



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA**  
**ELÉCTRICA – INSTRUMENTACIÓN**

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN DISPOSITIVO ÓPTICO PORTÁTIL  
BASADO EN LEDS, PARA LA CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE  
MICRO-PARTÍCULAS BIOLÓGICAS**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN INGENIERÍA**

**PRESENTA:**  
**M.I. MIGUEL ANGEL CASAS RAMOS**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**Dr. GABRIEL EDUARDO SANDOVAL ROMERO, ICAT-UNAM**  
**COMITÉ TUTOR**  
**Dr. AUGUSTO GARCÍA VALENZUELA, ICAT-UNAM**  
**Dr. HUGO MARTÍN SOBRAL, ICAT-UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO 2023**



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.



**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Bruce Davidson Neil Charles  
Secretario: Dr. García Valenzuela Augusto  
1 er. Vocal: Dr. Sandoval Romero Gabriel Eduardo  
2 do. Vocal: Dr. Sobral Hugo Martín  
3 er. Vocal: Dra. Pérez Pacheco Argelia

Lugar donde se realizó la tesis:  
INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍAS, UNIVERSIDAD  
NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.

**TUTOR DE TESIS:**

NOMBRE

-----  
**FIRMA**



# Agradecimientos

Agradezco a mi tutor, tanto de maestría como de doctorado, el Dr. Gabriel Eduardo Sandoval Romero por permitirme realizarme como doctor, compartirme sus conocimientos y sobre todo la amistad que siempre me ha brindado. También, agradezco a mi comité y jurado por sus revisiones, comentarios y sugerencias dadas para mejorar esta obra de manera sustancial. Gracias a la Dra. Argelia Pérez y a Nadia Álvarez por su ayuda con las muestras biológicas, así como su orientación sobre varios temas.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de continuar mi preparación académica y profesional y a todas aquellas personas que han sido parte del Grupo de Sensores Ópticos y del ICAT durante mi estancia. También agradezco a mis compañeros de laboratorio por su compañía, apoyo y amistad brindada.

Deseo extender mi agradecimiento al CONAHCYT (antes CONACYT) por haberme otorgado una beca económica, a través de la Universidad Nacional Autónoma de México, para la realización de los estudios de doctorado. Al igual que, a la DGAPA-UNAM por el apoyo económico por medio del proyecto PAPIIT IT101019 para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Así mismo, quiero dedicar este trabajo a familia que siempre me apoyó durante toda mi trayectoria académica. A mis padres, Miguel y Silvia, que me han brindado la educación y valores para alcanzar mis metas y que son pilares de mi ser, muchas gracias por todo su apoyo, motivación y enseñanzas dadas. A mi hermana a quien admiro como una gran investigadora. A mi querida esposa Sheninska que siempre estuvo presente durante todo el proceso de doctorado, en las buenas y en las malas, le agradezco por haberme escuchado, brindarme su apoyo y darme ánimos en todo momento.



# Contenido

Contenido .....	7
Abreviaturas y siglas .....	9
Lista de abreviaturas.....	13
Introducción.....	15
1. Fundamentos y antecedentes .....	17
1.1 Técnicas ópticas basadas en el esparcimiento .....	18
1.1.1 Óptica de Fourier y el filtraje .....	20
1.1.2 Técnicas por filtrado de la luz esparcida en la dirección de incidencia .....	21
1.2 Esparcimiento de luz por partículas pequeñas .....	25
1.2.1 Esparcimiento de la luz .....	25
1.2.2 Teoría de Mie .....	27
1.2.3 Potencia, irradiancia y flujo .....	30
2. Metodología.....	35
2.1 Monocapa y suspensión.....	39
2.1.1 Número de partículas.....	41
3. Desarrollo experimental .....	43
3.1 Arreglo experimental.....	43
3.1.1 Fuente de luz.....	47
3.2 Electrónica.....	48
3.2.1 Circuito de medición.....	49
3.3 Resultados experimentales .....	50

3.3.1	Monocapa de partículas de levadura .....	56
3.3.2	Solución diluida: leucocitos .....	63
4.	Aplicaciones.....	73
4.1	Monitoreo del proceso de hemólisis.....	73
4.2	Identificación de especímenes .....	78
	Conclusiones.....	87
A.	Electrónica .....	91
A.1	Amplificador de transimpedancia (TIA) .....	91
A.2	Selección del amplificador operacional (OPAMP) .....	93
A.2.1	Selección de la resistencia de realimentación ( $RF$ ).....	94
A.2.2	Selección del capacitor de realimentación ( $CF$ ) .....	95
A.2.3	TIA de ganancia programable.....	96
A.3	Calibración del sistema .....	97
B.	Listado de código en MATLAB .....	99
B.1	Evaluación numérica de la teoría de Mie: código en MATLAB .....	99
B.1.1	Función de Mie.....	99
B.1.2	Función para los coeficientes de esparcimiento $a$ , $b$ , $c$ y $d$ .....	100
B.1.3	Funciones las funciones angulares $\tau n$ y $\pi n$ .....	101
B.1.4	Funciones de amplitud $S1$ y $S2$ .....	101
B.1.5	Función para calcular la intensidad en función $\theta$ .....	102
B.2	Calcular la densidad de partículas por unidad de área iluminada .....	102
B.2.1	Función $f_{openingESv1}()$ .....	104
C.	Preparación de las muestras .....	107
C.1	Monocapa.....	107
C.1.1	Levadura.....	108
C.1.2	Eritrocitos, RBC.....	110
C.2	Suspensiones.....	111
	Referencias .....	113

# Abreviaturas y siglas

Símbolo	Dimensión	Descripción
$A$	$m^2$	Área
$A_f$	-	Fracción de área cubierta por las partículas en una superficie
$A_p$	$m^2$	Área de la partícula
$A_T$	$m^2$	Área total
$b$	m	Base del área de la superficie plana
$D$	m	Diámetro
$\bar{D}_p$	m	Diámetro promedio de la partícula, diámetro más probable, valor medio
$E_{\parallel S}$		Componente paralela del campo esparcido
$E_{\perp S}$		Componente transversal del campo esparcido
$f$	m	Distancia focal
$f_{LN}(D)$	-	Función de distribución de tamaños
FWHM	nm	Anchura a media altura (por sus siglas en inglés <i>Full Width at Half Maximum</i> )
GBWP	Hz	Producto ganancia-ancho de banda (por sus siglas en inglés <i>Gain-bandwidth product</i> )
$h$	m	Altura del área de la superficie plana
$h_n^1(z)$	-	Función esférica de Henkel (función esférica de Bessel de tercer orden)
$i_{\parallel}$	-	Función de intensidad no dimensionada para la luz esparcida en polarización paralela

$i_{\perp}$	-	Función de intensidad no dimensionada para la luz esparcida en polarización perpendicular
$i_{np}$	-	Función de intensidad no dimensionada para la luz no polarizada
$I$	W/m <sup>2</sup>	Irradiancia
$I_0$	W/m <sup>2</sup>	Irradiancia incidente
$j_n(z)$	-	Función esférica de Bessel
$J_{n+1/2}(z)$	-	Función de Bessel de primer tipo
$k$	m <sup>-1</sup>	Número de onda
$M$		Tasa de magnificación
$m$	g	Masa
$m_f$	-	Fracción de masa
$m_m$	g	Masa de la muestra
$m_T$	g	Masa total
$n_{rel}$	-	Índice de refracción relativo
$n_{aire}$	-	Índice de refracción del aire
$n_m$	-	Índice de refracción del medio
$n_p$	-	Índice de refracción de la partícula
$N$	partículas, células	Número de partículas
$N(D)$	part./m <sup>3</sup>	Cantidad de partículas, de todos los tamaños, por unidad de volumen
$N_A = N/A$	part./m <sup>2</sup>	Número de partículas por unidad de área proyectada
$N_T = N/V$	part./m <sup>3</sup>	Número de partículas por unidad de volumen
$P$	W	Potencia
$P_{abs}$	W	Potencia absorbida
$P_{ext}$	W	Potencia extinguida
$P_{sca}$	W	Potencia esparcida
$P_0$	W	Potencia incidente
$P_n^1(\cos \theta)$	-	Polinomios de Legendre
$Q_{abs}$	-	Eficiencia de absorción
$Q_{ext}$	-	Eficiencia de extinción
$Q_{sca}$	-	Eficiencia de esparcimiento
$r$	m	Radio

$R$	m	Distancia radial
$R_F$	$\Omega$	Resistencia de realimentación
$s$	-	Desviación estándar
$S_1(\theta), S_2(\theta)$	-	Función de amplitud
$t$	s	Tiempo
$T$	-	Transmitancia
$V$	V	Voltaje
$\mathcal{V}$	$m^3$	Volumen
$\mathcal{V}_f$	-	Fracción volumétrica
$\mathcal{V}_{líquido}$	ml, $cm^3$	Volumen del líquido
$\mathcal{V}_p$	$m^3$	Volumen de una partícula
$\mathcal{V}_T$	$m^3$	Volumen total
$w$	m	Espesor de la película o medio esparcidor
$X$	-	Parámetro de tamaño
$y_n(z)$	-	Función esférica de Bessel
$Y_{n+1/2}(z)$	-	Función de Bessel de segundo tipo
$(x, y, z)$	-	Sistema de coordenadas cartesianas espaciales

**Letras griegas**

**Dimensión**

**Descripción**

---

$\alpha_{abs}$	$m^{-1}$	Coefficiente de absorción
$\alpha_{ext}$	$m^{-1}$	Coefficiente de extinción
$\alpha_{sca}$	$m^{-1}$	Coefficiente de esparcimiento
$\theta$	$^\circ$	Ángulo de esparcimiento
$\theta'$	$^\circ$	Ángulo de esparcimiento de salida de una suspensión
$\theta_{crit}$	$^\circ$	Ángulo crítico
$\theta_{max}$	$^\circ$	Ángulo de máximo esparcido detectado por la cámara
$\theta_{1/2}$	$^\circ$	Semiángulo máximo, ángulo de aceptación
$\lambda$	nm	Longitud de onda

$\xi_n(z)$	-	Función de Riccati-Bessel
$\pi_n(\cos \theta)$	-	Función angular
$\rho$	g/ml, g/cm <sup>3</sup>	Densidad
$\sigma_{abs}$	m <sup>2</sup>	Sección transversal de absorción
$\sigma_{ext}$	m <sup>2</sup>	Sección transversal de extinción
$\sigma_{sca}$	m <sup>2</sup>	Sección transversal de esparcimiento
$\sigma_0$	m <sup>2</sup>	Sección transversal del haz de luz colimado
$\phi$	°	Ángulo azimutal
$\psi_n(z)$	-	Función de Riccati-Bessel

# Lista de abreviaturas

---

ADC	Convertidor de analógico-digital (por sus siglas en inglés <i>Analog-to-digital converter</i> )
BLB	Ley de Beer-Lamber-Bouguer
BS	Divisor de haz no polarizado
CMOS	Semiconductor complementario de óxido metálico (por sus siglas en inglés <i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i> )
FSC	Luz esparcida hacia adelante (por sus siglas en inglés <i>Forward Scatter</i> )
IR	Radiación infrarroja (por sus siglas en inglés <i>Infrared Radiation</i> )
L	Lente acromática
LED	Diodo Emisor de Luz (por sus siglas en inglés <i>Light Emitting Diode</i> )
M	Espejo
OPAMP	Amplificador operacional (por sus siglas en inglés <i>Operational amplifier</i> )
PBS	Solución o <i>buffer</i> de fosfato salino (por sus siglas en inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PD	Fotodetector
PMMA	Polimetilmetacrilato
PSD	Distribución del tamaño de las partículas (por sus siglas en inglés <i>Particle Size Distribution</i> )
RBC	Eritrocitos, glóbulos o células rojas (por sus siglas en inglés <i>Red Blood Cells</i> )
RGB	Rojo, Verde y Azul (por sus siglas en inglés <i>Red, Green and Blue</i> )
SF	Filtro espacial o pantalla circular opaca.

SP3T	Un polo tres tiros (por sus siglas en inglés <i>Single Pole Tree-way Throw</i> )
SSC	Luz esparcida lateralmente (por sus siglas en inglés <i>Side Scatter</i> )
TIA	Amplificador de transimpedancia (por sus siglas en inglés <i>Transimpedance Amplifier</i> )
UV	Radiación ultravioleta (por sus siglas en inglés <i>Ultraviolet Radiation</i> )
WBC	Glóbulos blancos (por sus siglas en inglés <i>White Blood Cells</i> )

# Introducción

Este trabajo describe una técnica de medición óptica, que en condiciones clínicas o de laboratorio, permite obtener, de manera rápida, propiedades físico-ópticas de muestras particuladas, a bajas concentraciones/diluidas, en forma de una película delgada o en una suspensión. La rapidez en las mediciones consiste en utilizar una fuente de luz cuasi monocromática colimada y cuasi coherente, en este caso, un LED (por sus siglas en inglés *Light Emitting Diode*, o Diodo Emisor de Luz) RGB (*Red, Green and Blue*, o Rojo, Verde y Azul) comercial. Las propiedades que se estiman con esta técnica son: tamaño, fracción volumétrica, distribución de tamaños, coeficiente de extinción, esparcimiento y absorción.

Este trabajo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Sensores en Fibras Ópticas, del grupo de Sensores, del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnologías (ICAT), localizado en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), como un nuevo aspecto de la actividad investigadora del grupo de Sensores sobre el desarrollo e implementación de dispositivos para la medición y monitoreo de variables físicas que sirvan para el análisis de procesos en la materia blanda empleando óptica y electrónica.

De estos aspectos del grupo de Sensores, se desprende, la meta del desarrollo de detectores opto-eléctricos para el estudio de algunas de las propiedades ópticas en los materiales biológicos tales como: la transmitancia, reflectancia, la extinción, esparcimiento y absorción de la luz, el índice refracción efectivo y complejo. Así como el estudio *in vivo* de dichos materiales, de una manera cuantitativa y reproducible; para su aplicación en el monitoreo de procesos físicos o químicos.

Los objetivos y metas contemplados, durante la elaboración, de la investigación de este trabajo consisten en caracterizar las propiedades físico-ópticas de una partícula sin tener ningún o muy poco conocimiento previo de la misma. Comparar y analizar la transmitancia, el esparcimiento y la absorción de la luz en la dirección de propagación del haz mediante un arreglo experimental, para una interfase aire-vidrio, en monocapa de partículas depositadas sobre un sustrato plano transparente o una suspensión, para extender este modelo y obtener los coeficientes de extinción, esparcimiento y absorción de una monocapa aislada o suspensión

constituida por partículas. Para lograr esto, se emplean tres longitudes de onda diferentes para medir la transmitancia, esparcimiento y absorción de la luz para diversos tipos de muestras.

Como metas primordiales, considerando un enfoque instrumental, con el fin de conducirnos a los objetivos planteados se contemplaron inferir el coeficiente de absorción debido a las partículas iluminadas por un haz de luz colimado a partir de la medición del coeficiente de extinción y esparcimiento. Explorar la posibilidad de identificar determinado tipo de partículas (entre un número finito de posibilidades) en una mezcla de diferentes partículas. Estimar el tamaño y la densidad numérica de partículas presentes en el sustrato, en un intervalo de 2 micras hasta 15 micras, por unidad de área (para monocapas) y por unidad de volumen (para suspensiones).

La hipótesis inicial es que cuando un haz de luz incide sobre cualquier microorganismo este esparce la luz debido a la interacción luz-materia y cada uno de estos microorganismos forma un patrón de esparcimiento único. Esta es una consecuencia natural causada por las características estructurales y bioquímicas únicas que distinguen un tipo de microorganismo de otro. Por lo que, al medir los aspectos característicos del esparcimiento de la luz de un microorganismo en particular, su estructura y composición bioquímica podrían (en principio) ser determinados de manera única, permitiendo la identificación de cada microorganismo. Analizar cada una de las características correspondientes a las partículas biológicas lleva a diversas mediciones con diferentes métodos, y estos pueden ser explicados a través de una herramienta física-matemática conocida como la teoría de Mie.

