][17].

2.3 Puntos de Carbono

Los puntos de carbono (PC) son nanopartículas de carbono descubiertas por primera vez en 2004, durante la purificación de nanotubos de carbono de pared simple [56]. Estos están compuestos principalmente de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, aunque su composición exacta se adapta de acuerdo con la composición química de los precursores [18].

Los puntos de carbono son ampliamente utilizados por sus propiedades, estos exhiben una alta fotoestabilidad, buena biodetección, biocompatibilidad, fotoluminiscencia; todas estas dependen en gran medida de los precursores, parámetros de reacción y ruta de síntesis que se utilice [19].

2.3.1. Métodos de síntesis de puntos de carbono

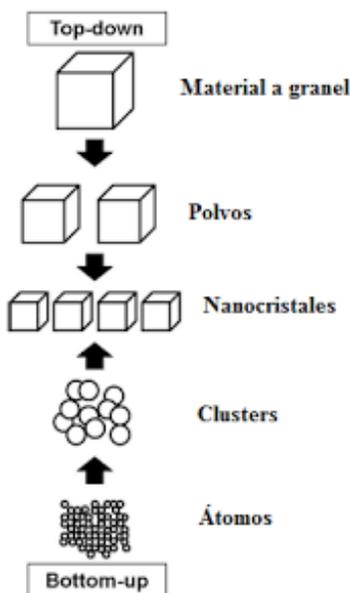


Figura 2.7: Métodos de síntesis de nanopartículas [57]

Generalmente, la síntesis de PC puede clasificarse en dos estrategias principales tal como se observa en la figura 2.7: métodos ascendentes (bottom-up) y descendentes (top-down) [58]. Los métodos bottom-up forman PC por pequeños precursores moleculares, incluidos materiales de fuente de carbono y agentes de pasivación [59]. Alternativamente, en las técnicas top-down los PC producidos se forman o rompen a partir de grandes recursos renovables, como leche de soja, zumo de naranja, huevos, capullo de seda, entre otros [59][60].

El calentamiento por microondas es un método rápido y efectivo de formación de nanopartículas, partiendo de un precursor molecular, que permite aumentar la energía cinética de la reacción hasta en dos órdenes de magnitud [57].

2.3.2. Utilización de Puntos de Carbono como agentes de contraste

Los PC son una alternativa interesante y particular en el bioetiquetado de componentes celulares, particularmente debido a la ausencia de cualquier metal en su composición [26].

Sin embargo, es de suma importancia considerar aspectos específicos para asegurarse de la fluorescencia brillante y visible de los PC: síntesis de alta calidad con distribución de tamaño de pequeña, emisión estrecha y sintonizable, comprender el origen de la fluorescencia y utilizar este conocimiento para preparar los PC, explotar la química de la superficie y su aplicación como agentes de contraste en focalización subcelular, para así entender una gran cantidad de procesos intracelulares [26].

En ensayos celulares, los PC deben ser de tamaño pequeño (preferiblemente <10 nm), para así poder entrar fácilmente en la célula e interactuar con un compartimento bioquímico específico. Una ventaja de la utilización de PC en este ámbito es la posibilidad de funcionalizarlos para apuntar a diferentes componentes intracelulares y sustancias químicas o biomoléculas en su trabajo como sondas [26]. En los últimos años se han sintetizado y funcionalizado una gran cantidad de PC con este fin tal como se muestra en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Puntos de carbono utilizados como agentes de contraste en ensayos celulares [26]

Precusores	Biomolécula conjugada	Tamaño	Funcionalización	Referencias
Polvo de carbón activado	Dopamina	2-5 nm	Monitoreo de la actividad de la tirosinasa y detección de inhibidores	Chai et al. (2015)
Ácido cítrico-etilendiamina	Localización de secuencias de péptidos	<10 nm	Núcleo celular	Yang et al. (2015)
Ácido hialurónico, polietilenimina ramificada	Ácido hialurónico	2-3 nm	Identificación de tumores, imágenes intracelulares y liberación de genes	Zhang et al. (2017)
Ácido cítrico-etilendiamina	Nanopartículas de sílica mesoporosas	200 nm	Estado redox	Liu et al. (2015)
Ácido cítrico-polietilenimina	Derivados de morfina	2-6 nm	Lisosoma	Wu et al. (2017); Prabhakar et al. (2017)
m-fenilendiamina-L-cisteína	Protoporfirina IX	25 nm	Núcleo, nucléolo	Hua et al. (2018)
Etanol	Hidroetidina	—	Superóxido	Gao et al. (2014)
o-fenilendiamina	—	—	Lisina	Song, W., Duan, W., et al. (2017)
Alginato-triptófano	Complejación con Cu^{2+}	—	Histidina	Zhu et al. (2016)
Ácido cítrico-urea / rojo neutro-trietilamina	Nanohojas y nanoflores de MnO_2	—	Glutatión	He et al. (2015); Jiao et al. (2019)

2.4 Lectores de placas multimodales

Los lectores de placas multimodales son equipos que combinan técnicas de imágenes, tal es el caso del equipo Cytation 3, el cual combina microscopía digital automatizada y detección

de microplacas convencional [30].

Diversos estudios han utilizado imágenes multimodales con nanotecnología: tal es el caso de las imágenes de fluorescencia NIR (Near-infrared) simultáneas, imágenes basadas en SERS (Surface Enhanced Raman spectroscopy) que utilizan nanotubos de oro [61], imágenes de tomografía y resonancia magnética de manera simultánea en ratones con hepatoma utilizando oro y óxido de hierro [62] y por último, en modo triple, imágenes de resonancia magnética, imágenes fotoacústicas (PAI) y fluorescencia *in vivo* utilizando nanopartículas de óxido de hierro y grafeno [63].

2.4.1. Cytation



Figura 2.8: Equipo Cytation 3 [64]

Este lector multimodal incluye los siguientes modos [64]:

- Espectroscopía de intensidad de fluorescencia (FI).
- Polarización de fluorescencia (FP).
- Espectroscopía de fluorescencia en tiempo retardado (TRF).
- Luminiscencia.
- Absorbancia UV-Visible.
- Formación de Imágenes.

Este equipo es un instrumento modular, con 3 partes: el módulo de óptica monocromática, el módulo de filtros ópticos y el módulo de imágenes (Figura 2.9). En los filtros ópticos se encuentran filtros de excitación y emisión para obtener mediciones de fluorescencia. El filtro de excitación selecciona la banda de luz a la que estará expuesta la muestra y el filtro de emisión selecciona la banda de luz con la máxima señal de fluorescencia de la muestra que será medida por el tubo fotomultiplicador. En general, puede realizar lecturas usando un filtro de cubo o un monocromador. El sistema con el monocromador, tiene sondas superior e inferior y se utiliza para absorbancia, intensidad de fluorescencia y exploraciones de luminiscencia espectral, este tiene también una lámpara de xenón que permite realizar mediciones de luz UV y visible [64].

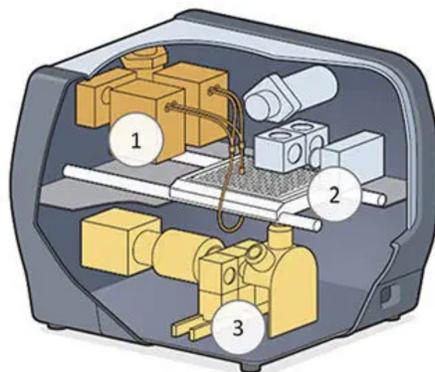


Figura 2.9: Óptica Modular del Cytation [65]

El sistema de imágenes admite lecturas de fluorescencia basadas en filtros LED y un lector de campo brillante, este puede utilizar hasta cuatro cubos LED y cuatro cubos de filtro y dos objetivos. Al obtener las imágenes estas pasan al software Gen5 con el cual se tiene comunicación para la configuración de dichos objetivos [64], para su posterior operación, incluida la reducción y el análisis de datos [64].

Al momento de utilizar los cubos LED, es imperativo conocer la diferencia entre el **espectro de excitación**, el cual muestra la intensidad fluorescente observada en función de la longitud de onda de excitación, a una longitud de onda de emisión fija y el **espectro de emisión**, donde se observa la intensidad de la emisión fluorescente en función de la longitud de onda de emisión, con una longitud de onda de excitación fija [4].

Los cubos LED más utilizados en el Cytation son el **DAPI**, **GFP** y **RFP**, los cuales tal como se observa en la tabla 2.3, en sus propiedades de excitación y emisión abarcan una gran parte de la región visible del espectro electromagnético.

Tabla 2.3: Rangos de excitación y emisión de los cubos LED utilizados en el Cytation [66]

Cubo LED	Excitación	Emisión
DAPI	377/50	447/60
GFP	469/35	525/39
RFP	531/40	593/40

En general, la captura comienza con el ajuste de parámetros relacionados al enfoque de la imagen y el ajuste y exposición del LED, los cuales son:

- Longitud Focal: También conocido como distancia focal, es la distancia óptica expresada en μm desde el punto en donde los rayos convergen hasta formar una imagen de un objeto para el sensor en el plano focal de la cámara [67].
- Intensidad del LED (U. Arb.): Grado de fuerza con el que se manifiesta la fuente LED [68].
- Tiempo de integración (ms): Tiempo en el cual los píxeles acumulan luz [69].

- **Ganancia (U. Arb.):** factor que convierte el número de fotoelectrones capturados al captar la imagen en el valor numérico que toma cada píxel y que determina su nivel de brillo [70].

Este equipo ha sido empleado en la adquisición de imágenes con fluoróforos exógenos comercialmente disponibles, tal es el caso de imágenes de la expresión de ARN [71], donde se utilizó Hoeschst, CY-3 y el CY-5. Permitiendo mediante la combinación de lector de imágenes y las sondas de ARN fluorescentes, obtener información cuantitativa y cualitativa de la respuesta *in vivo* de células HeLa en respuesta a estímulos externos. El objetivo de la presente investigación fue calibrar el equipo para su utilización en la captación de imágenes con otros tipos de fluoróforos, como lo son los puntos de carbono.

2.5 Procesamiento de Imágenes Digitales

Los métodos matemáticos y las técnicas computacionales utilizadas en el procesamiento de imágenes digitales dependen en general de la naturaleza de las mismas [72][73]. En los enfoques de estos procedimientos se encuentran:

- **Lineal:** Abarca métodos basados en teorías reversibles bastante desarrolladas [72]. En este enfoque se encuentran los filtros en el dominio espacial y en el dominio de la frecuencia [31].
- **Estadístico:** Dependiendo de su orden: Analizan píxeles en forma simple, comúnmente bajo el análisis de la distribución de las intensidades de píxeles de una imagen, extraídos del histograma de la misma, también estudian propiedades de pares de píxeles (como la matriz de coocurrencia) y secuencias de niveles de gris (como la matriz de longitudes de secuencia de niveles de grises) [72] [74].
- **Físico-Matemático:** Considera las imágenes digitales como un conjunto espacial de píxeles cuyas posiciones y niveles de gris pueden ser asociadas, bajo ciertas hipótesis, con variables físicas relacionadas mediante un modelo físico-matemático que resulte útil para el procesamiento [72]. En estos se destacan los contornos activos y el espacio escalado [31].
- **Morfología Matemática:** De naturaleza no lineal, fundamentada en la teoría de conjuntos y retículos algebraicos [75]. Su objetivo es obtener información de las formas y geometría de los objetos de interés en una imagen. Es un enfoque constructivo y gratificado, ya que partiendo de elementos estructurantes y de las operaciones básicas de dualidad, erosión y dilatación morfológica se deducen operaciones adicionales que permiten ampliar su alcance [72].

