

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A
DISTANCIA

TRABAJO DE COMIENZO DE INVESTIGACIÓN

**USO DE CÁMARAS EMCCD PARA LA
DETECCIÓN DE EMISIÓN
ULTRADÉBIL DE FOTONES EN
HUMANOS**

Autor:

Jonatan MARTÍNEZ PÉREZ

Tutora:

Dra. Cristina SANTA MARTA

*Trabajo de Comienzo de Investigación para cumplir los requisitos
para el título de Máster en Física Médica*

30 de Octubre de 2018

Declaración de Autoría

Yo, Jonatan MARTÍNEZ PÉREZ, declaro que este trabajo de comienzo de investigación titulado, «USO DE CÁMARAS EMCCD PARA LA DETECCIÓN DE EMISIÓN ULTRADÉBIL DE FOTONES EN HUMANOS» y el estudio presentado en él son de mi propia autoría. Y certifico que:

- Este trabajo se ha realizado total o principalmente durante el curso del Máster de Física Médica de esta Universidad.
- Cuando alguna parte de este trabajo se ha presentado anteriormente para obtener un título o cualquier otra titulación en esta Universidad o en cualquier otra institución, esto se ha establecido claramente.
- Donde he consultado el trabajo publicado por otros, siempre ha quedado claramente atribuido.
- Donde he citado el trabajo de otros, siempre se da la fuente. Con la excepción de estas citas, esta tesis es completamente mi propio trabajo.
- He reconocido todas las fuentes principales de ayuda.
- Cuando el estudio se basa en el trabajo realizado por mí mismo junto con otros, he dejado claro exactamente lo que hicieron los demás y lo que he contribuido yo mismo.

Firmado: Jonatan Martínez Pérez

Fecha: 03/12/2018

«There is a wide, yawning black infinity. In every direction, the extension is endless; the sensation of depth is overwhelming. And the darkness is immortal. Where light exists, it is pure, blazing, fierce; but light exists almost nowhere, and the blackness itself is also pure and blazing and fierce.»

Carl Sagan

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA

Resumen

Facultad de Ciencias
Departamento de Física Matemática y de Fluidos

Máster en Física Médica

USO DE CÁMARAS EMCCD PARA LA DETECCIÓN DE EMISIÓN ULTRADÉBIL DE FOTONES EN HUMANOS

por Jonatan MARTÍNEZ PÉREZ

El uso de cámaras EMCCD en la detección de la Ultra-weak Photon Emission (UPE) puede reducir enormemente el tiempo en la toma de imágenes, lo que popularizaría su uso especialmente en medicina para la detección de enfermedades y disfunciones de una forma no invasiva. Para establecer los límites de detección de la UPE en el rango visible así como las necesidades técnicas de los instrumentos es necesaria la realización de una serie de medidas. Este trabajo busca realizar los primeros ensayos de cara a ir estableciendo los parámetros técnicos necesarios que deriven en la construcción de instrumentos sensibles a la UPE en el rango visible para su uso médico.

Using of EMCCD cameras in the detection of Ultra-weak Photon Emission (UPE) can greatly reduce the time needed to get images, which would popularize its use especially in medicine for the detection of diseases and dysfunctions in a non-invasive way. In order to establish the detection limits of the UPE in the visible range as well as the technical needs of the instruments, it is necessary to carry out a series of tests. This work seeks to perform the first tests in order to establish the necessary technical parameters that lead to the construction of instruments sensitive to UPE in the visible range for medical use.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a Yolanda Martín Hernando toda la ayuda y soporte en la toma de medidas, todas las ideas, información y consejos que han hecho posible este trabajo. Gracias igualmente a José Miguel Delgado Hernández por su participación en el estudio ofreciéndose como conejillo de indias. Agradecer enormemente a mi supervisora Cristina Santa Marta por sus correcciones, paciencia y ánimos, que han sido fundamentales. Finalmente agradecer al **Instituto de Astrofísica de Canarias** su colaboración permitiendo el uso de sus instalaciones y material para la realización del presente trabajo.

Índice general

Declaración de AutoríaII ResumenIV AgradecimientosV

1. Introducción	1
1.1. Contexto y descripción del presente estudio	1
1.2. Detectores	2
1.2.1. Principios de los dispositivos CCD	2
1.2.2. Los nuevos dispositivos EMCCD	3
1.3. Ultra-weak Photon Emission (UPE)	4
2. Revisión del estado del arte	5
2.1. Tipos de radiación originada en el tejido biológico	5
2.1.1. Radiación térmica	5
2.1.2. Radiación bioquímica	5
2.2. Detección de la UPE	5
2.2.1. Técnicas para la detección de la UPE	6
2.2.2. Estudios y aplicaciones basadas en la detección de la UPE	6
Medicina	6
Agricultura y Alimentación	8
2.3. Tipos de UPE	9
2.3.1. Emisión espontánea	9
2.3.2. Emisión inducida	9
2.4. Espectro, intensidad y rango de emisión de la UPE	9
3. Objetivo	10
4. Metodología	11
4.1. Montaje en LISA	12
4.1.1. Montaje frente a cuerpo negro	12
4.1.2. Montaje en el banco óptico	13
4.2. Montaje en la cámara apantallada	15
4.2.1. Montaje al aire	16
4.2.2. Montaje con caja cobertora	16
5. Resultados	17
5.1. Resultados en LISA	17
5.1.1. Cuerpo negro	17
5.1.2. Banco óptico	19
5.2. Resultados en la cámara apantallada	20
5.2.1. Al aire	20
5.2.2. Con caja cobertora	22

6. Discusión	25
6.1. Medidas del cuerpo negro	25
6.2. Medidas en el banco óptico de LISA	25
6.3. Medidas en la cámara apantallada al aire	26
6.4. Medidas en la cámara apantallada con caja cobertora	26
7. Conclusiones y futuros trabajos	28
Bibliografía	29

Índice de figuras

1.1. Analogía del funcionamiento de dispositivos CCD	2
1.2. Esquema de funcionamiento de una cámara EMCCD	3
4.1. Cámara ANDOR	11
4.2. Oculares COSMICAR de 16 mm y MERIT de 8.5 mm	12
4.3. Cuerpo negro	13
4.4. Banco óptico visible de LISA	14
4.5. Caja cobertora en la cámara apantallada	16
5.1. Cuerpo negro con pared de fondo y luz ambiental	17
5.2. Cuerpo negro a 40 °C y 25 °C	18
5.3. Diferencia entre el cuerpo negro a 40 °C y a 25 °C	18
5.4. Manos de los sujetos 1 y 2 en el banco óptico de LISA tras exposición a sol y oscuridad	19
5.5. Mano y rostro del sujeto 2 al aire en la cámara apantallada para dife- rentes tiempos de integración	21
5.6. Mano del sujeto 3 con caja cobertora en la cámara apantallada para diferentes tiempos de integración	23

Capítulo 1

Introducción

1.1. Contexto y descripción del presente estudio

Este estudio se encuadra dentro de las investigaciones que lleva a cabo el Grupo de investigación en tecnología médica del Instituto de Astrofísica de Canarias (IAC), centro español de investigación astrofísica con un departamento de ingeniería donde se desarrolla instrumentación puntera para su uso en astrofísica. Forma parte de los estudios dedicados a la transferencia tecnológica de uso común desde el campo de la astrofísica al de la tecnología médica. Dentro de este contexto se está analizando el uso de sensores EMCCD para detectar la Ultra-weak Photon Emission (UPE) de cara a desarrollar instrumentación que permita la detección de enfermedades de forma no invasiva.

El estudio se divide en los capítulos que se describen a continuación:

1. El presente capítulo introductorio comienza con una breve descripción de los detectores CCD y EMCCD y continúa definiendo lo que es la Ultra-weak Photon Emission (UPE).
2. El segundo capítulo comienza describiendo los tipos de radiación originados en los tejidos biológicos, continúa con una breve introducción histórica a la detección de la UPE, las dos técnicas más comunes utilizadas y los estudios y aplicaciones en medicina, agricultura y alimentación que se han derivado de la misma. Continúa una clasificación de la UPE según lo que la origina. Y finalmente describe las características de la señal registrada (espectro, intensidad y rango de emisión).
3. El tercer capítulo listan los objetivos que se fija el presente estudio.
4. El cuarto capítulo describe la instrumentación y metodología utilizada así como los diferentes montajes realizados.
5. El quinto capítulo detalla los resultados obtenidos para cada uno de los montajes.
6. El sexto capítulo discute los resultados obtenidos para cada montaje.
7. El séptimo capítulo presenta las conclusiones que se deducen de los resultados obtenidos y se plantean futuras líneas de investigación.
8. Finalmente se listan las referencias utilizadas en el presente estudio.

1.2. Detectores

1.2.1. Principios de los dispositivos CCD

El principio de los CCD (Charge Coupled Device) fue inventado en 1969 por W. Boyle y G. Smith y demostrado posteriormente por G. Amelio, M. Tompsett y G. Smith en los laboratorios Bell [McLean, 2010]. Estos dispositivos han alcanzado un nivel de desarrollo y aplicaciones sobresaliente en los últimos años que ha permitido su uso en diferentes áreas como la astronomía o la medicina.

Los dispositivos CCD funcionan siguiendo los principios del efecto fotoeléctrico donde un fotón incide sobre los electrones de la banda de valencia de un semiconductor excitándolos hacia la banda de conducción. Un CCD se compone de un chip semiconductor de base de silicio con una matriz bidimensional de celdas donde cada una de ellas absorbe fotones de luz y utiliza esta energía para liberar un electrón en un semiconductor (silicio). Estos electrones son confinados en cada celda por un campo electrostático que atrae al electrón cargado a una posición determinada. Dado que los fotones siguen impactando se crea una región de almacenamiento aplicando unos electrodos de metal al material semiconductor junto a una fina lámina de óxido de silicio que hace de aislante. De esta forma se tiene un capacitor paralelo que puede acumular carga eléctrica [McLean, 2010].

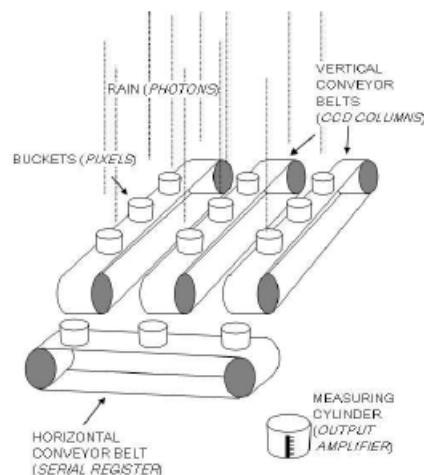


FIGURA 1.1: Analogía del funcionamiento de dispositivos CCD con una serie de cintas transportadoras que llevan los electrones al amplificador de salida [Tulloch, 2010].