En general, las partículas biológicas son cuasi transparentes, de tamaño microscópico y, cuando son iluminadas, la mayoría de la luz se esparce en la dirección de incidencia en ángulos menores a los 30°, además la absorción debido a las mismas partículas es relativamente baja [1-5]. Con estas características, se puede inferir la cantidad, el tamaño absoluto, distribución de tamaños y tipos de partículas, también se asume que las partículas son esféricas y que la luz esparcida tiene la misma longitud de onda que la de la luz incidente y que se encuentra en el rango del espectro visible de la luz [1,6-8]. Al registrar la extinción de la luz debida a la intensidad esparcida por unidad de volumen en una dirección dada se puede inferir la cantidad de partículas presentes en una muestra. Del patrón de esparcimiento, dado por la muestra, se extraen el tamaño absoluto y la distribución de tamaños. Además, a partir del patrón de esparcimiento también se podrían identificar y diferenciar los tipos de partículas. Es evidente que, al tomar ventaja de las propiedades de la extinción angular de la luz, es posible extraer mucha información sobre las partículas y así poder caracterizar las muestras.

# 1. Fundamentos y antecedentes

Considérese la interacción de la luz de longitud de onda arbitraria con una partícula, la cual está inmersa en un medio homogéneo, a menos que se indique lo contrario. Por medio homogéneo se entiende que la heterogeneidad molecular de este medio es lo suficientemente pequeña en comparación con la longitud de onda de la luz incidente y que se puede ignorar el esparcimiento por fluctuaciones que son, en general, mucho menores al esparcimiento debido a las partículas. Aunque la partícula pueda tener una forma complicada y contener diversos componentes homogéneos, se puede asumir que la materia de la que está compuesta puede ser descrita, desde cada punto, en términos macroscópicos. Esto es, que las propiedades ópticas de una partícula son por tanto especificadas por completo por las constantes ópticas dependientes de la longitud de onda. Se restringe el tratamiento al esparcimiento elástico: la frecuencia de la luz esparcida es la misma que el de la luz incidente. Este esparcimiento elástico también es conocido como esparcimiento coherente, pero el término elástico es “físicamente” descriptivo.

Como es bien sabido, cada microorganismo irradiado por una fuente luz, debido a sus características estructurales y bioquímicas únicas, esparce la luz en todas direcciones. Esto forma un patrón único de esparcimiento y en consecuencia se puede, en principio, distinguir un tipo de microorganismo de otro. La teoría del esparcimiento de la luz describe la relación entre el comportamiento del campo esparcido y el tamaño de los lóbulos en el patrón de esparcimiento. El campo esparcido tiene un comportamiento oscilatorio particular que depende del tamaño del esparcimiento, la longitud de onda de la fuente de luz, los índices de refracción de las partículas y del medio circundante, y del ángulo de esparcimiento (desde el punto de vista del observador). El principal logro de esta investigación es la identificación y la determinación del tamaño de partículas biológicas, la cual requiere solucionar el problema del esparcimiento que se basa en el análisis del campo esparcido. Los tamaños (diámetros) de las partículas biológicas de interés están en el rango de 1  $\mu\text{m}$  hasta 19  $\mu\text{m}$ . En este rango de tamaños están las células denominadas normales o sanas (alrededor de 5-6  $\mu\text{m}$ ), es decir, que no presentan una patología, y células displásicas (10-15  $\mu\text{m}$ ) [9-13]. Ejemplo de esto son los

linfocitos, estos tienen su diámetro en el rango de 8-10  $\mu\text{m}$  y una distribución de tamaños de 5.98-7.8  $\mu\text{m}$  [14-17].

En general, existen dos formas de abordar el problema relacionado al análisis de las interacciones de la luz con una partícula pequeña.

- La manera directa, donde se considera una partícula (de forma, tamaño y composición específicos) iluminada por un rayo (de irradiancia, polarización y longitud de onda específicas) determinan el campo esparcido por todas direcciones.
- La manera indirecta o inversa, requiere un adecuado análisis del campo esparcido y un tratamiento teórico, entonces describir la partícula o partículas responsables del esparcimiento.

Por tanto, se afronta la tarea de tratar de describir una partícula o una colección de partículas con algo menos que un conjunto de datos teóricamente ideales en la mano y decidir la forma en que se aborda el problema de analizar el objeto de estudio. Pero esto no es necesariamente causa de desesperación. Normalmente, se cuenta con suficiente información complementaria acerca de la partícula de interés para poder describirla. Además, se delimita el tipo de partículas a estudiar con muestras biológicas microscópicas, casi esféricas y transparentes utilizando una fuente de luz en el espectro visible. Con esto en mente, mediante los fenómenos de esparcimiento y absorción, sin involucrar a ninguna partícula en específico, se requiere investigar si es posible caracterizar y cuantificar micropartículas con una fuente de luz casi coherente, en el espectro visible (casi monocromática). Para extraer características físicas de la muestra que se analiza, como el tamaño, densidad numérica de partículas e identificación del tipo de partícula. Esto, a través de la medición de los fenómenos de absorción y esparcimiento de la luz en la muestra. Los esquemas de identificación basados en los métodos del esparcimiento de la luz poseen varias posibilidades muy atractivas. La más importante, por supuesto, es que la mayoría de los microorganismos podrían identificarse en un estado vivo. Otra posibilidad es que los procedimientos basados en el esparcimiento de luz pueden eventualmente usarse para examinar microorganismos de manera individual. Finalmente, la identificación rápida (en un milisegundo o menos) bien podría lograrse debido a la velocidad de los circuitos electrónicos modernos, las altas intensidades de las fuentes de luz disponibles actualmente (láseres, LEDs y lámparas) y la precisión de las técnicas de medición óptica.

## 1.1 Técnicas ópticas basadas en el esparcimiento

En campos como la biología, medicina, el monitoreo medioambiental y procesos de control en industria de la fabricación de semiconductores es importante contar con un método para la rápida detección, identificación y cuantificación de partículas, un problema que es comúnmente difícil. Además, la gran motivación para llevar a cabo la presente investigación se debe al tema

de la salud pública y la gran preocupación del impacto negativo en la salud humana. Técnicas convencionales como cultivos y ensayos biomédicos, consumen mucho tiempo para los microbiólogos y son relativamente costosos cuando se les compara con procesos de pruebas automatizados en la mayoría de las ciencias físicas. Las técnicas del esparcimiento de la luz relacionadas a la biología, incluyendo la microbiología, ofrecen diversas aplicaciones (Sección 1.1.2). Aquellas que vienen inmediatamente a la mente se refieren a mediciones de turbidez [3,15,18], determinación de tamaños y formas [15,19-25], cambios estructurales en las células [1,15,21,23,26,27], los efectos de agregar ciertos compuestos orgánicos a suspensiones de células [28], mecanismos de hinchamiento y lisis de células aisladas [1,6,29], entre otros. Todas estas aplicaciones esencialmente se han basado en la deducción intuitiva a partir del esparcimiento de la luz y las diferencias estructurales pueden causar diferentes esparcimientos.

Ejemplo de una técnica que emplea el esparcimiento de la luz está la citometría de flujo, la cual ha tenido un rápido desarrollo dentro de las tres últimas décadas. Las partículas pasan por un orificio muy pequeño, donde se enfoca un haz de luz y este es parcialmente bloqueado al pasar las partículas. La reducción en la intensidad de la luz y el esparcimiento de la luz a un ángulo fijo, normalmente a  $90^\circ$ , es proporcional a la sección transversal de cada partícula y esta puede ser convertida a una función de distribución de tamaños. Generalmente es aplicada para la caracterización individual de las células debido al esparcimiento de la luz y a la fluorescencia. Esta técnica tiene una tasa de muestreo de partículas muy alta (hasta 5000 partículas por segundo) y tiene numerosas aplicaciones [21,30,31]. Esta técnica es ampliamente aplicada para la identificación de células blancas (leucocitos) al combinar el esparcimiento de la luz y la inmunofenotipificación [30]. Este último es un proceso que demanda mucho tiempo, porque utiliza la fluorescencia para etiquetar anticuerpos y existe la posibilidad de un daño celular durante esta. Por tanto, durante los últimos años ha crecido el interés en obtener los parámetros morfológicos de células biológicas, basados principalmente en la observación de los datos del esparcimiento. En la citometría de flujo, la luz esparcida es medida en dos direcciones: hacia adelante y hacia los lados. Así, es posible extraer más información sobre las características de las células al medir la intensidad o la polarización correspondientes a las distribuciones angulares de la luz esparcida, ya que es sensible a la morfología celular.

También está la técnica de espectroscopía de luz retro esparcida. Aquí, un haz intenso de luz, normalmente un láser o luz blanca, ilumina una suspensión de partículas y se mide la distribución angular de luz esparcida de regreso a ángulos grandes. Esta distribución de luz esparcida es procesada para obtener la distribución de tamaños de partículas [9,10,32-36]. Este tipo de técnicas es no destructivo y no invasivo, se aplica a concentraciones altas de partículas y no es necesario preparar las muestras. Sin embargo, posee poca resolución de la distribución de tamaños de partículas, las propiedades ópticas y formas de las partículas deben de ser conocidas de antemano para obtener resultados precisos y se puede presentar esparcimiento débil si la muestra es muy absorbente.

### 1.1.1 Óptica de Fourier y el filtraje

Considere el esquema de la Fig. 1.1a [37-39], un sistema óptico que utiliza dos lentes convergentes ( $L_1$  y  $L_2$ ), de igual distancia focal  $f$  ( $f_1 \equiv f_2$ ) y con una longitud total igual a  $4f$ . Cuando un frente de onda plano monocromático y coherente<sup>1</sup> incide sobre un objeto bidimensional ubicado en el plano  $\mathcal{O}$  (también llamado plano del objeto o plano de entrada), la lente  $L_1$  realiza la transformada de Fourier del objeto en el plano  $\mathcal{F}$  (también llamado plano de Fourier). La lente  $L_2$  realiza la transformada de Fourier de la distribución de campo (generada por el objeto) en  $\mathcal{F}$  sobre el plano de la imagen,  $\mathcal{O}'$ . Finalmente, la imagen del objeto (en el plano imagen,  $\mathcal{O}'$ ) formada por la lente  $L_2$ , estará invertida y con magnificación  $M = 1$ .

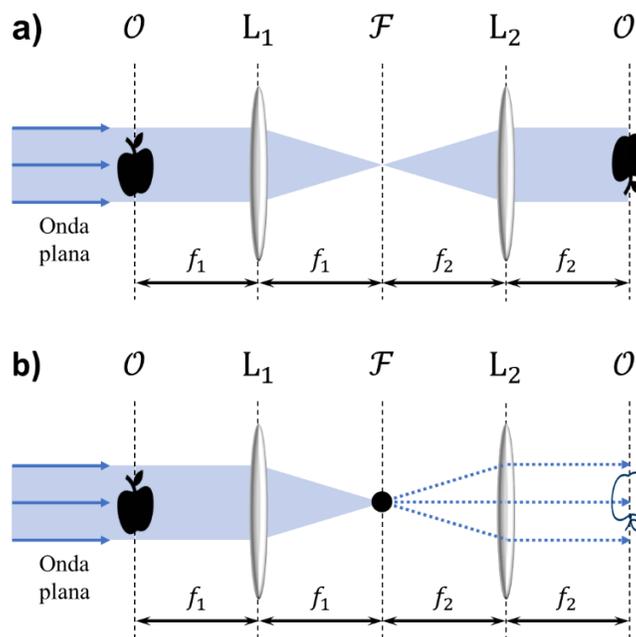


Fig. 1.1. Sistema óptico para el filtraje espacial de objetos con luz coherente:  $\mathcal{O}$ , plano del objeto;  $\mathcal{F}$ , plano de Fourier;  $\mathcal{O}'$ , plano imagen. a) El objeto bidimensional iluminado, transparente con la figura de una manzana, en el plano  $\mathcal{O}$  es transmitido a través del sistema óptico (enfocado en  $\mathcal{F}$  por  $L_1$  y colimado por  $L_2$ ) y la imagen final proyectada en el plano  $\mathcal{O}'$  tiene el mismo tamaño y está invertida. En el plano de Fourier, el orden central (bajas frecuencias espaciales) se origina por la luz no difractada, debida a la fuente de luz coherente, y las frecuencias más altas provendrán de la difracción debida al objeto. b) Se muestra el efecto de quitar el orden central del patrón de frecuencias espaciales, mediante una pantalla opaca introducida en el plano  $\mathcal{F}$  de la Fig. 1.1a (exactamente en el foco de  $L_1$ ). Aquí, la imagen final en  $\mathcal{O}'$  corresponde a la fase transmitida del objeto.

<sup>1</sup> Esto corresponde, experimentalmente, a un haz láser colimado

Construir un sistema óptico (Fig. 1.1a) donde la imagen resultante, en el plano  $\mathcal{O}'$ , de un objeto (en el plano de entrada  $\mathcal{O}$ ) sea del mismo tamaño e invertida no parece aportar mucha información. Sin embargo, lo atractivo de este sistema óptico ocurre en el plano intermedio,  $\mathcal{F}$ , donde el contenido del objeto está en términos de la frecuencia espacial y por tanto puede ser descrita mediante la transformada de Fourier. Esto quiere decir que, se puede modificar el contenido del objeto en términos de frecuencia con la ayuda de filtros en el plano de Fourier (Fig. 1.1b). Además, ya que las lentes son lo suficientemente grandes como para transmitir todas las frecuencias espaciales correspondientes al objeto en  $\mathcal{O}$ , significa que la abertura finita de las lentes no afectará la imagen resultante [40]. En el plano de Fourier se pueden insertar máscaras o filtros para evitar que ciertas frecuencias espaciales lleguen al plano imagen. Este proceso se conoce como filtrado espacial.

La mayoría de las células no absorben o esparcen la luz de manera significativa; es decir, estas son “esencialmente” transparente o también se les puede considerar como objetos con fase. El método propuesto por Zernike sobre el filtraje de fase (Fig. 1.1b) representó un gran avance en la imagenología de contraste, porque permite revelar detalles de las estructuras internas de las muestras transparentes sin la necesidad de teñir ni utilizar marcadores [41]. La disposición óptica en la Fig. 1.1b se puede modificar para obtener imágenes del perfil de una partícula simultáneamente con su patrón de esparcimiento bidimensional.

### 1.1.2 Técnicas por filtrado de la luz esparcida en la dirección de incidencia

El particular interés y las bases de la presente investigación surgen de los trabajos publicados por Latimer y Tully (1968) [1] y, particularmente, del trabajo publicado por Valenzeno y Trank (1985) [6]. Estos autores describen la caracterización, no destructiva y no invasiva, de muestras biológicas semi esféricas, al monitorear el patrón de luz visible esparcida en la dirección de incidencia. Latimer y Tully concluyen, a partir del estudio de los patrones de esparcimiento de la luz en la dirección de incidencia a ángulos menores a  $13^\circ$ , que el esparcimiento debido a las células de levadura (elipsoide alargado) concuerdan sustancialmente con las predicciones de las ecuaciones de Mie para esferas homogéneas [1].

Mientras que, Valenzeno y Trank proponen una técnica para el monitoreo del proceso de hemólisis de una suspensión de eritrocitos o RBCs (por sus siglas en inglés *Red Blood Cells*) y determinar la cantidad de RBC por unidad de volumen, midiendo la intensidad total de la luz esparcida en la dirección de incidencia a ángulos menores a  $10^\circ$  [6]. La Fig. 1.2 muestra el esquema de medición.

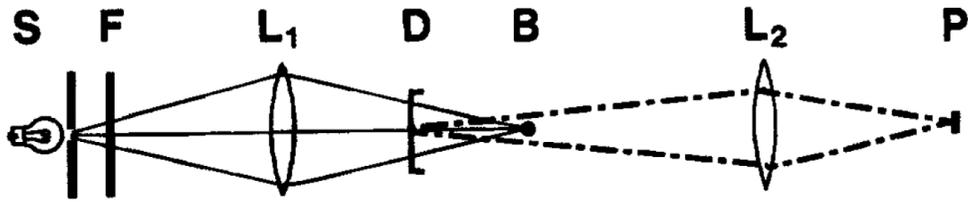


Fig. 1.2. Sistema óptico para la medición del esparsamiento de la luz. *S* es la fuente. *F* es un filtro de paso largo de 705 nm.  $L_1$  y  $L_2$  son lentes de distancia focal de 83.3 cm. *D* es el plato que contiene la suspensión celular. *B* es un tope que bloquea la luz que no ha sido esparsada. *P* es un fotodetector para medir la luz esparsada que incide sobre la misma. Crédito: Latimer y Tully (1968) [1].

La diferencia fundamental entre ambos trabajos está en la innovación del esquema de medición implementado por Valenzeno y Trank. Esto se debe a, la capacidad de discriminar, en la dirección de propagación del haz incidente, la luz esparsada debida a la suspensión de partículas de la luz transmitida. Esto se logró al utilizar un filtro espacial (una pantalla circular opaca) que tiene el propósito de bloquear toda la luz incidente no-esparsada, permitiendo reportar cómo la intensidad total del esparsamiento decae conforme al rompimiento de las células y la relación entre la intensidad de la luz esparsada con la fracción de volumen de las células, es decir, su concentración.