En la presente investigación se tuvo como enfoque el análisis estadístico del histograma y la morfología matemática para la correcta visualización de imágenes, explicadas en las secciones posteriores.

2.5.1. Histograma de una Imagen

El histograma de una imagen es la representación y/o distribución de todos los píxeles que la conforman. Con niveles de intensidad en el rango $[0, L-1]$ es una función discreta $h(r_k) = n_k$, donde r_k es el k -ésimo valor de intensidad y n_k es la cantidad de píxeles en la imagen con intensidad r_k [31].

La manipulación del histograma es una herramienta fundamental en procesamiento de imágenes, su forma está intrínsecamente relacionada a la apariencia de la imagen [73] y permite analizar diversas particularidades, tal es el caso del contraste, tipo de distribución (si los píxeles están homogéneamente distribuidos) y tipo de fondo [31][75].

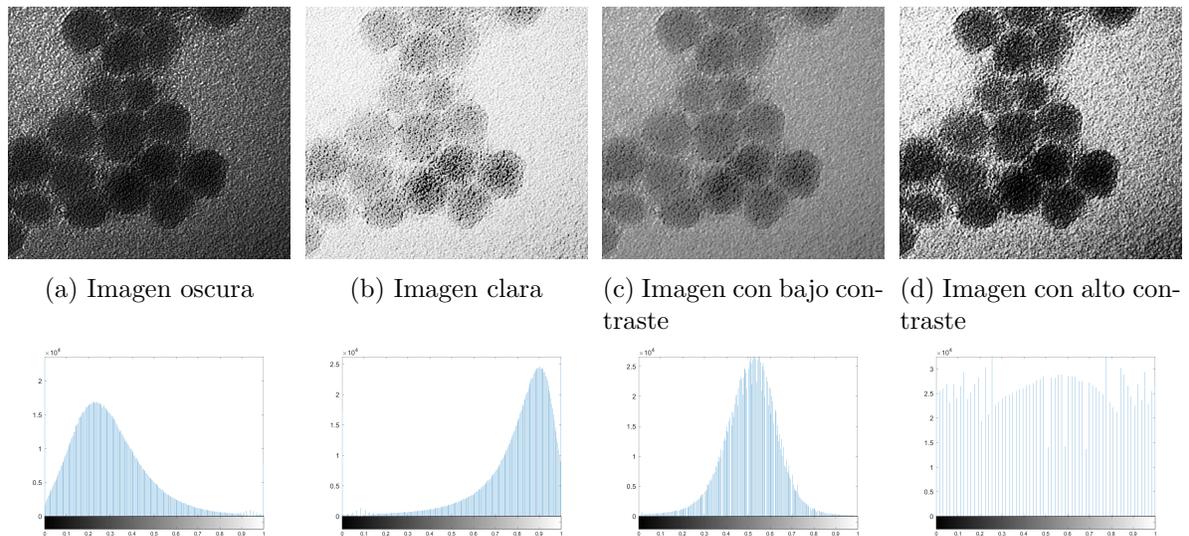


Figura 2.10: Ejemplificación de los cambios en el histograma de una imagen y su apariencia (Imagen original [76])

En la figura 2.10 se muestra una misma imagen con cuatro características básicas de intensidad: "oscuro", "claro", bajo contraste y alto contraste; así como también sus respectivos histogramas. En la imagen oscura (Figura 2.10a) el histograma está concentrado hacia el extremo izquierdo, correspondiente a los niveles de intensidad más cercanos al negro. Del mismo modo, la segunda imagen (Figura 2.10b), correspondiente a "claro", la mayor cantidad de píxeles está hacia el extremo superior, indicando niveles de gris más claros. Del mismo modo, al centrarse en el contraste, una imagen con nivel alto, tendrá un histograma abarcando una gran parte de los niveles de intensidad, tal como se muestra en Figura 2.10d, al contrario, al tener un nivel bajo de contraste (Figura 2.10c), los píxeles típicamente se concentran en un área pequeña al centro de la escala de intensidad [31].

El histograma en aplicaciones como microscopía de fluorescencia es de suma importancia al momento de captar imágenes, usualmente los programas computacionales utilizados por los microscopios muestran los histogramas pertenecientes a la imagen a obtener, si en estos se observa saturación, significa que se está perdiendo información importante y detalles por una focalización incorrecta. En la figura 2.11 se observa un ejemplo del histograma de una imagen con píxeles saturados.

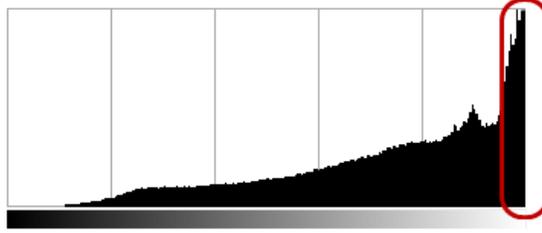


Figura 2.11: Ejemplificación de la saturación en el histograma [77]

2.5.2. Operadores Morfológicos

El procesamiento de imágenes morfológicas es un tipo de procesamiento en el que la forma espacial o la estructura de los objetos de una imagen son modificados [73]. Su objetivo central es extraer las posibles estructuras geométricas relevantes de una imagen, considerándola como un subconjunto del plano R^2 o de Z^2 , mediante un sondeo con otro conjunto denominado elemento estructurante (SE), cuya geometría y tamaño dependen de la información que se desee obtener en la imagen inicial [31][72]. Las expresiones morfológicas se escriben en términos de elementos estructurantes y un conjunto, A, de píxeles de primer plano, o en términos de elementos estructurantes y una imagen, I, que contiene A [31].

En general, los operadores morfológicos tienen aplicaciones más amplias que únicamente segmentación, también son funcionales en el filtrado, clasificación, medición, reconocimiento de patrones y análisis de texturas [75]. En esta técnica se destacan la dilatación y erosión morfológica, con la primera de estas un objeto crece uniformemente en extensión espacial, mientras que con la erosión un objeto se encoge uniformemente [73].

2.5.2.1 Erosión

Con A y B como conjuntos en Z^2 , la erosión se define como:

$$A \ominus B = \{z : B_z \subseteq A\} \quad (2.3)$$

donde A es un conjunto de píxeles de primer plano, B es un elemento estructurante y las z son valores de primer plano (unos) [31]. El resultado de la erosión es un conjunto de puntos $z \in R^n$ tales que B está propiamente contenido en A cuando su centro se coloca en z [72].

2.5.2.2 Dilatación

Con A y B como conjuntos en Z^2 , la dilatación se define como:

$$A \oplus B = \{z : \hat{B}_z \cap A \neq \emptyset\} \quad (2.4)$$

Esta ecuación se basa en reflejar B sobre su origen y trasladar la reflexión por z, como en erosión. La dilatación de A por B entonces es un conjunto de puntos $z \in R^n$, tales que los elementos de primer plano de \hat{B} se superponen al menos con un elemento de A [72][31].

A diferencia de la erosión, que es una operación de reducción o adelgazamiento, la dilatación hace crecer objetos en una imagen. La forma y extensión de este engrosamiento está controlada por la forma y tamaño del elemento estructurante utilizado [31].

2.5.2.3 Apertura y Cierre

A partir de las operaciones de erosión y dilatación se construyen otras operaciones a través de su composición algebraica, estas son la apertura y el cierre [72]. La apertura generalmente suaviza el contorno de un objeto, rompe istmos estrechos y elimina protuberancias delgadas y el cierre, generalmente fusiona elementos cercanos, elimina pequeños espacios y rellena huecos en el contorno [31].

La **apertura** del conjunto A por el elemento estructurante, se define como:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (2.5)$$

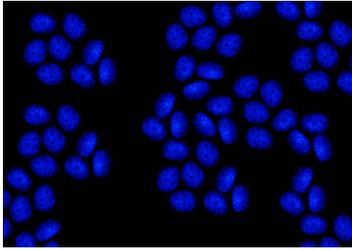
En palabras, la apertura A por B es la erosión de A por B, seguida de una dilatación del resultado por B [31].

De manera similar, el **cierre** del conjunto A por el elemento estructurante B, se define como:

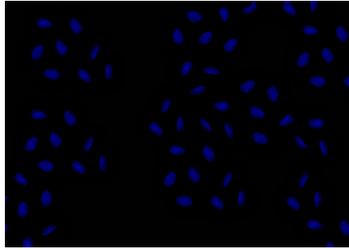
$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (2.6)$$

De forma que, el cierre de A por B es simplemente la dilatación de A por B, seguido de erosión del resultado por B [31].

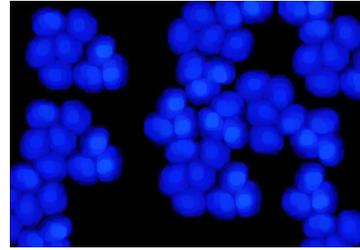
En términos prácticos, este procedimiento pueden ser vistos en la figura 2.12. En la erosión (Figura 2.12b) se observa que los elementos de la imagen se hacen más pequeños, en la dilatación (Figura 2.12c) al contrario, se hacen más grandes. En otro caso, la apertura (Figura 2.12d) tiende a eliminar objetos pequeños y el cierre (Figura 2.12e) a conectar objetos que se encuentran cerca.



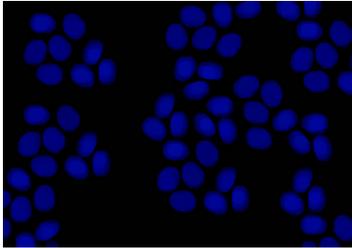
(a) Imagen original [78]



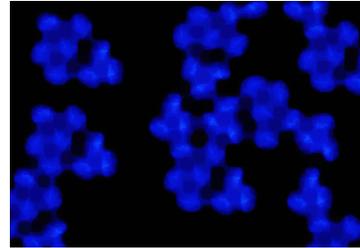
(b) Aplicación de erosión morfológica



(c) Aplicación de dilatación morfológica



(d) Aplicación de apertura morfológica



(e) Aplicación de cierre morfológico

Figura 2.12: Aplicación de operadores morfológicos a imagen de células obtenida por microscopía confocal mediante la utilización de un elemento estructurante en forma de disco

Numerosas técnicas de filtrado y procesamiento de imágenes están basadas en conceptos de morfología matemática, tal es el caso de la granulometría para la determinación de la distribución de tamaño de partículas en una imagen, gradientes morfológicos, suavizado morfológico, transformaciones de sombrero superior e inferior para remoción de artefactos y corrección de iluminación no uniforme [31][75], siendo esta última técnica, un enfoque importante en la investigación.

