



CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN OPTICA, A.C.

**“FLUORESCENCIA Y PROPIEDADES
POLARIMÉTRICAS EN EL
EXOESQUELETO DE ALACRANES:
POSIBLES CORRELACIONES CON SU
ECOFISIOLOGÍA”**



Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Óptica)

Presenta: Daniel López Cabrera
Director de Tesis: Dr. Gabriel Ramos Ortiz

León · Guanajuato · México

Junio 2021

Índice

Agradecimientos	4
Glosario	5
Resumen.....	8
Capítulo 1	9
Introducción General	9
Capítulo 2	14
Fluorescencia en alacranes	14
2.1 Antecedentes	14
2.2 Metodología para el estudio de la fluorescencia en alacranes.....	19
2.2.1 Muestra taxonómica	20
2.2.2 Cámara de iluminación y adquisición de fotografías.	21
2.2.3 Procesamiento digital de fotografías tomadas en alacranes vivos.....	23
2.2.4 Espectros de emisión y reflectancia de los exoesqueletos	25
Capítulo 3	27
Resultados y discusión de fluorescencia en alacranes.....	27
3.1 La fluorescencia del cuerpo del alacrán es heterogénea	27
3.2 Relación entre fluorescencia emitida y tonalidad de color en el exoesqueleto	35
3.3 Análisis espectroscópico de la reflectancia y fluorescencia.....	41
3.4 Dependencia de la fluorescencia como función de la excitación	47
3.5 Conclusiones sobre fluorescencia en alacranes	51
Capítulo 4	52
Polarimetría en el exoesqueleto de alacranes.....	52
4.1 Antecedentes de estudios de polarimetría en insectos.....	52
4.2 Tipos de Luz Polarizada	55
4.3 Derivación de los parámetros de Stokes.....	56
4.4 Vector de Stokes	59
4.4.1 Luz lineal polarizada horizontalmente	59
4.4.2 Luz lineal polarizada verticalmente.....	59
4.4.3 Luz lineal polarizada a +45º.....	60
4.4.4 Luz lineal polarizada a -45º	60

4.4.5 Luz polarizada circularmente a la derecha.....	60
4.4.6 Luz polarizada circularmente a la izquierda.....	61
4.5 Matriz de Mueller (interacción luz-materia).....	61
4.5.1 Matriz de Mueller para un polarizador lineal	63
4.5.2 Matriz de Mueller para un retardador.....	66
4.5.3 Matriz de Mueller para un rotador	68
4.6 Métricas de despolarización de la luz	69
4.6.1 Parámetros de diatenuación $D(M)$	70
4.6.2 Parámetros de polarización $P(M)$	71
4.6.3 Grado de polarización DoP	71
4.6.4 Índice de despolarización, DIM	73
4.6.5 Métrica QM	73
4.6.6 Teorema de Gil-Bernabeu TC	74
4.6.7 Resumen esquematizado de las métricas polarimétricas.....	75
4.7 Ejemplos de matrices de Mueller.....	76
4.8 Metodología para el estudio de polarimetría en alacranes.....	77
4.8.1 Preparación de muestras del exoesqueleto para estudios de polarimetría	81
4.8.2 Obtención de la matriz de Mueller mediante imágenes.....	82
Capítulo 5	87
Resultados polarimétricos.....	87
5.1 Resultados de caracterización polarimétrica en alacranes.....	87
5.1.1 Matriz de Mueller por reflexión a 635 nm	87
5.1.2 Cálculo de métricas	98
5.2 Matriz de Mueller de emisión de fluorescencia.....	101
5.3 Conclusiones sobre polarización en alacranes.....	105
Apéndice 1.....	108
Apéndice 2.....	111
Referencias.....	114

Agradecimientos

Al Dr. Gabriel Ramos Ortiz por su valiosa asesoría, tiempo invertido en este trabajo de investigación y por todo su apoyo, así mismo por los impulsos que me dio cada vez que me veía abrumado.

Al Dr. Edmundo González-Santillán por su aporte con los especímenes estudiados en este trabajo de investigación y por su ayuda en la correlación de todos los aspectos biológicos.

Al Dr. Rafael Espinosa Luna por todo su apoyo y enseñanzas en todos los aspectos polarimétricos.

A CONACyt por la beca otorgada para la realización de mi doctorado en ciencias ópticas.

A National Science Foundation por el financiamiento para recolectar especímenes (subvención de la DEB-1754587) otorgada a Paula E. Cushing.

A Henry Carmona y P. Cushing por su ayuda en el campo.

A SEMARNAT por el permiso FAUT-0305 para recolectar especímenes silvestres otorgado al Dr. Edmundo González-Santillán.

En especial a mi esposa Diana de Jesús Villanueva Colchado, a mi hijo Daniel Lestat López Villanueva y a mi hija Diana Lilith López Villanueva, por su paciencia a lo largo de estos 4 años.

A mis padres Miguel Lopez Días y Yolanda Cabrera Pérez.

Glosario

Este glosario describe algunos términos biológicos relacionados con los alacranes y utilizados a lo largo de esta tesis.

Aposemáticas: Fenómeno que presentan algunos organismos y que consiste en colores brillantes y contrastantes, son señal de alguna defensa química en la mayoría de los casos, destinados a alejar a sus depredadores.

Artrópodo: Invertebrados con simetría bilateral, el cuerpo segmentado y recubierto por un tegumento duro (exoesqueleto) y las patas articuladas.

Clubbing: Nombre que se le da a los golpes con el metasoma en todo el cuerpo entre alacranes en el ritual de apareamiento, sin la intención de picar.

Críptico: Palabra utilizada para dar a conocer un fenómeno que no se conoce con certeza.

Ecdisis: Es un proceso que se refiere a la muda del exoesqueleto.

Ecofisiología: Rama de la ecología que estudia los procesos fisiológicos de los seres vivos influenciados por factores ambientales.

Ecomorfotipo: Término que se refiere a la adaptación morfológica y fisiológica relacionada con algún hábitat en particular.

Esclerotización: Endurecimiento y oscurecimiento de la quitina (sustancia formada por glúcidos nitrogenados, que constituye el material principal del que está formado el exoesqueleto del cuerpo de los artrópodos) del exoesqueleto.

Exoesqueleto: Esqueleto externo que recubre, soporta y protege el cuerpo de un animal.

Filogenética: Disciplina que se encarga de la reconstrucción de los patrones evolutivos de los seres vivos y que sienta las bases para clasificarlos.

Juddering: Durante el apareamiento de los alacranes, es el nombre que se le da a los movimientos que consisten en una serie de sacudidas rápidas del cuerpo del macho de adelante hacia atrás y consta de múltiples pulsos cortos.

Ocelos: Órgano visual rudimentario, formado por un grupo de células fotosensibles, mediante el cual pueden percibir luz pero no imágenes.

Opistosoma: Tagma que comprende el abdomen en animales del filo Arthropoda.

Pectenes: Estructura en forma de peine usada como órgano sensorial para el reconocimiento de pareja o identificación de presas, único en el orden Scorpiones.

Pelófilas: Ecomorfotipo de alacranes que viven en suelos compactos o bajo piedras, rara vez salen de sus galeras, y para alimentarse solo esperan en la entrada de su madriguera.

Preoral: La cavidad preoral se encuentra en la región ventral del prosoma y está formada por extensiones de las coxas de los pedipalpos y de los dos primeros pares de patas, al fondo de ella se encuentra la boca.

Prosoma: Tagma anterior del cuerpo de los arácnidos que comprende los ojos, quelíceros, pedipalpos, finalizados en pinzas, y cuatro pares de patas.

Psamófila: Ecomorfotipo de alacranes que viven en sustratos arenosos, y que por las noches abandonan sus galeras en busca de alimento o cortejo.

Tagmas: En artrópodos las tagmas son las diferentes partes del cuerpo que están compuestas por la fusión de segmentos similares entre sí, diferenciadas morfológica y funcionalmente del resto.

Taxones: Grupos en los que se clasifican a los seres vivos, se estructuran en una jerarquía de inclusión, en la que un grupo incluye a otros menores y este, a su vez, es subordinado a uno mayor. A los grupos se les asigna un rango o categoría taxonómicas que acompaña al nombre propio del grupo. Los taxones principales, ordenados de menos a más inclusivos, son: especie, género, familia, orden, clase, filo o división, reino y dominio.

Troglomórficos: Término que se da a una especie que evoluciona con adaptaciones morfológicas necesarias para vivir en la constante oscuridad de las cuevas, estas adaptaciones se caracterizan por la pérdida de pigmento, disminución de la vista o ceguera y atenuación de los apéndices (se adelgazan o elongan).

Resumen

Los alacranes son arácnidos que se pueden encontrar casi en cualquier hábitat del mundo. La mayoría de las especies de alacranes exhiben una característica intrigante: bajo iluminación UV su exoesqueleto emite fluorescencia azul-verdosa. Se han realizado diversos estudios con la finalidad de identificar la función biológica de dicha fluorescencia, sin que hasta la fecha exista alguna conclusión. En este trabajo se caracterizan las propiedades de fluorescencia de 24 especies de alacranes recolectados en diferentes partes de la república mexicana. Este estudio se realizó mediante procesamiento digital de imágenes bajo iluminación UV y mediante técnicas espectroscópicas. Los resultados muestran que existe una heterogeneidad en la emisión de fluorescencia, siendo los segmentos del exoesqueleto, asociados a comportamientos de predación y defensa los que muestran mayor intensidad emitida. También se encontró que existe una intensidad de fluorescencia diferenciada entre especies que hipotéticamente pudiera estar correlacionada con procesos de esclerotización y tonalidad del exoesqueleto. La tonalidad del exoesqueleto esta a su vez influenciado por el nivel de actividad y el sustrato en el que se desplazan. Por otra parte, y a diferencia de lo que han reportado otros autores, aquí se encontró que no existe una diferencia espectral de la fluorescencia entre especies, lo cual significa que en todas ellas los fluoróforos presentes en el exoesqueleto son los mismos.

También se implementaron estudios polarimétricos de la luz reflejada como de la fluorescencia emitida. Mediante el formalismo de Matrices de Mueller se determinó que los exoesqueletos de los alacranes se comportan como retardadores ópticos y materiales parcialmente despolarizantes. De estos estudios destaca el hecho de que los elementos de Matriz de Mueller para especies con exoesqueleto oscuro se diferencian notoriamente del resto de especies.

Toda esta información no solo es una caracterización exhaustiva, sino que ha permitido generar una serie de hipótesis para trabajos futuros.

Capítulo 1

Introducción General

En la naturaleza existen muchos casos de animales terrestres y marinos cuyos cuerpos exhiben efectos ópticos tales como biofluorescencia, bioluminiscencia, iridiscencia y efectos de polarización de la luz. Por mencionar algunos ejemplos, la biofluorescencia se observa en alacranes, escarabajos, algunos gusanos, corales y arañas (Figura 1.1); la bioluminiscencia en las luciérnagas, medusas, anémonas y calamares (Figura 1.2); la iridiscencia y efectos de polarización de luz en de aves, peces, insectos, escarabajos (Figura 1.3), etc. En varios casos se ha identificado la función biológica de estos efectos, asociada a la reproducción, defensa/depredación, y comunicación entre congéneres; no obstante, en la mayoría de los casos aún se desconoce su función biológica en caso de que exista alguna, o no se sabe si se trata simplemente de un subproducto evolutivo en estas especies.

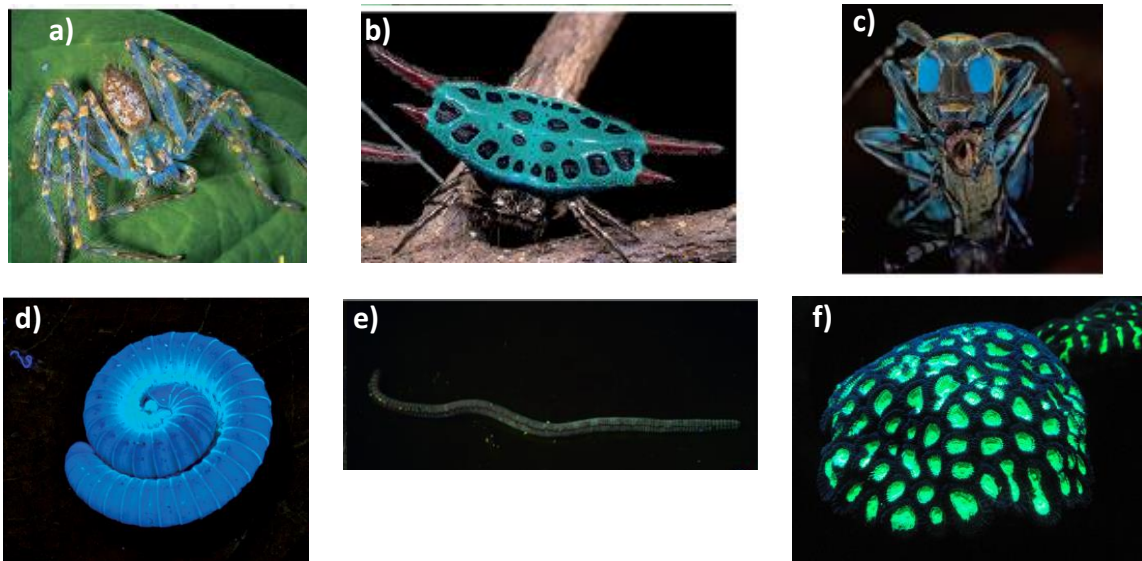


Fig. 1.1 Ejemplos de animales que exhiben biofluorescencia: a) araña cazadora (*Araneomorphae: Sparassidae*); b) Araña tejedora (*Araneomorphae: Araneidae*), c) escarabajo de cuernos largos (*Coleoptera: Cerambycidae*), d) milpiés (de Singapur), e) lombriz de tierra (de Taiwán), Imágenes tomadas de [1] f) coral (Imagen disponible bajo Creative Commons CC0 1.0 Dedicación de dominio público universal)

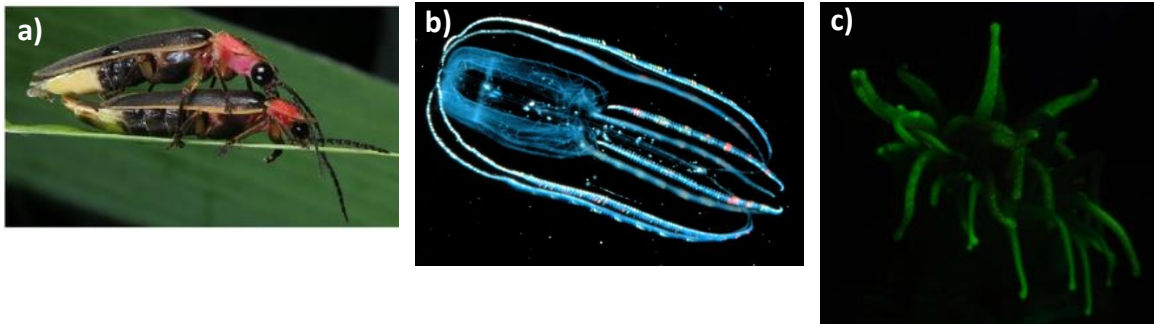


Fig. 1.2 Ejemplos de animales que exhiben bioluminiscencia: a) luciérnagas macho y hembra (*P. pyralis*) imagen tomada de [2] b) Imagen de un ctenóforo lobulado, donde el color azul en el centro del cuerpo se debe a la bioluminiscencia, imagen tomada de [3], c) anémona de Japón (*Cribrinopsis japónica*) imagen tomada de [4].



Fig. 1.3 Ejemplos de animales que exhiben iridiscencia a) Tucúsite rubí (*Chrysolampis mosquitus*) Foto: iStock, imagen tomada de [5], b) Ejemplo de un pez tropical (neon tetra) mostrando iridiscencia, imagen tomada de [6], c) Ejemplo de un escarabajo *C. smaragdina* mostrando efectos de polarización [7].

En este trabajo de tesis se estudia la fluorescencia del exoesqueleto de varias especies de alacranes de la República Mexicana. Desde que el fenómeno de fluorescencia en los alacranes fue reportado por primera vez en 1954 [8], múltiples estudios se han realizado para identificar su posible función biológica, sin que hasta la fecha exista una conclusión al respecto y por tanto existe un debate en la literatura al respecto [9, 10, 11, 12]. En este contexto, y con la finalidad de aportar más información desde la perspectiva de la ciencia óptica que pudiera resolver esta interrogante, en este trabajo se estudiaron las propiedades de emisión en exoesqueletos de alacrán mediante procesamiento digital de imágenes obtenidas a partir de fotografías tomadas a especímenes vivos bajo iluminación ultravioleta. Con el objetivo de identificar una posible correlación entre las características de

fluorescencia y la biología de los alacranes, el estudio fue realizado en una muestra taxonómica amplia conteniendo especímenes provenientes de diferentes hábitats: en total se estudiaron 4 familias, 9 géneros y 24 especies.

Las técnicas de procesamiento de imágenes también fueron implementadas para fotografías de alacranes iluminados con luz blanca, ello permitió cuantificar la reflectividad característica para cada especie de alacrán bajo estudio, lo cual es importante dado que la muestra usada contenía desde alacranes muy oscuros hasta alacranes muy pálidos. A priori se puede establecer que la reflectividad y color del exoesqueleto en un alacrán deben estar relacionadas con su hábitat; se puede especular también que el ecomorfotipo determina otras características morfológicas del exoesqueleto que pueden dar lugar a propiedades ópticas particulares. Recuérdese, por ejemplo, que en muchos insectos la luz se refleja polarizadamente o es reflejada preferencialmente a ciertos colores debido a la existencia de microestructuras en el exoesqueleto. Por ello en esta tesis el exoesqueleto de los alacranes fue estudiado por medio de polarimetría aplicada tanto a la luz reflejada como a la fluorescencia emitida. Además de los estudios de procesamiento de imágenes y de polarimetría, la fluorescencia y la reflectividad fueron analizadas espectroscópicamente.

Se obtuvieron varios resultados que pueden resultar significativos en el estudio de la biología de los alacranes. Por ejemplo, que la fluorescencia no es homogénea en el exoesqueleto de los alacranes; los resultados muestran que los pedipalpos y los segmentos metasomales, partes del cuerpo en los alacranes asociados con actividades de depredación y defensa, exhiben una fluorescencia más intensa que otras partes del exoesqueleto. A su vez, la intensidad de fluorescencia emitida por cada especie varía según su color característico (asociado a la reflectancia óptica del exoesqueleto). Dado que la coloración del exoesqueleto está determinada por los pigmentos de melanina, concluimos sugiriendo que la capacidad de fluorescencia puede correlacionarse directamente con el ecomorfotipo de los alacranes. En este sentido, y de manera aún muy genérica, parece existir una tendencia en la que los alacranes que tienen menos actividad superficial en los

sustratos en el que viven tienen una coloración más oscura y exhiben menos fluorescencia. Por otra parte, y a diferencia de reportes anteriores [9, 10, 11, 12], el espectro de fluorescencia obtenido para las 24 especies en estudio es casi idéntico, independientemente de los taxones, el género o el tamaño, lo que sugiere que los mismos fluoróforos están presentes en la misma proporción en los exoesqueletos de los alacranes. En relación con los estudios de polarimetría, las matrices de Mueller obtenidas (apéndice 2) muestran que los exoesqueletos funcionan como retardadores y que despolarizan parcialmente la luz, pero que algunos especímenes, en especial los muy oscuros, muestran una clara diferenciación respecto a otras en cuanto a sus propiedades polarizantes.

La metodología aquí implementada es sin duda mucho más robusta desde el punto de vista óptico que muchas de las reportadas previamente en la literatura sobre la fluorescencia en alacranes [9, 10, 11, 12], esto se explica en parte porque la mayoría de los reportes previos han tenido un enfoque más biológico. Con la finalidad de que los resultados aquí presentados puedan conducir a conclusiones de orientación biológica, a lo largo del trabajo se contó con la valiosa colaboración de un biólogo especialista en alacranes, el Dr. Edmundo González Santillán, quien ayudó a correlacionar las características ópticas de los alacranes con características de su hábitat, comportamiento, fisonomía, etc., esto es, de su ecomorfotipo. De esta forma, todos estos resultados sobre las características puramente ópticas del exoesqueleto de los alacranes han permitido no solo delinear las varias conclusiones sobre su biofluorescencia, sino que abre otras muchas interrogantes para futuros trabajos.

La tesis está estructurada de la siguiente manera. En el capítulo 2 se hace una revisión de los antecedentes más relevantes en cuanto a investigaciones científicas sobre la biofluorescencia en alacranes y las hipótesis que han surgido en cuanto a su posible función biológica. En ese capítulo se describe con detalle la muestra taxonómica de alacranes utilizada para la realización de la investigación, así como la metodología implementada para la toma de imágenes y su procesamiento digital, y los métodos espectroscópicos empleados. El capítulo 3

presenta los resultados obtenidos para la fluorescencia y color tanto por las técnicas de procesamiento de imágenes como por evaluaciones espectroscópicas; en este capítulo se plantean varias hipótesis sobre la correlación entre fluorescencia y la ecofisiología de las especies bajo estudio. En el capítulo 4 se dan algunos antecedentes sobre propiedades polarimétricas en los exoesqueletos de algunos insectos, a la vez que se describen los fundamentos básicos de la teoría polarimétrica y algunas métricas útiles para el estudio de polarización en alacranes; se presentan también la metodología usada para el estudio del exoesqueleto en reflexión y emisión de fluorescencia, para finalmente en el capítulo 5 describir los resultados y sus conclusiones.

Capítulo 2

Fluorescencia en alacranes

2.1 Antecedentes

Los alacranes pertenecen al orden Scorpiones y son parte del filo Arthropoda, en la actualidad existen 23 familias, 210 géneros 2590 especies y 356 subespecies [13].

Debido a que en este trabajo se presenta la caracterización de las propiedades óptico-luminiscentes, reflectivas y de polarización de diferentes partes del cuerpo de un alacrán, es necesario describir cómo está constituido dicho cuerpo. De acuerdo con la Figura 2.1, el cuerpo de los alacranes se divide en dos tagmas: el prosoma (PRO) y el opistosoma (OPS). El prosoma está representado por un caparazón, que lleva un par de ocelos medianos y de nueve a cero ocelos laterales, es la región corporal anterior y se divide en seis tergitos donde se pueden encontrar los pedipalpos (Ped), el fémur (Fem), la patela (Pat) y las quelas (Che) que se utilizan en la mayoría de las actividades de los alacranes, desde la alimentación, la ofensa/defensa durante la depredación, el apareamiento, etc. Los quelíceros (che) son piezas bucales, que ocupan una posición anatómica preoral por lo que no son homólogos de las mandíbulas y se usan para sujetar el alimento.

Por otra parte, el opistosoma está compuesto por trece segmentos unidos firmemente entre sí y se divide en: mesosoma (MES) y metasoma (MET). El mesosoma comprende siete placas que cubren y protegen la mayoría de los órganos dentro del cuerpo, comprende los órganos reproductores, el sistema digestivo, y en él se articulan los pectenes, que son un par de órganos especializados en mecano-recepción [14, 15]. El metasoma es la fusión de cinco segmentos, los cuales forman la cola del alacrán, que se utiliza para dirigir el aguijón en la depredación o defensa. El telson es una estructura derivada del quinto

segmento metasomal. El telson se puede dividir en la vesícula, la parte globosa de la estructura, en la que está contenida una glándula de veneno y el acúleo o aguijón, la estructura en forma de aguja que inyecta el veneno.

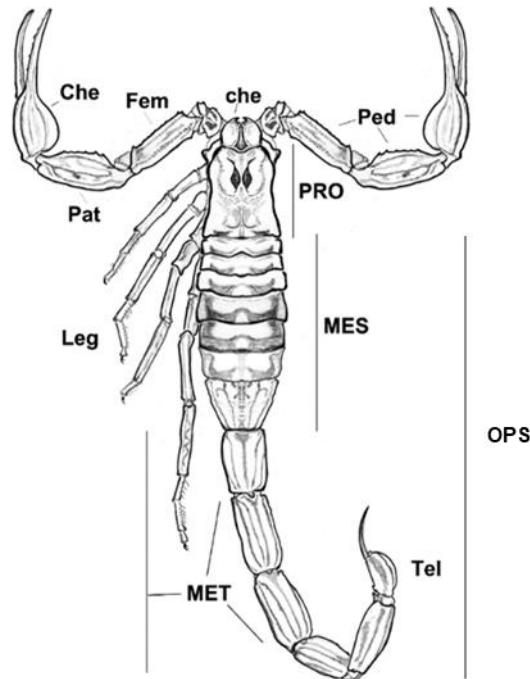


Fig. 2.1 Morfología representativa de un alacrán. Resaltamos que la morfología de algunas especies específicas de alacranes en estudio en este trabajo puede variar con respecto a esta representación genérica.

Los alacranes tienen una amplia gama de distribución geográfica y viven en casi todos los hábitats, desde desiertos hasta bosques tropicales. Muchos de ellos viven debajo de la superficie, algunos son excavadores superficiales y otros viven debajo de piedras, corteza y hojarasca [13]. Cuando un alacrán es expuesto a la radiación ultravioleta (UV) (315-400 nm) [16], su exoesqueleto emite fluorescencia de un color azul-verdoso (420-650 nm) [9]. Este fenómeno se reportó por primera vez en 1954 [16], y es característico de la mayoría de los alacranes con algunas excepciones [17]. En la actualidad, se desconoce la función biológica –si es que existe alguna– de este intrigante fenómeno. Los alacranes no son los únicos organismos que emiten fluorescencia, otros invertebrados, plantas y algunos vertebrados también presentan este fenómeno, sin embargo, se han reportado

pocos casos en los que exista alguna razón biológica o que se haya explicado su origen evolutivo [18, 9]. En el caso de los alacranes, se han propuesto varias hipótesis. Por ejemplo, se determinó experimentalmente que los ocelos laterales de los alacranes tienen una visión dicromática con picos de sensibilidad correspondientes a la luz verde (~ 509 nm) y la luz UV (~ 371 nm), respectivamente, mientras que los ocelos medios responden muy poco a la luz UV pero son sensibles a la luz verde [10]. Los experimentos posteriores no solo corroboraron esta sensibilidad de los ocelos laterales, sino que también concluyeron que son uno de los fotorreceptores más sensibles entre los Artrópodos [19]. Los resultados de otros experimentos muestran que la luz verde y UV puede afectar el comportamiento de locomoción del alacrán respecto a las longitudes de onda más largas [20]. Estos hallazgos sugieren que el exoesqueleto podría funcionar como un colector de fotones, aparentemente utilizado como un mecanismo activo para detectar la presencia de luz UV. Además, se sugiere que la fluorescencia puede ser útil para encontrar refugio, ya que el bloqueo de cualquier parte del exoesqueleto disminuye la cantidad de fotones detectados, y por lo tanto, el alacrán podría encontrar un refugio adecuado al detectar la disminución de la luz UV [20, 22]. Se han propuesto hipótesis similares sobre la fluorescencia como mecanismo para la detección de la luz UV comparando el nivel de actividad en los alacranes con la reducción inducida de la fluorescencia en sus exoesqueletos [23]. Otros autores propusieron que la luz de la luna, que contiene un cierto porcentaje de radiación UV, podría tener un efecto indirecto en el comportamiento de caza de los alacranes. Según los resultados de ese informe, la intensidad de la luz y otros factores ambientales se utilizan como señales para determinar los niveles de riesgo de depredación y la disponibilidad de alimentos [24]. También se ha argumentado que la percepción de fluorescencia emitida por los alacranes podría usarse para discernir entre hembras y machos o incluso para diferenciar a los alacranes de otras especies [25, 26]. En resumen, aunque hay algunas líneas de evidencia que sugieren una interacción entre la visión del alacrán y la fluorescencia emitida por su cutícula, su papel parece ser más complejo de lo que inicialmente se pensó y por tanto merece un examen más exhaustivo.

En la actualidad se ha identificado la β -carbolina [27] y la 4-metil-7-hidroxicumarina [28] como los fluoróforos responsables de la fluorescencia en el exoesqueleto del alacrán. Más recientemente se descubrió que existe otro fluoróforo presente conocido como éster diftalato macrocíclico, el cual fue aislado en la exuvia del alacrán *llocheles australasiae* [29]. Estas moléculas se concentran en la epicutícula, la capa más externa de la cutícula [30], y participan en el proceso de esclerotización, que es el proceso de endurecimiento de la quitina en el exoesqueleto del alacrán [19]. Después de la ecdisis, los restos del exoesqueleto o exuvia emiten fluorescencia muy brillante, pero el alacrán que emerge de él no flúorese en absoluto y la nueva cutícula solo se vuelve completamente fluorescente después de 48 horas [31].

En un estudio reciente, los cambios de fluorescencia del exoesqueleto de los alacranes fueron monitoreados de acuerdo con las etapas de muda del exoesqueleto [32]. El resultado principal de esa investigación fue que la intensidad de la emisión de fluorescencia es una función del grosor de la cutícula, es decir, cuanto más gruesa es la cutícula, mayor es la intensidad de la emisión de fluorescencia. Respecto a esto, Hjelle [33] planteó la hipótesis de que el material fluorescente se lleva a la epicutícula, como parte del mecanismo que transporta mucopolisacáridos, lípidos y otras sustancias que confieren impermeabilidad al exoesqueleto de los alacranes. Por lo tanto, parece que el grosor, el endurecimiento y quizás la impermeabilidad [34] de la epicutícula están íntimamente relacionados con los niveles de intensidad de fluorescencia en los alacranes.

Las adaptaciones morfológicas y fisiológicas a sustratos de diversas características (dureza, color, composición, etc.) han moldeado diferentes ecomorfotipos [35], impactando también en las interacciones conductuales y biológicas de los alacranes [36]. Con esto, resulta razonable predecir que debe existir una emisión diferenciada en la intensidad de la fluorescencia emitida para especies de alacranes adaptadas a diferentes sustratos. Otras propiedades ópticas del exoesqueleto, como el color, han sido poco estudiadas. Al observar una amplia gama en la distribución de alacranes de sabana y bosque, se concluyó que el color

y el patrón de color en los alacranes tiene un significado críptico asociado a los linajes filogenéticos [27]. Los mismos autores coinciden en que el color es una adaptación ecológica asociada con el entorno donde habitan los alacranes. Aunque estos autores establecieron una conexión entre las áreas boscosas (selva) y abiertas (sabana) con el color pálido y oscuro de los alacranes, respectivamente, nunca postularon explícitamente que los alacranes tienden a imitar el color del sustrato donde viven. Polis [11] reportó que el exoesqueleto de alacrán *Heteronebo bermudezi* [12] coincide estrechamente con el hábitat de arena blanca [38, 39] indicando que la mayoría de las especies cubanas son de color críptico. De manera similar, Williams [40] informó que varias especies de *Vaejovis* y *Hadrurus* son más oscuras en suelos oscuros y más claras en suelos más claros. Otras coincidencias en el color del exoesqueleto y el sustrato se producen en especies de alacranes de América del Norte, como *Centruroides* [41], *Thorellius* [42] y miembros de la subfamilia *Smeringurinae* [43]. Aunque no se ha aclarado por completo qué moléculas confieren la tonalidad de color [11], varios compuestos pueden estar involucrados en la creación de un color o patrón de color. Algunos pigmentos como la melamina y otras proteínas como la esclerótica [44] le dan el color característico al alacrán, es decir, estas moléculas determinan la forma en que se absorbe la luz incidente y definen las características espectrales de la luz reflejada del exoesqueleto.

En función del contexto citado líneas más arriba, un posible escenario es que la fluorescencia de los alacranes pueda, en efecto, tener una función biológica lo cual aún está bajo debate en la literatura y ha conducido a las diferentes hipótesis mencionadas más arriba; o bien que pueda deberse a una herencia evolutiva sin que necesariamente tenga una función biológica. La búsqueda de la respuesta a la interrogante sobre la biofluorescencia en los alacranes ha sido la principal motivación de este trabajo. Así por ejemplo, para correlacionar a la fluorescencia con el ecomorfotipo de los alacranes se requieren estudios de investigación que proporcionen información más amplia y detallada sobre las características de dicha fluorescencia. Por ejemplo, hasta ahora no existen estudios comparativos de la intensidad de fluorescencia emitida por diferentes especies; el precisar si hay una

diferenciación en la intensidad de emisión en función de especies y su ecomorfotipo permitiría saber si la fluorescencia tiene una función biológica en cualquiera de los aspectos de la vida del alacrán: comunicación entre congéneres, reproducción, defensa o predación. Por otra parte muchos de los reportes científicos son inconsistentes en cuanto a si espectralmente la fluorescencia en los alacranes es diferente en función de la especie, así como tampoco existe información de si algunos segmentos del exoesqueleto tienen mayor intensidad de emisión que otras y en caso de que así sea porqué sucede esto. En función de todo ello, para este trabajo de tesis se diseñó una metodología orientada a realizar una caracterización de la fluorescencia en una muestra taxonómica amplia y estadísticamente significativa de especies de alacranes vivos que se encuentran en la República Mexicana. El siguiente capítulo detalla la metodología seguida para el estudio de la fluorescencia en el exoesqueleto de alacranes. Los estudios se extienden a las propiedades ópticas del exoesqueleto mediante técnicas polarimétricas; en particular, es de interés saber si existe alguna relación entre las propiedades reflectivas y de color de cada especie y el medio donde vive.

2.2 Metodología para el estudio de la fluorescencia en alacranes

Se obtuvieron fotografías digitales de alacranes vivos bajo iluminación tanto de luz blanca como de luz UV. Primero, las fotografías tomadas con iluminación de luz blanca (400 a 700nm) se procesaron digitalmente para obtener un parámetro cuantificable del color del exoesqueleto de todos los alacranes bajo estudio. Después se tomaron fotografías bajo iluminación de luz UV y se procesaron digitalmente para obtener un mapa de la fluorescencia del exoesqueleto e identificar diferencias en la intensidad de la fluorescencia emitida entre las especies. Finalmente, la reflectancia y la fluorescencia del exoesqueleto se resolvieron espectralmente mediante técnicas espectroscópicas estándar.

2.2.1 Muestra taxonómica

Se estudiaron machos y hembras adultos pertenecientes a 4 familias, 9 géneros y 24 especies de alacranes (Tabla 1). En total la muestra consistió en 75 especímenes. Seleccionamos las familias de alacranes más diversas y numéricamente abundantes distribuidas en México para incluir la mayor variación de morfología y ecomorfotipos. Todas las muestras se mantuvieron en recipientes de plástico, a temperatura ambiente, se alimentaron con grillos *Acheta domesticus* cada 15 días y se les proporcionó agua semanalmente. Para cada una de las especies estudiadas se contó con diferente número de especímenes, de ambos géneros, diversas edades y por ende tamaños. La Tabla 1 es un resumen del origen geográfico de cada uno de los especímenes bajo estudio así como datos sobre su sexo y dimensiones del exoesqueleto.

Tabla 1 Lista de familia, especie, sexo, tamaño y origen geográfico de los individuos en estudio. El asterisco indica una muestra subadulto.