Cuando se cierra el obturador y finaliza con ello la incidencia de fotones, la carga se desplaza hacia abajo detrás de la región enmascarada del chip antes de ser leída. Para leer el sensor, la carga se mueve modulando los voltajes de los electrodos en la superficie del CCD. Se van empujando así los electrones mediante cambios de potencial y son transportados verticalmente al registro serie (de lectura), y luego horizontalmente al nodo del amplificador de salida donde la carga es recogida píxel a píxel para su medida [ANDOR, 2008a]. En la Figura 1.1 se muestra una analogía de la captación de fotones y del desplazamiento electrónico hasta el amplificador de salida.

1.2.2. Los nuevos dispositivos EMCCD

Los dispositivos CCD fueron superados en el año 2000 por los EMCCD (Electron Multiplying CCD) que incorporan un mecanismo de avalancha electrónica que aumenta la ganancia y mejora el ratio señal/ruido a la salida del amplificador, pudiéndose llegar a detectar electrones de forma individual mediante esta técnica [Tulloch y Dhillon, 2011].

El funcionamiento de las EMCCD es equivalente al de las CCD hasta la llegada del flujo de electrones a la etapa de amplificación tras el registro serie. La principal diferencia a nivel constructivo con las CCD se debe a que el registro serie en el caso de las EMCCD se extiende para incluir el registro de multiplicación o ganancia. Cuando se mueve la carga a través de este registro, existe una pequeña probabilidad de que las cargas que se transfieren puedan crear una carga adicional mediante un proceso conocido como *ionización de impacto*. La ionización de impacto se produce cuando una carga tiene suficiente energía para liberar un electrón haciéndolo saltar de la banda de valencia a la de conducción produciendo así una amplificación [ANDOR, 2008a]. La estructura de una cámara EMCCD se muestra en la Figura 1.2.

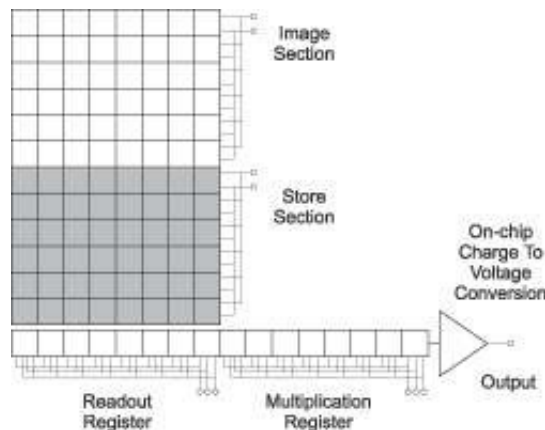


FIGURA 1.2: Esquema de funcionamiento de una cámara EMCCD [ANDOR, 2018].

Para provocar la ionización de impacto en el registro serie, se colocan dos electrodos a una gran diferencia de potencial generando así un gran campo eléctrico entre ellos. Esto aporta al electrón la energía necesaria para que se produzca la electromultiplicación.

La electromultiplicación aumenta la ganancia del dispositivo con lo que se reduce el tiempo necesario para el registro de la imagen, algo muy necesario en imágenes con poca luz. Lo bueno del sistema es que la amplificación se produce en el sensor, antes de llegar al amplificador y al convertidor Analógico-Digital que son los elementos que más ruido interno (de lectura) generan. Con esta ganancia previa se consigue una señal por encima del nivel de ruido de lectura, que es el que impone los límites de detección, mejorado el ratio señal/ruido que tiene un dispositivo CCD.

1.3. Ultra-weak Photon Emission (UPE)

La UPE (Ultra-weak Photon Emission) es un fenómeno según el cual los tejidos biológicos emiten fotones con una tasa de emisión muy baja.

Según [Ives y col., 2014] la UPE fue detectada por primera vez en el año 1961 que es cuando se publican los primeros artículos al respecto en Rusia [Tarussov, Polidova y Zhuravlyov, 1961b] y [Tarussov, Polidova y Zhuravlyov, 1961a]. Desde ese momento las publicaciones no han parado de multiplicarse y se ha consolidado la idea de que los organismos vivos emiten espontáneamente luz durante los procesos metabólicos oxidativos (emisión biofotónica) [Cifra y Pospíšil, 2014]. Estas emisiones tienen una intensidad estimada de menos de $10^{-16} \text{ W cm}^{-2}$ y entran dentro de lo que se ha dado en llamar la quimioluminiscencia, a diferenciar de la bioluminiscencia característica de otros organismos vivos como las luciérnagas y cuyo origen está en reacciones enzimáticas [Kobayashi y col., 1999].

Se considera que esta emisión tiene como origen los procesos de metabolismo y estrés oxidativo que sufren las células de animales y plantas. Estos procesos originan compuestos electrónicamente excitados que al desexcitarse emiten estos fotones. Cada compuesto emite en un rango determinado que depende de los saltos del electrón entre los diferentes niveles electrónicos del compuesto [Cifra y Pospíšil, 2014], [Rastogi y Pospíšil, 2013].

La detección de la UPE es una técnica innovadora cuyas aplicaciones prácticas todavía no han sido ampliamente estudiadas o explotadas y que por lo tanto presenta un campo de investigación con un gran potencial.

Capítulo 2

Revisión del estado del arte

2.1. Tipos de radiación originada en el tejido biológico

2.1.1. Radiación térmica

La radiación térmica es la que se considera generada a partir de la temperatura propia de un cuerpo, siguiendo la Ley del cuerpo negro de Max Planck [Planck, 1914]. En este caso la intensidad de la radiación emitida sigue la Ley de Planck por lo que para comprobar si un cuerpo está emitiendo exclusivamente fruto de su temperatura solo hay que comparar si la curva de emisión detectada encaja con la de la Ley de Planck a esa temperatura. A la temperatura habitual de un organismo vivo (300 K) la intensidad de la UPE es de varios órdenes de magnitud superior a la de un cuerpo negro a esa temperatura [Cifra y Pospíšil, 2014] lo que implica que ésta emisión no tiene este origen.

2.1.2. Radiación bioquímica

Este tipo de radiación se considera generada fruto de procesos de metabolismo y estrés oxidativo [Rastogi y Pospíšil, 2011] que generan compuestos electrónicamente excitados. Se considera que la UPE tiene este origen.

Los compuestos excitados que se considera son generados por esta vía son las llamadas Reactive Oxygen Species (ROS), O_2^{-*} , H_2O_2 , OH^* y 1O_2 . Este tipo de compuestos son generados de forma rutinaria en los seres vivos durante procesos como la respiración celular, los procesos de transferencia en la membrana celular o el metabolismo energético [Kobayashi y col., 1999].

2.2. Detección de la UPE

Como ya se ha indicado anteriormente los orígenes de la detección de la UPE según [Ives y col., 2014] se sitúan en el año 1961 en Rusia [Tarussov, Polidova y Zhuravlyov, 1961b] y [Tarussov, Polidova y Zhuravlyov, 1961a]. Siendo a partir del año siguiente cuando se empieza a consolidar la idea de su relación con los procesos oxidativos de las células [Stauff y Schmidkunuz, 1962].

Desde entonces han aparecido múltiples estudios que han ido ampliando el rango de detección de la UPE fuera de la célula. Estos estudios a su vez han planteado hipótesis sobre esta emisión y la relación que puede haber entre la intensidad de la UPE y la actividad metabólica [Kobayashi y col., 1999], [Rastogi y Pospíšil, 2011].

2.2.1. Técnicas para la detección de la UPE

En general se utilizan dos técnicas para la detección de la UPE [Cifra y Pospíšil, 2014]:

- Las medidas puntuales en una dimensión (1D) que solo miden la intensidad puntual recibida utilizando tubos fotomultiplicadores de bajo ruido (PMT) [A. Prasad, 2012], [Kim y col., 2006] o fotodiodos de avalancha (APD) [Isoshima, 1995] durante un periodo de tiempo.
- Las medidas bidimensionales (2D) en el plano focal que mediante imágenes permiten distribuir la intensidad de la UPE espacialmente utilizando cámaras CCD/EMCCD (2D) [Prasad y Pospíšil, 2011], [A. Prasad, 2012], [Takeda y col., 2004], [Kobayashi, Kikuchi y Okamura, 2009], [Ortega-Ojeda y col., 2018], [Wijk, Kobayashi y Wijk, 2006].

En el montaje experimental se realizarán medidas bidimensionales utilizando para ello una cámara EMCCD.

2.2.2. Estudios y aplicaciones basadas en la detección de la UPE

Fruto de la relación entre las frecuencias de emisión, la intensidad de emisión y la actividad metabólica de los seres vivos se pueden pensar en diferentes aplicaciones. En este caso cabe destacar los diferentes estudios que se han llevado a cabo en áreas como la medicina, la agricultura y la alimentación.

Medicina

Los autores J.A. Ives y col. hacen una revisión exhaustiva sobre las publicaciones relacionadas con la UPE en humanos [Ives y col., 2014] y determinan que existe un gran interés en el campo y que las publicaciones relacionadas tienen una alta calidad. Además señalan que el uso de la UPE en entornos médicos para estudiar procesos inflamatorios y estados oxidativos es creciente lo que da valor a estos procedimientos y que puede ser una herramienta importante de monitorización de la salud con la ventaja de no ser invasiva.

Como ya se ha indicado la UPE se genera por procesos celulares rutinarios en los seres vivos. Un mal funcionamiento de la célula debido a algún tipo de enfermedad derivaría en una alteración del UPE ya que los procesos de metabolismo oxidativo se verían afectados. Así la monitorización del metabolismo oxidativo utilizando la UPE puede utilizarse en la identificación de enfermedades, la detección de procesos previos al padecimiento de las mismas o el seguimiento de los efectos de fármacos y terapias.

El estudio [Wijk, Kobayashi y Wijk, 2006] ha podido medir diferentes emisiones de UPE para diferentes partes del cuerpo humano lo que demuestra que los procesos de metabolismo oxidativo no son homogéneos en todo el cuerpo. Esto es importante a la hora de establecer las correlaciones necesarias entre la UPE y las enfermedades o disfunciones detectadas para cada parte del cuerpo.

El tejido cerebral homogeneizado también muestra quimioluminiscencia bajo la condición de auto-oxidación atmosférica [Kobayashi y col., 1999]. En este estudio se

ha planteado que la UPE es un reflejo del estrés oxidativo que contribuye al envejecimiento prematuro en los animales y por lo tanto su monitorización puede dar cuenta de este proceso.