En las últimas dos décadas la instrumentación, con especial énfasis en aplicaciones para las áreas de la medicina y biología, basada en el esparsamiento de la luz ha tenido un rápido incremento en su desarrollo y aplicación a la caracterización, conteo y clasificación de células. Sin embargo, debido a las dificultades de separar, en la dirección de propagación del haz incidente, la luz esparsada por las células de la luz debido a la fuente de luz ha sido necesario idear formas de filtrarlas o separarlas. Una solución a este problema fue dada por Yang et al. [20], con un dispositivo que realiza el conteo y la clasificación automática de RBCs y glóbulos blancos, o WBCs (por sus siglas en inglés *White Blood Cells*), mediante el monitoreo simultaneo de la extinción y esparsamiento de la luz a ángulos pequeños.

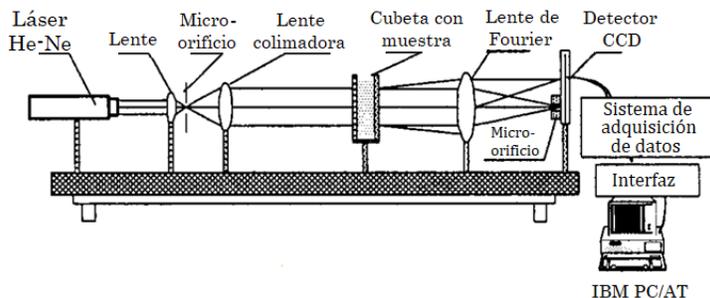


Fig. 1.3. Esquema medición óptica para el conteo y clasificación de glóbulos rojos utilizando la luz esparsada. Crédito: Yang et al. (2004) [20].

En el esquema de medición de la Fig. 1.3, un haz láser colimado ilumina una suspensión, se coloca (frente a la cubeta) una lente de Fourier exactamente a la distancia focal de la lente, después de la lente hay dos detectores. La lente enfoca la luz sobre un fotodiodo y con un sensor lineal CCD se obtiene la distribución del espaciamiento, que al combinarse con la teoría de Mie se obtiene la distribución de tamaños en relación con la distribución de la intensidad. Con este método logran obtener el tamaño promedio, la destrucción de células rojas y también diferenciar entre: leucocitos, células de tamaño medio y neutrófilos.

Dentro de las metodologías publicadas para el análisis y caracterización de partículas transparentes, se han comparado los patrones que se forman a partir del espaciamiento de la luz en la dirección de incidencia con los patrones de difracción, permitiendo analizar este problema mediante la óptica de Fourier y el filtraje espacial [37]. El uso de esta técnica fue reportado Smith et al. (2012) [19], quienes implementan un dispositivo que obtiene el tamaño promedio, distribución de tamaños y el número de células en una suspensión, a partir de la visualización del patrón del espaciamiento de luz y logrando tener una resolución de hasta 20 nm. Este dispositivo, Fig. 1.4, ilumina una suspensión con un haz láser colimado y el patrón de espaciamiento es observado con una cámara de teléfono celular, tomando ventaja de la óptica de Fourier y el filtraje espacial [37].

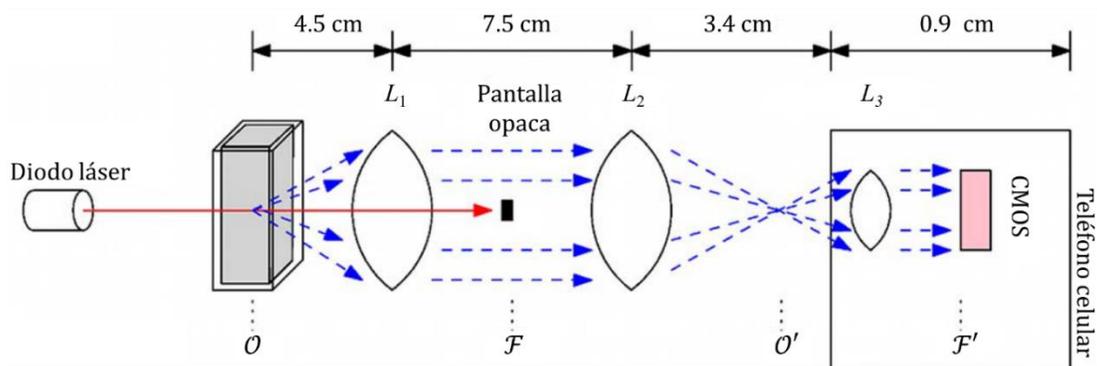


Fig. 1.4. Esquema del sistema experimental para monitorear el patrón de espaciamiento de la luz, debido a la muestra, al filtrar la luz no dispersada (láser) de la luz dispersada con una pantalla opaca en el centro del láser. Crédito: Smith et al. (2012) [19].

Yurchuk et al. (2016) [42] emplea un sistema de medición automatizado, mediante un arreglo óptico experimental de filtraje espacial (Fig. 1.5a), para calcular el tamaño promedio y las curvas de distribución de tamaños de suspensiones de glóbulos rojos (Fig. 1.5b). Este método aproxima los patrones de espaciamiento observados (Fig. 1.5c) como patrones de difracción en el campo lejano. Su sistema permite determinar el diámetro promedio con un error menor al 1% y la distribución de tamaños con un error cercano al 20%.

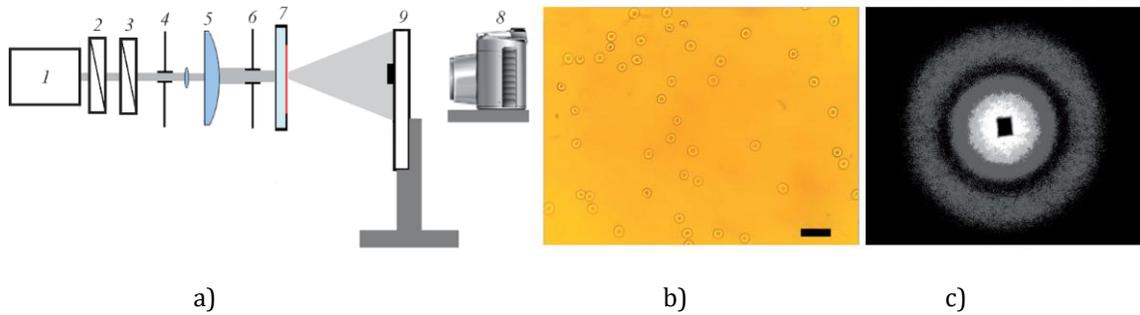


Fig. 1.5. Medición de la luz esparcida hacia adelante. a) Configuración experimental: (1) láser He-Ne; (2,3) polarizadores; (4,6) aberturas; (5) sistema de lentes; (7) frotis de sangre; (8) cámara; (9) pantalla translúcida con placa absorbente de rayos láser. b) frotis de sangre húmeda bajo un microscopio, la regla de escala es  $20 \mu\text{m}$ . c) Patrón de difracción debido a la muestra de sangre. Crédito: Yurchuk et al. (2016) [42].

Todas estas técnicas muestran la viabilidad de calcular el tamaño promedio, la distribución de tamaños, la concentración e incluso diferenciar entre distintos tipos de partículas en una monocapa o en una suspensión, mediante el esparcimiento y la extinción de la luz. Para poder inferir las características mencionadas (cantidad, el tamaño relativo, función de distribución de tamaños y diferenciación de tipos de partículas) y por simplicidad, se asume que las partículas son esféricas transparentes y que la luz esparcida tiene la misma longitud de onda que la de la luz incidente, además de estar en el rango visible del espectro de luz. Al registrar la extinción de la luz debida a la intensidad esparcida por unidad de volumen en una dirección dada, se puede inferir la cantidad de partículas presentes en una muestra. Cada una de las muestras que contienen partículas, tiene un índice de refracción complejo particular y pueden ser inferidas mediante el esparcimiento de luz hacia adelante, si la distancia entre partículas fuera mayor que la longitud de onda utilizada. Del patrón de esparcimiento dado por la muestra se extraen el tamaño absoluto y la distribución de tamaños. Además, a partir del patrón de esparcimiento también se podrían identificar y diferenciar los tipos de partículas si se controlará y cambiará el estado de polarización de la luz incidente en la muestra y se analizará este esparcimiento con un polarizador antes del detector óptico. Es evidente que, al tomar ventaja de las propiedades de la extinción angular de la luz, es posible extraer mucha información sobre las partículas y así poder caracterizar las muestras.

El propósito de este trabajo es describir una técnica para la medición del patrón de esparcimiento de las partículas, sobre un rango angular bidimensional cercano a la dirección de propagación del haz. Esto se logra al explotar las propiedades de la transformada de Fourier en combinación con un filtro espacial [6]. A continuación, se presenta una breve discusión de los principios básicos de esta técnica.

## 1.2 Esparcimiento de luz por partículas pequeñas

Los mecanismos por los cuales un haz de luz se atenúa, cuando atraviesa un medio no homogéneo, son la absorción (por ejemplo, la conversión de la energía de la radiación electromagnética incidente en calor o energía química) y el esparcimiento (redireccionamiento de la radiación electromagnética incidente fuera de la dirección original de propagación, normalmente debido a partículas de cualquier tamaño y por moléculas). Esta atenuación es llamada extinción e intuitivamente se sabe que esta extinción, en cualquier caso, debe de ser proporcional a la radiación incidente. Esto quiere decir que, en ausencia de iluminación (la fuente de luz está apagada) la extinción también es cero (¡No se puede quitar energía a un haz inexistente!). Si se llegase a duplicar la intensidad incidente (debido a la fuente de iluminación) también se duplicará la tasa extinción, debido a la absorción o esparcimiento, sin importar cuál de estas sea la principal causa de esta caída en la intensidad saliente del medio. Si se considera que el coeficiente de extinción ( $\alpha_{ext}$ ) es la suma del coeficiente de esparcimiento ( $\alpha_{sca}$ ) y coeficiente de absorción ( $\alpha_{abs}$ ),

*Extinción = absorción + esparcimiento, o*

$$\alpha_{ext} = \alpha_{sca} + \alpha_{abs}, \quad (1.1)$$

entonces se podría caracterizar las contribuciones relativas del esparcimiento y la absorción de la extinción total.

### 1.2.1 Esparcimiento de la luz

El estudio del esparcimiento de la luz debido a partículas pequeñas tiene una larga y honorable historia. Los libros de van de Hulst [43] y Kerker [44] son reseñas clásicas del tema. Los trabajos generales más recientes incluyen los libros de Bohren y Huffman [15], Bayvel y Jones [45] y Xu [3]. Cuando la luz se encuentra con la materia, ésta la reemite en todas las direcciones. A este fenómeno se le conoce como “esparcimiento” (Fig. 1.6). El esparcimiento es debido a la reflexión de la luz, la refracción de la luz o una combinación de ambas interacciones con una partícula o molécula. La intensidad de la luz esparcida, en la Fig. 1.6 y denotada por las flechas salientes de la partícula esférica, depende de la posición de observación o el ángulo de esparcimiento  $\theta$ , la longitud de onda de la fuente de luz  $\lambda$ , el radio  $r$  de la partícula y del índice de refracción relativo

$$n_{rel} = \frac{n_p}{n_m}, \quad (1.2)$$

donde,  $n_p$  es el índice de refracción de la partícula (real) y  $n_m$  es el índice de refracción del medio circundante (real o complejo).

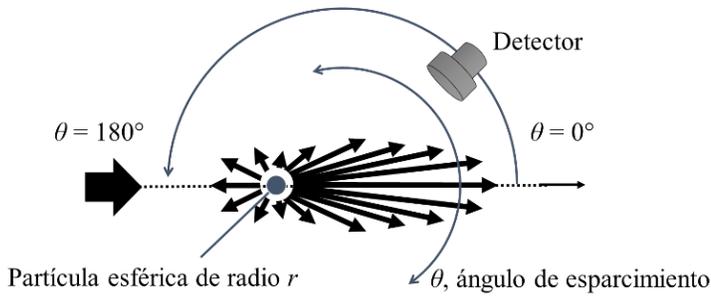


Fig. 1.6. Esquema del fenómeno del esparcimiento de la luz.

La solución al problema del esparcimiento depende de la combinación de la partícula de interés (con una forma, tamaño e índice de refracción arbitrarios) con la longitud de onda de la fuente, que puede abarcar un amplio espectro electromagnético desde ultravioleta hasta microondas. La Fig. 1.7 ilustra esto en detalle, donde el esparcimiento debido a las partículas se puede clasificar en diferentes regiones (Rayleigh, Mie y óptica geométrica) como función de  $\lambda$ .

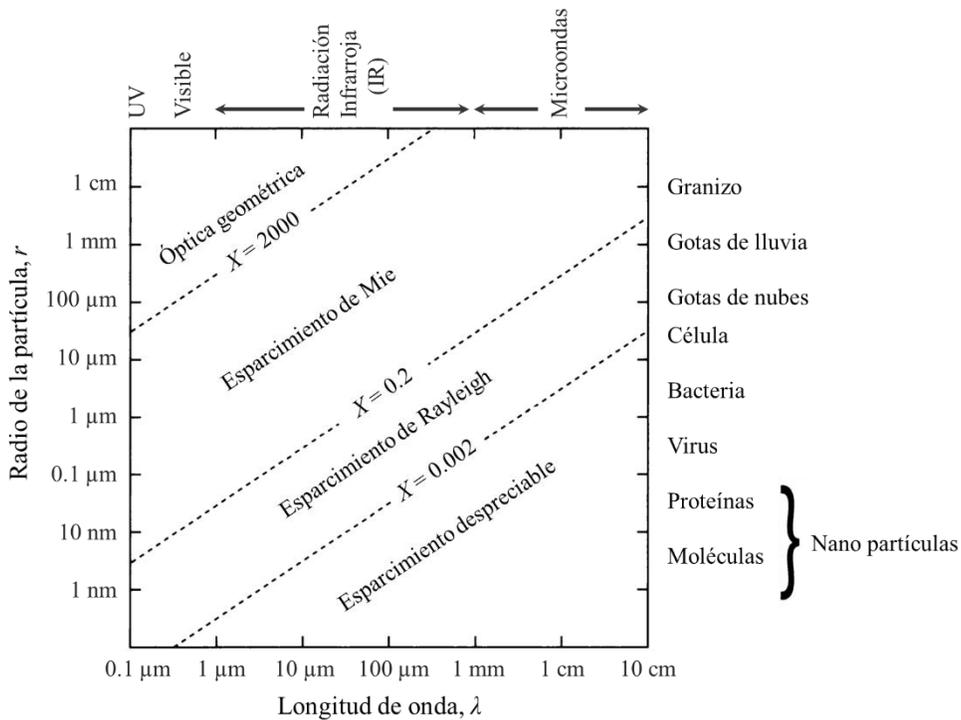


Fig. 1.7. Relación gráfica entre el tamaño de la partícula  $r$  y del tipo de esparcimiento como función de la longitud de onda. Los tipos de partículas y radiación electromagnética se muestran a la derecha y arriba, respectivamente. Las líneas punteadas representan los límites (aproximados) entre los regímenes de esparcimiento. Crédito: G. W. Petty (2006) [46].

En la Fig. 1.7,  $X$  corresponde al parámetro de tamaño y es definido por

$$X = kr = \frac{2\pi r}{\lambda} = \frac{\pi D}{\lambda}, \quad (1.3)$$

donde  $r$  es el radio de la partícula,  $D$  es el diámetro de la partícula,  $\lambda$  es la longitud de onda y  $k = 2\pi/\lambda$  es el número de onda. Cada una de las regiones en la Fig. 1.7 están asociada al parámetro de tamaño, es decir, una partícula con un tamaño dado puede esparcir la luz en diferentes regímenes dependiendo de su índice de refracción y de la longitud de onda.

La Fig. 1.7 muestra que la región aplicable para detallar las partículas de interés, en la presente investigación, es el régimen de Mie. El rango de radios efectivos, promedios, está entre 0.5 y 9.5  $\mu\text{m}$  (o diámetros de 1 a 19  $\mu\text{m}$ ) en el rango del espectro visible (400-700 nm) [11-13]. Este rango de tamaño es de interés porque incluye los diámetros y núcleos de células sanas (sin patología) y displásicos, mencionados al principio de este capítulo.