Familia	Especie	Origen Geográfico	Tamaño del espécimen (cm ²)**						
			Hembra			Macho			Tamaño promedio
Buthidae	1. <i>Centruroides infamatus</i> Adultos (2 hembras, 3 machos)	Aguascalientes	4.4	4.1	-	4.7	4.8	4.4	4.5
	2. <i>Centruroides nigrimanus</i> Adultos (1 hembra, 1 macho)	Chiapas	9.4	-	-	8.5	-	-	9.0
	3. <i>Centruroides tecomanus</i> Adultos (1 hembra)	Colima	4.6	-	-	-	-	-	4.6
	4. <i>Centruroides vittatus</i> Adultos (1 hembra, 1 macho)	Zacatecas	2.2	-	-	2.1	-	-	2.1
Caraboctonidae	5. <i>Hoffmanniadrurus gertschi*</i> Subadultos (1 hembra)	Guerrero	8.8	-	-	-	-	-	8.8
Diplocentridae	6. <i>Kolotl poncei</i> Adultos (1 hembra, 1 macho)	Michoacán	13.4	-	-	11.5	-	-	12.4
	7. <i>Diplocentrus duende</i> Adultos (1 hembra, 1 macho)	Puebla	3.2	-	-	3.6	-	-	3.4
	8. <i>Diplocentrus</i> sp1 Adultos (2 hembras, 1 macho)	Zacatecas	4.1	5.2	-	4.4	-	-	4.6
	9. <i>Diplocentrus</i> sp2 Adultos (1 macho)	Oaxaca	-	-	-	5.3	-	-	5.3
	10. <i>Diplocentrus tehuacanus</i> Adultos (3 hembras, 3 machos)	Puebla	6.2	7.2	6.0	5.9	6.4	7.0	6.4
	11. <i>Diplocentrus whitei</i> Adultos (2 hembras, 3 machos)	Coahuila	6.7	8.6	-	7.0	7.5	7.4	7.4
	Vaejovidae	12. <i>Chihuahuanus bilineatus</i> Adultos (1 hembra)	Durango	2.5	-	-	-	-	-
13. <i>Chihuahuanus coahuilae</i> Adultos (3 hembras, 3 machos)		Durango	4.5	4.5	3.1	2.2	3.5	4.7	3.7
14. <i>Chihuahuanus globosus</i> Adultos (2 hembras, 2 machos)		Coahuila	3.0	2.9	-	3.0	2.7	-	2.9
15. <i>Chihuahuanus</i> aff. <i>Crassimanus</i>		Coahuila	3.0	2.9	-	3.1	3.7	-	3.1

Adultos (2 hembras, 2 machos)									
16. <i>Mesomexovis subcristatus</i> Adultos (1 hembra)	Puebla	4.9	-	-	-	-	-	-	4.9
17. <i>Mesomexovis</i> aff. <i>variegatus</i> sp1 Adultos (1 hembra)	Michoacán	2.3	-	-	-	-	-	-	2.3
18. <i>Mesomexovis</i> aff. <i>variegatus</i> sp2 Adultos (3 hembras, 2 machos)	Oaxaca	2.6	2.6	2.7	2.2	2.1	-	-	2.4
19. <i>Mesomexovis</i> aff. <i>subcristatus</i> sp3 Adultos (3 hembras, 3 machos)	Oaxaca	4.7	5.6	5.0	5.3	4.5	5.6	-	5.1
20. <i>Paruroctonus gracilior</i> Adultos (3 machos)	Coahuila	-	-	-	5.6	6.0	5.9	-	5.8
21. <i>Paruroctonus</i> aff. <i>Gracilior</i> Adultos (3 hembras, 3 machos)	Guanajuato	3.6	4.0	4.1	4.4	3.5	3.8	-	3.3
22. <i>Thorellius</i> aff. <i>Tecuani</i> Adultos (1 hembra)	Guerrero	6.6	-	-	-	-	-	-	6.6
23. <i>Vaejovis intermedius</i> Adultos (3 hembras, 3 machos)	Durango	4.4	4.2	2.9	3.2	4.7	3.8	-	3.9
24. <i>Vaejovis pococki</i> Adultos (1 hembra)	Guanajuato	3.4	-	-	-	-	-	-	3.4

** El tamaño de cada alacrán fue calculado durante el procesamiento digital de imágenes

2.2.2 Cámara de iluminación y adquisición de fotografías.

Para fotografiar los alacranes se empleó una cámara de iluminación (Figura 2.2). La cámara se fabricó con cinco láminas de acrílico negro con dimensiones de 83, 55 y 55 cm de largo, ancho y alto, respectivamente. Cada lado se pegó firmemente en cada margen para bloquear la luz externa y favorecer la iluminación homogénea interna. En el interior de la cámara, la iluminación fue proporcionada por dos lámparas UV (tubos fluorescentes de luz negra con emisión máxima a 365 nm) y dos lámparas de luz blanca (lámparas halógenas) ubicadas en la parte superior. Se utilizó una cámara digital, Nikon L320, montada en la parte superior de la cámara de iluminación para capturar las fotografías. Se montaron dos filtros, un filtro UV con longitud de onda de corte a 405 nm y un filtro de densidad neutra (ND) frente a las lentes de la cámara. El filtro UV permitió capturar la fluorescencia emitida por el cuerpo de los alacranes mientras bloqueaba la radiación UV, en tanto que el filtro ND evitó la saturación de las fotografías. Se prestó especial atención al diseño de la cámara de iluminación para garantizar que las fotografías de todos los especímenes tuvieran una iluminación homogénea. La potencia óptica en el fondo de la cámara se midió barriendo un área total de 20 × 20 cm²; la variación de la potencia fue de solo un microwatt dentro de esta área, lo que garantizó una iluminación homogénea para la adquisición de las fotografías.

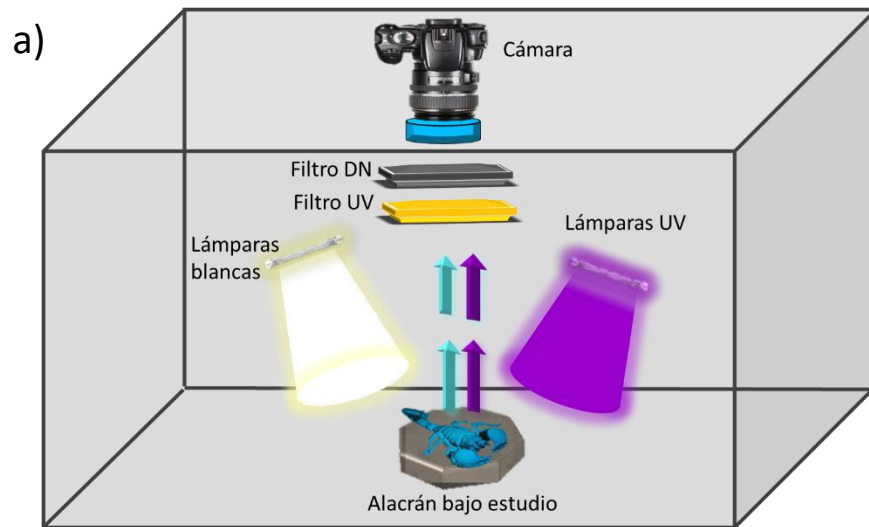
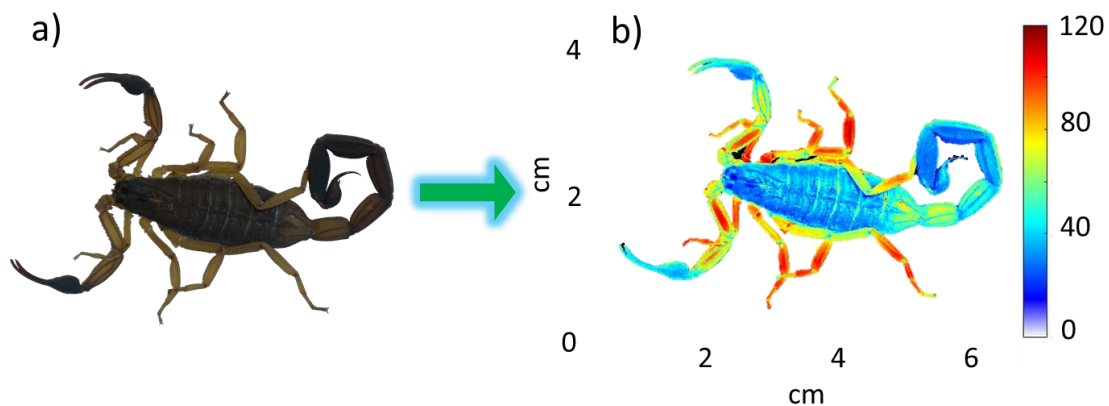


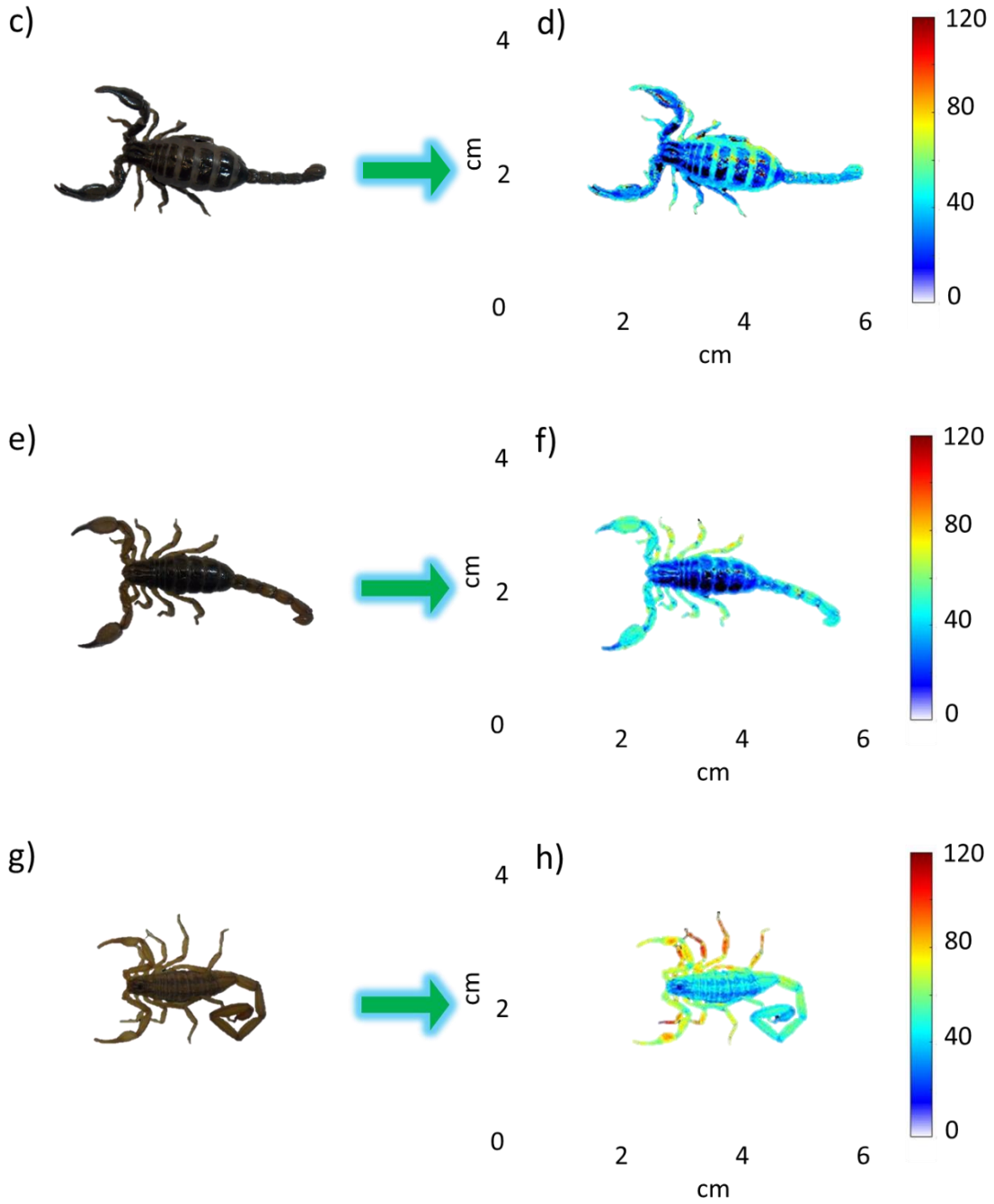
Fig. 2.2 a) Representación esquemática de la cámara de iluminación. En esta cámara, el alacrán se aísla de la luz exterior, se ilumina con luz ultravioleta o blanca y luego se fotografía. b) Imagen del interior de la cámara con un espécimen *C. infamatus* bajo iluminación ultravioleta.

Una vez que se ajustó la cámara, cada espécimen vivo se colocó en una placa de Petri de 50 mm de radio y se introdujo en la cámara de iluminación, colocando la placa exactamente en el mismo lugar cada vez que se tomaba una fotografía. Se tomaron una serie de fotografías por cada muestra bajo iluminación blanca y UV. El número total de muestras estudiadas fue de 75. El experimento se repitió cuatro veces para luz blanca e iluminación UV obteniendo un total de 600 fotografías.

2.2.3 Procesamiento digital de fotografías tomadas en alacranes vivos

La colección de fotografías se procesó en el software Matlab® con una rutina de segmentación de imágenes, que convirtió la imagen digital a escala de grises, eliminando el fondo y dejando solo los píxeles correspondientes al cuerpo del alacrán. Luego, para cada imagen se obtuvo un gráfico 3D, donde los ejes x e y denotaban las coordenadas del píxel, mientras que el eje z corresponde al valor de cada píxel, registrado como la intensidad en la fotografía, en escala de grises. Este procedimiento de procesamiento de imágenes nos permitió llevar a cabo la detección de bordes, facilitó el cálculo del tamaño del alacrán, la segmentación de imágenes y la cuantificación de la luz reflejada del exoesqueleto bajo iluminación de luz blanca, y permitió discernir la intensidad de fluorescencia del exoesqueleto bajo iluminación UV. El límite para la escala de grises para el color blanco se estableció en 255 como el valor máximo posible y 0 se asignó al valor mínimo posible en escala de grises para el color más oscuro. Finalmente, el rango de escala de grises detectado en la imagen del exoesqueleto se trazó en colores falsos para una mejor discriminación de la intensidad de la fluorescencia. Como ejemplo, la Figura 2.3 muestra una imagen procesada para los especímenes: *C. nigrimanus*; *D. withei*; *D. tehuacanus*; *D. infamatus* y *D. sp2*, para el caso de una iluminación bajo luz blanca.





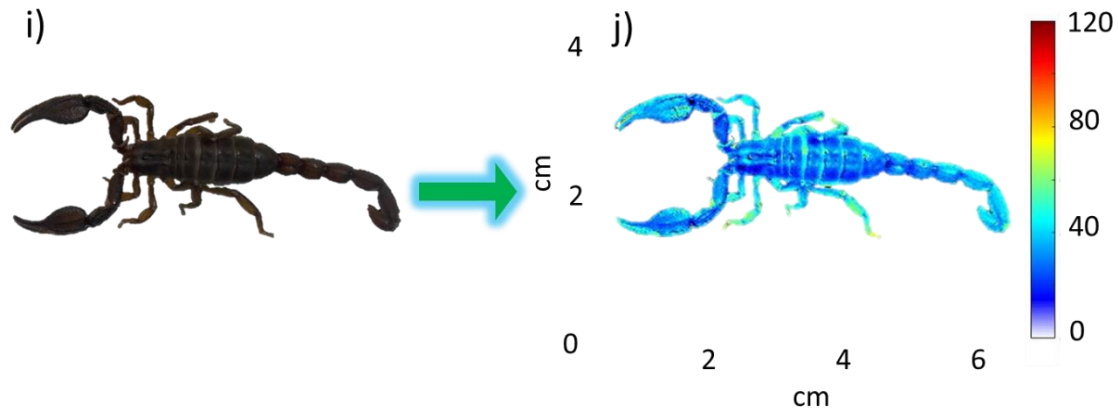


Fig. 2.3 Fotografías originales obtenidas bajo iluminación de luz blanca (a, c, e, g, i) y después del procesamiento de imágenes (b, d, f, h, j) con colores falsos para la intensidad registrada de cada píxel. Especímenes presentados: a) hembra, *C. nigrimanus*; c) macho, *D. witheí*; e) hembra, *D. tehuacanus*; g) hembra, *C. infamatus* y i) macho, *D. sp2*. La escala en cm representa la dimensión real de la muestra.

Para todos los especímenes adultos en estudio, el tamaño varió desde aproximadamente 4 cm (*Ch. coahuilae*, *C. vittatus*, *M. variegatus*) hasta 12 cm (*C. nigrimanus*, *H. gertschi*, *K. poncei*). Para normalizar la luz reflejada total obtenida para cada muestra fotografiada bajo iluminación de luz blanca o fluorescencia emitida bajo iluminación UV, se calculó la suma de los valores de la escala de grises en la imagen procesada y se dividió por el área del cuerpo del alacrán, obteniendo la intensidad del reflejo luz blanca y la intensidad de fluorescencia por unidad de área (cm²).

2.2.4 Espectros de emisión y reflectancia de los exoesqueletos

Los espectros de fluorescencia de los alacranes se midieron en un fluorómetro FS5 (Edinburgh Instruments) con excitación a 405 nm. Los espectros se obtuvieron del mesosoma de cada muestra porque en todos los casos proporcionó una superficie óptica plana lo suficientemente grande como para ser analizada espectroscópicamente. Para inmovilizar a los alacranes y mantenerlos en condiciones inofensivas durante las mediciones, se introdujeron en una bolsa Ziploc®, que se colocó sobre una base rectangular de acrílico negro. La bolsa se

probó para evaluar si el espectro de fluorescencia intrínseca del alacrán era alterado. La Figura 2.4 muestra que el uso de la bolsa Ziploc® no modificó el espectro. Este enfoque también se implementó para medir los espectros de reflectancia (espectrofotómetro Cary 5000 UV-Vis-NIR con lámparas de deuterio y yoduro de cuarzo como fuentes de luz UV y visible, respectivamente). Estos espectros también se obtuvieron del mesosoma del exoesqueleto de los alacranes inmobilizados en la bolsa Ziploc®. Teniendo en cuenta que la bolsa en sí misma también refleja una cierta cantidad de luz que podría afectar las mediciones, se obtuvo el espectro de reflectancia de la bolsa (línea negra en la Figura 2.4) y se sustrajo de los espectros de las muestras. Se observa que la bolsa solo desplazó el nivel de reflectancia medido en el alacrán en el rango de longitud de onda visible (400 - 700 nm) pero no modifica la estructura del espectro.

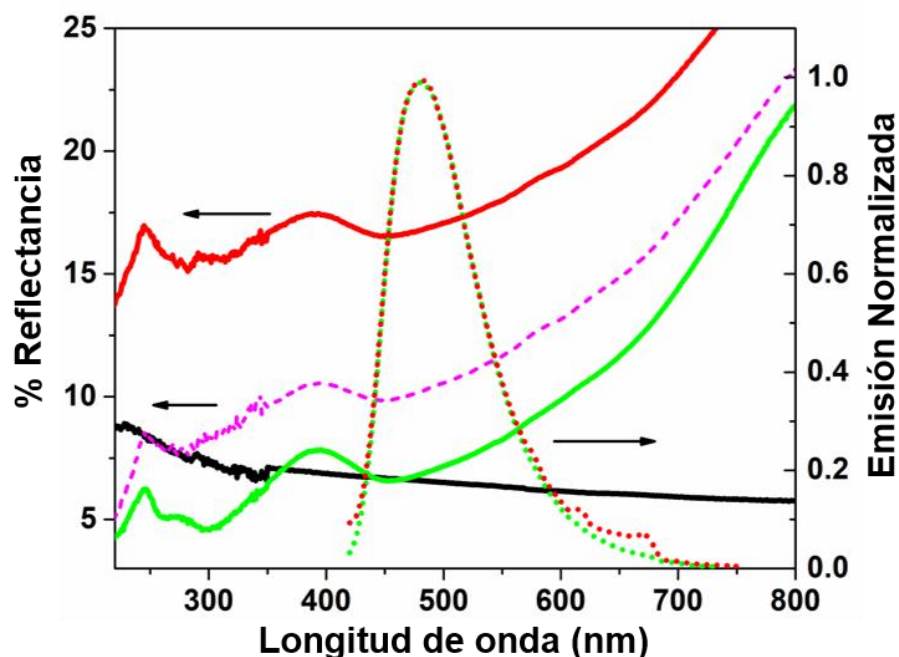


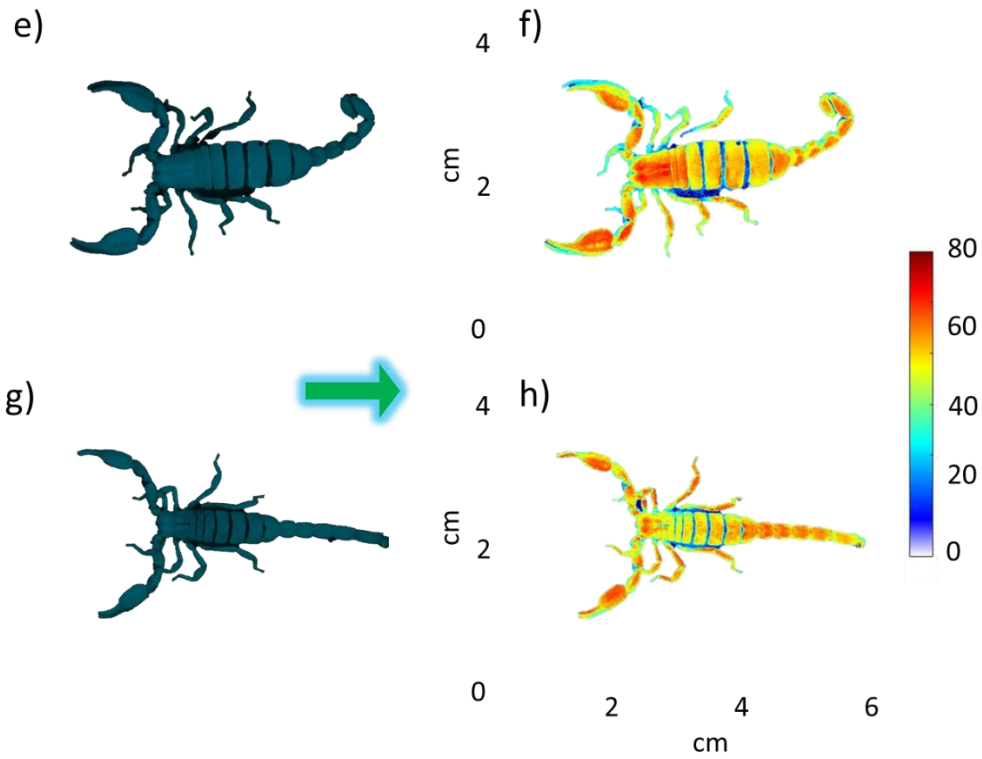
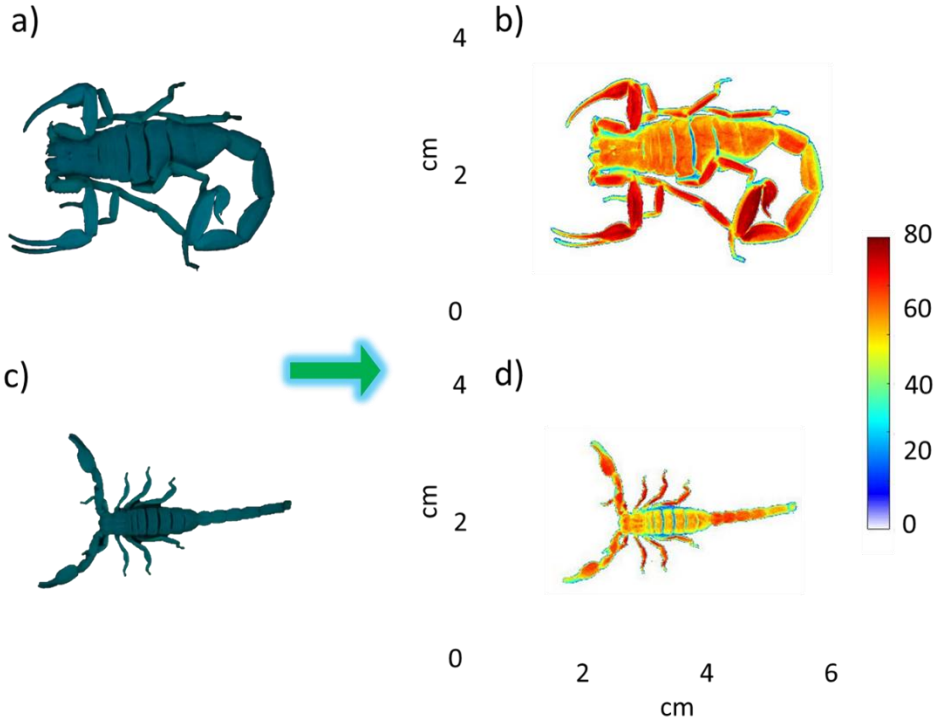
Fig. 2.4 Espectros de reflectancia y fluorescencia medidos a partir de un alacrán inmobilizado (*V. intermedius*) dentro de una bolsa Ziploc® (curva roja) y fuera de la bolsa (curva verde), respectivamente. Como referencia, la línea negra es el espectro de reflectancia obtenido de una bolsa Ziploc® sola, mientras que la línea discontinua es el espectro corregido del alacrán una vez que se resta el espectro de la bolsa Ziploc®.

Capítulo 3

Resultados y discusión de fluorescencia en alacranes

3.1 La fluorescencia del cuerpo del alacrán es heterogénea

El procesamiento de imágenes digitales no solo nos permitió cuantificar la intensidad general de la fluorescencia, sino que también nos permitió identificar regiones de diferentes intensidades de emisión en el cuerpo del alacrán. Por ejemplo, la Figura 3.1 presenta imágenes procesadas digitalmente que fueron obtenidas bajo iluminación con luz UV para especímenes de las especies *Centruroides nigrimanus*, *Diplocentrus duende*, *Diplocentrus withei*; *Diplocentrus tehuacanus*; *Centruroides infamatus* y *Diplocentrus sp2*; en las que la intensidad de la fluorescencia no es homogénea en el exoesqueleto del alacrán. Estas imágenes procesadas muestran los segmentos mesosomales con una fluorescencia moderada, mientras que los pedipalpos, segmentos metasomales y patas muestran un color más rojizo que el segmento mesosomal, lo que indica una fluorescencia más alta. Encontramos este patrón de fluorescencia en las 24 especies en estudio, aunque con diferentes niveles de intensidad dependiendo de la especie.



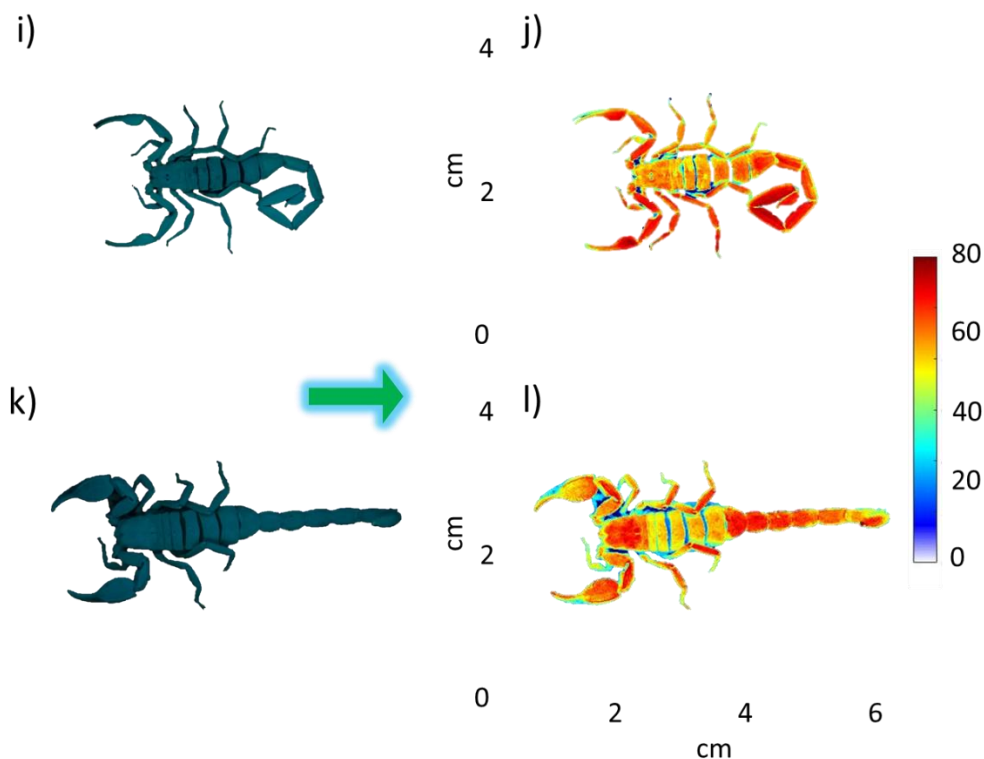


Fig. 3.1 Fotografías obtenidas bajo iluminación con luz UV para los especímenes a) hembra, *C. nigrimanus*, c) macho, *D. duende*; e) macho, *D. withei*; g) hembra, *D. tehuacanus*; i) hembra, *C. infamatus* y k) macho, *D. sp2*; b), d), f), h), j) y l) fotografías después del procesamiento de imágenes y el trazado con colores falsos de la intensidad registrada de cada píxel. La escala en unidades de cm representa la dimensión real de los especímenes.

Se calculó el promedio de la intensidad de fluorescencia por unidad de área (cm^2) en todas las muestras cuyos resultados condensados se pueden consultar en la Tabla 2 y Figura 3.2.

Tabla 2 Intensidad de fluorescencia por unidad de área (cm^2) para el exoesqueleto completo, las quelas, el primero y segundo segmento metasomal, y el cuarto segmento mesosomal, obtenido de las imágenes procesadas tomadas bajo luz UV, para alacranes vivos cada uno fotografiado con cuatro réplicas, tomadas en diferentes días. Los porcentajes entre paréntesis de las columnas de quelas y metasoma indican los incrementos de intensidad con respecto a la intensidad en los segmentos mesosomales.

Especie	Genero	Intensidad de fluorescencia por unidad de área (cm^2)				
		Promedio Mesosoma	Promedio Quelas	Promedio Metasoma	Promedio exoesqueleto completo	
					Por sexo	global
1. <i>Centruroides infamatus</i>	Macho	52.6 ± 1.0	63.2 ± 2.0 (20.2 %)	56.9 ± 2.0 (8.2 %)	69.3 ± 4.0	
	Hembra	50.2 ± 1.0	60.3 ± 4.0 (20.2 %)	57.9 ± 2.0 (15.4 %)	69.1 ± 5.0	

2.	<i>Centruroides nigrimanus</i>	Macho	55.2 ± 4.0	62.9 ± 2.0 (13.9 %)	65.3 ± 3.0 (18.3 %)	66.8 ± 4.0	63.9 ± 4.0
		Hembra	52.2 ± 4.0	64.4 ± 2.0 (23.4 %)	68.2 ± 3.0 (30.7 %)	61.0 ± 3.0	
3.	<i>Centruroides tecomanus</i>	Macho	-	-	-	-	54.3 ± 6.0
		Hembra	40.8 ± 2.0	54.5 ± 2.0 (33.6 %)	53.0 ± 3.0 (29.9 %)	54.3 ± 6.0	
4.	<i>Centruroides vittatus</i>	Macho	63.2 ± 3.0	72.3 ± 5.0 (14.4 %)	73.2 ± 3.0 (15.8 %)	67.6 ± 5.0	65.0 ± 4.0
		Hembra	65.0 ± 3.0	74.5 ± 5.0 (14.6 %)	69.4 ± 3.0 (6.8 %)	62.4 ± 4.0	
5.	<i>Hoffmannihadrurus gertschi</i>	Macho	-	-	-	-	69.8 ± 4.0
		Hembra	51.2 ± 2.0	63.7 ± 2.0 (24.4 %)	67.6 ± 3.0 (32.0 %)	69.8 ± 4.0	
6.	<i>Kolotl poncei</i>	Macho	56.9 ± 4.0	64.8 ± 4.0 (13.8 %)	63.8 ± 9.0 (12.1 %)	59.5 ± 3.0	59.3 ± 2.0
		Hembra	53.7 ± 4.0	59.5 ± 4.0 (10.8 %)	58.7 ± 8.0 (9.3 %)	59.1 ± 3.0	
7.	<i>Diplocentrus duende</i>	Macho	42.2 ± 2.0	57.4 ± 3.0 (36.0 %)	53.4 ± 1.0 (26.5 %)	61.7 ± 4.0	61.3 ± 5.0
		Hembra	39.8 ± 2.0	50.9 ± 3.0 (28.1 %)	60.1 ± 1.0 (51.2 %)	60.9 ± 5.0	
8.	<i>Diplocentrus sp1</i>	Macho	43.1 ± 2.0	53.4 ± 3.0 (23.9 %)	49.1 ± 1.0 (13.9 %)	52.2 ± 5.0	51.2 ± 4.0
		Hembra	38.4 ± 2.0	56.5 ± 3.0 (47.0 %)	47.5 ± 1.0 (23.5 %)	50.3 ± 5.0	
9.	<i>Diplocentrus sp2</i>	Macho	51.7 ± 2.0	55.1 ± 3.0 (8.7 %)	53.3 ± 2.0 (5.0 %)	48.6 ± 3.0	48.6 ± 3.0
		Hembra	-	-	-	-	
10.	<i>Diplocentrus tehuaeanus</i>	Macho	46.2 ± 3.0	63.8 ± 2.0 (38.1 %)	67.3 ± 2.0 (45.7 %)	57.8 ± 5.0	58.3 ± 6.0
		Hembra	42.6 ± 3.0	66.7 ± 2.0 (56.7 %)	66.5 ± 2.0 (56.2 %)	58.8 ± 4.0	
11.	<i>Diplocentrus whitei</i>	Macho	43.6 ± 3.0	51.5 ± 3.0 (18.0 %)	54.1 ± 3.0 (24.1 %)	51.8 ± 3.0	51.9 ± 3.0
		Hembra	46.0 ± 3.0	52.6 ± 3.0 (14.3%)	51.7 ± 3.0 (12.4 %)	52.0 ± 4.0	
12.	<i>Chihuahuanus bilineatus</i>	Macho	-	-	-	-	57.8 ± 6.0
		Hembra	45.1 ± 2.0	51.2 ± 1.0 (13.5%)	52.6 ± 2.0 (16.6 %)	57.8 ± 6.0	
13.	<i>Chihuahuanus coahuilae</i>	Macho	47.9 ± 2.0	56.7 ± 1.0 (18.4%)	65.5 ± 2.0 (36.7 %)	57.8 ± 4.0	59.2 ± 5.0
		Hembra	45.5 ± 5.0	57.5 ± 1.0 (26.4%)	61.2 ± 3.0 (34.7 %)	60.6 ± 6.0	
14.	<i>Chihuahuanus globosus</i>	Macho	54.3 ± 3.0	64.6 ± 3.0 (19.0 %)	62.3 ± 4.0 (14.7 %)	65.5 ± 4.0	66.8 ± 6.0
		Hembra	48.1 ± 3.0	62.4 ± 3.0 (29.6%)	58.4 ± 3.0 (21.3 %)	68.1 ± 5.0	
15.	<i>Chihuahuanus aff. crassimanus</i>	Macho	67.9 ± 3.0	72.3 ± 2.0 (6.5%)	70.2 ± 2.0 (3.4 %)	77.3 ± 3.0	75.6 ± 5.0
		Hembra	61.7 ± 3.0	68.1 ± 2.0 (10.3%)	72.9 ± 2.0 (18.1 %)	73.9 ± 5.0	
16.	<i>Mesomexovis subcristatus</i>	Macho	-	-	-	-	53.5 ± 3.0
		Hembra	50.8 ± 2.0	61.0 ± 2.0 (20.1 %)	64.0 ± 3.0 (26.0 %)	53.5 ± 3.0	
17.	<i>Mesomexovis aff. variegatus sp1</i>	Macho	-	-	-	-	47.0 ± 5.0
		Hembra	39.4 ± 4.0	53.4 ± 2.0 (35.5%)	53.9 ± 3.0 (36.8 %)	47.0 ± 5.0	
18.	<i>Mesomexovis aff. variegatus sp2</i>	Macho	47.1 ± 3.0	53.8 ± 2.0 (14.2 %)	56.6 ± 3.0 (20.2 %)	50.2 ± 3.0	49.9 ± 4.0
		Hembra	43.3 ± 3.0	57.5 ± 2.0 (32.7 %)	57.6 ± 3.0 (32.9 %)	49.7 ± 3.0	
19.	<i>Mesomexovis aff. subcristatus sp3</i>	Macho	62.4 ± 3.0	68.7 ± 2.0 (10.1%)	72.6 ± 3.0 (16.3 %)	63.4 ± 4.0	65.7 ± 5.0
		Hembra	65.8 ± 3.0	73.0 ± 2.0 (11.0 %)	67.3 ± 3.0 (2.3 %)	67.9 ± 5.0	
20.	<i>Paruroctonus gracilior</i>	Macho	76.4 ± 1.0	84.2 ± 2.0 (10.2%)	83.8 ± 3.0 (9.6 %)	82.2 ± 4.0	82.2 ± 4.0
		Hembra	-	-	-	-	

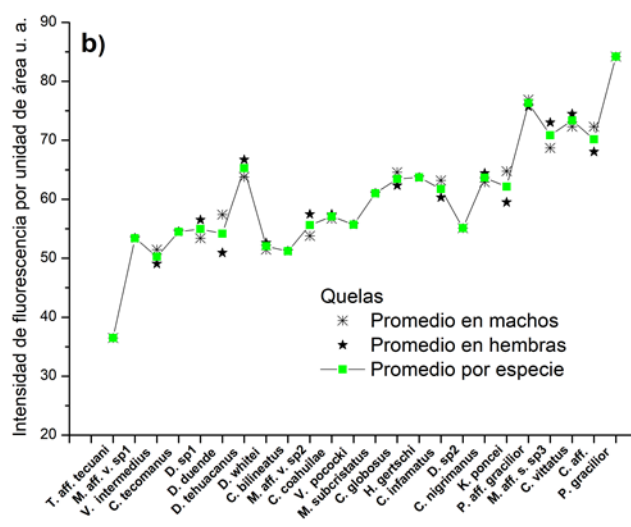
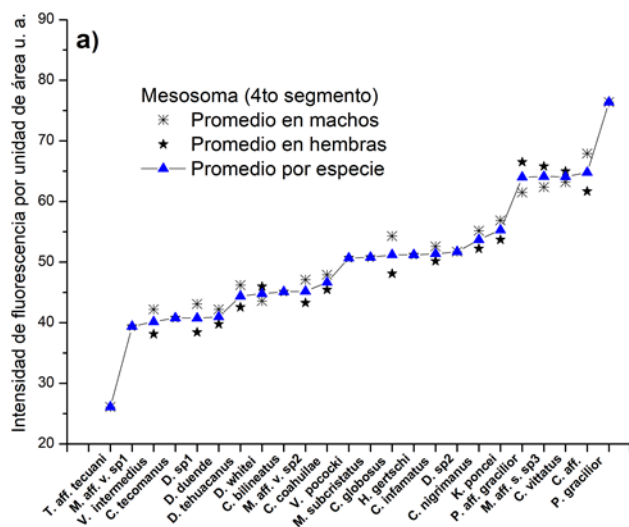
21.	<i>Paruroctonus aff. gracilior</i>	Macho	61.5 ± 2.0	76.9 ± 1.0 (25.0%)	71.4 ± 2.0 (16.1%)	77.3 ± 4.0	75.6 ± 5.0
		Hembra	66.5 ± 2.0	75.7 ± 1.0 (13.9%)	70.9 ± 2.0 (6.7%)	73.8 ± 6.0	
22.	<i>Thorellius aff. tecuani</i>	Macho	26.1 ± 2.0	36.5 ± 1.0 (39.8%)	34.1 ± 1.0 (30.8%)	35.5 ± 1.0	35.5 ± 1.0
		Hembra	-	-	-	-	
23.	<i>Vaejovis intermedius</i>	Macho	42.2 ± 2.0	51.5 ± 1.0 (22.0%)	58.3 ± 3.0 (38.2%)	52.3 ± 4.0	49.2 ± 3.0
		Hembra	38.1 ± 2.0	49.1 ± 1.0 (28.7%)	55.7 ± 3.0 (46.1%)	46.2 ± 5.0	
24.	<i>Vaejovis pococki</i>	Macho	-	-	-	-	52.0 ± 2.0
		Hembra	50.7 ± 3.0	55.7 ± 2.0 (9.9%)	58.3 ± 2.0 (15.0%)	52.0 ± 2.0	
		Promedio machos	52.3 ± 2.6	61.6 ± 2.4	61.7 ± 2.7	60.9 ± 3.8	
		Promedio hembras	49.3 ± 2.7	60.4 ± 2.3	60.6 ± 2.8	59.4 ± 4.5	
		Promedio ambos sexos	50.2 ± 2.6	60.3 ± 2.2	60.5 ± 2.7	59.3 ± 4.2	59.3 ± 4.2

Hecho lo anterior, se realizaron análisis estadísticos para determinar si hay diferencias de intensidad de fluorescencia entre el sexo, entre segmentos del exoesqueleto, o entre especies. El primer conjunto de análisis consistió en una prueba t pareada (ver apéndice 1: definiciones estadísticas) entre los promedios de fluorescencia en machos y hembras, considerando solo las 15 especies para las cuales la muestra contenía los dos sexos (Tabla 1). Esta prueba t pareada se obtuvo para la fluorescencia medida en todo el exoesqueleto, el metasoma, las quelas y los segmentos mesosomales, por cada sexo. En la prueba t pareada se plantean dos hipótesis, la primera de ellas conocida como la hipótesis nula donde la diferencia estadística de las medias es cero, y la hipótesis alternativa donde la diferencia estadística de las medias es diferente de cero. Para determinar cuál de las dos hipótesis es la correcta desde el punto de vista estadístico, se calcula el valor p , si este valor es mayor que el nivel de significancia definido *a priori* entonces se acepta la hipótesis nula, pero si es menor que el nivel de significancia se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Para nuestros resultados sobre la intensidad de fluorescencia entre hembras y machos el valor de p en todos los casos siempre fue mayor o igual al nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), por lo que se optó por la aceptación de la hipótesis nula, estableciendo que las medias de las intensidades de fluorescencia entre las hembras y los machos en todos los segmentos del exoesqueleto bajo estudio no son significativamente diferentes, Tabla 3. Este hecho se puede corroborar en la Figura 3.2 a-c, donde se puede observar que en general

los valores de fluorescencia entre hembras y machos difieren aleatoriamente del valor promedio, lo que sugiere que los valores medios son iguales.