Se ha detectado la UPE en el cerebro de una rata *in vivo* utilizando un contador de fotones, estando la emisión correlacionada con la actividad cerebral medida en la superficie cortical. Esta intensidad se ha asociado al flujo sanguíneo y a la hiperoxia. En este estudio se expuso a la rata a varias situaciones como eliminación de la glucosa, adición de iones potasio o *Rotenona* (inhibidor de la cadena de transporte electrónico mitocondrial) y se midió la variación que estas situaciones generaba en la UPE [Kobayashi y col., 1999]. Llevando esto al ámbito humano, la UPE podría servir igualmente para detectar disfunciones en el flujo sanguíneo, niveles anómalos de glucosa o hiperoxia de forma no invasiva.

En este trabajo [Prasad y Pospíšil, 2011] se expone la relación entre el estrés oxidativo en la piel humana y la UPE y se plantea la monitorización de la misma como medio de detección de enfermedades e infecciones.

Le UPE en la piel tras la radiación de luz visible y luz ultravioleta cercana ha sido registrada [A. Prasad, 2012], resultado en un aumento de los procesos metabólicos oxidativos y por lo tanto de la UPE. Además también se ha estudiado qué efectos tiene en la UPE la aplicación de antioxidantes sobre la piel [Sauer mann y col., 2004] como vía para evaluar la eficacia de estos antioxidantes. Estos trabajos nos da pie a efectuar nuestras propias medidas sobre los efectos de la luz solar y la crema solar sobre la UPE. Los resultados obtenidos a este respecto se encuentran en el apartado 5.1.2 y su discusión en el apartado 6.2.

El estudio [Isoshima, 1995] ha analizado los efectos en la UPE tras la introducción de una toxina (tetrodotoxina) en una rodaja de cerebro (hipocampo), observando una disminución de la emisión tras esta acción. Esto abre las puertas a la detección de toxinas en el cerebro humano de forma no invasiva.

Por otra parte el estudio [Kobayashi, Kikuchi y Okamura, 2009] ha medido variaciones rítmicas de la UPE emitida por humanos a lo largo del día, lo que abre las puertas a una monitorización de las constantes del sujeto en base a medidas de la UPE continuadas.

Se ha encontrado también una correlación entre el tejido tumoral canceroso y la intensidad de la UPE [Kim y col., 2006]. Esto puede servir para detectar, hacer seguimiento de este tipo de tumores y analizar la viabilidad de una intervención.

Finalmente, en el estudio [Blakytyn y Jude, 2006] se analiza cómo se puede utilizar la UPE para detectar y monitorizar úlceras y heridas crónicas en diabéticos. Esto mejoraría las condiciones de este tipo de enfermos y podría evitar amputaciones. Este tema en concreto es donde mayores esfuerzos está dedicando el Grupo de investigación en tecnología médica del Instituto de Astrofísica de Canarias (IAC), de cara a desarrollar dispositivos que permitan la detección y monitorización de estas úlceras por medios no invasivos.

Agricultura y Alimentación

Las propiedades de la UPE (espectro e intensidad) pueden utilizarse para medir la reacción de las plantas a las plagas. Así se han estudiado las respuestas defensivas de plantas de alubias y tomates [Mansfield, 2005] estableciendo una correlación entre las mismas y la UPE detectada.

Al someterse la planta *Arabidopsis thaliana* a radiación ultravioleta cercana [Rastogi y Pospíšil, 2013] se han encontrado dos vías diferenciadas de emisión de UPE a diferentes frecuencias derivadas de los distintos compuestos que participan en los procesos de metabolismo oxidativo: des-excitación rápida (regiones verdes-azules y rojas del espectro) y des-excitación lenta (regiones verdes-azules del espectro). Esto aporta detalles sobre los compuestos participantes en el metabolismo oxidativo que permiten monitorizar el proceso y relacionar la radiación absorbida con la UPE.

Se ha encontrado una correlación entre la sequía y la UPE en alubias rojas [Ohya y col., 2002], pudiendo así estimarse los daños sufridos en las raíces como consecuencia de la sequía a partir de la emisión de las mismas.

Se han hecho también medidas del efecto del estrés salino en la intensidad de la UPE de las alubias rojas, encontrando una relación entre ambas y el estado de crecimiento de la planta [Ohya y col., 2000].

Se han observado los efectos de herbicidas en la UPE de plantas de arroz [Inagaki y col., 2008], encontrando una correlación entre la intensidad de la emisión y la resistencia al herbicida.

Los procesos oxidativos que se dan en los alimentos pueden ayudar a determinar la calidad del mismo. Un estudio analizó la UPE de los alimentos tostados como vía para evaluar este tipo de productos en base a la oxidación que han sufrido en el proceso de recolección y manufactura [Iida y col., 2002].

Se ha encontrado igualmente variaciones de UPE en la maduración de las fresas, asociada a variaciones en las cantidades de adenosín trifosfato (ATP), adenosín monofosfato (AMP) y adenosín difosfato (ADP). Cambios en la energía celular han podido ser asociados a cambios en la UPE [Guo y col., 2017]. Esto permitiría monitorizar el proceso de maduración de las frutas.

Estudiando la oxidación de los pepinos [Kokubo y Yamamoto, 2009] se ha podido medir la variación temporal de la UPE desde que se cortan hasta varias horas después, encontrando un máximo a las 5h y luego decreciendo en la emisión. Demostrando que se puede hacer un seguimiento del estado oxidativo de los alimentos a partir de la UPE.

La idea subyacente de todos estos estudios es la misma ya comentada anteriormente, relacionar la UPE detectada con el proceso que está sufriendo el alimento o la planta como consecuencia de oxidación pasiva, infecciones, radiaciones, etc. El beneficio de establecer estas correlaciones y ser capaz de hacer estas medidas es muy alto ya que sin destruir los alimentos ni las plantas se puede realizar un análisis de los procesos que está sufriendo.

2.3. Tipos de UPE

A partir de la forma en que se genera la UPE, según M. Cifra se pueden diferenciar dos tipos: la emisión espontánea y la emisión inducida [Cifra y Pospíšil, 2014].

2.3.1. Emisión espontánea

Como su propio nombre indica, la emisión espontánea es la generada por los propios procesos del metabolismo oxidativo, sin la aplicación de ningún tipo de estímulo externo.

2.3.2. Emisión inducida

La emisión inducida es la que se genera tras la aplicación de estímulos. Los estímulos externos pueden ser de origen biológico o ambiental. La intensidad de estas emisiones puede ser varios ordenes de magnitud superiores a la emisión espontánea y vuelve a los valores iniciales cuando finaliza el estímulo [Cifra y Pospíšil, 2014].

Esta emisión inducida es especialmente interesante por cuanto supone cambios sobre una emisión espontánea que podríamos llamar estándar. Un estudio de la misma permitiría relacionar sus valores con posibles orígenes, lo que permitirían identificar si un individuo está sufriendo algún tipo de infección o daño físico. De esta forma un fotómetro podría hacer la labor que hoy por hoy hace un termómetro clínico pero aportando información extra que vendría codificada en su rango de emisión.

2.4. Espectro, intensidad y rango de emisión de la UPE

La revisión de M. Cifra estima que para los diferentes compuestos los fotones se emiten en un rango espectral que va de 350 nm a 1300 nm de longitud de onda. Esto incluye las regiones del espectro ultravioleta cercano, visible e infrarrojo cercano [Cifra y Pospíšil, 2014].

Por otro lado la intensidad de la emisión en la superficie se estima inferior a $10^{-16} \text{ W cm}^{-2}$ [Kobayashi y col., 1999]. Ésta depende de los compuestos emisores y estos a su vez dependen del proceso metabólico que la ha producido. Para la emisión espontánea se estima un rango de 10 fotones $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ a 1000 fotones $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ [Devara, Usa e Inaba, 1997]. Estos rangos no son lo suficientemente intensos para ser detectados por el ojo humano, cuyo umbral de sensibilidad se encuentra en torno a 10^6 fotones $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ [Kobayashi, Kikuchi y Okamura, 2009]. En el caso de emisión inducida el rango es dos o tres órdenes de magnitud mayor que el de la emisión espontánea [Cifra y Pospíšil, 2014].

El número de fotones detectados dependerá de la fuente, las características del detector, el tiempo de integración o la distancia entre fuente y detector. El montaje, por lo tanto, es de gran importancia.

Capítulo 3

Objetivo

El objetivo general de este trabajo es validar si la UPE es detectable con una cámara EMCCD y qué beneficios aportaría frente a la detección con cámaras CCD convencionales.

Los objetivos detallados del estudio son los siguientes:

1. Verificación de que la UPE es detectable con una cámara EMCCD en completa oscuridad.
2. Si se cumple 1., estudio de la reducción del tiempo necesario de integración con cámaras EMCCD respecto a cámaras CCD convencionales.
3. Verificación en laboratorio de la influencia de la radiación térmica o de cuerpo negro en las medidas obtenidas con cámaras EMCCD de radiación procedente de tejido biológico y en condiciones de oscuridad.
4. Estudio del nivel de oscuridad mínimo necesario para la realización de medidas de la UPE.

En los montajes experimentales de este estudio en particular y según lo comentado en las diferentes bibliografías se espera detectar intensidades de la UPE de en el rango que va de $10 \text{ fotones s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ a $1000 \text{ fotones s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para la emisión espontánea [Devara, Usa e Inaba, 1997] y dos o tres órdenes de magnitud por encima de éstos [Cifra y Pospíšil, 2014] en el caso de la UPE inducida por la radiación solar.

El rango espectral en el que se detecta la UPE abarca de 350 nm a 1300 nm [Cifra y Pospíšil, 2014] de longitud de onda por lo que es en éste en el que se deberían de encuadrar nuestras medidas, aunque se espera un rango más estrecho ya que la eficiencia del detector no es la misma para todo el espectro [e2V, 2004].

No se considera ninguna frecuencia pico para un proceso metabólico oxidativo determinado ya que en esta primera fase de estudio no se busca estudiar los procesos generadores de la UPE, aunque si que debe haberlo según diferentes referencias [Ortega-Ojeda y col., 2018].

Las frecuencias específicas de emisión no son objeto de este estudio ya que se encuentra en una primera fase donde como ya se indicado la detección es lo preferencial.