2.5.2.4 Filtrado morfológico de sombrero superior

El filtrado morfológico de sombrero superior es un algoritmo de transformación de imágenes que combina la sustracción de las mismas con la operación morfológica de apertura [31] siguiendo la expresión 2.7

$$T_{hat} = f - (f \circ b) \quad (2.7)$$

Entre las aplicaciones de esta transformación es la eliminación de objetos a partir de una imagen mediante el uso de un elemento estructurante en la operación de apertura el cual no se ajusta a los objetos a remover y también para la corrección de los efectos de iluminación para poder extraer objetos del fondo en una imagen [31].

El efecto de la iluminación y la reflectancia juegan un papel central en el éxito de la segmentación de imágenes mediante el uso de umbrales u otras técnicas de segmentación, ignorar dichos factores puede dificultar el procesamiento óptimo de una imagen.

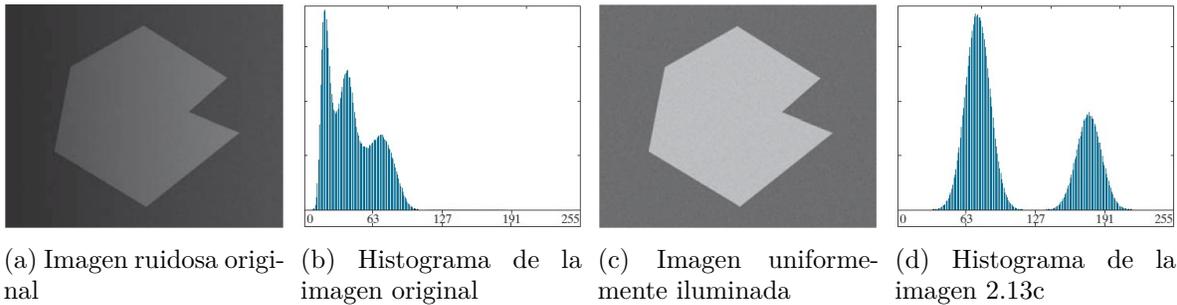


Figura 2.13: Efecto de la iluminación no uniforme en una imagen [31]

En la figura 2.13a se encuentra una imagen con su respectivo histograma (Figura 2.13b), en dicha representación de distribuciones no es tan sencillo separar (sin procesamiento adicional) los píxeles correspondientes a figura y fondo. En contraparte, en la figura 2.13c se tiene la misma imagen con un fondo uniformemente iluminado, donde al observar su histograma (Figura 2.13d) los valles correspondientes a fondo y figura son fácilmente diferenciables [31].

Capítulo 3

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio experimental, el cual se encuentra organizado en 5 fases: Síntesis de PC, caracterización de las propiedades ópticas de los PC, fijación en agarosa de los PC, obtención de imágenes *in vitro* por fluorescencia y procesamiento de las imágenes obtenidas (Figura 3.1).



Figura 3.1: Esquema general de la metodología del proyecto

Adicionalmente, la distribución de tareas (Diagrama de Gantt) se encuentra en la sección de anexos.

3.1 Síntesis de puntos de carbono

Se sintetizaron dos tipos de puntos de carbono con diferentes propiedades ópticas por el método bottom-up de microondas. Los primeros con fluorescencia verde (los cuales serán llamados como "verdes" en el desarrollo del trabajo) utilizando los materiales mostrados en la tabla 3.1. Ácido cítrico (AC) y urea fueron utilizados como precursores orgánicos y como solvente dimetilformamida.

Nombre	Fórmula molecular	Cantidad utilizada
Urea - Sigma Aldrich	CH_4N_2O	1.2 g
Ácido Cítrico Monohidrato - Scharlau	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	0.6 g
N,N-Dimetilformamida - R.A. Chemicals	C_3H_7NO	6.0 mL

Tabla 3.1: Materiales utilizados en los puntos de carbono "verdes".

Para los segundos PC, los cuales tienen fluorescencia azul (los cuales serán llamados como "azules" en el desarrollo del trabajo) se usaron los materiales mostrados en la tabla 3.2, el AC fue usado como precursor orgánico y como solventes una mezcla 1:1 (vol:vol) de etanol y dimetilformamida.

Nombre	Fórmula molecular	Cantidad utilizada
Ácido Cítrico Monohidrato - Scharlau	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	0.5 g
N,N-Dimetilformamida - R.A. Chemicals	C_3H_7NO	6.0 mL
Etanol Absoluto - Scharlau	C_2H_5OH	6.0 mL

Tabla 3.2: Materiales utilizados en los puntos de carbono "azules".

3.1.1. Síntesis de puntos de carbono por reacción de microondas

En ambos casos se siguió el mismo procedimiento: Los precursores sólidos se dispersan en los solventes definidos de acuerdo a la información detallada en las tablas 3.1 y 3.2, se homogeneiza la mezcla en un baño ultrasónico (Elmasonic Easy de Elma) aproximadamente por 5 minutos.

Como siguiente paso, se transfiere la solución obtenida a un tubo de reacción y se somete al calentamiento por microondas en un reactor MONOWAVE 50 (Anton Paar) (Figura 3.2). La configuración utilizada fue:

- Temperatura: 200 °C.
- Método: AFAP - As Fast As Possible.
- Tiempo: 5 minutos.



Figura 3.2: Microondas MONOWAVE 50 utilizado en la síntesis de puntos de carbono.

Posterior a esto, se confirma la formación de especies fluorescentes al exponer el producto de la reacción a una lámpara UV con una longitud de onda de excitación de 365 nm (λ_{exc} : 365nm).

3.1.2. Purificación de puntos de carbono

La solución obtenida se centrifuga a 10.000 rpm por 15 minutos en una mini centrifugadora (Thermo Scientific mySPIIN12) y filtrada (filtro de 0.20 μm (Minisart NY 25, PTFE)).

Por último, se realiza un procedimiento de separación por cromatografía por columna. Este es un método de purificación y separación cuidadosa de las diversas fracciones de PC. Esta técnica utiliza una fase estacionaria, que se embala en tubo de Pasteur con sílica y una fase móvil que pasa a través de la columna utilizando como solvente una mezcla 1:1 (vol:vol) de acetonitrilo con agua Milli-Q, de tal forma que se aprovechan las diferencias de polaridad entre compuestos, permitiendo que las moléculas se separen [79].

De esta forma, los fluoróforos moleculares que flotan libremente abandonan la columna primero, seguidos por PC altamente fluorescentes con fluoróforos unidos al núcleo de carbono y finalmente seguidos por partículas de carbono de baja fluorescencia sin fluoróforos [80](Figura 3.3).

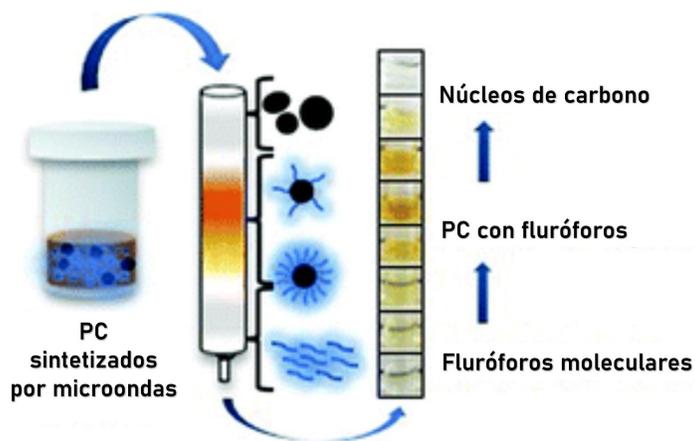


Figura 3.3: Esquema del fraccionamiento de PC por cromatografía por columnas [80]

Al culminar este proceso, se filtra de nuevo la solución obtenida y se pasa a una cápsula de Pietri para su secado en un horno convencional (UM100, Memmert) durante 12 horas a 110 °C.

3.2 Caracterización de las propiedades ópticas de los puntos de carbono

Con el fin de evaluar las propiedades ópticas de los PC obtenidos en función de la concentración de los mismos, se preparó una solución de PC dispersados en agua destilada con concentración de 5 mg/mL.

3.2.1. Espectrofotometría UV-Vis para la determinación de las propiedades ópticas de los puntos de carbono

Los espectros de absorción se midieron usando un espectrofotómetro FLAMES-S-XR1 de Ocean Insight, el cual trabaja con el software Ocean View, junto al equipo se utilizó celda de cuarzo de 1cm de paso óptico.

Los espectros de emisión fueron tomados con el equipo Cytation 3 en conjunto con el software Gen5. Las longitudes de onda de excitación usadas corresponden a los cubos LED disponibles del módulo de imagen de dicho equipo: Se utilizó una longitud de onda de 377 nm

(Correspondiente al filtro azul: DAPI), seguido de una de 469 nm (Correspondiente al filtro verde: GFP) y de 377 nm (Correspondiente al filtro rojo: RFP).

3.2.1.1 Filtrado de los espectros de absorción

Los filtros de mediana son una técnica no lineal de procesamiento de señales que consiste en una ventana deslizante que abarca un número par de píxeles. El píxel central de la ventana se reemplaza por la mediana de los píxeles que se encuentran en la ventana y así se continúa el procedimiento hasta recorrer toda la señal. Al igual que el filtrado de paso bajo, el filtrado medio suaviza la señal, por tanto, es útil para reducir el ruido y de la misma forma puede preservar las discontinuidades [73].

Se implementó en la plataforma MatLab® un filtro de mediana de 1D con orden 20 ($N=20$), mediante la utilización del comando *medfilt1*, con el fin de remover el ruido de la señal correspondiente al espectro de absorción de las especies en estudio para así lograr su fácil visualización y análisis (Figura 3.4).

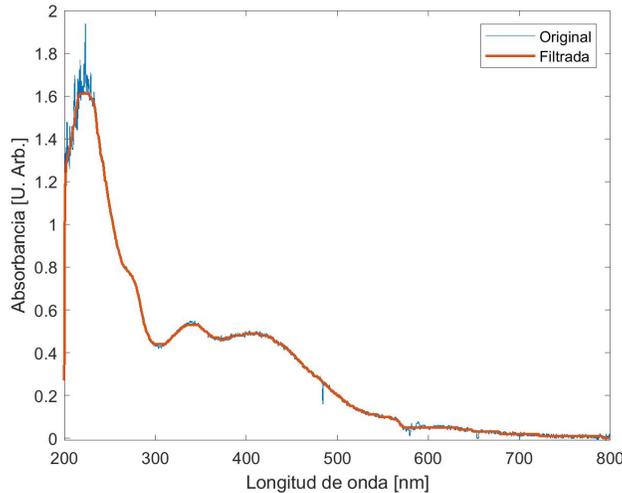


Figura 3.4: Comparación de la señal del espectro de absorción original y la señal con el filtro de mediana aplicado para los PC “verdes”.

3.3 Fijación de puntos de carbono en agarosa

Para facilidad en el momento de la captación de imágenes, se busca que los PC no tengan movimiento, por lo cual se realizó una fijación de las mismas en agarosa de bajo punto de fusión. Para cumplir este fin, se propone un método modificado del protocolo de ensayo cometa [81].