Tabla 3 Prueba t pareada entre los promedios de fluorescencia en machos y hembras. A un nivel de 0.05, la diferencia de medias no es significativamente diferente por lo que se aceptó la hipótesis nula.

Intensidad de fluorescencia por unidad de área:	Genero	Estadística descriptiva de los promedios en machos y hembras		
		Promedio	Desviación estándar	Error medio desviación estándar
Exoesqueleto completo	Macho	62.0	8.7	2.2
	Hembra	60.9	8.7	2.2
		$t = 1.34, GL=14, p=0.20$		
Mesosoma	Macho	52.4	8.6	2.2
	Hembra	50.5	10.07	2.6
		$t = 2.20, GL =14, p=0.05$		
Quelas	Macho	62.2	8.1	2.1
	Hembra	61.9	8.4	2.2
		$t = 0.38, GL =14, p=0.71$		
Metasoma	Macho	62.7	7.6	2.0
	Hembra	61.6	7.4	1.9
		$t = 1.21, GL =14, p=0.25$		



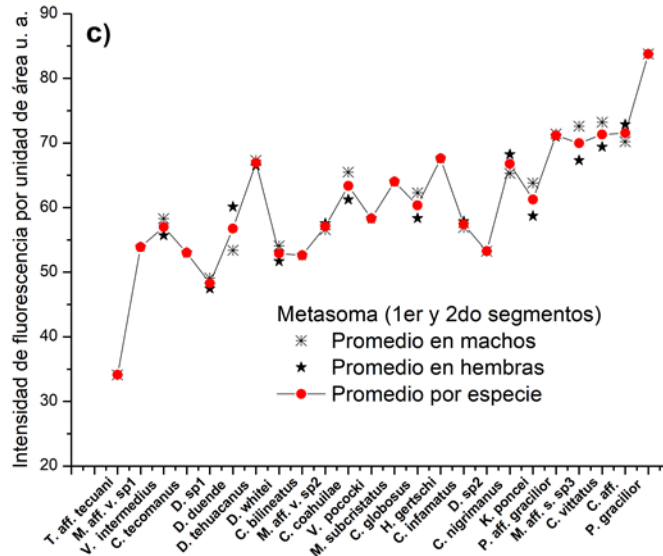


Fig. 3.2 Se muestra el promedio de la intensidad de fluorescencia medida en diferentes segmentos del exoesqueleto de machos y hembras: a) mesosoma, b) quelas, c) metasoma.

El segundo conjunto de análisis estadístico consistió en un estudio ANOVA de medidas repetidas de un factor (ver apéndice 1, para la definición de esta estadística) para evaluar la posible diferencia significativa en el promedio de fluorescencia obtenida para todas las especies en tres segmentos del exoesqueleto: las quelas, y los segmentos metasomales y mesosomales (Tabla 4). Estadísticamente (a un nivel de $\alpha=0.05$), hay una diferencia significativa entre el promedio de fluorescencia entre estas estructuras [$F(2,69) = 7.9, p < 0.05$]. La prueba post-hoc de t-student realizada en las tres estructuras pareadas (Tabla 5), reveló un patrón entre especies en el que la fluorescencia en quelas y metasoma es de hecho más alta en comparación con el mesosoma (Figura 3.3), lo que respalda nuestra observación de que la fluorescencia es heterogénea a través del exoesqueleto tal y como se había discutido para los resultados de la Figura 3.1.

Tabla 4 ANOVA global de todas las mediciones sobre la fluorescencia de las tres estructuras, los segmentos metasomales, los segmentos mesosomales y las quelas. Como se mostró en el apéndice 1, la notación usada es grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC) y cuadrados medios (CM), de tal forma que si se toma la intersección de una columna con un renglón tendremos el valor correspondiente a las definiciones del apéndice 1, por ejemplo columna 3, renglón 1 corresponde a SCF (suma de cuadrados del factor).

F(2, 69) = 7.9, p = 0.001

Fuente	GL	SC	CM	F_{ratio}	F_{α}
Factor	2.0	1678.0	839.0	7.9	3.1
Error	69.0	7330.0	106.2		
Total	71.0	9008.0			

Tabla 5 Post-hoc de t-student entre estructuras pareadas (mesosoma, quelas, metasoma). A un nivel de 0.05, las medias de fluorescencia son significativamente diferentes para los pares quelas-mesosoma y metasoma-mesosoma.

Condiciones pareadas	Estadística descriptiva de la fluorescencia		
	Media	Desviación estándar	Error medio desviación estándar
Quelas	60.3	10.0	2.0
Metasoma	60.5	10.0	2.0
	$t = -0.09, GL = 45, p = 0.93$		
Quelas	60.3	10.0	2.0
Mesosoma	50.2	10.9	2.2
	$t = 3.35, GL = 45, p = 0.00$		
Metasoma	60.5	10.0	2.0
Mesosoma	50.2	10.9	2.2
	$t = 3.44, GL = 45, p = 0.00$		

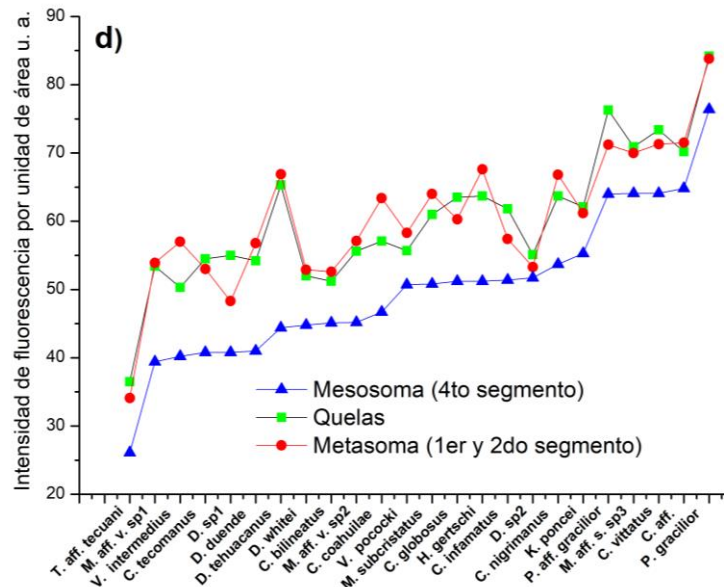


Fig. 3.3 Se muestra la comparación de las intensidades promedio en tres segmentos del exoesqueleto: mesosoma, pinza y metasoma.

Los segmentos metasomales y pedipalpos juegan un papel principal en la depredación, defensa y apareamiento. Estas estructuras pueden tener una alta esclerotización [27, 32, 33], porque el alacrán depende de las estructuras más resistentes de su cuerpo para disuadir a los posibles depredadores y matar a una presa de manera más eficiente, lo que determina su supervivencia. Por lo tanto, una esclerotización más alta en algunos de los segmentos del exoesqueleto podría implicar una fluorescencia más alta. Sin embargo, es probable que se puedan considerar otras conexiones entre la función y la evolución natural de estos segmentos en el exoesqueleto con las nuevas observaciones de fluorescencia heterogénea en alacranes obtenidas en la presente investigación. Por ahora, podríamos especular, por ejemplo, la posible utilidad de la fluorescencia durante el apareamiento en etapas como el *juddering* y el *clubbing* como mecanismo de señalización visual. La sensibilidad aguda de los ocelos laterales [19] podría usarse como una forma secundaria de reconocimiento entre especímenes (el reconocimiento primario puede ser bioquímico a través de las hormonas [11]) o para sondear la receptividad de la pareja a medida que se usan pedipalpos y metasomas para atraer y estimular a la pareja potencial para que coopere en el comportamiento de cortejo [11].

3.2 Relación entre fluorescencia emitida y tonalidad de color en el exoesqueleto

El color del exoesqueleto de las especies de alacranes estudiadas aquí variaba de un color amarillo pálido a negro oscuro. Para evaluar la tonalidad de color del exoesqueleto, se calculó la luz reflejada por unidad de área (cm^2) a partir de las fotografías obtenidas bajo iluminación de luz blanca (Tabla 6), resultando la mayor reflectancia para los alacranes con el color más claro y la menor reflectancia para los alacranes más oscuros.

Tabla 6 Intensidad de luz reflejada por unidad de área (cm²) para el exoesqueleto completo, las quelas, el primero y segundo segmento metasomal y el cuarto segmento mesosomal obtenido de las imágenes procesadas tomadas bajo luz blanca para alacranes vivos cada uno con cuatro réplicas. Los porcentajes entre paréntesis de las columnas de quelas y metasoma indican los incrementos de intensidad con respecto a la intensidad en los segmentos mesosomales.

Especie	Genero	Intensidad de luz reflejada por unidad de área (cm ²)				
		Promedio Mesosoma	Promedio Quelas	Promedio Metasoma	Promedio del exoesqueleto completo	
					Por sexo	Global
1. <i>Centruroides infamatus</i>	Macho	43.3 ± 2.0	84.3 ± 3.0 (94.9 %)	56.6 ± 1.0 (30.8 %)	60.1 ± 5.0	61.2 ± 4.0
	Hembra	41.3 ± 2.0	87.0 ± 4.0 (110.9 %)	58.2 ± 2.0 (41.2 %)	62.3 ± 3.0	
2. <i>Centruroides nigrimanus</i>	Macho	36.1 ± 1.0	32.9 ± 1.0 (-8.8 %)	39.3 ± 4.0 (8.9 %)	55.2 ± 3.0	54.2 ± 5.0
	Hembra	37.3 ± 1.0	38.2 ± 3.0 (2.3 %)	38.7 ± 5.0 (3.6 %)	53.2 ± 4.0	
3. <i>Centruroides tecomanus</i>	Macho					57.6 ± 4.0
	Hembra	40.3 ± 3.0	74.3 ± 2.0 (84.1 %)	50.0 ± 2.0 (24.0 %)	57.6 ± 4.0	
4. <i>Centruroides vittatus</i>	Macho	71.1 ± 4.0	100.4 ± 4.0 (41.2 %)	81.4 ± 3.0 (14.5 %)	75.1 ± 3.0	76.1 ± 3.0
	Hembra	73.2 ± 3.0	93.3 ± 1.0 (27.4 %)	83.2 ± 4.0 (13.7 %)	77.1 ± 2.0	
5. <i>Hoffmannihadrurus gertschi</i>	Macho					67.6 ± 4.0
	Hembra	36.1 ± 4.0	91.7 ± 3.0 (154.3 %)	85.0 ± 3.0 (135.6 %)	67.6 ± 4.0	
6. <i>Kolotl poncei</i>	Macho	49.3 ± 3.0	34.0 ± 3.0 (-30.9 %)	44.0 ± 5.0 (- 10.6 %)	39.5 ± 2.0	44.0 ± 3.0
	Hembra	51.9 ± 2.0	36.3 ± 4.0 (-30.1 %)	43.3 ± 2.0 (- 16.6 %)	48.5 ± 3.0	
7. <i>Diplocentrus duende</i>	Macho	41.6 ± 1.0	72.3 ± 3.0 (73.7 %)	78.8 ± 2.0 (89.4 %)	67.6 ± 3.0	68.2 ± 3.0
	Hembra	40.7 ± 1.0	83.1 ± 2.0 (104.5 %)	80.2 ± 4. (97.4 %)	68.8 ± 4.0	
8. <i>Diplocentrus sp1</i>	Macho	47.4 ± 3.0	51.3 ± 2.0 (8.2 %)	47.2 ± 3.0 (- 0.4 %)	57.0 ± 5.0	51.9 ± 5.0
	Hembra	49.9 ± 3.0	38.0 ± 3.0 (-23.7 %)	49.6 ± 3.0 (- 0.6 %)	46.8 ± 4.0	
9. <i>Diplocentrus sp2</i>	Macho	37.8 ± 5.0	46.2 ± 4.0 (22.2 %)	41.5 ± 1.0 (9.8 %)	41.3 ± 3.0	41.3 ± 3.0
	Hembra					

10.	<i>Diplocentrus tehuacanus</i>	Macho	42.2 ± 4.0	73.9 ± 2.0 (75.1 %)	69.9 ± 4.0 (65.7 %)	63.4 ± 4.0	58.1 ± 5.0
		Hembra	41.6 ± 4.0	64.8 ± 3.0 (55.9 %)	67.8 ± 1.0 (63.2 %)	52.7 ± 6.0	
11.	<i>Diplocentrus whitei</i>	Macho	37.0 ± 2.0	38.1 ± 3.0 (2.8 %)	37.1 ± 2.0 (0.1 %)	38.8 ± 3.0	46.6 ± 4.0
		Hembra	38.8 ± 5.0	41.2 ± 1.0 (6.3 %)	38.9 ± 1.0 (0.4 %)	54.5 ± 4.0	
12.	<i>Chihuahuanus bilineatus</i>	Macho					69.0 ± 4.0
		Hembra	46.6 ± 2.0	83.2 ± 4.0 (78.4 %)	61.0 ± 5.0 (31.1 %)	69.0 ± 4.0	
13.	<i>Chihuahuanus coahuilae</i>	Macho	54.3 ± 1.0	85.0 ± 1.0 (56.4 %)	61.6 ± 4.0 (13.3 %)	77.3 ± 4.0	71.0 ± 4.0
		Hembra	55.6 ± 1.0	79.5 ± 5.0 (43.1 %)	64.2 ± 4.0 (15.6 %)	64.8 ± 3.0	
14.	<i>Chihuahuanus globosus</i>	Macho	74.8 ± 1.0	116.2 ± 2.0 (55.3 %)	81.8 ± 4.0 (9.4 %)	95.6 ± 4.0	96.5 ± 4.0
		Hembra	72.5 ± 3.0	62.4 ± 3.0 (-13.9 %)	79.6 ± 3.0 (9.9 %)	97.4 ± 5.0	
15.	<i>Chihuahuanus</i> aff. <i>crassimanus</i>	Macho	70.1 ± 3.0	107.8 ± 1.0 (53.9%)	73.6 ± 3.0 (5.1 %)	92.0 ± 3.0	87.3 ± 3.0
		Hembra	74.1 ± 4.0	95.8 ± 2.0 (29.2 %)	75.6 ± 3.0 (1.9 %)	82.6 ± 2.0	
16.	<i>Mesomexovis subcristatus</i>	Macho					74.8 ± 4.0
		Hembra	55.6 ± 3.0	79.1 ± 1.0 (42.4 %)	79.0 ± 4.0 (42.2 %)	74.8 ± 4.0	
17.	<i>Mesomexovis</i> aff. <i>variegatus</i> sp1	Macho					75.0 ± 4.0
		Hembra	59.2 ± 5.0	100.1 ± 2.0 (69.0 %)	72.0 ± 2.0 (21.6 %)	75.0 ± 4.0	
18.	<i>Mesomexovis</i> aff. <i>variegatus</i> sp2	Macho	45.3 ± 4.0	75.0 ± 3.0 (65.5 %)	55.0 ± 1.0 (21.4 %)	58.4 ± 5.0	58.8 ± 4.0
		Hembra	47.8 ± 1.0	78.5 ± 2.0 (64.1 %)	52.8 ± 1.0 (10.5 %)	59.2 ± 4.0	
19.	<i>Mesomexovis</i> aff. <i>subcristatus</i> sp3	Macho	51.4 ± 5.0	98.3 ± 2.0 (91.1 %)	64.9 ± 2.0 (26.2 %)	81.0 ± 4.0	75.4 ± 4.0
		Hembra	49.3 ± 2.0	88.4 ± 3.0 (79.5 %)	66.8 ± 2.0 (35.6 %)	69.8 ± 5.0	
20.	<i>Paruroctonus gracilior</i>	Macho	77.1 ± 3.0	119.5 ± 1.0 (54.9 %)	92.6 ± 1.0 (20.0 %)	96.7 ± 3.0	96.7 ± 3.0
		Hembra					
21.	<i>Paruroctonus</i> aff. <i>gracilior</i>	Macho	46.6 ± 1.0	96.7 ± 4.0 (107.7 %)	88.1 ± 6.0 (89.2 %)	78.2 ± 5.0	76.2 ± 4.0

	Hembra	49.9 ± 1.0	86.9 ± 4.0 (74.2 %)	91.3 ± 3.0 (83.0 %)	74.2 ± 4.0	
22. <i>Thorellius aff. tecuani</i>	Macho	35.2 ± 2.0	42.9 ± 3.0 (22.1 %)	45.2 ± 3.0 (28.6 %)	43.1 ± 3.0	43.1 ± 3.0
	Hembra					
	Macho	75.5 ± 4.0	72.0 ± 3.0 (-4.7 %)	55.5 ± 2.0 (- 26.5 %)	71.9 ± 4.0	
23. <i>Vaejovis intermedius</i>	Hembra	77.4 ± 3.0	67.2 ± 3.0 (-13.1 %)	54.0 ± 4.0 (- 30.1 %)	73.0 ± 5.0	72.4 ± 5.0
	Macho					
24. <i>Vaejovis pococki</i>	Hembra	51.1 ± 2.0	47.8 ± 4.0 (-6.4 %)	39.3 ± 1.0 (- 23.0 %)	56.2 ± 4.0	56.2 ± 4.0
Promedio machos		52.0 ± 2.9	74.8 ± 3.0	61.9 ± 3.0	66.5 ± 3.9	
Promedio hembras		51.9 ± 2.7	72.2 ± 3.2	63.4 ± 2.9	66.6 ± 4.1	
Promedio ambos sexos		51.4 ± 2.8	73.9 ± 3.1	62.7 ± 2.9	66.4 ± 3.9	66.4 ± 4.2

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas de un factor para el promedio de la luz reflejada entre las especies [$F(2, 69) = 8.65, p = 0.001$] y la prueba Post-hoc correspondiente, mostrando que a un nivel de 0.05 las medias de la reflexión de la luz en los segmentos metasomales y quelas es mayor que en los segmentos mesosomales (Tabla 7 y Tabla 8). Esto muestra que el nivel de reflectividad no es homogéneo en todo el exoesqueleto de los alacranes, como tampoco lo fue en el caso de la fluorescencia.

Tabla 7 ANOVA global sobre la reflectancia en tres estructuras: segmentos metasomales, segmentos mesosomales y quelas.

F(2, 69) = 8.7, p = 0.001					
Fuente	GL	SC	CM	F_{ratio}	F_{α}
Factor	2.0	6116.0	3057.8	8.7	3.1
Error	69.0	24429.0	354.0		
Total	71.0	30545.0			

Tabla 8 Post-hoc t-student entre estructuras pareadas (mesosoma, quelas, metasoma). A un nivel de 0.05, las medias son significativamente diferentes para los pares quelas-mesosoma y metasoma-mesosoma.

Condiciones pareadas	Estadística descriptiva de la luz reflejada		
	Media	Desviación estándar	Error medio desviación estándar
Quelas	73.9	23.9	4.9
Metasoma	62.7	17.5	3.6
t = 1.86, GL = 42, p = 0.07			
Quelas	73.9	23.9	4.9
Mesosoma	51.4	13.7	2.8
t = 4.02, GL = 36, p = 0.00			
Metasoma	62.7	17.5	3.6
Mesosoma	51.4	13.7	2.8
t = 2.51, GL = 43, p = 0.02			

Por otra parte, se desea explorar si existe alguna relación entre el nivel de fluorescencia que exhibe una especie con respecto al color característico de su exoesqueleto. La Figura 3.4 muestra la intensidad promedio de fluorescencia por unidad de área *versus* la intensidad promedio de la luz reflejada por unidad de área en todo el exoesqueleto de las diferentes especies bajo estudio. Aunque los puntos de datos en esta figura muestran una dispersión significativa, se observa una tendencia entre la fluorescencia y la luz reflejada: cuanto más pálido es el exoesqueleto, más intensa es la fluorescencia. Para probar esa afirmación, se obtuvo una regresión lineal a partir de los valores promedio obtenidos para cada una de las 24 especies de alacranes. La regresión aunque resulta relativamente pobre ($R^2 = 0.39$), a un nivel de 0.05, revela que la pendiente es significativamente diferente de cero ($p = 0.00056$) lo que implica que a pesar de que el ajuste al modelo lineal está lejos de ser óptimo, la probabilidad de tener un modelo lineal con la pendiente cero (sin variación de fluorescencia con respecto a la tonalidad de color) es poco probable.

La tendencia descrita arriba implicaría que en general los alacranes oscuros emiten menos fluorescencia. Obsérvese que en este caso no significa que necesariamente por procesos de reabsorción en el exoesqueleto los alacranes oscuros emitan menos fluorescencia. Por el contrario, lo que este hallazgo pudiese sugerir es que los alacranes oscuros son intrínsecamente menos fluorescentes que los alacranes claros, o dicho de otra manera, que los alacranes más claros son

intrínsecamente más fluorescentes que los oscuros. Esto es algo que tendría que corroborarse con futuros estudios, no obstante se puede mencionar algunos reportes en la literatura que pareciesen estar en línea con nuestras observaciones [36, 46].

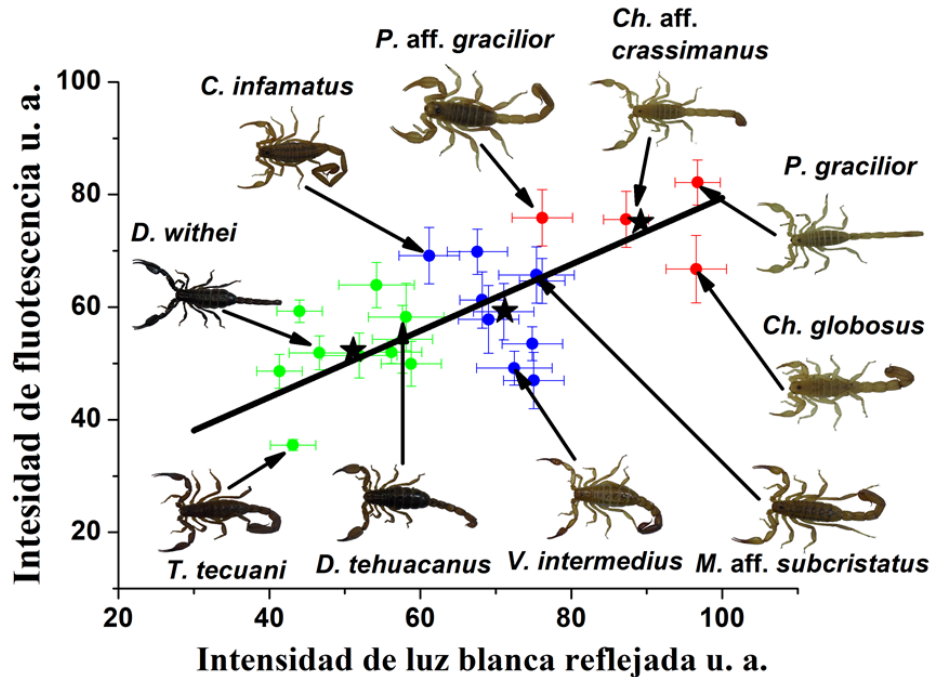


Fig. 3.4 Gráfico de dispersión de la fluorescencia emitida por unidad de área bajo iluminación UV y la luz reflejada por unidad de área bajo iluminación blanca. La línea continua es una regresión lineal de todos los datos (24 especies) que coincide con la tendencia lineal de la agrupación obtenida mediante el algoritmo K-means. Los centroides calculados de cada cúmulo se indican como estrellas negras y la asignación estadística de cada dato a un grupo se denota con los colores verde, azul y rojo. Estadísticas de la regresión lineal de 24 puntos de datos: pendiente = $0.45 \pm (0.11)$; intersección = 29.39 ± 7.62 ; R-cuadrado = 0.397; DF = 22; F = 16,19; p = 0,00056.

Con el fin de identificar posibles características de agrupación en los datos, se llevó a cabo un análisis de agrupación de K-means [45]. El algoritmo de agrupamiento de K-means asigna iterativamente cada punto de datos en la Figura 3.4 a uno de los K agrupamientos en base a las características de los alacranes contenidos en el mismo. Cada grupo está definido por un centroide. El análisis de agrupamiento de K-means se implementó con K = 3, 4, 5, el algoritmo tuvo un comportamiento convergente para K = 3 grupos (Tabla 9) cuyos centroides se representan como símbolos de estrella en la Figura 3.4. El primer centroide corresponde a un grupo con 10 especies de color oscuro y baja emisión de

fluorescencia; el segundo centroide comprende un grupo con 10 especies de color intermedio y una emisión de fluorescencia media; el tercer grupo comprende 4 especies de alacranes de color claro y con la mayor emisión de fluorescencia.

Tabla 9 Relación de especímenes agrupados mediante el análisis K-means. Cada grupo está relacionado con el aumento de fluorescencia y la tonalidad del color.

Grupo 1 Baja emisión/color oscuro	Grupo 2 emisión media/color oscuro	Grupo 3 emisión alta/color claro
<i>Centruroides nigrimanus</i>	<i>Centruroides infamatus</i>	<i>Chihuahuanus globosus</i>
<i>Centruroides tecomanus</i>	<i>Centruroides vittatus</i>	<i>Chihuahuanus aff.</i>
<i>Diplocentrus sp1</i>	<i>Hoffmannihadrurus gertschi</i>	<i>Crassimanus</i>
<i>Diplocentrus sp2</i>	<i>Diplocentrus duende</i>	<i>Paruroctonus gracilior</i>
<i>Diplocentrus tehuacanus</i>	<i>Chihuahuanus bilineatus</i>	<i>Paruroctonus aff. gracilior</i>
<i>Diplocentrus whitei</i>	<i>Chihuahuanus coahuilae</i>	
<i>Koloff poncei</i>	<i>Mesomexovis subcristatus</i>	
<i>Mesomexovis aff. variegatus sp2</i>	<i>Mesomexovis aff. variegatus sp1</i>	
<i>Thorellius tecuani</i>	<i>Mesomexovis aff. subcristatus sp3</i>	
<i>Vaejovis pococki</i>	<i>Vaejovis intermedius</i>	

Se ha reportado, por ejemplo, que en algunas especies de la familia Chaerilidae, la biofluorescencia está casi ausente, notablemente, estas especies tienden a tener una tonalidad oscura y patrones de color de áreas pigmentadas en las superficies dorsales y ventrales [17]. Además, estas especies débilmente fluorescentes no tienen ojos o tienen ocelos medianos y laterales vestigiales y una percepción nula de la luz UV [17]. Los querílidos son alacranes humícolas, es decir, alacranes especializados en vivir en la hojarasca densa tienden a ser de color oscuro, igualando el color oscuro de la hojarasca.

3.3 Análisis espectroscópico de la reflectancia y fluorescencia

La reflectancia y la fluorescencia del exoesqueleto de los alacranes vivos se obtuvieron directamente por métodos espectroscópicos. Para realizar estas mediciones, se seleccionaron dos especies representativas de color claro, dos de color medio y dos de color oscuro. Usando el agrupamiento proporcionado por el estudio de K-means, se seleccionaron dos especímenes de cada grupo (Tabla 9), de esta forma se obtuvieron los espectros de: alacranes de color claro *P. gracilior* y

P. aff. gracilior (grupo 3, Tabla 9); alacranes de color medio *M. aff. subcristatus* sp3 y *C. infamatus* (grupo 2, Tabla 9); y alacranes de color oscuro *D. tehuacanus* y *D. whitei* (grupo 2, Tabla 9). Los espectros de reflectancia y fluorescencia (Figura 3.5) resultaron de promediar el espectro de al menos 4 individuos por especie.

La Figura 3.5 muestra la reflectancia promedio para cada una de las seis especies bajo prueba. Los espectros de reflectancia se caracterizan por un pico bien definido aproximadamente a 390 nm. Coincidentemente, este máximo relativo de reflectividad en el UV es cercano al valor de longitud de onda del pico de sensibilidad (~ 371 nm) de los ocelos laterales en alacranes [24]. Por otra parte, los espectros de reflectancia tienen un mínimo relativo en el rango de 429-465 nm dependiendo de la especie. Esto concuerda con la reflectancia mínima a 453 nm reportada recientemente para *Centruroides limpidus* [46]. A partir del mínimo de reflectancia, todos los espectros muestran un aumento monotónico en función de la longitud de onda. Para obtener un valor representativo de la reflectancia por especie, cada curva de la Figura 3.5 se promedió en el rango 400-700 nm correspondiente al espectro visible, el que también se registró para el procesamiento de imágenes digitales discutidas en las secciones 3.1 y 3.2. La reflectancia representativa así obtenida varió de 9.45% en la especie *D. whitei* hasta 18.05% para *P. gracilior*. Obsérvese que estos resultados de reflectancia en la Figura 3.5 son consistentes con los resultados obtenidos con los métodos de imágenes procesadas digitalmente en la Fig. 3.4.

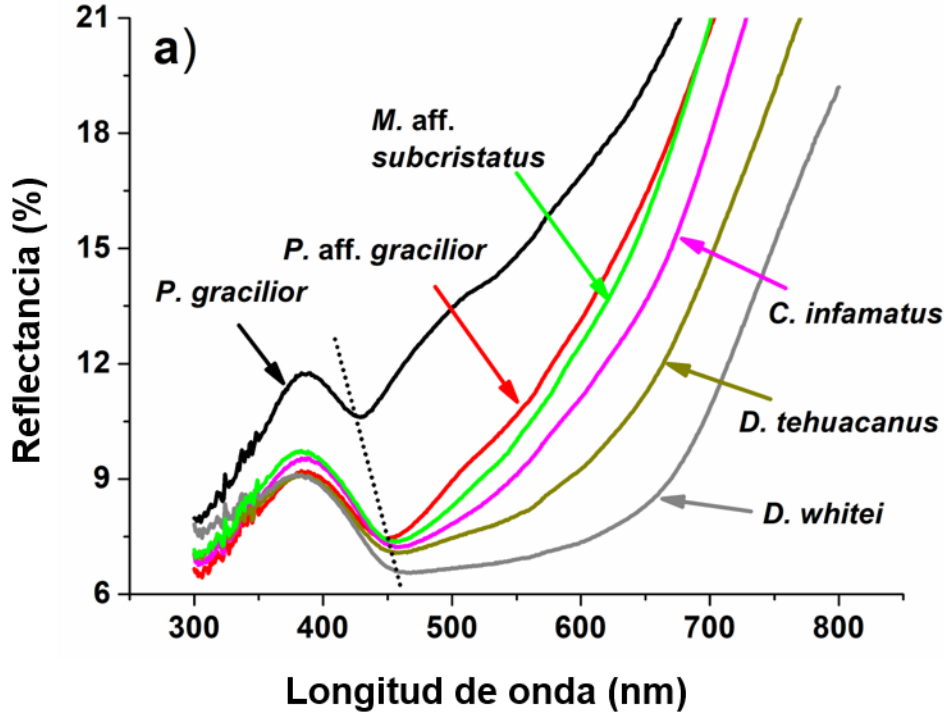


Fig. 3.5 Espectros de reflectancia obtenidos del mesosoma de cada alacrán. La línea punteada representa el desplazamiento del mínimo de reflectancia.

Aunque los experimentos aquí realizados aportan información limitada sobre las relaciones del color de los alacranes y su ecomorfotipo, y por tanto resultaría complicado establecer hipótesis robustas sobre la correlación entre el color de los alacranes y el color del sustrato donde viven, se establecen algunas ideas generales que pudieran ser de utilidad para futuros trabajos. Resulta lógico suponer entonces que el color del exoesqueleto de los alacranes aquí estudiados resulta de una adaptación al hábitat donde viven. Por ejemplo, *P. gracilior*, caracterizado por la reflectancia más alta (ver Figure 3.5) y por un exoesqueleto de color amarillento pálido, es una especie psamófila que vive exclusivamente en dunas de arena de color claro. Al igual que muchas otras especies de psamófilos en todo el mundo [11], las galerías de construcción de *P. gracilior* se utilizan como refugio durante el día, pero durante la noche cazan activamente. Por su parte, *P. aff. gracilior* puede clasificarse como un pseudosamófilo, de acuerdo con los ecomorfotipos definidos por [34], ya que puede ocupar hábitats intermedios desde suelos arenosos hasta

suelos compuestos por gravilla. Este hábitat intermedio de *P. aff. gracilior* se correlaciona con su color más oscuro en comparación con el color de *P. gracilior* (Figura 3.5). En contraste, las especies *D. whitei* y *D. tehuacanus* se caracterizan por la reflectancia más baja y el color más oscuro. Estas especies son pelófilas, construyen galerías en suelos compactos y arcillosos. A diferencia de las especies psamófilas, las especies pelófilas rara vez salen de sus galerías y usan sus robustos pedipalpos para cazar con una estrategia de sentarse y esperar [36, 37]. Estas especies tienen un corto período de actividad en la superficie, dedicado exclusivamente a la reproducción. Los machos, raramente deambulan por la superficie, y solo lo hacen para encontrar una pareja potencial durante la temporada reproductiva. Las otras especies, *C. infamatus* y *M. aff. subcristatus*, viven en hábitats más diversos, que van desde suelos arenosos a rocosos o incluso en el caso de *C. infamatus* bajo la corteza de los árboles. A diferencia de los alacranes de color y reflectancia extrema, estas dos especies están moderadamente adaptadas morfo-fisiológicamente al sustrato donde habitan, pero son más activas en la superficie que las especies de menor reflectancia. Estos casos ejemplifican el papel potencial del sustrato como un factor de selección natural que produce coincidencia de tonalidad de color con el exoesqueleto; como se discutió anteriormente, esa adaptación involucra el nivel de actividad superficial ya que los alacranes han desarrollado una coloración críptica [36] para evitar a los depredadores. Sin embargo, se necesitan más experimentos para fortalecer y generalizar estas correlaciones hipotéticas en la Orden Scorpiones.