Capítulo 4

Metodología

Para la toma de las imágenes se utilizó una cámara ANDOR iXon^{EM+} 860 UV [ANDOR, 2008b]. Algunas de las características técnicas del sensor son las siguientes [e2V, 2004]:

- Área activa de la imagen 3.072 mm × 3.072 mm.
- Píxeles activos de la sección de la imagen 128[H] × 128[V].
- Tamaño del píxel de la imagen 24 μm × 24 μm.
- Número de amplificadores de salida, 1.
- Factor de relleno 100 %.
- Respuesta de salida del amplificador 1.2 μV/e⁻.
- Máxima ganancia del registro de multiplicación 1000.
- Temperatura de operación (MIN -120, MAX +75).

En la Figura 4.1 se muestra la cámara ANDOR utilizada en las pruebas.

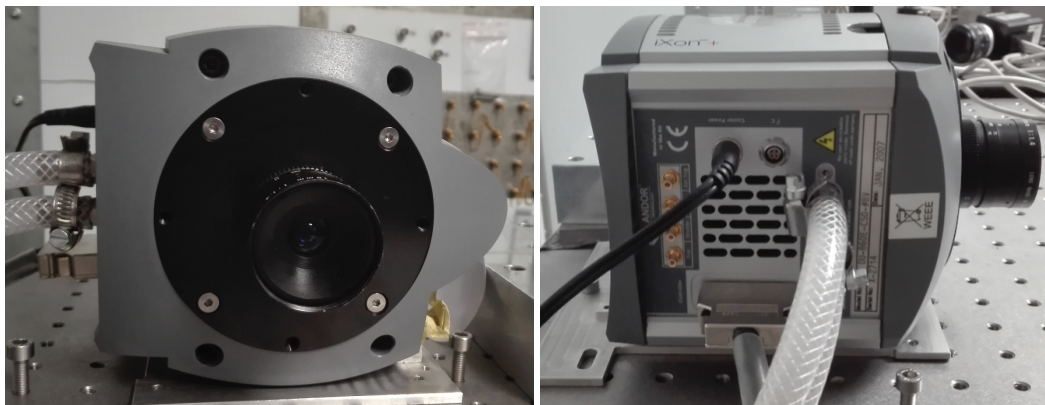


FIGURA 4.1: Cámara ANDOR utilizada para la toma de imágenes.

Junto con la cámara se han utilizado dos oculares con las siguientes características:

- Ocular COSMICAR Television de 16 mm, 1:1.4.
- Ocular MERIT de 8.5 mm, 1:1.3.

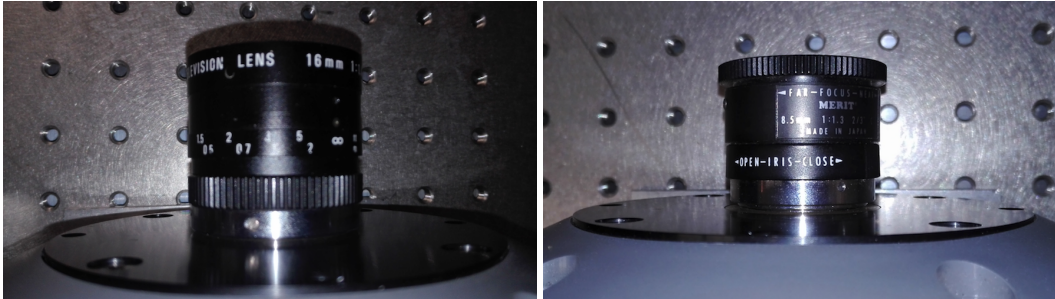


FIGURA 4.2: Ocular COSMICAR de 16 mm y MERIT de 8.5 mm.

En la Figura 4.2 se muestran los oculares utilizados en las pruebas.

Se han realizado montajes en dos localizaciones distintas:

- La primera localización fue el Laboratorio de Imagen y Sensores para la Astronomía (LISA) del Instituto de Astrofísica de Canarias. Aquí se realizaron dos tipos de mediciones:
 - Montaje frente a cuerpo negro.
 - Montaje en el banco óptico.
- La segunda localización fue la sala apantallada del Instituto de Astrofísica de Canarias. Aquí nuevamente se realizaron dos tipos de mediciones:
 - Montaje al aire.
 - Montaje con caja cobertora.

Se tomaron imágenes con diferentes tiempos de integración y ganancias. Las imágenes fueron tomadas en formato *fits* utilizando el software propietario *Andor Solis*. El procesamiento de las imágenes se ha realizado con el software *Matlab R2018b* de 64bit.

Junto a cada una de las imágenes se añade una barra de color que va a señalar la diferente intensidad de cada píxel, esto es, la mayor (marrón) o menor (azul oscuro) cantidad de fotones registrados. La escala no es relevante ya que se ha modificado para mejorar la visualización de la imagen. Su numeración se corresponde con el número de fotones registrados, asignándose los valores máximos de color a cualquier píxel con un registro de fotones igual o superior al valor máximo de la escala.

En el estudio han participado tres sujetos.

4.1. Montaje en LISA

4.1.1. Montaje frente a cuerpo negro

Se realizaron medidas con la cámara para comprobar si los cambios de temperatura del cuerpo negro son detectados por la cámara. Para ello se colocó la cámara con el ocular de 16 mm frente al cuerpo negro a una distancia de 30 cm y se tomaron series de 300 imágenes de 1 s de integración enfocadas a captar una parte del cuerpo negro y una parte de la pared del fondo que serviría de referencia.

La configuración de la cámara fue la siguiente:

- Detector a -90°C .
- Tiempo de integración 1 s
- Kinetic y serie de 300 imágenes
- Prescans = 0
- Frame transfer ON
- Base line clamp on (offset 100)
- Vertical shift : Normal 0.45 usecs
- Lectura: 16 bit, 1 MHz
- Preamplifier x5
- EM x100

Se adquirieron series de imágenes con el cuerpo negro a temperaturas de 40°C y 25°C . También se tomaron series de imágenes con el obturador cerrado y el mismo tiempo de integración (*dark*). A los promedios de ambas series de imágenes se les restó el promedio de las imágenes *dark* para eliminar el fondo y obtener así una imagen más real. En la Figura 4.3 se muestra el cuerpo negro utilizado en la toma de las medidas.



FIGURA 4.3: Cuerpo negro utilizado en las medidas.

Finalmente se restaron las imágenes de integración del cuerpo negro a 40°C y 25°C . La imagen resultante se analiza para comprobar si en la parte donde hay cuerpo negro la diferencia de temperaturas ha generado algún tipo de registro.

4.1.2. Montaje en el banco óptico

Se montó la cámara con el ocular de 16mm en el banco óptico de LISA fijándola en el carril interior del mismo. El proceso de medición consistió en la introducción

de la mano de los sujetos 1 y 2 dentro del banco frente a la cámara a aproximadamente 1m de distancia. Se cubrió la apertura por donde se introdujo la mano con una manta oscura y se apagaron las luces del laboratorio para reducir al máximo la luz ambiental. Se utilizó la misma cámara ANDOR utilizada para el estudio del cuerpo negro. Se colocó un papel blanco en el campo de visión de la cámara que sirvió como referencia. Además en las dos últimas medidas la entrada circular del banco óptico sirvió también como referencia.

La configuración de la cámara fue la siguiente:

- Detector a -90°C .
- Tiempo de integración 1 s
- Kinetic y serie de 100 imágenes
- Prescans = 0
- Frame transfer ON
- Base line clamp on (offset 100)
- Vertical shift : Normal 0.45 usecs
- Lectura: 16 bit, 1 MHz
- Preamplifier x5
- EM x200

En este caso las series fueron de 100 imágenes con un tiempo de integración de 1 s. Posteriormente se realizó el promedio de las mismas. Se tomó igualmente un *bias*, serie de 100 imágenes con el tiempo de integración mínimo de la cámara, que se les restó para eliminar el ruido intrínseco de la misma.

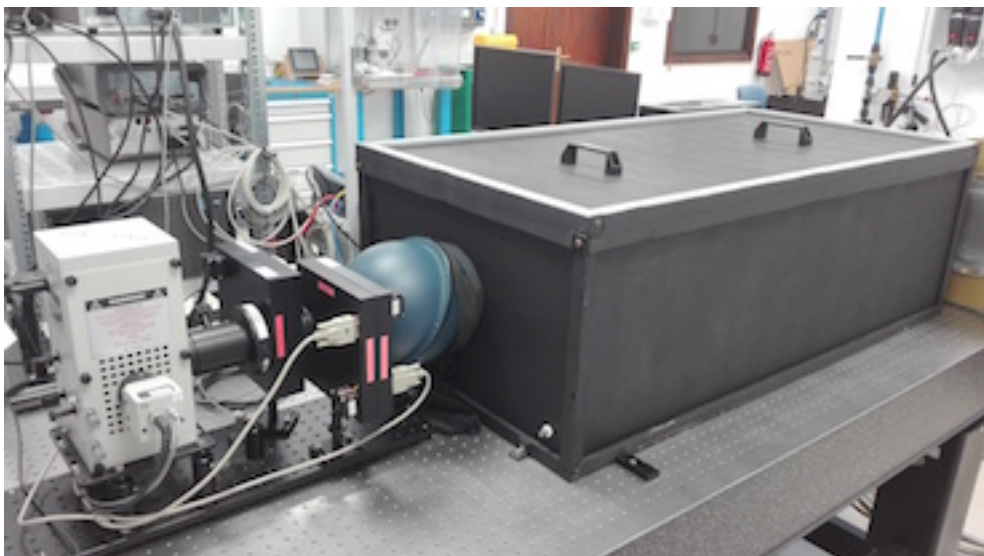


FIGURA 4.4: Banco óptico visible de LISA.

Se tomaron imágenes de la mano derecha del sujeto 1 tras permanecer a oscuras, después al sol con una línea de crema solar y finalmente las manos derechas de los sujetos 1 y 2 utilizando además del papel blanco la entrada circular del banco óptico como referencia.

Estas medidas permitirán comprobar los diferentes niveles de intensidad que es capaz de detectar la cámara para cada una de las condiciones señaladas así como testear los efectos de la oscuridad, el sol y la crema solar de cara a verificar si la radiación UV estimula la UPE.

En la Figura 4.4 se muestra el banco óptico donde se realizaron las medidas.

4.2. Montaje en la cámara apantallada

En este caso se montó la cámara ANDOR en la sala apantallada del Instituto de Astrofísica de Canarias con la intención de reducir aún más la luz ambiental.

La cámara apantallada dispone de una mesa óptica donde se fijó la cámara apuntando a las muestras. Se modificó el tiempo de integración y la ganancia respecto de las medidas anteriormente realizadas en LISA.

