

SIMULACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE OBJETOS TURBIOS COMO EL MEDIO BIOLÓGICO MEDIANTE OPTICSTUDIO (ZEMAX)[®]

A. Cárdenas-Rosales ^a, J.A. Delgado Atencio ^b, M. Cunill-Rodríguez ^c

Universidad Politécnica de Tulancingo, Hidalgo, México

^a alejandra.cardenas@upt.edu.mx, ^b jose.delgado@upt.edu.mx,

^c margarita.cunill@upt.edu.mx

RESUMEN

En este trabajo se presenta una simulación de la fluorescencia realizada mediante el software de diseño óptico Zemax[®], para un objeto turbio en forma de disco de tamaño variable en el rango de 25 a 1800 μm de diámetro y de grosor fijo en 500 μm . El modelo de esparcimiento volumétrico de la muestra de estudio se describe por medio de la función de Henyey-Greenstein. La metodología presentada sirve de tutorial en la simulación de los procesos de reflexión difusa y de fluorescencia en aplicaciones médicas, a la vez que los resultados obtenidos ilustran la influencia de las variables consideradas en la señal recolectada por el detector en el arreglo óptico propuesto.

Palabras clave: Simulación en Zemax; Fluorescencia en medios biológicos; Objetos turbios

ABSTRACT

In this work a fluorescence simulation performed by using the optical design software Zemax[®] is presented, for a disk-shaped turbid object of variable size in the range of 25 to 1800 μm in diameter and 500 μm in thickness. The bulk-scattering model of the study-sample is described through the Henyey-Greenstein function. The presented methodology serves as a tutorial in the simulation of diffuse reflectance and of fluorescence processes in medical applications, at the same time that the obtained results illustrate the influence of the considered variables on the recollected signal by the detector in the optical setup proposed.

Keywords: Zemax simulation; Fluorescence in biological media; Turbid objects

1. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes fenómenos fundamentales que permiten que sea posible la propagación de la luz en diferentes medios [1]. Estos fenómenos incluyen a la absorción, transmisión, reflexión y esparcimiento, siendo este último propio de aquellos objetos o medios denominados como turbios, quienes se caracterizan por mantener variaciones de sus propiedades ópticas suficientemente pequeñas como para evitar la absorción localizada [2].

El estudio del transporte e interacción de la luz con un medio o tejido biológico se basa principalmente en la Teoría del Transporte Radiactivo, en donde dicho fenómeno puede ser modelado analíticamente por medio de la ecuación de transferencia radiativa (ETR) o ecuación del transporte la cual, debido a la complejidad de su solución, es comúnmente aproximada a la ecuación de la difusión, proporcionando soluciones que son computacionalmente más eficientes pero menos precisas que aquellas obtenidas a través del método Monte Carlo [3, 4].

La aproximación de la difusión permite resolver a la ecuación de transporte de forma analítica después de cumplir ciertas condiciones [5], entre las cuales se encuentra que el haz luminoso debe ser infinitamente delgado y el medio debe ser semi infinito e isotrópico. Es por ello que, para muestras de estudio de tamaños considerablemente pequeños, la aproximación de la difusión no es recomendable.

Por el contrario, el método Monte Carlo permite resolver de forma exacta a la ecuación de transferencia radiativa, mediante la simulación computacional del modelado de la luz [2], a través de las trayectorias de los fotones y su interacción con los centros de absorción y esparcimiento de un tejido, de forma aleatoria.

Actualmente, existe una tendencia cada vez más creciente del uso de software computacional para realizar simulaciones y modelado óptico, tales como: YafRay, POV-Ray, ASAP (Advanced Systems Analysis Program), Fred Optical Engineering, OSLO, ZEMAX (OpticStudio), entre otros. ZEMAX® [6] es un software computacional de diseño óptico y modelado de trazo de rayos, que basa su funcionamiento en el método Monte Carlo mediante eventos estocásticos y aleatorios.