Como primer paso, se calentó la agarosa en un microondas por 15 segundos. Luego en el equipo AccuBlock™ Digital Dry Nath de LabNet a una temperatura de aproximadamente 38°C, se combinaron y mezclaron por medio de una pipeta los PC con la agarosa (Figura 3.5).

A partir de la solución madre se prepararon 7 diluciones en agarosa a concentraciones de 1µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 125µg/mL, 250µg/ml y 500µg/ml (Figura 3.6).



Figura 3.5: Preparación de las muestras de agarosa y PC

Estos valores fueron elegidos tomando en cuenta las concentraciones con las que actualmente se trabaja en los ensayos de evaluación de citotoxicidad de PC en diferentes líneas celulares usadas en los proyectos de los grupos de investigación GIBIOME e Investigación Clínica de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario.

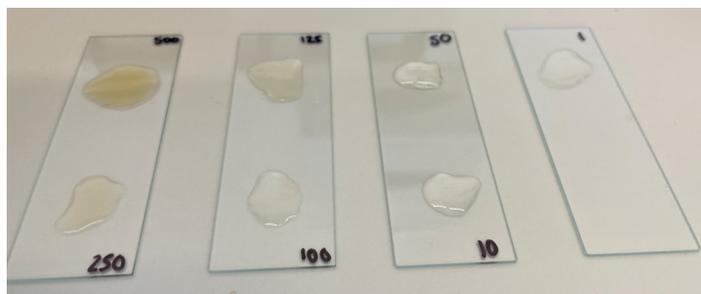


Figura 3.6: Fijación de PC en agarosa

Al terminar la preparación, se transfirieron 100 μ l de las soluciones a un portaobjetos y luego se refrigeraron a 4°C por 15 minutos. Por último, al culminar el tiempo establecido, se realizó un lavado de cada portaobjetos con agua destilada por 5 minutos, seguido de un lavado con Etanol al 99% también por 5 minutos con el fin de deshidratar la agarosa y lograr un grosor uniforme en todas las muestras [81].

3.4 Obtención de imágenes *in vitro* por fluorescencia

Se utilizó el lector multimodal Cytation 3 en conjunto al software Gen5 (figura 3.7) para la obtención de las imágenes por fluorescencia con los objetivos de 10x y 20x (disponibles en el momento en el laboratorio).

Como primer paso se obtuvieron imágenes por fluorescencia de microesferas de 1 μ m, con el fin de ser tomadas de punto de referencia en los parámetros a utilizar para la obtención de imágenes de los PC.

Posteriormente, se analizaron los espectros de emisión de los PC (obtenidos en la sección

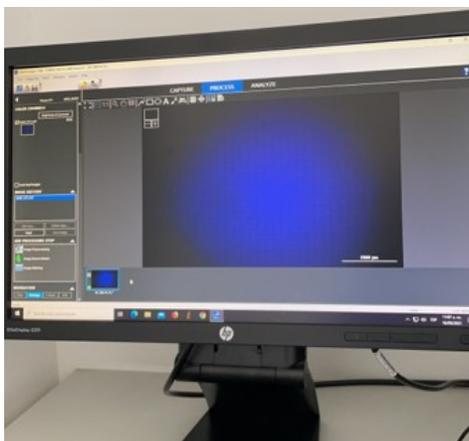


Figura 3.7: Obtención de imágenes *in vitro* por fluorescencia mediante la utilización del equipo Cytation 3 y el software Gen5

3.2) para las tres longitudes de onda correspondientes a los filtros DAPI, GFP y RFP con el fin de determinar en cual existe una mayor área bajo la curva y por tanto, en cual de estos deben fijarse los parámetros para la captación de imágenes.

Para cada concentración y tipo de PC se captaron entre 3 y 5 imágenes en cada filtro. Se variaron los parámetros de: Longitud focal, intensidad del LED, tiempo de integración y ganancia de la cámara, con el fin de obtener imágenes nítidas y evitar la saturación de píxeles en las imágenes. Una ventaja del software Gen5 es que muestra los histogramas de la imagen a ser captada y allí se puede identificar la presencia de saturación (Figura 3.8).

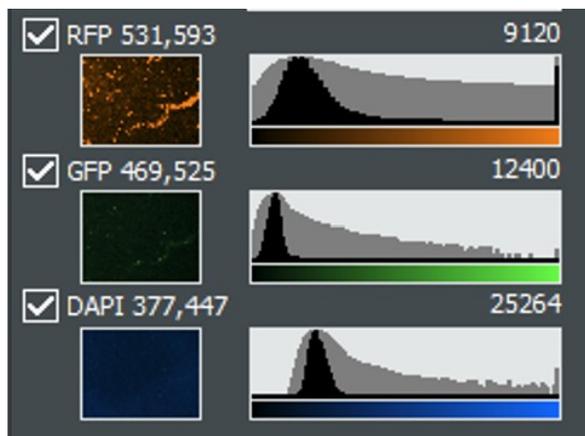


Figura 3.8: Ejemplificación de los histogramas en 3 imágenes de fluorescencia tomadas en el Cytation

Por último, se realizaron ensayos preliminares de la obtención de imágenes por fluorescencia utilizando bases más complejas: células Vero. Para la preparación de estas, se sembraron 50.000 células por pozo y se incubaron por 24 horas con PC de AC, urea y aminoácidos (histidina o arginina) a concentraciones de $50\mu\text{g/ml}$, $125\mu\text{g/mL}$, $250\mu\text{g/ml}$ y $500\mu\text{g/ml}$. Seguido, se fijaron las células con formaldehído al 4%, cloruro de amonio y se realizaron lavados con

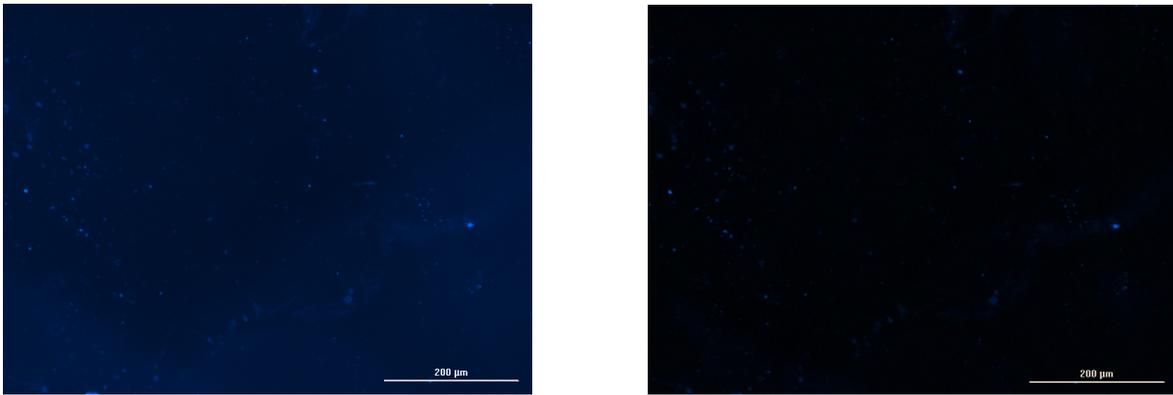
PBS, para finalizar, se agregó Hoeschst para el bioetiquetado del núcleo [82].

3.5 Procesamiento de imágenes

Ya obtenidas las imágenes en la etapa anterior, se debe realizar un procesamiento de las mismas para su caracterización y clasificación.

3.5.1. Corrección de iluminación no uniforme

Controlar los factores de diferenciación de fondo y figura (expuestos en la sección 2.4.2.4) es uno de los primeros pasos a considerar en la solución de un problema de segmentación [31]. Por tanto, se implementó el algoritmo de filtrado morfológico de sombrero superior en la plataforma de programación y computación numérica MatLab ®[75], mediante la función *imtophat* con un elemento estructurante de forma de disco para eliminar el fondo no uniforme de la imagen y así solo visualizar los conglomerados de PC para su posterior análisis.



(a) Imagen original

(b) Imagen con el filtro implementado

Figura 3.9: Comparación de la imagen original y de la imagen al implementar el filtrado morfológico de sombrero superior

3.5.2. Análisis estadístico de las imágenes obtenidas

Para el análisis estadístico, se realizaron dos cálculos: el área bajo la curva (AUC) de cada espectro de emisión de los dos tipos de PC, y el AUC del histograma de las imágenes obtenidas, para así tener una base de la cantidad de información correspondiente a cada filtro y correlacionar ambos cálculos.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos del proceso de síntesis de los puntos de carbono por el método de reacción por microondas, la caracterización óptica de los mismos y la obtención en el Cytation y procesamiento de imágenes por fluorescencia.

4.1 Síntesis de puntos de carbono

Se sintetizaron PC siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.1. Posteriormente, se confirmó la formación de especies fluorescentes al irradiar las soluciones obtenidas con una lámpara UV (λ_{exc} : 365nm) (Figura 4.1).



Figura 4.1: Formación de especies fluorescentes, a la izquierda, de PC "verdes" y a la derecha, de PC "azules" bajo la irradiación con una lámpara UV (λ_{exc} : 365nm)

Al completar el procedimiento de separación por cromatografía por columnas se obtuvo una serie de muestras de PC fraccionados las cuales muestran la tendencia de color típica del fraccionamiento dentro de la columna de cromatografía. El color y la concentración de PC se intensifica durante la primera mitad de la separación y luego disminuye, tal como lo indica la literatura revisada [80].

Fue posible separar fracciones de fluoróforos, productos orgánicos, PC con fluoróforos y por último, núcleos de carbono y dominios orgánicos, tal como se observa en la figura 4.3.



Figura 4.2: Resultado obtenido al completar el proceso de cromatografía por columnas

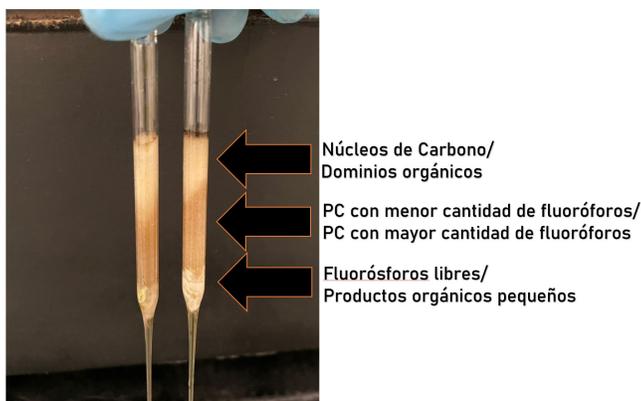


Figura 4.3: Fraccionamiento de los CD por cromatografía por columnas visto en la pipeta Pasteur

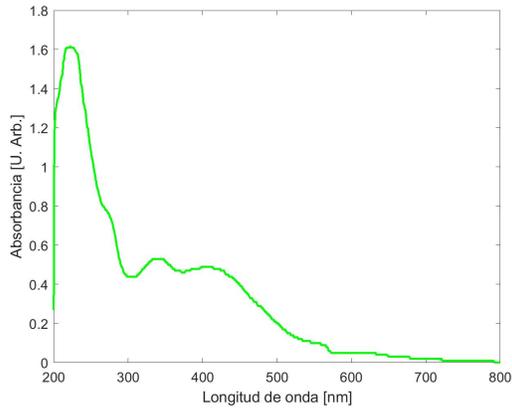
4.2 Caracterización de las propiedades ópticas de los puntos de carbono

Se utilizó espectrofotometría UV-Vis para la determinación de las propiedades ópticas de los PC siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.