La configuración de la cámara fue la siguiente:

- Detector a -90°C .
- Tiempo de integración 10 s, 20 s, 30 s, 50 s, 60 s, 120 s y 300 s
- Kinetic y una imagen
- Prescans = 0
- Frame transfer ON
- Base line clamp on (offset 100)
- Vertical shift : Normal 0.45 usecs
- Lectura: 16 bit, 1 MHz
- Preamplifier x5
- EM x300

Las pruebas en la sala apantallada se realizaron durante dos jornadas. En la primera los resultados no fueron concluyentes y se observó que seguía habiendo luz ambiental de origen desconocido por lo que en la segunda jornada se optó por realizar las medidas en la misma sala pero introduciendo tanto la cámara como las muestras en una caja completamente cubierta.

4.2.1. Montaje al aire

Durante la primera jornada se realizaron las medidas en la sala apantallada en completa oscuridad. Se tomaron varias imágenes de manos y rostro del sujeto 2 usando tiempos de integración de 10 s, 20 s y 30 s y una ganancia EM x300.

En las imágenes se utilizaron como superficies de referencia:

- Superficie blanca: papel.
- Superficie negra: cinta americana.

El objetivo es verificar qué nivel de oscuridad es necesario para la detección de la UPE. En el caso de que la oscuridad no sea suficiente y exista algo de luz ambiental en el rango de detección de la cámara, la superficie blanca reflejaría mucho más que la negra y esto quedaría reflejado en las imágenes. Dado que ni el papel blanco ni la cinta americana negra son tejidos biológicos vivos, no deberían tener fotoluminiscencia. Por lo tanto una diferencia entre radiación proveniente de estos materiales sólo podría deberse a luz ambiental reflejada en ellos.

4.2.2. Montaje con caja cobertora

Durante la segunda jornada se realizaron nuevamente las medidas en la sala apantallada en completa oscuridad, en este caso se introdujo en el montaje experimental una caja de cartón cubierta por mantas oscuras en el interior de la cuál se realizaron las medidas.

Dentro de la caja se introdujo la mano del sujeto 3 en 3 posiciones distintas junto con un papel blanco de referencia. Se tomaron varias imágenes con tiempos de integración de 60 s, 120 s y 300 s y una ganancia de EM x300. La Figura 4.5 muestra una imagen de la caja utilizada para las pruebas.

En el interior de la caja se utilizaron dos superficies de referencia:

- Superficie blanca: papel.
- Superficie marrón: cartón.



FIGURA 4.5: Caja cobertora cubierta con mantas oscuras en la cámara apantallada.

Capítulo 5

Resultados

5.1. Resultados en LISA

5.1.1. Cuerpo negro

Se midió la radiación de un cuerpo negro a diferentes temperaturas para comprobar si era detectable con la cámara y por lo tanto la temperatura jugaba algún papel en las medidas que se iban a tomar posteriormente.

En primer lugar se tomó una imagen del cuerpo negro con luz y sin electromultiplicación (Figura 5.1). Esta imagen sirvió para posicionar el cuerpo negro en las imágenes posteriores (rectángulo en la zona superior derecha) y facilitar la interpretación del resto de medidas.

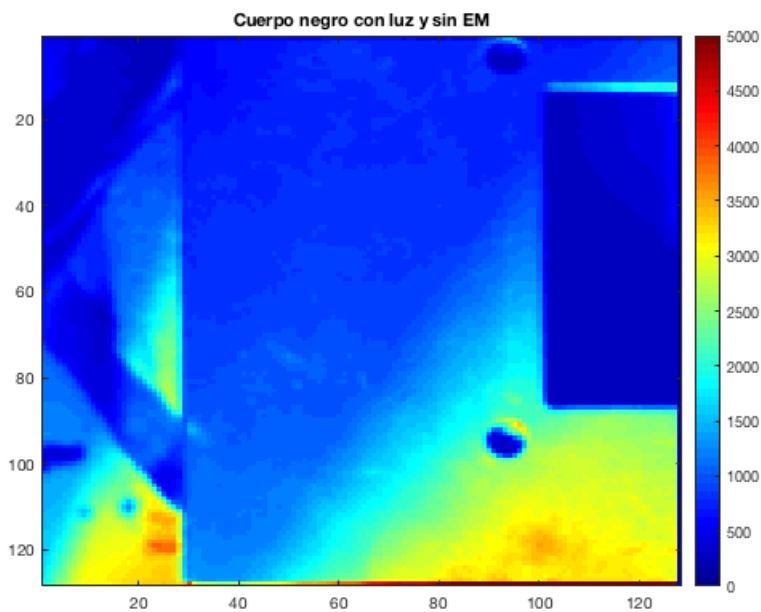


FIGURA 5.1: Cuerpo negro con pared de fondo y luz ambiental.

El cuerpo negro se situó a las temperaturas de 40 °C y 25 °C y se adquirieron series de 300 imágenes con un tiempo de integración de 1 s. Se tomaron igualmente series de 300 imágenes con el obturador cerrado y mismo tiempo de integración (*dark*).

Las imágenes registradas han sido las siguientes:

- Cuerpo negro a 40 °C de temperatura, serie de 300 imágenes de 1 s de integración y lectura a 1 MHz.
- Cuerpo negro a 25 °C de temperatura, serie de 300 imágenes de 1 s de integración y lectura a 1 MHz.
- Obturador cerrado, serie de 300 imágenes, con mínimo tiempo de integración y lectura a 1 MHz.

Los resultados después de promediar las series de imágenes y restarles el *dark* se pueden mostrar en la Figura 5.2.

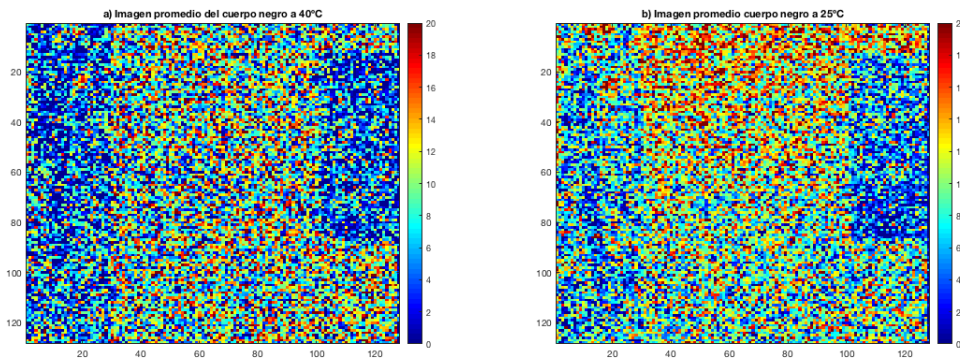


FIGURA 5.2: Promedio de 300 imágenes de 1 s de integración del cuerpo negro a 40 °C y 25 °C tras restarles el *dark*.

Finalmente se restaron las imágenes a las temperaturas de 40 °C y 25 °C para comprobar si la diferencia entre ellas generaba algún tipo de patrón. El resultado se muestra en la Figura 5.3.

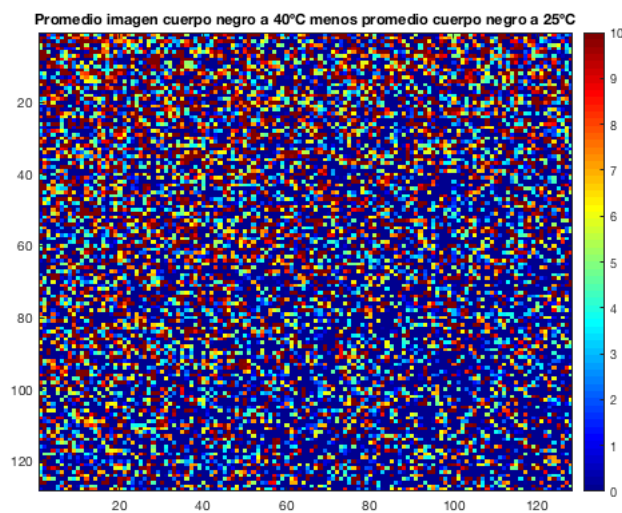


FIGURA 5.3: Resultado de la sustracción de las imágenes de los promedios del cuerpo negro a 40 °C y 25 °C.

5.1.2. Banco óptico

En el banco óptico se tomaron varias series de 100 imágenes con un tiempo de integración de 1 s así como un *bias* para proceder posteriormente a su sustracción de las imágenes y eliminar el ruido interno.

En la Figura 5.4 se muestran las imágenes obtenidas en el banco óptico de LISA.

- Mano derecha del sujeto 1 tras permanecer a oscuras con papel blanco de referencia.
- Mano derecha del sujeto 1 tras permanecer al sol con una línea de crema solar y con papel blanco como referencia.
- Mano derecha del sujeto 1 con papel blanco y entrada circular al banco óptico como referencias.
- Mano derecha del sujeto 2 con la entrada circular al banco óptico como referencia.

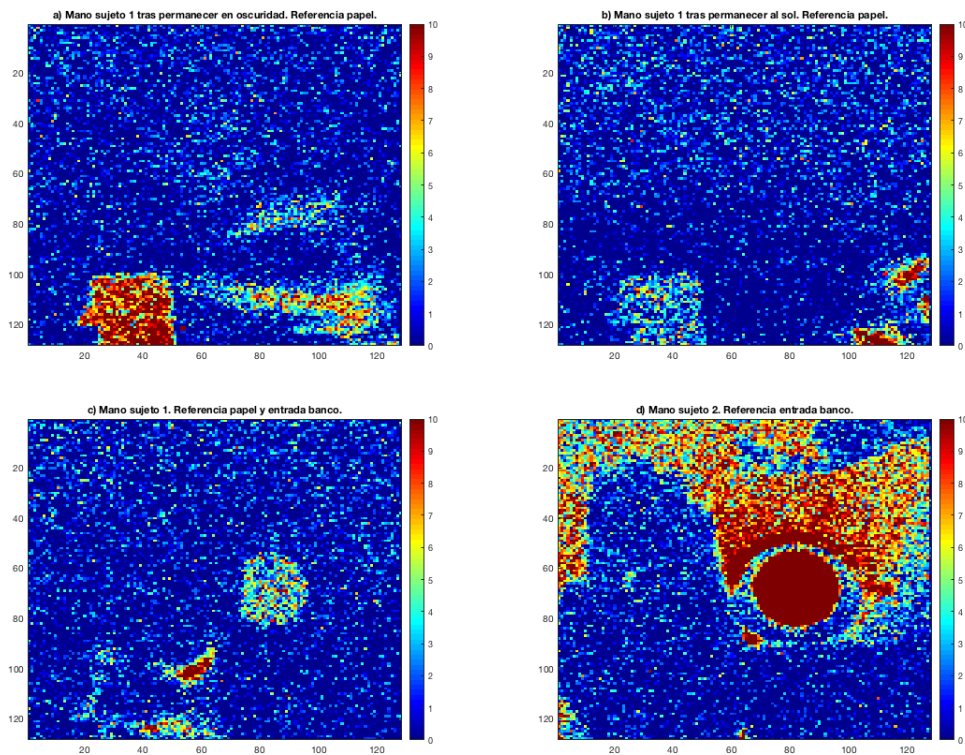


FIGURA 5.4: Imágenes de la mano del sujeto 1 tras haberla mantenido en la oscuridad (a) y al sol (b). Imagen de la mano del sujeto 1 con papel blanco y entrada circular del banco óptico como referencia (c). Imagen de la mano del sujeto 2 con la entrada circular del banco óptico como referencia.