## 1.2.2 Teoría de Mie

Para el intervalo de tamaños de las partículas de interés ( $1 < D < 19 \mu\text{m}$ ), se elige la teoría que mejor describa la atenuación de la luz a través de un medio particulado. Como se mencionó en la sección 1.2, la atenuación (llamada extinción a partir de ahora) depende del esparcimiento y absorción. Si hay pocas partículas presentes en el medio, la teoría de Mie [43] describe con precisión la propagación de la luz. Cuando la concentración de partículas aumenta habrá esparcimiento múltiple, este se rige por la Ecuación de Transferencia Radiativa (ETR) [44].

Para suspensiones diluidas, la probabilidad de que los fotones, que fueron inicialmente esparcidos, sean nuevamente esparcidos por una segunda célula es relativamente pequeña; debido a que el proceso de esparcimiento estará dominado por eventos de esparcimientos simples o únicos. En este dominio, la anisotropía del esparcimiento en la dirección de propagación de la luz es muy alta y puede ser descrita, en detalle, mediante la teoría de Mie.

La solución rigurosa del esparcimiento de una onda plana debido a una partícula esférica de cualquier tamaño, mediante la teoría de Mie, es dada en mayor detalle por van de Hulst [43] y Bohren y Huffman [15]<sup>2</sup>. La relación entre la luz incidente y esparcida debido a una partícula esférica está descrita por la “matriz de amplitud” (Ec. 1.4). Esta matriz es una relación entre las componentes perpendiculares y paralelas del campo incidente ( $E_{\perp i}$  y  $E_{\parallel i}$ ), evaluada en  $z = y = x = 0$ , y del campo esparcido ( $E_{\perp s}$  y  $E_{\parallel s}$ ) a una distancia radial  $R$  del centro de la partícula, hasta al punto de observación, con un ángulo de inclinación  $\theta$  y  $\varphi$ . Esta geometría del esparcimiento se muestra en la Fig. 1.8.

---

<sup>2</sup> La notación utilizada en esta sección corresponde a las referencias [15,43] (Bohren y Huffman, y van de Hulst) y esta solo será empleada la sección 1.2.2 y Anexo B.1.

$$\begin{bmatrix} E_{\parallel S} \\ E_{\perp S} \end{bmatrix} = \frac{e^{ik(R-z)}}{-ikR} \begin{bmatrix} S_2 & S_3 \\ S_4 & S_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_{\parallel i} \\ E_{\perp i} \end{bmatrix} \quad (1.4)$$

donde  $k = 2\pi/\lambda$  es el número de onda y  $S_1, S_2, S_3,$  y  $S_4$  son las funciones de amplitud que están asociadas con el vector de Stokes [15,43] dando diferentes combinaciones para las componentes incidentes paralela  $E_{\parallel}$  y transversal  $E_{\perp}$  del campo esparcido.

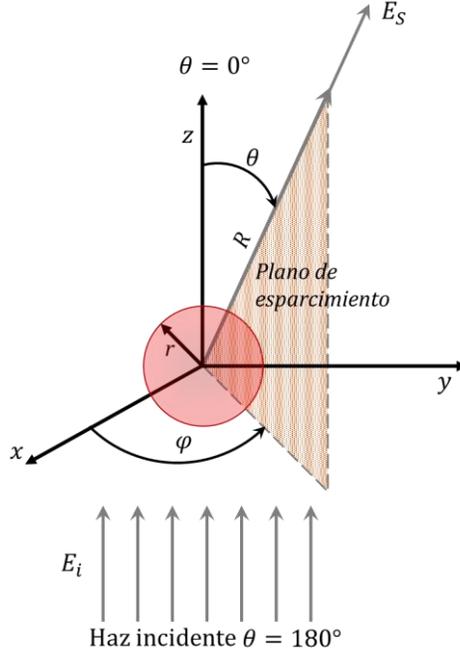


Fig. 1.8. Geometría utilizada para describir los campos incidentes y esparcidos, donde el eje  $z$  representa la dirección de propagación de la luz incidente. En esta situación física, la partícula se considera una esfera de radio  $r$ , iluminada por una onda plana y con el origen del sistema de coordenadas en el centro de la partícula.

Considerando que las partículas son esféricas, se asume que el esparcimiento es el mismo en los ángulos  $\theta$  y  $\varphi$ , por tanto  $\theta = \varphi$ . Además,  $S_3 = S_4 = 0$  porque estas funciones de amplitud están asociadas a simetrías diferentes de la esférica y únicamente  $S_1$  y  $S_2$  son de interés. Entonces, la matriz de la Ec. 1.4 para cualquier dirección  $\theta \neq 0$ , queda como:

$$\begin{bmatrix} E_{\parallel S} \\ E_{\perp S} \end{bmatrix} = \frac{e^{ik(R-z)}}{-ikR} \begin{bmatrix} S_2 & 0 \\ 0 & S_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_{\parallel i} \\ E_{\perp i} \end{bmatrix}. \quad (1.5)$$

Las funciones de amplitud que dependen del ángulo de esparcimiento  $\theta$  son  $S_1(\theta)$  y  $S_2(\theta)$ , asociadas a las componentes perpendiculares y paralela respectivamente, y son de la siguiente forma:

$$S_1(\theta) = \sum_{l=1}^{\infty} \frac{2l+1}{l(l+1)} (a_l \pi_l(\cos \theta) + b_l \tau_l(\cos \theta)) \quad (1.6)$$

$$S_2(\theta) = \sum_{l=1}^{\infty} \frac{2l+1}{l(l+1)} (a_l \tau_l(\cos \theta) + b_l \pi_l(\cos \theta)) \quad (1.7)$$

donde  $l$  es el número del modo. Las funciones angulares de Mie corresponden a  $\pi_l$  y  $\tau_l$ , y describen la dependencia angular de la luz radiada en la dirección del ángulo de esparcimiento  $\theta$ ,

$$\pi_l(\cos \theta) = \frac{1}{\sin \theta} P_l^1(\cos \theta) \quad (1.8)$$

$$\tau_l(\cos \theta) = \frac{d}{d\theta} P_l^1(\cos \theta) \quad (1.9)$$

donde  $P_l^1$  son los polinomios de Legendre. Los coeficientes  $a_l$  y  $b_l$ , para una partícula homogénea no magnética, también se les conocen como los coeficientes de Mie o los coeficientes de esparcimiento y están dados por

$$a_l = \frac{n_{rel} \psi_l(Z) \psi_l'(X) - \psi_l(X) \psi_l'(Z)}{n_{rel} \psi_l(Z) \xi_l'(X) - \xi_l(X) \psi_l'(Z)} \quad (1.10)$$

$$b_l = \frac{\psi_l(Z) \psi_l'(x) - n_{rel} \psi_l(x) \psi_l'(Z)}{\psi_l(Z) \xi_l'(x) - n_{rel} \xi_l(x) \psi_l'(Z)} \quad (1.11)$$

donde  $n_{rel}$  es el índice de refracción relativo,  $Z = n_{rel} X$  es una variable adimensional y  $X$  es el parámetro de tamaño (Ec. 1.3) de la partícula.  $\psi_l$  y  $\xi_l$  son las funciones de Riccati-Bessel y están dadas por

$$\psi_l(Z) = Z j_l(Z) \quad (1.12)$$

$$\xi_l(Z) = Z h_l^1(Z) \quad (1.13)$$

donde  $h_l^1(Z)$  corresponde a la función esférica de Henkel (también conocidas como funciones esféricas de Bessel de tercer orden)

$$h_l^1(Z) = j_l(Z) + i y_l(Z) \quad (1.14)$$

además  $j_l(Z)$  y  $y_l(Z)$  son las funciones esféricas de Bessel

$$j_l(Z) = \sqrt{\frac{\pi}{2Z}} J_{l+1/2}(Z) \quad (1.15)$$

$$y_l(Z) = \sqrt{\frac{\pi}{2Z}} Y_{l+1/2}(Z) \quad (1.16)$$

donde  $J_{l+1/2}(Z)$  y  $Y_{l+1/2}(Z)$  son las funciones de Bessel de primer y segundo tipo, respectivamente.

### 1.2.3 Potencia, irradiancia y flujo

En óptica, la unidad con la que se está más acostumbrados a trabajar es la potencia óptica<sup>3</sup>,  $P$ , definida como la energía en Joules (J) por unidad de tiempo (s), o Watt (W). También es usual normalizar la potencia óptica por unidad de área o volumen, densidad de energía, expresada en  $W/m^2$  y  $W/m^3$ . Sin embargo, para poder normalizar es necesario especificar si el área considerada es plana o curva, así como su orientación. Por lo que, se puede definir la potencia incidente en una superficie plana de área unitaria como irradiancia,  $I$ .

En la mayoría de los sistemas de medición de la luz, los detectores son opto-eléctricos y se calibran usando luz con una dirección definida, es decir, luz colimada. Estos dispositivos tienen una superficie de detección plana y habitualmente su superficie es colocada normal a la dirección de iluminación. Cuando las células biológicas son iluminadas mediante una fuente de luz, estas esparcirán la luz en todas direcciones por lo que se requiere medir la luz en todas las direcciones. Por ello, la mayoría de los detectores necesitan ser insensibles al ángulo de incidencia de la fuente de luz para poder medir el esparcimiento de la luz incidente.

La irradiancia esparcida  $I_{sca}$  está dada por la luz incidente y su estado de polarización  $I_0(z = 0)$  y de la distancia  $R$ , que corresponde a la distancia del centro de la partícula al punto de observación dada por el ángulo de esparcimiento  $\theta$ . Esta irradiancia esparcida se escribe como

$$I_{\perp,sca} = \frac{i_{\perp}}{k^2 R^2} I_0 \quad (1.17)$$

$$I_{\parallel,sca} = \frac{i_{\parallel}}{k^2 R^2} I_0 \quad (1.18)$$

donde  $k = 2\pi/\lambda$  es el número de onda,  $I_{\parallel,sca}$  e  $I_{\perp,sca}$  son las irradiancias esparcidas de las componentes paralelas y perpendiculares al plano de esparcimiento, respectivamente,  $i_{\perp}$  e  $i_{\parallel}$  son las funciones de intensidad no dimensionadas para la luz esparcida asociadas a las componentes perpendicular y paralela, respectivamente, y se calculan a partir del cuadrado del módulo de las funciones de amplitud  $S_1$  y  $S_2$ , Ec. 1.6 y Ec. 1.7,

$$i_{\perp} = |S_1(\theta)|^2 \quad (1.19)$$

$$i_{\parallel} = |S_2(\theta)|^2 \quad (1.20)$$

La irradiancia de la luz esparcida  $I_{sca}$  no polarizada o luz natural, se calcula como,

$$I_{sca} = \frac{i_{np}}{k^2 R^2} I_0 \quad (1.21)$$

---

<sup>3</sup> La potencia óptica  $P$  es diferente de  $P_l^1$ , la notación de  $P$  para identificar el polinomio de Lagrange solamente se utilizará en las funciones angulares de Mie (capítulo 1.2.2 y Anexo B) y no serán empleadas en otra sección del trabajo.

donde la función adimensional de intensidad para la luz no polarizada  $i_{np}$  es,

$$i_{np} = \frac{i_{\perp} + i_{\parallel}}{2} \quad (1.22)$$

Como se mencionó al principio de este capítulo, la extinción es la atenuación de una onda electromagnética debido al esparcimiento y a la absorción al atravesar un medio particulado (Ec. 1.1). En un medio homogéneo el mecanismo dominante de la extinción es usualmente debido a la absorción. Cuando se comparan los espectros de extinción (para pequeñas partículas de diferentes tamaños) con los espectros de absorción para materiales en bruto revelan que ambas presentan similitudes y a la vez diferencias (debido a la naturaleza y distribución de las partículas) [15]. Para una muestra (una suspensión diluida o una película delgada de partículas suficientemente distanciadas entre sí), algunas características físicas, tales como el tamaño o cantidad, u ópticas como el coeficiente de extinción o absorción pueden ser obtenidas al conocer la transmitancia ( $T$ ) de una muestra de espesor  $w$ ,

$$T = \frac{I}{I_0} = \frac{P}{P_0} = \exp(-\alpha_{ext} \cdot w). \quad (1.23)$$

Donde el haz de luz incidente de sección transversal  $\sigma_0$  y potencia  $P_0 = \sigma_0 I_0$  se atenúa exponencialmente  $\alpha_{ext}$  (coeficiente de extinción o atenuación) hasta  $P = P_{abs} + P_{sca}$  (potencia absorbida y esparcida, respectivamente) al atravesar una distancia  $w$  a través de un medio lleno de partículas, ver

Fig. 1.9.

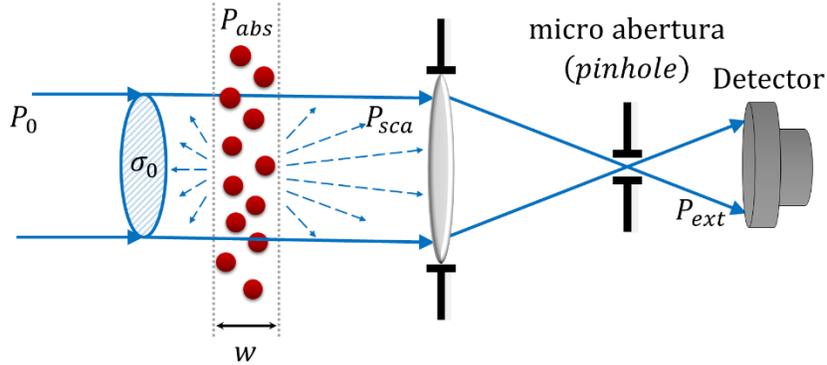


Fig. 1.9. Esquema óptico para la medición de la transmitancia, la micro abertura (o *pinhole*) rechaza la luz esparcida por la muestra.

Entonces, se considera que el esparcimiento múltiple es despreciable, en una muestra diluida, cuando la probabilidad de que los fotones, que fueron inicialmente esparcidos, sean nuevamente esparcidos por una segunda célula es relativamente pequeña, es decir,  $\alpha_{ext} \cdot w < 1$ ; debido a que el proceso de esparcimiento estará dominado por eventos de esparcimientos simples o únicos [47], resultando en que la atenuación de la luz al atravesar un

medio particulado será de manera exponencial. En general, la extinción de la luz debido a una muestra diluida o altamente concentrada puede ser descrita con la Ec. 1.23, también conocida como ley de Beer-Lamber-Bouguer (BLB), donde las características de la extinción de las partículas pueden ser inferidas a través de la transmitancia. Cuando la extinción de la luz ocurre debido una mezcla de partículas esféricas de diferentes tamaños, entonces el coeficiente de atenuación para tal mezcla se expresa como

$$\alpha_{ext} = \sum_{l=1}^n N_{T_l} \sigma_{ext}(D_l) = \frac{-\ln(T)}{w} \quad (1.24)$$

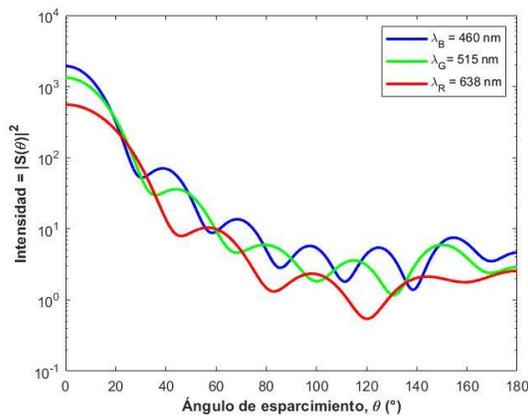
donde  $N_{T_l}$  representa la cantidad de partículas por unidad de volumen,  $\sigma_{ext}$  es la sección transversal de extinción y  $D$  es el diámetro de la partícula.

Como se ha mencionado en secciones anteriores, es importante conocer y caracterizar cuantitativamente el esparcimiento de la luz debido a células. Ha habido diversos estudios sobre las propiedades de dichas partículas a través del esparcimiento y algunos de estos estudios (ver Sección 1.1) han relacionado una o más de las propiedades observadas con las predicciones teóricas. Sin embargo, no ha habido una “profunda” introspección del esparcimiento debido a algún tipo de célula biológica o partícula subcelular grande cuyas dimensiones sean mayores que la longitud de onda  $\lambda$  y que solo considere analizar la propagación de la luz esparcida en la dirección de propagación del haz de luz (no en la retro esparcida) a pequeños ángulos, es decir, a ángulos menos a  $20^\circ$ . Por tanto, es interesante cuestionar si el monitoreo del esparcimiento hacia adelante puede aportar nueva información a la caracterización de las partículas. Esto es de interés, pues, es posible utilizar de igual forma las predicciones, mediante las ecuaciones de esferas homogéneas perfectas de Mie en esferas como en esferoides oblatos si y solo si se considera el esparcimiento en la dirección de propagación de la luz, o “hacia adelante”. Sin importar la forma de la célula, es posible obtener información sobre su composición (índice de refracción), tamaño y cantidad. Lo que descarta un parámetro a la variedad de variables que hay cuando se analiza una célula en particular.