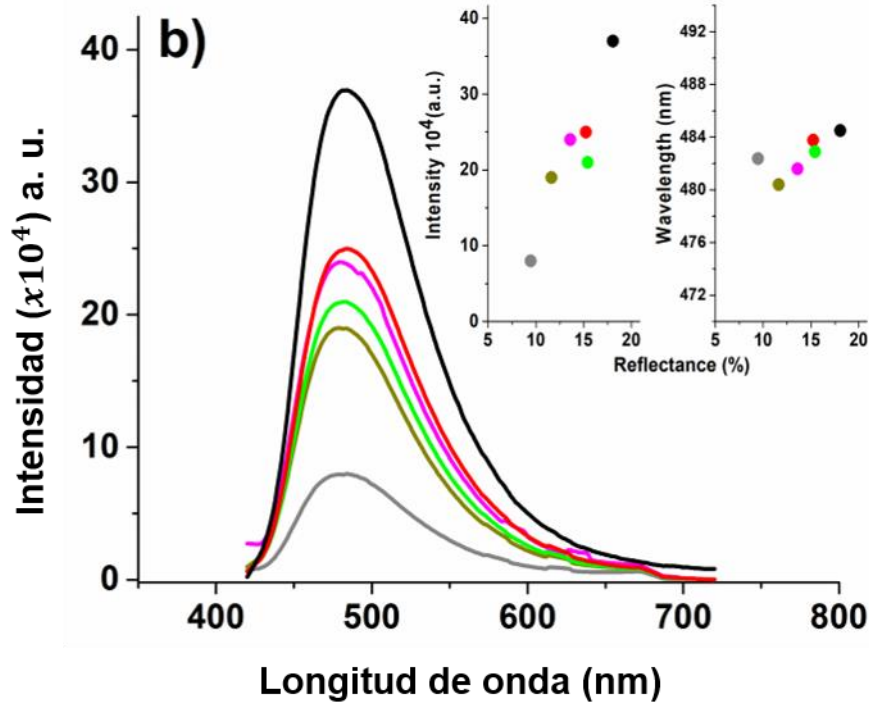


Fig. 3.6 Espectros de fluorescencia obtenidos del mesosoma bajo una excitación de 405 nm. Las inserciones muestran la intensidad de emisión y las longitudes de onda de emisión en función de la reflectancia promedio calculada de 400 a 800 nm.

Los espectros de fluorescencia promediados obtenidos para estas seis especies se muestran en la Figura 3.6. Esta figura demuestra que los resultados espectroscópicos concuerdan con los obtenidos por el procesamiento de imágenes en el que la intensidad de fluorescencia tiende a correlacionarse linealmente con el color del exoesqueleto (ver recuadro en la Figura 3.6). Esta figura también muestra las longitudes de onda del pico de emisión que resultó del promedio de los picos medidos para estas especies. Se observan pequeñas diferencias en los valores de longitud de onda de estos picos. Dado que estas diferencias en la longitud de onda ocurren más bien en un rango muy estrecho, se puede considerar que en nuestros experimentos el pico de emisión característico es de alrededor de 483 nm (ver Tabla 10).

Tabla 10 Longitudes de onda de emisión máxima medidas en seis especies con exoesqueletos característicos que varían de color claro a color oscuro.

Especie	Característica de color en el exoesqueleto	Pico de emisión (nm)
<i>P. gracilior</i>	Tonalidad clara	484.5 ± 0.5
<i>P. aff. gracilior</i>	Tonalidad clara	483.8 ± 3.8
<i>M. aff. subcristatus</i> sp3	Tonalidad media	482.9 ± 4.1
<i>C. infamatus</i>	Tonalidad media	481.6 ± 4.4
<i>D. tehuacanus</i>	Tonalidad oscura	480.4 ± 1.4
<i>D. whitei</i>	Tonalidad oscura	482.4 ± 0.6

Nuestros resultados se pueden comparar con otros reportes en la literatura (Tabla 11). Por ejemplo, nuestras lecturas difieren significativamente de las reportadas para la especie *C. limpidus* con un pico de emisión a 518 nm dada una fuente de excitación UV de 266 nm [46] pero son más similares a las de *C. vittatus* a 490 nm con excitación a 360 nm [27]. Kloock [26] registró el pico de fluorescencia en el rango de 497-500 nm con excitación a 395 nm, notando diferencias estadísticamente significativas de uno o dos nanómetros para las especies *Paravaejovis confusus* y *Paruroctonus shulovi*. Con una excitación similar (390 nm), el pico de emisión para la especie *Paruroctonus becki* resultó ser a 501 nm [47]. Observe que para la especie *M. martensii* [48] el pico de emisión es de 490 nm, siempre que la excitación sea de 400 nm; este último es similar al utilizado en el presente trabajo (405 nm), pero los picos de emisión tienen un corrimiento al rojo de 7 nm en comparación con nuestros resultados.

La discrepancia entre nuestros resultados y la literatura (Tabla 11) podría atribuirse a la existencia de una dependencia de excitación de la emisión. Sin embargo, en la siguiente sección, mostramos que si bien la emisión de los fluoróforos contenidos en el exoesqueleto exhibieron una dependencia significativa de las longitudes de onda de excitación cuando se prueban en solución, en la fase condensada (la del exoesqueleto) la dependencia es insignificante. En tal caso, el rango de longitudes de onda de emisión pico reportadas en la literatura podría ser el resultado del uso de diferentes condiciones experimentales, dispositivos de detección e incertidumbres experimentales. En cualquier caso, si la longitud de onda

máxima es casi la misma para todas las especies de alacranes cuando están expuestas a los rayos UV en las mismas condiciones, tendríamos que concluir que dicho parámetro óptico difícilmente puede funcionar como un rasgo característico para la identificación de especies como fue sugerido previamente en la literatura [26].

Tabla 11 Picos de emisión reportados en la literatura para diferentes especies de alacranes.

Especie	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)	Ref.
<i>C. limpidus</i>	266	518	[37]
<i>C. vittatus</i>	360	490	[9]
<i>V. confusus</i>	395	500	[8]
<i>P. shulovi</i>	395	498	[8]
<i>P. becki</i>	390	501	[10]
<i>M. martensii</i>	400	490	[11]
Medido en seis especies con exoesqueletos característicos que van desde el color claro al oscuro.	405	~ 483	Este trabajo

3.4 Dependencia de la fluorescencia como función de la excitación

Los estudios de dependencia de excitación se realizaron en soluciones de fluoróforos extraídos del exoesqueleto, siguiendo el método descrito por Wankhede [49]. La Figura 3.7 muestra los espectros de absorción, excitación y emisión de soluciones de fluoróforos extraídos para el caso de *V. intermedius*. La caracterización presentada aquí es solo para un espécimen de tonalidad de color medio e intensidad de fluorescencia media, como una evaluación global de la dependencia de la fluorescencia con la excitación. Los resultados muestran un pico de absorción a 275 nm y un pico de excitación a 332 nm. Como podemos ver en la Figura 3.7, el pico de fluorescencia depende de la longitud de onda de excitación; el máximo de intensidad de emisión es de aproximadamente 424 nm para la excitación de 270-320 nm, pero para longitudes de onda más largas de excitación (330–400 nm) el pico de la fluorescencia se desplaza continuamente hacia el rojo hasta aproximadamente 478 nm. Los picos de excitación y emisión obtenidos en

nuestras soluciones son similares a los valores encontrados para soluciones de β -carbolina (375 y 445 nm, respectivamente) y 4-metil-7-hidroxicumarina (330 y 450 nm, respectivamente) que son los fluoróforos que se ha identificado que están presentes en el exoesqueleto de todos los alacranes [26-28, 48].

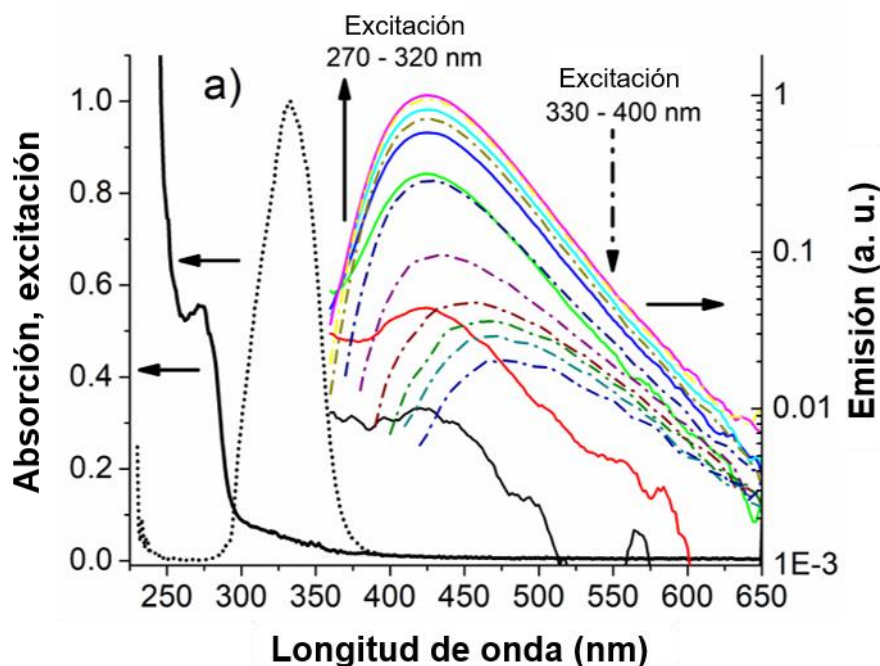


Fig. 3.7 Comparación de los espectros de excitación (líneas de puntos) y emisión (líneas de color) de la muestra *V. intermedius* medida a partir de la solución de moléculas extraídas. Los espectros de excitación se obtuvieron con detección en longitudes de onda de emisión máxima y etapas de excitación de 10 nm. Para este caso, el pico de emisión aumenta para la excitación en el rango de 270-320 nm y disminuye en el rango de 330 a 400 nm.

A diferencia de las soluciones, la longitud de onda de emisión máxima de los fluoróforos contenidos en el exoesqueleto no muestra una dependencia significativa de la excitación. La Figura 3.8 presenta los espectros de excitación medidos directamente en el exoesqueleto de la muestra, mostrando un pico a 400 nm; en este caso, la longitud de onda de emisión máxima exhibe variaciones mínimas para el rango de excitación 300-440 nm; tales variaciones no siguen una tendencia específica y por tanto se interpretan como errores experimentales intrínsecos. Sin embargo, hay una diferencia notable en los picos de emisión obtenidos de las

soluciones de extracción molecular y los del exoesqueleto. Es bien sabido que la emisión de cualquier fluoróforo puede variar sustancialmente de solución a la fase condensada (sólida). Por ejemplo, los cambios en el pico de emisión son el resultado de una combinación de diferentes procesos fotofísicos, como los efectos del filtro interno, las interacciones intermoleculares, la transferencia de energía resonante, la formación de agregados y otros [50]. El efecto de filtro interno, que es la reabsorción de fotones emitidos por otro fluoróforo cercano, parece estar excluido en los datos de la Figura 3.7, debido a la concentración muy diluida de la solución molecular preparada. Sin embargo, en el exoesqueleto del alacrán (fase condensada), no se puede despreciar la proximidad entre los fluoróforos y por tanto el efecto de filtro interno; véanse, por ejemplo, los resultados de un estudio previo de efectos internos en β -carbolina [51]. En este caso, el efecto interno conduciría a la autoabsorción del borde azul de emisión y, a su vez, producirá un desplazamiento hacia el rojo en el espectro de emisión. La alta concentración de los fluoróforos en la fase condensada también puede producir interacción intermolecular, es decir, mientras que en soluciones diluidas cada fluoróforo emite luz de forma independiente, en la fase condensada la proximidad permite interacciones intermoleculares que conducen a niveles excitados de energía más bajas (cambio de color rojo) [52]. Aunque estas son causas plausibles de las diferencias de espectros que se muestran en la Figura 3.8, la fotofísica detallada de fluoróforos en el exoesqueleto del alacrán para las diferentes especies requiere más investigación.

Aunque los espectros de emisión de los fluoróforos (β -carbolina y 4-metil-7-hidroxycumarina) contenidos en el exoesqueleto podrían ser independientes de la especie de alacrán y la longitud de onda de excitación, no está claro si la menor intensidad de fluorescencia de los alacranes oscuros se debe a una menor concentración de fluoróforos (la concentración de fluoróforos en el exoesqueleto podría generar una capacidad diferenciada de las especies para emitir fluorescencia) o se debe a una mayor absorbancia (menor reflectancia) en el exoesqueleto proporcionada por la concentración de pigmentos de melanina u otras moléculas no identificadas. Una mayor absorción de melanina u otros pigmentos puede disminuir la fluorescencia de dos maneras: la primera, al reducir la cantidad

de luz que puede excitar los fluoróforos y la segundo, por el efecto interno. Cabe destacar que la concentración de pigmentos que proporcionan color al exoesqueleto parece estar relacionada con el ecomorfotipo, como ya se señaló más arriba. Como un caso particular, debe resaltarse el hecho de que los alacranes troglomórfismos extremos, como los incluidos en la familia Typhlochactidae, se despigmentan y no tienen pigmentos de manera significativa, curiosamente, mantienen la fluorescencia de su cutícula [53].

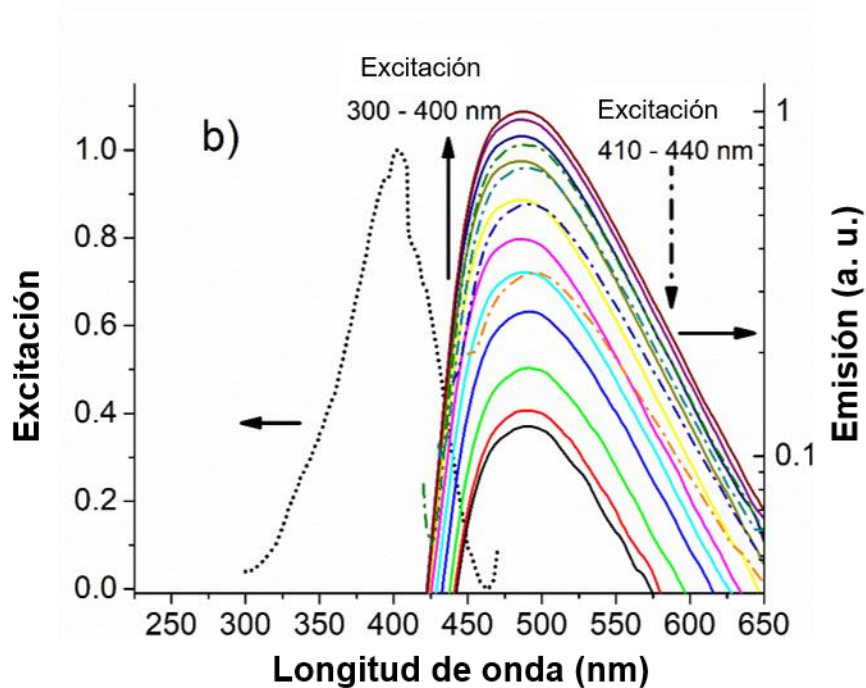


Fig. 3.8 Comparación de los espectros de excitación (líneas de puntos) y emisión (líneas de color) de la muestra *V. intermedius* medida a partir del exoesqueleto. Los espectros de excitación se obtuvieron con detección en longitudes de onda de emisión máxima y pasos de excitación de 10 nm. Para el caso del exoesqueleto el pico de emisión aumenta para la excitación en el rango de 300 a 400 nm y disminuye monótonicamente en el rango de 410-440 nm.

3.5 Conclusiones sobre fluorescencia en alacranes

Mediante el procesamiento de imágenes y las técnicas espectroscópicas de UV-Vis, se realizó un estudio comparativo de las propiedades de fluorescencia de 24 especies de alacranes. Este enfoque reveló fluorescencia heterogénea en el exoesqueleto con regiones de fluorescencia máxima en pedipalpos y segmentos metasomales. La intensidad de la fluorescencia se correlaciona lineal y positivamente con el color de los alacranes, cuanto más oscuro es el color, menor es la tasa de fluorescencia. No se detectaron diferencias significativas espectrales en la emisión de al menos seis especies caracterizadas de baja a alta intensidad de fluorescencia emitida y exoesqueletos que varían de color amarillo pálido a negro; esto nos lleva a suponer que los fluoróforos contenidos en el exoesqueleto son los mismos para todas las especies, independientemente del grupo taxonómico al que pertenecen, mientras que la intensidad emitida podría depender de otros pigmentos como la melanina u otras moléculas no identificadas y la concentración de fluoróforos en la cutícula. Nuestros resultados pueden usarse como punto de partida para establecer hipotéticamente que la heterogeneidad de la fluorescencia en el exoesqueleto de los alacranes puede ser el resultado de un proceso de esclerotización diferenciado, y la correlación entre la tonalidad del color y la intensidad de la fluorescencia puede implicar adaptaciones morfo-fisiológicas locales al sustrato en el que habitan los alacranes. En última instancia, todos estos parámetros asociados con la capacidad de emitir fluorescencia merecen una inspección más detallada y una mayor experimentación para afirmar escenarios evolutivos que crearon tales patrones.

Capítulo 4

Polarimetría en el exoesqueleto de alacranes

4.1 Antecedentes de estudios de polarimetría en insectos

En la naturaleza existen mariposas, aves o insectos que exhiben colores muy brillantes como resultado de algún fenómeno óptico producido por micro o nanoestructuras que pueden encontrarse en las superficies de sus alas o exoesqueletos [54, 7]. Las microestructuras dan como resultado reflexión selectiva y efectos de polarización [55]. En una gran variedad de casos esta coloración tiene una función sexual, como por ejemplo, en el caso de las coloridas plumas de las especies de aves del paraíso [56], o de selección natural donde los colores estructurales proporcionan formas de camuflaje en insectos [57, 58] o señales aposemáticas como es el caso del escarabajo *tigre* (*Cicindelinae*) [59]. Se han hecho diferentes estudios polarimétricos en algunos insectos, con la finalidad de conocer la función biológica de polarizar la luz o generar reflexión selectiva de la luz que incide en sus cuerpos. Es conocido que gracias a la reflexión de Bragg algunos escarabajos pueden exhibir diferentes tonalidades, como sucede con el *Plusiotis boucardi* con una doble coloración verde-amarillo [60] (Figura 4.1), el *Chalcothea smaragdina* con un tono verde metálico [61], tonos en verde, rojo y azul en el escarabajo *Cetonia aurata* [62, 63]. La reflexión selectiva se debe a la presencia de microestructuras quirales con regiones helicoidales (Figura 4.2), de lo cual se desprende que algunos especímenes tengan diferentes tonos de reflexión en función del paso (o frecuencia) del helicoide [60-63], esta estructura helicoidal también es la responsable de polarizar la luz en forma circular izquierda [60-68]. En algunos escarabajos, por ejemplo, la exocutícula la conforman estructuras

pentagonales con radios entre $10\mu\text{m}$ y $15\mu\text{m}$ [69, 70] (Figura 4.3) acomodados en capas helicoidales capaces de generar despolarización y diatenuación parcial de la luz [69]. Se ha demostrado que en algunos escarabajos a un ángulo de incidencia de 20° el grado de polarización en función de la longitud de onda es idéntico al espectro de reflexión [68].

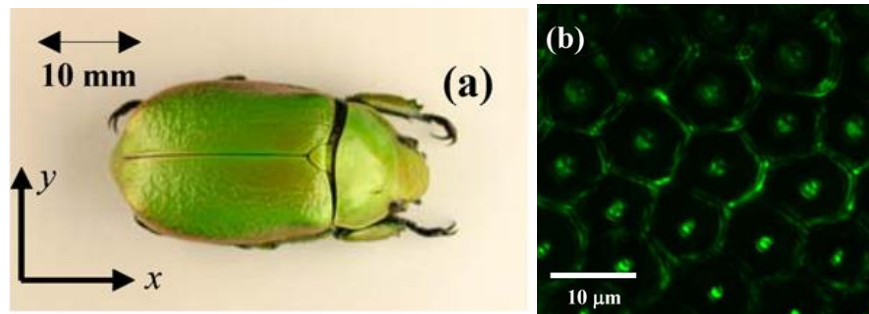


Fig. 4.1 (a) Imagen de un espécimen *P. boucardi*, donde se puede observar una coloración entre verde y amarillo. (b) imagen tomada con un microscopio confocal con iluminación a 543 nm del exoesqueleto del *P. boucardi*. Las imágenes fueron tomadas de [60].

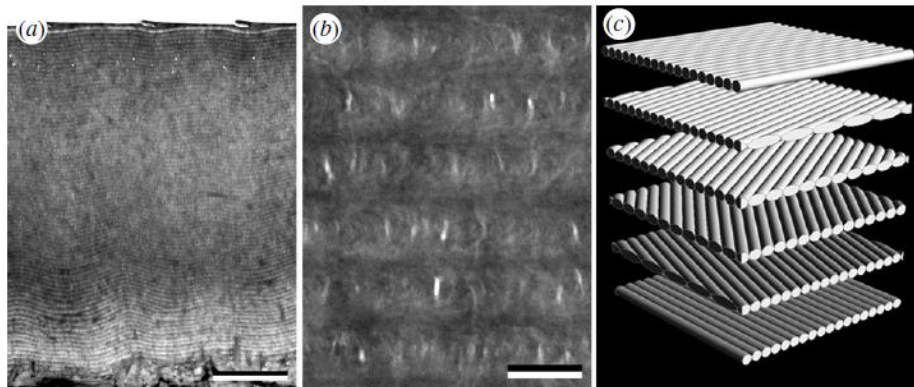


Fig. 4.2 (a) Sección transversal de la cutícula dorsal de *C. smaragdina* tomada mediante TEM (la barra de escala mostrada corresponde a $3\mu\text{m}$), (b) Sección transversal de la cutícula dorsal de *C. smaragdina* tomada mediante TEM con aumento (la barra de escala mostrada corresponde a 2 nm), (c) Esquema de la morfología helicoidal dentro del exocutículo de *C. smaragdina*. Imágenes tomadas de [61].

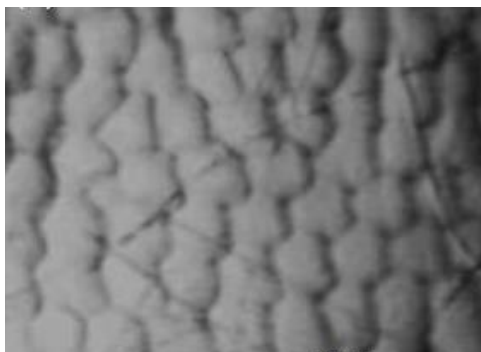


Fig. 4.3 Micrografía óptica de *C. mutabilis* donde se pueden observar estructuras pentagonales en forma de mosaico. Imagen tomada de [65].

La reflexión selectiva en los insectos es un fenómeno que se ha estudiado de manera relativamente abundante, no solo desde la perspectiva de ciencia básica, sino también porque tiene aplicaciones prácticas desde la perspectiva del biomimetismo; por ello es importante poder caracterizarla en base al formalismo matemático de la polarimetría. Por ejemplo, los exoesqueletos de los escarabajos *C. aurata* y *P. cuprea* [64] en el rango infrarrojo cercano se comportan como un espejo de tal suerte que los valores de la diagonal de la Matriz de Mueller asociada a dichos exoesqueletos son igual a $[1, 1, -1, -1]$. En secciones posteriores se hará una descripción de los aspectos básicos del formalismo de las matrices de Mueller y varias métricas útiles en el estudio de las propiedades de reflexión selectiva y polarimétricas en insectos. Finalmente, debe señalarse también que existe todo un campo del conocimiento relacionado con la visión de luz polarizada en el reino animal que es un mecanismo de orientación. La sensibilidad a la luz polarizada es bien conocida en insectos, en peces, aves, anfibios y reptiles [67]. En el contexto de los ejemplos aquí citados sobre reflexión polarizada y la sensibilidad de algunos animales a detectarla es que surgió la motivación para que en este trabajo de tesis se estudiara las propiedades polarimétricas del exoesqueleto de los alacranes.

En la actualidad no existen trabajos de investigación relacionados con la polarización de la luz en el exoesqueleto de los alacranes. Aunque en primera instancia no se aprecia que el exoesqueleto de los alacranes este constituido por microestructuras regulares que le confieran apariencia de color específicas o

reflexión selectiva como en el caso de algunos insectos, sí sabemos que en función del hábitat los alacranes pueden mostrar una capacidad diferenciada de biofluorescencia, así como un color característico, como se discutió previamente. Lo anterior dio pauta a realizar este trabajo de investigación, en el cual se aborda el estudio de la respuesta polarimétrica por reflexión en el visible (635 nm) y la respuesta polarimétrica de la emisión de fluorescencia en el exoesqueleto. Para ello se seleccionaron 4 especies de alacranes con diferente color de su exoesqueleto. Desde la perspectiva de la polarimetría, el estudio se realizó mediante el análisis de la matriz de Mueller, la cual se obtuvo mediante el procesamiento digital de imágenes. En las siguientes secciones se presenta un breve bosquejo del formalismo utilizado en polarimetría para diferentes métricas que permiten conocer el efecto de polarización, en este caso por parte del exoesqueleto de los alacranes y los resultados obtenidos con la metodología respectiva para este tipo de estudios.

4.2 Tipos de Luz Polarizada

Todo el tratamiento matemático presentado en esta sección se basó en el libro *“Polarized light, Dennis H. Goldstein”* [69]. La luz polarizada es una propiedad de las ondas electromagnéticas, que se define como la descripción de alguna dirección particular de la vibración del campo eléctrico; existen diferentes tipos de polarización dependiendo de la dirección de propagación, por ejemplo la polarización lineal es la vibración del campo eléctrico en una sola dirección del espacio, como se muestra en la Figura 4.4a. La polarización lineal es el caso extremo de un continuo de posibles polarizaciones, llamadas estados, donde la polarización circular, ilustrada en la Figura 4.4b, es el otro extremo. En este caso, la gráfica de la punta del vector de campo eléctrico, durante un ciclo, da como resultado una hélice. La polarización elíptica es un término general que se puede usar para describir cualquier estado en el continuo, desde lineal hasta circular.

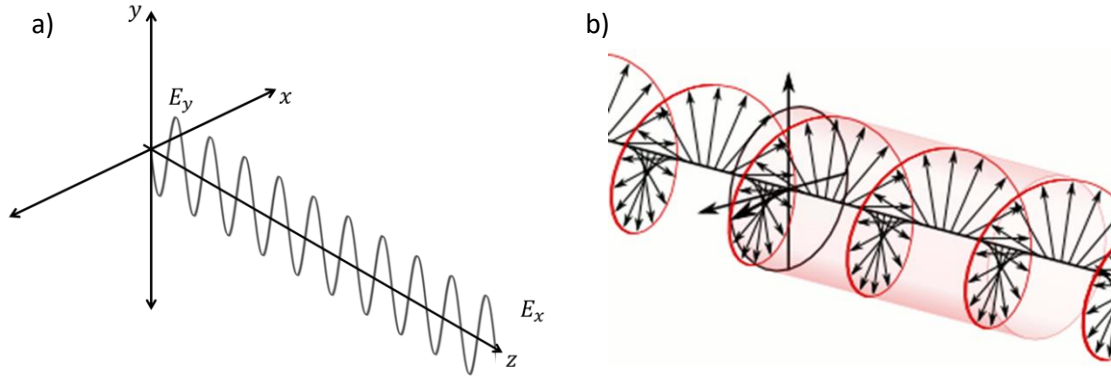


Fig. 4.4 Propagación del campo eléctrico mediante una a) polarización lineal, b) polarización circular.

4.3 Derivación de los parámetros de Stokes

Para describir los estados de polarización de la luz es necesario establecer algunos parámetros. Si consideramos un par de ondas electromagnéticas planas ortogonales entre sí, en un punto del espacio $z = 0$, entonces sus campos pueden ser expresados como:

$$E_x(t) = E_{0x}(t) \cos[\omega t + \delta_x(t)] \quad 4.1a$$

$$E_y(t) = E_{0y}(t) \cos[\omega t + \delta_y(t)] \quad 4.1b$$

Donde δ_x y δ_y son fases relativas de cada campo. Combinando ambas ecuaciones tenemos que para el caso de radiación monocromática las amplitudes y las fases son constantes en cualquier instante, entonces para un instante "t" tenemos

$$\frac{E_x^2(t)}{E_{0x}^2} + \frac{E_y^2(t)}{E_{0y}^2} - \frac{2E_x(t)E_y(t)}{E_{0x}E_{0y}} \cos \delta = \sin^2 \delta \quad 4.2$$

Donde $\delta(t) = \delta_y(t) - \delta_x(t)$. A fin de representar esta ecuación en términos de observables del campo óptico, tomamos el promedio en el tiempo de

observación. Debido a que este es un periodo muy largo con respecto a una oscilación del campo, podemos tomarlo como infinito. Pero en vista de la periodicidad de $E_x(t)$ y $E_y(t)$, solo necesitamos el promedio en un periodo T , entonces podemos reescribir la ecuación como

$$\frac{\langle E_x^2(t) \rangle}{E_{0x}^2} + \frac{\langle E_y^2(t) \rangle}{E_{0y}^2} - \frac{2\langle E_x(t)E_y(t) \rangle}{E_{0x}E_{0y}} \cos \delta = \sin^2 \delta \quad 4.3$$

Donde

$$\langle E_i(t)E_j(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T E_i(t)E_j(t) dt \quad 4.4$$

Utilizando la definición anterior podemos calcular cada uno de los términos de la ecuación 4.4, obteniendo

$$\langle E_x^2(t) \rangle = \frac{1}{2} E_{0x}^2 \quad 4.5$$

$$\langle E_y^2(t) \rangle = \frac{1}{2} E_{0y}^2 \quad 4.6$$

$$\langle E_x(t)E_y(t) \rangle = \frac{1}{2} E_{0x}E_{0y} \cos \delta \quad 4.7$$

Multiplicando la ecuación 4.3 por el término $4E_{0x}^2E_{0y}^2$, obtenemos

$$\begin{aligned} 4E_{0y}^2\langle E_x^2(t) \rangle + 4E_{0x}^2\langle E_y^2(t) \rangle - 8E_{0x}E_{0y}\langle E_x(t)E_y(t) \rangle \cos \delta \\ = (2E_{0x}E_{0y} \sin \delta)^2 \end{aligned} \quad 4.8$$

Sustituyendo las ecuaciones 4.5 – 4.7 en la ecuación 4.8, tenemos

$$2E_{0x}^2E_{0y}^2 + 2E_{0x}^2E_{0y}^2 - (2E_{0x}E_{0y} \cos \delta)^2 = (2E_{0x}E_{0y} \sin \delta)^2 \quad 4.9$$

Completando los trinomios cuadrados perfectos y reescribiendo

$$(E_{0x}^2 + E_{0y}^2)^2 - (E_{0x}^2 - E_{0y}^2)^2 - (2E_{0x}E_{0y} \cos \delta)^2 = (2E_{0x}E_{0y} \sin \delta)^2 \quad 4.10$$

Redefiniendo cada uno de los términos de la ecuación 4.10

$$S_0 = E_{0x}^2 + E_{0y}^2 \quad 4.11a$$

$$S_1 = E_{0x}^2 - E_{0y}^2 \quad 4.11b$$

$$S_2 = 2E_{0x}E_{0y} \cos \delta \quad 4.11c$$

$$S_3 = 2E_{0x}E_{0y} \sin \delta \quad 4.11d$$

Donde

$$S_0^2 = S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 \quad 4.12$$

Las ecuaciones obtenidas 4.11 (a - d) son conocidas como los *parámetros de polarización de Stokes* para una onda plana, de tal forma que la ecuación 4.12 se cumple solo para luz monocromática y totalmente polarizada. Los parámetros de Stokes son cantidades reales y que, a su vez, son los observables de la elipse de polarización y, con esto, del campo de polarización. El primer parámetro de Stokes S_0 , es la intensidad total del haz de luz. El parámetro S_1 , describe la cantidad de luz polarizada linealmente en dirección horizontal (si es positivo) o vertical (si es negativo), el parámetro S_2 describe la cantidad de luz polarizada linealmente a +45 o -45, medidos respecto al plano horizontal, y el parámetro S_3 describe la cantidad de luz circularmente polarizada a la derecha (si es positivo) o izquierda (si es negativo) contenida en el haz.

4.4 Vector de Stokes

Reescribiendo los parámetros de Stokes en forma de vector columna tenemos

$$\mathbf{s} = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} E_{0x}^2 + E_{0y}^2 \\ E_{0x}^2 - E_{0y}^2 \\ 2E_{0x}E_{0y} \cos \delta \\ 2E_{0x}E_{0y} \sin \delta \end{pmatrix} \quad 4.13$$

La ecuación 4.13 es conocida como el vector de Stokes para una onda plana. A partir de esta ecuación se pueden encontrar los vectores de Stokes, que representan los estados de polarización de la luz.

4.4.1 Luz lineal polarizada horizontalmente

Para el caso en el que $E_{0y} = 0$

$$\mathbf{s} = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad 4.14$$

Donde $I_0 = E_{0x}^2$ representa la intensidad total. La ecuación 4.14 es definida como el vector de Stokes para la luz lineal polarizada horizontalmente.

4.4.2 Luz lineal polarizada verticalmente

Para el caso en el que $E_{0x} = 0$

$$\mathbf{s} = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad 4.15$$

Donde $I_0 = E_{0y}^2$ representa la intensidad total. La ecuación 4.15 es definida como el vector de Stokes para la luz lineal polarizada verticalmente.

4.4.3 Luz lineal polarizada a $+45^\circ$

Para el caso en el que $E_{0x} = E_{0y} = E_0$ y $\delta = 0$

$$\mathbf{S} = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad 4.16$$

Donde $I_0 = 2E_0^2$. La ecuación 4.16 es definida como el vector de Stokes para la luz lineal polarizada a 45° .

4.4.4 Luz lineal polarizada a -45°

Para el caso en el que $E_{0x} = E_{0y} = E_0$ y $\delta = 180^\circ$

$$\mathbf{S} = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad 4.17$$

Donde $I_0 = 2E_0^2$. La ecuación 4.17 es definida como el vector de Stokes para la luz lineal polarizada a -45° .

4.4.5 Luz polarizada circularmente a la derecha

Para el caso en el que $E_{0x} = E_{0y} = E_0$ y $\delta = 90^\circ$

$$\mathbf{S} = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix} \quad 4.18$$

Donde $I_0 = 2E_0^2$. La ecuación 4.18 es definida como el vector de Stokes para la luz polarizada circularmente a la derecha.

4.4.6 Luz polarizada circularmente a la izquierda

Para el caso en el que $E_{0x} = E_{0y} = E_0$ y $\delta = -90^\circ$

$$\mathbf{S} = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{pmatrix} \quad 4.19$$

Donde $I_0 = 2E_0^2$. La ecuación 4.19 es definida como el vector de Stokes para la luz polarizada circularmente a la izquierda.

4.5 Matriz de Mueller (interacción luz-materia)

Si consideramos un elemento óptico capaz de cambiar el estado de polarización de un haz incidente, es deseable encontrar la representación matricial de los parámetros de Stokes, los cuales son una herramienta matemática muy poderosa para tratar esta interacción. En la Figura 4.5, se muestra un haz incidente, el cual interactúa con un elemento polarizador obteniendo un haz emergente por reflexión.

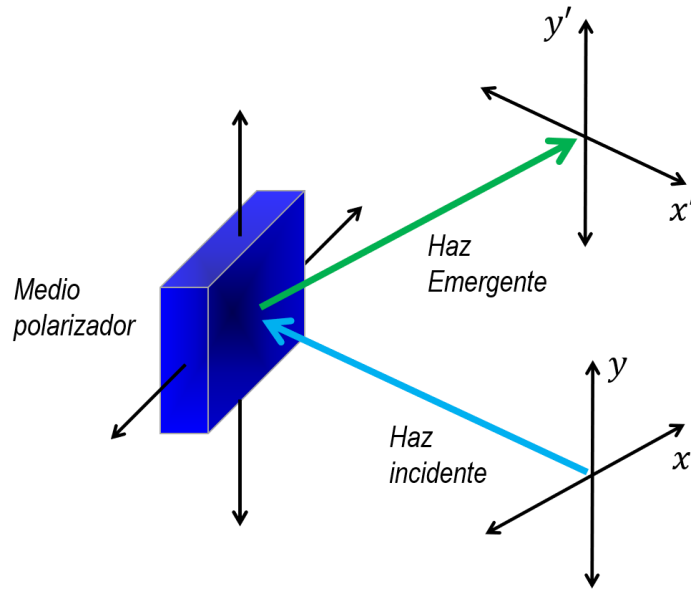


Fig. 4.5 Diagrama esquemático donde se muestra la incidencia de un haz de luz sobre un medio polarizador, obteniendo un haz emergente por reflexión.