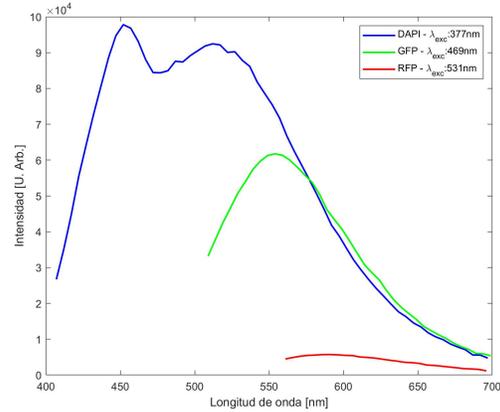
4.2.1. Puntos de carbono “verdes”

El espectro de absorción de los PC “verdes” se muestra en la Figura 4.4a. Se puede observar como para la concentración de $5 \mu\text{g/ml}$ existen dos bandas de absorción centradas a las longitudes de onda de mayor transición [83]. Los máximos en esta banda de absorción están alrededor de los 220 nm, 380 nm y 430 nm, esto se da ya que estas longitudes de onda contienen la energía suficiente para excitar los electrones de los PC, y es atribuida a transiciones electrónicas de tipo $\pi - \pi^*$ que involucran carbonos aromáticos sp^2 (enlaces aromáticos $\text{C}=\text{C}$), transiciones $n - \pi^*$ asociadas a enlaces $\text{C}=\text{O}$ de los grupos carboxilo aportados por el ácido cítrico y enlaces $\text{C}=\text{N}$ aportados por la urea [84].

Se obtuvieron espectros de emisión al excitar los PC a 3 longitudes de onda distintas correspondientes a los cubos LED del módulo de imágenes del cytation (Figura 4.4b). A una longitud de onda de irradiación de 531 nm, emisión a longitudes de onda entre los 400 y 550 nm, posteriormente a una longitud de onda de 469 nm se observa emisión entre los 500 y 600 nm y por último, a una longitud de onda de 377 nm, se tiene emisión a 570 y 650 nm. Esta información permite conocer las longitudes de onda a las que deben ser excitadas los PC para obtener la mayor intensidad de fluorescencia posible.



(a) Espectro de Absorción de los PC "verdes"

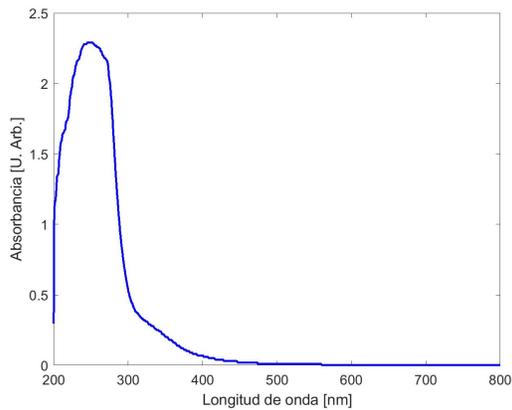


(b) Espectro de Emisión de los PC "verdes"

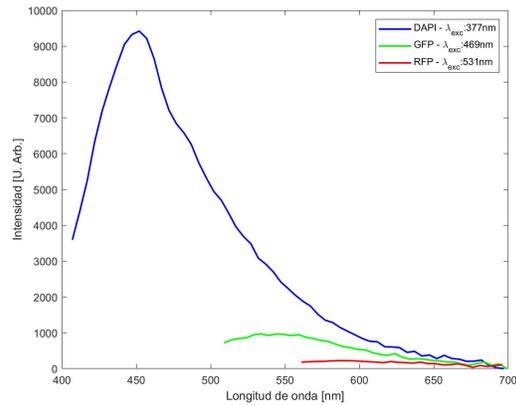
Figura 4.4: Caracterización de las propiedades ópticas de los PC "verdes" a una concentración de $5 \mu\text{g/ml}$

4.2.2. Puntos de carbono "azules"

El espectro de absorción de los PC "azules" se muestra en la Figura 4.5a. Se puede observar como para la concentración de $5 \mu\text{g/ml}$ existe una banda de absorción centrada a la longitud de onda de mayor transición [83]. El máximo de esta banda está centrado a longitudes de onda entre los 200 y 300 nm, esto se da ya que estas longitudes de onda contienen la energía suficiente para excitar los electrones de los PC, y es atribuida a transiciones electrónicas de tipo $\pi - \pi^*$ que involucran carbonos aromáticos sp^2 (enlaces aromáticos C=C) [84].



(a) Espectro de Absorción de los PC "azules"



(b) Espectro de Emisión de los PC "azules"

Figura 4.5: Caracterización de las propiedades ópticas de los PC "Verdes" a una concentración de $5 \mu\text{g/ml}$

A una longitud de onda de irradiación de 531 nm, se obtuvo emisión a longitudes de onda entre los 400 y 550 nm, posteriormente a una longitud de onda de 469 nm se observa emisión entre los 500 y 600 nm y por último, a una longitud de onda de 377 nm, se tiene emisión a

550 y 600 nm, tal como se observa en la Figura 4.5.

Por último, se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) de los espectros de absorción y emisión de los PC sintetizados, para su posterior uso en la fijación de los parámetros al momento de captar imágenes y en el análisis estadístico de las imágenes. Obteniendo que la mayor AUC se encuentra en la longitud de excitación de 531 nm correspondiente al filtro DAPI.

Tabla 4.1: Áreas bajo la curva de los espectros de emisión y absorción de los PC utilizados

Especie	AUC Espectro de emisión			AUC Espectro de absorción
	λ_{exc} : 377 nm	λ_{exc} : 469 nm	λ_{exc} : 531 nm	
PC "verdes"	$3.21 \cdot 10^6$	1297087	106235	460.21
PC "azules"	$1.92 \cdot 10^5$	20044	4235	442.74

4.3 Obtención y procesamiento de imágenes *in vitro* por fluorescencia

Se captaron imágenes por fluorescencia en el lector multimodal Cytation 3 en tres especies distintas: microesferas como estándares de referencia, puntos de carbono y células Vero incubadas con 2 tipos de fluoróforos distintos (Hoeschst y PC).

4.3.1. Estándares de Referencia

Se captaron imágenes por fluorescencia de microesferas de $1\mu\text{m}$, las cuales fueron tomadas como punto de referencia para la obtención de las imágenes de los PC (Figura 4.6).

4.3.2. Imágenes por fluorescencia de puntos de carbono

Al revisar los espectros de emisión de los PC (Figuras 4.5a y 4.4a) y sus respectivas AUC, la curva correspondiente a la longitud de onda de 377 nm (DAPI) contiene la mayor cantidad de información con respecto al filtro GFP y el filtro RFP, motivo por el cual se eligió al filtro DAPI para fijar los parámetros de obtención de imágenes por fluorescencia.

Los parámetros de entrada del módulo de imágenes del Cytation (software Gen5) fueron ajustados para cada concentración, tal como se observa en la tabla 4.2. Al realizar el análisis de este resultado, se destaca que existe una relación inversa entre la concentración de PC y los parámetros de intensidad de LED y ganancia de la cámara, asociada a la relación proporcional que se tiene entre la concentración de PC y intensidad de la fluorescencia.

Posterior a la fijación de parámetros, se captaron imágenes en función de la concentración de PC siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3.2, siendo $1\mu\text{g}/\text{ml}$ la mínima y $500\mu\text{g}/\text{ml}$ la máxima concentración detectable. En las imágenes mostradas (Figura 4.7 - Figura 4.8) se observan conglomerados de PC luego de corregir su iluminación.

Por último, al calcular el AUC de los histogramas de 42 imágenes obtenidas y compararlo con las AUC de los espectros de absorción y emisión de los PC utilizados (tabla 4.1) se obtuvo que existe una relación lineal entre estos, es decir, la mayor cantidad de información se encuentra en las imágenes captadas con el filtro DAPI.

Tabla 4.2: Parámetros para la obtención de imágenes *in vitro* por fluorescencia utilizando PC

Concentración de PC	Longitud Focal (μm)	Intensidad del LED	Tiempo de integración (ms)	Ganancia de la Cámara
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1350-1420	5-10	2400-2600	8-12
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1400-1500	5-9	2380-2550	6-11
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1400-1550	5-8	2300-2550	5-11
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1350-1500	3-7	2100-2400	5-10
125 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1350-1500	3-7	2100-2400	5-10
250 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1400-1550	<4	<1000	<5
500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1400-1550	<4	<1000	<5

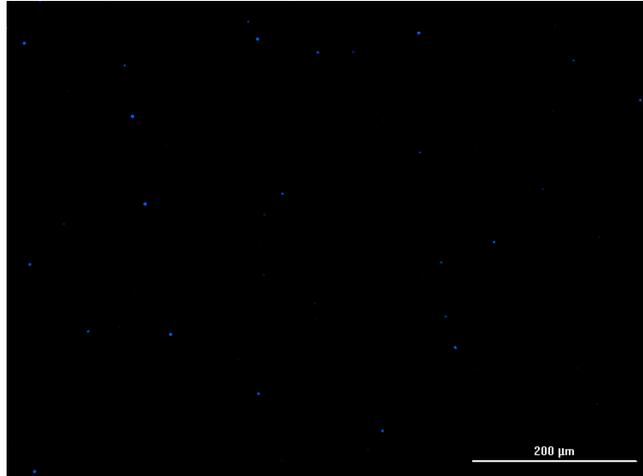
4.3.3. Imágenes por fluorescencia de células

Se captaron imágenes por fluorescencia de células Vero (Figura 4.9) incubadas con dos fluoróforos Hoeschst para el bioetiquetado del núcleo y PC a concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, utilizando como parámetros de entrada al software Gen 5 los rangos mostrados en la tabla 4.3.

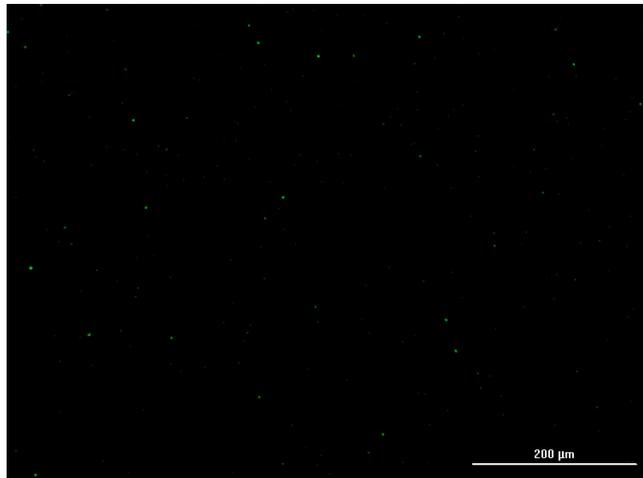
Al realizar el procesamiento de las imágenes captadas se observó aumento en la cantidad de detalles morfológicos visualizables en las células (Figura 4.10).

