



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL
PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN
SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE
ONDA INCIDENTE**

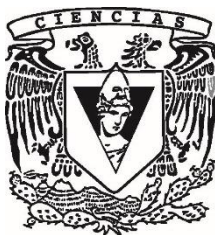
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICA

P R E S E N T A:

NADIA ESTEFANIA ÁLVAREZ CHÁVEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ARGELIA PÉREZ PACHECO

Ciudad Universitaria, CDMX.,

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi asesora y consejera la Dra. Argelia Pérez Pacheco por el incondicional apoyo, tiempo, dedicación y la guía para realizar este trabajo, tanto en sus sugerencias como en las correcciones. Ha sido un privilegio para mí, el poder contar con su sabiduría.

También quisiera agradecer al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) de mi gran querida institución la UNAM, así como el equipo que está dirigido por el Dr. Augusto García Valenzuela que me permitió llevar a cabo el proceso inicial de este trabajo. Quien fue parte fundamental con ayuda de sus conocimientos y experiencia, para realizar el modelo teórico que describe el montaje experimental.

Mi agradecimiento se hace extensivo al laboratorio de Hematología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, así como al Dr. Adolfo Martínez Tovar, la Dra. Irma Olarte Carrillo y al personal que labora en esta sección del hospital. Ya que con su autorización e intervención, se me proporcionaron las muestras celulares de los leucocitos, para realizar la investigación propuesta.

Y por encima de todo, quisiera agradecer a mi familia por el apoyo que recibí durante mi formación académica, por ser la parte fundamental en la motivación de este trabajo, al tener paciencia y tolerar mi ausencia en innumerables convivencias.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

DEDICATORIAS

Quisiera dedicar este trabajo a mis padres **Magdalena Inés Chávez Altamirano** y **Francisco Apolinar Álvarez Casillas (q. e. p. d.)** por impulsarme, ser el principal motivo al estudiar ésta carrera y un gran ejemplo para lograr mi meta profesional. Mamá, fuiste sin duda alguna la guía, el amor y el soporte durante todo este tiempo. Papá, por el tiempo breve que estuviste conmigo físicamente, compartiendo tu amor, conocimiento y esa capacidad de asombro por la ciencia. “Nos volveremos a encontrar cuando seamos resto de polvillo cósmico.”

A mis hermanos **Marian Berenice, Marcos Francisco, Edgar Josué y Jorge Isaac** por brindarme su tiempo, consejos y experiencias, que siempre compartieron día a día durante el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis sobrinos **Francisco Alberto, Paola, Azul Jimena, Regina, Santiago, Mateo Sebastian y Alan Andre**, porque la ciencia nace a partir de la infancia, con sus famosas preguntas “¿Por qué? y ¿Cómo?”. Nunca dejen perder su capacidad de asombro

A mí querida abuelita materna **María de la Luz Chávez** porque siempre me impulso ante las dificultades que se me presentaron en esta carrera dedicada a la ciencia, por tu gran amor gracias “Mi científica”.

A mis queridos abuelitos paternos **Guadalupe Casillas y Jacinto Álvarez (q. e. p. d.)**, por su gran amor y calidad humana, que me enseñaron durante mi niñez y adolescencia; lo que me hizo ser cada día una mejor persona.

A mis tíos maternos y paternos, cuñados, primos y de más familiares con cariño, ya que cada uno de forma directa o indirecta aportó un granito de arena a este trabajo.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Contenido

• Resumen	
• Capítulo 1: Introducción	6
.1.1. Antecedentes y motivación	6
Planteamiento del Problema	6
.1.2. Objetivos	9
.1.3. Justificación y Alcance	10
• Capítulo 2: La luz y sus propiedades	11
.2.1. Espectro electromagnético	11
.2.2. La luz y la materia	12
.2.2.1. Teoría ondulatoria de la luz	13
.2.2.2. Teoría corpuscular de la luz	17
.2.3. Fenómenos ópticos de la luz al interactuar con la materia	19
.2.3.1. Reflexión	19
.2.3.2. Refracción	23
.2.3.3. Transmitancia	24
.2.3.4. Esparcimiento	26
.2.3.5. Absorción	29
.2.4. Aproximación por Difracción Anómala (ADA) para partículas mayores que la longitud de onda incidente.	33
2.4.1 Modelo teórico y simulaciones numéricas	34
• Capítulo 3: Partículas y Células	39
.3.1. Partículas	39
.3.2. Células Sanguíneas	41
Plasma, Eritrocitos o glóbulos rojos, Leucocitos o glóbulos blancos y plaquetas	
.3.3. Leucocitos	42
Granulocitos (Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos) y Agranulocitos (Monocitos y Linfocitos)	
.3.4. Lisis Celular	46
.3.5. Propiedades Biofísicas de las Células	47
3.5.1. Densidad óptica	47
.3.6. Enfermedades patológicas	48
3.6.1. Leucemia	49
3.6.2. Anemia	51

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

3.6.3. Mieloma múltiple	53
.3.7. Métodos de conteo de células	54
3.7.1. Citómetro de flujo	55
3.7.2. Cámara de Neubauer	56
• Capítulo 4: Dispositivo Propuesto	58
.4.1. Componentes del sistema óptico	59
.4.2. Metodología	62
4.2.1. Procedimiento y preparación de las muestras	63
.4.3. Esquema del Diseño	67
4.3.1. Fuera de la distancia focal	68
4.3.2. Límite de la distancia focal	69
4.3.3. Dentro de la distancia focal	70
• Capítulo 5: Resultados	72
.5.1. Experimentos previos	72
Monocapas de eritrocitos	
Lisis mediante soluciones hipotónicas e hipertónicas	
.5.2. Montaje Óptico	78
5.2.1. Partículas de Borosilicato	78
Conteo preliminar de partículas de Borosilicato	
5.2.2. Curva de Calibración con micropartículas de Borosilicato	
Ajuste teórico por ADA	84
5.2.3. Partículas de Leucocitos	85
Ajuste teórico por ADA	
• Capítulo 6: Conclusiones	91
• Bibliografía.	93

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

RESUMEN

En este trabajo se presenta un arreglo experimental óptico portátil que mide la potencia del haz transmitido al pasar por una muestra de partículas en suspensión. Con este arreglo experimental se estudia la densidad óptica en número de partículas, cuyo tamaño es mayor que la longitud de onda incidente, cumpliendo con la Teoría de Mie y la ley de Beer-Lambert. Para la parte teórica se utilizó la llamada aproximación de difracción anómala (ADA) para calcular los coeficientes de amplitud de dispersión de las partículas y simular la transmitancia coherente de la luz, en función de la densidad óptica en número de las partículas. Se muestran los resultados experimentales al aplicar la técnica para conocer la transmitancia de: 1) micro-partículas esféricas huecas de borosilicato con un diámetro aproximado de $10\ \mu\text{m}$, suspendidas en agua tridestilada a distintas concentraciones y 2) células de leucocitos suspendidas en PBS. Para la obtención de los leucocitos se utilizaron 5 ml de sangre periférica de donadores sanos y con diagnóstico de leucemia del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". La separación de las células se realizó por medio de gradiente de densidad y por medio de una solución hipertónica de lisis de eritrocitos. El conteo de leucocitos mediante cámara de Neubauer dio una viabilidad del 98%.

El esquema experimental propuesto fue probado primero con partículas de Borosilicato para calibrar el sistema, encontrando su utilidad y sensibilidad para mediciones de partículas suspendidas en medios con alta transparencia en la región visible. Este diseño mostró mayor eficiencia para obtener información referente al comportamiento de la luz de muestras con baja absorción que por los métodos tradicionales no es posible obtener. Los resultados experimentales fueron congruentes con el modelo teórico propuesto.

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes y motivación

Actualmente existen numerosas técnicas de análisis clínico para determinar la bioquímica y la estructura de las células, partículas o bacterias que se basan en fenómenos ópticos. Algunas de estas técnicas se llevan a cabo utilizando instrumentos ópticos como: el microscopio óptico de campo brillante, el de contraste de fase, el de luz ultravioleta y fluorescencia, el de transmisión, el microscopio electrónico de barrido y la citometría de flujo. La morfología, número de partículas, cambios en las propiedades ópticas etc, son algunas de las características que permiten identificar anomalías en las células. Desarrollar nuevos métodos y/o técnicas más rápidos, a costos más bajos contribuirá a tener un diagnóstico oportuno y certero que complemente las técnicas de análisis clínico de hoy en día. Por lo anterior en esta tesis se desarrolló un sistema portátil y sensible para medir la transmitancia de partículas en medios altamente transparentes el cual tiene un gran potencial para ser usado al estudio de la dinámica celular.

Para estudiar la morfología de las células en un microscopio óptico o electrónico se realiza la preparación de la muestra siguiendo cuatro pasos fundamentales: 1) fijación, en el cual se logra detener procesos de destrucción, celular o histológica, es decir, rompimiento del tejido; 2) inclusión, se refiere a que el tejido tenga suficiente firmeza al cortarse, el agua que contiene el tejido se sustituye por una sustancia que le da rigidez y evita que se deforme; 3) corte, como su nombre lo indica se realizan cortes utilizando equipos especiales, los cuales presentan una cuchilla que corta "lascas" del material. Para microscopía óptica se utilizan cuchillas de acero y recibe el nombre micrótomo, para microscopía electrónica se utilizan cuchillas de vidrio o diamante y recibe el

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

nombre de ultramicrotomas, estos cortes se montan en un portaobjetos para su observación en el microscopio y 4) coloración, para el estudio de cortes en el microscopio es necesario colorear previamente las muestras con diferentes compuestos químicos (el más común azul de tripano) los cuales tienen la capacidad de reaccionar con los componentes de las estructuras celulares.

La posibilidad de observar una coloración dada en una estructura celular se debe a que esta se comporta como filtro de color, dejando pasar solamente la luz de una determinada longitud de onda. Este tipo de colorantes, tal como el azul de tripano, es utilizado para el conteo de células, en el caso de querer determinar el número de leucocitos se puede observar su viabilidad usando una cámara de Neubauer. El azul de tripano, es un colorante azoico el cual se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permite diferenciar células vivas de células muertas. Las células muertas son aquellas que tienen rompimiento en la membrana celular por lo que se tiñen de azul ya que los compuestos químicos pueden atravesar la membrana celular y en las células vivas la membrana permanece intacta. Figura 1.1

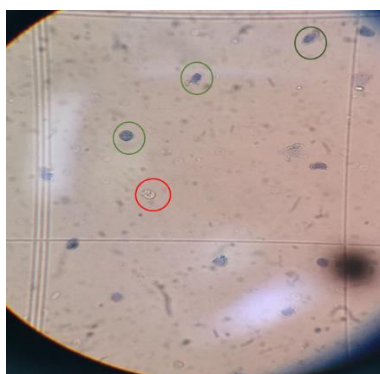


Figura 1.1 Conteo celular utilizando azul de tripano. Las células muertas son la que se encuentran encerradas en los círculos azules y célula viva aquella que se encuentra encerrada con el círculo rojo.

Para el estudio de la morfología, clasificación de las células y recuento, se utiliza la citometría de flujo. Un citómetro de flujo se basa en la captación de las

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

señales luminosas que percibe una muestra sanguínea, las cuales son detectadas y transformadas en impulsos eléctricos que se amplifican y convierten en señales digitales. Para obtener éste tipo de señales luminosas, a la muestra sanguínea se le aplican colorantes, los cuales son llamados biomarcadores, es decir, colorantes fluorescentes, que se encuentran en una suspensión procesada y teñida, ésta muestra atraviesa un finísimo tubo transparente sobre el cual incide un haz de luz monocromática donde va dispersando la luz en todas direcciones. Esta luz transmitida se va recolectando en detectores fotomultiplicadores de tal forma que permiten identificar tamaño y morfología de las células sanguíneas.

Algunas de las anormalidades morfológicas de las células en el caso de los leucocitos son la neutrofilia, neutropenia, eosinofilia, eosinopenia, basofilia, basopenia, monocitosis, monocitopenia, linfocitosis, linfocitopenia; en el caso de los eritrocitos anormalidades son anocitosis, microcitos, macrocitos, normocromo, hipocromía, hipercromía, policromacia, poiquilocitosis, anisocitosis, esferocitosis, eliptocitos, estomatocitos, drepanocitos, dianocitos, dacrocitos, excentrocitos; y en las plaquetas algunas de las anormalidades morfológicas son: megatrombocitosis, microtrombocitosis, trombocitopenia y trombocitosis. Estas anormalidades morfológicas pueden provocar patologías graves en los seres humanos, tales como la anemia, leucemia y mieloma.

Planteamiento del problema

Diferentes técnicas ópticas han sido utilizadas para conocer partículas de tamaño que no son visibles por el ojo humano. A finales del siglo XVI los Holandeses Zacharias Janssen (1588-1642) y su padre Hans Martens, construyeron el primer microscopio compuesto que les permitió observar células, empleado por primera vez por Robert Hooke (1635-1703)^[1].

Estudiar la estructura de las células, tejidos y órganos que constituyen los componentes del cuerpo humano y organismos pluricelulares ha sido de gran

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

interés en la medicina. A lo largo de los años, diversos métodos y técnicas han sido desarrollados con el fin de conocer con más profundidad la morfología y función de los diferentes niveles de organización de la materia. Para estudiar las células pueden utilizar métodos ópticos (físicos) y cito químicos. El primer método nos da información morfológica de los componentes celulares, mientras que el segundo nos proporciona la composición de sus estructuras.

En este trabajo se presenta un diseño experimental para determinar, concentraciones de partículas en suspensión. El diseño óptico desarrollado en esta tesis, realiza el conteo de células con alta transparencia de forma eficaz en función del tiempo con resultados más precisos que el que arroja la utilización de la cámara de Neubauer, a partir de un haz de luz y midiendo transmitancia de luz coherente.

1.2 Objetivo

Diseñar un sistema portátil que analice la componente coherente de la luz transmitida de partículas con diámetro mayor que la longitud de onda incidente.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Determinar la configuración ideal así como la cantidad requerida para observar propiedades de las partículas en suspensión.
- Conocer el límite de detección del sistema.
- Identificar y cuantificar la densidad óptica en número de partículas a través de la transmitancia de luz coherente.
- Identificar diferencias en la cantidad de leucocitos de pacientes sanos y pacientes con leucemia.
- Realizar un modelo teórico basado en la teoría de Mie y la ley de Beer-Lambert utilizando el método de Aproximación de Difracción Anómala (ADA), para ajustar los valores experimentales.

1.3 Justificación y Alcance

El conteo celular utilizando un hematocitómetro o cámara de Neubauer es uno de los métodos más usados debido a su simplicidad, sin embargo dada la naturaleza subjetiva del conteo manual humano puede llevar a una amplia variación en los resultados. Con base en estas observaciones, a fin de mejorar el conteo y tener un diagnóstico más certero, se propone la medición a través de la transmitancia de luz coherente.

La propuesta desarrollada en este trabajo busca un método rápido y confiable para detectar anomalías respecto a la densidad de células en la sangre, con ello beneficiar a un mayor número de personas que presenten diferentes enfermedades patológicas.

Capítulo 2. La luz y sus propiedades

Para el estudio óptico de las células y partículas en general, es importante tener conocimiento sobre la interacción de la luz con la materia, así mismo como conocer las propiedades de la luz y las leyes que describen su comportamiento. El sistema óptico que se propone mide la componente coherente de la luz transmitida al pasar por una suspensión de células cumpliendo con la llamada ley de Beer-Lambert y la dispersión de Mie, ya que es utilizada para partículas con diámetro mayor que la longitud de onda incidente.

En el siguiente capítulo se hablará sobre los principios físicos que describen el comportamiento de la luz con la materia y el modelo teórico que nos permite entender el comportamiento del sistema propuesto, utilizando el método de Aproximación por Difracción Anómala (ADA)

2.1 Espectro electromagnético

Se denomina espectro electromagnético a la distribución del conjunto de ondas electromagnéticas, es decir a la propagación de un estado de perturbación del campo eléctrico (**E**), variable en el tiempo que genera un campo magnético (**B**) que es en todas partes perpendicular a la dirección en la que **E** cambia; de la misma manera si **B** es variable en el tiempo, **E** será perpendicular a éste. En 1867, Maxwell publicó la primera descripción extensa sobre éstas ondas, la cual denominaba banda de frecuencias y que se extendía del ultravioleta (<400nm), pasando por el espectro visible (400nm – 700nm) y el infrarrojo (>750nm). Todo el espectro se extiende desde la radiación de menor longitud de onda (rayos gamma, rayos X, hasta la de mayor longitud de onda (ondas de radio) Figura 2.1.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Las ondas electromagnéticas se transmiten a la velocidad de la luz ($3 \times 10^8 \text{ m/s}$), mientras más corta sea la longitud de onda, más alta será la frecuencia [1,11].

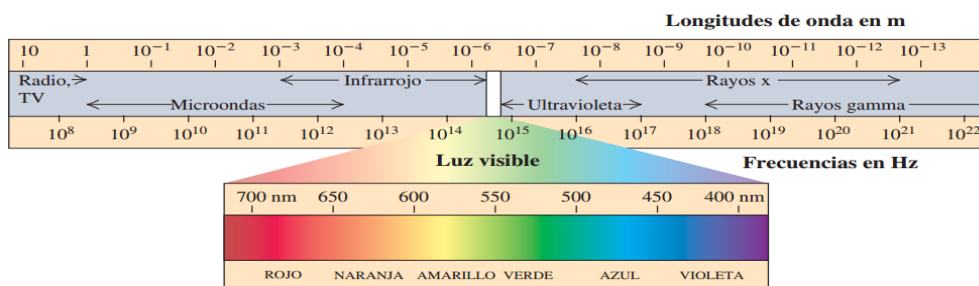


Figura 2.1 Espectro electromagnético. (Fuente: Sergio Fonrouge (2013), catedra de informática Espectro Electromagnético, recuperado de <https://sites.google.com/site/ondaselecmag>)

2.2 La luz y la materia.

La luz visible es energía que corresponde a la radiación electromagnética en la banda estrecha en el rango de los 400 A 700nm, la cual está formada por partículas elementales denominadas fotones. Estas partículas carentes de masa y carga eléctrica, viajan en el vacío a la velocidad de la luz. Los fotones son producidos por cargas en movimiento las cuales a su vez generan campos electromagnéticos. El fotón presenta tanto propiedades corpusculares como ondulatorias, dependiendo del experimento y del tipo de interacción que sufre con la materia es su comportamiento. Experimentos científicos han demostrado la dualidad onda-partícula de la luz; tales como el experimento de Young, la polarización de la luz y el biprisma de Fresnel, que nos describen un carácter ondulatorio y finalmente el efecto fotoeléctrico que describe un comportamiento corpuscular, de esta manera estos fenómenos denominan el comportamiento de la luz como una dualidad onda-partícula [1,10].

2.2.1 Teoría Ondulatoria de la luz.

En 1678, el físico holandés Christiaan Huygens, desarrolla la teoría ondulatoria de la luz, la cual afirmaba que las leyes de la óptica se basan en la suposición de que la luz es de naturaleza ondulatoria. Con ello, explicaba además la existencia de los colores que Newton adjudicaba a diferentes tipos de partículas [10].

Los colores se deben a que las ondas de la luz oscilan con diferentes frecuencias, es decir, recorren en un ciclo a distintos tiempos. La frecuencia de una oscilación se define como el número de ciclos que se completan sobre una unidad de tiempo. Físicos como Christiaan Huygens (1629-1695), Augustin-Jean Fresnel (1788-1821) y James Clerk Maxwell (1831-1879) apoyaban esta teoría.

- Principio de Huygens

En 1690 mediante la publicación *Traité de la Lumière*, Huygens formuló así la teoría ondulatoria de la luz, donde proponía que la luz era emitida en todas direcciones como un conjunto de ondas que se desplazan por un medio en el que denomino éter [26, 27]. Describiéndolo de la siguiente manera: “*cada punto en una fuente de onda en propagación S_1 sirve como fuente de trenes de ondas esféricas secundarias S_2 , de tal modo que al cabo de cierto tiempo, el frente de onda será la envolvente de estos trenes de onda, por otro lado, si la onda que se propaga tiene una frecuencia ν , y se transmite por el medio a una velocidad v_t , entonces los trenes de ondas secundarios tendrán la misma frecuencia y velocidad.*” Figura 2.2

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

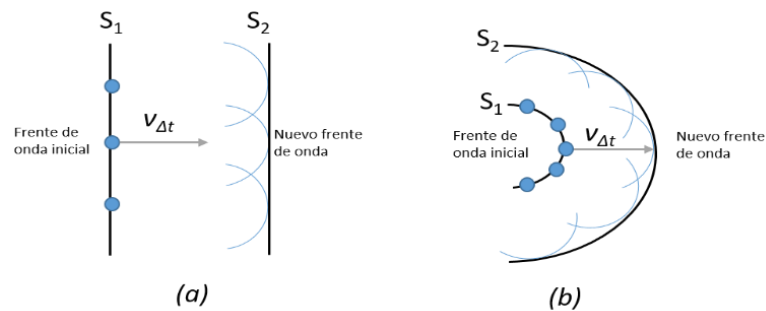


Figura 2.2 (a) propagación de onda plan, (b) propagación onda esférica.

Este principio es una descripción geométrica de la propagación de la luz, por esta razón Huygens afirmó que la luz se transmite como una onda y no como una partícula, dando sustento a comprender fenómenos como el efecto Doppler. Esta teoría fue posteriormente modificada matemáticamente por Fresnel en 1826 (es por esa razón que se denomina frecuentemente “principio de Huygens-Fresnel”), observando que el segundo nuevo frente de onda que, según está formulación, también se formaría hacia atrás llamándolo interferencia [27]. Posteriormente Kirchhoff demostró que el principio de Huygens-Fresnel era un análisis matemático donde las ondas elementales procedentes de fuentes individuales realmente se destruyen entre sí debido a su interferencia mutua, excepto en la superficie envolvente que aparece en el sentido de propagación original, deduciéndose a partir de la propia ecuación de onda.