El haz incidente se caracteriza por sus parámetros de Stokes S_i , donde $i = 0, 1, 2, 3$. El haz polarizado incidente interactúa con el medio de polarización, y el haz emergente se caracteriza por un nuevo conjunto de parámetros de Stokes S'_i . Ahora suponemos que S'_i puede expresarse como una combinación lineal de los cuatro parámetros de Stokes del haz incidente, de esta forma obtenemos las relaciones

$$S'_0 = m_{00}S_0 + m_{01}S_1 + m_{02}S_2 + m_{03}S_3 \quad 4.20a$$

$$S'_1 = m_{10}S_0 + m_{11}S_1 + m_{12}S_2 + m_{13}S_3 \quad 4.20b$$

$$S'_2 = m_{20}S_0 + m_{21}S_1 + m_{22}S_2 + m_{23}S_3 \quad 4.20c$$

$$S'_3 = m_{30}S_0 + m_{31}S_1 + m_{32}S_2 + m_{33}S_3 \quad 4.20d$$

Escribiendo las ecuaciones anteriores en forma matricial

$$S' = MS \quad 4.21a$$

$$\begin{pmatrix} S'_0 \\ S'_1 \\ S'_2 \\ S'_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & m_{03} \\ m_{10} & m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{20} & m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{30} & m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} \quad 4.21b$$

Donde S y S' son los vectores de Stokes y M es una matriz 4×4 conocida como matriz de Mueller, de elementos reales. La matriz de Mueller es de gran importancia, ya que mediante sus 16 términos se puede describir la respuesta polarimétrica de cualquier material óptico a un haz de luz polarizado.

En la interacción de un haz de luz con un medio material, el estado de polarización del haz incidente casi siempre cambia, este cambio del estado de polarización incidente se puede manifestar en diferentes formas, por ejemplo: El estado de polarización puede ser modificado cambiando las amplitudes de los componentes de la luz; cambiando la fase relativa entre los componentes ortogonales; cambiando la dirección de los componentes del campo ortogonal o transfiriendo energía de estados polarizados al estado no polarizado. Un elemento óptico que cambia las amplitudes ortogonales de manera desigual se llama *diatenuador* si absorbe la luz. Cabe señalar que la diatenuación, el retardo y la despolarización son las tres propiedades fundamentales de un elemento de polarización que están codificadas dentro de la matriz de Mueller. La rotación puede ocurrir a través de una rotación física o un cambio de fase, pero esencialmente resulta en una transformación de coordenadas. La rotación no es una propiedad que se pueda extraer de una matriz experimental de Mueller única, como lo puede ser la diatenuación, el retardo y la despolarización.

4.5.1 Matriz de Mueller para un polarizador lineal

Un polarizador lineal es considerado como un diatenuador, ya que absorbe las componentes del campo eléctrico en una dirección (eje de absorción), mientras que permite el paso de la luz en la dirección perpendicular a la primera (eje de transmisión). Si las componentes ortogonales del haz incidente se atenúan por

igual, entonces el polarizador es tratado como un filtro de densidad neutra. En la Figura 4.6, se muestra un haz polarizado incidente sobre un polarizador junto con el haz emergente; las componentes del haz incidente están representadas por E_x y E_y . Después de que el haz emerge del polarizador, los componentes son E'_x y E'_y , estas componentes de campo están relacionadas con las componentes originales mediante factores de atenuación p_x y p_y :

$$E'_x = p_x E_x \quad 0 \leq p_x \leq 1 \quad 4.22a$$

$$E'_y = p_y E_y \quad 0 \leq p_y \leq 1 \quad 4.22b$$

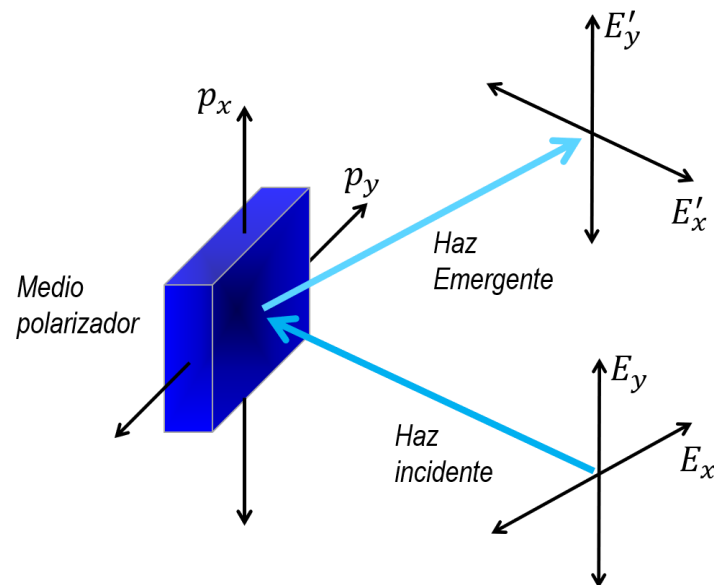


Fig. 4.6 Diagrama esquemático donde se muestra la incidencia de un haz de luz sobre un medio polarizador que atenúa en un factor p_x y p_y las componentes ortogonales del haz incidente, obteniendo un haz emergente atenuado por reflexión.

Entonces los parámetros de Stokes para un haz incidente son:

$$S_0 = E_x E_x^* + E_y E_y^* \quad 4.23a$$

$$S_1 = E_x E_x^* - E_y E_y^* \quad 4.23b$$

$$S_2 = E_x E_y^* + E_y E_x^* \quad 4.23c$$

$$S_3 = i(E_x E_y^* - E_y E_x^*) \quad 4.23d$$

Y para el haz emergente:

$$S'_0 = E'_x E_x'^* + E'_y E_y'^* \quad 4.24a$$

$$S'_1 = E'_x E_x'^* - E'_y E_y'^* \quad 4.24b$$

$$S'_2 = E'_x E_y'^* + E'_y E_x'^* \quad 4.24c$$

$$S'_3 = i(E'_x E_y'^* - E'_y E_x'^*) \quad 4.24d$$

Sustituyendo las ecuaciones 4.22a y 4.22b en las ecuaciones 4.23 (a - d) y usando las ecuaciones 4.24 (a - d), se obtiene

$$\begin{pmatrix} S'_0 \\ S'_1 \\ S'_2 \\ S'_3 \end{pmatrix} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} p_x^2 + p_y^2 & p_x^2 - p_y^2 & 0 & 0 \\ p_x^2 - p_y^2 & p_x^2 + p_y^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2p_x p_y & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2p_x p_y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} \quad 4.25$$

Donde

$$\mathbf{M} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} p_x^2 + p_y^2 & p_x^2 - p_y^2 & 0 & 0 \\ p_x^2 - p_y^2 & p_x^2 + p_y^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2p_x p_y & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2p_x p_y \end{pmatrix} \quad 0 \leq p_{x,y} \leq 1 \quad 4.26$$

La ecuación 4.26 es conocida como la matriz de Mueller para un polarizador lineal con índices de atenuación p_x y p_y , donde las cantidades p_x^2 y p_y^2 , son cantidades medibles interpretadas como intensidad. Realizando un análisis trigonométrico y tomando $p^2 = p_x^2 + p_y^2$ como la intensidad total de la luz, entonces se pueden escribir las componentes de p en coordenadas polares como: $p_x = p \cos \gamma$ y $p_y = p \sin \gamma$, de esta forma se puede describir la ecuación 4.26 de una manera más general como:

$$\mathbf{M} = \frac{p^2}{2} \begin{pmatrix} 1 & \cos 2\gamma & 0 & 0 \\ \cos 2\gamma & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \sin 2\gamma & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \sin 2\gamma \end{pmatrix} \quad 4.27$$

Donde $0 \leq \gamma \leq 90^\circ$. Para un polarizador lineal horizontal $\gamma = 0$, y para un polarizador lineal vertical $\gamma = 90^\circ$.

4.5.2 Matriz de Mueller para un retardador

Un retardador es un elemento óptico polarizador que cambia la fase del haz incidente (Figura 4.7). Los retardadores introducen un cambio de fase de φ entre las componentes ortogonales del campo eléctrico incidente. Por conveniencia matemática, este cambio de fase φ se divide equitativamente entre las direcciones ortogonales, por lo tanto, para un desplazamiento de fase a lo largo del eje x, se considera un desfase de $\varphi/2$, y para un desplazamiento a lo largo del eje y se considera un desfase de $-\varphi/2$, estos ejes en el retardador se denominan ejes rápido y lento, respectivamente.

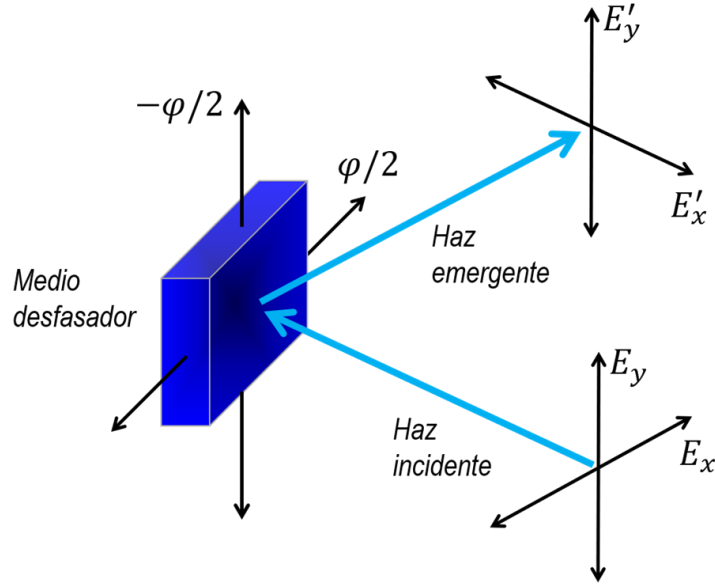


Fig. 4.7 Diagrama esquemático donde se muestra la incidencia de un haz de luz sobre un medio retardador o desfasador, obteniendo un haz emergente por reflexión con un desfasamiento de $\varphi/2$ en el eje "x" y con un desfasamiento de $-\varphi/2$ en el eje "y".

Retomando las componentes del haz emergente en un retardador tenemos:

$$E'_x(z, t) = e^{+i\varphi/2} E_x(z, t) \quad 4.28a$$

$$E'_y(z, t) = e^{-i\varphi/2} E_y(z, t) \quad 4.28b$$

Tomando las ecuaciones 4.23 (a - d) y 4.24 (a - d) y sustituyendo las ecuaciones 4.28a y 4.28b, se obtienen los parámetros de Stokes para un retardador

$$S'_0 = S_0 \quad 4.29a$$

$$S'_1 = S_1 \quad 4.29b$$

$$S'_2 = S_2 \cos \varphi + S_3 \sin \varphi \quad 4.29c$$

$$S'_3 = -S_2 \sin \varphi + S_3 \cos \varphi \quad 4.29d$$

Reescribiendo este resultado en forma matricial se obtiene la matriz de Mueller para un retardador

$$\mathbf{M} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \cos \varphi & \sin \varphi \\ 0 & 0 & -\sin \varphi & \cos \varphi \end{pmatrix} \quad 4.30$$

A partir de la ecuación 4.30 se pueden considerar dos casos, que son los más utilizados en polarización, el primero de ellos se obtiene cuando $\varphi = 90^\circ$, conocido como un retardador o desfasador de cuarto de onda, el cual genera un retraso de un cuarto de onda en las componentes ortogonales del campo eléctrico, mientras que el segundo caso corresponde a un polarizador de media onda, para $\varphi = 180^\circ$, donde ahora se genera un retraso de media onda respecto a las componentes ortogonales.

4.5.3 Matriz de Mueller para un rotador

Otra forma de obtener un cambio del estado de polarización es cuando al rotar un haz de luz por un elemento óptico, éste tiene la propiedad de rotar las componentes ortogonales del campo eléctrico, un determinado ángulo θ , como se muestra en la Figura 4.8.

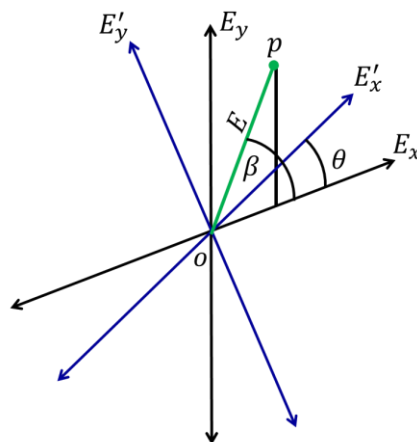


Fig. 4.8 Diagrama de la rotación de las componentes del campo eléctrico.

De la figura anterior se pueden escribir las componentes ortogonales del campo eléctrico incidente (E_x y E_y) y el campo eléctrico emergente (E'_x y E'_y), en términos del ángulo incidente (β) y el ángulo rotado (θ), obteniendo las siguientes ecuaciones

$$E_x = E \cos \beta \quad 4.31a$$

$$E_y = E \sin \beta \quad 4.31b$$

$$E'_x = E \cos(\beta - \theta) \quad 4.32a$$

$$E'_y = E \sin(\beta - \theta) \quad 4.32b$$

Reescribiendo las ecuaciones 4.32 (a y b) y sustituyendo en las ecuaciones 4.24 (a - b) y 4.25 (a - d), se obtiene la matriz de Mueller para un elemento rotador

$$\mathbf{M} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos 2\theta & \sin 2\theta & 0 \\ 0 & -\sin 2\theta & \cos 2\theta & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad 4.33$$

4.6 Métricas de despolarización de la luz

Hasta esta sección se ha considerado la forma en como interacciona la luz polarizada con la materia, y la representación matemática de dichas interacciones, de tal forma que se obtiene la matriz de Mueller y se define la información del medio que se puede extraer a partir de ella. La información que se puede obtener mediante los términos de la matriz de Mueller se hace mediante parámetros conocidos como métricas, en este sentido una métrica es una cantidad escalar, que nos proporciona la máxima información posible acerca de la naturaleza interna de un sistema despolarizante bajo estudio. Las métricas que se presentan son la Diatenuación, Polarización, el Grado de Polarización, el Índice de Despolarización y la métrica

$Q(M)$, siendo ésta última la más importante, ya que se ha demostrado que es la que aporta más información [70].

4.6.1 Parámetros de diatenuación $D(M)$

Considerando la relación de los parámetros de Stokes que nos proporcionan información sobre la intensidad total del haz de luz emergente en función del haz de luz incidente, tenemos la ecuación

$$S'_0 = m_{00}S_0 + m_{01}S_1 + m_{02}S_2 + m_{03}S_3 \quad 4.20a$$

De esta forma se puede observar que la intensidad total del haz de luz emergente depende solo de los elementos del primer renglón de la matriz de Mueller, de esta forma se define la diatenuación como [71]:

$$D(M) = \frac{\sqrt{m_{01}^2 + m_{02}^2 + m_{03}^2}}{m_{00}} \quad 4.34a$$

Donde

$$0 \leq D(M) \leq 1 \quad 4.34b$$

Una vez definida la métrica de diatenuación, se interpreta el significado físico de los valores posibles que puede tomar dicho parámetro. Cuando $D(M) = 0$, el medio es no diatenuante, esto significa que solo la intensidad total del haz incidente va a contribuir en una cantidad m_{00} a la intensidad total del haz emergente, por otro lado cuando $D(M) = 1$, implica un medio diatenuante, esto significa que la intensidad total del haz emergente tiene una contribución de los términos degenerados del haz incidente.

4.6.2 Parámetros de polarización P(M)

Retomando las ecuaciones 4.20 (a - d), podemos observar que los términos m_{i0} determinan qué cantidad de la intensidad total del haz incidente, va a contribuir a cada uno de los estados de polarización S'_0 del haz emergente, de tal forma que la métrica polarización o polarizancia se define como [72]:

$$P(M) = \frac{\sqrt{m_{10}^2 + m_{20}^2 + m_{30}^2}}{m_{00}} \quad 4.35a$$

Donde

$$0 \leq P(M) \leq 1 \quad 4.35b$$

Ahora definiendo el significado físico de los valores extremos de la polarización, podemos establecer que en el caso donde $P(M) = 0$, se tiene un medio que no polariza la luz, en tal caso solo el término m_{00} contribuye a la intensidad total del haz emergente, en el caso en que $P(M) = 1$, se tiene un medio que polariza la luz en un estado de polarización en particular, donde los términos de la primer columna de la matriz de Mueller (a excepción del término m_{00}) son los que contribuyen a la intensidad total del haz emergente.

4.6.3 Grado de polarización DoP

Retomemos nuevamente la ecuación

$$S' = MS \quad 4.21a$$

Donde S es un haz de luz que interacciona con un elemento óptico M y S' es el haz emergente después de la interacción con el elemento óptico, los elementos de S' son mediciones experimentales de la intensidad, el significado físico de los parámetros de Stokes para el haz emergente es el siguiente: el término S'_0

representa la intensidad total del haz emergente, mientras que S'_1 , S'_2 y S'_3 representan las intensidades del haz emergente polarizado de forma lineal vertical o horizontal, lineal a $\pm 45^\circ$ y circular derecha o izquierda, respectivamente. De esta forma si tomamos la siguiente ecuación

$$S_0'^2 \geq S_1'^2 + S_2'^2 + S_3'^2 \quad 4.36$$

Podemos decir que si la desigualdad se cumple el haz emergente estaría parcialmente polarizado, de otra forma si se cumple la igualdad entonces el haz estaría completamente polarizado, a partir de esta deducción podemos definir el grado de polarización DoP como

$$DoP = \frac{I_{pol}}{I_{tot}} = \frac{\sqrt{S_1'^2 + S_2'^2 + S_3'^2}}{S_0'} \quad 4.37a$$

Donde I_{pol} es la suma de las intensidades de las componentes de polarización e I_{tot} es la intensidad total del haz emergente. En este caso también se debe cumplir que

$$0 \leq DoP \leq 1 \quad 4.37b$$

La definición anterior es válida para cualquier vector de Stokes, en este caso particular trabajamos con matrices de Mueller, más no con parámetros de Stokes, por lo que ahora definiremos el DoP , pero en función de los elementos de la matriz de Mueller, quedando de la siguiente forma [72]:

$$DoP = \frac{\left[\sum_{j=1}^3 (m_{j0}S_0 + m_{j1}S_1 + m_{j2}S_2 + m_{j3}S_3)^2 \right]^{1/2}}{m_{00}S_0 + m_{01}S_1 + m_{02}S_2 + m_{03}S_3} \quad 4.38$$

Físicamente cuando $DoP = 0$, se tiene un haz totalmente despolarizado, y cuando $DoP = 1$, se tienen un haz totalmente polarizado, en cualquier otro caso donde $0 < DoP < 1$, se tiene un haz parcialmente polarizado.

4.6.4 Índice de despolarización, $DI(M)$

La métrica de despolarización proporciona información sobre la pérdida en el DoP , después de que un rayo de luz haya emergido de un medio óptico, con matriz de Mueller M . El índice de despolarización es definido como una consecuencia de la respuesta lineal de un medio óptico, como [72, 73]

$$DI(M) = \frac{[\sum_{j,k=0}^3 m_{jk}^2 - m_{00}^2]^{1/2}}{\sqrt{3}m_{00}} \quad 4.39a$$

Donde

$$0 \leq DI(M) \leq 1 \quad 4.39b$$

Nuevamente en este caso tomando los valores extremos y su significado físico tenemos que cuando $DI(M) = 0$, se considera un medio totalmente despolarizante, y cuando $DI(M) = 1$, se considera un medio no despolarizante, en cualquier otro caso $0 < DI(M) < 1$, se considera un medio parcialmente despolarizante.

4.6.5 Métrica $Q(M)$

La métrica $Q(M)$ es un valor escalar que proporciona información sobre el medio físico con el cual interactuará un haz de luz polarizado, y su relación funcional con el índice de despolarización, los parámetros de diatenuacion y polarizancia, así como sus límites físicos, definidos por [74]

$$0 \leq Q(M) = \frac{\sum_{j=1,k=0}^3 m_{jk}^2}{\sum_{k=0}^3 m_{0k}^2} = \frac{3[DI(M)]^2 - [D(M)]^2}{1 + [D(M)]^2} \quad 4.40$$

$$= \frac{\{\sum_{j,k=1}^3 m_{jk}^2\}/m_{00}^2 + [P(M)]^2}{1 + [D(M)]^2} \leq 3$$

Donde para un valor de $Q(M) = 0$ se tiene un sistema óptico totalmente despolarizante; $0 < Q(M) < 1$ se tiene un sistema óptico parcialmente despolarizante; si $1 \leq Q(M) < 3$ y $0 < DI(M) < 1$ el sistema es parcialmente despolarizante también, pero si $1 \leq Q(M) < 3$ y $DI(M) = 1$ el sistema es no despolarizante y totalmente diatenuante; por último si $Q(M) = 3$ se tiene un sistema óptico no despolarizante y no diatenuante [74].

4.6.6 Teorema de Gil-Bernabeu TC

Las matrices de Jones describen medios que no despolarizan y no absorben luz, toda matriz de Jones es describible mediante una matriz de Mueller, pero lo inverso no necesariamente es cierto, a menos que se trate de una matriz de Mueller-Jones. El teorema de Gil-Bernabeu establece que una condición necesaria y suficiente para que una matriz de Mueller sea derivable de una matriz de Jones, es que se cumpla la relación

$$Tr(M^T M) = 4m_{00}^2 \quad 4.41$$

Si se cumple la igualdad, entonces sería una condición necesaria y suficiente para que una matriz de Mueller se considere una matriz de Mueller-Jones.

4.6.7 Resumen esquematizado de las métricas polarimétricas.

Para tener una comparativa entre los diferentes valores que pueden tomar las métricas, en la Tabla 12 se muestra un resumen de los rangos que pueden adquirir las métricas ($D(M)$, $P(M)$, $DI(M)$ y $Q(M)$) y el significado físico que representan dichos valores.

Tabla 12 Resumen de las métricas utilizadas en este trabajo de investigación, considerando sus rangos numéricos y su interpretación.

Métrica	Rango físico	Interpretación
Diatenuacion: $D(M)$	$D(M) = 0$	Medio no diatenuante
	$D(M) = 1$	Medio diatenuante
Polarizancia $P(M)$	$P(M) = 0$	Medio no polarizante
	$P(M) = 1$	Medio polarizante
Índice de despolarización: $DI(M)$	$DI(M) = 0$	Medio totalmente despolarizante
	$0 < DI(M) < 1$	Medio parcialmente despolarizante
	$DI(M) = 1$	Medio no despolarizante
Métrica: $Q(M)$	$0 < Q(M) < 1$	Sistema parcialmente despolarizante
	$1 \leq Q(M) < 3$ y $0 < DI(M) < 1$	Sistema es parcialmente despolarizante
	$1 \leq Q(M) < 3$ y $DI(M) = 1$	Sistema no despolarizante y totalmente diatenuante
	$Q(M) = 3$	Sistema no despolarizante y no diatenuante
Teorema de Gil-Bernabeu	$TC = \frac{Tr(M^T M)}{4m_{00}^2}$	La matriz de Mueller se deriva en una matriz de Jones, las cuales no despolarizan la luz.

4.7 Ejemplos de matrices de Mueller

Para dar a conocer un ejemplo del tipo de matrices de Mueller que se obtienen al analizar polariméricamente el exoesqueleto de un insecto, se presenta el caso del escarabajo *C. mutabilis* [65]

$$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.553 & -0.120 & -0.755 \\ -0.457 & 0.138 & 0.359 & 0.282 \\ 0.398 & 0.144 & 0.302 & -0.242 \\ -0.654 & 0.394 & 0.058 & 0.190 \end{bmatrix}$$

Fig. 4.9 Ejemplo de una matriz de Mueller obtenida para el exoesqueleto del escarabajo *C. mutabilis*, donde mediante el cálculo de las métricas se concluye que este espécimen es parcialmente despolarizante y parcialmente diatenuante.

Estos resultados fueron obtenidos mediante elipsometría a un ángulo de 5° respecto a la normal. Aplicando las métricas escalares (Tabla 12) para la traza de la matriz de Mueller y usando el teorema de Gil-Bernabeu se obtiene un valor de 3.278, lo que indica que el sistema es parcialmente despolarizante, y que es consistente con la información proporcionada por el índice de despolarización ($DI(M) = 0.871$) y la métrica $Q(M) = 0.734$; a su vez la cutícula muestra ser parcialmente diatenuante ($D(M) = 0.944$) y parcialmente polarizante ($P(M) = 0.892$).

En otro estudio que no involucra tejido biológico, se calculó la matriz de Mueller en acero de superficie rugosa [75]. En la Figura 4.10 se puede observar la matriz obtenida, en donde aparte de los términos de la diagonal existen más términos diferentes de cero, al calcular las métricas se puede deducir que se trata de un material parcialmente despolarizante $Q(M) = 0.74$ y $DI(M) = 0.52$ (con un índice de polarización $P(M) = 0.01$), y parcialmente diatenuante $D(M) = 0.18$.

$$M = \begin{bmatrix} 1.000 & 0.1631 & -0.0322 & -0.0802 \\ 0.0083 & 0.4038 & 0.2555 & -0.2158 \\ -0.0026 & 0.4297 & -0.1376 & 0.2016 \\ 0.0116 & 0.0597 & -0.3175 & -0.3690 \end{bmatrix}$$

Fig. 4.10 Ejemplo de la matriz de Mueller obtenida para acero con una superficie rugosa. Mediante el cálculo de las métricas se concluye que este material es parcialmente despolarizante y parcialmente diatenuante.

En otro estudio polarimétrico en tejido biológico (hoja de árbol) [76], la matriz de Mueller obtenida es de la forma:

$$M = \begin{bmatrix} 1.000 & 0.0269 & -0.0021 & -0.0018 \\ 0.0101 & 0.3236 & -0.0087 & -0.0023 \\ 0.0008 & -0.0024 & -0.3276 & 0.0009 \\ 0.0026 & 0.0023 & -0.0029 & -0.2754 \end{bmatrix}$$

Fig. 4.11 Ejemplo de una matriz de Mueller obtenida para tejido biológico (hoja de un árbol). Mediante el cálculo de las métricas se concluye que este material es parcialmente despolarizante.

Se puede observar que en la matriz de la Figura 4.11 solo los elementos de la diagonal ($m_{00}, m_{11}, m_{22}, m_{33}$) son significativos en tanto que el resto pueden ser considerados como ceros; también se puede observar que el término m_{11} es positivo mientras que los términos m_{22} y m_{33} son negativos. Los resultados del cálculo de las métricas polarimétricas en la matriz de la Figura 4.11, muestran que la hoja de árbol presenta propiedades de un material parcialmente despolarizante $Q(M) = 0.29$ y $DI(M) = 0.31$ (con un índice de polarización $P(M) = 0.01$), y no diatenuante $D(M) = 0.03$.

4.8 Metodología para el estudio de polarimetría en alacranes

Para calcular experimentalmente cada uno de los 16 términos de la matriz de Mueller para el exoesqueleto de un alacrán, se consideró el siguiente arreglo óptico propuesto por Bickel & Bailey [77] para la medición de matrices de esparcimiento.

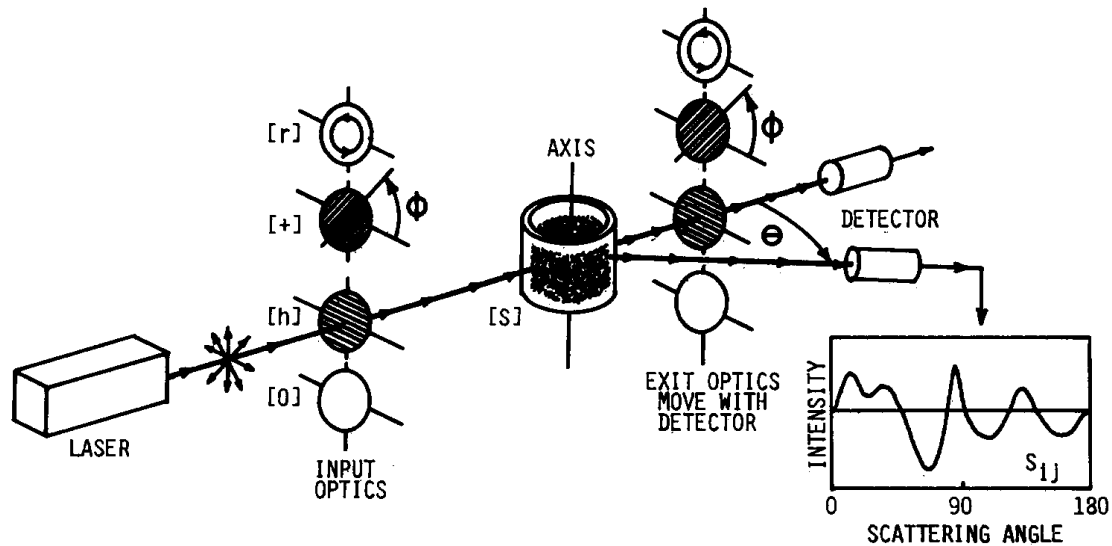


Fig. 4.12 Imagen del arreglo experimental utilizado para calcular la matriz de dispersión de un medio óptico, este arreglo está compuesto por una fuente de luz despolarizada, un polarizador ([r] = circular a la derecha, [+] = 45°, [h] = horizontal) y un medio no polarizador [0], un soporte para colocar la muestra y un detector. (Tomado de [77]).

Este arreglo (Figura 4.12) tiene una fuente de luz láser despolarizado, que se hace incidir sobre un elemento óptico polarizador (en el cual se pueden tener los seis estados de polarización y con incidencia directa [h] = horizontal, [v] = vertical, [+] = 45°, [-] = -45°, [r] = circular a la derecha, [l] = circular a la izquierda y [0] = elemento no polarizador, esta notación es la que originalmente se usa en el artículo citado; sin embargo, en la presente investigación la notación usada de aquí en adelante será p = horizontal, s = vertical, x = 45°, y = -45°, r = circular a la derecha y l = circular a la izquierda y 0 = elemento no polarizador) para así incidir después en la muestra con una polarización en particular. Continuando con la idea del funcionamiento del arreglo óptico mostrado en la Figura 4.12, parte del haz polarizado es transmitido por la muestra y otra parte es esparcido; el haz transmitido nuevamente se hace incidir sobre un elemento óptico polarizador y después llega a un detector que registra la intensidad del haz emergente. Para calcular los elementos de la matriz de Mueller se realizan combinaciones de las polarizaciones del haz incidente y el haz emergente. Analizando la configuración experimental de forma matemática se

obtiene la relación que guarda cada una de las combinaciones de los seis estados de polarización (p, s, x, y, r y l) con los 16 términos de la matriz de Mueller. Los cálculos se realizan de la siguiente forma: consideremos que se hace incidir un estado de polarización x sobre la muestra, esto lo podemos representar de la siguiente forma matricial:

$$\begin{pmatrix} S_{00} & S_{01} & S_{02} & S_{03} \\ S_{10} & S_{11} & S_{12} & S_{13} \\ S_{20} & S_{21} & S_{22} & S_{23} \\ S_{30} & S_{31} & S_{32} & S_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} S_{00} + S_{02} \\ S_{10} + S_{12} \\ S_{20} + S_{22} \\ S_{30} + S_{32} \end{pmatrix} \quad 4.41$$

Ahora al haz emergente de la muestra se le hace pasar por un analizador de polarización específico, por ejemplo: r , lo cual podemos escribir de la siguiente forma

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_{00} + S_{02} \\ S_{10} + S_{12} \\ S_{20} + S_{22} \\ S_{30} + S_{32} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} (S_{00} + S_{02}) + (S_{30} + S_{32}) \\ 0 \\ 0 \\ (S_{00} + S_{02}) + (S_{30} + S_{32}) \end{pmatrix} \quad 4.42$$

Este vector de Stokes resultante representa el haz emergente de todo el sistema óptico que llega al detector, el detector solo registra intensidades, por lo tanto solo se considera el primer término del vector de Stokes emergente, esto es

$$I_{xr} = S_{00} + S_{02} + S_{30} + S_{32} \quad 4.43$$

En la expresión anterior se sobreentiende que I_{xr} denota la intensidad que registra el detector a partir de que en la muestra incidió un estado de polarización lineal a $+45^\circ$ (x) y como analizador después de la muestra se usa un elemento que polariza como circular derecho (r). De esta forma si realizamos el análisis de las 36 combinaciones posibles entre los 6 estados de polarización incidentes y analizados tendríamos las siguientes intensidades en función de los términos de la matriz de Mueller.

S_{11} * *	S_{12} ↔ *	S_{13} / *	S_{14} ○ *
* * S_{11}	↔ * $S_{11} + S_{12}$ ↑ * $S_{11} - S_{12}$	/ * $S_{11} + S_{13}$ \ * $S_{11} - S_{13}$	○ * $S_{11} + S_{14}$ ○ * $S_{11} - S_{14}$
S_{21} * ↔	S_{22} ↔ ↔	S_{23} / ↔	S_{24} ○ ↔
* ↔ $S_{11} + S_{21}$ * ↓ $S_{11} - S_{21}$	↔ ↔ $S_{11} + S_{12} + S_{21} + S_{22}$ ↔ ↑ $S_{11} + S_{12} - S_{21} - S_{22}$ ↓ ↔ $S_{11} - S_{12} + S_{21} - S_{22}$ ↓ ↓ $S_{11} - S_{12} - S_{21} + S_{22}$	/ ↔ $S_{11} + S_{13} + S_{21} + S_{23}$ / ↑ $S_{11} + S_{13} - S_{21} - S_{23}$ \ ↓ $S_{11} - S_{13} + S_{21} - S_{23}$ \ ↑ $S_{11} - S_{13} - S_{21} + S_{23}$	○ ↔ $S_{11} + S_{14} + S_{21} + S_{24}$ ○ ↑ $S_{11} + S_{14} - S_{21} - S_{24}$ ○ ↓ $S_{11} - S_{14} + S_{21} - S_{24}$ ○ ↓ $S_{11} - S_{14} - S_{21} + S_{24}$
S_{31} * /	S_{32} ↔ /	S_{33} / /	S_{34} ○ /
* / $S_{11} + S_{31}$ * \ $S_{11} - S_{31}$	↔ / $S_{11} + S_{12} + S_{31} + S_{32}$ ↔ \ $S_{11} + S_{12} - S_{31} - S_{32}$ ↓ / $S_{11} - S_{12} + S_{31} - S_{32}$ ↓ \ $S_{11} - S_{12} - S_{31} + S_{32}$	/ / $S_{11} + S_{13} + S_{31} + S_{33}$ / \ $S_{11} + S_{13} - S_{31} - S_{33}$ \ / $S_{11} - S_{13} + S_{31} - S_{33}$ \ \ $S_{11} - S_{13} - S_{31} + S_{33}$	○ / $S_{11} + S_{14} + S_{31} + S_{34}$ ○ \ $S_{11} + S_{14} - S_{31} - S_{34}$ ○ / $S_{11} - S_{14} + S_{31} - S_{34}$ ○ \ $S_{11} - S_{14} - S_{31} + S_{34}$
S_{41} * ○	S_{42} ↔ ○	S_{43} / ○	S_{44} ○ ○
* ○ $S_{11} + S_{41}$ * ○ $S_{11} - S_{41}$	↔ ○ $S_{11} + S_{12} + S_{41} + S_{42}$ ↔ ↓ ○ $S_{11} + S_{12} - S_{41} - S_{42}$ ↑ ○ $S_{11} - S_{12} + S_{41} - S_{42}$ ↑ ○ $S_{11} - S_{12} - S_{41} + S_{42}$	/ ○ $S_{11} + S_{13} + S_{41} + S_{43}$ / ↓ ○ $S_{11} + S_{13} - S_{41} - S_{43}$ \ ↓ ○ $S_{11} - S_{13} + S_{41} - S_{43}$ \ ↑ ○ $S_{11} - S_{13} - S_{41} + S_{43}$	○ ○ $S_{11} + S_{14} + S_{41} + S_{44}$ ○ ↓ ○ $S_{11} + S_{14} - S_{41} - S_{44}$ ○ ↓ ○ $S_{11} - S_{14} + S_{41} - S_{44}$ ○ ↓ ○ $S_{11} - S_{14} - S_{41} + S_{44}$

Fig. 4.13 Relaciones obtenidas para el cálculo de la matriz de Mueller (Tomado de [77]). Los encabezados de las columnas de esta figura están relacionados con los términos de la matriz de Mueller y que tipo de polarización está relacionada con cada término de la matriz, así por ejemplo, S_{11} esta relacionado con un haz incidente-reflejado despolarizado, S_{22} esta relacionado con un haz incidente-reflejado polarizado solo de forma horizontal y vertical y así sucesivamente. En cuanto a los renglones esta tabla nos indica la combinación de los estados de polarización involucrados en el cálculo de cada término de la matriz de Mueller.