En las imágenes participaron dos sujetos y se utilizaron dos referencias distintas: el papel blanco y la entrada circular al banco óptico. Además se testearon los efectos de la oscuridad, el sol y la crema solar en la detección de la UPE.

Analizando cada una de las imágenes obtenidas (Figura 5.4) en este ensayo se tiene que:

- Imagen a: En la parte inferior derecha de la imagen se deja entrever parte de la forma de la mano aunque sin definición suficiente, además el papel blanco de referencia destaca sobremanera, señal de que hay fotones reflejados por el mismo que están entrando por alguna parte.
- Imagen b: En esta imagen ocurre lo mismo que en la anterior aunque la definición es aún menor. Parece que el sol ha uniformizado la imagen y el contraste ya no es tan claro. La línea de crema solar no se aprecia por ningún sitio.
- Imagen c: Destaca la referencia del papel, parcialmente tapado por la mano y la de la entrada circular del banco óptico pero siguen sin apreciarse rasgos de la mano.
- Imagen d: En esta imagen si que se observa la mano aunque por contraste con la entrada de luz con mayor intensidad desde la entrada circular del banco óptico.

5.2. Resultados en la cámara apantallada

Dentro de la cámara apantallada se realizaron medidas utilizando la misma cámara ANDOR utilizada en las pruebas anteriores. Las imágenes se tomaron durante dos jornadas, una primera con la cámara y la muestra al aire y una segunda con ambas en el interior de una caja cubierta con mantas oscuras. La razón de cambiar el montaje a la cámara apantallada fue la de reducir la luz ambiental que entraba en el montaje en el banco óptico de LISA.

5.2.1. Al aire

Durante la primera jornada se tomaron imágenes de manos y rostro del sujeto 2 para lo que se utilizó como la misma cámara ANDOR y el ocular de 16 mm de casos anteriores. En este montaje se utilizaron como referencias un papel blanco y cinta americana negra.

En la Figura 5.5 se muestran las imágenes registradas que tienen las siguientes características:

- a) Mano del sujeto 2 con trozo de cinta americana negra, integración de 10 s y ganancia EM x300.
- b) Mano del sujeto 2 con trozo de cinta americana negra, integración de 30 s y ganancia EM x300.
- c) Rostro del sujeto 2 con luz ambiental.
- d) Rostro del sujeto 2, integración de 10 s y ganancia EM x300.
- e) Rostro del sujeto 2 con papel blanco, integración de 20 s y ganancia EM x300.
- f) Rostro del sujeto 2 con papel blanco y cinta americana negra, integración de 30 s y ganancia EM x300.

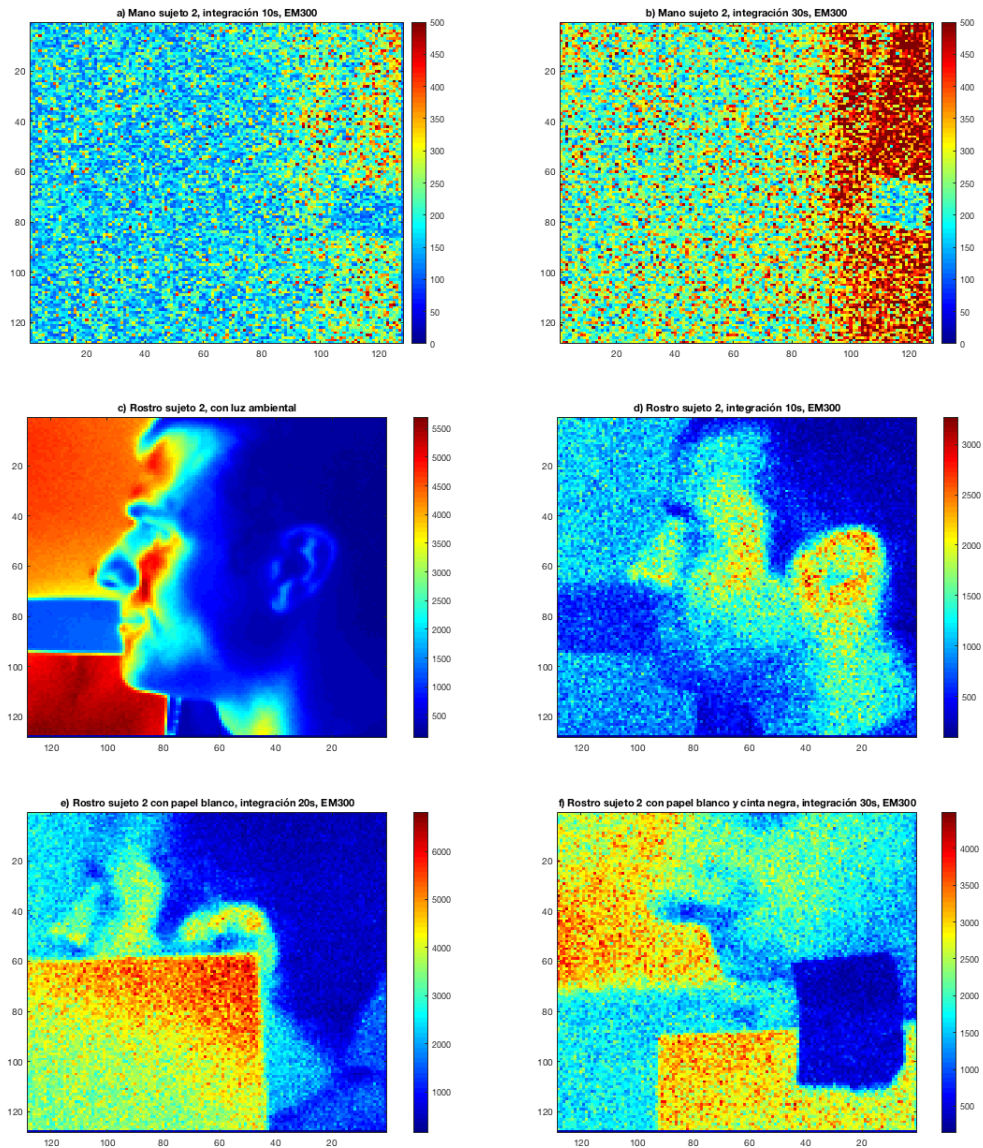


FIGURA 5.5: a) y b) Imágenes de la mano derecha del sujeto 2 con tiempos de integración de 10 s y 30 s y ganancia EM x300. c) Imagen del rostro del sujeto 2 con luz ambiental. d), e) y f) Imágenes del rostro del sujeto 2 a oscuras, tiempos de integración de 10 s, 20 s y 30 s y con referencias de papel blanco y cinta negra americana.

Analizando cada una de las imágenes se observa:

- Imágenes a y b: Comparando ambas imágenes de la mano del sujeto 2 se muestra cómo un mayor tiempo de integración mejora la definición de la imagen y tanto la mano como la cinta americana negra se aprecian perfectamente.
- Imágenes c y d: En las imágenes del rostro del sujeto 2 se puede observar que las zonas de la nariz, la sien y la oreja son las de mayor emisión.
- Imagen e y f: Al introducir las referencias del papel blanco y la cinta negra se observa claramente cómo el papel blanco emite mucho más que el resto mientras que la cinta americana negra aparece en el lado opuesto con una emisión mínima.

A partir de las superficies de referencia se observó que las mayores intensidades correspondían a las superficies blancas, seguidas de la piel y finalmente las superficies negras. Los valores de intensidad eran relativamente altos, se llegaron hasta cerca de las 2000 cuentas para el papel con tiempos de integración de 10 s y ganancia EM x300. Todo esto parecía indicar que estábamos observando luz reflejada por las diferentes superficies en vez de luz emitida por cada una de ellas lo que complicaba sobremanera la detección de la UPE de menor intensidad de emisión. Es por esto que se decidió introducir una caja en el montaje experimental para reducir más aún esta luz ambiental.

5.2.2. Con caja cobertora

Durante la segunda jornada se tomaron imágenes con la cámara y la muestra en el interior de una caja cubierta con mantas negras. En este caso se tomó como muestra la mano del sujeto 3, se utilizó la misma cámara ANDOR de los casos anteriores y se cambió al ocular de 8.5 mm para comprobar si con más aumentos se conseguía detectar la UPE.

La primera imagen se tomó sin muestra, con tan solo el papel blanco de referencia en el interior de la caja. La intención de esto era estimar si seguía detectándose luz ambiental reflejada en el papel. Esta medida se corresponde con la imagen a) de la Figura 5.6. El resto de medidas sí se realizó con muestras comparando la imagen con luz ambiental con la imagen en oscuridad.

En la Figura 5.6 se muestran las imágenes registradas que tienen las siguientes características:

- a) Imagen sin muestra, integración de 50 s y ganancia EM x300.
- b) Mano del sujeto 3 con luz ambiental y posición 1.
- c) Mano del sujeto 3 en posición 1, integración de 60 s y ganancia EM x300.
- d) Mano del sujeto 3 con luz ambiental y posición 2.
- e) Mano del sujeto 3 en posición 2, integración de 120 s y ganancia EM x300.
- f) Mano del sujeto 3 con luz ambiental y posición 3.
- g) Mano del sujeto 3 en posición 3, integración de 300 s y ganancia EM x300.