Debido a la disponibilidad de una llave de este programa en nuestro cuerpo académico de Computación Óptica y Sistemas de Visión de la Universidad Politécnica de Tulancingo, en este trabajo se presentan simulaciones de la fluorescencia y de reflexión difusa, para una muestra cilíndrica ópticamente turbia de tamaños de diámetro comprendidos en el rango de 25 a 1800 μm y de espesor fijo en 500 μm . El modelo de esparcimiento volumétrico de la muestra de estudio se encuentra descrito bajo la función de fase de Henyey-Greenstein, con un factor de anisotropía (g) variable desde 0 a 0.97, ángulo de esparcimiento de 180° , una trayectoria promedio de 0.05 mm y una transmitancia de 1. En esta simulación una fuente elipse es utilizada como fuente de excitación, emitiendo a una longitud de onda de onda de 532 nm. Mediante la cadena de filtro "X_WAVESHIFT", fue establecido un desplazamiento de Stokes ilustrativo al considerarse una emisión de fluorescencia a la longitud de onda de onda de 625 nm. El objetivo de esta simulación es estudiar el comportamiento de la detección de la señal de la fluorescencia mediante el aumento proporcional de la dimensión radial del disco de la muestra en un arreglo óptico de excitación-detección típico espectroscópico donde un espejo dicroico separa la luz de excitación de la luz de emisión fluorescente. En el canal de excitación se coloca una lente que concentra el haz de excitación sobre la muestra y a la vez recolecta una fracción de la señal emitida por fluorescencia. La radiación fluorescente, una vez que es transmitida por un divisor de haz con propiedades de un espejo dicroico, es concentrada sobre un detector *rect* por medio de una segunda lente. La metodología seguida sirve de tutorial en la simulación de este proceso en aplicaciones médicas, a la vez que los

resultados obtenidos ilustran la influencia de las variables consideradas en la señal recolectada por el arreglo óptico propuesto.

2. Materiales Y Métodos

Las simulaciones presentadas en este trabajo fueron realizadas con software Zemax® en su versión 2009, por medio de una máquina virtual con sistema operativo Windows 7 profesional, 32 GB de disco duro y 3 GB de memoria RAM, así como de 3 núcleos de procesamiento proporcionados por el procesador Intel Core i7 de la máquina física.

En la Figura 1, se observa el arreglo óptico de trazo de rayos utilizado para realizar la simulación de la reflexión difusa de la muestra de estudio. Este arreglo se encuentra conformado por (1) una fuente elipse que emite a una longitud de onda de 532 nm y de potencia igual a 1mW, (2) un objeto de tipo *poly object*, con características de un divisor de haz, (3) un detector de tipo *rect* para registrar la señal que proviene antes de llegar a la lente, (4) una lente convergente de distancia focal de 10 mm, (5) un detector tipo *rect* colocado después de la lente para observar la radiación saliente de esta lente, (6) una muestra volumétrica en forma de disco, (7) un detector de tipo *rect* para registrar la señal que proviene del divisor de haz antes de llegar a la lente, (8) una lente de características semejantes a la primera y (9) un detector de tipo *rect* colocado a la distancia focal de la lente para registrar la radiación de emitida por la muestra.

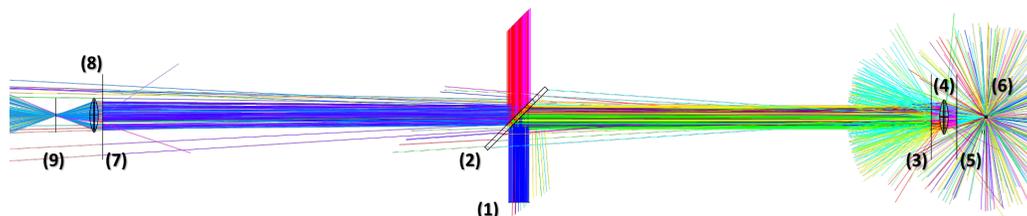


Figura 1: Sistema óptico de trazo de rayos para llevar a cabo la simulación de reflexión difusa y fluorescencia

Se establecieron las siguientes propiedades a la muestra de estudio (6) de este sistema óptico.