Ahora tomando, por ejemplo, las intensidades de las combinaciones I_{pp} , I_{sp} , I_{ps} y I_{ss} , tenemos

$$I_{pp} = S_{11} + S_{12} + S_{21} + S_{22} \quad 4.44a$$

$$I_{ps} = S_{11} + S_{12} - S_{21} - S_{22} \quad 4.44b$$

$$I_{sp} = S_{11} - S_{12} + S_{21} - S_{22} \quad 4.44c$$

$$I_{ss} = S_{11} - S_{12} - S_{21} + S_{22} \quad 4.44d$$

De los cuales resulta un sistema de cuatro ecuaciones con cuatro incógnitas, que se puede resolver para determinar los términos de la matriz de Mueller en función de las intensidades obtenidas con el detector, generando las siguientes ecuaciones

$$S_{11} = I_{pp} + I_{ps} + I_{sp} + I_{ss} \quad 4.45a$$

$$S_{12} = I_{pp} + I_{ps} - I_{sp} - I_{ss} \quad 4.45b$$

$$S_{21} = I_{pp} - I_{ps} + I_{sp} - I_{ss} \quad 4.45c$$

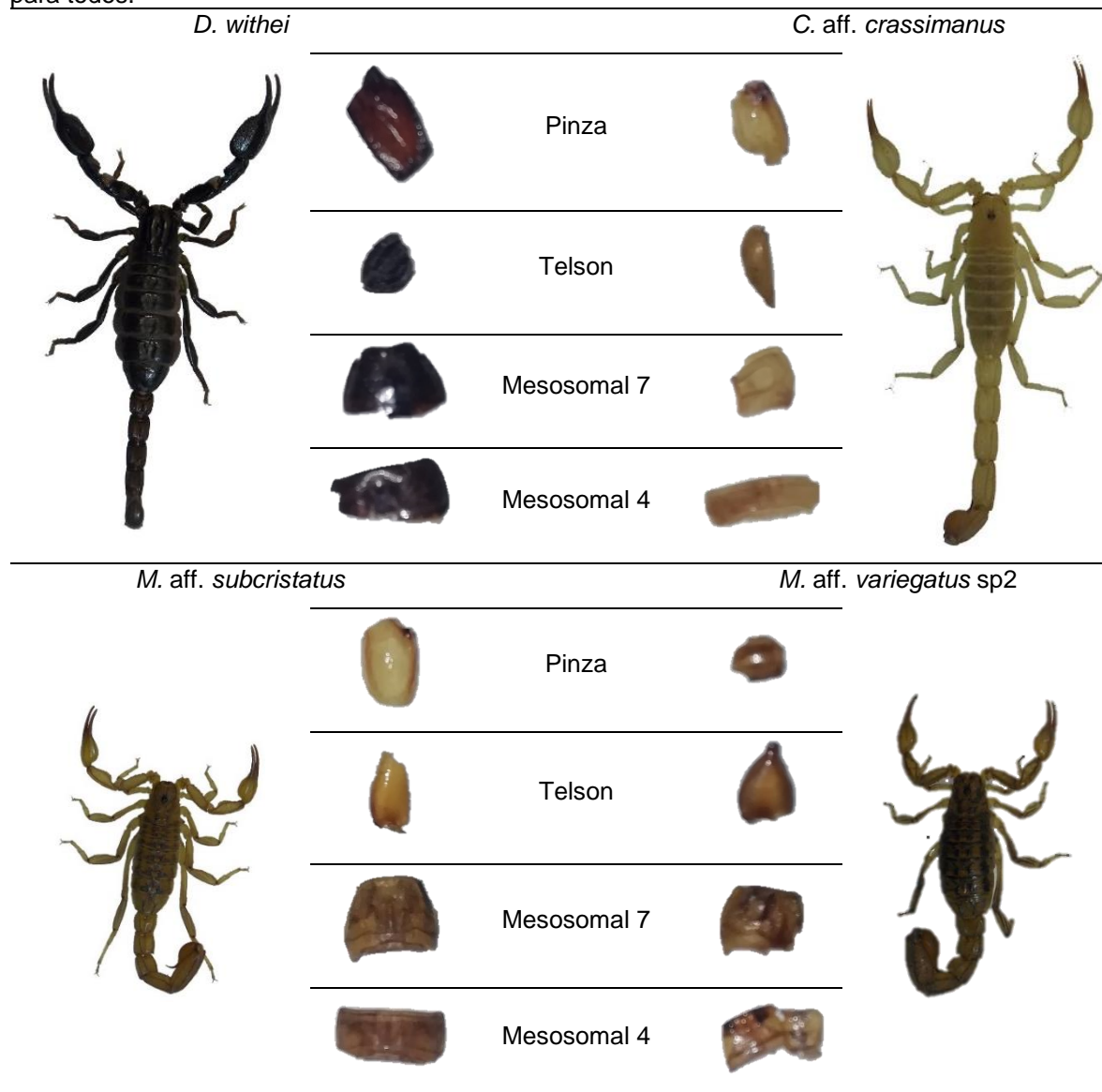
$$S_{22} = I_{pp} - I_{ps} - I_{sp} + I_{ss} \quad 4.45d$$

Si este procedimiento lo realizamos con las 36 combinaciones posibles entre los 6 estados de polarización podemos encontrar los 16 términos de la Matriz de Mueller en términos solo de la intensidad detectada experimentalmente.

4.8.1 Preparación de muestras del exoesqueleto para estudios de polarimetría

Para el estudio polarimétrico del exoesqueleto de los alacranes usando las métricas anteriormente expuestas, se definió una muestra representativa de alacranes de diferente tonalidad. Se seleccionó a la especie *D. withei*, que tiene una tonalidad oscura, a la especie *C. aff. crassimanus* que tiene una tonalidad clara y las especies *M. aff. subcristatus* y *M. aff. variegatus* sp2 que tienen una tonalidad intermedia, como se discutió en la Tabla 9. Las muestras se obtuvieron de 4 alacranes (uno de cada especie antes mencionada), los cuales perecieron por causas naturales. Las zonas bajo estudio se obtuvieron de la disección de la pinza, telson y segmentos mesosomales 4 y 7. Estos segmentos fueron seleccionadas ya que, como se discutió en capítulos anteriores, son los que mostraron una mayor (pinza y telson) y menor (mesosomales 4 y 7) intensidad de fluorescencia, y porque son zonas del cuerpo del alacrán casi planas, lo que facilita su estudio. La Tabla 13 presenta fotografías de los segmentos bajo estudio.

Tabla 13 Imágenes de las partes del cuerpo del exoesqueleto del alacrán que se usaron para el estudio de polarización. Estas imágenes son representativas de los segmentos estudiados, el área analizada para cada segmento estuvo controlada por el tamaño del haz incidente, que fue el mismo para todos.



4.8.2 Obtención de la matriz de Mueller mediante imágenes

A continuación se presenta como se calcularon los elementos de matriz de Mueller para el exoesqueleto de alacranes. Cada elemento de la matriz de Mueller se calcula a partir de las intensidades de las imágenes generadas de las combinaciones de polarización posibles, como se discutió de manera genérica en

secciones anteriores, usando como guía el esquema experimental de la Figura 4.12. Esto es, se considera que cada término de intensidad detectada de las 36 posibles combinaciones de polarización entrada/salida, es el promedio de las intensidades de los pixeles que conforman la imagen. Para poder obtener la matriz de Mueller mediante imágenes, se realizó el arreglo experimental mostrado en la Figura 4.14, que está inspirado en el arreglo de la Figura 4.12 previamente discutido.

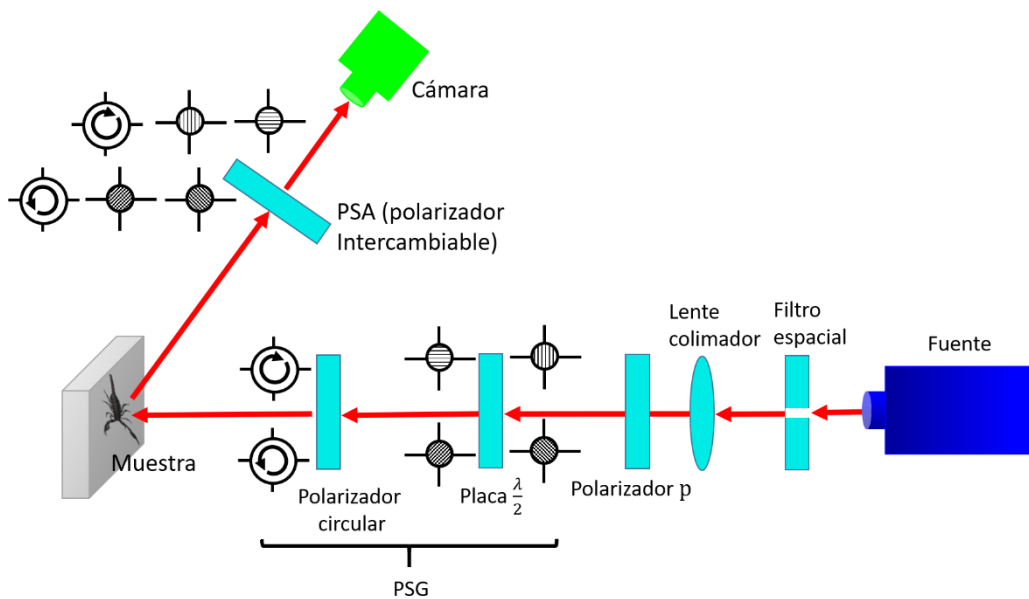


Fig. 4.14 Diagrama del montaje experimental para obtener la matriz de Mueller por reflexión del cuerpo del alacrán, el cual consta de una fuente de luz láser, un filtro espacial, un sistema generador de estados de polarización (PSG), un porta-muestras, un sistema analizador de estados de polarización (PSA) y una cámara.

El arreglo experimental esquematizado en la Figura 4.14 cuenta con una fuente de luz (ya sea un diodo láser con emisión a 405 nm para el estudio polarimétrico de la biofluorescencia o un diodo láser con emisión a 630 nm para el estudio polarimétrico de la luz esparcida por el exoesqueleto), un filtro espacial, una lente colimadora biconvexa de 15 cm de distancia focal, un polarizador horizontal p , un sistema PSG (generador de estados de polarización) que está compuesto por una placa $\lambda/2$ (la cual permite la generación de los estados lineales de polarización),

y un polarizador intercambiable que permite generar los estados de polarización circulares. En el arreglo se coloca un porta-muestras que sostiene las partes del alacrán bajo estudio y por último se encuentra el PSA (analizador de estados de polarización) que está compuesto por un polarizador intercambiable donde se pueden analizar los diferentes estados de interés (denotados como p, s, x, y, r y l de acuerdo con la Tabla 14). Por último se encuentra una cámara CMOS (Thorlabs, DCC3240C, 1280 x 1024 pixeles), con la cual se obtienen las imágenes generadas con la luz emitida (fluorescencia) o esparcida por reflexión por el espécimen bajo estudio.

Tabla 14 Abreviaturas de los estados de polarización.

Abreviatura	Estado de polarización
p	Lineal horizontal
s	Lineal vertical
x	Lineal a $+45^\circ$
y	Lineal a -45°
r	Circular derecho
l	Circular izquierdo

Con las imágenes obtenidas fue posible calcular las intensidades reflejadas (o emitidas para el caso de fluorescencia) por el exoesqueleto del alacrán. El procedimiento se describe a continuación, primero se coloca un polarizador en el PSG, por ejemplo un polarizador horizontal p , el haz polarizado incide sobre la muestra y para analizar la luz emitida (esparcida) en el PSA se coloca otro polarizador, por ejemplo p , para después registrar una imagen a la cual se le da el nombre I_{pp} , donde el primer subíndice está relacionado con el estado de polarización en el PSG y el segundo subíndice está relacionado con el estado de polarización en el PSA. A continuación se mantiene el polarizador p en el PSG y se cambia el polarizador del PSA, por los otros 5 polarizadores faltantes (s, x, y, r y l), por cada uno se obtiene una nueva imagen, después se cambia el polarizador en PSG y nuevamente se alternan los 6 estados de polarización en el PSA, obteniendo

6 nuevas imágenes, este proceso es iterativo hasta obtener las 36 imágenes correspondientes a las combinaciones posibles de los 6 estados de polarización en PSG con los 6 estados de polarización en PSA.

Una vez que se obtienen las 36 imágenes se procesan con una rutina de Matlab® que segmenta cada una de las imágenes eliminando el fondo y convirtiéndolas a escala de grises; después realiza las operaciones para el cálculo de cada término de la matriz de Mueller de acuerdo con las siguientes formulas:

$$m_{00} = I_{pp} + I_{sp} + I_{ps} + I_{ss} \quad 4.46a$$

$$m_{01} = I_{pp} + I_{ps} - I_{sp} - I_{ss} \quad 4.46b$$

$$m_{02} = I_{xp} + I_{xs} - I_{yp} - I_{ys} \quad 4.46c$$

$$m_{03} = I_{rp} + I_{rs} - I_{lp} - I_{ls} \quad 4.46d$$

$$m_{10} = I_{pp} - I_{ps} + I_{sp} - I_{ss} \quad 4.46e$$

$$m_{11} = I_{pp} - I_{ps} - I_{sp} + I_{ss} \quad 4.46f$$

$$m_{12} = I_{xp} - I_{rs} - I_{lp} + I_{ls} \quad 4.46g$$

$$m_{13} = I_{rp} - I_{rs} - I_{lp} + I_{ls} \quad 4.46h$$

$$m_{20} = I_{px} - I_{py} + I_{sx} - I_{sy} \quad 4.46i$$

$$m_{21} = I_{px} - I_{py} - I_{sx} + I_{sy} \quad 4.46j$$

$$m_{22} = I_{xx} - I_{xy} - I_{yx} + I_{yy} \quad 4.46k$$

$$m_{23} = I_{rx} - I_{ry} - I_{lx} + I_{ly} \quad 4.46l$$

$$m_{30} = I_{pr} - I_{pl} - I_{sl} + I_{sr} \quad 4.46m$$

$$m_{31} = I_{pr} - I_{pl} - I_{sr} + I_{sl} \quad 4.46n$$

$$m_{32} = I_{xr} - I_{xl} - I_{yr} + I_{yl} \quad 4.46o$$

$$m_{33} = I_{rr} - I_{rl} - I_{lr} + I_{ll} \quad 4.46p$$

Nótese que en nuestro arreglo experimental se registran imágenes para cada combinación de polarización de PSG y PSA. Una vez registrada la imagen, se realiza el promedio espacial del valor de los pixeles de cada imagen que da lugar a los valores I que aparecen en las ecuaciones 4.46 (a-p). Finalmente, cada entrada de la matriz de Mueller es normalizado al valor del término m_{00} , el cual representa el total de luz reflejada

Los segmentos del exoesqueleto de los alacranes de los 4 especímenes estudiados se fotografiaron un total de seis veces, en diferentes días y diferentes

posiciones. Esto permitió generar una estadística robusta sobre los resultados de cada uno de los elementos de la matriz de Mueller.

Capítulo 5

Resultados polarimétricos

5.1 Resultados de caracterización polarimétrica en alacranes

5.1.1 Matriz de Mueller por reflexión a 635 nm

El primer análisis polarimétrico consistió en analizar la luz esparcida a una longitud de onda de 635 nm por los segmentos de exoesqueleto bajo prueba. Como se estableció en la Tabla 13 se analizaron 4 partes del exoesqueleto (pinza, telson, segmentos mesosomal 4 y 7) de cuatro especies de alacranes diferentes (*D. withei*, *M. Aff. subcristatus*, *M. aff. variegatus* sp2, *C. aff. crassimanus*).

En la Figura 5.1 se muestra un ejemplo de la matriz obtenida para el caso del espécimen *D. withei* en la zona de la pinza. Cada una de las entradas de esta Matriz es un promedio de las 6 mediciones realizadas sobre esta zona bajo estudio y cada uno de estos términos es normalizado con respecto al valor del término m_{00} , el cual representa el total de luz reflejada. Para cada entrada de la matriz se especifica su incertidumbre asociada. Como puede observarse, solo los términos de la diagonal resultaron significativamente diferentes de cero. Se tiene también que para los términos (m_{11} , m_{22} y m_{33}) las incertidumbres son en general el 30% del valor promedio obtenido, mientras que para los elementos fuera de la diagonal las incertidumbres son notoriamente mayores que los valores promedio (que tienden a ser cero). Debido a estos resultados se podría considerar que solo los elementos de la diagonal (m_{11} , m_{22} y m_{33}) resultan tener un valor significativo.

$$M = \begin{bmatrix} 1.000 & 0.001 \pm 0.018 & 0.004 \pm 0.023 & 0.001 \pm 0.036 \\ -0.013 \pm 0.019 & 0.148 \pm 0.055 & 0.049 \pm 0.025 & 0.008 \pm 0.030 \\ -0.004 \pm 0.031 & 0.083 \pm 0.030 & -0.154 \pm 0.043 & -0.002 \pm 0.030 \\ -0.012 \pm 0.036 & 0.015 \pm 0.031 & 0.004 \pm 0.023 & -0.130 \pm 0.042 \end{bmatrix}$$

Fig. 5.1 Ejemplo de los resultados de la matriz de Mueller, para el segmento de la pinza del espécimen *D. withei*, bajo radiación láser a 635 nm.

La primera observación para estos resultados es que las matrices obtenidas son similares a la matriz de un retardador en el sentido de que solo los términos m_{00} , m_{11} , m_{22} y m_{33} son diferentes de cero y en donde m_{22} y m_{33} son negativos. De acuerdo con lo que se expuso en la sección 4.5.2, una matriz como la de la Figura 5.1 parece reproducir las propiedades de un retardador de media onda a la vez que tiende a ser un medio despolarizante. Un retardador de media onda tiene la propiedad de cambiar las fases relativas al sistema de referencia de cualquier onda de luz con la que interacciona en 180° , generando un cambio de 90° en la dirección de polarización incidente, esto es, si incide sobre un retardador de media onda luz polarizada horizontalmente, será transmitida como luz polarizada verticalmente; por su parte, un medio despolarizante perfecto es aquel que elimina cualquier estado de polarización incidente. Para ilustrar como el comportamiento óptico del segmento de la pinza del espécimen *D. withei* está entre un retardador de media onda y un medio despolarizador, en la Figura 5.2 se hace una comparación de las respectivas matrices de Mueller. Para la matriz de un retardador de media onda el segundo término de la diagonal tiene un valor de uno ($m_{11} = 1$), mientras que los siguientes dos elementos de la diagonal tienen un valor de -1 ($m_{22} = -1$ y $m_{33} = -1$), fuera de los elementos de la diagonal todos los valores son igual a cero, cabe recalcar que para el caso ideal los valores de la diagonal corresponden a unos ya que se ha supuesto que la reflexión es ideal y no existen pérdidas por absorción. Para el despolarizador todas las entradas de su matriz de Mueller son cero, excepto m_{00} . En el caso de la matriz de Mueller para el espécimen *D. withei* (Fig. 5.2), se mencionó en el párrafo anterior que solo los valores de la diagonal son significativos, considerando esto y el hecho de que el exoesqueleto de los alacranes es un material ópticamente absorbente (razón por la cual los elementos de la diagonal son menores a 1), podemos suponer que los segmentos del alacrán estudiados tienen

la propiedad de un retardador, desfasando las componentes del campo eléctrico, generando un cambio en la dirección de polarización incidente en un ángulo en particular, a la vez que tienden a despolarizar la luz. Más adelante se retomará esta idea con un análisis más detallado de las componentes de las intensidades registradas usando las métricas descritas en el capítulo anterior.

$$M = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad M = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$M = \begin{bmatrix} 1.00 & 0.00 & 0.00 & 0.00 \\ -0.01 & 0.15 & 0.05 & 0.01 \\ -0.00 & 0.08 & -0.15 & -0.00 \\ -0.01 & 0.01 & 0.00 & -0.13 \end{bmatrix}$$

Fig. 5.2 Lado izquierdo: matriz de Mueller para un retardador de media onda; lado derecho: matriz de Mueller de un medio despolarizador perfecto; abajo matriz de Mueller del espécimen *D. withei* con cada elemento aproximado a dos cifras significativas.

Al igual que en el *D. withei*, para el resto de los especímenes solo las diagonales de la matriz de Mueller resultaron con valores significativos independientemente del segmento del exoesqueleto estudiado (ver apéndice 2). A continuación en la Figura 5.3 se presentarán todos los resultados obtenidos para los elementos de matriz m_{11} , m_{22} y m_{33} (evidentemente para todos los casos se tiene $m_{00} = 1$) de los 4 especímenes y los 4 segmentos bajo estudio y a partir de ellos se realizan cálculos de las diferentes métricas con la finalidad de establecer las características polarimétricas de los exoesqueletos comunes a todas las especies así como aquellas que los diferencian.

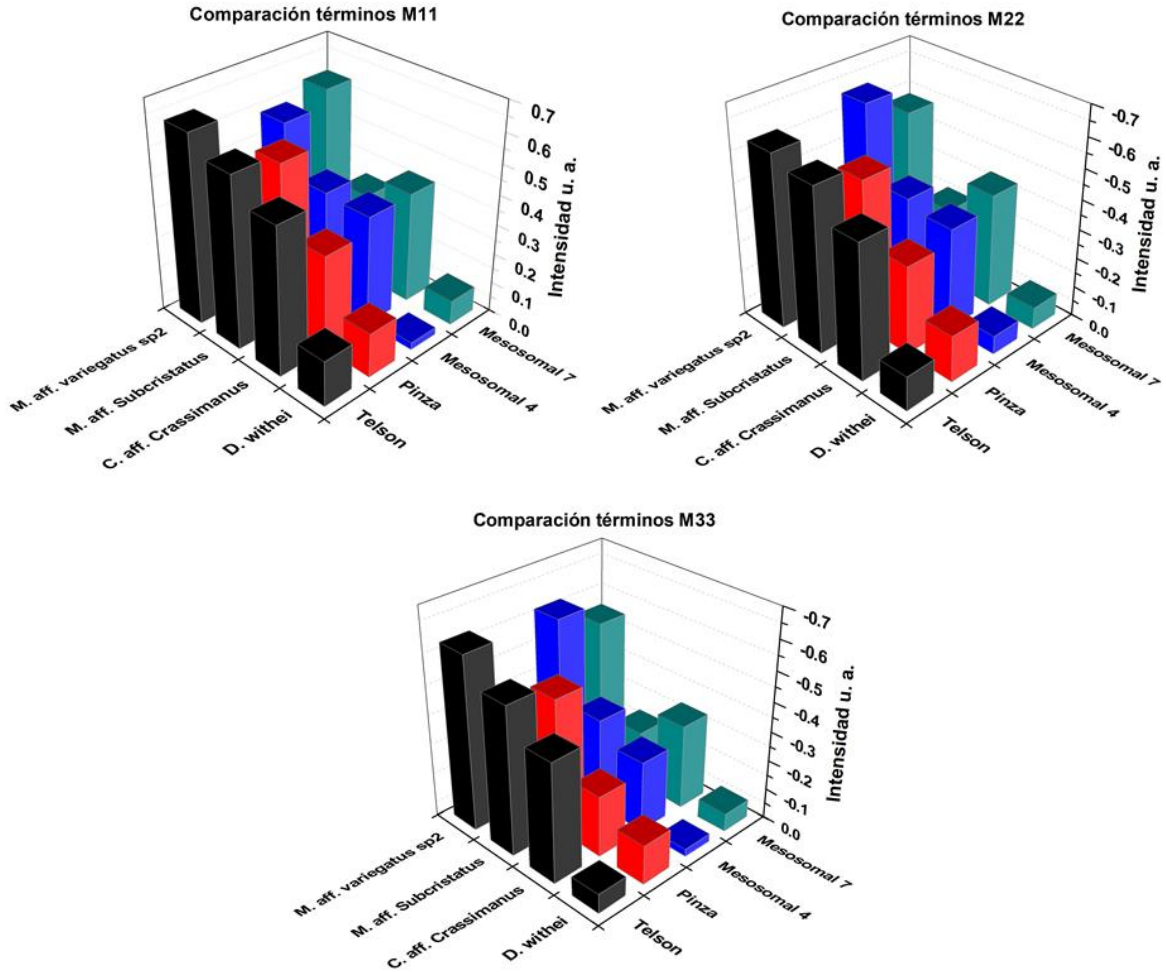
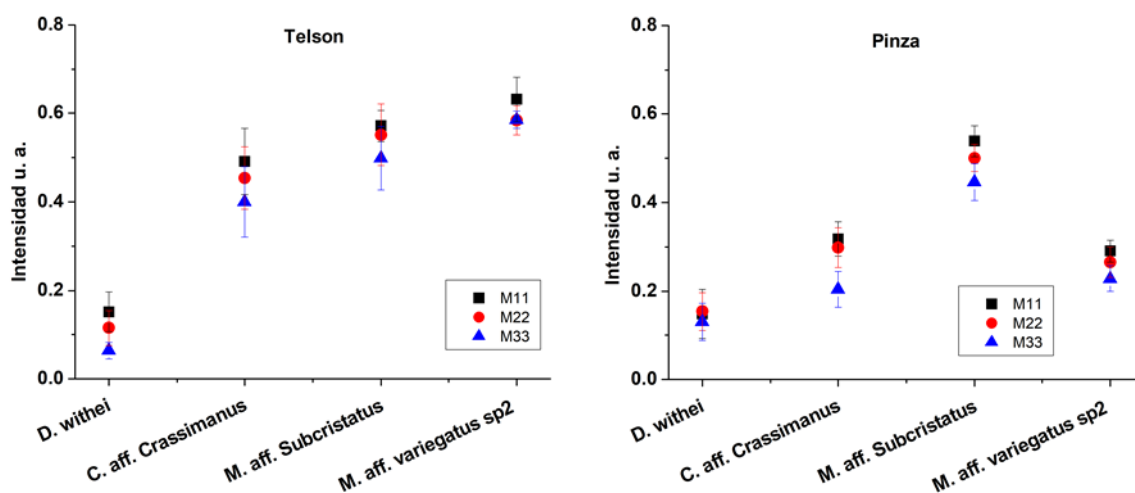


Fig. 5.3 Graficas de los valores calculados para los términos m_{11} , m_{22} y m_{33} , de la matriz de Mueller para los 4 segmentos de los 4 especímenes estudiados. Nota: obsérvese que los valores de m_{11} , son todos positivos y los de m_{22} y m_{33} son negativos. Para propósitos comparativos las escalas positivas y negativas se grafican apuntado verticalmente hacia arriba.

Retomando el hecho de que las matrices están normalizadas con respecto al valor máximo (m_{00}), la reflexión diferenciada que se había mostrado en la Figura 3.4 no es un parámetro comparativo entre las matrices de Mueller obtenidas para cada espécimen; por el contrario, estas matrices son propias de la respuesta polarimétrica de cada espécimen únicamente. En la Figura 5.3 se muestran las gráficas para los resultados de los elementos m_{11} , m_{22} y m_{33} de la matriz de Mueller. Como se aprecia en esta figura, de manera consistente se tiene que los valores en valor absoluto de la matriz de Mueller más pequeños corresponden al espécimen *D. withei* para cualquiera de los segmentos de su exoesqueleto. Debe

observarse que *D. withei* es precisamente la especie cuyo exoesqueleto es el más oscuro de entre los cuatro estudiados. La coloración oscura de esta especie la podemos apreciar a simple vista en las imágenes de la Tabla 12; y cuantitativamente se puede apreciar en la Tabla 6 presentada en el capítulo 3, cuando se discutió sobre la cuantificación de la reflectividad del exoesqueleto mediante el procesamiento digital de imágenes. Por otra parte, y a diferencia de *D. withei*, se observa que los elementos de matriz para las otras tres especies (*M. aff. subcristatus*, *M. aff. variegatus*, *C. aff. crassimanus*) parecen no seguir alguna tendencia en particular, por lo menos a primera inspección.

Sin embargo, es evidente que en todos los casos el término $m_{11} > 0$ mientras que los términos $m_{22}, m_{33} < 0$ (Figura 5.3). Por otra parte si los tres términos (m_{11} , m_{22} y m_{33}) son analizados en valor absoluto (Figura 5.4), pareciera existir una tendencia en donde se cumple $m_{11}, m_{22} > m_{33}$, este resultado podría ser un indicativo de que existe una mayor respuesta a polarizaciones incidentes lineales que a polarizaciones incidentes circulares, esto debido a que los términos m_{11} y m_{22} esta en función únicamente de las intensidades de polarización vertical-horizontal y a 45° -(-45°), respectivamente, mientras que el término m_{33} depende únicamente de las polarizaciones circulares (Ecuaciones 4.46 a-p).



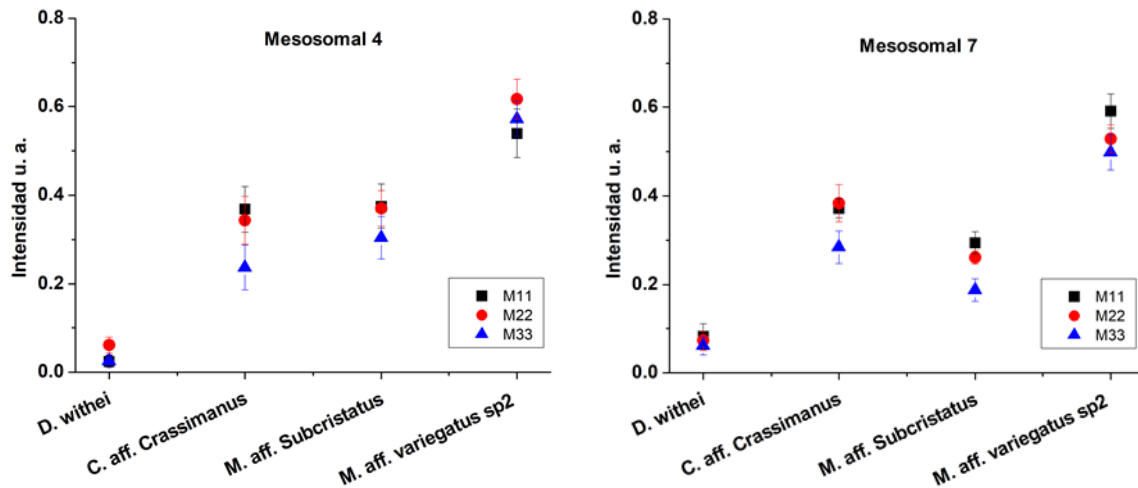


Fig. 5.4 Graficas de los valores absolutos para los términos m_{11} , m_{22} y m_{33} , de la matriz de Mueller para los 4 segmentos de los 4 especímenes estudiados.

Con la finalidad de obtener una idea más intuitiva de las propiedades polarimétricas del exoesqueleto entrada/salida, se realizó un análisis gráfico considerando solo seis intensidades de polarización de entrada/salida, las cuales corresponden a I_{pp} , I_{ps} , I_{px} , I_{rr} , I_{rl} y I_{xy} (paralelo-paralelo, paralelo-vertical, paralelo-(+45°), circular derecho-circular derecho, circular derecho-circular izquierdo y -45°-(+45°), respectivamente). Para este análisis solo se consideraron dos especímenes, uno de ellos con tonalidad clara (*C. aff. crassimanus*) y el otro con una tonalidad oscura (*D. withei*). Se tomaron las imágenes para cada una de las 6 combinaciones antes citadas, cada imagen fue convertida a escala de grises y segmentada en Matlab®, después se calculó el promedio de los pixeles para cada imagen. Este proceso se repitió seis veces obteniéndose así 6 imágenes analizadas. Para mayor claridad debe mencionarse que el promedio de estas seis mediciones realizadas sobre las imágenes individuales se usó para el cálculo de los elementos de matriz de Mueller conforme a las ecuaciones 4.46 (a-p). No obstante, en esta sección deseamos analizar las tendencias que se observan cuando se grafican las mediciones individuales. El proceso se repitió para las 4 zonas (pinza, telson, segmentos mesosomales 4 y 7) de los dos especímenes mencionados para este análisis.

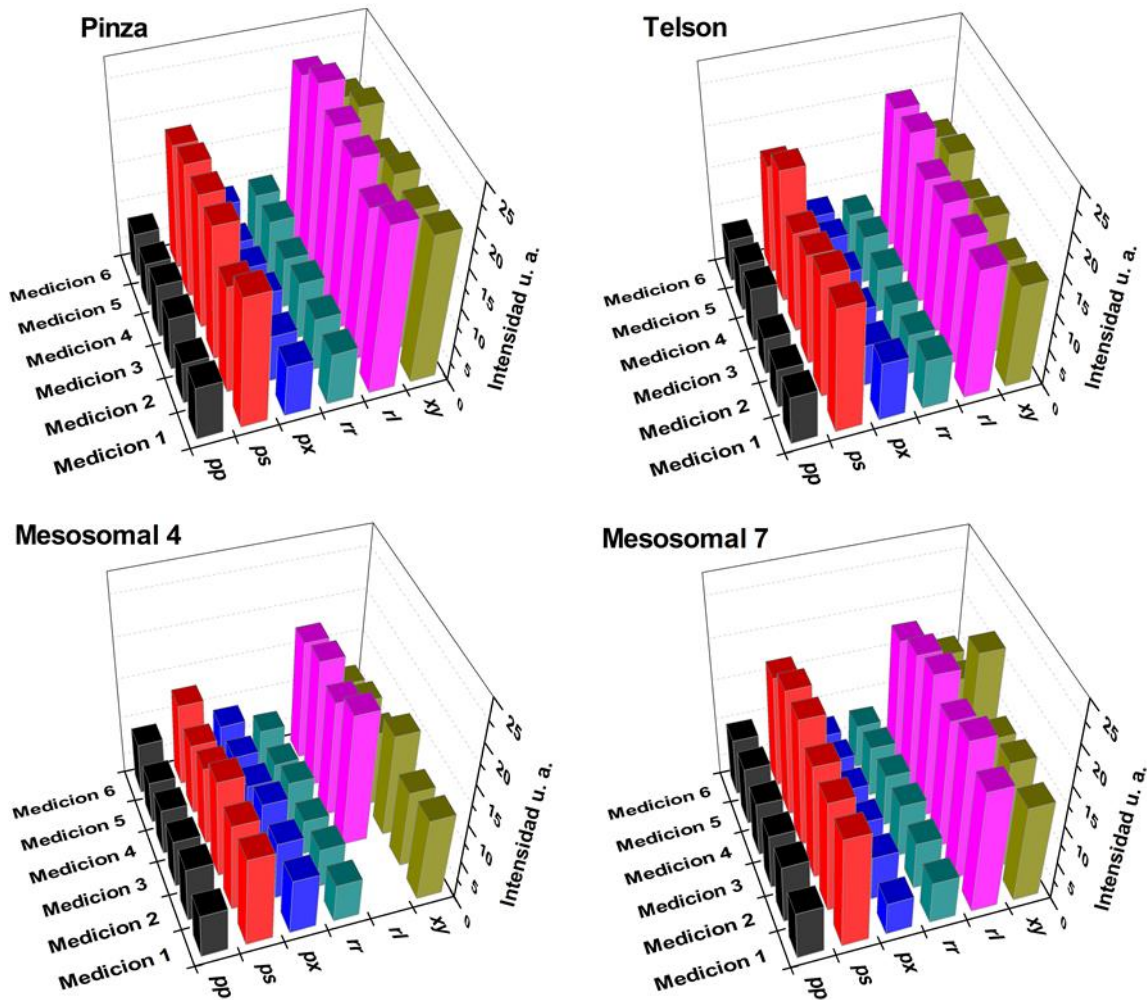


Fig. 5.5 En estas graficas se muestran los resultados para cada una de las seis mediciones I_{pp} , I_{ps} , I_{px} , I_{rr} , I_{rl} , I_{xy} , por cada zona del exoesqueleto bajo estudio para el espécimen *D. withei*, para las combinaciones de polarización seleccionadas. Para el caso del mesosoma 4 en la combinación I_{rl} solo se muestran cuatro valores, los otros dos no se graficaron ya que mostraban valores atípicos hecho que se atribuye a errores fuera de control en las mediciones.

En la figura 5.5 se muestran los resultados de cada medición individual de las intensidades de polarización I_{pp} , I_{ps} , I_{px} , I_{rr} , I_{rl} e I_{xy} , para el espécimen *D. withei* en los 4 segmentos bajo estudio. Comparando los resultados para las primeras dos intensidades de polarización I_{pp} e I_{ps} , se puede observar claramente que en las 4 zonas del exoesqueleto las intensidades para I_{ps} son significativamente mayores que las intensidades para I_{pp} , este resultado puede interpretarse como la respuesta del cuerpo del alacrán funcionando como un retardador (resultado que ya se había discutido mediante los valores obtenidos para

su matriz de Mueller, Figura 5.2), esto es, cuando la polarización lineal incidente es de forma horizontal, al ser reflejada por el cuerpo del alacrán sufre un desfase que al ser analizada de forma horizontal tiende a tener un valor menor que cuando es analizada de forma vertical, precisamente por el cambio de dirección inducido por el desfase del estado de polarización incidente, donde este cambio de dirección es preferente por la dirección vertical. Esto sucede para todos los segmentos del exoesqueleto analizados: la pinza, telson, mesosomales 4 y 7.