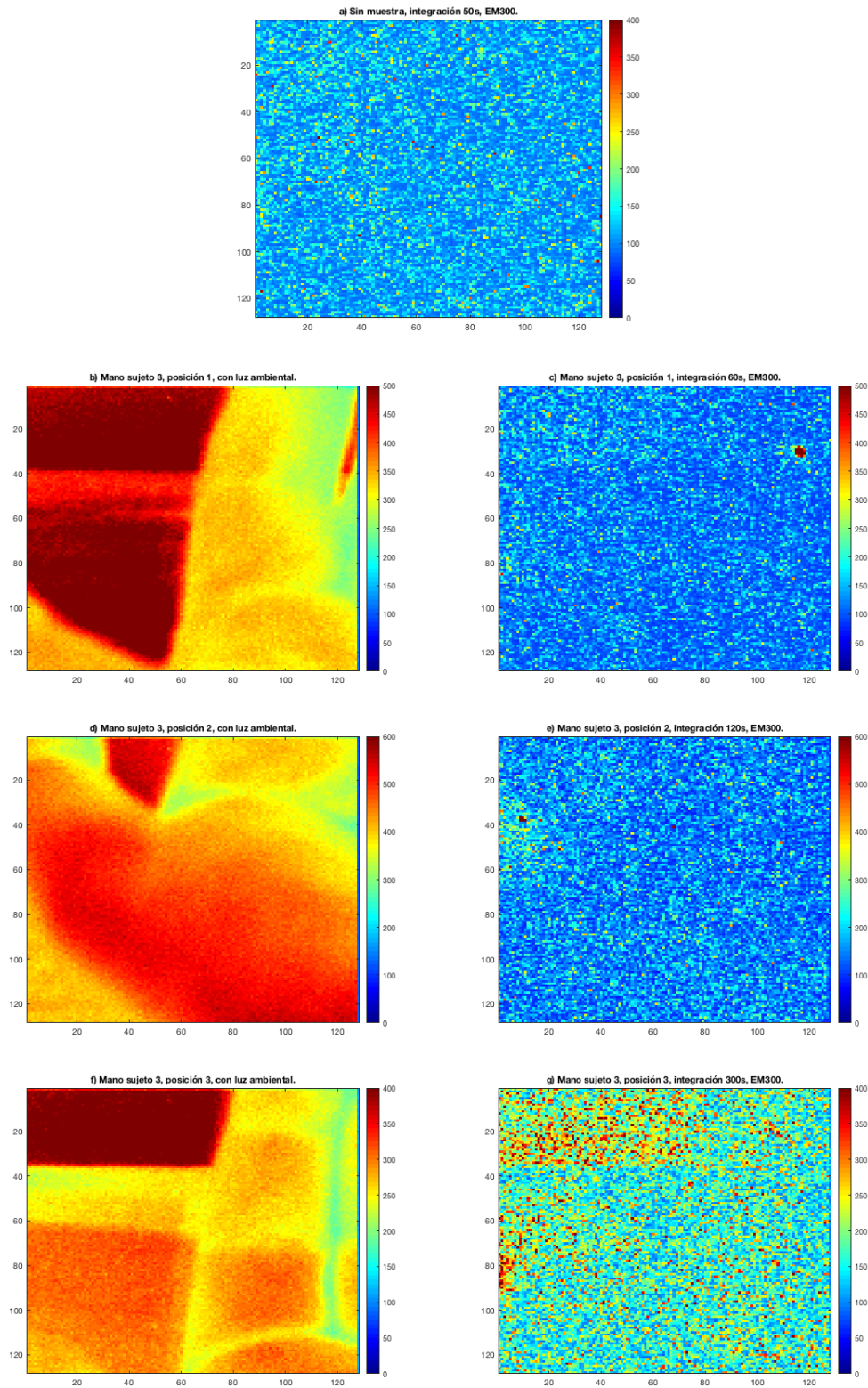


FIGURA 5.6: a) Imagen en el interior de caja sin muestra, con papel blanco de referencia y tiempo de integración de 50 s. b), d) y f) Mano sujeto 3 en el interior de caja con luz ambiental en diferentes posiciones. c), e) y g) Mano del sujeto 3 con tiempos de integración de 60 s, 120 s y 300 s y ganancia EM x300 con las mismas posiciones adjuntas anteriores.

Analizando cada una de las imágenes se observa:

- Imagen a: Es esta imagen no se ha introducido muestra alguna en la caja, solo un papel blanco de referencia. Tras 50 s de integración la forma del papel no es apreciable, señal de que se ha reducido enormemente la luz ambiental respecto a las anteriores medidas. Todo parece indicar que se ha conseguido eliminar prácticamente toda la luz ambiental.
- Imagen b y c: Comparando la posición de la mano del sujeto 3 con luz ambiental con el registro en oscuridad tras 60 s de integración y ganancia EM x300 se observa una emisión muy localizada en torno a un punto. Este punto coincide con la parte interna del dedo índice de la mano derecha.
- Imagen d y e: Comparando la posición de la mano del sujeto 3 con luz ambiental con el registro en oscuridad tras 120 s de integración y ganancia EM x300 se observa en este caso una zona de emisión en el dedo pulgar de la mano derecha del sujeto. Esta emisión está menos localizada que la anterior y es ligeramente menos intensa también.
- Imagen f y g: Comparando la posición de la mano del sujeto 3 con luz ambiental con el registro en oscuridad tras 300 s de integración y ganancia EM x300 se observa esta vez una estructura mucho más concreta que coincide con el papel blanco de referencia. También una emisión en el lateral izquierdo de la imagen que coincide con la pared de cartón marrón pero que queda fuera de la posición de la mano y el papel de referencia.

Capítulo 6

Discusión

Como ya se ha indicado, a partir de los datos de las diferentes bibliografías lo que se buscaba son intensidades de la UPE de $10 \text{ fotones s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ a $1000 \text{ fotones s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para la emisión espontánea [Devara, Usa e Inaba, 1997] y dos o tres órdenes de magnitud por encima de estos [Cifra y Pospíšil, 2014] en el caso de la UPE inducida por la radiación solar.

Por otro lado, el rango espectral en el que se detecta la UPE varía de 350 nm a 1300 nm [Cifra y Pospíšil, 2014] por lo que éste es el que deberíamos haber obtenido en nuestras medidas aunque se espera un rango más estrecho ya que la eficiencia del detector no es la misma para todo el espectro [e2V, 2004]. En cualquier caso no estaba entre nuestros objetivos la determinación de frecuencias o longitudes de onda de la UPE sino su mera detección.

6.1. Medidas del cuerpo negro

En la figura 5.2 se pueden observar las diferentes formas de la imagen lo que indica la distinta emisión de fotones por parte de cada una de ellas. Estos fotones pueden provenir de la emisión propia, reflexión de luz ambiental o una mezcla de ambos.

En la imagen que resulta de la sustracción de las imágenes del cuerpo negro a 40°C y a 25°C no se observa ningún tipo de patrón ni se diferencia ninguna forma, la pared del fondo o el propio cuerpo negro. El resultado es una imagen simple de ruido blanco.

Se puede concluir que la temperatura de los elementos enfocados no es una variable que ha influido en lo que la cámara ha detectado y por lo tanto la radiación detectada no tiene un origen térmico. Los fotones detectados no se pueden atribuir a la radiación de cuerpo negro, no hay ninguna variación en la emisión detectada fruto de la temperatura sino fotones de la luz ambiental reflejados por los cuerpos. En consecuencia es procedente descartar experimentalmente la existencia de radiación térmica en los datos registrados en posteriores montajes.

6.2. Medidas en el banco óptico de LISA

Los resultados indican que a pesar de todas las medidas tomadas para evitarlo se detecta luz ambiental en el banco. De forma destacada desde la entrada circular del mismo a pesar de permanecer cerrada. Además se observa que esta luz se refleja en el papel blanco lo que genera grandes contrastes. Esta entrada de luz en el montaje

invita a afirmar que las partes detectadas de la mano son fruto de reflejos o, como en la última imagen, simple contraste con un fondo iluminado.

No se puede afirmar nada acerca de los efectos que la exposición a la oscuridad, al sol y a la crema solar tienen sobre la UPE ya que no ha sido detectada. Es conveniente por lo tanto la búsqueda de una nueva localización que permita medidas con menor entrada de luz. Esto contrasta con la impresión inicial de la existencia de una oscuridad notable en la toma de imágenes y confirma también la gran sensibilidad de la cámara.

6.3. Medidas en la cámara apantallada al aire

Durante la primera jornada en la cámara apantallada aparentemente no entró nada de luz en el montaje y la oscuridad era absoluta sin embargo, al igual que en el caso del banco óptico de LISA, en las medidas se contabilizó un número de fotones excesivamente alto.

En todos los casos la mayor intensidad de las imágenes se observa en las superficies blancas seguidas de la piel y de las superficies negras. Además los valores de intensidad son excesivamente altos, cerca de 2000 fotones para el papel con una integración de 10 s y una ganancia EM x300. Finalmente señalar que la intensidad aumenta proporcionalmente con el tiempo de integración, al pasar de 10 s a 30 s. Todo esto encaja más con una reflexión que con una emisión propiamente dicha.

Nuevamente por lo tanto por alguna parte se estaba colando luz ambiental que tras ser reflejada en el papel blanco y en el sujeto acaba siendo registrada por la cámara. Es por esto que se plantea un nuevo montaje con una caja cobertora para comprobar si realmente es así y reducir la luz ambiental en este caso.

6.4. Medidas en la cámara apantallada con caja cobertora

Durante la segunda jornada se añadió una caja de cartón cubierta con mantas negras al montaje experimental para asegurar la oscuridad en la toma de medidas y descartar por completo los fenómenos de reflexión de luz ambiental. En este caso, se integró durante 50 s, 60 s, 120 s y 300 s con una ganancia de EM x300.

La no visualización del papel blanco de referencia en el montaje en la caja cobertora confirma que los detalles captados en los anteriores montajes estaban altamente correlacionados con la reflexión de la luz ambiental y por lo tanto pierden todo valor como prueba de detección de la UPE.

Las imágenes c y e parecen haber detectado emisiones localizadas en dos dedos de forma separada. Esto no parece muy acorde con lo que se espera de una emisión de origen oxidativo, donde se espera algo menos localizado. Además al integrar más tiempo, como se muestra en la imagen g, se vuelve a una mayor emisión por parte del papel blanco, señal de que sigue habiendo algo de luz ambiental en el montaje. Parece por lo tanto que las detecciones señaladas pueden tener otro origen, sean rayos cósmicos o efectos no deseados de la propia cámara, y no son lo suficientemente concluyentes como para apuntar a la UPE como origen.