1. Propiedades ópticas:
 - 1.1. Factor de anisotropía con valores de 0, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 0.95 y 0.97.
 - 1.2. Trayectoria promedio de 0.05 mm.
 - 1.3. Transmisión igual a 1.
 - 1.4. Ángulo de esparcimiento de 180°.
2. Propiedades geométricas:
 - 2.1. Diámetros de la muestra de 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 y 1800 μm .
 - 2.2. Grosor de 500 μm .

Las propiedades ópticas mencionadas anteriormente, fueron asignadas mediante las propiedades del objeto en ZEMAX®, usando el modelo de esparcimiento de la función de

fase de “Henyey-Greenstein-bulk.dll” [7], mientras que las propiedades físicas fueron establecidas directamente en el editor de lentes de ZEMAX.

Para llevar a cabo la simulación de la fluorescencia, al divisor de haz (2) se le asignaron propiedades de un espejo diecrico [8, 9], permitiendo separar las longitudes de onda de excitación (532 nm) y de emisión de fluorescencia (625 nm). Finalmente, por medio de la cadena de filtro “X_WAVESHIFT” [10-12], fue establecido un desplazamiento de Stokes ilustrativo mediante el cambio de la longitud de onda de excitación a la de emisión de fluorescencia. En la Figura 2, se muestra la influencia de la cadena de filtro en el diagrama de trazo de rayos, para llevar a cabo la simulación de fluorescencia.

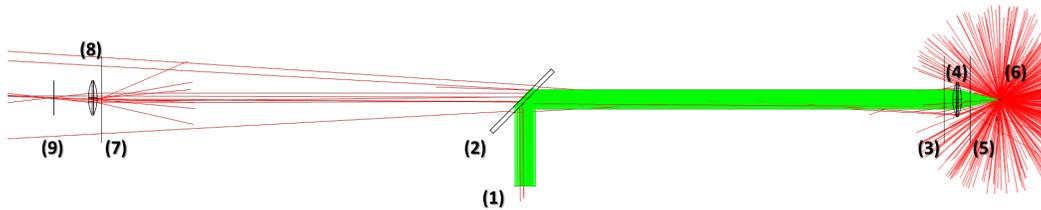


Figura 2: Aplicación de la cadena de filtro X_WAVESHIFT en el arreglo óptico de trazo de rayos, para obtener un desplazamiento de Stokes que ilustra el cambio de longitud de onda como emisión de fluorescencia de un disco ópticamente turbio

3. RESULTADOS

Un total de 120 simulaciones fueron realizadas, de las cuales 60 fueron para simular la reflexión difusa y las otras 60 para simular la fluorescencia de la muestra, con sus diferentes tamaños de diámetro (25 a 1800 μm) y sus valores de g (0 a 0.97).

Los valores de potencia total (mW) registrados por el detector *rect* (9) del arreglo mostrado en la Figura 1, fueron procesados y graficados mediante un script de MATLAB®, obteniendo las gráficas que se muestran en la Figura 3, correspondientes a los datos de la simulación de reflexión difusa del objeto turbio. La Figura 3a muestra a la potencia total registrada en función del diámetro del objeto, para cada valor del factor de anisotropía del medio g , mientras que la Figura 3b ilustra un ajuste lineal por mínimos cuadrados de la potencia total en función al factor de anisotropía, para 3 diámetros del objeto (25, 400 y 1200 μm).