Para describir esquemáticamente el comportamiento polarimétrico del exoesqueleto del *D. withei* hagamos referencia a la figura 5.6a, en esta figura se muestra una onda que viaja con polarización horizontal (incidencia p), pero una vez que es reflejada por la pinza (o cualquier otra parte del exoesqueleto) y es analizada por un filtro o analizador p , a la salida lo que se obtiene es una intensidad baja, esto significa que una vez que la onda fue reflejada el desfase inducido por las propiedades polarimétricas del exoesqueleto cambian parcialmente el estado de polarización en una dirección θ desconocida, este cambio proporciona una mayor contribución de su intensidad a su componente vertical, por lo que la intensidad de salida analizada de forma horizontal es baja. Por lo contrario (Figura 5.6b) cuando se hace incidir una polarización p (horizontal), y a la salida se analiza una polarización s (vertical), la intensidad es mayor debido precisamente a la mayor contribución en intensidad de su componente vertical del haz polarizado desfasado después de la reflexión. De manera notoria, el resultado tiende a reproducirse para las polarizaciones circulares, en este caso, se obtiene una intensidad mucho mayor para la combinación cruzada I_{rl} que para la combinación paralela I_{rr} .

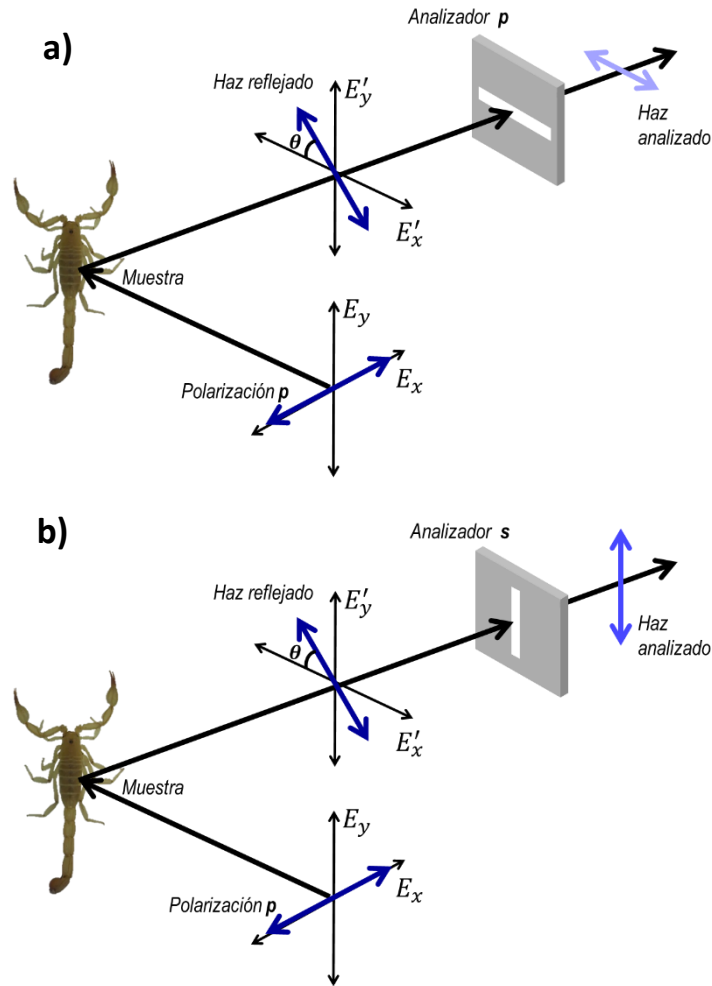


Fig. 5.6 En esta figura se muestra esquemáticamente la forma en cómo se obtiene la intensidad: a) I_{pp} y b) I_{ps} , al analizarlas se obtiene que $I_{pp} < I_{ps}$, este es un indicativo de que el cambio de dirección generada por el desfaseamiento podría ser mayor a 45° .

Un resultado muy interesante sobre el análisis del *D. withei* se obtiene al analizar la Intensidad I_{px} , que es similar a las intensidades obtenidas para I_{pp} y I_{rr} , lo cual podría ser un indicio de que el cambio en la dirección de polarización que genera el cuerpo de alacrán podría ser en efecto mayor a 45° , ya que cuando la luz reflejada por el alacrán es analizada en combinaciones cruzadas (I_{ps} y I_{rl}) la intensidad es mayor que cuando es analizada en combinaciones paralelas (I_{pp} y I_{rr}) o condiciones a cruzadas a 45° como en el caso de I_{px} .

Por otra parte en las combinaciones I_{pp} , I_{ps} , I_{px} , I_{rr} , I_{rl} y I_{xy} para el caso del espécimen *C. aff. crassimanus* (Figura 5.7) se observan algunas diferencias y

similitudes con respecto a *D. withei*. En este caso no hay diferencias notorias entre las intensidades de I_{pp} y I_{ps} , pero si existe una notable diferencia entre las intensidades I_{rr} y I_{rl} , siendo que de manera consistente se tiene que $I_{rl} > I_{rr}$.

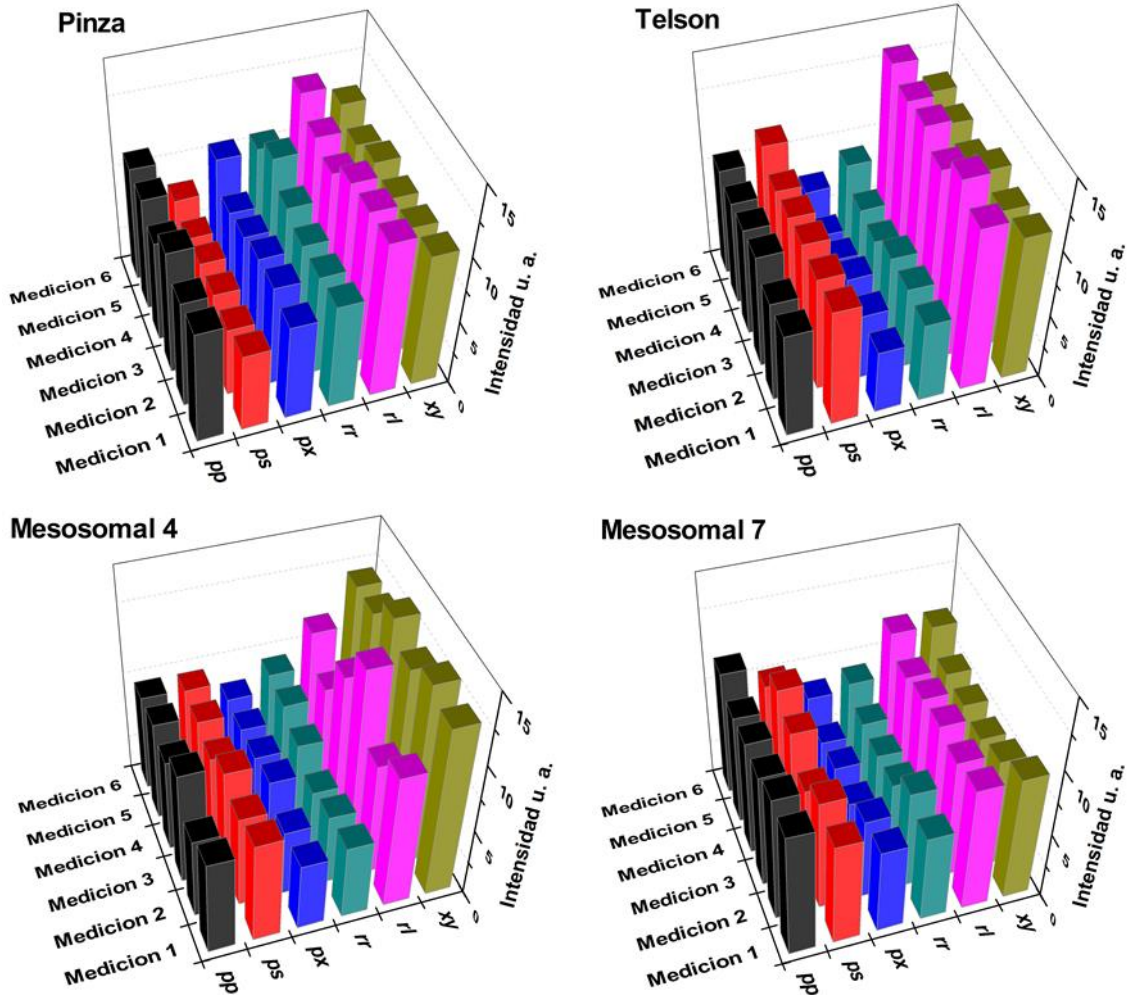
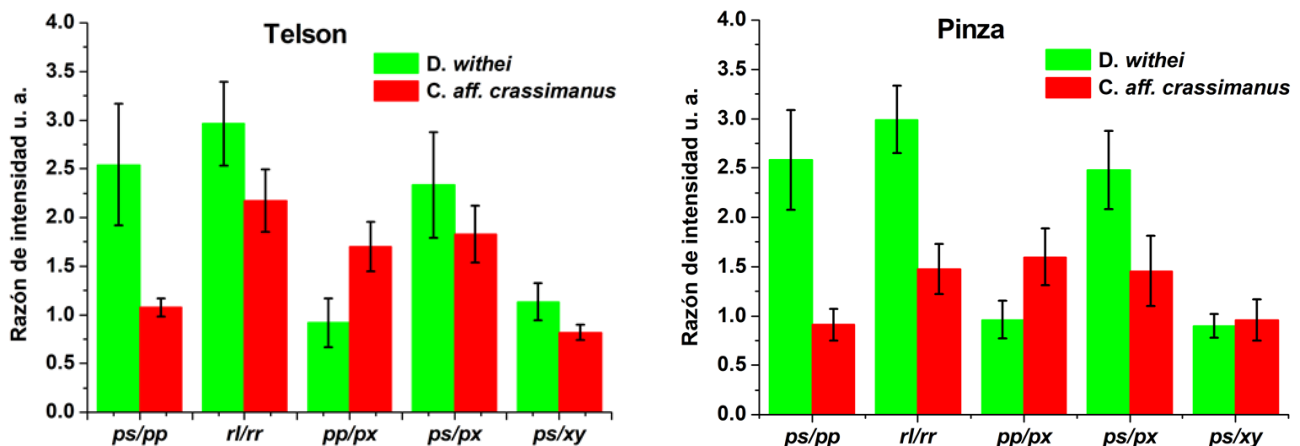


Fig. 5.7 En estas graficas se muestran los resultados para cada una de las seis mediciones I_{pp} , I_{ps} , I_{px} , I_{rr} , I_{rl} , I_{xy} , por cada zona del exoesqueleto bajo estudio para el espécimen *C. aff. crassimanus*, para las combinaciones de polarización seleccionadas.

En la figura 5.8 se muestra la razón de las intensidades I_{ps}/I_{pp} , I_{rl}/I_{rr} , I_{pp}/I_{px} , I_{ps}/I_{px} y I_{ps}/I_{xy} para los especímenes *D. withei* y *C. aff. crassimanus* en las 4 zonas de estudio. Si nos centramos en la gráfica correspondiente a la pinza, se puede observar que la razón I_{ps}/I_{pp} es mayor para el espécimen *D. withei* que para el espécimen *C. aff. crassimanus*, esto indica que en el primer caso el

comportamiento como retardador de media onda es más efectivo. Este hecho se puede observar nuevamente para la razón I_{rl}/I_{rr} , siendo esta razón mayor para *D. withei*. Por otra parte se tiene que la razón para I_{pp}/I_{px} es mayor para el espécimen *C. aff. crassimanus* resultado que se invierte cuando se analiza la razón I_{ps}/I_{px} ya que ahora es mayor para *D. withei*, este resultado comprueba el hecho de que el cambio en la dirección del estado de polarización incidente es mayor en *D. withei*, más aun, podría reforzar la suposición de que el cambio de dirección es mayor a 45° como se comentó más arriba. Por último, si se observa la razón entre I_{ps}/I_{xy} (Figura 5.8), para los dos especímenes es aproximadamente 1 ($I_{ps}/I_{xy} \sim 1$), resultado que es razonable ya que esta razón proviene de combinaciones de polarización cruzadas y lineales.

Los resultados discutidos en el párrafo anterior también se observan en los otros tres segmentos estudiados (Telson y segmento mesosomal 4 y 7), en otras proporciones pero con las mismas características, sin embargo, el único resultado que no está de acorde con los demás, es para el espécimen *C. aff. crassimanus* en el segmento mesosomal 4 para la razón I_{ps}/I_{xy} que da como resultado aproximadamente 0.5 siendo para el resto aproximadamente 1.



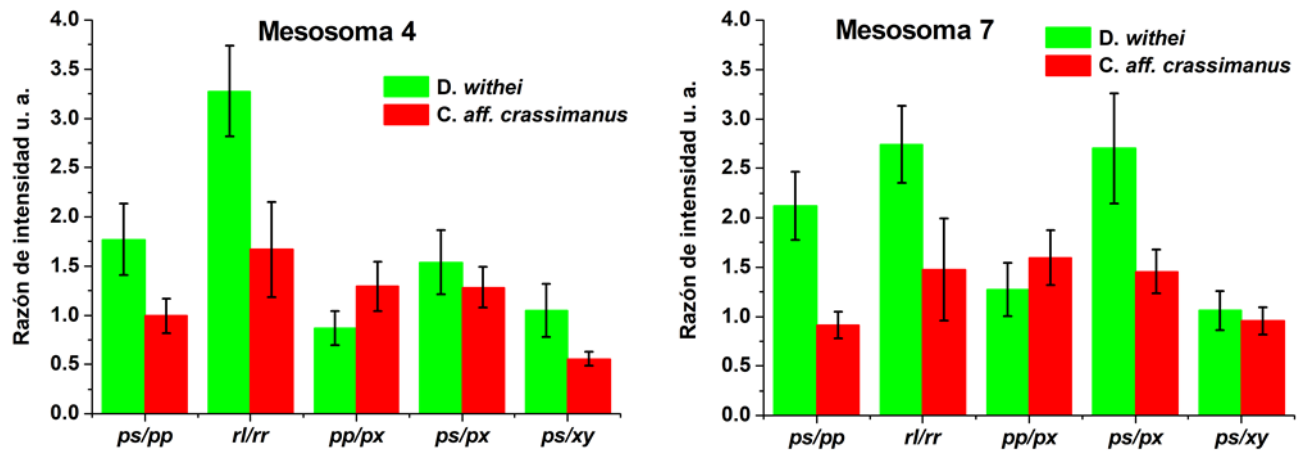


Fig. 5.8 En esta grafica se muestra la razón del promedio las mediciones I_{ps}/I_{pp} , I_{rl}/I_{rr} , I_{pp}/I_{px} , I_{ps}/I_{px} y I_{ps}/I_{xy} , para los especímenes *D. withe* (color negro) y *C. aff. crassimanus* (color rojo), para los 4 segmento en estudio.

5.1.2 Cálculo de métricas

Se calcularon las 5 métricas escalares definidas en la sección 4.6, la Tabla 15 es un ejemplo de los valores obtenidos para el espécimen *D.withei*, estos resultados son el promedio de las seis mediciones realizadas en el segmento de la pinza de este espécimen. Como se puede observar los valores obtenidos para las métricas $D(M)$ y $P(M)$ son muy pequeños, cercanos a cero. De acuerdo con la Tabla 12, estos resultados indican que la pinza de *D. withei* se puede considerar como un medio no diatenuante ($D(M) = 0$) y no polarizante ($P(M) = 0$), este resultado fue similar para los 4 especímenes en los 4 segmentos estudiados. Sin embargo para las métricas $DI(M)$, y $Q(M)$ y TC los valores obtenidos son significativamente diferentes de cero y están caracterizados por una incertidumbre de solo 14% de su valor calculado. Estas tres métricas se grafican para los diferentes segmentos del exoesqueleto y para cada especie (ver Figura 5.9).

Tabla 15 Ejemplo de los valores de las métricas calculadas para el espécimen *D. withei* en el segmento de la pinza.

$D(M)$	$P(M)$	$DI(M)$	$Q(M)$	TC
0.021	0.029	0.163	0.083	0.268
± 0.009	± 0.018	± 0.037	± 0.037	± 0.012

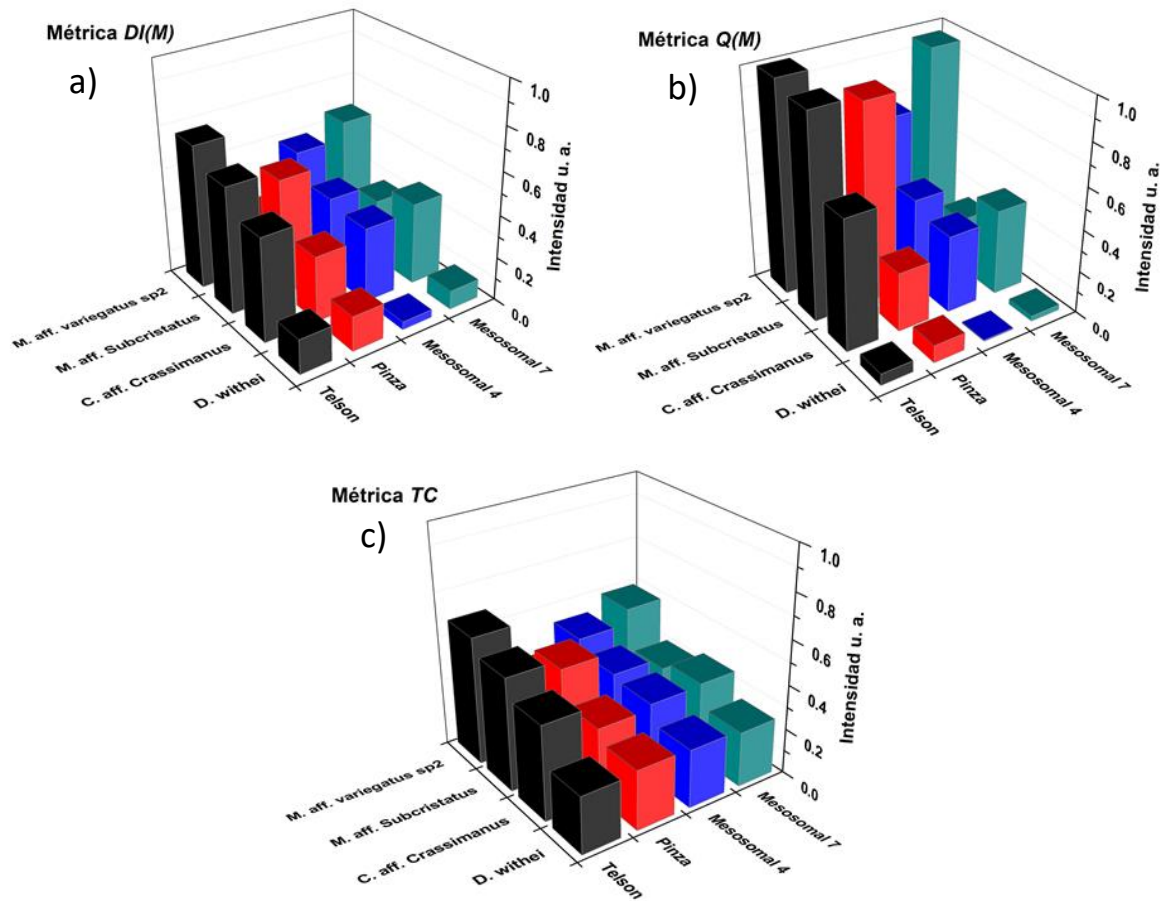


Fig. 5.9 Resultados de las métricas ($DI(M)$, $Q(M)$ y TC) para los cuatro especímenes por cada segmento bajo estudio.

Las métricas (Figura 5.9a y b) indican que en general los 4 especímenes en las 4 zonas estudiadas muestran propiedades de medios que despolarizan parcialmente la luz ($0 < DI(M) < 1$ y $0 < Q(M) < 1$, ver Tabla 12), de estas dos métricas los valores más bajos son para el espécimen *D. withei* en las 4 zonas, esto indica que *D. withei* tiende a ser el espécimen más despolarizante de los 4 estudiados, hecho que es consistente con lo que se describió con anterioridad en la sección 5.1.1. En el apéndice 2 se muestran las matrices de Mueller obtenidas para los 4 especímenes en los cuatro segmentos estudiados, verificándose para todos que solo los valores de la diagonal son significativamente diferentes de cero, siendo el tercer (m_{22}) y cuarto término (m_{33}) de la diagonal negativos, por lo que las matrices obtenidas denotan que las características de los exoesqueletos son

similares a las de un retardador de media onda (ver en la Figura 5.2 la matriz de Mueller para un retardador de media onda). Por otra parte, resalta el hecho de que, los valores de la diagonal para el caso de *D. withei* son notoriamente menores a las del *M. aff. Subcristatus*, *M. aff. variegatus* sp2 y *C. aff. crassimanus* y más cercanos a cero, entonces las matrices de Mueller obtenidas para *D. withei* denotan más el carácter de un material despolarizante (ver en la Figura 5.2 la matriz de Mueller para un despolarizador perfecto). Debido a estos resultados podemos concluir que los exoesqueletos de los alacranes en estudio funcionan como materiales retardadores y a su vez como materiales despolarizantes, siendo el espécimen *D. withei* el más despolarizante de todos.

Por último los resultados para el teorema de Gil. Bernabeu (Métrica *TC*, figura 5.9-C) muestra que las matrices de Mueller obtenidas no se pueden considerar como matrices de Mueller-Jones, reforzando los resultados obtenidos para $DI(M)$ y $Q(M)$, estableciendo que las matrices obtenidas están asociadas a sistemas parcialmente despolarizantes.

Por otra parte se ha reportado que la matriz de Mueller característica para una superficie rugosa parcialmente despolarizante [69] es de la forma:

$$M = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & a & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -a & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -a \end{bmatrix} \quad \text{o} \quad M = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & a & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -b & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c \end{bmatrix}$$

Fig. 5.10 Estructura general de una matriz de Mueller para una superficie rugosa parcialmente despolarizante.

De la Figura 5.10, se observa que solo los elementos de la diagonal son diferentes de cero ($m_{00}, m_{11}, m_{22}, m_{33} \neq 0$) con el término m_{11} positivo y los términos m_{22} y m_{33} negativos. Esta matriz característica para una superficie rugosa es muy similar a las matrices obtenidas para los 4 especímenes y las 4 zonas estudiadas en este trabajo (ver Figura 5.1, Apéndice 2), lo cual es otro indicativo de que los exoesqueletos de los alacranes estudiados en los cuatro segmentos (pinza, telson, mesosomas 4 y 7) se pueden considerar como sistemas parcialmente

despolarizantes debido a que su superficie es rugosa. Evidentemente la rugosidad genera reflexión difusa, pero una diferenciación en la rugosidad del exoesqueleto podría dar lugar a diferentes características polarimétricas, como se ha observado para el caso del *D. withei* con respecto al resto de las especies bajo estudio.

5.2 Matriz de Mueller de emisión de fluorescencia

Para el caso del cálculo de la matriz de Mueller de la emisión de fluorescencia se utilizaron las mismas muestras (Tabla 12), como ejemplo, la Figura 5.11 presenta el caso del espécimen *D. withei*, donde los valores mostrados corresponden al promedio de las seis mediciones tomadas en el segmento del telson.

$$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.004 \pm 0.001 & -0.001 \pm 0.001 & -0.007 \pm 0.007 \\ -0.004 \pm 0.002 & 0.099 \pm 0.011 & 0.017 \pm 0.001 & -0.002 \pm 0.001 \\ -0.005 \pm 0.003 & 0.011 \pm 0.002 & -0.093 \pm 0.005 & 0.001 \pm 0.001 \\ 0.001 \pm 0.001 & -0.001 \pm 0.001 & -0.000 \pm 0.002 & 0.005 \pm 0.002 \end{bmatrix}$$

Fig. 5.11 Ejemplo de los resultados de la matriz de Mueller, para el segmento del telson del espécimen *D. withei*, correspondiente a la emisión de fluorescencia.

A diferencia de la matriz de Mueller por reflexión donde los términos de la diagonal fueron diferentes de cero, la matriz de Mueller para el análisis de la emisión de fluorescencia solo contempla tres términos de la diagonal diferentes de cero, los cuales corresponden a m_{00} , m_{11} y m_{22} (Figura 5.11). Nótese por ejemplo que el resto de los valores están caracterizados por una incertidumbre que es de la misma magnitud que el valor promedio, más aún, los términos m_{11} y m_{22} son en general dos órdenes de magnitud mayor que los términos fuera de la diagonal. Otra semejanza con respecto a la matriz obtenida por reflexión es que el término $m_{11} > 0$ y $m_{22} < 0$. Las matrices para los demás segmentos y los otros tres especímenes presentan la misma estructura de la matriz mostrada en la Figura 5.11.

Para realizar una comparación entre los términos de la matriz de Mueller para los diferentes segmentos en los 4 especímenes, se graficaron los términos m_{11} y m_{22} , los resultados se muestran en la Figura 5.12.

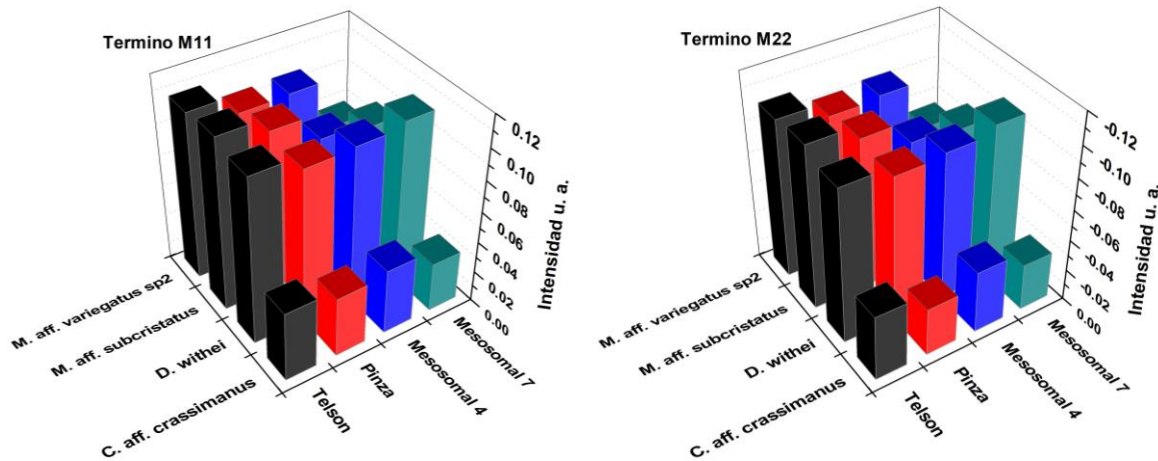


Fig. 5.12 Graficas de los valores calculados para los términos m_{11} y m_{22} , de la matriz de Mueller para los 4 segmentos de los 4 especímenes estudiados. Nota: obsérvese que los valores de m_{11} , son todos positivos y los de m_{22} son negativos. Para propósitos comparativos las escalas positivas y negativas apuntan verticalmente hacia arriba.

El espécimen *C. aff. crassimanus* ha sido caracterizado por tener valores más altos en los términos de la diagonal de la matriz de Mueller por reflexión a comparación del espécimen *D. withei* (sección 5.1), y una alta intensidad de emisión de fluorescencia (sección 3.2), sin embargo, en cuestión a la matriz de Mueller de la emisión de fluorescencia está caracterizada por los valores más bajos. Como se mencionó en la sección 5.1, las matrices que se calculan están normalizadas al valor más alto de la matriz (término m_{00}), esto permite desechar el hecho de que los especímenes estudiados poseen una diferencia notable en la intensidad de fluorescencia (sección 3.2) y permite considerar únicamente la respuesta al haz de luz polarizado pero en la emisión de fluorescencia; por lo tanto, no es de extrañarse que a pesar de que *C. aff. crassimanus* es un espécimen claro con emisión alta de fluorescencia obtenga los valores más bajos en la diagonal de Mueller. De la misma forma se tiene que el espécimen *D. withei* está caracterizado por los valores de matriz más altos a pesar de ser un espécimen de tonalidad oscura y con una intensidad de fluorescencia baja (sección 3.2). Por último los especímenes *M. aff.*

subcristatus y *M. aff. variegatus sp2* con una tonalidad media y una intensidad de fluorescencia media obtuvieron también valores más altos que *C. aff. crassimanus*, estos valores son similares a los de *D. withei*. En cuestión a los valores numéricos entre los términos m_{11} y m_{22} existe una tendencia en donde $|m_{11}| > |m_{22}|$ (Figura 5.13) en todos los casos, esta tendencia también se observó en los resultados por reflexión (sección 5.1) donde $|m_{11}| > |m_{22}| > |m_{33}|$.

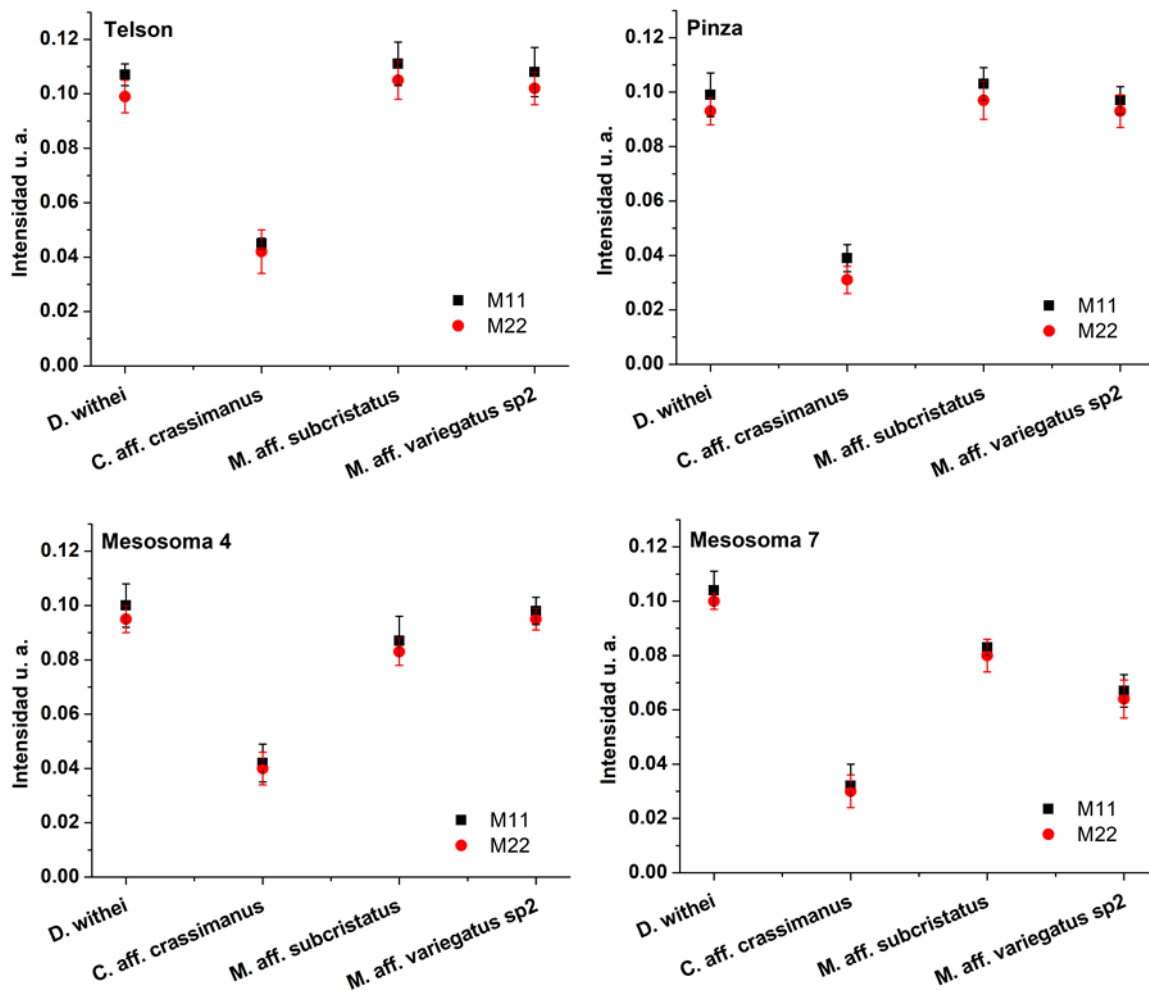


Fig. 5.13 Gráficas de los valores absolutos para los términos m_{11} y m_{22} , de la matriz de Mueller para la fluorescencia de los 4 segmentos en los 4 especímenes estudiados.

Las métricas definidas en la sección 4.6 también fueron calculadas para la matriz de Mueller de la fluorescencia, en la Tabla 16 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos con su respectiva incertidumbre para el espécimen *D. withei*,

los valores mostrados en esta tabla corresponden al promedio de las seis mediciones hechas en el segmento de la pinza de este espécimen.

Tabla 16 Ejemplo de los valores de las métricas calculadas para el espécimen *D. withei*, en el segmento de la pinza.

$D(M)$	$P(M)$	$DI(M)$	$Q(M)$	TC
0.008	0.007	0.084	0.02	0.274
± 0.003	± 0.002	± 0.07	± 0.02	± 0.03

La Tabla 16 muestra que los valores obtenidos solo son significativos para la métrica TC , ya que para las otras 4 métricas los valores se pueden considerar como ceros. Los resultados fueron similares para los 4 especímenes en los 4 segmentos estudiados. En la Figura 5.14 se muestran los resultados obtenidos de la métrica TC para los 4 especímenes en los 4 segmentos bajo estudio.

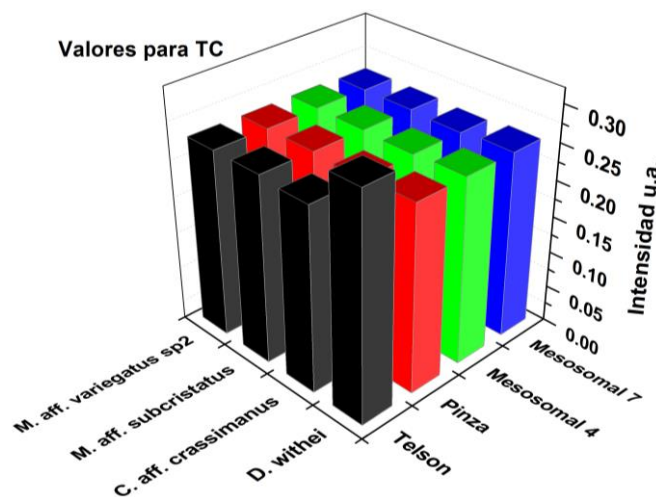


Fig. 5.14 Resultados de los valores para las métricas TC para los cuatro especímenes por cada segmento bajo estudio.

Se observa que todos los valores de la Figura 5.14 (correspondientes a la métrica TC) son similares para los 4 especímenes, en los cuatro segmentos bajo estudio. Por lo tanto, con los resultados obtenidos para las métricas según la Tabla 12, podemos establecer que los 4 segmentos estudiados (para los 4 especímenes) tienen propiedades de medios parcialmente diatenuantes ($0 < D(M) < 1$) y parcialmente polarizantes ($0 < P(M) < 1$), resultados consistentes con las restantes

métricas ($0 < DIM(M) < 1$, $0 < Q(M) < 1$ y $TC < 1$). Estos resultados son de gran relevancia ya que muestran que al menos los 4 especímenes estudiados (en los 4 segmentos) tienden a emitir fluorescencia con el mismo nivel de despolarización (cuando el haz incidente de excitación es polarizado), este fenómeno podría ser utilizado como un artilugio de camuflaje, ya que se ha confirmado que varios insectos pueden detectar la luz polarizada [67] y a su vez evitan la fluorescencia del alacrán [78], estos dos fenómenos juntos podrían ser un medio más eficaz para evitar a los insectos que se sirven del alacrán como alimento.