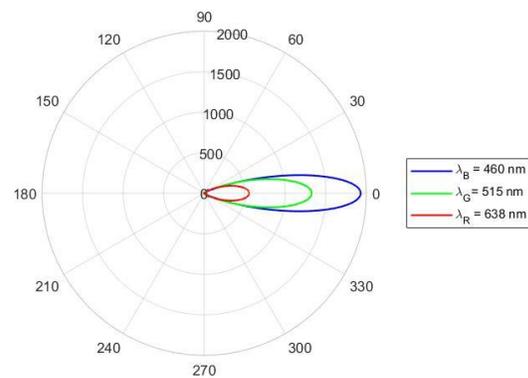
Se toma como ejemplo, de la dependencia angular del esparcimiento de la luz debido a una esfera, dos pequeñas gotas de agua. Cada gota de agua es diferente solo en tamaño, donde una gota de agua tendrá un tamaño de  $D = 1 \mu\text{m}$  y la otra de  $D = 16 \mu\text{m}$ , ambas son iluminadas con luz visible (a longitudes de onda  $\lambda_0 = 460 \text{ nm}$ ,  $\lambda_0 = 515 \text{ nm}$  y  $\lambda_0 = 638 \text{ nm}$ ). En el espectro visible de la luz, el índice de refracción del agua es aproximadamente  $(1.33 + i10^{-8})$ . Los resultados de los cálculos computacionales, utilizando el programa de MATLAB del apéndice B.1, las dos gotas de agua son mostradas en la Fig. 1.10; las gráficas cartesianas y polares lineales correspondientes a la intensidad  $i_{np}$ ; en todos estos dos conjuntos de curvas la variable independiente es el ángulo de esparcimiento  $\theta$ .

Posiblemente el punto más importante a destacar es que el esparcimiento es altamente pronunciado en la dirección de propagación. Esto se aprecia sorprendentemente en la gráfica

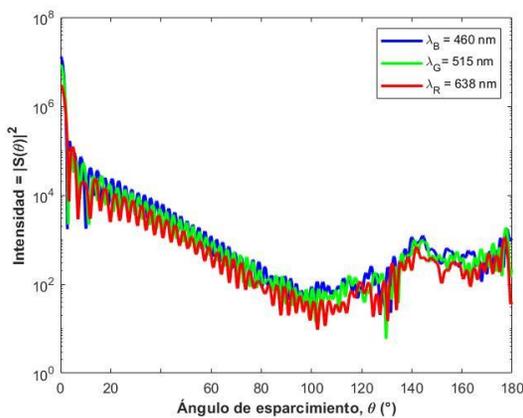
polar de la Fig. 1.10b y Fig. 1.10d. En la Fig. 1.10, los pequeños lóbulos de esparcimiento para  $\theta > 90^\circ$  son casi imperceptibles cuando se le compara con los lóbulos, bien pronunciados, del esparcimiento que se da hacia adelante (en la dirección de propagación); en efecto, para que los lóbulos del retro esparcimiento sean vistos del todo, es necesario que se magnifique los gráficos polares por lo menos en dos órdenes de magnitud. La irradiancia esparcida en la dirección de propagación del haz incidente (hacia adelante) es de más de 100 veces más grande que el de la dirección trasera (Fig. 1.10a y Fig. 1.10c); tal asimetría direccional se vuelve más pronunciada conforme se incrementa el parámetro del tamaño, al punto que el valor es de poco valor desplegarlo en los diagramas de esparcimiento en una forma lineal y solo es perceptible en escala logarítmica. La intención de los gráficos (Fig. 1.10) es enfatizar la predominancia del esparcimiento de la luz en ángulo muy cercanos a la dirección de propagación del haz de luz incidente y el porqué del interés en el esparcimiento a ángulos cercano a esta dirección.



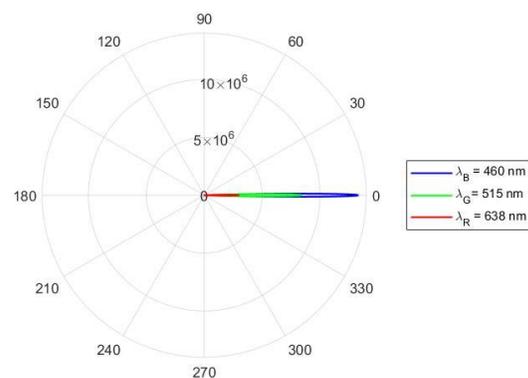
a)



b)



c)



d)

Fig. 1.10. Ángulo de esparcimiento para esferas con  $n_p = 1.33 + i10^{-8}$ , con una iluminación a tres diferentes longitudes de onda en el espectro visible; la parte derecha corresponde a gráficos en coordenadas polares. a) y b) corresponde a una esfera de diámetro de  $1 \mu\text{m}$ . c) y d) corresponde a una esfera de diámetro de  $16 \mu\text{m}$ .

Para el caso del esparcimiento hacia adelante ( $\theta = 0^\circ$ ) las partículas esféricas dan una mayor simplificación por el hecho que  $S_1(0) = S_2(0)$ , esto se denota por  $S(0)$  sin subíndice,

$$S(0^\circ) = \frac{1}{2} \sum_{l=1}^{\infty} (2l + 1)(a_l + b_l), \quad (1.25)$$

y la sección transversal de la extinción por partícula es,

$$\sigma_{ext} = \frac{4\pi}{k^2} \text{Re}\{S(0)\}. \quad (1.26)$$

Dividiéndola por la sección transversal de la partícula  $\sigma_{part} = \pi r^2$  e introduciendo el parámetro del tamaño  $X = kr$  se obtiene el factor de eficiencia,

$$Q_{ext} = \frac{\sigma_{ext}}{\sigma_{geom}} = \frac{4}{X^2} \text{Re}\{S(0)\} \quad (1.27)$$

donde  $r$  es el radio de la partícula.

## 2. Metodología

Cuando el haz de luz incidente atraviesa un medio, como el de la Fig. 2.1, la luz será reducida proporcionalmente a la extinción. La cantidad de potencia removida,  $P(z)$ , del haz propagándose en la dirección  $z$  a través del medio que contiene a las partículas y de espesor  $w$ , está dado por,

$$P(z) = P_0 \cdot \exp(-\alpha_{ext}z) \quad (2.1)$$

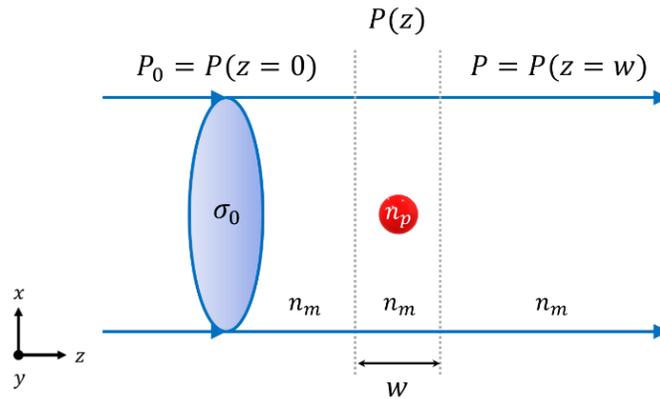


Fig. 2.1. Esquema de la extinción de la potencia óptica entre la fuente de luz y un medio particulado

Debido a que la extinción es una medida de la pérdida de la potencia, debido al esparcimiento y a la absorción, es la propiedad más sencilla de estimar y en consecuencia se empezará el estudio con la sección transversal de extinción. Se considera que la fuente de iluminación es un haz de luz colimado direccional con una potencia  $P_0$ , longitud de onda incidente  $\lambda_0$  y sección transversal  $\sigma_0$ , entonces la irradiancia del haz incidente es,

$$I_0 = \frac{P_0}{\sigma_0} \quad (2.2)$$

Este haz ilumina una región de espesor  $w$  que contiene un total de  $N_T$  células suspendidas en un volumen  $\mathcal{V}$ . El haz de luz es tal que solo llena la sección transversal  $\sigma_0$ , del volumen contenedor de partículas, con una irradiancia uniforme  $I_0$ .

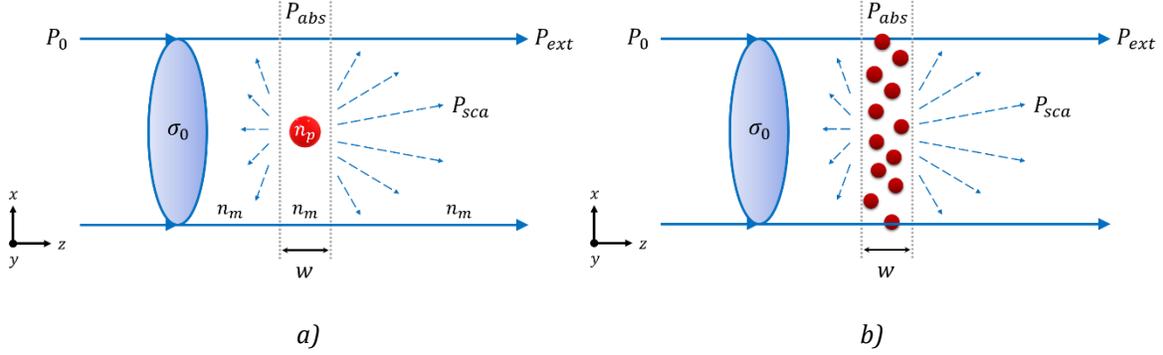


Fig. 2.2. Esquema de la interacción entre la fuente de luz y un medio particulado. La potencia incidente se denota por  $P_0$ , la potencia esparcida  $P_{sca}$ , la potencia absorbida por  $P_{abs}$  y la componente coherente por  $P_{ext}$ . a) Representa la existencia de una sola partícula en el volumen iluminado; b) Representa una película o suspensión de varias partículas.

Para el caso  $N_T = 1$ , una sola partícula contenida en un volumen  $\mathcal{V}$  e iluminada por un haz incidente (ver Fig. 2.2a), los procesos de esparcimiento y absorción son proporcionales a la irradiancia incidente para esa partícula. Es decir, que la potencia total esparcida  $P_{sca}$  es proporcional a  $I_0$  como,

$$P_{sca} = \sigma_{sca} I_0 \quad (2.3)$$

donde  $\sigma_{sca}$  es la sección transversal de esparcimiento, teniendo dimensiones de área. De manera similar, la absorción se escribe como,

$$P_{abs} = \sigma_{abs} I_0 \quad (2.4)$$

donde  $\sigma_{abs}$  es la sección transversal de absorción. Ambos procesos remueven potencia de la radiación incidente, y su efecto combinado es la extinción. Por tanto, la suma de la potencia absorbida y esparcida para una partícula es,

$$P_{ext} = \sigma_{ext} I_0 = P_{sca} + P_{abs} \quad (2.5)$$

así como la sección transversal de extinción,

$$\sigma_{ext} = \sigma_{sca} + \sigma_{abs} \quad (2.6)$$

El cociente entre la potencia extinguida y la potencia incidente es,

$$\frac{P_{ext}}{P_0} = \frac{\sigma_{ext}}{\sigma_0} = Q_{ext} \quad (2.7)$$

y  $Q_{ext}$  se define como la eficiencia de extinción. De igual forma,

$$Q_{ext} = Q_{sca} + Q_{abs} \quad (2.8)$$

donde  $Q_{sca} = P_{sca}/P_0 = \sigma_{sca}/\sigma_0$  y  $Q_{abs} = P_{abs}/P_0 = \sigma_{abs}/\sigma_0$ .

Las partículas muy rara vez, si es que alguna lo hacen, se encuentran de manera aisladas. Estas existen en películas o suspensiones que contienen números muy grandes. Aquí, el esparcimiento de la luz dependerá de las circunstancias, tal como el número real de partículas presentes en el espacio observado por el detector del volumen de la muestra. Por lo tanto, a bajas concentraciones y con un volumen pequeño se podría estar ante una sola partícula, pero la presencia de otras partículas no puede ser ignorada en todos los casos. Para volúmenes y concentraciones más grandes, se puede estar viendo varios millones de partículas.

La extensión del esparcimiento simple a las monocapas o suspensiones, Fig. 2.2b, se puede realizar en dos niveles, siendo el más simple el de baja concentración. Las complicaciones surgen a altas concentraciones donde el esparcimiento múltiple y los efectos de interacción de partículas se vuelven significativos.

Para concentraciones muy bajas, las definiciones simples dadas al principio de la sección pueden extenderse a una película de una manera directa, siempre que se cumplan tres condiciones:

- El esparcimiento múltiple es insignificante. Esto significa que, una vez esparcido un fotón, este tiene una probabilidad muy alta de abandonar la película sin encontrarse con otra partícula.
- No existe el esparcimiento interactivo. Esto implica que existe una estructura que propicia el esparcimiento múltiple, donde las partículas tienden a comportarse hasta cierto punto como un conjunto. En el límite estas se tocan y se comportan como una sola partícula o aglomerado. Para evitar el esparcimiento interactivo, si el grupo de partículas (que comprende  $N_T = N/\mathcal{V}$  esferas, siendo  $N$  el número total de partículas y  $\mathcal{V}$  el volumen total de todas las partículas presentes) está lo suficientemente separadas entre ellas (la literatura indica que una separación de tres diámetros entre sí es suficiente [44]) entonces se puede definir que la amplitud de esparcimiento no interactiva como la sumatoria de esparcimientos simples debidos a esferas.
- Las partículas están colocadas al azar y son suficientes para aplicar una superposición incoherente. El posicionamiento aleatorio significa que las fases de las ondas esparcidas que llegan al detector también son aleatorias. Si el número es lo suficientemente grande como para que las fases sumen cero, las intensidades se pueden sumar directamente.

Si se aplican estas tres condiciones, simplemente se suman las intensidades. Por lo tanto, si hay  $N_T$  partículas por unidad de volumen, todas del mismo tamaño  $D$ , la potencia total de extinción por unidad de volumen de espacio es,

$$P_{ext,N} = N_T P_{ext} \quad (2.9)$$

y, al dividir por la irradiancia,

$$\frac{P_{ext,N}}{I_0} = N_T \frac{P_{ext}}{I_0} = N_T \sigma_{ext} = \alpha_{ext}. \quad (2.10)$$

De manera similar, el coeficiente de extinción queda definido como,

$$\alpha_{ext} = \alpha_{sca} + \alpha_{abs} \quad (2.11)$$

Considerando el medio de espesor  $w$  en la Fig. 2.2, esta ecuación tiene como solución,

$$I = I_0 \exp(-\alpha_{ext} \cdot w) \quad (2.12)$$

Se entiende por extinción al producto del número de partículas total de partículas  $N_T$  por unidad de volumen y la sección transversal total de extinción  $\sigma_{ext}$ . Por lo tanto,

$$\alpha_{ext} \cdot w = N_T \sigma_{ext} w \quad (2.13)$$

Con el fin de promediar los efectos del esparcimiento de una colección de partículas esféricas y diferenciándose solo en tamaño (asumiendo que todas son de composición idéntica), es decir polidispersas, se presenta mediante una distribución de tamaños de forma conocida, que frecuentemente se asume que tiene la forma de, log-normal [48],  $f_{LN}(D)$ , con un tamaño en el rango de  $D$  hasta  $D + dD$ ,

$$f_{LN}(D) = \frac{1}{D s \sqrt{2\pi}} \times \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln D - \bar{D}}{s}\right)^2\right) \quad (2.14)$$

donde  $\bar{D}$  y  $s$  son el diámetro promedio de la partícula (también puede ser el diámetro medio) y la desviación estándar (ancho de la distribución), respectivamente. Esta distribución de tamaños (tipo log-normal) es aplicable a las partículas de monocapa y suspensiones. La densidad en número, la cantidad de partículas de todos los tamaños por unidad de volumen,  $N(D)$ , para una distribución de tamaño está dada por

$$N(D) = \int_0^{\infty} N_T \cdot f_{LN}(D) dD, \quad (2.15)$$

donde  $N_T$  es la densidad en número de las partículas independientemente de su tamaño  $D$ ,

$$N_T = \frac{N}{\mathcal{V}} \quad (2.16)$$

donde  $N$  es el número total de partículas y  $\mathcal{V}$  corresponde al volumen de todas las partículas depositadas sobre el sustrato (para las monocapas) y suspensiones. Utilizando las Ec. 2.10 y Ec. 2.15 el coeficiente de extinción queda como

$$\alpha_{ext} = N_T \int_0^{\infty} \sigma_{ext}(D) f_{LN}(D) dD = N_T \bar{\sigma}_{ext} \quad (2.17)$$

y de igual forma para los coeficientes de esparcimiento y absorción (Ec. 2.11).  $\bar{\sigma}_{ext}$  es la sección transversal de extinción promedio, para una función de distribución de tamaño [43]. Así mismo, se considera la cantidad de partículas presentes en un espacio total del bloque que las contiene, llámese monocapa o suspensión. Para una muestra monodispersa, se define la fracción de área cubierta por una monocapa sobre la superficie de un sustrato plano como

$$A_f = N_A \cdot A_P = \frac{N}{A} \cdot (\pi r^2), \quad (2.18)$$

aquí  $N_A$  es el número total de partículas sobre un área,  $N$ , de partículas depositadas de radio  $r$  sobre un área,  $A$  (el sustrato). La fracción de volumen ocupada por las partículas en un volumen dado

$$\mathcal{V}_f = N_T \cdot \mathcal{V}_P = \frac{N}{\mathcal{V}} \cdot \left( \frac{4}{3} \pi r^3 \right). \quad (2.19)$$