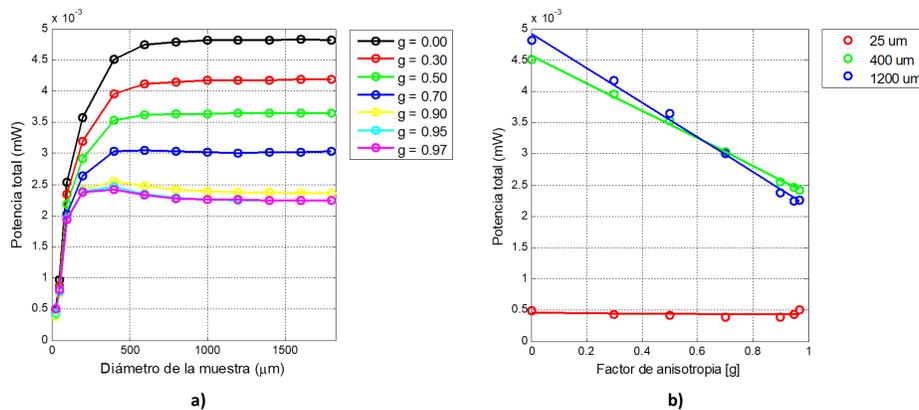


Figura 3: Simulación de la reflexión difusa: a) potencia total (mW) según cambia el diámetro de la muestra (μm) para siete valores de g ; b) ajuste lineal por mínimos cuadrados de la potencia total en función de g para tres diámetros específicos de la muestra

En la Figura 4 se presentan los resultados de la simulación de la fluorescencia, en donde la Figura 4a muestra la potencia total, registrada por el detector *rect* (9) de la Figura 2, en función del diámetro de la muestra para diferentes valores de g , mientras que la Figura 4b visualiza el ajuste lineal por mínimos cuadrados de la potencia total en función de los valores de g , para los tres diámetros de la muestra mencionados anteriormente (25, 400 y 1200 μm).

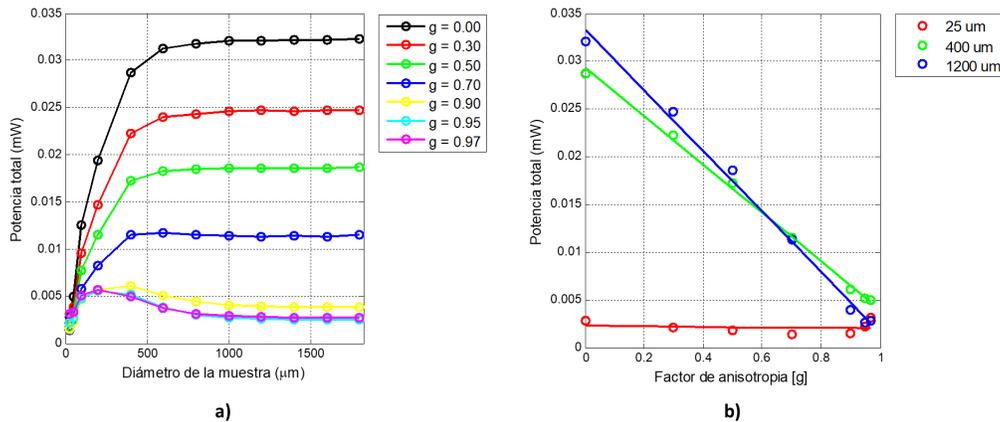


Figura 4: Simulación de la fluorescencia: a) potencia total (mW) según cambia el diámetro de la muestra (μm) para siete valores de g ; b) ajuste lineal por mínimos cuadrados de la potencia total en función de g para tres diámetros específicos de la muestra

Observe que las gráficas de la potencia total en función del diámetro de la muestra tienden a incrementar y posteriormente a mantenerse cuando ésta tiene un tamaño a partir de 1000 μm , aproximadamente. Note, que ambos ajustes lineales por mínimos cuadrados de la potencia total en función al factor de anisotropía, tanto para la simulación de la reflexión difusa como para la simulación de la fluorescencia de un medio ópticamente turbio, tienen un comportamiento semejante, particularmente en la pendiente de cada recta calculada para cada diámetro de la muestra, no mostradas en este trabajo.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo hemos presentado una simulación de trazo de rayos, para la reflexión difusa y fluorescencia, realizada mediante el software ZEMAX®, de un objeto ópticamente turbio en forma de disco de diámetro variable entre 25 - 1800 μm . Se le asignaron propiedades de esparcimiento volumétrico a la muestra mediante la librería .DLL de la función de Henyey-Greenstein de ZEMAX®, en donde los valores del factor de anisotropía (g) fueron variables de 0 a 0.97.