Tabla 4.3: Parámetros para la obtención de imágenes por fluorescencia de células

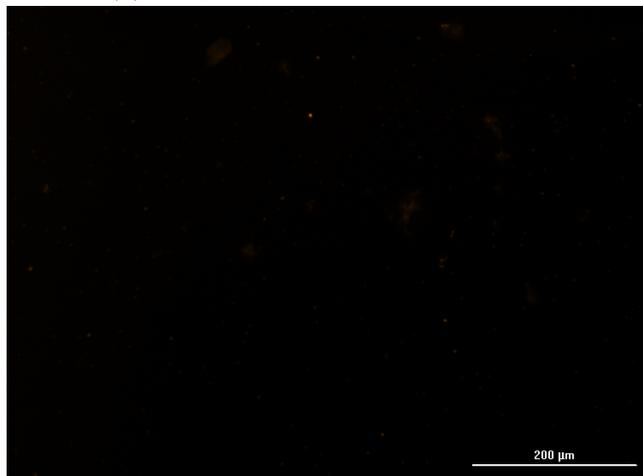
Objetivo	Longitud Focal (μm)	Intensidad del LED	Tiempo de integración (ms)	Ganancia de la Cámara
20x	2500-2600	4-8	<1000	5-10



(a) Imagen obtenida con el filtro DAPI

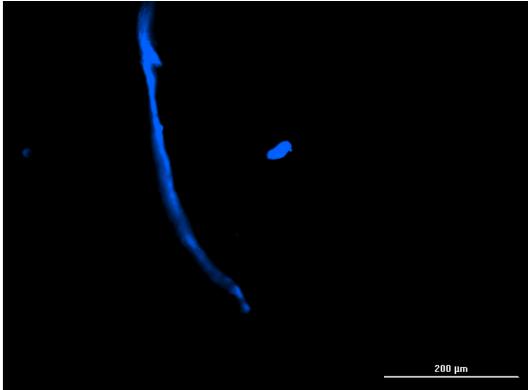


(b) Imagen obtenida con el filtro GFP

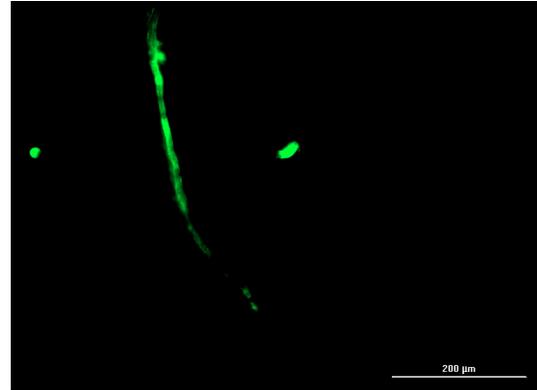


(c) Imagen obtenida con el filtro RFP

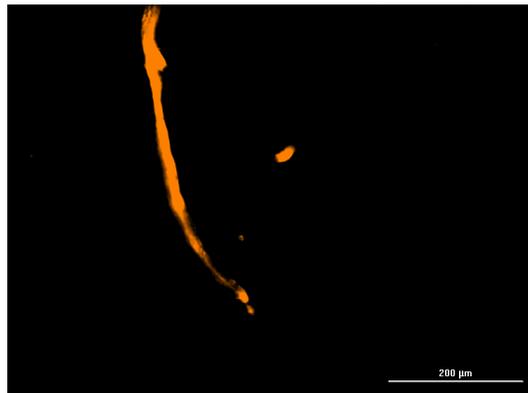
Figura 4.6: Imágenes obtenidas en el Cytation de las microesferas de $1\mu\text{m}$



(a) Imagen obtenida con el filtro DAPI

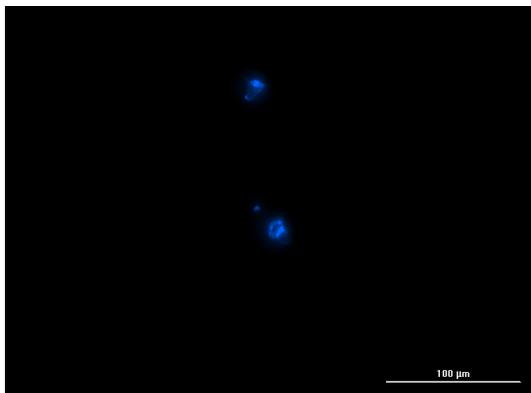


(b) Imagen obtenida con el filtro GFP

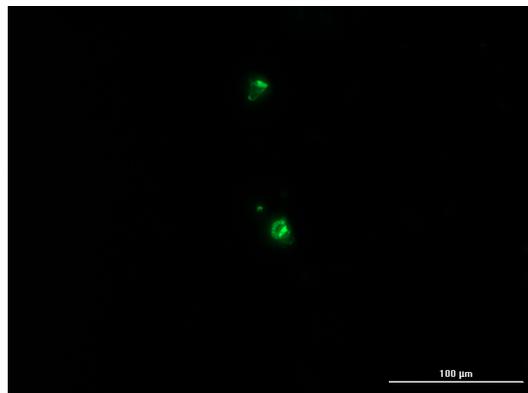


(c) Imagen obtenida con el filtro RFP

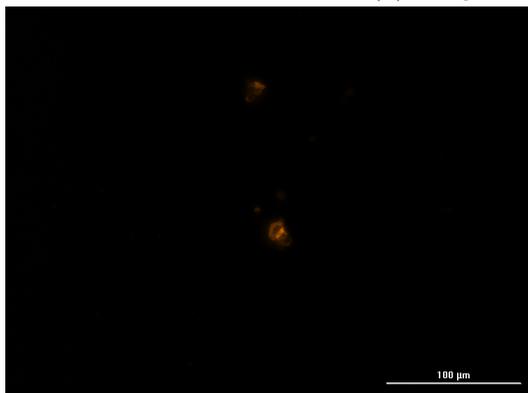
Figura 4.7: Imágenes obtenidas en el Cytation de los PC "azules" a una concentración de $10\mu\text{g/ml}$



(a) Imagen obtenida con el filtro DAPI

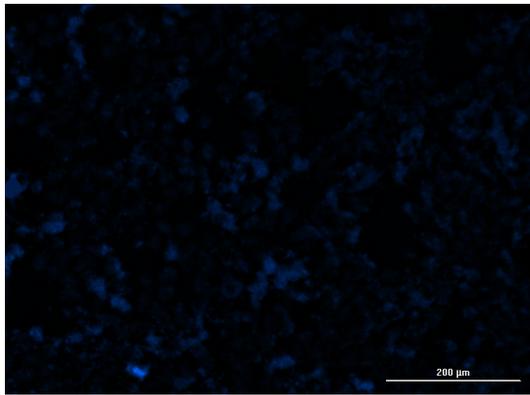


(b) Imagen obtenida con el filtro GFP

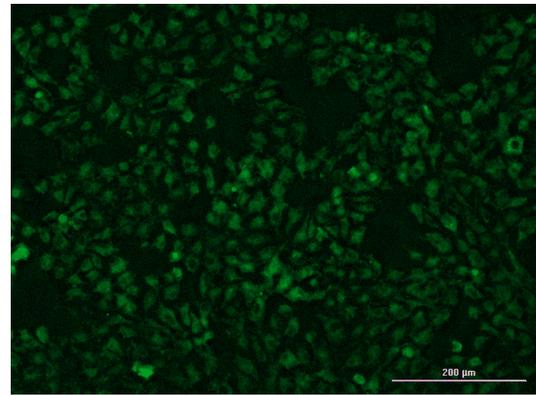


(c) Imagen obtenida con el filtro RFP

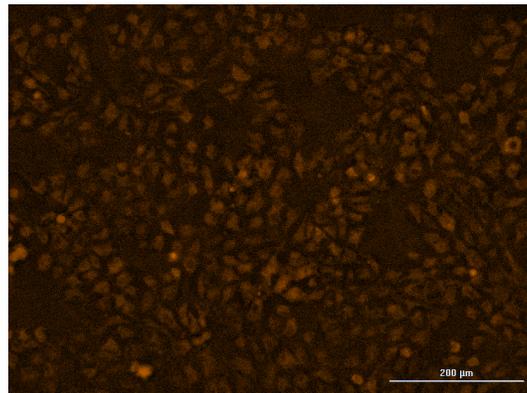
Figura 4.8: Imágenes obtenidas en el Cytation de los PC "verdes" a una concentración de $10\mu\text{g/ml}$



(a) Imagen obtenida con el filtro DAPI

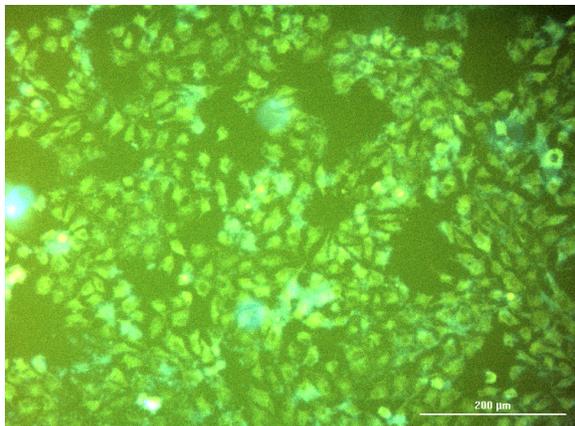


(b) Imagen obtenida con el filtro GFP

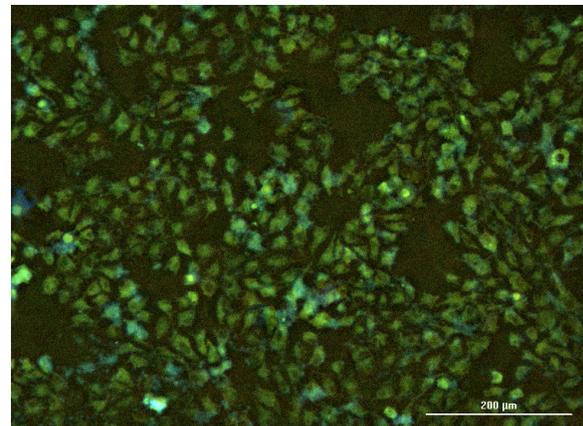


(c) Imagen obtenida con el filtro RFP

Figura 4.9: Imágenes obtenidas en el Cytation de las células con PC a una concentración de $500\mu\text{g}/\text{ml}$



(a) Solape de las imágenes sin procesar



(b) Solape de las imágenes procesadas

Figura 4.10: Diferencias entre las imágenes sin procesar (a) y luego de la corrección de iluminación no uniforme (b)

Capítulo 5

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos de la investigación, enfocados a la obtención de imágenes *in vitro* por fluorescencia utilizando PC como agentes de contraste mediante la utilización de un lector multimodal, se logró la obtención de las mismas en términos de PC fijados en agarosa y células incubadas con fluoróforos (Hoeschst para bioetiquetado del núcleo y PC).