Por otra parte, para una muestra polidispersa la fracción de área cubierta por la monocapa de partículas sobre la superficie del sustrato plano [49],

$$A_f = N_A \cdot A_P \cdot \exp(2 \cdot \ln^2(s)) = \frac{N}{A} \cdot (\pi \bar{r}^2) \cdot \exp(2 \cdot \ln^2(s)), \quad (2.20)$$

donde  $\bar{r}$  es el radio promedio de las partículas en la muestra,  $s$  es la desviación estándar (ancho de la distribución) y la fracción de volumen ocupada por las partículas en un volumen dado [50],

$$\mathcal{V}_f = N_T \cdot \mathcal{V}_P \cdot \exp\left(-\frac{1}{2}(3 \ln s)^2\right) = \frac{N}{\mathcal{V}} \cdot \left( \frac{4}{3} \pi \bar{r}^3 \right) \cdot \exp\left(\frac{1}{2}(3 \ln s)^2\right). \quad (2.21)$$

## 2.1 Monocapa y suspensión

La presente sección tiene como objetivo determinar el coeficiente de extinción y esparcimiento para los dos diferentes casos, tratados en este trabajo, respecto al tipo de muestras a considerar, el primero de ellos es que las partículas pueden estar en una monocapa (ver Fig. 2.3a), y en el segundo caso, pueden estar en un medio líquido (Fig. 2.3b).

En el primer caso, se asume que las partículas adheridas a una interfaz plana (interfaz 2 en la Fig. 2.3a) se encuentran entre dos medios se trata de una monocapa y que pueden ser representadas como una superficie efectiva, es decir, una película infinitamente delgada con espesor de tamaño  $D$ , tratándose de una muestra monodispersa y tamaño promedio  $\bar{D}$  sí es polidispersa.

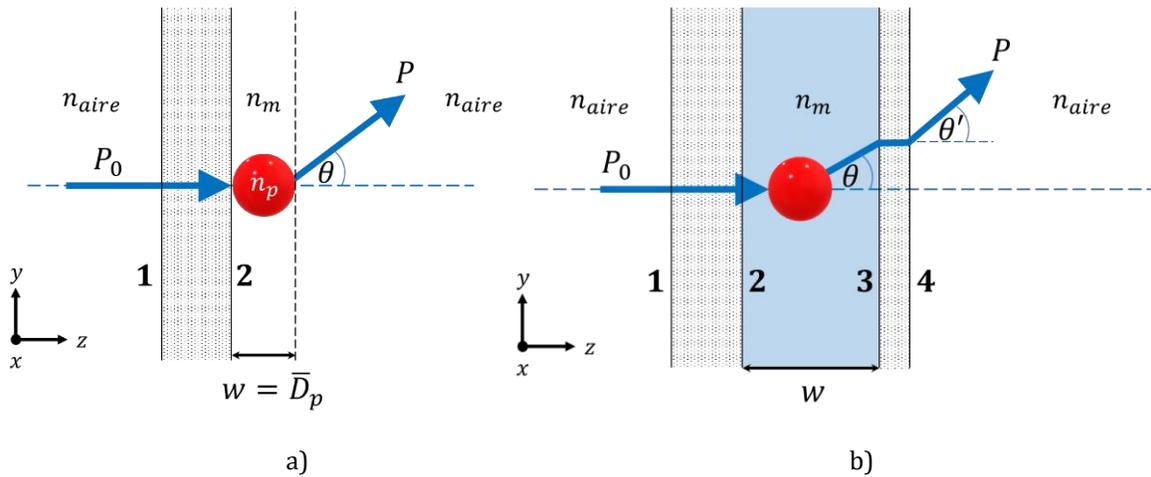


Fig. 2.3. Esquema del camino óptico del haz de luz colimado para muestras con partículas esféricas caracterizadas por un índice de refracción  $n_p$ , a) en una película delgada con índice de refracción  $n_m$ , donde la luz se esparce con un ángulo verdadero  $\theta$  y no requiere una corrección en su ángulo de medición, y b) embebidas en un medio líquido con índice de refracción  $n_m$ , donde la luz atraviesa varias interfaces, 1-4, que llevan a la refracción y potencialmente a la reflexión. El verdadero ángulo de salida de la luz esparcida,  $\theta$ , se obtiene mediante una corrección con el ángulo medido  $\theta'$ .

En el segundo caso, la suspensión<sup>4</sup> se considera que está lo suficientemente diluida ( $\alpha_{ext} \cdot w < 1$ ) para poder describir con facilidad la luz esparcida mediante la teoría de Mie, sección 1.2. Sin embargo, en la práctica se debe que considerar el efecto de la refracción de la luz cuando el recorrido del camino óptico, de un haz de luz, atraviesa varias interfaces (ver Fig. 2.3b) con diferentes índices de refracción durante las mediciones. Mediante la ley de Snell [51] y considerando  $n_m = n_{líquido}$ , se puede determinar el verdadero ángulo de esparcimiento,  $\theta$ , a partir de las mediciones del esparcimiento de la luz después de salir de la suspensión, interfaz 4 de la Fig. 2.3a, con un ángulo  $\theta'$ . Las interfaces en la Fig. 2.3a están marcadas como

Listado de las interfaces en la Fig. 2.3 y correspondientes a los esquemas de monocapa y suspensión.

Interfaz	Monocapa (Fig. 2.3a)	Suspensión (Fig. 2.3b)
1	aire-vidrio	aire-vidrio
2	vidrio- aire	vidrio-líquido
3	-	líquido-vidrio
4	-	vidrio-aire.

<sup>4</sup> Mezcla heterogénea de partículas no solubles que están dispersadas en un medio líquido

Si se considera que las interfaces 1 y 2, en la Fig. 2.3, corresponden a las superficies de un portaobjetos de microscopio (CLS294775X25, 75 mm × 25 mm, grosor 0.90 – 1.10 mm, Corning®) pueden ser omitidas en el análisis debido a que el haz de luz colimado tiene una incidencia normal a estas interfaces. Dado que el cociente del espesor de la interfaz 3 a la 4, en la Fig. 2.3a, corresponde a un cubreobjetos (2845-22, 22 mm × 22 mm, grosor 0.13 – 0.16 mm, Corning®), respecto a la distancia del detector ( $f_1 = 25$  mm en la Fig. 3.2) es muy pequeña,

$$\frac{0.16 \text{ mm}}{25 \text{ mm}} \approx 6.4 \times 10^{-3}.$$

Las interfaces 3 y 4 pueden considerarse como una sola interfaz agua-aire. La relación entre el ángulo de entrada  $\theta$  y el ángulo de salida  $\theta'$  se calcula fácilmente a partir de la ley de refracción

$$\theta' = \sin^{-1} \left( \frac{n_{\text{aire}}}{n_m} \sin \theta \right) \quad (2.22)$$

donde  $n_m = 1.33$  es el índice de refracción del agua y  $n_{\text{aire}} = 1$  es el índice de refracción del aire. Experimentalmente únicamente se puede obtener  $S(\theta')$ , por lo tanto, para obtener  $S(\theta)$  se debe utilizar la Ec. 2.8. En consecuencia, el máximo ángulo detectable en la dirección de propagación es,

$$\theta' < \theta'_{\text{crit}} = \sin^{-1} \left( \frac{1}{1.33} \right) \approx 48.75^\circ.$$

### 2.1.1 Número de partículas

Ya se discutió el proceso del esparcimiento de la luz de manera extensiva a través del capítulo 1. Como es bien sabido, cada microorganismo irradiado con una fuente luz esparce la luz (debido a sus características estructurales y bioquímicas únicas) y forma un patrón único de esparcimiento; en consecuencia, se puede en principio distinguir un tipo de microorganismo de otro. ¿Cómo se puede medir esto? Para ello se recurre a la teoría del esparcimiento de la luz que es de gran importancia, ya que da una relación entre el comportamiento del campo esparcido y el tamaño del esparcimiento. El campo esparcido tiene un comportamiento oscilatorio particular que depende del tamaño del esparcimiento, la longitud de onda de la fuente de luz, los índices de refracción de las partículas y del medio circundante, y del ángulo de esparcimiento (desde el punto de vista del observador respecto a la dirección de incidencia del haz de luz sobre la partícula en concreto). El principal logro de la investigación que se está reportando es la identificación, cuantificación y la determinación del tamaño de partículas biológicas, de forma rápida, la cual requiere solucionar el problema del esparcimiento que se basa en el análisis del campo esparcido. Para partículas esféricas biológicas, el rango de tamaños (diámetros) de interés es de 1  $\mu\text{m}$  hasta 35  $\mu\text{m}$ , el cual cubre el rango de tamaños para

células normales y displásicas, para las células y los núcleos es de alrededor de 5-6  $\mu\text{m}$  y para displásicas es de 10-15  $\mu\text{m}$  [9-13]. Ejemplo de esto son los linfocitos que tienen en promedio un diámetro de 8-10  $\mu\text{m}$  y una distribución de tamaños de 5.98-7.8  $\mu\text{m}$  (datos son extraídos a partir de la literatura [16,17]), y sus valores son corroborados en la sección 3.3 mediante los resultados experimentales a partir de la metodología implementada.

Normalmente, en la medición de la transmitancia se considera una película o celda (piscina) de espesor  $w$ , y embebidas en esta hay partículas esféricas esparcadoras de diámetro  $D$  con una densidad numérica  $N_T$ , iluminadas por un haz de luz colimado. Las partículas están rodeadas por un medio no absorbente. Asumiendo que el esparcimiento múltiple es despreciable y que la longitud camino geométrico  $w$  atravesado por el haz de luz puede ser considerado homogéneo, la transmitancia  $T$  de la película está dada por,

$$T = \frac{P}{P_0} = \exp(\alpha_{ext} \cdot w) \quad (2.23)$$

donde  $\alpha_{ext} = N_T \cdot \bar{\sigma}_{ext}$ ,  $P_0$  es la potencia de la luz incidente,  $P$  es la potencia de la luz transmitida, y  $\bar{\sigma}_{ext}$  es la sección transversal promedio de las partículas y definida como,

$$\bar{\sigma}_{ext} = \int_0^{\infty} \sigma_{ext} \cdot f_{LN}(D) dD \quad (2.24)$$

donde  $\sigma_{ext} = \sigma_{sca} + \sigma_{abs}$  representa la sección transversal extinguida por una única partícula de tamaño  $D$ , y  $f_{LN}(D)$  es la función de distribución de los tamaños de las partículas. Aquí  $\sigma_{sca}$  y  $\sigma_{abs}$  son las secciones transversales esparcida y absorbida, respectivamente, correspondiente a una única partícula. Debido al finito campo visual (campo de visión limitado) del fotodetector, la contribución de la irradiancia debido a la luz esparcida hacia adelante sobre el fotodetector no puede ser completamente eliminada, incluso cuando el esparcimiento múltiple puede ser negado [52,53]. Cuando el parámetro de tamaño de la partícula  $X$  es grande con respecto a la unidad, algo de la luz esparcida hacia adelante entra por la apertura finita del fotodetector.

En el dispositivo experimental ilustrado en la Fig. 2.1 la luz del LED incide directamente sobre la muestra, que tiene la forma de una película gruesa de la suspensión de partículas. El LED se coloca a una distancia para que se ilumine una gran área de la muestra. El coeficiente de extinción de partículas esféricas de tamaño  $D$ ,  $\sigma_{ext}(D)$ , se calcula fácilmente utilizando la llamada teoría de Mie [15,43]. Al medir  $T$  se obtiene una estimación de la densidad numérica de partículas en suspensión,

$$N_T = -\frac{1}{w\bar{\sigma}_{ext}} \ln(T) \quad (2.25)$$

## 3. Desarrollo experimental

En este capítulo se presenta la metodología aplicada en la caracterización óptica de dos tipos de monocapa. Además, se presentan curvas experimentales de esparcimiento y extinción junto a sus respectivas simulaciones teóricas. La comparación entre la teoría y el experimento, para cada monocapa. Cada muestra biológica, como monocapa, utilizó levadura comercial de panadero (*Saccharomyces cerevisiae*) [13,54,55] y glóbulos blancos (WBC, por sus siglas en inglés *White Blood Cells*) de sangre extraída de personas sin patología, específicamente linfocitos. Para estimar las propiedades ópticas inherentes de cada muestra es necesario medir la transmitancia, el esparcimiento y la extinción; esta información es adquirida mediante la metodología planteada en el capítulo 2. Con esto se estiman los coeficientes de extinción y esparcimiento. Todo esto solo será posible si, se cuenta con un apropiado arreglo experimental para la medición de la extinción, tal como se muestra en la siguiente sección.

### 3.1 Arreglo experimental

Cuando se tiene que analizar suspensiones de partículas y estas partículas son lo suficientemente pequeñas, en comparación con la longitud de onda de la luz, el coeficiente de extinción  $\alpha_{ext}$  puede ser determinado experimentalmente con precisión utilizando un haz de luz láser bien colimado y midiendo la potencia óptica del haz colimado transmitido. La luz esparcida se difunde suavemente en todas las direcciones y contribuye de manera insignificante a la medición de transmitancia colimada. Sin embargo, cuando las partículas son grandes en comparación con la longitud de onda, como lo es en el presente caso, de suspensiones de células, la esparcida es distribuida cerca de la dirección de propagación del haz (cerca de unos pocos grados alrededor de la dirección de incidencia en el caso de un haz bien colimado), haciendo que la medición de  $\alpha_{ext}$  sea difícil y propensa a errores. Por otro lado, el ruido en las mediciones de las señales de transmitancia es dependiente del número de

partículas iluminadas conforme el haz óptico a traviesa la muestra y del ruido fluctuante en la intensidad del haz de luz incidente.

Ya que, no se requiere que las intensidades de luz sean mayores a las decenas o centenas de  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , las bandas en el espectro visible requeridas son conocidas y debido al hecho de que experimentalmente se ha comprobado se produce el mismo efecto biológico a las mismas longitudes de onda, intensidad y tiempo de radicación, a nivel celular, para fuentes de luz coherente (p. ej. láser) y no-coherentes (p. ej. diodos emisores de luz, LEDs) [18]. Para suspensiones de partículas grandes, sería mejor iluminar la muestra con una fuente óptica estable y de bajo ruido, por tanto, descartando el uso de la luz láser como fuente de iluminación debido a que es menos estable y tiene un mayor ruido de baja frecuencia que las fuentes no-coherentes [47,56,57]. Además, las mediciones de la transmitancia no requieren de grandes longitudes de coherencia, resultando en que la luz láser no es la mejor elección para la medición de  $\alpha_{ext}$  en nuestras muestras biológicas. Por otra parte, los diodos emisores de luz (LED, por sus siglas en inglés *Light Emitting Diode*) comerciales pueden ser fuentes de luz muy estables y de bajo ruido. Esto se debe a que la longitud de coherencia del LED es pequeña (normalmente en el rango de 5 a 22 micras [18,58]) y comparable con el tamaño del esparcimiento (de las células en suspensión o depositadas sobre un sustrato plano), resulta en que el ruido moteado o de “*speckle*” que surge de la interferencia de la luz esparcida debido diferentes partículas es muy pequeño [18], en comparación con el ruido debido a la luz coherente polarizada. Todas las ventajas antes mencionadas sirven como base para utilizar como fuente de luz parcialmente coherente un LED cuasi monocromático.