Los resultados de la reflexión difusa obtenidos en este trabajo, muestran la influencia del parámetro g que se encuentra directamente relacionada con el esparcimiento del fotón, dado que al incrementar el valor de g , el retroesparcimiento de la luz cada vez presenta menor señal registrada por el detector, tal y como se observó en las gráficas de la potencia total en función al aumento del diámetro de la muestra, en donde el incremento de g condujo a un decremento de la señal de reflexión dirigida hacia el último detector.

La técnica de ajuste de curvas por mínimos cuadrados realizado para las gráficas de la potencia total en función del factor de anisotropía, permitió observar que todas las curvas muestran una tendencia de ajuste polinomial de orden 1, con diferentes valores de pendiente y de intersección, los cuales permitirán definir ecuaciones de rectas precisas para cada diámetro de la muestra.

Resultados similares fueron obtenidos para el caso de las simulaciones de fluorescencia, con la diferencia de que el nivel de señal registrada por el detector fue diferente. Para las simulaciones de fluorescencia se aplicaron propiedades ópticas de un espejo dicróico [9] al divisor de haz, para que permitiera realizar la función de separar las longitudes de onda de excitación (532 nm) proveniente de la fuente luminosa, y de emisión de fluorescencia (625 nm) procedente de la muestra. Durante esta simulación, se emplearon cadenas de filtros [10-12] para observar el cambio de la longitud de onda de excitación a emisión en el layout de la interfaz de usuario de ZEMAX®, particularmente con la cadena “X_WAVESHIFT”.

Las simulaciones presentadas en este trabajo, proporcionan una visión general de la influencia de las propiedades ópticas, particularmente del factor de anisotropía, para el modelado de trazo de rayos en medios turbios, y con ello ser contemplado en aplicaciones médicas para el estudio de los efectos de la luz (reflexión difusa y fluorescencia) en tejidos biológicos.

5. REFERENCIAS

- [1] Hecht, E., [Optica], Addison Wesley Iberoamericana, Madrid. 86 (2000).
- [2] Prahl S.A., [Light Transport in Tissue]. Tesis doctoral. (1988).
- [3] Wang, L.V. y Wu, H.I., [Biomedical Optics: Principles and Imaging], John Wiley & Sons, Inc. 83 (2009).
- [4] Rafeh, de M. S. y Muñoz, M. A. A. [Algoritmo Monte Carlo multicapas modificado para la simulación de la luz difusa en la atmósfera] Revista Ingeniería UC, 21(1), 7-15 (2014).
- [5] Delgado A. J. A., [Análisis de la Piel Humana Mediante Espectroscopía de Reflexión Difusa], INAOE, Tesis doctoral. 4-5 (2007).
- [6] Zemax LLC., [Zemax Optical Design Software].
- [7] Zemax LLC., [Optical Design Program User's Guide], Chapter 12, 423 (2009).
- [8] Zemax LLC., [Optical Design Program User's Guide], Chapter 20, 583, (2009).
- [9] Thorlabs Inc., [DMLP550, Longpass Dichroic Mirror 550 nm].
- [10] Gangadhara S., [How to model fluorescence using bulk scattering], Zemax Knowledgebase OpticStudio, (2008).
- [11] Zemax LLC., [Optical Design Program User's Guide], Chapter 12, 435, (2009).
- [12] Gangadhara S., [How to Identify Specific Rays Using Filter Strings], Zemax Knowledgebase OpticStudio, (2009).