Se realizó la síntesis de PC por método de reacción por microondas que exhibieron: en el caso de los "verdes" absorción a longitudes de onda entre los 200 y 500 nm y bajo la irradiación de luz de 531 nm, emisión a longitudes de onda entre los 400 y 650 nm y en los PC "azules" absorción a longitudes de onda entre los 200 y 300 nm y bajo la irradiación de luz de 531 nm, emisión a longitudes de onda entre los 400 y 550 nm. Por lo cual, se concluye que al utilizar como solvente la dimetilformamida se tiene un impacto significativo en las propiedades ópticas presentadas por los PC, atribuidas a los grupos funcionales presentes en dichos solventes.

Se encontró que la concentración de PC tiene una relación inversa con los parámetros de intensidad del LED y ganancia de la cámara. La mínima y máxima concentración detectable fue de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 500 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. En el lector multimodal es imperativo fijar los parámetros correctamente al momento de captar imágenes, teniendo en cuenta que se afectan la calidad de las imágenes con la aparición de píxeles saturados.

Para el procesamiento de las imágenes obtenidas en el lector multimodal, se propone realizar una corrección de la iluminación no uniforme, para así tener una mejor distinción de los detalles de dichas imágenes.

Con los resultados obtenidos hasta el momento se concluye que la obtención de imágenes por fluorescencia usando puntos de carbono como agentes de contraste mediante la utilización del equipo Cytation 3 es una alternativa efectiva, a bajo costo y viable al alcance de los grupos de investigación de la Universidad del Rosario. Lo desarrollado mediante la utilización de células es solo un acercamiento de las imágenes que pueden ser obtenidas, por lo que se deben continuar trabajando con PC con distintas propiedades ópticas de fluorescencia.

Capítulo 6

RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

6.1 Recomendaciones

Se recomienda correlacionar las imágenes obtenidas por el método propuesto con otras modalidades de imagen. Adicionalmente, ampliar la investigación utilizando otros PC con propiedades ópticas de fluorescencia distintos. A su vez, obtener imágenes utilizando objetivos de magnificación mayor, así como cubos LED con rangos de excitación y emisión distintos, principalmente hacia las longitudes de onda correspondientes al rojo.

6.2 Trabajos futuros

En términos generales, a corto plazo se plantea conformar una base de datos con imágenes por fluorescencia de células utilizando PC con propiedades de ópticas distintas (teniendo en cuenta que en la presente investigación solo se utilizaron dos) y a distintas concentraciones para así caracterizar e identificar las mismas en regiones de interés con y sin presencia de PC.

En la misma línea de ideas, a largo plazo se propone implementar un aplicación complementaria al software Gen5 la cual detecte y clasifique los fluoróforos utilizados en imágenes por fluorescencia solo bajo la introducción de los espectros de emisión y absorción a dicho programa.

Bibliografía

- [1] G. Ferro, F. Ramírez, B. E. Ocampo, E. M. Avila, C. L. Santos y A. Mendoza, «Radiofármacos: nanopartículas como sistemas multifuncionales para la obtención in vivo de imágenes moleculares,» en *Contribuciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares al Avance de la Ciencia y la Tecnología en México*, México: ININ, 2010, cap. 2.
- [2] R. Weissleder y V. Ntziachristos, «Shedding light onto live molecular targets,» *Nature Medicine*, vol. 9, n.º 1, págs. 123-128, 2003.
- [3] M. M. Corona, «Diseño y síntesis de borinatos con potencial aplicación para la obtención de imágenes por fluorescencia,» Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2017.
- [4] M. Monteleone, *Fluorescencia*, [En Línea]. dirección: <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504634347.pdf>.
- [5] V. Prasad, D. Semwogerere y E. R. Weeks, «Confocal microscopy of colloids,» vol. 19, 2007.
- [6] D. Narváez, *La Microscopía: Herramienta para estudiar células y tejidos*. Mérida, Venezuela: Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes, [En línea].
- [7] J. Rao, A. Dragulescu-Andrasi y H. Yao, «Fluorescence imaging in vivo: recent advances,» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 18, n.º 1, págs. 17-25, 2007.
- [8] C. Stringari, L. Abdeladim, G. Malkinson, P. Mahou, X. Solinas, I. Lamarre, S. Brizion, J.-B. Galey, W. Supatto, R. Legouis, A.-M. Pena y E. Beaurepaire, «Multicolor two-photon imaging of endogenous fluorophores in living tissues by wavelength mixing,» *Scientific Reports*, vol. 7, n.º 1, págs. 1-11, 2017.
- [9] P. Koutsogiannis, E. Thomou, H. Stamatis, D. Gournis y P. Rudolf, «Advances in fluorescent carbon dots for biomedical applications,» *Advances in Physics: X*, vol. 5, n.º 1, 2020.
- [10] J. Lifante, Y. Shen, E. Ximendes, E. Martín-Rodríguez y D. Ortgies, «The role of tissue fluorescence in in vivo optical bioimaging,» *Journal of Applied Physics*, vol. 128, n.º 17, 2020.
- [11] D. C. Rodríguez, «Development of CaS:Eu²⁺/Dy³⁺ Persistent and NIR Photo-Stimulated Nanophosphors,» Tesis doct., Concordia University, Faculty of Arts, Science, Chemistry y Biochemistry, Montreal, Canada, 2017.

- [12] F. Bacic, P. Cabrera, C. Zamorano y J. Villar, *Fluorescencia*, Laboratory for Scientific Image Analysis, 2014 [En Línea]. dirección: <http://www.scian.cl/archivos/uploads/1409836870.8698>.
- [13] A. M. Ibarra-Ruiz, D. C. Rodríguez y J. A. Capobianco, «Photoluminescent nanoplatforms in biomedical applications,» *Advances in Physics: X*, vol. 1, n.º 2, págs. 194-225, 2016.
- [14] R. Alford, H. Simpson, J. Duberman, C. Hill, M. Ogawa, C. Regino, H. Kobayashi y P. ChoykeFirst, «Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular Imaging: Literature Review,» *Molecular Imaging*, vol. 3, n.º 6, págs. 341-354, 2009.
- [15] V. J. Mohanraj e Y. Chen, «Nanoparticles - A review,» *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 5, n.º 1, págs. 561-573, 2006.
- [16] A. Adewuyi y W. Lau, «Nanomaterial development and its applications for emerging pollutant removal in water,» en *Handbook of Nanotechnology Applications*, Elsevier, 2020, cap. 3.
- [17] P. Kumbhakar, S. Ray y A. Stepanov, «Optical Properties of Nanoparticles and Nanocomposites,» *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, 2014.
- [18] T. Medeiros, J. Manioudakis, F. Noun, J.-R. Macairan, F. Victoriaab y R. Naccache, «Microwave-assisted synthesis of carbon dots and their applications,» *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 7, n.º 24, págs. 7175-7195, 2019.
- [19] S. Ross, R.-S. Wu, S.-C. Wei, G. Ross y H.-T. Chang, «The analytical and biomedical applications of carbon dots and their future theranostic potential: A review,» *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 28, n.º 4, págs. 677-695, 2020.
- [20] U. Kumar, B. Bhushan y P. Gopinath, «Bioactive carbon dots lights up microtubules and destabilises cell cytoskeletal framework - A robust imaging agent with therapeutic activity,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 159, págs. 662-672, 2017.
- [21] T. Pal, S. Mohiyuddin y G. Packirisamy, «Facile and Green Synthesis of Multicolor Fluorescence Carbon Dots from Curcumin: In Vitro and in Vivo Bioimaging and Other Applications,» *ACS Omega*, vol. 3, n.º 1, págs. 831-843, 2018.
- [22] T. Lammers, L. Rizzo, G. Storm y F. Kiessling, «Personalized nanomedicine,» *Clinical Cancer Research*, vol. 18, n.º 18, págs. 4889-4894, 2012.
- [23] J. Liu, R. Li y B. Yang, «Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications,» *ACS Central Science*, vol. 6, n.º 12, págs. 2179-2195, 2020.
- [24] F. Du, M. Zhang, X. Li, J. Li, X. Jiang, Z. Li, Y. Hua, G. Shao, J. Jin, Q. Shao, M. Zhou y A. Gong, «Economical and green synthesis of bagasse-derived fluorescent carbon dots for biomedical applications,» *Nanotechnology*, vol. 25, n.º 31, 2014.
- [25] S.-T. Yang, L. Cao, P. G. Luo, F. Lu, X. Wang, H. Wang, M. J. Meziani, Y. Liu, G. Qi e Y.-P. Sun, «Carbon Dots for Optical Imaging in vivo,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, n.º 32, págs. 11 308-11 309, 2010.
- [26] H. Ali, S. Ghosh y N. R. Jana, «Fluorescent carbon dots as intracellular imaging probes,» *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 12, n.º 4, págs. 561-573, 2020.

- [27] A. López-Macay, J. Fernández-Torres y A. Zepeda, «Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica,» *Investigación en Discapacidad*, vol. 5, n.º 3, págs. 156-164, 2016.
- [28] A. M.-N. A. Sampedro J. Toyos, *Técnicas de Fluorescencia en Microscopía y Citometría*. Universidad de Oviedo, 1995.
- [29] *Cytation: Hybrid Multi-Mode Reader*, Biotek Instruments, [En Línea]. dirección: <https://www.biotek.com/products/detection-multi-mode-microplate-readers/cytation-hybrid-multi-mode-reader/>.
- [30] *Cytation: Multi-mode plate reader with sophisticated imaging*, Biotek Instruments, [En Línea]. dirección: <https://www.biotek.es/es/products/imaging-microscopy-cell-imaging-multi-mode-readers/cytation-5-cell-imaging-multi-mode-reader/#3>.
- [31] R. Gonzalez y R. E. Woods, *Digital Image Processing*, 3.^a ed. Prentice Hall, 2008.
- [32] K. Najarian y R. Splinter, *Biomedical Signal and Image Processing*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012.
- [33] *Medical Imaging*, Food and Drugs Administration, 2018 [En Línea]. dirección: <https://www.fda.gov/radiation-emitting-products/radiation-emitting-products-and-procedures/medical-imaging>.
- [34] J. Barabe, *What is Scientific Imaging, and Why is it Special?* The McCrone Group, 2018 [En Línea]. dirección: <https://www.mccrone.com/mm/scientific-imaging-webinar/>.
- [35] P. Alvarado, *Proceso de Formación de Imágenes*, Tecnológico de Costa Rica, Maestría en Ingeniería Electrónica [En Línea]. dirección: <https://www.tec.ac.cr/sites/default/files/media/doc/lec02.2.pdf>.
- [36] *What is Bioimaging?* Center for Advanced Bioimaging, Denmark, University of Copenhagen [En Línea]. dirección: https://cab.ku.dk/what_is_bioimaging/.
- [37] R. Atchudana, T. N. Edison, S. Perumal, C. Sagaya e Y. R. Leea, «Green synthesized multiple fluorescent nitrogen-doped carbon quantum dots as an efficient label-free optical nanoprobe for in vivo live-cell imaging,» *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 372, págs. 99-107, 2019.
- [38] T. Thurn, E. Brown, A. Wu, S. Vogt, B. Lai, J. Maser, T. Paunesku y G. Woloschak, «Nanoparticles for Applications in Cellular Imaging,» *Nanoscale Research Letters*, vol. 2, n.º 9, págs. 430-441, 2007.
- [39] C. Matea, T. Mocan, F. Tabaran, T. Pop, O. Mosteanu, C. Puia, C. Iancu y L. Mocan, «Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications,» *Internacional Journal of Nanomedicine*, vol. 12, págs. 5421-5431, 2017.
- [40] J. Du, N. Xu, J. Fan, W. Sun y X. Peng, «Nanoparticles for Applications in Cellular Imaging,» *Small Nanomedicine*, vol. 15, n.º 32, 2019.
- [41] E.-K. Lim, T. Kim, S. Paik, S. Haam, Y.-M. Huh y K. Lee, «Nanomaterials for Theranostics: Recent Advances and Future Challenges,» *Chemical Reviews*, vol. 115, n.º 1, págs. 327-394, 2015.