- Principio de Fresnel o Principio de Huygens-Fresnel

Fresnel, considerando el principio de Huygens, describe de la siguiente manera el frente de ondas: *“cada punto sin obstrucción de un frente de onda con un instante de tiempo determinado, sirve como fuente de trenes de onda secundarios esféricos (la misma frecuencia que la onda primaria). La amplitud del campo óptico en cualquier punto más allá de la superposición de todos estos frentes de onda (considerando sus amplitudes y fases relativas).”*

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Esta visión de propagación de las ondas ayuda a entender mejor diversos fenómenos ondulatorios como la difracción. En este caso el principio simplemente afirma que en una apertura cada punto genera nuevas ondas, por lo que los puntos situados en los extremos de la apertura producirán ondas que, al no tener otras a cada lado, se podrán “abrir” dando el resultado de una difracción. Figura 2.3

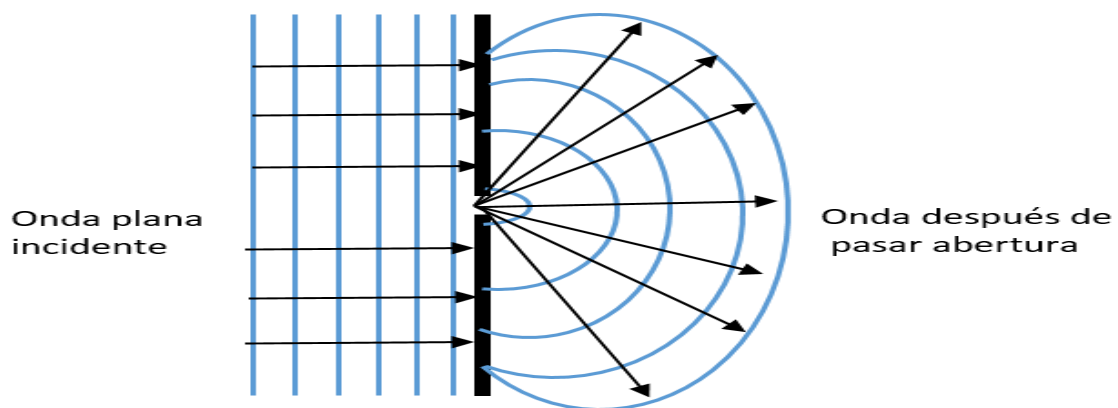


Figura 2.3 Principio de Fresnel-Huygens (difracción de una onda plana cuando el ancho de la ranura es igual que la longitud de onda.)

En 1865 Maxwell descubre que la perturbación del campo electromagnético puede propagarse en el espacio a una velocidad que coincide con la velocidad de la luz en el vacío, diciendo de esta manera que las ondas electromagnéticas son ondas luminosas. Antes de que Maxwell llegara a esta conclusión y formulara sus famosas ecuaciones llamadas “*Las ecuaciones de Maxwell*” hubo formulaciones anteriores como la ley de Ampere, Gauss y Faraday que son en las que se basan estas ecuaciones ^[10]. (Tabla 2.1)

**DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE
PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE**

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Forma diferencial	Forma integral	
$\nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0}$	$\oint \bar{\mathbf{E}} \cdot d\bar{\mathbf{A}} = \frac{q}{\epsilon_0}$	Gauss Eléctrica
$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0$	$\oint \bar{\mathbf{B}} \cdot d\bar{\mathbf{A}} = 0$	Gauss Magnética
$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}$	$\oint \bar{\mathbf{E}} \cdot d\bar{\mathbf{s}} = -\frac{d\phi_B}{dt}$	Faraday
$\nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t}$ $\nabla \times \mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{J} + \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}$	$\oint \bar{\mathbf{B}} \cdot d\bar{\mathbf{s}} = \mu_0 i + \frac{1}{c^2} \frac{\partial}{\partial t} \int \bar{\mathbf{E}} \cdot d\bar{\mathbf{A}}$	Ampere

Tabla 2.1 Ecuaciones de Maxwell en su forma diferencial e integral.

- Teoría ondas electromagnética de Maxwell

En el otoño de 1860, Maxwell confirmó la idea de que la luz se comportaba como si fueran líneas en movimiento, es decir, como ondas o frentes de onda, de tal forma que describían el fenómeno electromagnético [10,12]. Maxwell encontró la relación entre los fenómenos eléctricos y ópticos, concluyendo que las descargas eléctricas producían luz, relacionando el electromagnetismo y la óptica, donde los campos eléctricos y magnéticos describen una simetría notable, es decir, el campo **E** afecta al campo **B**, así como a su vez **B** afectara al campo **E**. Esta simetría matemática describe a su vez una gran simetría física en la cual se comporta la luz (Figura 2.4); estos comportamientos perfectamente acoplados se propagan en el espacio como una entidad individual libre de cargas y corrientes, sin materia, sin éter [1,12].

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

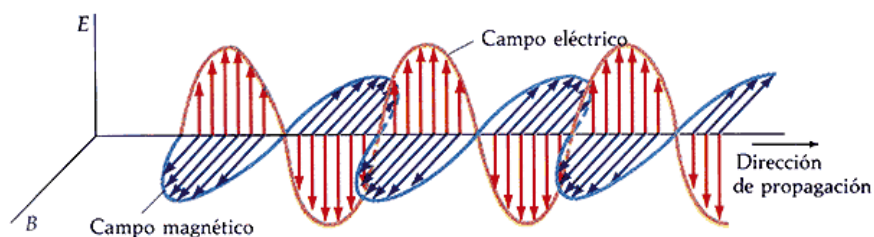


Figura 2.4 Propagación de la luz como una onda electromagnética. (Fuente: "Maxwell: la teoría electromagnética de la luz")^[12]

En resumen, si una carga eléctrica en movimiento crea un campo magnético; una carga eléctrica en movimiento acelerado creará un campo magnético variable y así sucesivamente. Maxwell predijo la existencia de ondas electromagnéticas, cuya fuente se encontraba en cargas eléctricas sometidas a una aceleración, que como todo fenómeno ondulatorio conlleva una transmisión de energía, esto confirma la composición ondulatoria de la luz que se propaga sin un medio material.

2.2.2 Teoría Corpuscular de la Luz

En 1704, previo a todos los experimentos que explican la teoría ondulatoria, Isaac Newton propone la teoría corpuscular de la luz, la cual afirmaba que la luz está formada por corpúsculos y se propagan en línea recta. Estas partículas van en línea recta y a gran velocidad por las distintas fuentes de luz refiriéndose a ellas como el sol, una vela o cualquier fuente de luz ^[13]. Fue en 1905, en que Albert Einstein explicó con el efecto fotoeléctrico que la luz se comporta como partícula ^[13].

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

- Efecto fotoeléctrico

Se atribuye el descubrimiento del efecto fotoeléctrico a Heinrich Hertz, en 1887, al tratar de probar la teoría de Maxwell sobre las ondas electromagnéticas, aunque realmente fue la primera prueba experimental que mostraba el carácter corpuscular de la luz.

El efecto fotoeléctrico tiene lugar cuando un fotón choca contra un electrón y lo arranca del metal, el fotón debe tener una energía mínima ($h\nu_0$) igual a la energía de ionización del átomo, para que el electrón pueda abandonar la influencia del núcleo. Si utilizamos radiaciones de menor energía (frecuencia) el efecto fotoeléctrico no se observa, la intensidad de la radiación está relacionada con el número de fotones que inciden sobre el metal, a mayor número de fotones mayor cantidad de electrones emitidos. La energía mínima (ϕ) necesaria que necesita el fotón para arrancar el electrón al suministrarle energía cinética (E_k), si el electrón absorbe energía (E), la diferencia de $E - \phi$ será la energía cinética del electrón emitido pudiendo escribirse el siguiente balance energético $E_k = E - \phi$ [13]. Donde $E = hf$, siendo h la constante de Planck y f a frecuencia de la onda electromagnética. Figura 2.5

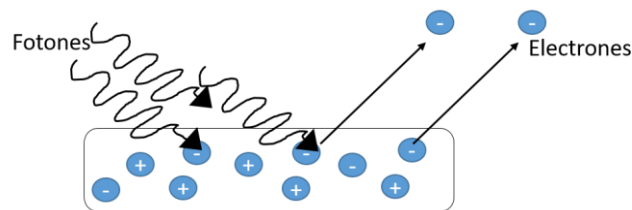


Figura 2.5 Efecto fotoeléctrico

De acuerdo a estas teorías podemos comprobar que la luz presenta un comportamiento dual onda-partícula. Posee esta doble naturaleza en la que puede explicar los fenómenos de la propagación (teoría ondulatoria) y de la interacción luz-materia (teoría corpuscular).

2.3 Fenómenos ópticos de la luz al interaccionar con la materia

Cuando un haz de luz incide en un medio con un índice de refracción diferente al medio inicial, la velocidad de propagación del haz transmitido cambia con respecto al medio incidente. Estos cambios de velocidad son importantes pues producen fenómenos ópticos como: *reflexión*, *refracción* y *transmisión* que es donde la luz se comporta como onda, siendo estos una manifestación macroscópica de los fenómenos ópticos como la *dispersión* y *absorción* donde la luz se comporta como partícula. Dependiendo de la intensidad y la longitud de onda de la fuente de luz, así como las características de la muestra es que pueden ocurrir algunos de estos fenómenos.

2.3. 1 Reflexión

Cuando un rayo de luz incide en la superficie de un material transparente como una lámina de vidrio, la luz se comporta como una onda al entrar en contacto con una enorme distribución superficial de átomos muy próximos entre sí. Cuando la luz atraviesa una interfaz como aire-vidrio, los rayos que son desviados en dirección contraria de la superficie del material y regresan al medio que salieron formando un ángulo igual al de la luz incidente, es a lo que llamamos luz reflejada o reflexión. (Figura 2.6)

En consecuencia cuanto mayor sea la longitud de onda (λ), más profunda será la región de penetración involucrada, es decir, capas de más de mil átomos siendo mayor el número de dispersores que actúan juntos, el resultado final es que la superficie de un medio transparente refleja todas las longitudes de onda prácticamente de la misma manera y nunca aparece un color determinado.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

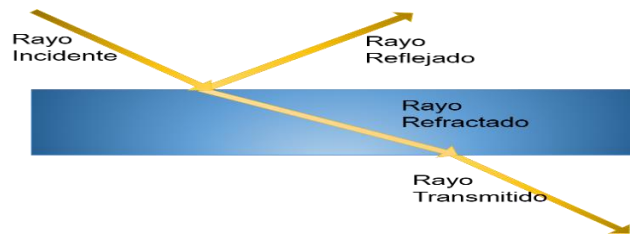


Figura 2.6 Trayectoria de los rayos

- Ley de la Reflexión

Esta ley establece que la dirección del haz reflejado viene determinado por una diferencia constante de fase entre los dispersores atómicos, es decir, entre las partículas que están distribuidas en la superficie, ésta a su vez viene determinada por el ángulo que dibuja la onda incidente con la superficie, denominado ángulo de incidencia. Figura 2.7

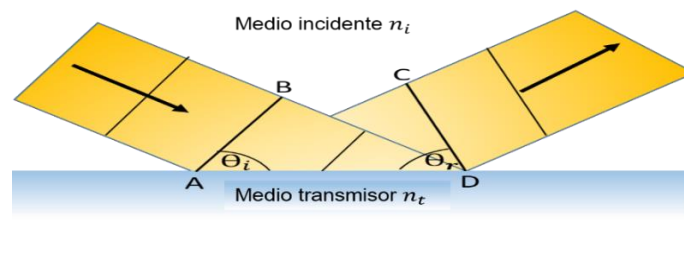


Figura 2.7 Ley de la reflexión, frente de ondas planas que inciden por la izquierda son reflejadas del lado derecho, con el mismo ángulo de incidencia

Todas las ondas de la Figura 2.7 viajarán en el medio incidente con la misma velocidad (v_i), de ahí determinamos que el tiempo (Δt) que tarde el punto B del tren de ondas, en llegar al punto D de la superficie y el tren de ondas emitido desde el punto A al punto C sea el mismo, dicho de este modo $\overline{BD} = v_i \Delta t = \overline{AC}$ y de acuerdo a la imagen vemos que $\sin \theta_i = \sin \theta_r$ por lo que significa que $\theta_i = \theta_r$, es decir *el ángulo de incidencia es igual al ángulo de reflexión*. Esta ecuación es la primera parte de la ley de reflexión.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Ahora bien, un rayo es una línea dibujada en el espacio que corresponde a la dirección del flujo de energía radiante en un medio uniforme (homogéneo), los rayos son rectos. Si el medio se comporta del mismo modo en todas direcciones (isótropo) los rayos serán perpendiculares a los trenes de onda. La segunda parte de la ley de la reflexión establece que *el rayo incidente, la perpendicular de la superficie y el rayo reflejado, se encuentran todos en un mismo plano que se denomina plano de incidencia*, hablamos de esta manera de un fenómeno tridimensional.

Decimos entonces que la reflexión puede ser de dos maneras: difusa y especular según como la superficie reflectora sea, rugosa o lisa. Si la superficie es lisa, de manera que las irregularidades puedan ser menor a la longitud de onda incidente, los rayos incidentes salen reflejados paralelamente y en una misma dirección (Figura 2.8-a) a este tipo de reflexión es llamado reflexión especular.

Por otro lado, si la superficie es rugosa los rayos luminosos se reflejarán en todas las direcciones (Figura 2.8-b) este tipo de reflexión es la más frecuente y se le conoce como reflexión difusa.

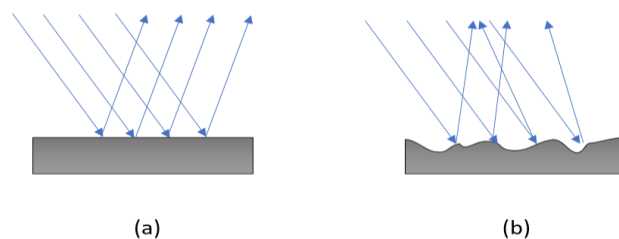


Figura 2.8 Reflexión especular (a); Reflexión difusa (b).

- Reflexión total interna

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Se denomina reflexión total interna cuando $\theta_i \geq \theta_c$ el llamado ángulo crítico. Donde el ángulo crítico es θ_c . Suponemos que tenemos una fuente sumergida con índice de refracción n_i en un medio ópticamente denso como por ejemplo agua, permitiendo que θ_i (el ángulo de incidencia) aumente gradualmente.

Al hacer crecer θ_i , el rayo transmitido se aproxima gradualmente a la tangencia con la frontera, conforme lo va haciendo una mayor cantidad de la energía disponible va apareciendo en el haz reflejado. Figura 2.9–a. Por ultimo cuando $\theta_i = 90^\circ$, el $\sin \theta_t = 1$ y el $\sin \theta_c = n_{ti}$ siendo n_{ti} el índice de refracción relativo es decir $n_{ti} = \frac{n_t}{n_i}$; donde n_i índice de refracción incidente, en este caso el agua y n_t índice de refracción transmitido el aire, quedando entonces como ángulo crítico en términos del ángulo incidente θ_i y el ángulo transmitido con $\theta_t = 90^\circ$, de tal forma que mientras mayor sea n_i menor será n_{ti} y θ_c , es decir, toda la energía incidente se refleja de nuevo hacia el medio incidente, y es a este fenómeno que se denomina reflexión total interna. Figura 2.9–b

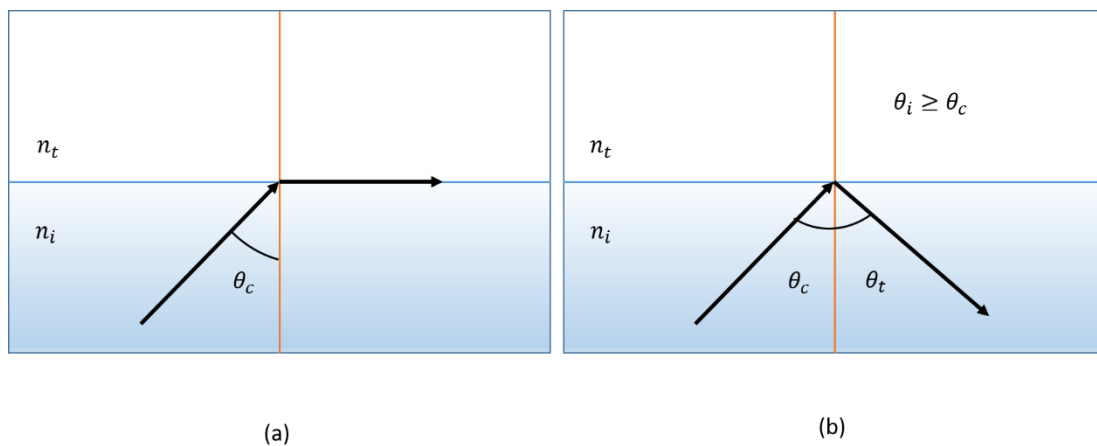


Figura 2.9 (a) Ángulo Crítico y (b) Reflexión total interna

2. 3. 2 Refracción

Cuando un rayo de luz incide sobre una interfaz con ángulo determinado es decir $\theta_i \neq 0$, la interfaz se comporta como un medio sin homogeneidad y los átomos que componen el medio, esparcen los rayos hacia atrás como si fueran reflejados y hacia adelante como si fuera un rayo transmitido. Al hecho de que los rayos incidentes se doblen o desvíen de su camino como lo explico Newton, es lo que se llama refracción. Figura 2.10.

- Ley de la Refracción

La ley de la reflexión explica como la incidencia de las ondas de luz, con ángulo θ_i , son desviadas θ_t , al cruzar un medio con fase constante, esto es debido a los cambios se velocidad en los que va incidiendo el haz. En la Figura 2.10 se ilustra ésta ley.

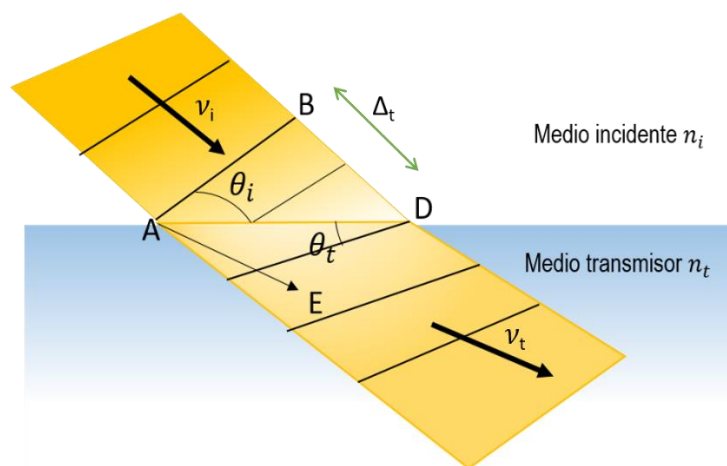


Fig. 2.10 Ley de la refracción, las ondas de luz que inciden con un ángulo θ_i , son desviadas al atravesar el medio con un ángulo θ_t , en un tiempo Δ_t .

Observamos que en un tiempo Δ_t , el haz de luz tarda en pasar del punto B al punto D con una velocidad constante v_i , la parte transmitida del haz es la que habrá llegado al punto E a una velocidad v_t . Si el medio incidente es menor que

el transmitido es decir $n_i < n_t$, la velocidad en el medio transmitido será mayor que la incidente provocando que los rayos que viajan del extremo de A al punto E sea menor a la trayectoria del punto B al punto D es decir $\overline{AE} < \overline{BD}$, esto quiere decir que las ondas electromagnéticas se van a desviar, formando un ángulo de interfaz θ_i de \overline{AE} ; si los triángulos descritos por \overline{ABD} y \overline{AED} comparten la hipotenusa \overline{AD} de tal modo que $\frac{\sin \theta_i}{BD} = \frac{\sin \theta_t}{AE} = \frac{\sin \theta_i}{v_i} = \frac{\sin \theta_t}{v_t}$; multiplicando por la velocidad de la luz c , ya que $n = \frac{c}{v}$ aplicándolo para los dos medios, tenemos que la expresión final es:

$$n_i \sin \theta_i = n_t \sin \theta_t. \quad (1)$$

Esta ecuación es la llamada la *ley de la refracción* conocida como *la ley de Snell*. Podemos decir a partir de este hecho que todos los rayos de luz incidentes, reflejados y refractados están en el mismo plano de incidencia.

2.3. 3 Transmitancia

Cuando un haz de luz atraviesa un material traslúcido una parte de esta luz es absorbida y la otra fracción del haz de luz atravesará el material en un determinado tiempo.

La transmitancia puede considerarse como una doble refracción. Para entender mejor éste fenómeno consideremos que los rayos de luz atraviesan un medio con índice de refracción mayor que el aire, por ejemplo vidrio, al atravesar los rayos de luz esta primera interfaz aire-vidrio sufre una primera refracción, al seguir los rayos de luz su trayectoria sufrirá otra refracción pasando la interfaz vidrio-aire. El haz de luz que sale de esta última interfaz es al que denominamos haz transmitido o transmitancia. Existen dos tipos de transmitancia: regular y difusa.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

La transmitancia regular o coherente es aquella que sigue una sola trayectoria, es decir, todas las ondas del haz de luz al ser refractadas antes de transmitirse se suman, emitiendo en una misma longitud y orientación. Figura 2.11-a

En cambio la transmitancia difusa o incoherente, es aquella que sigue todas direcciones, es decir, todas las ondas de luz al ser refractadas antes de transmitirse se superponen restándose entre sí, produciendo máximas o mínimas intensidades, emitiendo de esta manera distintas orientaciones.

Figura 2.11-b

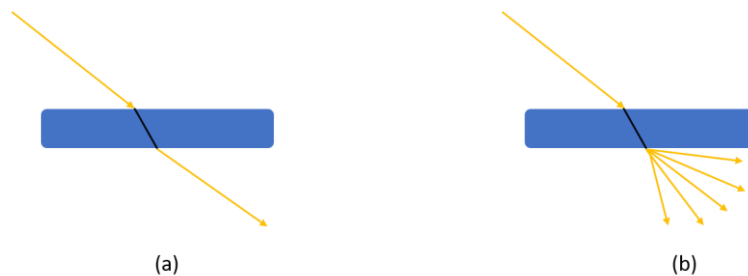


Fig. 14 Transmitancia regular (a) y Transmitancia difusa (b)

Este fenómeno fue descrito de forma matemática por Johann Heinrich Lambert y August Beer, conocida formalmente como la ley de Beer-Lambert.