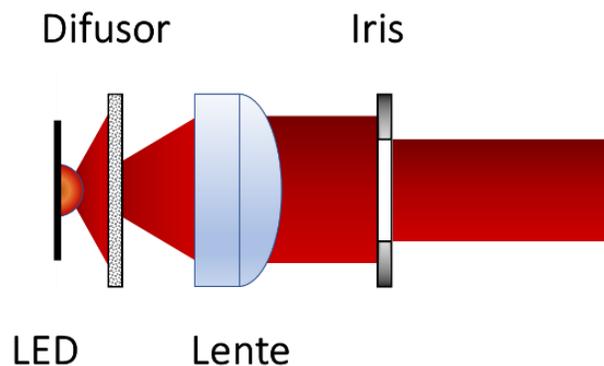


Fig. 3.1. Fuente de iluminación con un LED RGB

La Fig. 3.1 muestra el esquema de la fuente de iluminación colimada, el equipo y material empleado para este arreglo consiste en una fuente de luz tricolor LED-P1RGB60-120/43 (SiLed) con un rango espectral de  $\lambda_0 = 462 \text{ nm}$ ,  $\lambda_0 = 518 \text{ nm}$  y  $\lambda_0 = 630 \text{ nm}$  la cual se acopló a un arreglo opto-mecánico, con el fin de colimar el haz de luz. La fuente de iluminación (véase Fig. 3.1) se logra simplemente colocando una placa difusora para suavizar la imagen del LED, aunque eso reduzca considerablemente la intensidad de la iluminación, después se utiliza una sola lente colimadora frente a la placa difusora. Después se incluye un iris (es decir, diafragma

de apertura) para variar el ángulo máximo de los rayos de luz que inciden (es decir, la apertura numérica,  $NA$ ) en el arreglo experimental, controlando así el contraste y la resolución de la imagen. Para más detalles sobre la fuente de luz consultar el apéndice A.3.

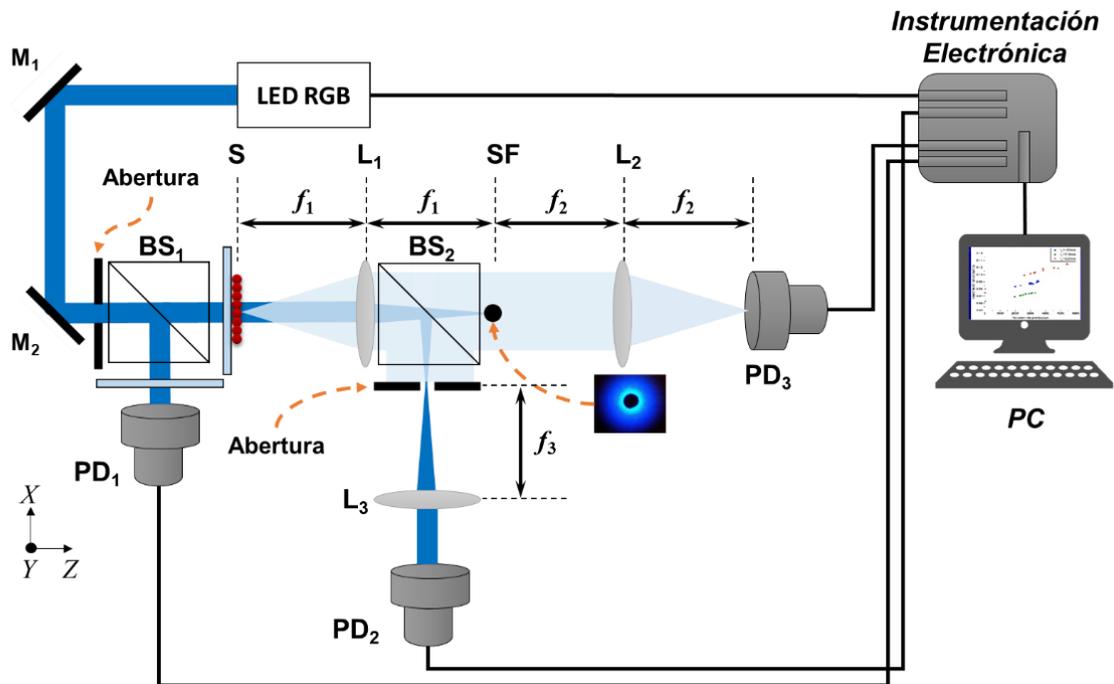


Fig. 3.2. Configuración óptica del sensor para la medición a varias longitudes de onda de las micropartículas. Los componentes están etiquetados como: BS, divisor de haz; L, lente acromática; M, espejo; PD, fotodetector; S, muestra; SF, filtro espacial o pantalla circular opaca.

El arreglo experimental (Fig. 3.2) utilizado para la medición simultánea de la extinción y esparcimiento de la luz, a pequeños ángulos en la dirección de propagación del haz de luz colimado, para los distintos tipos de muestras, a una incidencia normal. Este arreglo los espejos  $M_1$  y  $M_2$  son utilizado para la alineación del haz de luz colimado con respecto al eje óptico. El haz de luz colimado pasa por un divisor de haz para iluminar la monocapa (S en la Fig. 3.2, rectángulo color azul) y monitorear la intensidad incidente en la monocapa, mediante un

fotodiodo (PD<sub>1</sub>, en la Fig. 3.2). La región del patrón de la luz esparcida hacia adelante y la porción no-esparcida por el haz de luz incidente es interceptada por la lente acromática L<sub>1</sub> ( $f_1 = 25$  mm,  $D_1 = 25$  mm), la cual está colocada a una distancia  $f_1$  de la monocapa. En esta configuración, la lente recolecta el patrón del campo lejano sobre un rango angular de 0° a ~14° en el ángulo polar  $\theta$ , donde  $\theta$  es medida a partir de la dirección de propagación del haz incidente.

La luz esparcida y no-esparcida recolectada por la lente L<sub>1</sub> es dividida por un divisor de haz no polarizado, BS, con una tasa de división 50:50. La porción de luz captada por el fotodiodo PD<sub>2</sub> corresponde a la intensidad transmitida  $I_0$  por el sustrato-monocapa como función de la longitud de onda (a incidencia normal) y enfocada por L<sub>1</sub> sobre la superficie activa de PD<sub>2</sub>. Un diafragma de apertura ( $D = 1.6$  mm) es utilizado para filtrar las frecuencias espaciales que no pertenezcan al haz de luz LED colimado. Como el diafragma se encuentra a la distancia focal de L<sub>1</sub>, es decir en el plano de Fourier, toda la luz que no tenga la misma dirección que la del haz de luz colimado será removida.

La luz esparcida debido a la muestra es colimada por L<sub>1</sub> y separada de la porción de luz no-esparcida debido al haz incidente. La luz no esparcida es enfocada a la cintura del plano focal posterior (a una distancia  $f_1$ ) de L<sub>1</sub>, donde hay una pantalla circular opaca SF ( $D_{SF} = 1.6$  mm), de manera que la luz esparcida pase a través de este filtro, mientras que el patrón de luz no-esparcida por el haz incidente es enfocada sobre SF (absorbiéndola).

El plano intermedio entre las lentes L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> es conocido como plano de Fourier. Lo interesante es que en el plano de la imagen intermedia (entre las lentes L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>) se tiene el contenido, en términos de frecuencia espacial, del objeto y se puede manipular, es decir, es posible cambiar el contenido en términos de frecuencia espacial con la ayuda de filtros en el plano de Fourier. Los análisis que se realizan asumen que la abertura finita de las lentes no afecta las imágenes, lo que significa que las lentes son lo suficientemente grandes como para transmitir todas las frecuencias espaciales del objeto. La porción de luz esparcida debido a la muestra (S, en la Fig. 3.2) es captada por la lente L<sub>2</sub> ( $f_2 = 45$  mm,  $D_2 = 25$  mm), la cual está a una distancia  $f_2$  de SF, y registrada por PD<sub>3</sub>.

La medición de la extinción está dada por el detector PD<sub>2</sub> (Fig. 3.2), donde la micro abertura circular (micro-orificio o *pinhole*) ubicado frente al detector rechaza la luz esparcida que sale de la muestra en un ángulo mayor que la mitad del ángulo subtendido por la micro abertura circular adyacente al detector  $\theta_{1/2}$ . Borhen & Huffman [15] y Swanson & Billard [59] sugieren que el semiángulo máximo, ángulo de aceptación, para un micro-orificio debería ser inferior a una décima parte del primer mínimo angular en el patrón de difracción de Fraunhofer de un disco igual a la partícula en el área proyectada, es decir,

$$\theta_{1/2} \leq 7^\circ \frac{\lambda}{D} \quad (3.1)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda en el medio y  $D$  es el diámetro de la partícula. Asumiendo que la partícula más grande utilizada sea de  $19\ \mu\text{m}$  a una longitud de onda mínima de  $462.2\ \text{nm}$ , esto resulta en un ángulo de  $\theta_{1/2} = 0.17$ , que es aproximadamente igual al ángulo de aceptación de  $0.172^\circ \pm 0.05^\circ$  dado por un micro-orificio (modelo 15-396, Edmund Optics) de diámetro  $D = 150\ \mu\text{m}$  y la luz filtrada es recolectada por la lente  $L_3$  ( $f_3 = 35\ \text{mm}$ ,  $D_3 = 25\ \text{mm}$ ) y detectada por el fotodiodo  $\text{PD}_2$ .

Ejemplos experimentales de esta técnica son mostrados en las secciones subsecuentes, que presentan imágenes de las partículas utilizadas cuando se coloca un punto oscuro en el plano de Fourier, así como su posterior análisis empleando una computadora como apoyo, véase la Fig. 3.3.

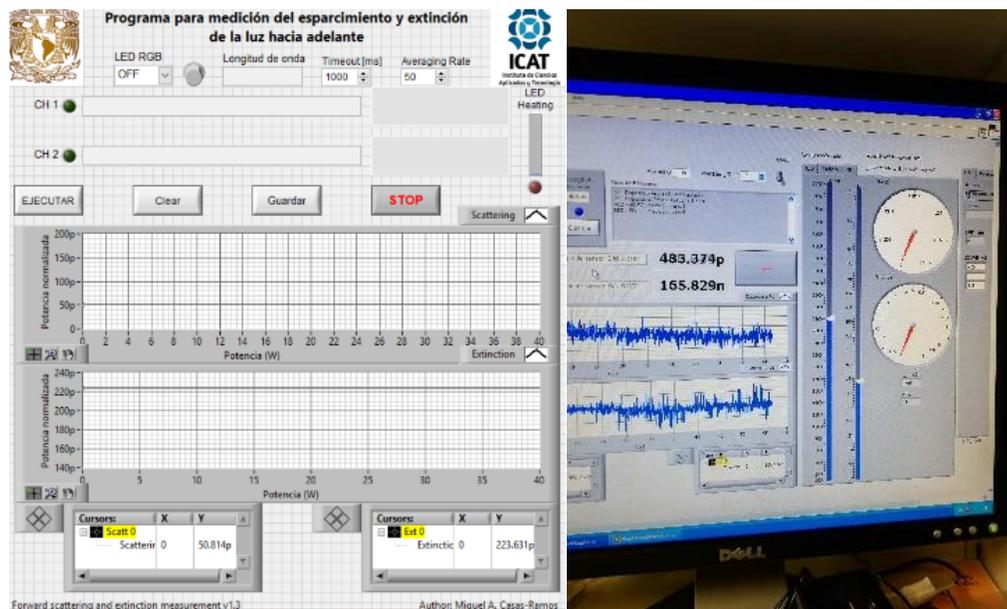


Fig. 3.3. Pantalla frontal del programa de adquisición de datos de las potencias medidas por los fotodiodos PD en la Fig. 3.2. Este programa fue desarrollado en LabVIEW por el autor.

### 3.1.1 Fuente de luz

En lo que respecta al control de la fuente de luz cuasi monocromática y coherente de la Fig. 3.1. La fuente de iluminación con un LED RGB (su ancho de pulso y frecuencia operacional), se utilizó una modulación por señal de reloj a  $1.4\ \text{kHz}$ . Mediante la señal de reloj y el controlador de corriente constante IC PT4115 (PowTech) [60], se pudo modular una intensidad constante para cada uno de los tres LED de color al cambiar el ciclo de trabajo del reloj. En ausencia de una señal de reloj, el circuito pone a cada uno de los LED en  $0\text{V}$  para mantenerlos apagados mientras no se encuentren en uso. La Fig. 3.4 muestra el diagrama de circuito correspondiente

al modulador de intensidad de la fuente de luz, donde VCC corresponde al voltaje de alimentación de circuito, ENA/DIM es el pin lógico del controlador de corriente, LED+ y LED- corresponden a los pines de alimentación del LED. Para el diseño del circuito en la Fig. 3.4, se tomó como referencia la aplicación de circuito en la hoja de datos del PT4115 [60].

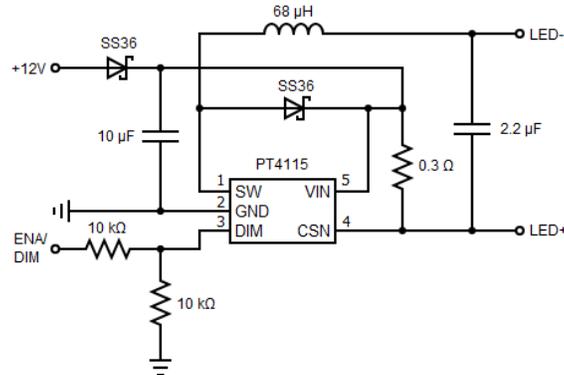


Fig. 3.4. Diagrama de circuito de la fuente de luz del sensor.

Debido a que la salida de luz de los LED cambia con la temperatura, el sistema realiza mediciones como una proporción de la muestra y los canales de referencia. Los fotodiodos tienen una tolerancia de ganancia de hasta  $\pm 11\%$ ; por lo tanto, incluso las variaciones radiométricas incluyen cierta desviación a medida que la salida del LED cambia con el tiempo y la temperatura. Al agregar un bucle de retroalimentación óptica para controlar la amplitud, los LED reducen en gran medida las variaciones de luz con la temperatura e incluso pueden hacer posible realizar mediciones precisas de un solo canal.

## 3.2 Electrónica

Los fotodiodos como elemento sensor son los más utilizados en equipos para la medición de la luz esparcida y absorbida. No obstante, su señal de salida es una corriente proporcional a la luz incidente en su área activa, por tanto, esta se debe convertir a voltaje a un nivel que sea aceptable para el procesamiento digital mediante un microcontrolador. En cualquier sistema de medición de luz es fundamental el acondicionamiento de las señales del fotodiodo. Se opta por utilizar un amplificador de transimpedancia (TIA, por sus siglas en inglés *Transimpedance Amplifier*) para convertir la corriente del fotodiodo en modo activo (Anexo A.1) a voltaje.

Esta sección aborda los principales elementos relacionados al diseño e implementación electrónica de la adquisición y el acondicionamiento de la señal debida a la luz transmitida y esparcida por el esquema óptico (véase Fig. 3.2). Esto incluye un análisis de los principales aspectos a considerar, tales como el ancho de banda, la ganancia de ruido y las principales fuentes de ruidos que afectan su funcionamiento, con el fin de garantizar su correcto

funcionamiento mediante la estabilidad de este sistema y haciendo hincapié en las características de los componentes utilizados.

### 3.2.1 Circuito de medición

El circuito de medición, en la Fig. 3.5, tiene con tres canales de detección, además de contar con una fuente de luz modulada (Fig. 3.4). Este circuito fue diseñado e implementado siguiendo los lineamientos expuestos en el Anexo A, incluyendo el análisis de los principales aspectos a considerar, tales como: ancho de banda, ganancia variable (para aumentar el rango dinámico de la señal de salida) y acondicionamiento de la señal. El circuito mide la señal de luz transmitida y esparcida por la muestra, en el esquema óptico de medición de la Fig. 3.2, a tres diferentes longitudes de onda. El acondicionamiento de la señal del detector de luz consiste en un fotodiodo y un amplificador de transimpedancia de ganancia programable, que convierte la corriente del fotodiodo en un voltaje; esto permite el análisis de diversas muestras, las cuales pueden tener amplias variaciones en el esparcimiento y absorción de la luz. A partir de la Fig. 3.2, se puede apreciar que los detectores colocados están en lados opuestos a la muestra (incluyendo al canal de referencia), donde cada uno ellos generan una fotocorriente proporcional a la cantidad de luz recibida. Mediante un convertidor de analógico-digital (ADC) de 12 bits, que ofrece un rango dinámico adicional, garantiza la suficiente resolución para detectar una amplia gama de voltajes a la salida del circuito.