5.3 Conclusiones sobre polarización en alacranes

Mediante el análisis por reflexión a 635 nm, de los 16 términos de la matriz de Mueller, solo los términos de la diagonal m_{11} , m_{22} y m_{33} resultaron significativos, de los cuales el término m_{11} resultó positivo y los términos m_{22} y m_{33} resultaron negativos, este hecho da indicios de que las zonas estudiadas en los 4 especímenes presentan propiedades de un retardador y un medio parcialmente despolarizante. El espécimen *D. withei* muestra los valores más bajos en los tres términos de la diagonal (en los cuatro segmentos estudiados) en comparación con los otros tres especímenes, para dar una explicación de este hecho se analizaron 6 combinaciones de polarizaciones por separado, los resultados mostraron que para el caso del espécimen *D. withei* las zonas estudiadas tienden a desfazar las componentes del haz incidente, generando un cambio de dirección en la polarización del haz reflejado con una mayor contribución de la intensidad a la componente vertical, ya que las intensidades de las combinaciones cruzadas (I_{ps} y I_{rl}) es mayor que las intensidades de las combinaciones paralelas (I_{pp} y I_{rr}), mientras que para el espécimen *C. aff. crassimanus* sucedió lo contrario, el desfase generado por las zonas estudiadas proporcionó una contribución mayor de la intensidad a la componente horizontal del haz polarizado reflejado. Este hecho indica que el espécimen *D. withei* genera un cambio mayor en la dirección de polarización del haz incidente en comparación con *C. aff. crassimanus*. Más aún las intensidades para la combinación I_{px} son muy similares a las intensidades de las

combinaciones paralelas (I_{pp} y I_{rr}), lo cual indica que el cambio de dirección de la polarización incidente es mayor a 45° .

Este mismo análisis de las seis combinaciones, mostró que el espécimen *D. withei* tiene una estructura que implica una mayor despolarización de la luz incidente en comparación con el espécimen *C. aff. crassimanus*, debido a que el cambio en la dirección de la polarización incidente es mayor en el espécimen *D. withei*. Se obtuvieron valores para las métricas DIM y QM, los cuales en todos los casos tuvieron valores entre 0 y 1, indicando que los sistemas en estudio se consideran parcialmente despolarizantes, siendo el espécimen *D. withei* quien tiene los valores más bajos, indicando que este espécimen es más despolarizante, resultado que está acorde con lo que se había encontrado en el análisis de las seis combinaciones de polarización.

En cuestión al análisis de la polarización de la emisión de fluorescencia, de la matriz de Mueller, para los 4 especímenes (en los 4 segmentos) solo dos términos de la diagonal m_{11} y m_{22} resultaron significativos, siendo m_{11} positivo y m_{22} negativo, esta matriz tiene la forma generalizada de una matriz para un medio despolarizante. En los cuatro segmentos (pinza, telson y segmento mesosomal 4 y 7) el espécimen *C. aff. crassimanus* obtuvo los valores más bajos para ambos términos (m_{11} y m_{22}) en comparación con los otros tres especímenes, siendo este espécimen de tonalidad clara y con una emisión de fluorescencia más alta. En cuestión a las métricas solo una de ellas resultó tener valores significativos, esos resultados indican que los 4 especímenes bajo estudio funcionan como sistemas parcialmente despolarizantes, al menos en los cuatro segmentos estudiados.

Por otra parte los resultados obtenidos son independientes del hecho que los especímenes estudiados tengan una intensidad de fluorescencia y reflectancia diferenciada, gracias a que todas las matrices son normalizadas al valor más alto (m_{00}) obtenido para cada matriz, por lo tanto las respuestas obtenidas (Matriz de Mueller) son íntegramente fenómenos asociados con las estructuras del exoesqueleto de los alacranes (análisis por reflexión) y respuestas a una haz polarizado de excitación (análisis de la emisión de fluorescencia). El hecho de que

en ambos casos las matrices tengan la forma de materiales parcialmente despolarizantes puede estar relacionado con una forma de camuflaje o un medio para conseguir alimento, en cualquier caso hace falta más trabajo de investigación para poder generar una hipótesis al respecto.

Con respecto al espécimen *D. withei*, los valores de la diagonal de sus matrices de Mueller por reflexión y de fluorescencia son muy similares (alrededor de 0.1), esto pudiera estar relacionado con el hecho de que esta especie es pelófila, a comparación de *C. aff. crassimanus* donde los valores de la diagonal de su matriz por reflexión decayeron en más de un 100 % en los valores que conforman su matriz de emisión de fluorescencia, *C. aff. crassimanus* pertenece a una especie psamófila la cual pasa gran parte de su tiempo fuera de su madriguera para conseguir alimento o pareja. En todos los casos el hecho de que los especímenes estudiados (en los 4 segmentos) reflejen o emitan (en el caso de fluorescencia) luz despolarizada pudiera estar estrechamente relacionado con su ecomorfotipo. En ambos casos se necesita plantear más experimentos y posibles investigaciones para generar hipótesis más robustas.

Apéndice 1

El estudio ANOVA (análisis de la varianza) tiene por objetivo probar que dos o más medias poblacionales son iguales. Ayudándose de lo que se conoce como hipótesis nula (H_0) o hipótesis alternativa (H_1), donde, H_0 indica que las medias poblacionales son iguales $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_i$ y H_1 indica que al menos un par de las medias poblacionales son diferentes.

Este estudio se basa en la comparación de la varianza de las medias de dos o más grupos, bajo la hipótesis nula de que las medias son iguales. Para realizar el estudio se deben calcular tres factores:

Suma de cuadrados total (SCT): Este parámetro mide la variabilidad total de los datos, se define como la suma de los cuadrados de las diferencias de cada observación respecto a la media general de todas las observaciones.

Suma de cuadrados del factor (SCF): Este parámetro mide la variabilidad de los datos asociados al efecto del factor sobre la media. Se obtiene como la suma de los cuadrados de las desviaciones de la media de cada observador respecto de la media general, ponderando cada diferencia al cuadrado por el número de observaciones de cada grupo.

Suma de cuadrados del error (SCE): Este parámetro mide la variabilidad que no es debida a una variable cualitativa o factor. Se calcula como la suma de los cuadrados de las desviaciones de cada observación respecto a la media del nivel al que pertenece.

Una vez calculadas las sumas, se tienen que calcular los cuadrados medios para cada suma, los cuales se definen como la suma de los cuadrados entre los grados de libertad, y están dados por las siguientes formulas:

$$\text{Cuadrados medios totales (CMT): } \frac{SCT}{N-1}$$

$$\text{Cuadrados medios del factor (CMF): } \frac{SCF}{N-k}$$

Cuadrados medios del error (CME): $\frac{SCE}{k}$

Donde N (grados de libertad totales) es el número total de observaciones, k (grados de libertad del error) es el número de tratamientos (variables) y N-k son los grados de libertad del factor. Por último se calcula el estadístico F_{ratio} que se define como:

$$F_{ratio} = \frac{CMF}{CME}$$

El siguiente paso es buscar el estadístico F_{α} que corresponde al valor de la distribución de Fisher con un intervalo de confianza del 5%, este valor se encuentra en tablas y depende de los grados de libertad obtenidos en los datos analizados, por ejemplo para la Tabla 4 se obtuvieron 2 grados de libertad para el factor y 69 grados de libertad del error, por lo tanto en las tablas de Fisher ($\alpha = 5\%$) se busca el valor correspondiente a la columna 2, fila 69 como se muestra en la Figura A1.1:

g.d.l	Grados de libertad del Numerador									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
31	4,160	3,305	2,911	2,679	2,523	2,409	2,323	2,255	2,199	2,153
32	4,149	3,295	2,901	2,668	2,512	2,399	2,313	2,244	2,189	2,142
33	4,139	3,285	2,892	2,659	2,503	2,389	2,303	2,235	2,179	2,133
34	4,130	3,276	2,883	2,650	2,494	2,380	2,294	2,225	2,170	2,123
35	4,121	3,267	2,874	2,641	2,485	2,372	2,285	2,217	2,161	2,114
40	4,085	3,232	2,839	2,606	2,449	2,336	2,249	2,180	2,124	2,077
60	4,001	3,150	2,758	2,525	2,368	2,254	2,167	2,097	2,040	1,993
80	3,960	3,111	2,719	2,486	2,329	2,214	2,126	2,056	1,999	1,951
90	3,947	3,098	2,706	2,473	2,316	2,201	2,113	2,043	1,986	1,938
100	3,936	3,087	2,696	2,463	2,305	2,191	2,103	2,032	1,975	1,927
120	3,920	3,072	2,680	2,447	2,290	2,175	2,087	2,016	1,959	1,910
inf.	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	2,010	1,938	1,880	1,831

Fig. A1.1 Ejemplo de la ubicación de un valor en la tabla de la distribución de Fisher, basado en los grados de libertad.

Así para nuestros datos de la tabla 4 tenemos $F_{\alpha}(2, 69) = 3.1$. por último se compara el valor que deberían tener nuestros datos en la distribución de Fisher (F_{α}) con el valor real obtenido (F_{ratio}), de esta forma si $F_{ratio} > F_{\alpha}$ se rechaza la hipótesis nula (H_0), lo que indica que entre las medias poblacionales existe una diferencia significativa, esto es, se acepta la hipótesis alternativa. Generalmente suele reportarse el valor del estadístico “p”, el cual nos indica la probabilidad de obtener, por azar, una diferencia mayor de la observada, cumpliéndose que no haya

diferencia real en la población de la que proceden las muestras, así que el hecho de que $p < 5\%$, indica que es improbable que los resultados se deban al azar, rechazando H_0 y justificando que la diferencia es real. Los resultados de este estudio de ANOVA suelen reportarse de la siguiente forma: $F(N - k, k) = F_{ratio, p}$.

Ahora si mediante un estudio ANOVA se acepta la hipótesis alternativa (al menos dos de las medias son significativamente diferentes) se realiza un análisis t-test, para identificar cuáles de las medias son diferentes, este estudio es conocido como un análisis post-hoc. Para el análisis de nuestros datos se usó el Tukey's test.

Por otro lado existe lo que se conoce como una prueba t, esta prueba es usada para analizar las diferencias entre dos conjuntos de datos a los cuales se les mide la misma variable, está basada en la aceptación o rechazo de la hipótesis nula, en función del valor p , donde si $p > \alpha$ (α es el valor de significancia) se acepta la hipótesis nula, por lo contrario si $p < \alpha$ se rechaza la hipótesis nula.

Apéndice 2

En este apartado se muestran las matrices de Mueller obtenidas para los 4 especímenes en los 4 segmentos estudiados, cada matriz mostrada proviene del promedio de las 6 mediciones realizadas en cada segmento y cada término contiene su error experimental.

Tabla A2.1 Matrices obtenidas para el espécimen *D. withei*, en los 4 segmentos estudiados. Cada matriz mostrada es el promedio de las 6 mediciones realizadas y cada término contiene su error experimental.

Segmento	<i>D. withei</i>
Telson	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.009 \pm 0.011 & 0.000 \pm 0.026 & -0.006 \pm 0.019 \\ -0.011 \pm 0.014 & 0.151 \pm 0.045 & 0.050 \pm 0.020 & -0.005 \pm 0.026 \\ 0.009 \pm 0.010 & 0.056 \pm 0.030 & -0.115 \pm 0.040 & 0.004 \pm 0.015 \\ -0.011 \pm 0.019 & 0.007 \pm 0.018 & 0.014 \pm 0.022 & -0.064 \pm 0.019 \end{bmatrix}$
Pinza	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & 0.001 \pm 0.018 & 0.004 \pm 0.023 & 0.001 \pm 0.036 \\ -0.013 \pm 0.019 & 0.148 \pm 0.055 & 0.049 \pm 0.025 & 0.008 \pm 0.030 \\ -0.004 \pm 0.031 & 0.083 \pm 0.030 & -0.154 \pm 0.043 & -0.002 \pm 0.030 \\ -0.012 \pm 0.036 & 0.015 \pm 0.031 & 0.004 \pm 0.023 & -0.130 \pm 0.042 \end{bmatrix}$
Mesosoma 4	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & 0.000 \pm 0.012 & -0.003 \pm 0.022 & 0.009 \pm 0.026 \\ -0.004 \pm 0.016 & 0.024 \pm 0.014 & 0.018 \pm 0.015 & -0.004 \pm 0.010 \\ -0.015 \pm 0.037 & 0.021 \pm 0.018 & -0.062 \pm 0.018 & 0.014 \pm 0.028 \\ -0.023 \pm 0.034 & 0.012 \pm 0.020 & -0.020 \pm 0.024 & -0.025 \pm 0.014 \end{bmatrix}$
Mesosoma 7	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.012 \pm 0.012 & 0.008 \pm 0.025 & -0.006 \pm 0.016 \\ 0.005 \pm 0.018 & 0.082 \pm 0.029 & 0.035 \pm 0.015 & 0.001 \pm 0.012 \\ 0.007 \pm 0.026 & 0.050 \pm 0.020 & -0.073 \pm 0.022 & -0.003 \pm 0.018 \\ 0.006 \pm 0.016 & 0.012 \pm 0.011 & 0.002 \pm 0.013 & -0.061 \pm 0.020 \end{bmatrix}$

Tabla A2.2 Matrices obtenidas para el espécimen *M. aff. subcristatus*, en los 4 segmentos estudiados. Cada matriz mostrada es el promedio de las 6 mediciones realizadas y cada término contiene su error experimental.

Segmento	<i>M. aff. subcristatus</i>
Telson	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.002 \pm 0.018 & -0.001 \pm 0.033 & -0.005 \pm 0.026 \\ -0.045 \pm 0.018 & 0.572 \pm 0.035 & 0.086 \pm 0.015 & 0.013 \pm 0.020 \\ 0.034 \pm 0.012 & 0.095 \pm 0.020 & -0.552 \pm 0.070 & -0.029 \pm 0.015 \\ -0.051 \pm 0.016 & 0.051 \pm 0.022 & 0.034 \pm 0.033 & -0.499 \pm 0.072 \end{bmatrix}$

Pinza	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.010 \pm 0.028 & -0.001 \pm 0.032 & -0.017 \pm 0.032 \\ -0.020 \pm 0.029 & 0.539 \pm 0.035 & 0.065 \pm 0.052 & 0.002 \pm 0.028 \\ 0.022 \pm 0.033 & 0.054 \pm 0.028 & -0.501 \pm 0.031 & -0.062 \pm 0.026 \\ -0.038 \pm 0.026 & 0.024 \pm 0.019 & -0.095 \pm 0.033 & -0.446 \pm 0.042 \end{bmatrix}$
Mesosoma 4	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.027 \pm 0.017 & 0.005 \pm 0.018 & -0.002 \pm 0.016 \\ -0.023 \pm 0.029 & 0.375 \pm 0.050 & 0.029 \pm 0.034 & 0.002 \pm 0.025 \\ 0.012 \pm 0.021 & 0.023 \pm 0.029 & -0.370 \pm 0.040 & 0.021 \pm 0.027 \\ -0.032 \pm 0.019 & 0.029 \pm 0.028 & -0.047 \pm 0.024 & -0.304 \pm 0.048 \end{bmatrix}$
Mesosoma 7	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.021 \pm 0.022 & 0.042 \pm 0.025 & 0.002 \pm 0.028 \\ -0.013 \pm 0.032 & 0.294 \pm 0.025 & 0.011 \pm 0.032 & -0.014 \pm 0.025 \\ -0.003 \pm 0.041 & 0.078 \pm 0.032 & -0.260 \pm 0.015 & 0.020 \pm 0.041 \\ -0.037 \pm 0.028 & 0.052 \pm 0.021 & -0.040 \pm 0.031 & -0.187 \pm 0.040 \end{bmatrix}$

Tabla A2.3 Matrices obtenidas para el espécimen *M. aff. variegatus* sp2, en los 4 segmentos estudiados. Cada matriz mostrada es el promedio de las 6 mediciones realizadas y cada término contiene su error experimental.

Segmento	<i>M. aff. variegatus</i> sp2
Telson	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.023 \pm 0.027 & 0.021 \pm 0.021 & -0.009 \pm 0.027 \\ -0.028 \pm 0.029 & 0.632 \pm 0.050 & 0.022 \pm 0.032 & 0.002 \pm 0.017 \\ -0.010 \pm 0.026 & 0.038 \pm 0.034 & -0.584 \pm 0.033 & -0.015 \pm 0.020 \\ -0.039 \pm 0.032 & 0.037 \pm 0.028 & -0.015 \pm 0.042 & -0.586 \pm 0.019 \end{bmatrix}$
Pinza	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.002 \pm 0.017 & 0.001 \pm 0.019 & -0.018 \pm 0.033 \\ -0.001 \pm 0.026 & 0.290 \pm 0.025 & 0.082 \pm 0.032 & 0.001 \pm 0.028 \\ 0.010 \pm 0.011 & 0.051 \pm 0.032 & -0.265 \pm 0.035 & 0.010 \pm 0.029 \\ -0.017 \pm 0.018 & 0.017 \pm 0.021 & -0.046 \pm 0.032 & -0.228 \pm 0.029 \end{bmatrix}$
Mesosoma 4	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.010 \pm 0.017 & -0.004 \pm 0.019 & -0.008 \pm 0.016 \\ -0.023 \pm 0.022 & 0.540 \pm 0.055 & 0.083 \pm 0.020 & -0.001 \pm 0.026 \\ 0.020 \pm 0.032 & 0.035 \pm 0.029 & -0.617 \pm 0.045 & 0.015 \pm 0.027 \\ -0.038 \pm 0.021 & 0.040 \pm 0.033 & 0.028 \pm 0.032 & -0.573 \pm 0.039 \end{bmatrix}$
Mesosoma 7	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.038 \pm 0.023 & 0.004 \pm 0.027 & -0.004 \pm 0.026 \\ -0.048 \pm 0.013 & 0.592 \pm 0.039 & 0.080 \pm 0.032 & -0.007 \pm 0.027 \\ -0.006 \pm 0.022 & 0.095 \pm 0.035 & -0.529 \pm 0.032 & 0.005 \pm 0.032 \\ -0.026 \pm 0.021 & 0.027 \pm 0.021 & -0.020 \pm 0.033 & -0.449 \pm 0.040 \end{bmatrix}$

Tabla A2.4 Matrices obtenidas para el espécimen *C. aff. crassimanus*, en los 4 segmentos estudiados. Cada matriz mostrada es el promedio de las 6 mediciones realizadas y cada término contiene su error experimental.

Segmento	<i>C. aff. crassimanus</i>
Telson	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.015 \pm 0.017 & 0.019 \pm 0.033 & 0.005 \pm 0.018 \\ -0.007 \pm 0.025 & 0.492 \pm 0.075 & 0.048 \pm 0.052 & 0.019 \pm 0.019 \\ -0.003 \pm 0.023 & 0.039 \pm 0.032 & -0.454 \pm 0.071 & 0.011 \pm 0.027 \\ -0.015 \pm 0.029 & 0.009 \pm 0.022 & -0.012 \pm 0.021 & -0.400 \pm 0.019 \end{bmatrix}$
Pinza	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.005 \pm 0.016 & 0.006 \pm 0.033 & -0.007 \pm 0.018 \\ -0.022 \pm 0.017 & 0.317 \pm 0.039 & 0.089 \pm 0.035 & 0.006 \pm 0.015 \\ 0.001 \pm 0.032 & 0.077 \pm 0.026 & -0.298 \pm 0.045 & 0.020 \pm 0.024 \\ -0.012 \pm 0.041 & 0.042 \pm 0.035 & -0.035 \pm 0.013 & -0.204 \pm 0.040 \end{bmatrix}$
Mesosoma 4	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & -0.052 \pm 0.021 & -0.013 \pm 0.021 & 0.017 \pm 0.026 \\ -0.021 \pm 0.017 & 0.368 \pm 0.052 & 0.042 \pm 0.052 & -0.015 \pm 0.029 \\ -0.006 \pm 0.023 & 0.058 \pm 0.028 & -0.343 \pm 0.054 & 0.030 \pm 0.036 \\ -0.011 \pm 0.029 & 0.020 \pm 0.033 & -0.058 \pm 0.041 & -0.237 \pm 0.051 \end{bmatrix}$
Mesosoma 7	$M = \begin{bmatrix} 1.000 & 0.014 \pm 0.028 & -0.020 \pm 0.028 & -0.011 \pm 0.028 \\ -0.005 \pm 0.015 & 0.372 \pm 0.022 & 0.041 \pm 0.029 & 0.004 \pm 0.026 \\ 0.002 \pm 0.028 & 0.084 \pm 0.030 & -0.383 \pm 0.042 & 0.000 \pm 0.029 \\ -0.011 \pm 0.026 & 0.026 \pm 0.027 & -0.012 \pm 0.035 & -0.284 \pm 0.037 \end{bmatrix}$

Referencias

- [1] Jeng M. L., Biofluorescence in Terrestrial Animals, with Emphasis on Fireflies: A Review and Field Observation, *Bioluminescence - Analytical Applications and Basic Biology*, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.86029.
- [2] Fallon T. R., Lower S. E., Chang C. H., Firefly genomes illuminate parallel origins of bioluminescence in beetles, *elifesciences, Genetics and Genomics*, 2018, 3. DOI: 10.7554/eLife.36495.
- [3] Michelle Ichikawa, *Biology 342 Fall 2020*.
- [4] Tsutsui K., Shimada E., Ogawa T., Tsuruwaka Y., A novel fluorescent protein from the deep-sea anemone *Cribrinopsis japonica* (Anthozoa: Actiniaria), *Scientific Reports*, 2016, 6. DOI: 10.1038/srep23493.
- [5] Foto: iStock de National Geographic.
- [6] Luo Z., Evans B. A., Chang C. H., Magnetically Actuated Dynamic Iridescence Inspired by the Neon Tetra, *ACS Nano*, 13, 2019, 4657–4666. DOI: 10.1021/acsnano.9b00822.
- [7] Shuichi Kinoshita, Shinya Yoshioka, Structural Colors in Nature: The Role of Regularity and Irregularity in the Structure, *ChemPhysChem*, 6, 2005, 1442-1459. DOI: 10.1002/cphc.200500007.
- [8] Welch, V. L., Hooijdonk, E. V., Intrater N., Vigneron, J. P., Fluorescence in insects, *The Nature of Light: Light in Nature*, Proc. SPIE 8480, Article 848004, 2012. DOI: 10.1117/12.929547.
- [9] Machan, L., Spectral sensitivity of scorpion eyes and the possible role of shielding pigment effect, *Journal of Experimental Biology*, 49, 1968, 95-105.
- [10] Polis, G.A. (Ed.), *The biology of scorpions*. Stanford, Stanford University Press, 1990, 247-293.

- [11] Moreno, A., Contribución al estudio de los escorpiónidos cubanos, Parte I, *Memorias de la Sociedad Cubana de Historia Natural*, 12 (3), 1938, 191-201.
- [12] Fet, V., Sissom, W. D., Lowe, G., Braunwalder, M. E., *Catalog of the scorpions of the world (1758 - 1998)*, New York Entomological Society, 2000.
- [13] Cloudsley J.L., Thompson M.A., Ph.D. F.R.E.S. F.L.S. F.Z.S., On the function of the pectines of Scorpions, *Annals and Magazine of Natural History*, 12, 8 (91), 1955. DOI:10.1080/00222935508655667.
- [14] Foelix R. F., Muller-Vorholt G., The fine structure of scorpion sensory organs. II. Pecten sencilla, *Bull.Br.arachnol.Soc.* 6 (2), 1983, 53-67.
- [15] Sissom, W.D., Polis, G. A., Watt, D. D., Field and laboratory methods, In: G. A. Polis (eds.), *The biology of scorpions*, Stanford University Press, Standford, 1990, 215-221.
- [16] Pavan, M., Presenza e distribuzione di una sostanza fluorescente nel tegumento degli scorpioni, *Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 30, 1954, 801-803.
- [17] Lourenco, W. R., Fluorescence in scorpions under UV light; can chaerilids be a possible exception? *Comptes Rendus Biologies*, 335 (12), 2012, 731-734. DOI: 10.1016/j.crv.2012.11.001.
- [18] Lawrence, R. F., Fluorescence in Arthropoda, *Journal of the Entomological Society of South Africa*, 17 (2), 1954, 167-170.
- [19] Fleissner, G. J., Scorpion lateral eyes: Extremely sensitive receptors of Zeitgeber stimuli, *Journal of Comparative Physiology*, 118 (1), 1977, 101-118. DOI: 10.1007/BF00612340.
- [20] Blass, G. R. C., Gaffin, D. D., Light wavelength biases of scorpions, *Animal Behaviour*, 76 (2), 2008, 365–373. DOI: 10.1016/j.anbehav.2007.12.022.

- [21] Gaffin, D. D., Barker, T. N., Comparison of scorpion behavioral responses to UV under sunset and nighttime irradiances, *The Journal of Arachnology*, 42 (1), 2014, 111-118. DOI: 10.1636/Hi12-91.1.
- [22] Gaffin, D. D., Bumm, L. A., Taylor M. S., Popokina N. V., Mann, S., Scorpion fluorescence and reaction to light, *Animal Behaviour*, 83 (2), 2012, 429-436. DOI: 10.1016/j.anbehav.2011.11.014.
- [23] Kloock, C. T., Kubli A., Reynolds R., Ultraviolet light detection: a function of scorpion fluorescence, *Journal of Arachnology*, 38 (3), 2010, 441-445. DOI: 10.2307/20798577.
- [24] Skutelsky, O., Predation risk and state-dependent foraging in scorpions: effects of moonlight on foraging in the scorpion *Buthus occitanus*, *Animal Behaviour*, 52 (1), 1996, 49-57. DOI: 10.1006/anbe.1996.0151.
- [25] Jordan, A. M., Can scorpions detect fluorescing scorpions? PhD Thesis, Department of Zoology, University of Oklahoma, Oklahoma, USA, 2010.
- [26] Kloock, C. T., A comparison of fluorescence in two sympatric scorpion species, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 91 (2-3), 2008, 132-136. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2008.02.008.
- [27] Stachel, S. J., Stockwell, S. A., Vranken, D. L. V., The fluorescence of scorpions and cataractogenesis, *Chemistry & Biology*, 6 (8), 1999, 531-539. DOI: 10.1016/s1074-5521(99)80085-4.
- [28] Frost, L. M., Butler, D. R., O'Dell, B., Fet, V., A coumarin as a fluorescent compound in scorpion cuticle, In: Fet, V. and Selden, P. A. (eds.), *Scorpions 2001, In Memoriam Gary A. Polis*. British Arachnological Society, Burnham Beeches, Buckinghamshire, UK, 365-368.
- [29] Yoshimoto Y., Tanaka M., Miyashita M., Abdel M. W., Alhussin M. A., Nakagawa Y., Miyagawa H., A Fluorescent Compound from the Exuviae of the Scorpion, *Liocheles australasiae*, *J. Nat. Prod.*, 83, 2020, 542-546. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00972.

- [30] Pavan, M., Studi sugli Scorpioni II, Contributo citometrico alla conoscenza delle cellule epidermiche e dei loro prolungamenti, Bollettino del Laboratorio de Zoologia F. Silvestri (Portici), 33, 1956, 586-593.
- [31] Stahnke, H. L., UV Light, A Useful Field Tool, BioScience, 22 (10), 1972, 604-607.
- [32] Chen, Y. J., Chiu, P. J., Lee, C., Fluorescence and multilayer structure of the scorpion cuticle, Proc. SPIE 9629, Article 96290P, 2015. DOI: 10.2307/1296207.
- [33] Hjelle J. T. Anatomy and morphology. In: G. A. Polis (eds.), The biology of scorpions, Stanford University Press, Standford, 1990, 9-63.
- [34] Constantinou, C., Cloudsley, T. J. L., Transpiration in ultra-violet light from a scorpion, Newsletters of the British Arachnological Society, 7 (44), 1985.
- [35] Prendini, L., Substratum specialization and speciation in southern African scorpions: The Effect Hypothesis revisited, In: Fet, V. and Selden, P. A. (eds.), Scorpions 2001. In Memoriam Gary A. Polis. British Arachnological Society, Burnham Beeches, Buckinghamshire, UK., 2001, 113-139. DOI: 10.1206/830.1.
- [36] Williams, S. C., Scorpion bionomics, Annual Review of Entomology, 32, 1987, 275-295. DOI: 10.1146/annurev.en.32.010187.001423.
- [37] Lourenço, W., J. Cloudsley-Thomson, The evolutionary significance of color, color pattern and fluorescence in scorpions Revue Suisse de Zoologie, 2, 1996, 449-458.
- [38] Armas, L. F., Escorpiones del archipiélago cubano. 6. Familia Diplocentridae (Arachnida: Scorpionida). Poeyana, 147, 1976, 1-35.
- [39] Armas L. F., Aspectos de la biología de algunos escorpiones cubanos. Poeyana, 211, 1980, 1-28.
- [40] Williams, S. C., Coexistence of desert scorpions by differential habitat preference, Pan-Pacific Entomologist, 46 (4), 1970, 254-267.

- [41] Stahnke, H. L., Calos, M., A key to the species of the genus *Centruroides* Marx (Scorpionida: Buthidae), *Entomological News*, 88 (5-6), 1977, 111-120.
- [42] González, S. E., Prendini L., Redefinition and generic revision of the North American vaejovid scorpion subfamily Syntropinae Kraepelin, 1905, with descriptions of six new genera, *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 382, 2013, 1-77. DOI: 10.1206/830.1.
- [43] Williams, S. C. Scorpions of Baja California, Mexico, and adjacent islands, *Occasional papers of the California Academy of Sciences*, 135, 1980, 1-127.
- [44] Wigglesworth, V. B., The physiology of insect cuticle. *Annual Review of Entomology*, 2 (1), 1957, 37-54. DOI:10.1146/annurev.en.02.010157.000345.
- [45] Kaufman L., Rousseeuw P. J., *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*, Wiley-Interscience, 1990. DOI:10.1002/9780470316801.
- [46] Ullrich, B., Duckworth, R. M., Singh, A. K., et al., Optical properties of a scorpion (*Centruroides limpidus*), *Physica Scripta*, 91 (4), 2016. DOI:10.1088/0031-8949/91/4/045802.
- [47] Kloock, C. T., Reducing scorpion fluorescence via prolonged exposure to ultraviolet light, *The Journal of Arachnology* 37 (3), 2009, 368-370. DOI: 10.1636/Sh08-87.1.
- [48] Tokumoto, H., Shimomura, H., Hakamatsuka, T., Ozeki, Y., Goda, Y., Fluorescence coupled with macro and microscopic examinations of morphological phenotype give key characteristics for identification of crude drugs derived from scorpions, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41 (4), 2018, 510–523. DOI: 10.1248/bpb.b17-00801.
- [49] Wankhede, R. A., Extraction, isolation, identification and distribution of soluble fluorescent compounds from the cuticle of the scorpion (*Hadrurus arizonensis*), Master Thesis, Marshall University, 2004.
- [50] Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, third edition, Springer, 2006.

- [51] Ghiggino, K. P., Skilton, P. F., Thistlethwaite, P. J., β -Carboline as a fluorescence standard, *Journal of Photochemistry*, 31 (1), 1985, 113-121. DOI: 10.1016/0047-2670(85)85079-6.
- [52] Musser, A. J., Rajendran, S. K., Georgiou, K., Gai, L., et al., Intermolecular states in organic dye dispersions: excimers vs. aggregates, *Journal of Materials Chemistry C*, 5 (33), 2017, 8380-8389. DOI: 10.1039/C7TC02655B.
- [53] Mitchell, R. W., Peck, S. B., *Typhlochactas sylvestris*, a new eyeless cave scorpion from Mexico (Scorpionida, Chactidae). *Ann. Spéleol*, 23, 1968, 753-777.
- [54] S. Berthier, *Iridescences*, Springer, Singapore, 2007.
- [55] T. Lenau, M. Barfoed, Colours and Metallic Sheen in Beetle Shells - A Biomimetic Search for Material Structuring Principles Causing Light Interference, *Advanced Engineering Materials*, 10 (4) 2008, 299-314. DOI: 10.1002/adem.200700346.
- [56] Wilts BD, Michielsen K, De Raedt H, Stavenga DG, Sparkling feather reflections of a bird-of-paradise explained by finite-difference time-domain modeling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111 (2014), 4363 - 4368. DOI:10.1073/pnas.1323611111.
- [57] Denton EJ. Review lecture: on the organization of reflecting surfaces in some marine animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 258, (1970) 285–313. DOI:10.1098/rstb.1970.0037.
- [58] Wilts BD, Michielsen K, Kuipers J, De Raedt H, Stavenga DG. Brilliant camouflage: photonic crystals in the diamond weevil, *Entimus imperialis*. *Proc. R. Soc. B* 279, (2012) 2524–2530. DOI:10.1098/rspb.2011.2651.
- [59] Vogler, A. Kelley, C. Covariation of defensive traits in *Cicindela* tiger beetles: a phylogenetic approach using mtDNA. *Evolution* 52, 1998, 357-366. DOI:10.2307/2411088.
- [60] S A Jewell, P Vukusic, N W Roberts, Circularly polarized colour reflection from helicoidal structures in the beetle *Plusiotis boucardi*, *New Journal of Physics* 9, 2007, 99-110. DOI:10.1088/1367-2630/9/4/099.

- [61] McDonald LT, Finlayson ED, Wilts BD, Vukusic P. Circularly polarized reflection from the scarab beetle *Chalcothea smaragdina*: light scattering by a dual photonic structure. *Interface Focus* 7, 2017, 1-11. DOI: 10.1098/rsfs.2016.0129
- [62] H. Arwin, L. Fernández del Río, K. Järrendahl, Comparison and analysis of Mueller-matrix spectra from exoskeletons of blue, green and red *Cetonia aurata*, *Thin Solid Films* 571, 2014, 739–743. DOI: 10.1016/j.tsf.2014.02.012
- [63] A. Mendoza-Galván, E. Muñoz-Pineda, K. Järrendahl, H. Arwin, Evidence for a dispersion relation of optical modes in the cuticle of the scarab beetle *Cotinis mutabilis*, *Optical Materials Express*, 4 (12), 2014. DOI:10.1364/OME.4.002484.
- [64] H. Arwin, L. Fernández del Río, C. Åkerlinda, S. Valyukha, A. Mendoza-Galván, R. Magnusson, J. Landina, K. Järrendahl, On the polarization of light reflected from beetle cuticle, *Materials Today: Proceedings*, 4 (4), 2017, 4933-4941. DOI:10.1016/j.matpr.2017.04.099.
- [65] E. Muñoz-Pineda, G. Lopez-Morales, R. Espinosa-Luna, Polarization properties of a single polygon of the cuticle of the scarab beetle *C. mutabilis* studied by micropolarimetry, *Optics Communications*, 434 (1), 2019, 65-69. DOI: 10.1016/j.optcom.2018.10.032
- [66] Vivek Sharma, Matija Crne, Jung Ok Park, Mohan Srinivasarao, Structural Origin of Circularly Polarized Iridescence in Jeweled Beetles, *Science* 325, 2009, 449-451. DOI: 10.1126/science.1172051.
- [67] G. Horváth, D. Varju, *Polarized Light in Animal Vision*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.
- [68] E. Muñoz-Pineda, K. Järrendahl, H. Arwin, A. Mendoza-Galván, Symmetries and relationships between elements of the Mueller matrix spectra of the cuticle of the beetle *Cotinis mutabilis*, *Thin Solid Films*, 571, 2014, 660–665. DOI: 10.1016/j.tsf.2013.11.144.
- [69] Dennis H. Goldstein, *Polarized light*, CRC Press, Third edition, 2011.

- [70] S. Y. Lu and R. A. Chipman, Mueller matrices and the degree of polarization, *Optics Communications*. 146, 1998, 11-14. Doi: 10.1016/S0030-4018(97)00554-3.
- [71] J. J. Gil and E. Bernabeu, "A depolarization criterion in Mueller matrices", 32 (3), 1985, 259-261. *Optica Acta*. DOI:10.1080/713821732.
- [72] J. J. Gil and E. Bernabeu, "Depolarization and polarization indices of an optical system", *Óptica Acta* 33 (2), 1986, 185-189. DOI: 10.1080/713821924. Nota: *Óptica Acta* cambió de nombre, a *Journal of Modern Optics* (J. Mod. Opt.).
- [73] R. Espinosa-Luna, G. Atondo-Rubio y O.J. Velarde-Escobar, Métrica de depolarización escalar $Q(M)$ como criterio para identificar sistemas retardadores o desfasadores puros, *Revista Mexicana de Física*, 56 (5), 2010, 406–410.
- [74] Espinosa L. R., Bernabeu E., Atondo R. G., $Q(M)$ and the depolarization index scalar metrics, *Optical Society of America, Appl. Opt.*, 47 (10), 2008, 1575-1580. Doi: 10.1364/AO.47.001575
- [75] Williams M. W., Depolarization and cross polarization in ellipsometry of rough surfaces, *Applied Optics*, 25 (20), 1986, 3616-3622. Doi: 10.1364/AO.25.003616
- [76] Collet C., Zallat J., Takakura Y., Clustering of Mueller matrix images for skeletonized structure detection, *Optics Express*, 12 (7), 1271, 2004. DOI: 10.1364/OPEX.12.001271.
- [77] Bickel W. S., Bailey W. M., Stokes vectors, Mueller matrices, and polarized scattered light, *American Association of Physics Teachers*, 53 (5), 1985, 468-478. DOI:10.1119/1.14202
- [78] Kloock C. T., Aerial Insects Avoid Fluorescing Scorpions, *Euscorpius-Occasional Publications in Scorpology*, 21, 2005, 1-7. DOI: 10.18590/euscorpius.