- **Ley de Beer-Lambert**

La ley de Beer-Lambert conocida también como Beer-Lambert-Bouguer, fue descubierta de 2 formas diferentes e independientes. En 1729 el matemático y astrónomo francés Pierre Bouguer describió el fenómeno a partir de la observación del Sol, diciendo que la luz solar era 300 veces más intensa que la de la luna, de este modo realizó las primeras mediciones en fotometría ^[8,15]. En 1760 el filósofo y matemático alemán Johann Heinrich Lambert, retomó las observaciones de Bouguer describiendo este fenómeno como absorción, definiéndolo como la capacidad de un material para absorber la luz a partir de la longitud de paso óptico por el medio ^[8]. Fue en 1852 donde el físico y

matemático, también alemán, August Beer que conjunta las teorías anteriores y describe la transmitancia como la relación entre el poder de radiación (intensidad I), transmitido por una muestra a través del camino óptico de los rayos y el poder de la radiación inicial I_0 que incide sobre la misma muestra, llegando a la siguiente expresión [14]:

$$T = \frac{I}{I_0} . \quad (2)$$

Ahora bien, si una capa de una muestra tiene la misma cantidad de partículas absorbentes que la primera capa, las partículas absorbentes de la segunda capa se transfieren a la primera, de forma que la concentración de la primera capa aumenta. A través de la radiación o intensidad aumentada, la ley de Beer-Lambert se relaciona la transmitancia o absorción mostrándola como una forma equivalente para medir la intensidad. Definiendo ésta intensidad en la siguiente expresión.

$$I = I_0 e^{-\alpha d} . \quad (3)$$

Donde I es la intensidad incidente y I_0 la intensidad transmitida, o bien la ecuación descrita anteriormente en la ecuación (2) para medir la transmitancia, α es el coeficiente de extinción que depende de las partículas del medio y d el espesor de la muestra.

2.3.4 Esparcimiento

Para poder entender el concepto de esparcimiento es necesario incorporar la naturaleza atómica de la materia. Es decir cuando un rayo de luz incide sobre medios densos, un gran número de moléculas o partículas dan lugar a un número igualmente de ondas electromagnéticas esparcidas, estas ondas se solapan e interfieren. Como regla general cuando más densa sea la sustancia por la cual la luz avanza, menor es el esparcimiento lateral, para entender este concepto de esparcimiento, se define la interferencia como la superposición de dos o más

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

ondas que dan como resultado una perturbación, siendo esta la suma de las contribuciones de ondas superpuestas.

Cuando dos ondas armónicas de la misma frecuencia se propagan en la misma dirección, y se encuentran en fase, la resultante en cada punto es la suma de los dos valores de la altura de la onda, a este caso extremo se denomina interferencia totalmente constructiva. Cuando la fase llega hasta 180° , las ondas tienden a anularse y nos encontramos entonces con el caso de interferencia destructiva [1,8].

Refiriéndose a partículas esféricas existen dos tipos de Esparcimiento, los cuales se diferencian de acuerdo al tamaño de la partícula por la cual las ondas harán incidencia, estos son el esparcimiento de Rayleigh y el de Mie. Estos fenómenos son descritos por La Teoría de Rayleigh y la Teoría de Mie las cuales describen las propiedades de esparcimiento de las partículas según su tamaño con respecto a la longitud de onda. Para partículas menores que la longitud de onda incidente se aplica la teoría de Esparcimiento de Rayleigh y para partículas mayores que la longitud de onda incidente se aplica la teoría de Esparcimiento de Mie. Figura 2.12



Figura 2.12 (a) Esparcimiento de Rayleigh : Para partículas menores a la longitud de onda incidente la luz se separa emitiendo distintas longitudes de onda; (b) Esparcimiento de Mie: Para partículas mayores que la longitud de onda incidente la luz no suele separarse emitiendo la misma longitud de onda incidente

- **Esparcimiento de Rayleigh**

El esparcimiento de Rayleigh se aplica cuando la partícula es más pequeña que la longitud de onda incidente, esto sucede cuando la luz se separa en distintas longitudes de onda, esta dispersión es el resultado de la polarización eléctrica de las partículas. El campo eléctrico oscilatorio de las ondas electromagnéticas actúa sobre las cargas de las partículas provocando que oscilen en la misma frecuencia, convirtiendo a la partícula en un pequeño dipolo radiante, cuya radiación visible es la luz esparcida.

En 1871 Rayleigh analizó el esparcimiento de la luz solar tomando como referencia los osciladores moleculares, llegando a la conclusión de que la intensidad de la luz es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda de la luz incidente $I \propto \frac{1}{\lambda^4}$ [15]. Esto significa que si la luz incidente es blanca, compuesta por ondas de diferentes longitudes, es decir diferente color, la luz reemitida contendrá mayor cantidad de colores con longitud de onda pequeña (azules y violetas) que con una longitud grande (amarilla y roja) [15].

- **Esparcimiento de Mie**

El esparcimiento se aplica cuando la partícula es más grande que la longitud de onda incidente, esto sucede cuando la luz no se separa produciendo un resplandor blanco. En 1908, Gustav Mie desarrolló una teoría para explicar la dispersión en disoluciones coloidales (llamándole así a las partículas mayores que la longitud de onda) [1,8]. Esta teoría es una extensión del concepto de Rayleigh. Ambas teorías estudian la interacción de una onda electromagnética en un gas, mientras que una considera un dipolo como el Esparcimiento de Rayleigh; la otra considera un conjunto de multipolos que originan ondas parciales y, considerando que las partículas son mayor que la longitud de onda incidente, se originan diferencias de fase, espaciales y temporales, entre dichas ondas parciales. De esta forma, cuando éstas se superponen para formar una onda secundaria dispersada, aparecen interferencias. Estas interferencias

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

dependen de la longitud de onda incidente, del tamaño y del índice de refracción de la partícula.

Esta teoría es aplicada para esferas isótropas, asumiendo que la partícula es esférica, la expresión del tamaño y la longitud de onda se describe por el parámetro de tamaño $x = \frac{2\pi r}{\lambda}$ que es el factor fundamental que interviene en el esparcimiento de Mie. Donde r es el radio de la partícula y λ la longitud de onda.

Un ejemplo de este fenómeno podemos observarlo cuando las nubes, están compuestas por gotas de agua incoloras de gran tamaño, las cuales hacen la función de un espejo reflejando la luz incidente en una sola dirección sin alterar su color, por esta razón las nubes aparecen blancas.

2.3. 5 Absorción

Cuando las ondas electromagnéticas visibles inciden sobre un cuerpo, éste absorbe una parte de la energía de ellas y la otra energía es esparcida, es decir, los fotones que logran incidir dentro de la materia o solución, transmiten su energía a los electrones de la última capa que se encuentran en la materia, convirtiéndola en energía calorífica o lumínica, es de esta manera que decimos que la solución ha absorbido parte de la energía de las ondas. Cuando la absorción se produce dentro del rango de la luz visible, recibe el nombre de absorción óptica. Esta radiación, al ser absorbida puede ser reemitida, como en el caso de la fluorescencia, o transformada en otro tipo de energía como calor o luz. Existen tres tipos de absorción: sencilla total, parcial y selectiva^[8]. Figura 2.13

- **Absorción Sencilla Total o Radiación del cuerpo negro**

Es aquella absorción en la cual las ondas electromagnéticas que atraviesan un cuerpo, son absorbidas por las moléculas que conforman a este objeto en todas las longitudes de ondas, es decir, el haz de luz que atraviesa el cuerpo no deja salir ninguna longitud de onda, por lo que no hay reflexión, ni transmitancia de la luz, tan sólo hay emisión de radiación térmica o lo que se conoce como calor. Para que este fenómeno se lleve a cabo, el cuerpo debe ser perfectamente negro, es de ahí donde proviene el término de radiación de cuerpo negro o absorción total. Figura 2.13-a

- **Absorción Parcial**

Es aquella absorción en la cual las ondas electromagnéticas que inciden en un cuerpo pueden determinar si el objeto es blanco o gris, es decir, el haz de luz es absorbido pero no en su totalidad, permitiendo que haya transmisión de una porción de la luz incidente, partiendo de si es un cuerpo, es gris el objeto absorbería un 50% y si es blanco un 10%. Si un cuerpo es blanco, reflejara el haz de luz un 90% absorbiendo el 10% restante, por lo que no existe un cuerpo 100% blanco ya que todos los cuerpos absorben parcialmente una cantidad de luz. Figura 2.13-b

- **Absorción Selectiva**

Es aquella absorción en la cual las ondas electromagnéticas que inciden sobre un objeto pueden determinar los colores de la luz blanca, es decir, aquellas longitudes que van desde los 400-700 nm. Este fenómeno se da debido a que el objeto absorbe totalmente el 90% de las longitudes de onda que inciden y el 10% la refleja, que sería el caso contrario de la absorción parcial. Por ejemplo, si un objeto es violeta o de longitud de onda de 400 nm, absorberá todas las demás longitudes hasta los 700 nm excepto la longitud de onda de 400 nm, es por esa

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

razón que cuando el ojo observa el objeto percibe que es de color violeta o morado. Este mismo fenómeno sucederá con toda la gama de colores que se encuentran en el espectro visible desde los 400-700 nm. Figura 2.13-c

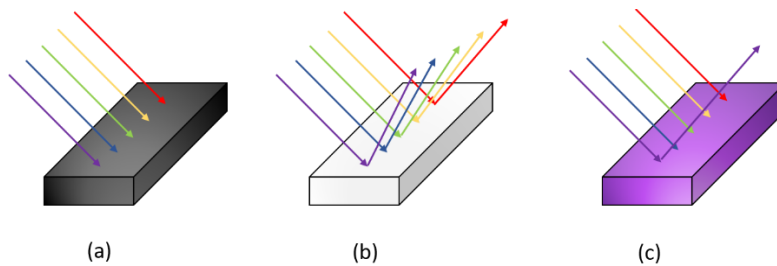


Figura 2.13 (a) Absorción Sencilla Total o Radiación del cuerpo negro; (b) Absorción Parcial y (c) Absorción Selectiva.

En general todos los materiales son absorbentes en algún rango de frecuencias (longitud de onda).

Como ya vimos de acuerdo a los tipos de absorción aquellos que absorben toda la luz son llamados materiales opacos, mientras que aquellos que dejan pasar luz en todo un rango del visible se les llama transparentes. Anteriormente se menciona la relación de la “absorción” con la transmitancia. Sin embargo el término denominado “absorción” es realmente una relación con el coeficiente de extinción, el cual incluye absorción y esparcimiento. Y se puede ver como ^[15]:

$$\text{Extinción} = \text{esparcimiento} + \text{absorción}$$

El cociente, de la intensidad de la luz transmitida I y la intensidad de la luz incidente I_0 , es la transmitancia T . En la literatura de la citometría y el análisis químico es muy común utilizar la ecuación (3) en base diez, de la siguiente manera:

$$\log \frac{I}{I_0} = -Ad, \quad (4)$$

de donde podemos obtener un coeficiente de extinción alternativo como $-\frac{1}{d} \log T = A$. La ley puede escribirse en varias formas las cuales son totalmente

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

equivalentes, viendo la constante de proporcionalidad $-Ad$ (la longitud de paso óptico d por lo general se da en centímetros, mientras que la concentración se expresa en gramos por litro (g/l) o por moles por litro (mol/l) representándolo por C , pasa a ser la absorción y la absorción molar de la muestra viene dada por ε , respectivamente. Por lo que tomamos a partir de las expresiones anteriores la siguiente relación:

$$\log \frac{I}{I_0} = -\alpha d C \rightarrow \log T = -\alpha d C,$$

Donde se obtiene la expresión, de la ley de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon d C. \quad (5)$$

La constante de proporcionalidad ε de esta ley, es una característica de la especie absorbente y, en general, su valor numérico depende de la longitud de onda en la cual mida. La luz de Beer-Lambert para la transmitancia y la absorción sólo es aplicable para la luz monocromática

2.4 Aproximación por Difracción Anómala (ADA) para partículas mayores que la longitud de onda incidente.

En este trabajo se realizó un modelo teórico donde se calcula el esparcimiento de la transmitancia de luz coherente de partículas en suspensión, cuyo diámetro es mayor que la longitud de onda incidente.

Se define transmitancia coherente al promedio de todas las transmitancias que se dan por cada una de las partículas suspendidas en el sustrato. Para estos cálculos se utilizó la teoría denominada Aproximación por Difracción Anómala (ADA), descrita por Van de Hulst en 1957 en su libro "*Light Scattering by small particles*" [15]. Esta teoría es aplicable para cualquier forma de partícula y es una aproximación complementaria a la teoría de Mie. Para describir este modelo se supondrá que la orientación de todas las partículas suspendidas en un sustrato es la misma para todas ellas, considerando de esta manera una sola partícula para obtener una expresión aproximada para el índice de refracción efectivo de la suspensión.

2.4.1 Modelo teórico y simulaciones numéricas

Suponemos que una onda electromagnética de la forma

$$\vec{E}^i = E_0 e^{i\vec{k}^m \cdot \vec{r} - i\omega t} \hat{e}_m . \quad (6)$$

Viajando en la matriz (suspensión) que llamaremos medio de incidencia, donde se encuentra la partícula (Figura 2. 14). La fase de la onda es $\phi = i\vec{k}^m \cdot \vec{r} - i\omega t$, donde \vec{k}^m es el vector de onda incidente, \vec{r} es el vector de posición y ω la frecuencia.

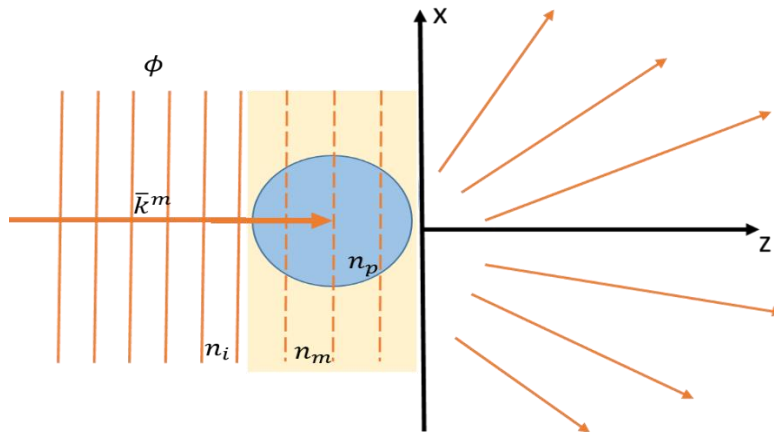


Figura 2.14 Esquema del modelo teórico de partículas en suspensión.

Suponemos que la luz incidente viaja en la dirección del eje z, es decir que el vector de onda incidente \vec{k}^m es paralelo al eje z, $\vec{k}^m = k_m \hat{a}_z$ donde $k_m = n_m k_0$ es la magnitud del vector de onda en el medio matriz y k_0 es el número de onda en el vacío a la frecuencia ω . Suponiendo que el n_m índice de refracción de la matriz y n_p índice de refracción de la partícula; no difieren demasiado, es decir, un bajo contraste de índice de refracción entre la partícula y el medio. La ADA supone entonces que la onda no se refleja ni desvía al pasar por la partícula, solamente experimenta un cambio de fase, proporcional al camino óptico $\Delta(x, y, z)$ recorrido en el interior de la partícula. De acuerdo con la ecuación (6) y

**DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE
PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE**

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

considerando que $\vec{k}^m \cdot \vec{r} = k_m z$, podemos calcular la onda transmitida \vec{E}_r al pasar por la partícula, en el plano $z = 0$ como:

$$\vec{E}^T(x, y, z = 0) = E_0 e^{i\Delta(x,y,x)} e^{-i\omega t} \hat{e}_m. \quad (7)$$

Con $\Delta(x, y, z = 0) = l(x, y)(n_p - n_m)$, donde $l(x, y)$ es la distancia geométrica recorrida por la luz al atravesar toda la partícula. Notamos entonces que $l(x, y) = 0$ si nos encontramos fuera de la sombra proyectada por la partícula en un plano xy . En este caso $\vec{E}^T(x, y, z = 0) = E_0 e^{-i\omega t} \hat{e}_m$.

A partir de ahora, no escribiremos el factor $e^{-i\omega t}$, queda implícito que este factor está presente y sólo cuando se requiera se expresará explícitamente.

Se define entonces el campo esparcido o radiado \vec{E}^S por la partícula, como la diferencia entre el campo total \vec{E}^T y el campo incidente \vec{E}^m en $z = 0$, es decir, $\vec{E}_{z=0}^S = \vec{E}_{z=0}^T - \vec{E}_{z=0}^m$ y sustituyendo las ecuaciones (6) y (7) tenemos que:

$$\vec{E}^S(x, y, z)|_{z=0} = E_0 [e^{il(x,y)(n_p - n_m)} - 1] \hat{e}_m, \quad (8)$$

Esta ecuación (7) representara el campo esparcido o radiado por la partícula en $z = 0$ en la ADA. Para calcular el campo esparcido en cualquier punto del espacio $z > 0$ se realiza una expansión de ondas utilizando transformadas de Fourier en x y y tenemos que:

$$\vec{f}_\perp(k_x, k_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} \vec{E}_\perp^S e^{-ik_x x_1 - ik_y y_1} d_{x_1} d_{y_1},$$

Donde k_x y k_y son las coordenadas en el espacio de Fourier, para poder considerarlo como una onda plana se debe garantizar que el campo radiado cumple con la ecuación de Helmholtz en tres dimensiones homogénea, cumpliendo de esta con las expresiones de Maxwell $\nabla \times \nabla \times \vec{E} - k^2 \vec{E} = 0$ y suponiendo que no hay densidades de carga ($\nabla \cdot \vec{E} = 0$), ni corrientes ($\vec{J} = \vec{0}$), llegamos a la expresión

**DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE
PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE**

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

$$\vec{E}(x, y, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \iint_{-\infty}^{\infty} [\bar{f}_{\perp}(k_x, k_y) + f_z(k_x, k_y)\hat{a}_z] e^{ik_z z} e^{ik_x(x-x_1)+ik_y(y-y_1)} d_x d_y. \quad (9)$$

De esta manera el campo coherente transmitido por una suspensión, considerando que la densidad en número de partículas está dado por $\rho = \frac{N}{V}$ podemos expresarlo como el esparcimiento en el campo transversal del plano $z = 0$, definiéndolo entonces la transformada de Fourier como

$$f_{\perp}(0,0) = \iint_{-\infty}^{\infty} [e^{i\ell(x,y)(n_p-n_m)} - 1] d_x d_y. \quad (10)$$

Ahora bien, si la onda incidente atraviesa una suspensión de medio homogéneo con índice de refracción efectivo n_{eff} se retrasaría y atenuaría de acuerdo al coeficiente de extinción.

$$n_{eff} = n_m \left\{ 1 + \frac{\rho}{ik_m} f_{\perp}(0,0) \right\}. \quad (11)$$

Obteniendo el índice de refracción efectivo y sustituyendo en la ecuación (3) correspondiente a la ley de Beer-Lambert obtenemos

$$I = I_0 e^{-2k_0 [Im(n_{eff})]d}. \quad (12)$$

Utilizando el programa MATLAB se calcularon las expresiones (10) y (11) para obtener la intensidad de transmitancia dada por la ecuación (12). Para el caso de las micro-partículas de borosilicato se tomaron los valores experimentales de nuestro sistema donde $n_m = 1.330$ siendo el índice de refracción de medio (agua tridestilada), $n_p = 1.520$ índice de refracción de las partículas ^[25], $\theta_m = 0$ el ángulo incidente, $\rho = 155 \times 10^{-6} \mu m$ límite máximo de la densidad en número de partículas, $d = 0.3 \times 10^3 \mu m$ volumen y la longitud de onda $\lambda = 470 \times 10^{-3} \mu m$ y un radio de $a = 5 \mu m$ llegando de esta manera a la curva que describe el fenómeno de nuestro sistema en la Figura 2.15-a.

Para el caso de las partículas de los Leucocitos donde $n_m = 1.334$ siendo el índice de refracción de medio (PBS), $n_p = 1.348$ índice de refracción de las

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

partículas [22], $\theta_m = 0$ el ángulo incidente, $\rho = 155 \times 10^{-6} \mu m$ límite máximo de la densidad en número de partículas, $d = 0.3 \times 10^3 \mu m$ volumen y la longitud de onda $\lambda = 470 \times 10^{-3} \mu m$ y un radio de $a = 5 \mu m$ obteniendo así la curva que describe el fenómeno de nuestro sistema en la Figura 2.15-b

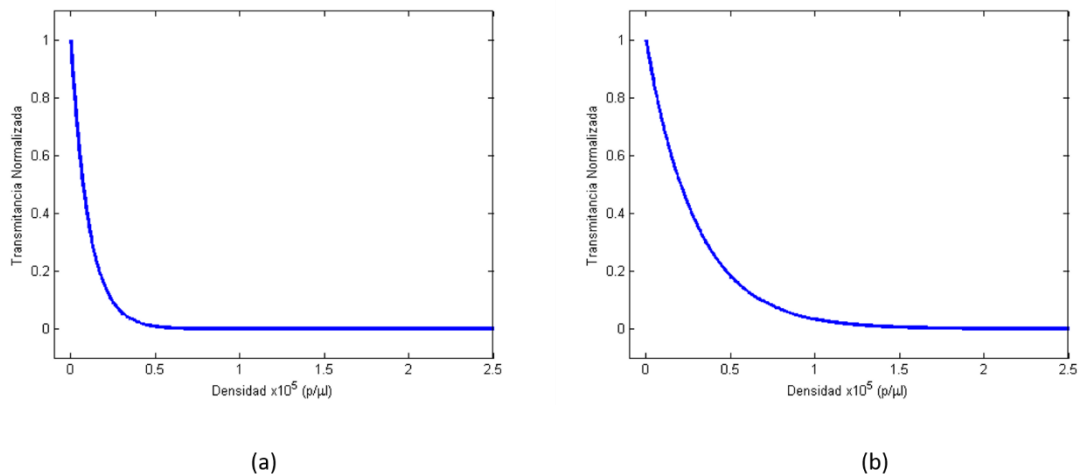


Figura 2.15 Curvas Teórica descrita por ADA, (a) es la curva teórica para las partículas de Si y (b) curva teórica para las partículas de leucocitos.