- [42] H. Wang, X. Li, B. Wan-Chi, H. Yang, C. Thorling, Y. Liu, M. Touraud, B. Chouane, X. Liu, M. Roberts y X. Liang, «Indocyanine green-incorporating nanoparticles for cancer theranostics», *Theranostics*, vol. 8, n.º 5, págs. 1227-1242, 2018.
- [43] A. Naumova, M. Modò, C. Murry y J. Frank, «Clinical imaging in regenerative medicine», vol. 32, págs. 804-818, 2014.
- [44] D. C. Rodríguez Burbano, R. Naccache y J. A. Capobianco, «Chapter 273 - Near-IR Triggered Photon Upconversion: Imaging, Detection, and Therapy», en, ép. Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, J.-C. Bünzli y V. K. Pecharsky, eds., vol. 47, Elsevier, 2015, págs. 273-347.
- [45] R. Zeineldin, «Nanotechnology for cancer screening and diagnosis», *Biomaterials for Cancer Therapeutics*, págs. 137-164, 2013.
- [46] L. Martí-Bonmatí, R. Sopena, P. Bartumeus y P. Sopena, «Multimodality imaging techniques», *Contrast Media & Molecular Imaging*, vol. 5, n.º 4, págs. 180-189, 2010.
- [47] D. Jaque, C. Richard, B. Viana, K. Soga, X. Liu y J. G. Solé, «Inorganic nanoparticles for optical bioimaging», *Advances in Optics and Photonics*, vol. 8, n.º 1, págs. 1-103, 2016.
- [48] S. Andersson-Engels, C. Klinteberg, K. Svanberg y S. Svanberg, «In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics», *Physics in Medicine Biology*, vol. 42, n.º 5, págs. 815-824, 1997.
- [49] B. Herman, «Fluorescence Microscopy», *Current Protocols in Cell Biology*, vol. 0, n.º 1, págs. 4.2.1-4.2.10, 2002.
- [50] J. Slavík, *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*. New York, NY, USA: Springer US, 1996.
- [51] J. W. L. 1 y J.-A. Conchello, «Fluorescence Microscopy», *Nature Methods*, vol. 2, n.º 12, págs. 910-919, 2005.
- [52] A. Expósito, F. Fanjul y J. Arce, «Análisis de propiedades espectroscópicas de fluoróforos utilizados en el diagnóstico clínico», en *XXXVI Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB)*, 2018, págs. 217-220.
- [53] M. A. Corti, «Aplicación de técnicas ópticas sobre tejidos y fluidos corporales para el diagnóstico no invasivo de enfermedades oncológicas», Tesis doct., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina, 2020.
- [54] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nischke y T. Nann, «Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels», *Nature Methods*, vol. 5, n.º 9, págs. 763-775, 2008.
- [55] S. Barrera, *Síntesis de puntos de carbono y revisión de su citotoxicidad en tumores de mama*, Bogotá, 2020.
- [56] X. Xu, Y. G. Robert Ray, H. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker y W. Scrivens, «Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments», *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, n.º 40, 2004.
- [57] I. Garrido, *Síntesis y bioconjugación de nanoclústeres fluorescentes de cobre para la determinación de Metalotioneína I y II y su aplicación en tejidos cancerosos*, Universidad de Oviedo, 2016.

- [58] N. Amin, A. Afkhami, L. Hossein y T. Madrakiana, «Green and cost-effective synthesis of carbon dots from date kernel and their application as a novel switchable fluorescence probe for sensitive assay of Zoledronic acid drug in human serum and cellular imaging,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 1030, págs. 183-193, 2018.
- [59] F. Du, M. Zhang, X. Li, J. Li, X. Jiang, Z. Li, Y. Hua, G. Shao, J. Jin, Q. Shao, M. Zhou y A. Gong, «Economical and green synthesis of bagasse-derived fluorescent carbon dots for biomedical applications,» *Nanotechnology*, vol. 25, n.º 31, págs. 1-9, 2014.
- [60] F. Du, J. Li, Y. Hua, M. Zhang, Z. Zhou, J. Yuan, J. Wang, W. Peng, L. Zhang, S. Xia, D. Wang, S. Yang, W. Xu, A. Gong y Q. Shao, «Multicolor Nitrogen-Doped Carbon Dots for Live Cell Imaging,» *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 11, n.º 5, págs. 780-788, 2015.
- [61] J. Qian, L. Jiang, F. Cai, D. Wang y S. He, «Fluorescence-surface enhanced Raman scattering co-functionalized gold nanorods as near-infrared probes for purely optical in vivo imaging,» *Biomaterials*, vol. 32, n.º 6, págs. 1601-1610, 2011.
- [62] D. Kim, M. K. Yu, T. S. Lee, J. J. Park, Y. Y. Jeong y S. Jon, «Amphiphilic polymer-coated hybrid nanoparticles as CT/MRI dual contrast agents,» *Nanotechnology*, vol. 22, n.º 15, 2011.
- [63] K. Yang, L. Hu, X. Ma, S. Ye, L. Cheng, X. Shi, C. Li, Y. Li y Z. Liu, «Multimodal Imaging Guided Photothermal Therapy using Functionalized Graphene Nanosheets Anchored with Magnetic Nanoparticles,» *Advanced Materials*, vol. 24, n.º 14, págs. 1868-1872, 2012.
- [64] *Cytation 3: Imaging Reader. Operator's Manual*, Biotek Instruments, 2016 [En Línea]. dirección: http://microweb.wustl.edu/wp-content/uploads/2019/04/cytation_opertator_manual.pdf.
- [65] *Sistema de imagen celular automatizado Cytation 3*, Medical Instruments, [En Línea]. dirección: <https://www.medicalexpo.es/prod/biotek-instruments/product-67858-678846.html>.
- [66] Biotek, *Cubos de Filtros para Imágenes, Accesorios*, [En Línea]. dirección: <https://www.biotek.es/es/products/accessories/index.html>.
- [67] D. Berkenfeld, M. Corrado y L. Silvermang, *Entendiendo la Distancia Focal*, Nikon, [En Línea]. dirección: <https://www.nikon.com.mx/learn-and-explore/a/tips-and-techniques/entendiendo-la-distancia-focal.html>.
- [68] L. Giner, M. Ribera, S. Cucurella y J. Ferré, «Lámparas de Emisión de Diodos (LED). El futuro de la fotopolimerización,» *Área de Biomateriales y Prótesis. Universitat Internacional de Catalunya*, 2009.
- [69] S. Imaging, *Integración*, Infaimon, [En Línea]. dirección: <https://www.infaimon.com/enciclopedia-de-la-vision/integracion/>.
- [70] *La ganancia del sensor fotográfico y su medida*, Sideribus, [En Línea]. dirección: <https://www.sideribus.com/blog/medir-ganancia-sensor-fotografico>.
- [71] P. Held, «Live Cell Imaging of RNA Expression,» *Applications Biotek Instruments*, 2014.

- [72] M. Mares, *Morfología matemática: un enfoque al procesamiento digital de imágenes*, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2014.
- [73] W. Pratt, *Digital Image Processing*, 4.^a ed. California: John Wiley & Sons, 2007, págs. 1-807.
- [74] A. Bovik, *The Essential Guide to Image Processing*. India: Springer, 2009.
- [75] P. Soille, *Morphological Image Analysis. Principles and Applications*, 2.^a ed. Springer, 2004.
- [76] L. Sun, T. Teng, M. Rashid, M. Krysmann, P. Dallas, Y. Wang, B.-R. Hyun, A. Bartnik, G. Malliaras, F. Wise y E. Giannelis, «Electrogenerated Chemiluminescence from Carbon Dots,» nov. de 2010.
- [77] *Tema 14. Exposición, Sensor e Histograma (III)*, Alberto Moral, 2016 [En Línea]. dirección: <https://aprendofotografia.wordpress.com/tag/histograma/>.
- [78] *Edited genome fluorescent cells confocal microscopy*, iStockPhoto, [En Línea]. dirección: https://media.istockphoto.com/photos/edited-genome-fluorescent-cells-confocal-microscopy-picture-id1185255014?k=20&m=1185255014&s=612x612&w=0&h=JblhGvnQkL9zBY0_8k6tKve-c4uClT3i1RfZCqU7RGA=.
- [79] J. Franco, *Organic Chemistry. Column Chromatography*. Cambridge, MA, USA: JoVE Science Education Database, 2021.
- [80] V. Hinterberger, C. Damm, P. Haines, D. Guldi y W. Peukert, «Purification and structural elucidation of carbon dots by column chromatography,» *Nanoscale*, n.º 17, págs. 1-13, 2019.
- [81] *OxiSelect Comet Assay kit*, Cell Biolabs, INC. Product Manual, Catalog Manual. [En Línea]. dirección: <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-351-comet-assay-kit.pdf>.
- [82] B. Chazotte, «Labeling nuclear DNA with hoechst 33342,» vol. 1, págs. 83-86, 2011.
- [83] D. Pavia, G. Lampman, G. Kriz y J. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*. Belmont, CA: Cengage Learning, 2010.
- [84] M. Liu, «Optical Properties of Carbon Dots: A Review,» vol. 1, págs. 1-12, 2020.

ANEXOS

Se organizaron las 15 semanas de trabajo correspondientes al semestre 2021-2 siguiendo el diagrama de Gantt a continuación:

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15
<i>Revisión bibliográfica</i>															
<i>Primeros acercamientos al laboratorio</i>															
<i>Síntesis de puntos de carbono</i>															
<i>Caracterización de puntos de carbono</i>															
<i>Fijación en agarosa de los puntos de carbono</i>															
<i>Obtención de Imágenes en el Cytation</i>															
<i>Procesamiento de Imágenes</i>															
<i>Redacción del documento final</i>															

Figura 6.1: Diagrama de Gantt de las actividades desarrolladas