Aunque se ha descartado la emisión UPE del papel blanco, al tratarse de material biológico, cabe la posibilidad de que esté emitiendo UPE por algún fenómeno de oxidación propia. Se ha considerado que el metabolismo oxidativo y por lo tanto la UPE de muestras biológicas vivas es mucho mayor que la de las no vivas, que sería el caso del papel, por lo que se ha despreciado esta última. En cualquier caso la UPE en muestras no vivas es también una vía de estudio, como ya se comentó en el Capítulo 2, en áreas como la alimentación.

Capítulo 7

Conclusiones y futuros trabajos

Los resultados descritos anteriormente llevan a sacar las siguientes conclusiones:

- Es muy difícil alcanzar la oscuridad absoluta. Aunque pensábamos que estaba todo a oscuras y éramos incapaces de detectar ningún tipo de fuente a simple vista y tras acostumbrar a los ojos a la oscuridad, es un hecho que la había en todos los casos salvo en las últimas medidas en la sala apantallada con caja cobertora. La existencia de pequeños huecos en los cajones, los dispositivos eléctricos y el alumbrado en las salas supone una dificultad añadida a tener en cuenta en la toma de este tipo de medidas. Esto puede generar errores de interpretación en las medidas y confundir la UPE con fenómenos de reflexión de la luz ambiental.
- No se ha observado ningún rastro de UPE emitido por ninguno de los sujetos a pesar de utilizar una cámara EMCCD de alta sensibilidad con una alta ganancia y un tiempo relativamente alto de integración. Por lo tanto la sensibilidad de la cámara en el rango visible y unos tiempos de integración de hasta 300 s no han sido suficiente para detectar la UPE. Sería por lo tanto conveniente analizar otros rangos de longitudes de onda, mayores tiempos de integración u otros instrumentos en la búsqueda de la UPE en el rango visible.
- No se ha detectado emisión ni de origen térmico ni de origen bioquímico con la cámara EMCCD y los tiempos de integración utilizados.

Es recomendable seguir haciendo medidas para determinar la sensibilidad que requeriría un dispositivo para detectar la UPE, especialmente a temperatura ambiente y en el espectro visible ya que esto daría pie a la fabricación de detectores con infinidad de utilidades en áreas como la medicina, la biología, la alimentación o la estructura de materiales.

Además de los conocidos fenómenos biológicos oxidativos que dan lugar a la UPE hay que analizar otras reacciones químicas capaces de emitir fotones, detectarlos, correlacionarlos con los procesos subyacentes y buscarles aplicación. Todo ello permitiría hacer un seguimiento *in situ* de las fases de estas reacciones químicas.

Las posibilidades que se derivarían de detectar con estas cámaras la UPE pueden ser infinitas dado que las reacciones químicas nos dan información de los procesos que tienen lugar y tanto su rapidez como su frecuencia permiten sacar conclusiones sobre los procesos metabólicos subyacentes. Por otro lado, la electromultiplicación supone una gran reducción de tiempo necesario para el registro de la imagen con poca luz como ya se ha probado en otros campos. Una simple integración en dispositivos móviles popularizaría su uso y cambiarían el desarrollo de un sinfín de procesos tal y como los conocemos ahora mismo.

Bibliografía

- A. Prasad, P. Pospíšil (2012). «Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: in vivo charge coupled device imaging». En: *Journal of Biomedical Optics* 17.8, pág. 085004. URL: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.8.085004>.
- ANDOR (2008a). «Andor iXon EM+ Hardware guide». En: *Andor Technology plc*. URL: <http://hexagon.physics.wisc.edu/research/technical%20info/andor%20ixon%20plus/INSTRUCTION%20MANUALS/BOOKMARKED%20PDF/iXon/iXonEMplus%20Hardware%20Guide.pdf>.
- (2008b). «iXon EM+ 860 (back-illuminated)». En: *bionovatec.com*. URL: <http://www.bionovatec.com/wp-content/uploads/2014/04/iXon+860+spec+sheet.pdf>.
- (2018). «Scientific Digital Cameras». En: *Oxford Instruments*. URL: <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/scientific-digital-cameras>.
- Blakytyn, R. y E. Jude (2006). «The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes». En: *Diabetic Medicine* 23.6, págs. 594-608. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01773.x>.
- Cifra, M. y P. Pospíšil (2014). «Ultra-weak photon emission from biological samples: Definition, mechanisms, properties, detection and applications». En: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 139, págs. 2-10. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.02.009>.
- Devara, B., M. Usa y H. Inaba (1997). «Biophotons: ultraweak light emission from living systems». En: *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2.2, págs. 188-193. URL: [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(97\)80064-2](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(97)80064-2).
- e2V (2004). «CCD60 Back Illuminated Electron Multiplying CCD Sensor». En: *Photometrics*. URL: <https://www.photometrics.com/products/datasheets/e2v-CCD60-Datasheet.pdf>.
- Guo, J. y col. (2017). «Ultraweak photon emission in strawberry fruit during ripening and aging is related to energy level». En: *Open Life Sciences* 12.1, págs. 393-398. URL: <https://doi.org/10.1515/biol-2017-0046>.
- Iida, T. y col. (2002). «Generation of Reactive Oxygen Species and Photon Emission from a Brownd Product». En: *Journal Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66.8, págs. 1641-1645. URL: <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1641>.
- Inagaki, H. y col. (2008). «Difference in ultraweak photon emissions between sulfonylurea-resistant and sulfonylurea-susceptible biotypes of *Scirpus juncoides* following the application of a sulfonylurea herbicide». En: *Weed Biology and Management* 8.2, págs. 78-84. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2008.00278.x>.
- Isoshima, T. (1995). «Ultrahigh sensitivity single-photon detector using a Si avalanche photodiode for the measurement of ultraweak biochemiluminescence». En: *Review of Scientific Instruments* 66.2922. URL: <https://doi.org/10.1063/1.1145578>.
- Ives, J.A. y col. (2014). «Ultraweak Photon Emission as a Non-Invasive Health Assessment: A Systematic Review». En: *PLoS ONE* 9.2, e87401. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087401>.

- Kim, J. y col. (2006). «Scanning Spontaneous Photon Emission From Transplanted Ovarian Tumor of Mice Using a Photomultiplier Tube». En: *Electromagnetic Biology and Medicine* 25.2, págs. 97-102. URL: <https://doi.org/10.1080/15368370600719000>.
- Kobayashi, M., D. Kikuchi y H. Okamura (2009). «Imaging of Ultraweak Spontaneous Photon Emission from Human Body Displaying Diurnal Rhythm». En: *PLoS ONE* 4.7, e6256. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006256>.
- Kobayashi, M. y col. (1999). «In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress». En: *Neuroscience Research* 34.2, págs. 103-113. URL: [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(99\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(99)00040-1).
- Kokubo, H. y M. Yamamoto (2009). «Wave Length and Photon Emission from Cucumber - Effects of 70GHz Extremely High Frequency (EHF) and Non-contact Healing -». En: *Journal of International Society of Life Information Science* 27.1, págs. 78-83. URL: http://kokubo.cool.coocan.jp/KokuboBiophoton_No6.pdf.
- Mansfield, J.W. (2005). «Biophoton distress flares signal the onset of the hypersensitive reaction». En: *Trends in Plant Science* 10.7, págs. 307-309. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.05.007>.
- McLean, I.S. (2010). «Electronic Imaging in Astronomy. Detectors and Instrumentation». En: *Praxis*, págs. 241-273.
- Ohya, T. y col. (2000). «Early Detection of Salt Stress Damage by Biophotons in Red Bean Seedling». En: *Japanese Journal of Applied Physics* 39.6A, pág. 3696. URL: <https://doi.org/10.1143/JJAP.39.3696>.
- Ohya, T. y col. (2002). «Biophoton Emission Due to Drought Injury in Red Beans: Possibility of Early Detection of Drought Injury». En: *Japanese Journal of Applied Physics* 41.7A, pág. 4766. URL: <https://doi.org/10.1143/JJAP.41.4766>.
- Ortega-Ojeda, F. y col. (2018). «Measuring the Human Ultra-Weak Photon Emission Distribution Using an Electron-Multiplying, Charge-Coupled Device as a Sensor». En: *Sensors (Basel)* 18.4, pág. 1152. URL: <https://dx.doi.org/10.3390/S18041152>.
- Planck, M. (1914). «The Theory of Heat Radiation». En: *PHILADELPHIA. P. BLAKISTON'S SON CO.* Págs. 197-220.
- Prasad, A. y P. Pospíšil (2011). «Two-dimensional imaging of spontaneous ultraweak photon emission from the human skin: role of reactive oxygen species». En: *Journal of Biophotonics* 4.11-12, págs. 840-849. URL: <https://doi.org/10.1002/jbio.201100073>.
- Rastogi, A. y P. Pospíšil (2011). «Spontaneous ultraweak photon emission imaging of oxidative metabolic processes in human skin: effect of molecular oxygen and antioxidant defense system». En: *Journal of Biomedical Optics* 16(09). URL: <https://doi.org/10.1117/1.3616135>.
- Rastogi, A. y P. Pospíšil (2013). «Ultra-weak photon emission as a non-invasive tool for the measurement of oxidative stress induced by UVA radiation in *Arabidopsis thaliana*». En: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 123.5, págs. 59-64. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.012>.
- Sauermann, G. y col. (2004). «Ultraweak photon emission of human skin in vivo: Influence of topically applied antioxidants on human skin». En: *Methods in Enzymology* 300.1999, págs. 419-428. URL: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)00147-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)00147-0).
- Stauff, J. y H. Schmidkunz (1962). «Chemilumineszenz von Oxydationsreaktionen». En: *Z. Phys Chem* 33, págs. 274-276.

- Takeda, M. y col. (2004). «Biophoton detection as a novel technique for cancer imaging». En: *Cancer Science* 95.8, págs. 656-661. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03325.x>.
- Tarussov, B.N., A.I. Polidova y A.I. Zhuravlyov (1961a). «Discovery of chemiluminescence in mice liver». En: *Radiobiologiya* 1, págs. 150-151.
- (1961b). «Investigation of super low spontaneous luminescence of animal cells». En: *Biofizika* 6, págs. 490-492.
- Tulloch, S. (2010). «Astronomical Spectroscopy with Electron Multiplying CCDs». En: *University of Sheeld*. URL: <http://www.qucam.com/assets/thesismtfinal2.pdf>.
- Tulloch, S. y V.S. Dhillon (2011). «On the use of electron-multiplying CCDs for astronomical spectroscopy». En: *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 411.1, págs. 211-225. URL: <https://academic.oup.com/mnras/article/411/1/211/1038914>.
- Wijk, R. Van, M. Kobayashi y E.P.A. Van Wijk (2006). «Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a moveable photomultiplier and CCD imaging». En: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 83.1, págs. 69-76. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.005>.