Cabe mencionar que para la obtención de estas curvas lo único que cambio fueron los índices de refracción de cada partícula y de sus matrices, debido a las distintas condiciones en las que se analizaron.

A partir de estos datos se realizó el cálculo para obtener una expresión que nos diera densidad en número de partículas a partir de la potencia de transmitancia, partiendo de la ecuación (3) y (12). Considerando que la transmitancia se puede ver como: $T = \frac{I}{I_0}$ entonces la expresión (13) nos queda como:

$$T = e^{-ad}. \quad (13)$$

**DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE
PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE**

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Haciendo los despejes correspondientes queda la expresión de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \ln T &= \ln e^{-\alpha d}, \\ \ln T &= -\alpha d, \\ \alpha &= -\frac{\ln T}{d}. \end{aligned} \tag{14}$$

Sustituyendo los valores de α tenemos que:

$$\begin{aligned} 2k_0[\operatorname{Im}(n_{eff})] &= -\frac{\ln T}{d}, \\ [\operatorname{Im}(n_{eff})] &= -\frac{\ln T}{2k_0d}, \end{aligned}$$

De la ecuación (10) sustituimos el valor del índice de refracción efectivo n_{eff} :

$$[\operatorname{Im}(n_m \{1 + \frac{\rho}{ik_m} \bar{f}_\perp(0,0)\})] = -\frac{\ln T}{2k_0d},$$

$$[\operatorname{Im}(n_m + \frac{\rho}{ik_m} \bar{f}_\perp(0,0))] = -\frac{\ln T}{2k_0d},$$

$$\operatorname{Im}\left(\frac{\rho}{ik_m} \bar{f}_\perp(0,0)\right) = -\frac{\ln T}{2k_0d} - n_m,$$

$$\operatorname{Im}(\rho \bar{f}_\perp(0,0)) = -\frac{\ln T}{2k_0d} - n_m ik_m,$$

$$\rho = -\frac{\ln T}{2k_0d} - \frac{k_m}{n_m} \frac{1}{\operatorname{Re} \bar{f}_\perp(0,0)},$$

$$\rho = -\frac{k_m}{n_m} \left(\frac{-\ln T}{2k_0d \operatorname{Re} \bar{f}_\perp(0,0)} \right). \tag{15}$$

Donde ρ es la densidad en número de partículas en función de la transmitancia (T)

Capítulo 3. Partículas y células

De acuerdo a los fenómenos ópticos dados por la transmitancia, utilizando la ley de Beer-Lambert y la dispersión de Mie a través del modelo teórico ADA empleamos estos conceptos al estudio de las partículas en suspensión. En particular en este trabajo se estudiaron partículas con diámetro mayor que la longitud de onda incidente, como es el caso de las partículas de Borosilicato y los leucocitos, mediante mediciones en la potencia del haz transmitido al pasar por la muestra. Con el fin de conocer la densidad en número de partículas y poder determinar un conteo más preciso que con el método de la cámara de Neubauer.

En el siguiente capítulo se hablará sobre las partículas del polvo de borosilicato y los leucocitos (células blancas), con una descripción breve del tipo de células sanguíneas así como sus propiedades biofísicas.

3.1 Partículas

La palabra partícula se deriva del latín, la cual significa “parte pequeña”. En las ciencias físicas, una partícula se define como una porción muy reducida de la materia con propiedades físicas como es el caso del volumen y químicas como la masa ^[1,8]. En física determinamos dos maneras de ver las partículas:

- a) Macroscópicamente: donde se define partícula como un cuerpo cuyas dimensiones y formas no cambian al estar en movimiento.
- b) Microscópicamente: donde se define partícula como el fragmento más pequeño de la materia, la cual está compuesta por átomos o moléculas; los átomos están compuestos por partículas subatómicas como es el caso del electrón, protón y neutrón ^[16].

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Para las ciencias biológicas, bioquímicas o médicas el concepto de partícula se define como molécula. Una molécula se encuentra formada por dos o más átomos, sus átomos se mantienen unidos debido a los enlaces químicos fuertes (covalentes o enlace iónico), es decir, al intercambio de electrones ^[20]. Así, las ciencias biológicas, pueden estudiar a los seres vivos a nivel molecular, ya que las moléculas son las que conforman las células y los tejidos.

Dentro de las definiciones de partículas se puede también encontrar que es una componente de la fase dispersa de una suspensión coloidal. Un coloide es una mezcla intermedia entre dos soluciones, es decir, es un combinación burda entre una mezcla homogénea y una heterogénea de partículas entre los nm hasta μm , el cual tienen dos componentes una fase dispersora y otra que se llama medio dispersante ^[17,18].

La fase dispersora es una sustancia que se encuentra en menor cantidad en un sistema dispersor o medio dispersante, es decir, las partículas que se encuentran interpuestas una dentro de la otra. El medio dispersante es la sustancia dentro de la cual se encuentran inmersas las partículas suspendidas o en monocapa, éste medio también se conoce como fase continua. Si ésta última es líquida, los sistemas coloidales se catalogan como “soles” y se subdividen en liófilos, aquellos que tienen poca atracción entre la fase dispersa y el medio dispersante y liófilos aquellos que tienen gran atracción entre la fase y el medio dispersante. Algunas de las características de los coloides “soles” son que no se ven a simple vista y surge el efecto Tyndall, un fenómeno el cual hace que las partículas sean visibles al dispersar la luz ^[19].

El estudio de los coloides es de gran relevancia en muchas áreas ya que se encuentran en diversos productos químicos como pinturas, pigmentos, adhesivos, agentes espesantes y catalizadores. En productos de la industria farmacéutica donde se aplican en emulsiones, micro-emulsiones, cremas, ungüentos, materiales absorbentes; en productos de consumo doméstico donde podemos encontrarlos en la leche, mantequilla, productos lácteo, cosméticos y

agentes de limpieza y en el área de investigación se utilizan los coloides para simular los tejidos vivos, como por ejemplo, células, proteínas, fibras y lípidos.

En este trabajo se realizó el estudio en un coloide utilizando las micro-partículas huecas transparentes de borosilicato, con un diámetro mayor que la longitud de onda incidente. Dado que el diámetro de las partículas de borosilicato es del mismo orden que de las células en el torrente sanguíneo, pudimos simular las células sanguíneas de los leucocitos.

3.2 Células Sanguíneas

La sangre es un líquido que se mueve a través de los vasos del sistema circulatorio, en el cual se incluye el plasma (parte líquida), glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y fragmentos de células llamados plaquetas ^[4]. Figura 3.1

- **Plasma:** Es el componente principal de la sangre, el cual consiste en su mayoría en agua y una mezcla de proteínas, iones, nutrientes y desechos.
- **Glóbulos rojos o eritrocitos:** Son células que circulan por todo el cuerpo, proporcionando oxígeno a los tejidos. Son pequeños y bicóncavos (más delgados en el centro) miden aproximadamente entre 7-8 μm , y no contienen mitocondrias o un núcleo cuando maduran. En general se encuentran de 4 a 9 millones por milímetro cúbico en hombres y de 4 a 6 millones por milímetro cúbico en mujeres ^[23].
- **Glóbulos blancos o leucocitos:** Forman parte del sistema inmunitario y tiene una función en la respuesta inmune (reconocer y neutralizar invasores, tales como virus y bacterias), son mucho menos comunes que los glóbulos rojos y conforman el 1% de las células. Miden aproximadamente entre 9-10 μm , tienen un núcleo normal y mitocondrias, existen cinco tipos principales los cuales están divididos como Granulocitos (Neutrófilos, Eosinófilos y

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Basófilos) y Agranulocitos (Monocitos y Linfocitos). De 4 000 a 11 000 por mililitro [23].

- **Plaquetas:** También llamadas trombocitos, son fragmentos celulares que participan en la coagulación de la sangre. Se producen cuando grandes células llamadas megacariocitos se desmoronan formando entre 2000 -3000 plaquetas. Las plaquetas tienen forma parecida a un disco y son pequeñas aproximadamente entre 2-4 μ m. De 150.000 a 400.000 por milímetro cúbico[24].

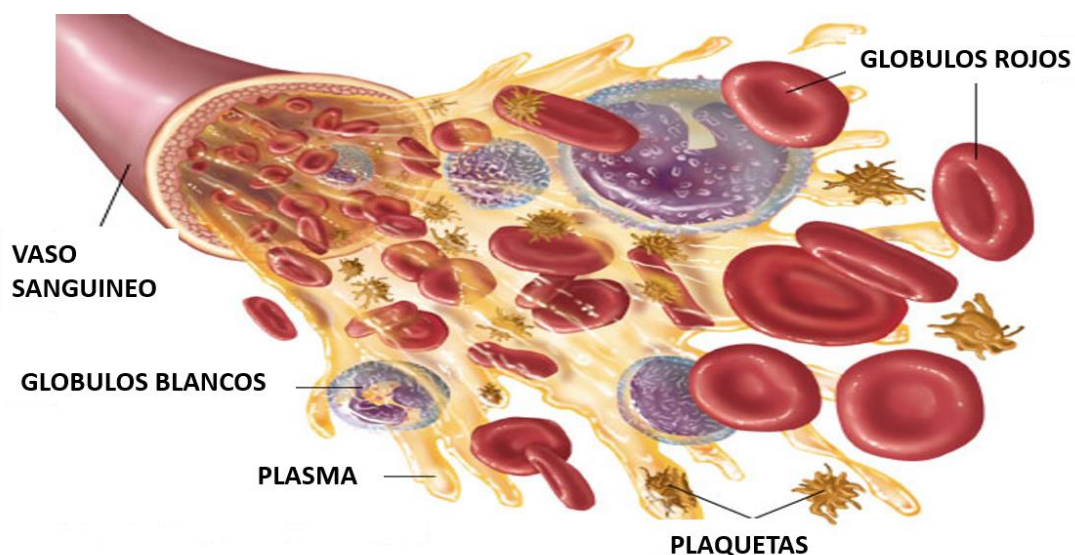


Figura 3.1 Vaso sanguíneo, composición de la sangre. (Fuente: *Fundamentos de inmunología básica y clínica* 2009)

3.3 Leucocitos

Los leucocitos son células sanguíneas que produce la médula ósea en la sangre y en los tejidos linfáticos; son parte del sistema inmunitario del cuerpo los cuales ayudan a combatir infecciones y otras enfermedades. Existen dos tipos de Leucocitos: los Granulocitos conocidos también como polimorfonucleares, en donde se encuentran los Neutrófilos, Eosinófilos y Basófilos; y los Agranulocitos donde se encuentran los Monocitos y Linfocitos. Figura 3.2

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

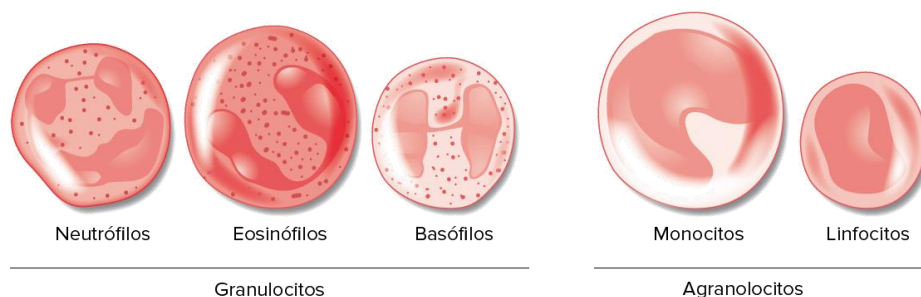


Figura 3.2 Leucocitos o Glóbulos Blancos. (Fuente: *Fundamentos de inmunología básica y clínica* 2009)

3.3.1 Granulocitos

- **Neutrófilos**

Los Neutrófilos son los glóbulos blancos con mayor porcentaje en el torrente sanguíneo, se forman en la médula ósea, y son los primeros en acudir cuando el organismo presenta alguna enfermedad. Su principal función se basa en atraer todas las células sanguíneas, las que ocasionan algún problema y luego segregan para eliminarlas, a través de tres procesos de defensa: 1) *Fagocitosis*: Ayuda a seleccionar las células dañadas, para luego eliminarlas, 2) *Desgranulación*: debido a que el organismo tiene gránulos, envía células antimicrobianas a todo el sistema sanguíneo de tal manera que destruya células dañadas y 3) *Trampas extracelulares de neutrófilos*: son células directamente de los neutrófilos que se encargan de inmovilizar a los agentes microbianos. Su existencia habitual en el cuerpo humano es entre 24 a 48 horas, miden aproximadamente entre 9-12 μm y sus niveles aumentan en circunstancias extremas. Es importante mencionar que los valores de los neutrófilos dependen de la edad, masa corporal y sexo de la persona, los valores normales de los neutrófilos se encuentran entre 2 000 a 7 500 por milímetro cúbico de sangre [23]. Existen dos tipos de neutrófilos:

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

En banda: son aquellos en los que su característica principal es que les faltan los lóbulos frontales, esto ayuda a que las células maduren por lo tanto los neutrófilos de banda son aquellos que son llamados neutrófilos inmaduros

Segmentados: son aquellos en los que se presenta el lóbulo frontal, de esta manera son las células en su plena madurez, constituyen el 40% de los glóbulos blancos.

- **Eosinófilos**

Los eosinófilos tienen como objetivo defender al organismo contra la invasión de microorganismos extraños, se encuentran presentes en la sangre en elevadas concentraciones principalmente durante reacciones alérgicas o en caso de infecciones parasitarias, bacterianas y fúngicas. Su existencia en el cuerpo humano es de 8-12 días, circulando en el torrente sanguíneo aproximadamente durante 4 horas, miden aproximadamente entre $10\mu\text{m}$ y son menos del 0.1% en la sangre. Los eosinófilos normalmente están en menor concentración en la sangre que otras células de defensa, los valores normales de los neutrófilos se encuentran entre 40 a 400 por milímetro cúbico de sangre ^[23].

- **Basófilos**

Es un tipo de célula que tiene gránulos con enzimas que se liberan durante las reacciones alérgicas o inflamaciones, miden aproximadamente $10\mu\text{m}$ y representan menos del 1% en los leucocitos ^[23], su trabajo es ayudar a evitar alergias y problemas respiratorios, cuando estas células sienten un agente extraño en el cuerpo libera histamina y heparina que son dilatadores de la sangre, lo cual impiden que se coagule de manera rápida, evitando desangramiento o retención de la misma

3.3.2 Agranulocitos

- **Monocitos**

Los monocitos son células pertenecientes a los leucocitos de la familia de los Agranulocitos, miden 12-15 μm y representan un 4-10% de los leucocitos, es decir entre 20 a 800 por milímetro cúbico de sangre ^[23]. Estas células tienen un promedio de vida de unos tres días; circulan por la sangre antes de entrar en los tejidos, por lo que son células dendríticas que se impregnan en órganos como el hígado, pulmones y el bazo. Su función principal es cuidar y proteger al sistema inmune ante bacteria y virus invasores, tiene el poder de convertirse en macrófagos, es decir, de eliminar microorganismos (gérmenes) extraños así como la eliminación de las células muertas. La forma correcta de definir la función de los monocitos es la fagocitosis, la cual se conoce como el proceso de ubicar e identificar las células y los cuerpos dañados, que habitan en el organismo para luego ingerirlos, evitando que sigan dañando el organismo. Una vez que el monocito localiza una membrana dañada procede a la expulsión o la eliminación de la célula dañada.

- **Linfocitos**

Los linfocitos son un tipo de células pertenecientes a los leucocitos de la familia de los Agranulocitos es decir glóbulos blancos, una parte importante del sistema inmunológico. Son mucho más comunes en el sistema linfático que en la sangre y son el principal tipo de célula que se encuentra en la linfa. Los linfocitos pueden defender el cuerpo contra las infecciones, ya que tienen como función distinguir las células del propio cuerpo como extranjeras; una vez que reconocen un material extraño en el cuerpo, producen sustancias químicas para destruir ese material ^[4]. Los valores normales de los linfocitos se encuentran entre: 1 000 a 5 000 por milímetro cúbico de sangre ^[23]. Se dividen en tres tipos principales, los cuales son: Linfocitos T (LT), Linfocitos B (LB) y células asesinas naturales (NK, natural killers por sus siglas en inglés).

Linfocitos T (LT): Son aquellos los cuales juegan un papel central en la inmunidad celular. Se llaman células T porque maduran en el timo, una glándula que se encuentra en el pecho.

Linfocitos B (LB): Son principalmente responsables de la inmunidad humoral. Hacen que los anticuerpos que puedan unirse a los patógenos, bloqueen la invasión de estas células, activan el sistema del complemento y aumentan la destrucción de células patógenas. Se mantienen dentro de la médula ósea hasta que maduran, una vez maduros se extienden por todo el cuerpo y se concentran en el bazo y los ganglios linfáticos.

Células asesinas naturales (NK): Son una parte del sistema inmune innato y juegan un papel importante en la defensa del huésped de ambos tumores y células infectadas de forma viral.

3.4 Lisis celular

Definimos la lisis celular como la ruptura de la membrana celular, dándose en células y bacterias; este proceso se realiza para liberar moléculas intracelulares como por ejemplo el orgánulo o proteínas.

Las células están protegidas por una membrana de plasma semipermeable que consiste en una bicapa fosfolípido, creando una barrera entre los interiores de células (citoplasma) y el medio extracelular. En la célula animal la membrana es la única barrera, pero en plantas y bacterias la membrana se encuentra rodeada por una pared celular. Estos tipos de barrera extracelular dan forma y rigidez a las células.

Los métodos que se utilizan para generar lisis son físicos y químicos, los más comunes son utilizar lisis por presión osmótica es decir soluciones hipertónicas

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

(mayor cantidad de sal), isotónicas (parte estable de las células) e hipotónicas (mayor cantidad de agua) [9]. Figura 3.3

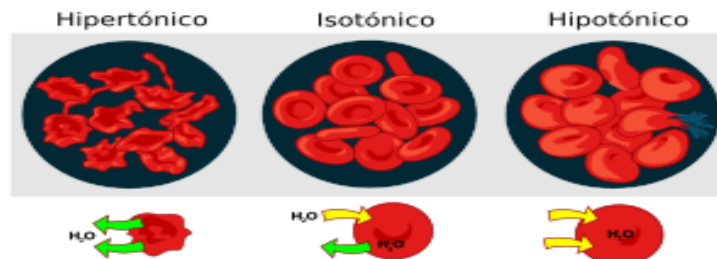


Figura 3.3 Lisis celular por presión osmótica. (Fuente: *Biología celular y molecular* 2003)

3.5 Propiedades Biofísicas de las Células.

Los fenómenos ópticos tales como la transmitancia, absorción, esparcimiento, etc., determinan como se propaga la luz en un medio, en este caso en una suspensión de células, estos fenómenos están relacionados con la masa intracelular y su concentración. Es posible usar este parámetro (refiriéndonos a su concentración) para determinar y correlacionar con otros parámetros biofísicos y estudiar ciertas actividades metabólicas celular, tales como división celular, infecciones, etc. Algunas enfermedades relacionadas con la densidad óptica en número de partículas en el caso de los leucocitos son la leucemia, anemia y mieloma múltiple.

3.5.1 Densidad Óptica

La densidad óptica en número de partículas es la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda determinada. Mientras más alta es la densidad óptica, más corta es la transmitancia [6].

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

El uso de citometría de flujo es un ejemplo en el cual la intensidad de dispersión lateral está relacionada con el índice de refracción de la célula. La densidad óptica se utiliza para correlacionar la concentración de las bacterias las cuales dependen del índice de refracción [2]. Podemos encontrar también en el estudio del índice de refracción de células, la morfología celular y el crecimiento biológico celular, para así poder diagnosticar enfermedades en hematología y patología.

Cuando las partículas son muy pequeñas en comparación con la longitud de onda de un haz incidente, el haz se reflejará o transmitirá sólo en la dirección especular. Sin embargo, cuando las partículas no son muy pequeñas, el haz no sólo se reflejará y transmitirá parcialmente en la dirección especular sino también se dispersará en múltiples direcciones. Por otro lado, si el tamaño de las partículas es comparable o mayor que la longitud de onda de la radiación incidente, se dispersará casi toda la luz. El campo reflejado y transmitido por una muestra de partículas, se divide en dos componentes: una coherente y una difusa.

Cuando el haz de luz incide sobre una muestra de suspensión, el haz reflejado coherentemente se desplaza en la dirección especular mientras el haz transmitido coherente refracta en la muestra de suspensión siguiendo la ley de Snell [3].

3.6 Enfermedades Patológicas

Algunas de las enfermedades patológicas más frecuentes en la sangre son la leucemia, anemia y mieloma múltiple, todas estas enfermedades se caracterizan por depender del número de células, es decir, para el caso de la leucemia se define como una cantidad excesiva de leucocitos, para la anemia como una

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

cantidad mínima de eritrocitos y para el caso del mieloma múltiple como la acumulación de células en la medula ósea. Figura 3.4

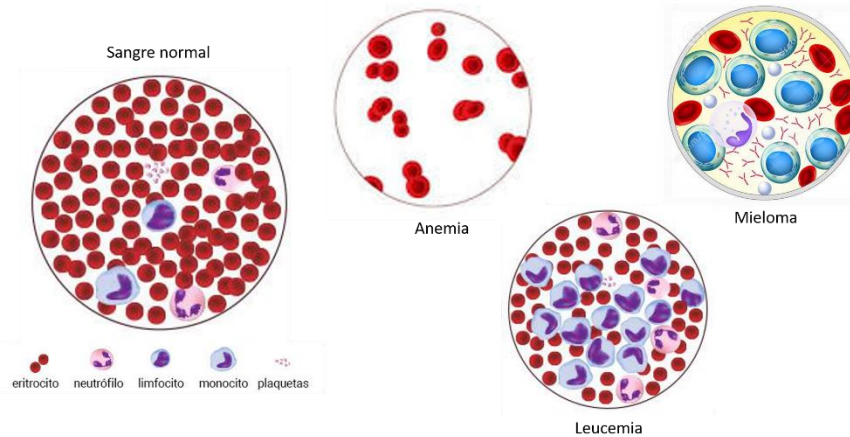


Figura 3.4 Enfermedades patológicas en las células sanguíneas (leucemia, anemia, mieloma)

3.6.1 Leucemia

La leucemia es una patología que se produce en la medula ósea y el sistema linfático, es un cáncer de los tejidos celulares la cual involucra a los leucocitos (glóbulos blancos), los cuales vienen con anomalías en su estructura, tales como mutaciones en el ADN reproduciéndose de una manera descontrolada. Algunas de estas anomalías de los leucocitos como el que no maduren de forma normal, hacen que la célula crezca y se divida con mayor rapidez, y siga viviendo, cuando normalmente las células sanas después de un ciclo deben de morir, esas células anormales pueden desplazar a las células sanguíneas sanas de la médula ósea, lo que disminuye la cantidad de plaquetas, glóbulos blancos y glóbulos rojos sanos, y causa los signos y síntomas de la leucemia. La leucemia puede clasificarse como: leucemia aguda y leucemia crónica. Figura 3.5

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

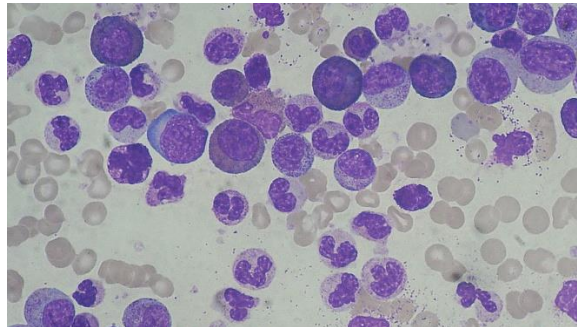


Figura 3.5 Leucemia en células sanguíneas. (Fuente: *Fundamentos de Hematología 2005*)

- **Leucemia aguda:** es aquella donde las células sanguíneas anormales son inmaduras (blastos), es decir, no pueden cumplir sus funciones normales y se multiplican rápido; por lo tanto, la enfermedad empeora con rapidez
- **Leucemia crónica:** es aquella donde las células se producen demasiado y otras, muy pocas; la leucemia crónica comprende células sanguíneas más maduras, es decir, se replican y acumulan muy lentamente, y pueden funcionar con normalidad durante un tiempo

La segunda clasificación de leucemia se centra en los leucocitos afectados. Estas clasificaciones se pueden observar en la Figura 3.6.

- **Leucemia linfocítica.** Este tipo de leucemia afecta las células linfoides (linfocitos) que forman el tejido linfoide o linfático. El tejido linfático forma el sistema inmunitario.
- **Leucemia mielógena.** Este tipo de leucemia afecta las células mieloides. Estas originan los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las células que producen plaquetas.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

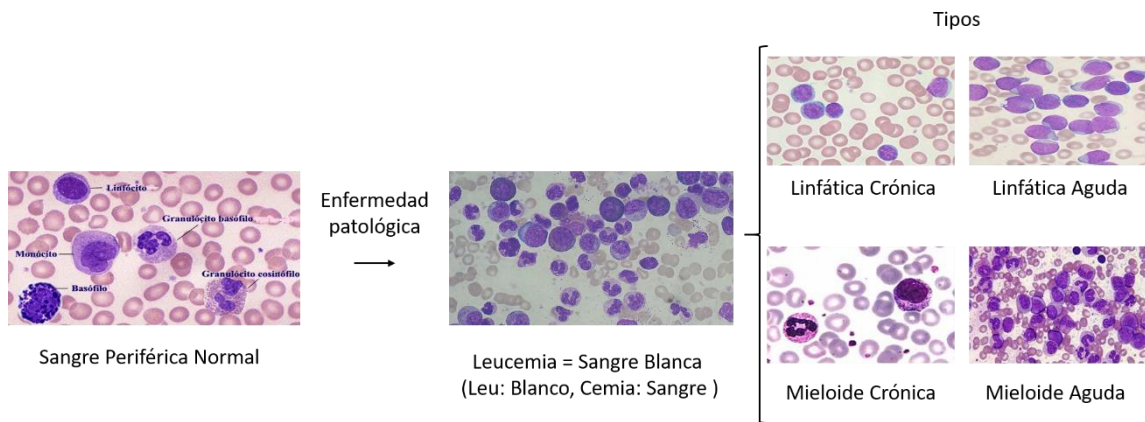


Figura 3.6 Clasificaciones de Leucemias en células sanguíneas. Linfática Crónica: es la producción excesiva de los linfocitos maduros; Linfática Aguda: es la producción excesiva de linfocitos inmaduros; Mieloide Crónica: es la producción excesiva de las células mieloides maduras y Mieloide Aguda: es la producción excesiva de las células mieloides inmaduras.

3.6.2 Anemia

La anemia es una patología en la sangre que se caracteriza por la falta de eritrocitos, los cuales se producen en la médula ósea y son los encargados de transportar oxígeno a los tejidos del cuerpo. Estos contienen hemoglobina, una proteína rica en hierro que le otorga el color rojo a la sangre. La hemoglobina le permite a los eritrocitos llevar a cabo su función transportadora de O_2/CO_2 de los pulmones a los tejidos y viceversa.

Para producir hemoglobina y eritrocitos, el cuerpo necesita hierro, vitamina B-12, ácido fólico. A continuación se describirán los diferentes tipos de anemia.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Anemia por deficiencia de hierro: es el más frecuente de en todo el mundo, la causa principal de esta anemia ferropénica es por la escasez de hierro en el cuerpo. La médula ósea necesita hierro para producir hemoglobina, sin la cantidad adecuada de hierro, el cuerpo no puede producir hemoglobina suficiente para los glóbulos rojos. Este tipo de anemia suele presentarse en mujeres embarazadas que no toman suplementos de hierro.

Anemia por deficiencia de vitaminas: es a causa de la ausencia de ácido fólico y vitamina B-12. Además de hierro, el cuerpo necesita este tipo de vitaminas para producir suficientes eritrocitos sanos.

Anemia por enfermedad crónica: es la causa de algunas enfermedades como cáncer, VIH/sida, artritis reumatoide, enfermedades renales, enfermedad de Crohn y otras enfermedades inflamatorias crónicas, las cuales pueden interferir en la producción de eritrocitos.

Anemia aplásica: inusual y potencialmente mortal se provoca cuando el cuerpo no puede producir suficientes eritrocitos, algunas de las causas es debido a infecciones, determinados medicamentos, enfermedades autoinmunitarias y exposición a sustancias químicas tóxicas.

Anemias de la médula ósea: corresponde a diversas enfermedades, como leucemia y mielofibrosis, pueden provocar anemia al afectar la producción de sangre en la médula ósea.

Anemias hemolíticas.: se presenta cuando los eritrocitos se destruyen más rápidamente de lo que la médula ósea puede reemplazarlos. Algunas enfermedades de la sangre aumentan la destrucción de eritrocitos.

Anemia de células falciformes: se debe a la forma en que la hemoglobina se encuentra defectuosa, la cual fuerza a los eritrocitos a adoptar una forma de media luna (falciforme) anómala. Estas células sanguíneas mueren de forma prematura, lo que tiene como resultado una escasez crónica de eritrocitos.

3.6.3 Mieloma múltiple

El Mieloma múltiple es un tipo de patología crónica denominada cáncer que se forma en las células de los leucocitos denominada célula plasmática. Las células plasmáticas ayudan a combatir infecciones mediante la fabricación de anticuerpos que reconocen y atacan los microorganismos.

El mieloma múltiple hace que las células cancerosas se acumulen en la médula ósea, donde desplazan a las células sanguíneas sanas, en lugar de producir anticuerpos útiles, las células cancerosas producen proteínas anormales que pueden provocar complicaciones. Las células cancerosas no se desarrollan y mueren como lo hacen las células normales, sino que se acumulan y, con el tiempo, sobrepasan la producción de células sanas. En la médula ósea, las células del mieloma desplazan los leucocitos y los sanos, lo que causa fatiga y la incapacidad de combatir infecciones.

Las células del mieloma continúan intentando producir anticuerpos, como lo hacen las células plasmáticas sanas, pero producen anticuerpos anormales que el cuerpo no puede usar. En cambio, los anticuerpos anormales (proteínas monoclonales o proteínas M) se acumulan en el cuerpo generando problemas, como daño renal, daño a los huesos y aumentar el riesgo de padecer fracturas.

Figura 3.7

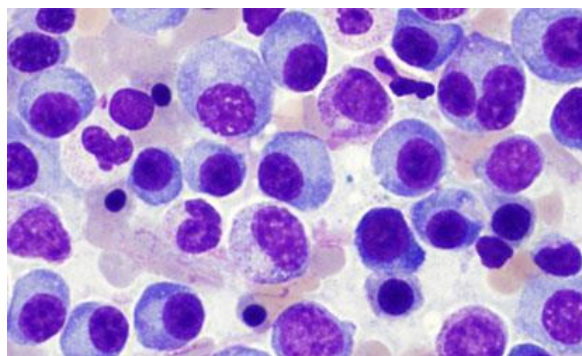


Figura 3.7 Mieloma múltiple en células sanguíneas. (Fuente: *Fundamentos de Hematología* 2005)

3.7 Métodos de conteo de Células.

Para tener conocimiento de algunas de las enfermedades patológicas del ser humano, como en el caso de la leucemia, anemia y mieloma múltiple; es importante hacer exámenes previos basándonos en el conteo células o visto desde una forma física, en la densidad óptica en número de partículas. Valores fuera del rango de “normalidad” pueden ser indicativos de determinadas patologías.

Los métodos para el conteo celular se pueden dividir en: Directos e Indirectos.

Entre los métodos directos se encuentran: La Biometría hemática o hemograma, el Hematocitómetro o cámara de Neubauer, el contador electrónico y dimensionamiento electrónico.

Entre los métodos indirectos se encuentra: Turbiedad o estimación, contenido de proteínas y ensayos con aplicaciones radiactivas [28].

Algunos de los métodos más utilizados para conteo celular son: hemograma o biometría hemática la cual se realiza con la citometría de flujo y la hematocimetría la cual se realiza con el hematocímetro o cámara de Neubauer.

La biometría hemática es una de las pruebas de laboratorio más importantes ya que en un solo estudio se analizan tres líneas celulares completamente diferentes: eritroide, leucocitaria y plaquetaria. Valores fuera del rango de normalidad pueden detectar a tiempo alguna patología o diagnosticar distintas enfermedades. La siguiente Tabla 3.1 presenta los valores normales del hemograma que debe mantener una persona sana según el tipo de célula [29].

PARÁMETRO	VALORES NORMALES DE UN ADULTO	UNIDADES BH	UNIDADES SISTEMA ÓPTICO
LEUCOCITOS	4.5-11	$\times 10^3 (p/\mu l)$	$\times 10^5 (p/\mu l)$
NEUTROFILOS	1.8-7.7	$\times 10^3 (p/\mu l)$	$\times 10^5 (p/\mu l)$
LINFOCITOS	1.0-4.8	$\times 10^3 (p/\mu l)$	$\times 10^5 (p/\mu l)$

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

MONOCITOS	0.0-0.8	$\times 10^3 (p/\mu l)$	$\times 10^5 (p/\mu l)$
EOSINOFILOS	0.02-0.45	$\times 10^3 (p/\mu l)$	$\times 10^5 (p/\mu l)$
BASOFILOS	0.02-0.10	$\times 10^3 (p/\mu l)$	$\times 10^5 (p/\mu l)$
ERITROCITOS	H: 4.5-6.3 M: 4.2-5.4	$(g/dl),$ $\times 10^6 (p/\mu l)$	$\times 10^8 (p/\mu l)$
HEMOGLOBINA	H: 14.0-18.0 M: 12.0-16.0	$\times 10^4 (p/\mu l)$	$\times 10^6 (p/\mu l)$
HEMATROCITRO	H: 42-52 M: 37-47	%	%
PLAQUETAS	150.0-450.0	$\times 10^3 (p/\mu l)$	$\times 10^5 (p/\mu l)$

Tabla 3.1 Valores Normales de Biometría Hemática (BH).

3.7.1 Citómetro de Flujo

Es una técnica que permite obtener información de densidad en número de partículas y morfología sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células (entre 5000 y 10000) la cual será una muestra lo suficientemente representativa del conjunto poblacional.

El principio del funcionamiento de un citómetro de flujo es biofísico en el que se usa luz láser. Sobre un tubo (t) se hace pasar una corriente de partículas en suspensión o células, totalmente alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso proveniente de un láser (f), cuya dispersión y reflexión son analizadas en duración, intensidad y espectro. La información producida de los datos, pueden agruparse de dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada por la emisión de la luz por los fluorocromos presentes en la célula o particular suspendida, al ser excitados por el haz de luz. Las señales luminosas son detectadas y se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora [7]. Figura 3.8

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

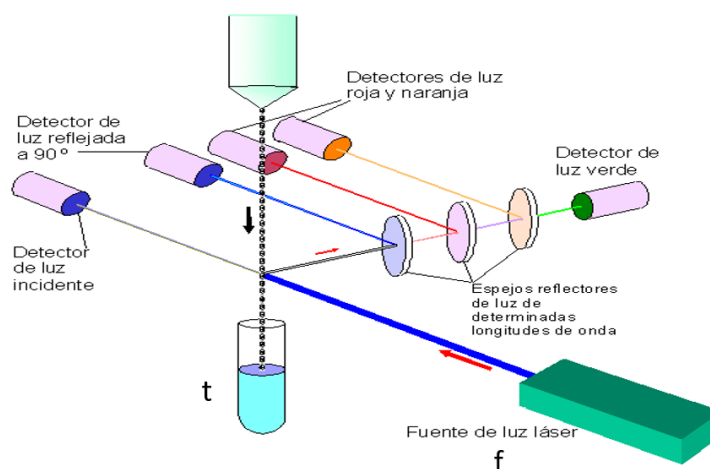


Figura 3.8 Funcionamiento del Citómetro Flujo. Sobre un tubo con partículas en suspensión(t), se hace incidir un haz de luz que proviene de la fuente (f), la luz generada por la luz y emitida es recolectada en los detectores. (Fuente Centro Nacional de Biotecnología, Universidad de Madrid)²¹.

3.7.2 Conteo por cámara de Neubauer

Este método se utiliza para hacer un conteo de células a través de un microscopio de campo claro o de contraste de fases, con la ayuda de un instrumento llamado cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer o hematómetro es un portaobjetos de $30 \times 70 \text{ mm}$ y 4 mm de grosor que tiene dos zonas ligeramente deprimidas Figura 3.9-a, en las cuales con ayuda de un diamante tiene grabada una cuadrícula, dividida por cuatro cuadrantes y cada uno por 16 cuadrillos de dimensiones conocidas de 0.1 mm^3 , como se observa en la Figura 3.9-b

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

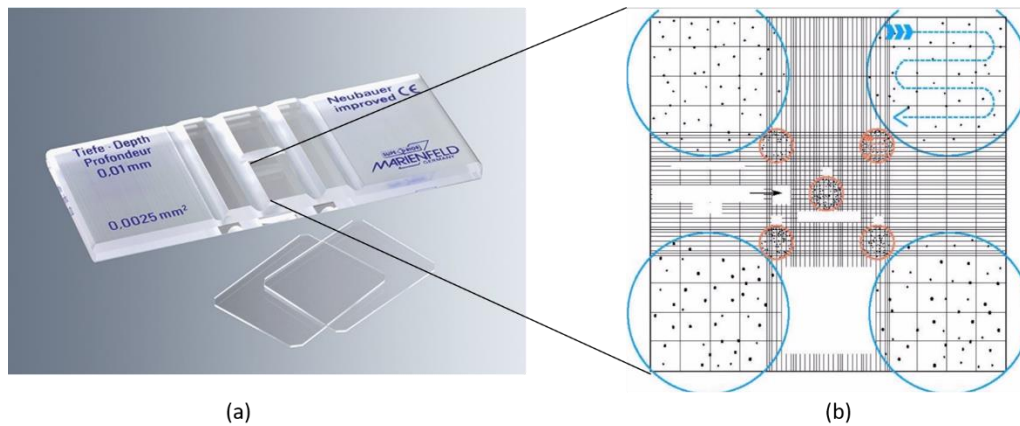


Figura 3.9 (a) Cámara de Neubauer y (b) cuadrícula grabada dividida en cuatro cuadrantes

El conteo se realiza cuadrante por cuadrante, comenzando por el cuadrante uno que se encuentra en la parte superior izquierda y se realiza en forma de zigzag comenzando por el primer cuadro del cuadrante uno y así sucesivamente. Este conteo se debe realizar de forma rápida antes de que las células empiecen a morir. Se cubre la cámara de Neubauer con un cubreobjetos de $22 \times 22 \text{ mm}$ que se adhiere por tensión superficial, posteriormente se introducen las partículas en suspensión las cuales están sometidas a una dilución previa, en algunos con colorantes como el azul de tripano. De acuerdo a la cantidad de células contadas y teniendo conocimiento del volumen del líquido que se depositó en la cámara, se calcula con ayuda de una fórmula la concentración total de las células por unidad de volumen de la muestra del líquido inicial, la cual está expresada de la siguiente manera.

$$\text{Concentración} = \frac{\# \text{ de células contadas} \times 10\,000}{\# \text{ de cuadros contados}}. \quad (16)$$

Capítulo 4. Dispositivo propuesto

En el siguiente capítulo se presenta el montaje experimental propuesto para el conteo de partículas en suspensión, el cual está conformado principalmente por un LED de $\lambda=470\text{nm}$, una lente convergente biconvexa con una distancia focal de 6 cm y un potenciómetro PM320E conectado a un fotodetector S120VC.

Los resultados obtenidos en este trabajo son corroborados mediante un modelo matemático teórico de dispersión múltiple para reflectancia y transmitancia coherente (ADA), descrito en la sección 2.4 del capítulo 2. Las muestras de leucocitos estudiadas se suspendieron en una solución de PBS (Phosphate Buffered Saline por sus siglas en inglés) depositadas en una caja de Petri transparente^[5].

El trabajo se enfoca al estudio de leucocitos, cuya geometría es esférica, siendo una célula mononuclear de diámetro de $10\ \mu\text{m}$ aproximadamente. Como ya se mencionó, la mayor parte de las enfermedades que influyen en los leucocitos (como el caso de la leucemia) se debe a los Linfocitos T, las cuales están programadas para reconocer, responder y recordar antígenos. Mediante cambios en la densidad de partículas ($p/\mu\text{l}$) es posible identificar anomalías en las células que pueden ser asociadas con ciertas patologías.

Previo al estudio de los leucocitos se realizó una simulación con micro-partículas esféricas huecas de Borosicato suspendidas en 5ml de agua tridestilada, para así poder modelar muestras de células de la sangre.

4.1 Componentes del sistema óptico

La luz que incide perpendicularmente sobre una lente se refracta hacia el plano focal, creando la imagen, esto sucede en las lentes convergentes, las cuales constan de dos superficies y al menos una de ellas es curva.

Existen tres tipos de lentes convergentes, las biconvexas donde sus dos superficies son convexas; las planoconvexas aquellas donde una superficie es plana y la otra convexa y por ultimo las cóncavoconvexas aquellas donde una de sus superficies es ligeramente cóncava, mientras que la otra es convexa. [1]

Al utilizar una lente convergente a cierta distancia se forma una imagen invertida y más pequeña que los objetos que se encuentran alejados de la lente (Figura 4.1). Cuando se proyecta una imagen (h_0) a través de una lente decimos que los rayos convergen formando una **imagen real** (h_i), y si no la podemos proyectar la imagen, es decir que los rayos divergen denominamos una **imagen virtual**. Para objetos alejados se forman imágenes reales invertidas y de menor tamaño que los objetos.

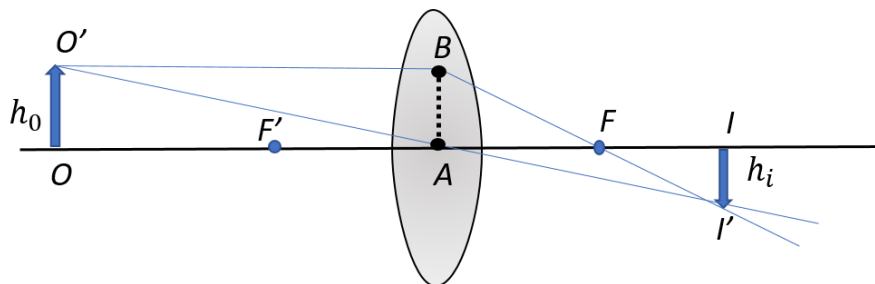


Figura 4.1 Geometría de lente convergente biconvexa utilizada para el montaje experimental.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Los otros componentes que conforman el montaje son un LED de 470nm, un diafragma (para el montaje se le denominó colimador), un fotodetector S120VC, Thorlabs, y un potenciómetro PM320E, Thorlabs.

- **LED**

El LED (Light Emitting Diode por sus siglas en inglés) o diodo emisor de luz, es una fuente de luz constituido por un material semiconductor, cuya característica principal es convertir en luz la corriente eléctrica de bajo voltaje que atraviesa su chip. Se elige esta fuente de luz debido a que presenta mayor estabilidad que un láser, sin generar tanto ruido y porque se propone un montaje económico y sustentable, al alcance de cualquier institución. Los datos que se obtienen utilizando esta fuente tienen variaciones de potencia en un 2% o menos.

- **Diafragma Óptico (Colimador)**

El diafragma es un dispositivo que regula la cantidad de luz que entra en la lente. Para el montaje propuesto se utilizó un diafragma de disco, con el fin de eliminar la luz esparcida y captar solamente la luz coherente, para fines del montaje se le denominó Colimador; de esta manera se puede regular la intensidad que detecta el Fotodetector.

- **Fotodetector**

El Fotodetector S120VC, Thorlabs, es un sensor que genera una señal eléctrica la cual depende de una fuente de luz, constituido por un semiconductor de estado sólido, el cual genera corriente cuando capta un fotón. Su grado de respuesta depende del potenciómetro al cual se encuentre conectado.

- **Potenciómetro**

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

El potenciómetro PM320E, Thorlabs es similar a los resistores pero cuyo valor de resistencia en vez de ser fijo es variable, permitiendo controlar la intensidad de corriente a lo largo de un circuito conectándolo en paralelo, de esta manera nos permite cuantificar la potencia transmitida que es captada por el fotodetector.

Estos objetos descritos son los que componen el sistema propuesto para el estudio de las células, el cual se observa en la Figura 4.2

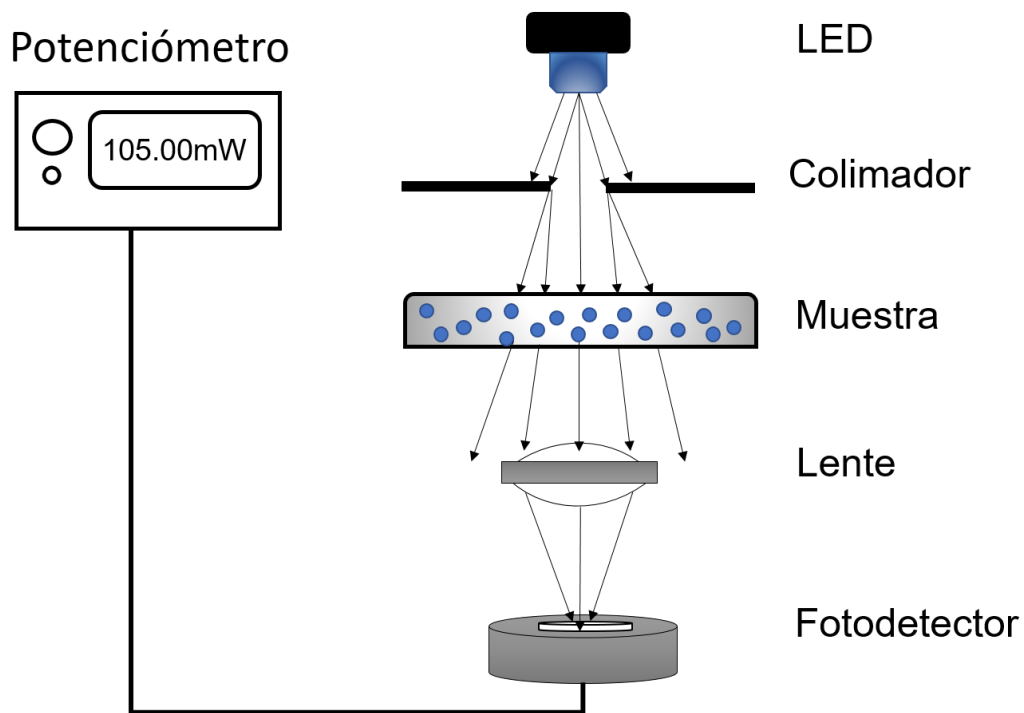


Figura 4.2 Esquema del sistema óptico propuesto.

4.2 Metodología

Se analizó la transmitancia de micro-partículas esféricas huecas de borosilicato con índice de refracción $n=1.520$ ^[25], suspendidas en 5ml de agua tridestilada.

Se utilizó un LED de $\lambda=470\text{nm}$, una lente convergente biconvexa con distancia focal de 6 cm, un potenciómetro PM320E conectado a un fotodetector S120VC el cual nos permitía obtener sólo la luz transmitida coherentemente.

Se estudiaron muestras con distintas concentración de micro-partículas esféricas huecas de borosilicato (0.05g, 0.1g, 0.15g y 0.2g) suspendidas en agua tridestilada Figura 4.3-a; y con ello se observaba un cambio en la transmitancia debido al esparcimiento de la luz por las partículas. Se observó que el detector registraba la luz esparcida y coherente de las partículas por lo que de acuerdo a nuestros montajes propuestos se aisló la luz esparcida tomando solamente la transmitancia generada por la luz coherente.

Previo al estudio de los leucocitos se propusieron tres montajes experimentales para verificar cuál de ellos era el más conveniente para monitorear en el tiempo los cambios en la concentración de las partículas o células suspendidas en un medio transparente.

4.2.1 Procedimiento y preparación de las muestras

Se utilizaron dos tipos de muestras para medir densidad óptica en número de partículas, una de ellas fueron las micro-esferas de Borosilicato y la otra muestra fueron los leucocitos. Para la preparación de cada muestra se utilizaron distintos métodos, los cuales se describirán a continuación.

- **Partículas de Borosilicato**

En este caso se utilizó agua tridestilada, una caja Petri de vidrio, un bote tipo gotero, una caja de Petri de plástico, agua tridestilada, bascula electrónica y un ultrasonic cleaner. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) Se vertía el polvo de las micro-esferas de Borosilicato en la caja de Petri de plástico, para poder pesar las concentraciones que se habían acordado (0.05g, 0.10g, 0.15g y 0.20g) ya que se tenía la cantidad deseada se vertía en el bote tipo gotero.
- 2) Se incorporaban los 5ml de agua tridestilada en el bote tipo gotero, el cual se mezclaba en un baño ultrasónico (ultrasonic cleaner) durante 15 minutos, es decir cada 5 minutos se realizaba una ligera vibración, de esta manera con ayuda de las vibraciones de éste equipo se mezclaban uniformemente todas las partículas de Borosilicato en el agua tridestilada.
- 3) Ya que se tenía la muestra mezclada perfectamente (Figura 4.3-b) se vertía en la caja de Petri de cristal para poder ser monitoreada.

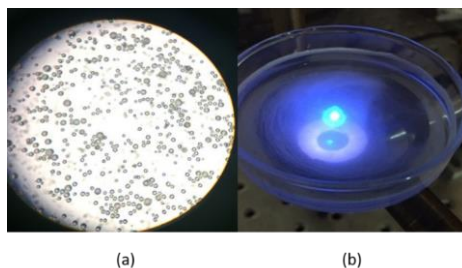


Figura 4.3 (a) Se observa la muestra de Borosilicato en 5 ml de agua tridestilada (vistas en el microscopio) y (b) Se observa la muestra depositada en la caja de Petri para ser monitoreada.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

• Partículas de Leucocitos

Para la medición de las partículas de leucocitos se utilizó el método de separación de células por la técnica de Ficoll que consiste en separar las células por gradiente de densidad. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) La muestra de sangre extraída es colocada en un tubo Falcon.
- 2) La sangre se diluye en una solución de PBS (Phosphate Buffered Saline por sus siglas en inglés), la cual es una solución isotónica que ayuda a las células a mantenerse vivas, se utiliza una concentración a razón 1 : 1 *ml* es decir por cada ml de sangre que tengamos se pondrá un ml de PBS
- 3) Esta muestra se prepara en un tubo de ensayo, el cual se coloca en una centrifugadora durante 5 minutos a 2,500 rpm (revoluciones por minuto). Para aplicar la técnica Ficoll, que consiste en una centrifugación por gradiente de densidad, es decir, las células sanguíneas van formando diferentes capas debido a su densidad, donde los eritrocitos y granulocitos se sedimentan hasta al fondo ya que son más pesados, seguida de la capa de sedimentación se encuentra una capa fina traslúcida constituida por los leucocitos y finalmente sobre esa capa se situaran las pláquetas y el plasma. Figura 4.4-a

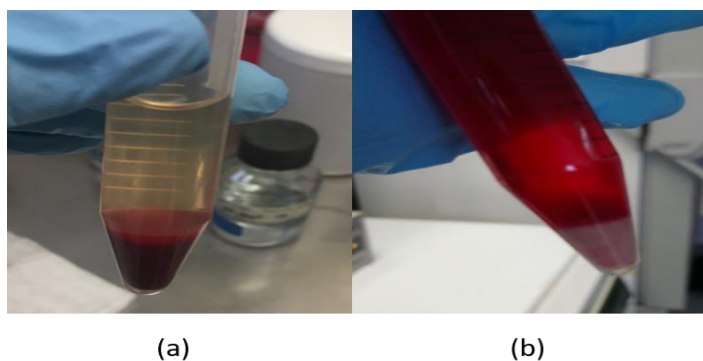


Figura 4.4 (a) Separación de células por gradiente de densidad y (b) Se observa el botón de los leucocitos al inferior del tubo cónico de ensayo.

- 4) Posteriormente se extraen los leucocitos con una pipeta Pasteur y se colocan en otro tubo cónico de ensayo donde se les aplicará una solución lítica hipertónica, la cual está compuesta por cloruro de amonio, bicarbonato de sodio y ácido etilendiaminotetracético; a razón 1 : 3 *ml*, es

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

decir por cada ml de concentración se pondrán 3 ml de solución lítica, ésta solución tiene como función lisar los eritrocitos y dejar los leucocitos al fondo. Figura 4.4-b

- 5) La muestra se vuelve a poner en la centrifugadora otros 5 min, hasta apreciar el botón de leucocitos en la parte inferior Figura 4.4-b, los cuales son extraídos con la pipeta Pasteur y depositados en un pequeño tubo cónico de ensayo con capacidad de 1ml. Es posible apreciar en el tubo cónico la diferencia en el botón de una persona sana (A) la cual se redondea con un círculo azul y el botón de una persona con leucemia (B) el cual esta redondeado con un círculo rojo. Figura 4.5

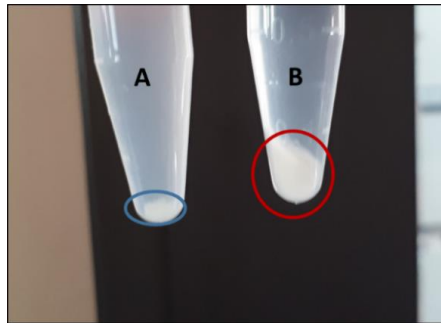


Figura 4.5 Comparación del botón de células sanas (A, círculo color azul) y células con leucemia (B, círculo color rojo)

- 6) Finalmente, para el conteo de células en la cámara de Neubauer, en un microtubo de 0.6 mL, se vierten 10 μ L de la muestra de leucocitos y 10 μ L de azul de tripano, es decir 10:10 μ l a una dilución de 20 μ l, y se resuspende la muestra. La dilución variaría dependiendo del tamaño del botón obtenido por la separación. Ésta solución se utiliza para hacer un conteo de células vivas en la cámara de Neubauer (Figura 4.6-a), a través del microscopio óptico
- 7) hPara las mediciones en el sistema, las partículas de leucocitos en PBS (1ml) son depositadas en la caja de Petri de la misma manera que las partículas de Silicio. Figura 4.6-b

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

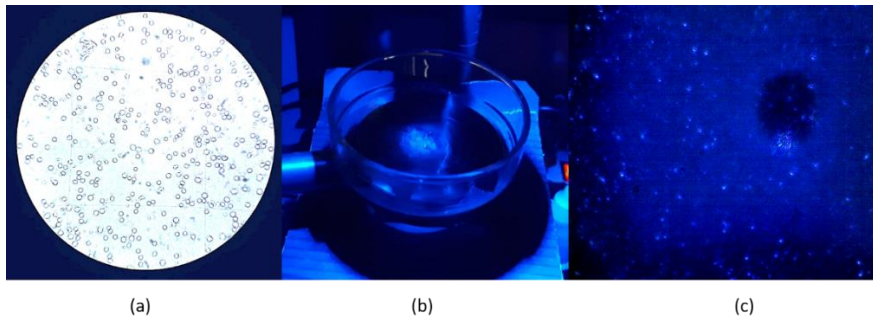


Figura 4.6 (a) Se observa la muestra de partículas de Leucocitos (vistas en el microscopio), (b) Se observa la muestra depositada en la caja de Petri para ser monitoreada y (c) Se observa la muestra los leucocitos vistos en el sistema óptico.

4.3 Esquema del diseño

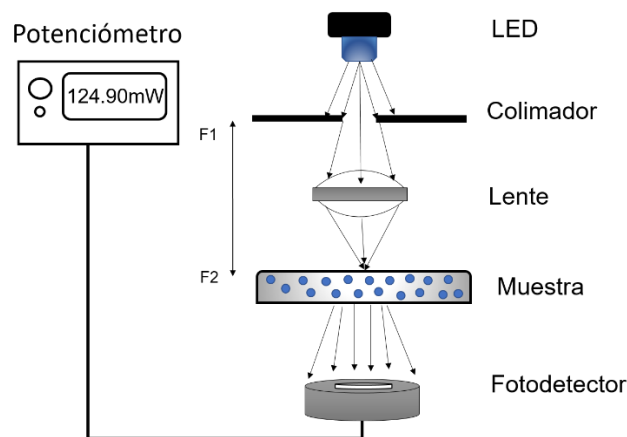
De acuerdo con la distancia focal de la lente, se propusieron tres montajes distintos basándonos en la posición de la muestra de acuerdo con la distancia focal de la lente. Para cada montaje se realizaron cuatro mediciones por cada uno, con una muestra de 0.15g de partículas de borosilicato en 5 ml de agua tridestilada.

- **Fuera de la distancia focal:** La muestra se coloca fuera de la distancia focal y por debajo de la lente, considerando que el detector se encuentra también fuera de la distancia.
- **Límite de la distancia focal:** La muestra se coloca en el límite de la distancia focal y por arriba de la lente; es decir la muestra estará en uno de los focos de la muestra y en el otro foco se encuentra el detector.
- **Dentro de la distancia focal:** La muestra se coloca dentro de la distancia focal y por arriba de la lente; considerando ponerla 5 cm dentro de la distancia, el detector se sigue manteniendo en el otro foco a 6 cm.

4.3. 1 Fuera de la distancia focal

Para este arreglo experimental la muestra de partículas de borosilicato a una concentración fija (0.15g en 5 ml de agua tridestilada), se colocó fuera de la distancia focal y por debajo de la lente, es decir a una distancia de 6.90 cm, como se muestra en la Figura 4.7

Se colocó de la siguiente manera: el LED va sostenido con un soporte, a una distancia de 6.62 cm se colocó un revolver que nos sirve como colimador para evitar la dispersión de la luz con un diámetro de abertura de unos 0.5 cm, posteriormente a una distancia de 8.29 cm se colocó la lente, seguida de ésta a una distancia de 6.90 cm se coloca la muestra y finalmente a una distancia de 2.00 cm se coloca el fotodetector. Con este montaje se obtiene una potencia en el detector de 124.9 μW , los valores obtenidos se pueden observar los valores para 4 mediciones en la Tabla 4.1.



MEDICIÓN	LED ($\pm 0.6 \mu\text{W}$)
1	127.5
2	127.5
3	121.4
4	123.3
PROMEDIO	124.9

Tabla 4.1 Datos correspondientes a la potencia obtenida del LED en el montaje 1.

Figura 4.7 Diagrama del montaje experimental fuera de la distancia focal

4.3. 2 Límite de la distancia focal

Para este arreglo experimental la muestra de partículas de borosilicato se colocó en el límite de la distancia focal y por arriba de la lente, es decir a una distancia de 6.00 cm, como se observa en la Figura 4.8

Se colocó el sistema óptico de la siguiente manera: el LED va sostenido con un soporte, a una distancia de 6.62 cm se colocó un revolver que nos sirve como colimador para evitar la dispersión de la luz con un diámetro de abertura de unos 0.5 cm, posteriormente a una distancia de 2.68 cm se coloca la muestra de borosilicato a la concentración elegida, seguida de ésta a una distancia de 6.00cm se coloca la lente y finalmente a una distancia de 6.00 cm se coloca el detector. Con este montaje se obtiene una potencia en el detector de $113.2\mu\text{W}$, los valores obtenidos se pueden observar los valores en la Tabla 4.2

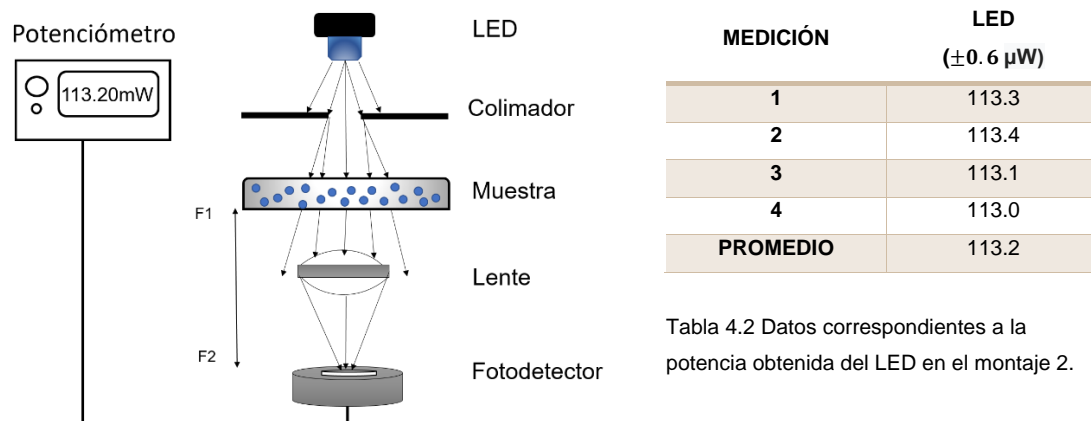


Figura 4.8. Diagrama del montaje experimental en el límite de la distancia focal.

Tabla 4.2 Datos correspondientes a la potencia obtenida del LED en el montaje 2.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

4.3. 3 Dentro de la distancia focal

Para este arreglo experimental se propuso colocar la muestra de partículas de borosilicato dentro de la distancia focal y por arriba de la lente, es decir a una distancia de 6.00 cm, como se muestra en el siguiente diagrama Figura 4.9

Se colocó el sistema óptico de la siguiente manera: el LED va sostenido con un soporte, a una distancia de 6.62 cm se colocó un revolver que nos sirve como colimador para evitar la dispersión de la luz con un diámetro de abertura de unos 0.5 cm, posteriormente a una distancia de 4.68 cm se coloca la muestra de borosilicato a la concentración elegida, seguida de ésta a una distancia de 5.00cm se coloca la lente y finalmente a una distancia de 6.00 cm se coloca el detector. Con este montaje se obtiene una potencia en el detector de $105.6 \mu\text{W}$, los valores obtenidos se pueden observar los valores en la Tabla 4.3.

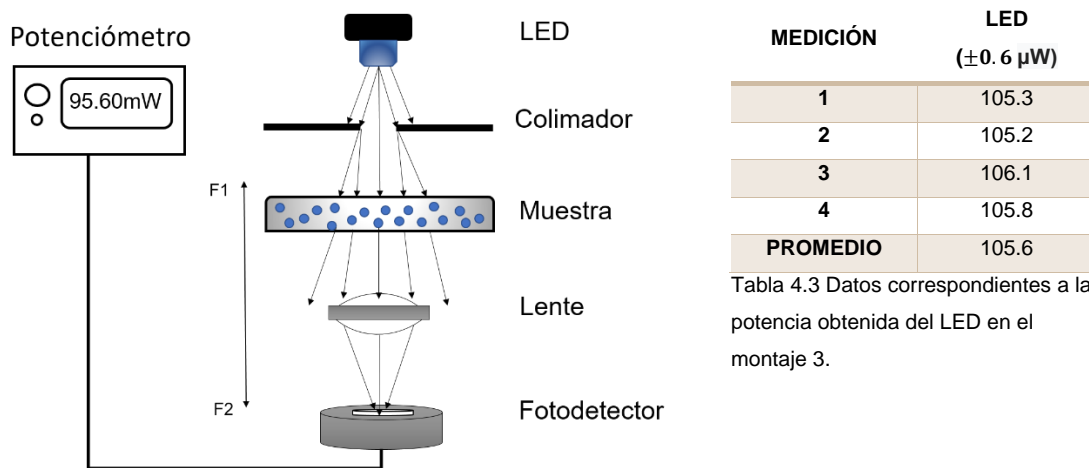


Figura 4.9 Diagrama del montaje experimental dentro de la distancia focal.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

De acuerdo con las propuestas que se mencionan para el montaje se determinó que para obtener mejores resultados al captar la luz coherente y tener menos dispersión, el montaje a elegir es el tercero, en el cual se encuentra la muestra dentro de la distancia focal y por arriba de la lente, provocando que el plano imagen de la muestra (las partículas) se encuentre justo en el detector y no fuera de él, obteniendo imágenes reales.

En la sección 4.1 de este capítulo se describe la conformación de una lente biconvexa, basándonos en estas descripciones, se observó que el plano imagen de las partículas de borosilicato se encuentran justo en el fotodetector, ya que todos los haces de luz que atravesaron la muestra y son esparcidos se vuelven a recolectar con la lente, obteniendo de esta manera una proyección con mayor precisión de la intensidad de luz coherente que atraviesan las partículas.

Capítulo 5. Resultados

Con base en lo descrito en el Capítulo 4, una vez definido el montaje más conveniente para medir las partículas en suspensión se procedió a realizar las mediciones de la transmitancia de las partículas de borosilicato y los leucocitos. En este capítulo, se describen los resultados obtenidos así como algunos experimentos previos realizados con monocapas de eritrocitos.

Inicialmente se buscaba aplicar un modelo de dispersión múltiple para reflectancia coherente de una monocapa de partículas esféricas soportadas en un substrato transparente colocado en forma vertical, sin embargo con esta metodología, los eritrocitos se precipitaban o eran barridos por las distintas soluciones empleadas, además de que no se obtuvieron resultados consistentes con las diferentes muestras resultando un método no reproducible.

5.1 Experimentos previos

Se define una monocapa como un sistema compuesto por una sola capa de átomos o moléculas estrechamente alineadas o empaquetados. Cuando las partículas en una monocapa son de tamaño comparable o mayor que la longitud de onda de la radiación incidente, la luz difusa se dispersa en todas las direcciones por lo que el flujo de energía se propaga en ángulos sólidos grandes. En la práctica, la reflectividad o reflectancia especular de una monocapa se relaciona directamente con la reflectancia coherente del sistema [3]. Con esta premisa se buscaba detectar la luz coherente al pasar por la monocapa y monitorear el comportamiento de las muestras de eritrocitos en función del tiempo para observar la lisis o variaciones en el tamaño de la célula por efecto de soluciones hipertónicas e hipotónicas.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Cuando una célula es expuesta a condiciones hipotónicas, hay un movimiento neto de agua hacia dentro de la célula, esta tiende a inflarse y puede llegar a explotar (lisis). Caso contrario con una solución hipertónica en la cual se encuentra una mayor concentración en el soluto externo, por lo que una célula en esta solución pierde agua debido a la presión osmótica y tiende a deshidratarse.

Para realizar una monocapa de eritrocitos se utilizó el método de frotis el cual consiste en lo siguiente:

- Se deposita una gota de sangre en un extremo de un portaobjetos limpio, aproximadamente de unos 2 mm de diámetro, esto es para que forme un extendido largo pero no muy grueso (Figura 5.1-a)
- Se utiliza un segundo objeto para distribuir la gota de sangre y extenderla sobre la superficie del primer portaobjetos, el segundo portaobjetos se mantiene en un ángulo de 45° o menos sobre la gota de sangre, moviéndola un poco hacia atrás hasta tocar la gota de sangre (Figura 5.1-b); posteriormente se mueve el portaobjetos en sentido contrario, es decir, hacia el frente, dejando que la sangre se extienda por todo el portaobjetos, tratando que quede una capa de sangre bien distribuida. (Figura 5.1- c)

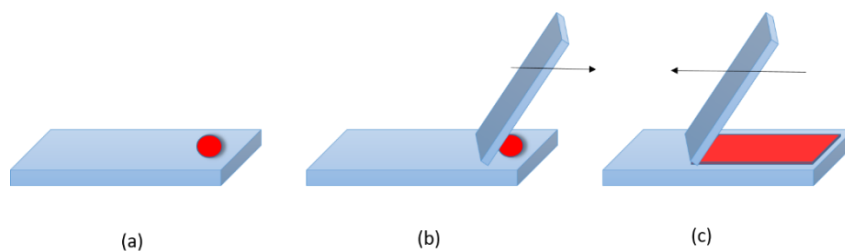


Figura 5.1 (a) gota de sangre depositada al extremo del portaobjetos, (b) segundo portaobjetos acomodado en un ángulo de 45° y (c) distribución de la sangre dejando una capa delgada.

- Ya que se obtiene la monocapa delgada como se observa en la Figura 5.2-a, obtenida por el microscopio óptico (MO), se determina la sección que es idónea para utilizar el método de fijación. Se entiende por fijación

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

a la manipulación sobre un tejido para obtener toda su parte estructural lo más inalterada posible, de tal manera que todos sus componentes se mantengan con las mismas características que cuando se encontraban vivos, dicho esto al seleccionar un área, se le aplica una gota de metanol diluido con agua tridestilada al 70% como se puede observar en la Figura 5.2-b. Este método de fijación se realizó debido a que la muestra se encontraba colocada de manera vertical (Figura 5.3)

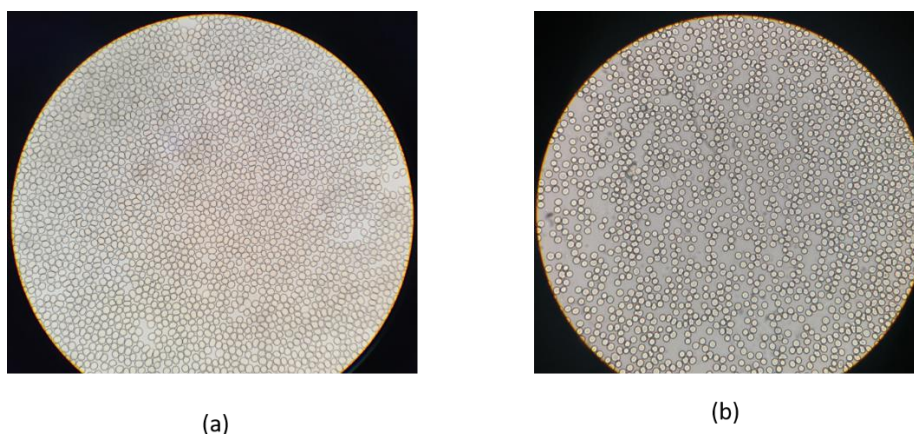


Figura 5.2 (a) monocapa de eritrocitos realizada con frotis, antes de ser fijada por el metanol y (b) monocapa de eritrocitos fijada con metanol. (Con una amplitud de 40x)

Este procedimiento se realizó para ver si con el sistema que se tenía se podía medir la lisis celular de los eritrocitos, utilizando tres formas para generar lisis o mantenerlas vivas. La primera era aplicar agua tridestilada a la muestra de sangre generando que éstas tuvieran lisis de forma hipotómicamente, es decir, absorbiendo mayor cantidad de agua y perdiendo sales, hasta que la membrana celular no resistiera y sufriera un rompimiento.

La segunda forma era aplicar mayor cantidad de solución salina con sal obteniendo una solución hipertónica, provocando que las células de los eritrocitos tuvieran una lisis hipertónica, es decir, absorbiendo mayor cantidad de sal y perdiendo agua, provocando que la membrana celular se deshidratara. Y en la última, se utilizó una solución isotónica utilizando solución salina al 0.9% de NaCl, provocando que las células de los eritrocitos se mantuvieran vivas.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Se realizaron quince muestras de monocapas, es decir, para cada solución hipotónica, hipertónica e isotónica se midieron 5 muestras en cada una de las soluciones. El objetivo era observar el momento en que se presentará la lisis celular, realizando un monitoreo durante 30 minutos. La manera en la cual se colocaba la muestra se puede observar en la Figura 5.4.

Las caras de dos portaobjetos se colocaban de forma paralela separadas una distancia de 0.2mm; el contorno de este volumen en forma de prisma rectangular era sellado dejando solo un lado abierto donde se introducía la muestra. En una de las paredes de un portaobjetos se encontraba la monocapa fijada con metanol (la cual se indica con el círculo rojo, de la figura 5.3) las dos paredes se sostienen con cinta micropore para evitar derramamientos y finalmente para poder construir una base, el prisma rectangular se sujetaba con clips binder. Por la pequeña abertura se introduce con ayuda de una jeringa la solución ya sea hipotónica, hipertónica o isotónica.

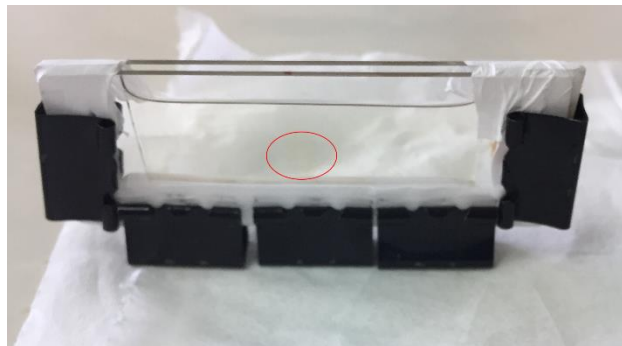


Figura 5.3 Colocación de la muestra en los portaobjetos. El círculo rojo indica donde se encontraba el frotis de los eritrocitos

Estos portaobjetos fueron colocados perpendicularmente al laser, al lente y al fotodetector (Figura 5.4). Cabe mencionar que las muestras de monocapas de eritrocitos sin tratamiento de fijación presentaron muchas dificultades a la hora de medir, ya que se derramaba la solución, haciendo que se barrierá la muestra de sangre, por esta razón se decidió fijarla con metanol.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

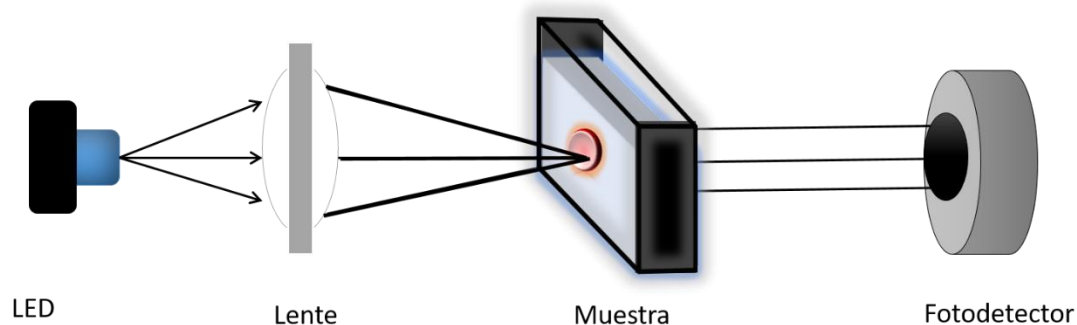


Figura 5.4 Descripción del montaje inicial.

- **Solución Hipotónica**

La solución hipotónica utilizada fue agua tridestilada. El agua tridestilada tiene la característica que al tener un proceso de destilación no contiene sales ni minerales por lo que al someter los eritrocitos a la solución hipotónica se genera un gradiente de potencial químico entre el agua contenida en el eritrocito y el agua del medio, originando el flujo de agua al interior de eritrocito a través de su membrana. Al fluir el agua al interior del eritrocito se hincha hasta alcanzar el punto crítico, donde la membrana pierde su integridad y ocurre la hemólisis.

En la Figura 5.5-a, se puede ver este fenómeno donde los eritrocitos presentan deformación en la membrana celular, esto quiere decir que han presentado lisis celular a través de perder sales y absorber gran cantidad de agua.

- **Solución Hipertónica**

Como solución hipertónica se utilizó una solución salina (NaCl) a una concentración del 3% de sal, es decir, se le agregó 0.045g de sal a 2 ml de la solución salina. En este caso cuando el eritrocito está sumergido en una solución hipertónica, se genera un gradiente de potencial químico entre el agua contenida en el eritrocito y el agua de la solución, originando el flujo de agua del interior del eritrocito hacia el exterior de él.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Como se puede ver en la Figura 5.5-b, los eritrocitos se mantienen deshidratados la membrana celular se ve como si fuera una pasa, esto quiere decir que han presentado lisis celular a través de perder agua y absorber gran cantidad de sal.

- **Solución Isotónica**

Una solución isotónica es aquella que mantiene a los eritrocitos en un estado íntegro y estable. En este caso, la solución isotónica fue una solución salina de Cloruro de Sodio (NaCl) con una concentración del 0.9%. La figura 5.5-c, muestra la imagen obtenida después media hora, de los eritrocitos los cuales se mantienen hidratados y la membrana celular se mantiene completa, esto quiere decir que no se ha presentado lisis de ningún modo.

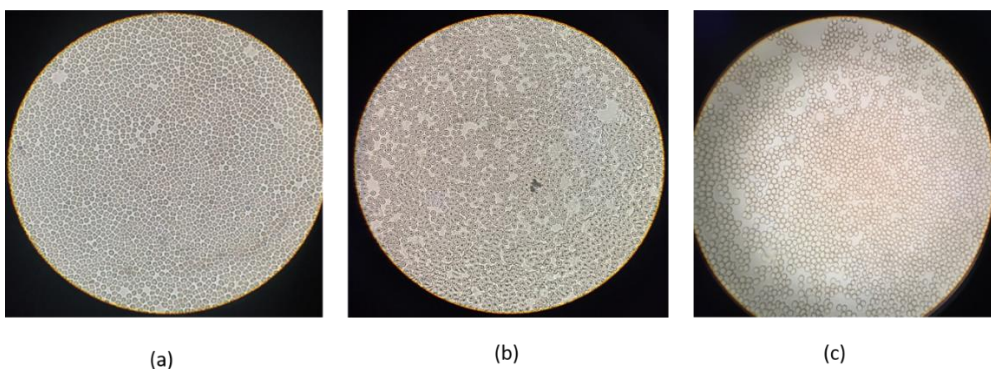


Figura 5.5 Muestra de eritrocitos con (a) solución Hipotónica, (b) solución hipertónica y (c) solución isotónica. (Con una amplitud de 40x)

Al analizar las muestras con las 3 soluciones mediante el sistema experimental no se obtuvieron resultados confiables. No se visualizaban cambios en la potencia por efecto de la lisis, además, la manera en que se colocaba la muestra no era la idónea ya que la monocapa de sangre era barrida por la solución por lo que se decidió modificar el experimento, tanto en el montaje como en el tipo muestras a estudiar. Este método de fijar muestras y colocarlas perpendicularmente ocasionaba demasiadas inconsistencias ya que al obtener los datos, no resultaba un método reproducible. Por lo anterior se propusieron los tres montajes que se describen en el Capítulo 4.

5.2 Montaje Óptico

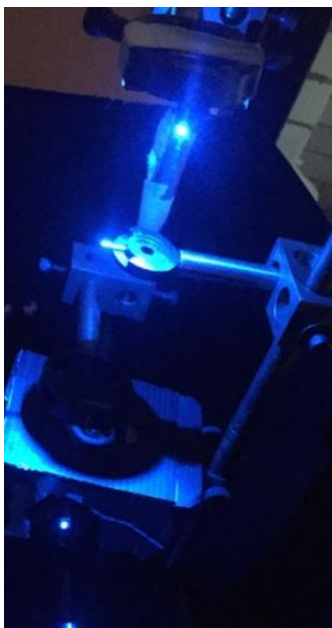
5.2. 1 Partículas de Borosilicato

Se utilizaron micro-partículas esféricas de Borosilicato con un diámetro de $10\ \mu\text{m}$, con índice de refracción de $n = 1.520$ [25] y con densidad de $\rho_{BS} = 1.3964 \pm 1\% \text{ g/ml}$ la cual se calculó, suspendidas en 5ml de agua tridestilada, utilizando cuatro distintas concentraciones 0.05g, 0.10g, 0.15g y 0.20g. Los valores de las distintas concentraciones se eligieron de manera arbitraria, la única condición fue obtener una muestra no saturada de partículas que fueran visibles en el MO.

Por cada concentración se realizaron tres mediciones con el sistema óptico propuesto, verificando que la potencia del LED de $\lambda=470\text{nm}$ se mantuviera constante, entre 95 - 98 μW . Para ello, se dejó el LED durante 10 min encendido antes de realizar mediciones con la muestra para estabilizarlo, tomando únicamente la potencia de la luz coherente del LED (Figura 5.6) bloqueando toda la luz esparcida que llega al detector. Estos datos se pueden observar en la Tabla 5.1. Es importante mencionar que se monitoreo la muestra aproximadamente media hora, por lo que se toman 18 000 datos por media hora, es decir, tomando datos 600 datos por minuto o bien cada 0.1s, los datos se registran en un block de notas los cuales con ayuda del programa ORIGIN son graficados.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ



MUESTRA (g)	LED ($\pm 0.6 \mu\text{W}$)			PROMEDIO
0.05	95.3	98.2	93.4	95.6
0.10	95.2	98.2	94.5	96.0
0.15	96.1	98.5	94.5	96.4
0.20	95.8	97.2	94.2	95.9

Tabla 5.1. Datos correspondientes a la potencia de la

luz coherente obtenida del LED.

Figura 5.6 Potencia del LED medida

durante 10 min con montaje experimental.

Al estar el LED ya estabilizado después de los 10 min, se colocaba la muestra con las micro-partículas de Borosilicato en la caja de Petri, (Figura 5.7) midiendo con el potenciómetro la transmitancia durante 1 min.

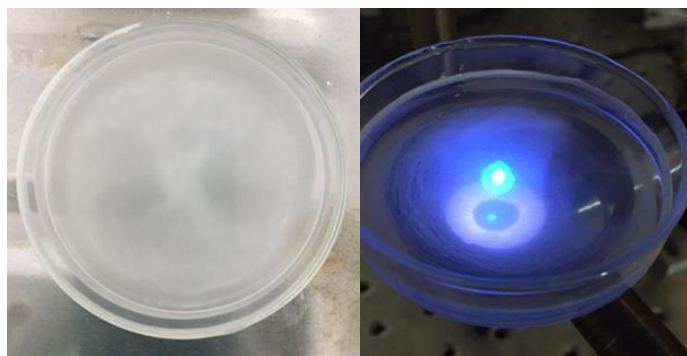


Figura 5.7 Preparación de la muestra con polvos de Si en 5ml de agua tridestilada (parte izquierda) y

Colocación de la muestra en la caja e Petri según el montaje experimental (parte derecha).

- **Conteo preliminar de micro-partículas de Borosilicato.**

Para el conteo preliminar de las partículas de borosilicato (Dantec Dynamics, HGS-10, con número de serie 80A6011) se calculó de manera experimental la masa de una sola partícula de borosilicato (m_{1p}) y su densidad (ρ_{BS}).

De una suspensión de $0.4096g$ de polvo de Borosilicato en $7.5129 ml$ de agua tridestilada, la suspensión mezclada homogéneamente con ayuda del ultrasonic cleaner, se tomó $1 ml$ de muestra con la micropipeta, depositando un volumen total de $v_T = 1.31984 ml$ en una caja de Petri, la muestra final se dejó en la báscula electrónica hasta que el agua se evaporará.

La suspensión de $1 ml$ fue medida en una báscula, la masa inicial fue $m_0 = 1.3390g$, después se dejó un tiempo hasta que el agua se evaporó obteniendo así una masa final de $m_f = 0.0675g$, la cual corresponde a las partículas de borosilicato. Podemos ver que la masa del agua evaporada tiene un valor de $m_{agua} = 1.2715g$ y un volumen de $v_{agua} = 1.2715ml$, tomando la diferencia del volumen total (v_T) y el volumen del agua v_{agua} se obtiene el volumen final correspondiente a las partículas de borosilicato $v_f = 0.04834 ml$. De esta manera, con los datos de la masa (m_f) y el volumen final v_f pudimos calcular la densidad de las partículas de borosilicato:

$$\rho_{BS} = m_f / v_f = 1.3964 \frac{g}{ml} \pm 1\%. \quad (17)$$

Teniendo el valor de la densidad de las partículas de borosilicato (ρ_{BS}), podemos calcular la masa de una sola partícula con ayuda de la siguiente expresión:

$$m_{1p} = \rho_{BS} v_{1p}. \quad (18)$$

Donde el volumen de una sola partícula es: $v_{1p} = 5.23 \times 10^{-10} ml$ el cual se obtuvo a partir de $v_{1p} = \frac{4}{3} \pi r^3 = \frac{4}{3} \pi (5\mu m)^3$. Finalmente de la ecuación (18)

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

se obtiene el valor de la masa de una sola partícula de borosilicato: $m_{1p} = 7.303 \times 10^{-10} g$

A partir de estos valores se determinó la densidad de partícula o bien el conteo por cada concentración ($C_m(g)$), es decir, la masa que corresponde al polvo de las partículas de borosilicato en 5ml de agua tridestilada, que se utilizó para determinar que el sistema podía detectar distintas concentraciones.

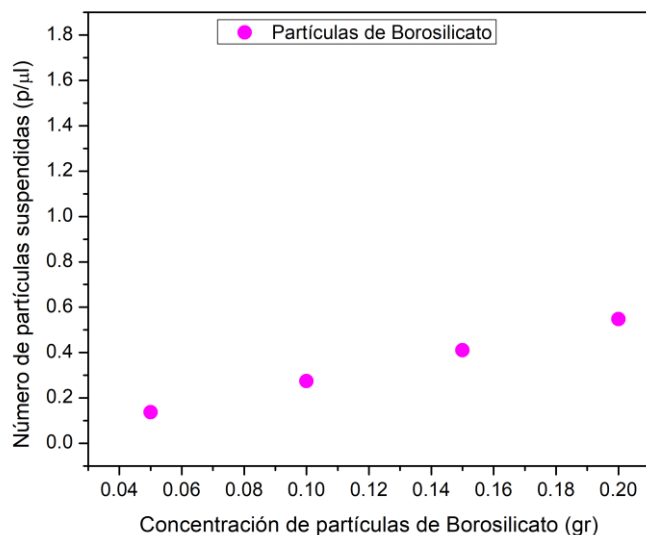
Es importante mencionar que se simularon concentraciones de partículas de borosilicato como si fueran leucocitos, los cuales se utilizan para hacer conteos con la cámara de Neubauer, estos se consideran en el conteo como partículas por mililitro ($\frac{p}{ml} \times 10^8$). Para determinar la densidad óptica en número de partículas (ρ_{EC}) de la suspensión que corresponde a la extinción coherente de la transmitancia se puede calcular con ayuda de la siguiente expresión.

$$\rho_{EC} = \frac{C_m(g)}{m_{1p} \times 5ml \times 10^8} \cdot \cdot \quad \left[\frac{p}{ml} = \frac{p}{\mu l} \times 10^5 \right] \quad (19)$$

Los datos correspondientes a la extinción coherente (ρ_{EC}) de cada concentración ($C_m(g)$) se observan en la Tabla 5.2, verificando que a mayor cantidad de micro-partículas disueltas en la suspensión mayor es la concentración. En la Figura 5.8 se puede observar la comparación de las cuatro concentraciones conforme a la cantidad de partículas.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ



Concentración (g)	No. De partículas, en una suspensión. ρ_{EC} $\times 10^5 \left(\frac{P}{\mu l} \right)$
0.05	0.137
0.10	0.274
0.15	0.410
0.20	0.547

Tabla 5.2. Datos correspondientes al conteo de micro-partículas de Borosilicato por cada concentración.

Figura 5.8 Conteo de micro-partículas de Borosilicato por cada concentración.

En los datos experimentales que se presentan en la Figura 5.8, se puede observar que existe una relación entre la concentración de partículas de Borosilicato disueltas con el número de partículas suspendidas, mostrando un comportamiento creciente, es decir, conforme va aumentando la cantidad de gramos en las muestras va aumentando la cantidad de partículas en la solución.

- **Transmitancia de micro-partículas de Borosilicato.**

Finalmente, por cada muestra se registró la transmitancia medida durante un periodo de 30 min, y con ayuda del programa ORIGIN se graficó la potencia transmitida con respecto al tiempo, teniendo como línea basal la transmitancia del agua tridestilada (Figura 5.9).

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Como se puede observar, conforme aumenta la cantidad de partículas de Borosilicato (Figura 5.8), va disminuyendo la cantidad de luz coherente que atraviesa la muestra, lo que se describe como disminución de la transmitancia.

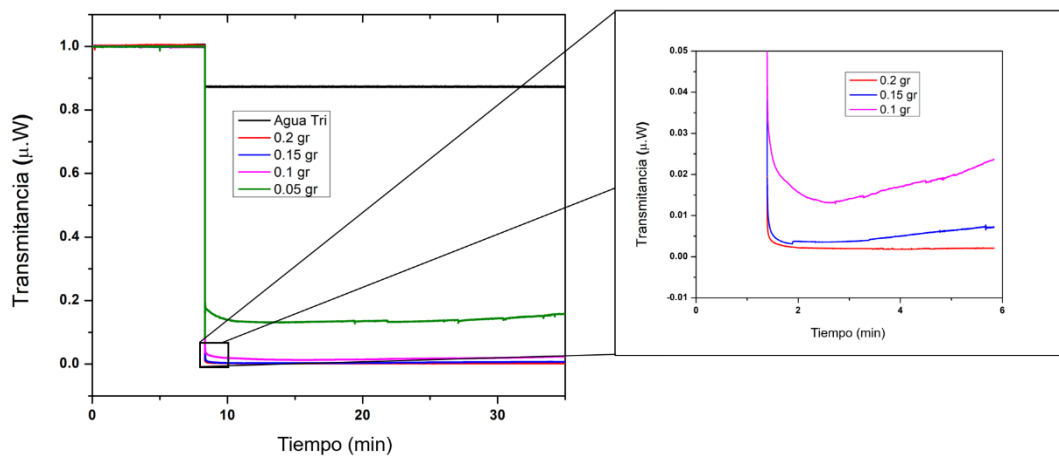


Figura 5.9 Transmitancia de micro-partículas de Borosilicato a distintas concentraciones comparadas con agua tridestilada.

5.2. 2 Curva de calibración con micro-partículas de Borosilicato

Con ayuda de las ecuaciones (18) y (19), se determinaron densidades de conteo ya conocidas para obtener la curva de calibración del sistema, es decir, la curva teórica que se obtuvo al utilizar ADA descrito en el Capítulo 2. La curva de calibración se obtuvo midiendo la potencia de la luz transmitida de siete muestras con densidades diferentes (Tabla 5.3). Es importante mencionar que se realizaron tres mediciones por cada muestra, reportando el promedio. Cada una fue monitoreada aproximadamente un minuto, por lo que se tomaron 1 800 datos, es decir, 600 datos por minuto o bien cada 0.1s. Al terminar se tomó el promedio de cada muestra y los valores de potencia fueron normalizados (Figura 5.10)

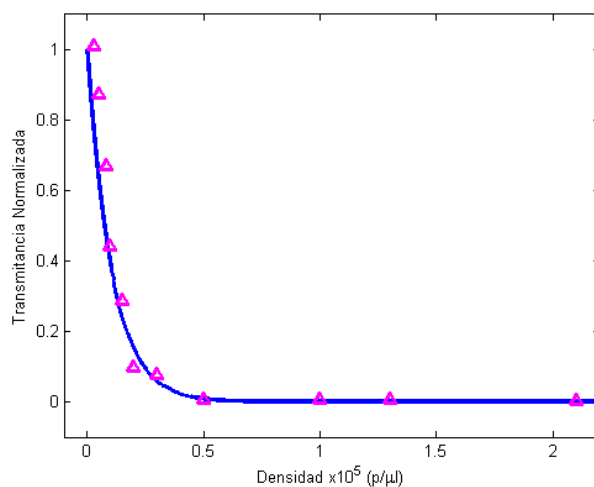


Figura 5.10 Transmitancia de micro-partículas de Borosilicato ajustados a la curva teórica.

Muestra	ρ $\times 10^5$ (p/ μ l)	Potencia Transmitancia normalizada μ W
1	0.029	1.00973
2	0.050	0.87244
3	0.080	0.67051
4	0.087	0.44258
5	0.150	0.28609
6	0.198	0.10964
7	0.300	0.09887
8	0.500	0.07601
9	1.000	0.00617
10	1.300	0.00583
11	2.100	0.00496

Tabla 5.3 Potencia de la transmitancia normalizada comparada por el conteo de las partículas de Borosilicato.

A partir de los resultados de la gráfica anterior, se pudo determinar los límites de detección del sistema los cuales se pueden observar en la Tabla 5.4

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Límites de detección	CONCENTRACIÓN $\times 10^5$ (p/ μ l)	LED ($\pm 0.6 \mu$ W)
Mínimo	0.003	100.5
Máximo	2.2	0.01

Tabla 5.4. Límites de detección del sistema.

5.2. 3 Partículas de Leucocitos.

Para medir la transmitancia de los leucocitos, se tomaron muestras de 5ml de sangre periférica pertenecientes a donadores sanos o de control y donadores con leucemia del laboratorio de Hematología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Las muestras de sangre humana se recogieron en tubos vacutainer los cuales contenían ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. La separación de las células se realizó por la técnica Ficoll, que consiste en una centrifugación por gradiente de densidad, descrito en el Capítulo 4.2.1. Una vez obtenidas por separadas las células blancas, estas fueron contadas con la cámara de Neubauer y con el sistema óptico propuesto, con el fin de comparar los resultados obtenidos.

La metodología fue la siguiente:

Se verifico que la potencia del LED se mantuviera lo más estable posible. La potencia del sistema sin muestra fue de 104 – 105 μ W. Para ello, se dejó el LED encendido durante 10 min antes de realizar mediciones con la muestra. Posteriormente la caja de Petri (vacía) se colocó por encima del detector, obteniendo una potencia de $\approx 90 \mu$ W. Este procedimiento se realizó para cada medición verificando que fueran las mismas condiciones, de igual manera que la caja de Petri se encontrará limpia y con las condiciones adecuadas para medir.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Ya que se verificó que el LED está estable y la caja de Petri se encuentra limpia, se depositó 1 ml de PBS para tomarlo como referencia o línea basal. Esta muestra se deja 30 minutos obteniendo una potencia $\approx 93 \mu W$, este proceso se realizó para cada muestra de leucocitos, promediando al final cada valor de PBS, determinando finalmente la línea base.

Después de medir el PBS, se procede a medir la muestra de leucocitos, colocando la muestra en la caja de Petri previamente limpia. Los datos que se registraron durante este periodo se analizaron con ayuda del programa Origin (Figura 5.11), observando una clara estabilidad en las muestras durante el tiempo de medición. De acuerdo con los datos obtenidos y el diagnóstico establecido clínicamente por los hematólogos, se obtuvieron los valores de la potencia transmitida para cada una de las muestras. Así se pudo determinar que aquellos pacientes considerados “sanos”, obtenían una potencia entre 95 a 62 μW , que disminuía con el aumento en el número de células cumpliendo la ley de Beer-Lambert y aquellos pacientes diagnosticados con leucemia, cuyo número de leucocitos superaban los valores de normalidad obtenían una potencia entre 15 a 0.01 μW .

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

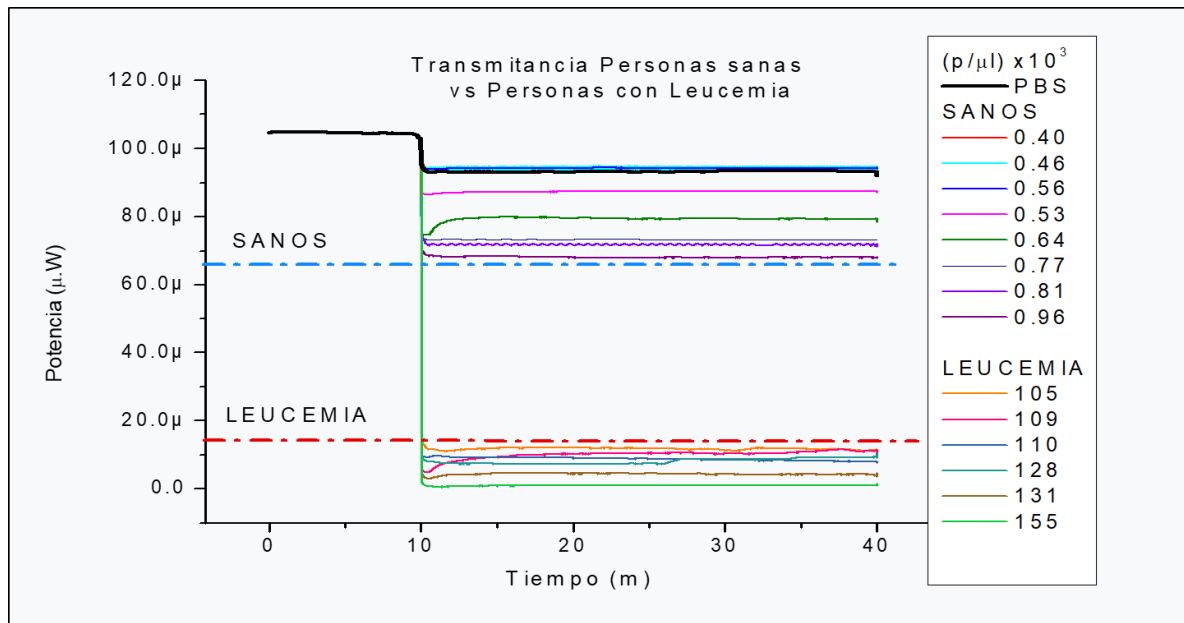


Figura 5.11 Transmitancia de partículas de leucocitos comparadas con PBS.

Con base en la transmitancia de las partículas de leucocitos que se puede ver en la Figura 5.11, se realizó un ajuste de los datos experimentales con la curva teórica que se obtuvo al utilizar ADA. Este modelo matemático se describe en el Capítulo 2. Cabe mencionar que los datos que se presentan en la Tabla 5.5 se encuentran normalizados, es decir, se descarta el valor del PBS considerando solamente la transmitancia normalizada de las partículas contadas con la cámara de Neubauer, estos valores, son los que se graficaron ajustándolos a la curva teórica y son los que podemos ver en la Figura 5.12.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTICULAS EN SUSPENSION MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

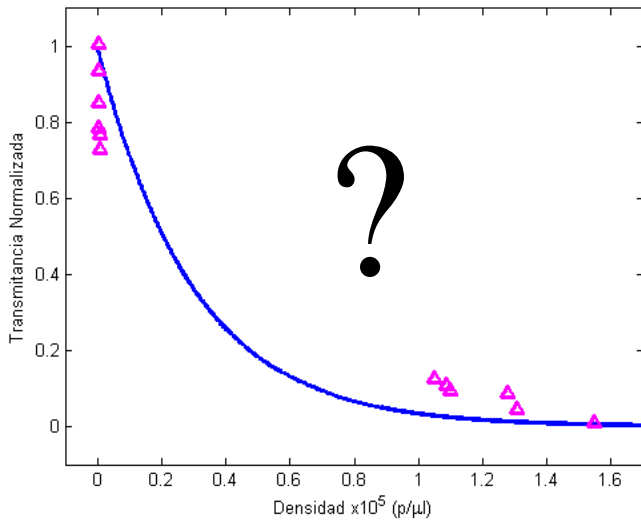


Figura 5.12 Transmitancia de partículas de Leucocitos experimentales ajustados a la curva teórica.

Potencia Transmitancia normalizada μW	Conteo de Leucocitos con cámara de Neubauer $\times 10^5$ (p/μl)
1.00548	0.004
1.01085	0.0046
0.93649	0.0053
0.85091	0.0064
0.78567	0.0077
0.76957	0.0081
0.73044	0.0096
0.12668	1.05
0.10808	1.09
0.09486	1.1
0.08734	1.28
0.04673	1.31
0.01106	1.55

Tabla 5.5. Potencia de la transmitancia normalizada comparada por el conteo de la cámara de Neubauer .

Como se puede observar en la Figura 5.12, los datos obtenidos por el conteo con la cámara de Neubauer presentan un comportamiento exponencial decreciente, es decir, a mayor densidad óptica en número de partículas la transmisión de la luz es menor, esto concuerda con lo establecido por la ley de Beer-Lambert. Sin embargo es importante mencionar que aunque presenten un comportamiento exponencial decreciente, no se ajustan los datos a la curva teórica que se menciona en el Capítulo 2, ya que estos datos presentan el error humano que se denomina índice capa o error del observador. Finalmente a partir de estos resultados se pudo hacer una comparación entre el conteo de células que se realiza con la cámara de Neubauer y el sistema óptico. Figura 5.13

Tomando los valores de la Tabla 5.5, correspondientes a la transmitancia normalizada, se determinó la densidad óptica en número de partículas con ayuda del modelo matemático descrito en el Capítulo 2, sección 2.5, de donde se obtiene la ecuación 15, la cual nos sirve para poder dar un conteo aproximado de la cantidad de partículas en cada muestra, estos valores se pueden ver en la Tabla 5.6.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

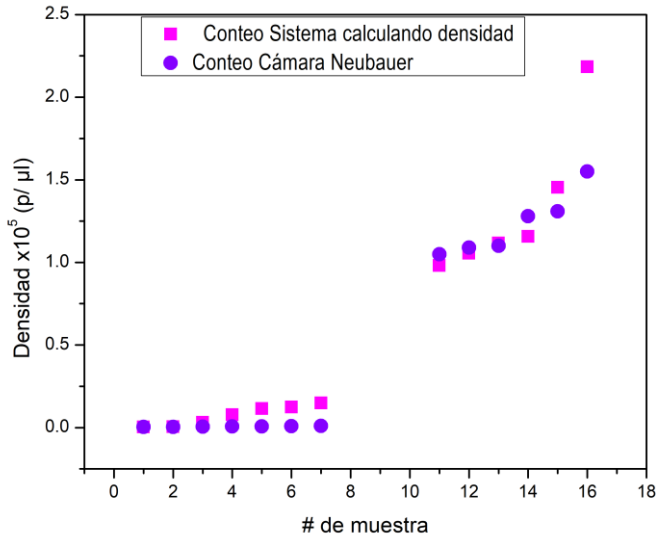


Figura 5.13 Comparación de conteo cámara de Neubauer vs densidad óptica en número de partículas sistema óptico.

Muestra	Conteo de Leucocitos con cámara de Neubauer $\times 10^5$ (p/ μ l)	Conteo de leucocitos calculando ρ modelo matemático $\times 10^5$ (p/ μ l)
1	0.004	-0.00259
2	0.0046	-0.00512
3	0.0053	0.03113
4	0.0064	0.07659
5	0.0077	0.11444
6	0.0081	0.12426
7	0.0096	0.14902
8	1.05	0.98020
9	1.09	1.05550
10	1.1	1.11740
11	1.28	1.15660
12	1.31	1.45330
13	1.55	2.18400

Tabla 5.6. Comparación de datos sobre conteos de células.

Mediante los resultados obtenidos con las micro-partículas de borosilicato, podemos constatar que el sistema detecta exclusivamente la transmisión de luz coherente.

Por lo anterior, podemos determinar la densidad óptica en número de partículas mediante un sistema óptico de fácil acceso, con resultados inmediatos y de mayor precisión que con la cámara de Neubauer.

Cabe mencionar que el conteo con de la cámara de Neubauer involucra muchos errores debido a la toma de muestras con la micropipeta ya que hay perdidas de leucocitos, así como errores derivados de la preparación del PBS, el azul de tripano y el operador. Por esta razón el sistema óptico propuesto nos puede determinar con mayor precisión un conteo celular, sin tener pérdidas al poner la muestra para ser analizada, ni error derivados del observador.

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

Con respecto al conteo de células de pacientes sanos y pacientes con leucemia las diferencias en los valores de los rangos de la transmitancia son claramente distinguibles de manera que es posible clasificar estos dos grupos.

Capítulo 6. Conclusiones

El objetivo de este trabajo se cumplió, a saber, se ha desarrollado un sistema óptico portátil, de fácil acceso y económico ya que solo se requiere de un detector y un led comercial cuya característica es su bajo costo así como su gran estabilidad en la potencia. Este sistema mostró que puede medir densidad óptica en número de partículas en suspensión con resultados inmediatos y con alta precisión en las mediciones.

Los experimentos realizados con las partículas de borosilicato permitieron obtener una curva de calibración verificando que el sistema óptico propuesto mide la transmitancia de luz coherente y no la difusa. De acuerdo con la ley de Beer -Lambert y la teoría denominada Aproximación por Difracción Anómala (ADA), se pudo realizar un modelo teórico el cual nos permitió calcular la curva teórica correspondiente a la Transmitancia de luz coherente de partículas en suspensión. Este modelo presenta un comportamiento exponencial decreciente en la potencia conforme aumenta la cantidad de partículas, es decir, detecta exclusivamente la luz coherente la cual disminuye al ir aumentando la densidad en número de partículas.

Al realizar mediciones con células de leucocitos de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con diagnóstico de leucemia, el sistema pudo distinguir claramente los dos grupos según el conteo de las células. El sistema óptico propuesto pudo determinar con mayor precisión el conteo celular que con la cámara de Neubauer ya que no hay diluciones al poner la muestra para ser analizada, ni error derivados del observador.

Los pacientes clasificados como “sanos” según su biometría cuentan con un número de células blancas entre 4 a $11 \times 10^3 \text{ p/ml}$, este número se ve alterado cuando se realiza la separación de las células por el método de gradiente por

DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

densidad (y lisis de eritrocitos) para ser contadas con la cámara de Neubauer. Las muestras de sangre de sujetos sanos contadas por las cámara, tuvieron un orden de magnitud 10 veces menor que los valores de la biometría, es decir el conteo se encuentra entre $3 \text{ a } 15 \times 10^5 \text{ p}/\mu\text{l}$. Esto se debe a los errores involucrados durante el muestreo, dilución y pipeteo así como al error del conteo por el observador.

Por lo tanto podemos decir que los resultados fueron satisfactorios. Este sistema puede ser utilizado como un contador de células para pruebas de diagnóstico médico (point of care) o de monitoreo celular, es accesible y no requiere de gastos ni tiempos excesivos en los resultados.

Como trabajo a futuro se busca estandarizar el procedimiento con el fin de tener una relación entre la separación de las células, el conteo con la cámara de Neubauer y el conteo según la biometría hemática y correlacionar con los valores de la potencia transmitida.

Bibliografía

1. E. Hecht, "Optics" 3th Edition Addison Wesley, EU (2002) p. 43-35, 66, 73-75, 90-95 y 160-165
2. P.Y. Liu. et al Lab on a Chip. 2016, 16, 634.
3. O. Vázquez-Estrada, A. García. *Optical reflectivity of a disordered monolayer of highly scattering particles: coherent scattering model versus experiment*, J. Opt. Soc. Am A Vol 31, No. 4 (2014)
4. I. Palomo, A. Ferreira, C. Sepúlveda, M. Roseblatt, U. Vergara, "Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica", Ed Universidad de Talca, Chile (2009) p. 53-55 y 57-61
5. A. García-Valenzuela. Et al. J. Opt. Sc. Am A 29, (2012)
6. L. Vidal Salgado. *Scientia et Technica* Año XIX, Vol. 19 No 1 (2014)
7. Instituto de Biología y Genética Molecular-Citometría de flujo (2004)
8. C. F. Bohren, D. R. Huffman "Absorption and Scattering of Light by Small Particles" A Wiley – Interscience Publication, Canadá (1998)
9. L. F. Jiménez, H. Merchant "Biología celular y molecular" 1^a Edición, Pearson Educación (2003)
10. Jagielski, Borys, Elements of the wave-particle duality of light, University of Oslo, 2009
11. Sergio Fonrouge (2013), "Espectro Electromagnético" recuperado de: <https://sites.google.com/site/ondaselecmag>
12. Gabàs Masip, J. (2015). "Maxwell: la teoría electromagnética de la luz". *Arbor*, 191 (775)
13. P. A. Tipler, R. A. Llewellyn "Modern Physics" 5^a Edición, Freeman and Company (2008)
14. H. A. Flaschka, A. J. Bernard, P.E. Sturrock "Química Analítica Cuantitativa" 3^a Edición, Vol 1, Compañía Editorial Continental, México (1976)

**DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE
PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE**

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

15. H. C. v. d. Hulst, *Light scattering by small particles*, New York: Wiley, 1957.
16. F. Reif. *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. McGraw-Hill, 1965
17. C. Reichhardt, C.J. Olson Reichhardt *Statics and Dynamics of Colloidal Particles on Optical Trap Arrays*. Vol 74000J (2009)
18. K. Zhong, P. J. Demeyer, X. Zhou, O. Kruglova, N. Verellen, *Introducing high-quality planar defects into colloidal crystals via self-assembly at the air/water interface* Vol. 93710L (2015)
19. M. Mennig, M. Schmitt, U. Becker, G. Jung and H. Schmidt, *Gold colloids in sol-gel derived SiO₂ coatings on glass and their linear and nonlinear optical properties*. Vol. 2288, Sol-Gel Optics III (1994)
20. R. Chang, W. College, "Chemistry", Mc Graw, 6th Edition, New York (2002), p. 35
21. Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Universidad de Madrid (2001). recuperado de: http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm
22. Valeri P Maltsev, Alfons G. Hoekstra and Maxim A. Yurkin "Optics of White Blood Cells: Optical Models, Simulations and Experiments", 2011
23. J. M. Moraleda, "Pregrado de Hematología" 4^a Edición, Ed. Luzán5, Madrid España (2017), p. 36, 206
24. B. Ulloa, M. Tapia, C. Toscano y C. Pozo, *Fundamentos de Hematología*, Ed. Edimec, Quito, Ecuador (2005)
25. Duran/ Propiedades Físicas y Químicas / Vidrio de Borosilicato 3.3, recuperado: http://www.vidrasa.com/esp/productos/duran/duran_pf.html

**DISEÑO DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE
PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN MAYORES QUE LA LONGITUD DE ONDA INCIDENTE**

NADIA ESTEFANÍA ÁLVAREZ CHÁVEZ

26. C. Huygens "*Traité de la lumiér*", Ed. Libraires du bureau des longitudes, de L'école, Paris. (1690).
27. D. Blanco Laserna, "*LIGHT AND WAVES. HUYGENS: LIGHT AS A PROPAGATING WAVE*" ISSN-L: 0210-1963, Vol. 191-775, (2015): <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2015.775n5002>
28. R. H. Burdon, P.H van Knippenberg, P. T. Sharpe, *Methods of cell counting and assaying cell viability, Chap. 2*, Vol 18 (1988)
29. Facultad de Medicina, UNAM, *Departamento de Biología Celular y Tisular*, UT 2, (2012)