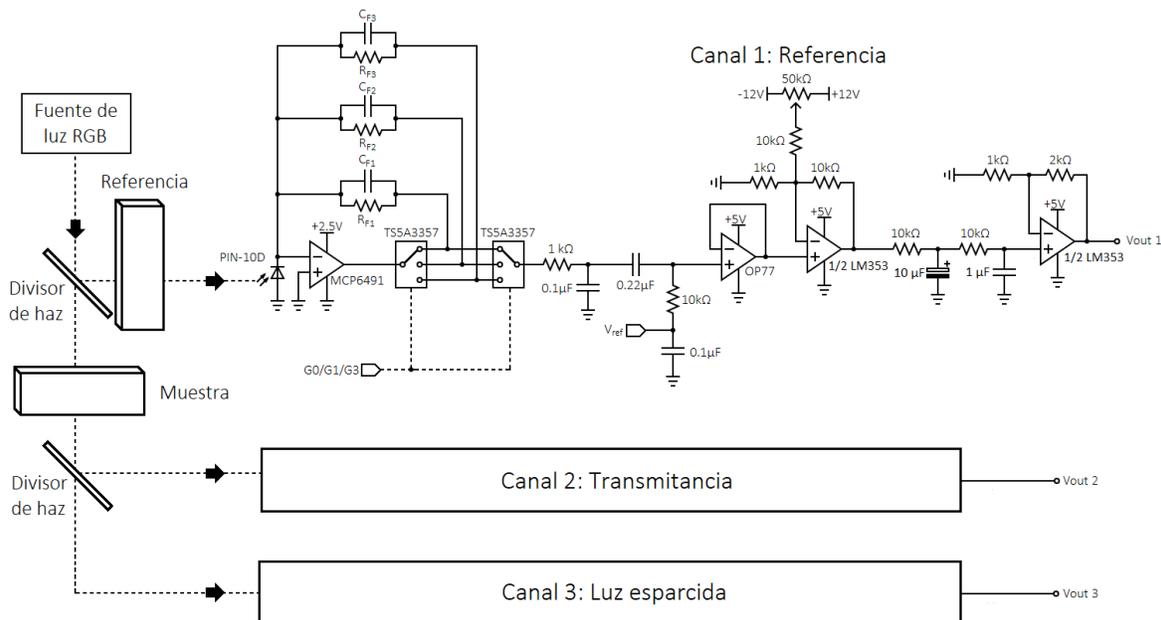


Fig. 3.5. Esquema simplificado del detector de triple canal con amplificadores de transimpedancia de ganancia programables.

Para la Fig. 3.5, los valores resistivos  $R_F$  (resistencia de retroalimentación) y capacitancia  $C_F$  (capacitor de retroalimentación) para cada canal están en las Tabla A.2 y Tabla A.3, respectivamente. Estos valores están optimizados, para que cada ganancia programable, para aumentar el rango dinámico de la señal de salida cada longitud de onda ( $\lambda_0 = 462$  nm,  $\lambda_0 = 518$  nm y  $\lambda_0 = 630$  nm) de la fuente de luz.

La primera etapa de cada canal de detección, en la Fig. 3.5, consiste en un amplificador operacional MCP6491T (Microchip) configurado como un amplificador de transimpedancia. Esta configuración convierte la corriente eléctrica del fotodiodo PIN-10D (OSI Optoelectronics) a voltaje, cuya amplitud será proporcional a la luz transmitida a través de la muestra o la referencia. El MCP6491T tiene la ventaja de tener una baja corriente de polarización a la entrada ( $\pm 1$  pA, normalmente a 25 °C), una ganancia unitaria estable, un ancho de banda de ganancia de 7.5 MHz y un ruido de 14 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ ; estas características lo hacen una excelente opción para un amplificador de transimpedancia. El uso de la fuente modulada en lugar de una fuente constante (CC) elimina los errores de medición debidos a la luz ambiental y el ruido de baja frecuencia, además de proporcionar una mayor precisión.

La siguiente etapa es un filtro acoplado en AC con búfer simple. La frecuencia de corte del filtro se establece en 7.2 Hz; elimina cualquier voltaje de compensación de salida y atenúa la contaminación lumínica de baja frecuencia de las luces incandescentes y fluorescentes, así como la de cualquier otra luz parásita que ingrese a los fotodiodos.

El circuito filtra las señales en frecuencias que no están sincronizadas con el reloj LED o sus armónicos impares, porque el reloj es una onda cuadrada. En el dominio de la frecuencia, el filtro pasa bajas en la salida del TS5A3357 parece un filtro pasa banda alrededor de la frecuencia del reloj LED. Cuanto menor sea el ancho de banda de este filtro, existe un mayor rechazo del ruido fuera de la banda. La frecuencia de corte de este filtro se establece en 16 Hz para hacer un compromiso entre el rechazo de ruido y el tiempo de estabilización. Es importante tener en cuenta que el ancho de banda de este filtro es alrededor del reloj LED. Por ejemplo, si el LED se modula a 5 kHz, la banda de paso de 3 dB del detector es de 4.984 kHz a 5.016 kHz.

### 3.3 Resultados experimentales

Es pertinente en este punto indicar cómo se obtienen las relaciones básicas. Los métodos son relativamente sencillos y lo sorprendente es que los coeficientes son simples. Para suspensiones de partículas uniformes y esféricas (monodispersas) es conveniente expresar en términos de la fracción volumétrica de partículas  $\mathcal{V}_f$ , de esta manera, para suspensiones conteniendo  $N_T$  partículas esféricas de diámetro  $D$  por unidad de volumen, la fracción volumétrica está dada simplemente por,

$$\mathcal{V}_f = \frac{\pi D^3}{6} N_T, \quad (3.2)$$

por lo que el número de partículas por unidad de volumen queda como,

$$N_T = \frac{6}{\pi D^3} \mathcal{V}_f = \frac{\mathcal{V}_f}{\mathcal{V}_p}. \quad (3.3)$$

Entonces la extinción total, para un volumen muestra, está dada por el producto de la extinción debido a un solo tipo de partícula por la colección de esferas homogéneas idénticas (Ec. 3.3), es decir, simplemente el número de partículas esféricas  $N_T$  multiplicado por el coeficiente de extinción  $\alpha_{ext}$  para una sola partícula, siempre que el esparcimiento sea individual [61].

Con el fin de promediar los efectos del esparcimiento de una colección de partículas esféricas y diferenciándose solo en tamaño (siendo todas de composición idéntica), es decir polidispersas, se representan mediante una distribución de tamaños de forma conocida, que frecuentemente se asume que tiene la forma de, log-normal [48],  $f_{LN}(D)$ , con un tamaño en el rango de  $D$  hasta  $D + dD$ ,

$$f_{LN}(D) = \frac{1}{D s \sqrt{2\pi}} \times \exp\left(-\frac{(\ln D - \bar{D})^2}{2 s^2}\right) \quad (3.4)$$

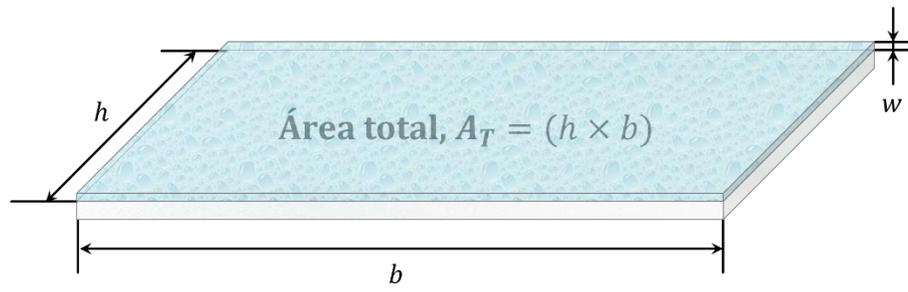
donde  $\bar{D}$  y  $s$  son el diámetro promedio de la partícula (también puede ser el diámetro medio) y la desviación estándar de  $\ln D$ . Donde la cantidad total de partículas en un volumen dado una distribución de tamaños, está dada por

$$N(D) = \int_0^{\infty} N_T \cdot f_{LN}(D) dD. \quad (3.5)$$

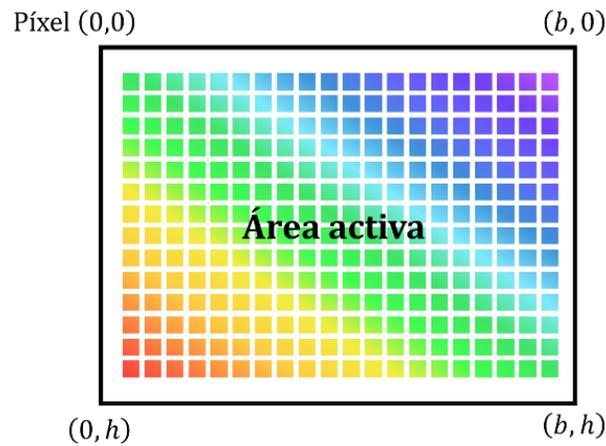
Se asume que un volumen de prueba de  $\mathcal{V} = b \times h \times w$  que contiene  $N$  elementos de partículas de volumen  $\mathcal{V}_p = (\pi \bar{D}^3)/6$  y cuyos centros están distribuidos aleatoriamente dentro del volumen. Además, las dimensiones laterales ( $b \times h$ ) del volumen (que están relacionadas con la superficie plana de la interfaz 1-2 de la Fig. 2.3 y se muestran en la Fig. 3.6a) son muy grandes en comparación con el tamaño de las partículas, entonces se tiene que  $w \rightarrow 0$  y nuestro volumen prueba se convierte en una monocapa aleatoria de partículas. Esto resulta en que el número de partículas presente en una superficie queda como

$$N_A = N_T \cdot \bar{D}, \quad (3.6)$$

donde  $\bar{D}$  es el tamaño promedio de las partículas en la monocapa.



a)



b)

Fig. 3.6. Ilustración de las áreas de las superficies planas que se encontraran en este trabajo: a) portaobjetos; b) matriz de píxeles de la cámara del sensor, donde  $h$  es la altura y  $b$  es el ancho. a) representa la superficie del portaobjetos donde están depositadas las partículas. Las áreas de ambas superficies serán  $A_T$ , independientemente de sus unidades.

A través de la micrografía de una sección aleatoria del volumen  $\mathcal{V}$  donde están contenidas las partículas se pueden describir las muestras, un ejemplo de esto es (aunque ambiguo) estimar la cantidad de partículas presentes  $N$ , el porcentaje de la fracción cubierta por las mismas sobre la superficie  $A_f$ , estimar los tamaños de las partículas  $D$ , diferenciar los tipos de partículas (si es que hay más de un tipo presente en la muestra), por mencionar algunos.

Posiblemente, la fracción de superficie cubierta por las partículas a partir de la imagen capturada, de la superficie del sustrato con la monocapa depositada o la suspensión en una celda contenedora, sea la cantidad más fácil de estimar. Dado un sensor de imagen de una cámara, se tiene que este es una matriz bidimensional de  $b \times h$  elementos, ver Fig. 3.6b, donde  $b$  es el número de píxeles a lo ancho y  $h$  es el número de píxeles a lo largo. Por lo que, independientemente de la imagen, se tiene que el área total  $A_T$  de la superficie corresponde al tamaño de la matriz ( $b \times h$ ), esta información se puede obtener en la hoja de datos proporcionada por el fabricante. Para ejemplificar la fracción de superficie ocupada por

partículas, la Fig. 3.7 presenta una imagen binaria donde la matriz imagen tendrá asignado un valor lógico de 0 (negro) para el fondo y 1 (blanco) para las partículas, donde es fácilmente mostrado que el número de perfiles de partículas por unidad de área  $N_A$  en un plano con orientación  $(x, y)$ . La Fig. 3.7a presenta una partícula circular “Blanca” de  $D = 25$  píxel sobre una superficie de área  $A_T = 1600 \times 1200$  píxel =  $1.92 \times 10^6$  píxel<sup>2</sup>  $\approx 2$  Mpx. La sumatoria total de los píxeles con valor de 1 es igual a  $A_{NP} = (N \cdot A_p)$  de la Ec. 3.6 para obtener la fracción de área  $A_f$  cubierta por las partículas en una superficie.

$$A_f = \frac{A_{NP}}{A_T} = \frac{N \cdot A_p}{A_T} \quad (3.7)$$

donde  $N$  es el número total de partículas,  $A_p$  es el área de la partícula y  $A_T$  es el área total de la superficie. En este caso particular, la partícula en la Fig. 3.7a tiene un área de  $A_p = \pi(D/2)^2 = 490.87$  píxel<sup>2</sup> y el área de la superficie de la imagen es de  $1.92 \times 10^6$  píxel<sup>2</sup>, resultando en una fracción de área  $A_f \times 100 = 0.026\%$ . Similarmente, la Fig. 3.7b con  $N = 12$ , resulta en una fracción de  $A_f \times 100 = 0.307\%$ .

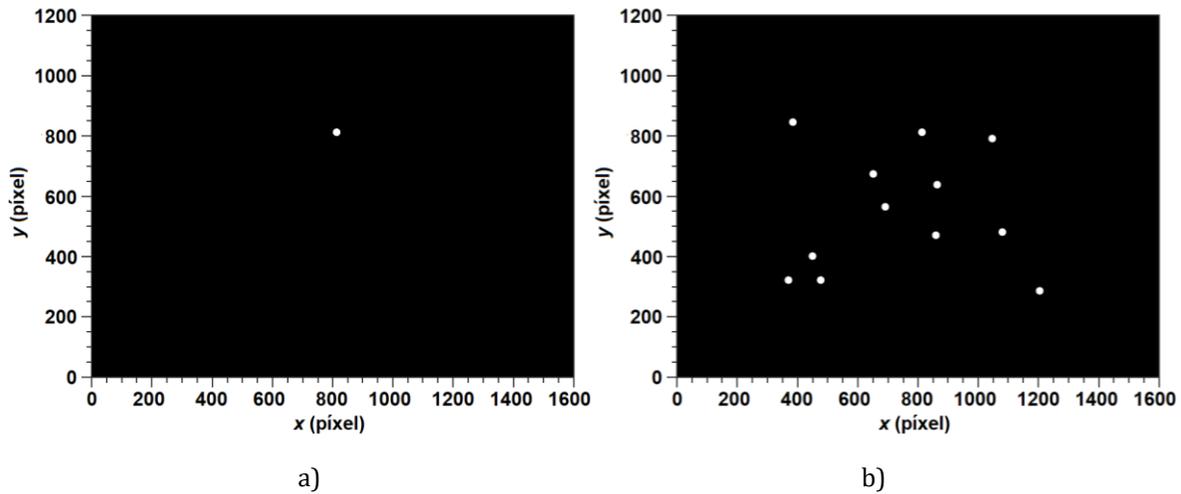


Fig. 3.7. Para una superficie blanca de  $1600 \times 1200$  píxel<sup>2</sup> se presenta a) una partícula de  $D = 25$  píxel de diámetro y b) 12 partículas con  $D = 25$  píxel depositadas sobre la misma área.

El caso expuesto anteriormente, solo considera partículas perfectamente circulares, sin embargo, el problema viene cuando las partículas depositadas sobre el sustrato no tienen una forma geométrica específica o se forman agregados. Por lo tanto, lo único seguro es el área total ocupada por las partículas,  $A_{NP}$ , sobre la sección transversal iluminada  $\sigma_0$  por la fuente de luz colimada, resultando en  $\sigma_0 = A_T$  y será necesario optar por asumir el área efectiva para las partículas. Para ello, se recurre a una variación del arreglo experimental de la Fig. 3.2, donde se obtiene la imagen de la muestra para la luz transmitida y la luz esparcida en la dirección de propagación del haz, para determinar el porcentaje de la fracción cubierta por la muestra.

Se utilizó un algoritmo en MATLAB (ver Anexo B.2) para estimar rápidamente la fracción cubierta a partir de la imagen capturada, entonces para llegar a una imagen binaria a partir una imagen RGB, se abrió la imagen con el comando *imshow*, para después aplicar un filtro (escala de grises) *rgb2gray* y por último se selecciona el rango, en la escala de grises, para los valores que correspondan a la partícula, resultando en que cada elemento de la matriz imagen tendrá asignado un valor lógico de 0 (negro) para el fondo y 1 (blanco) para las partículas, similar a la Fig. 3.7.

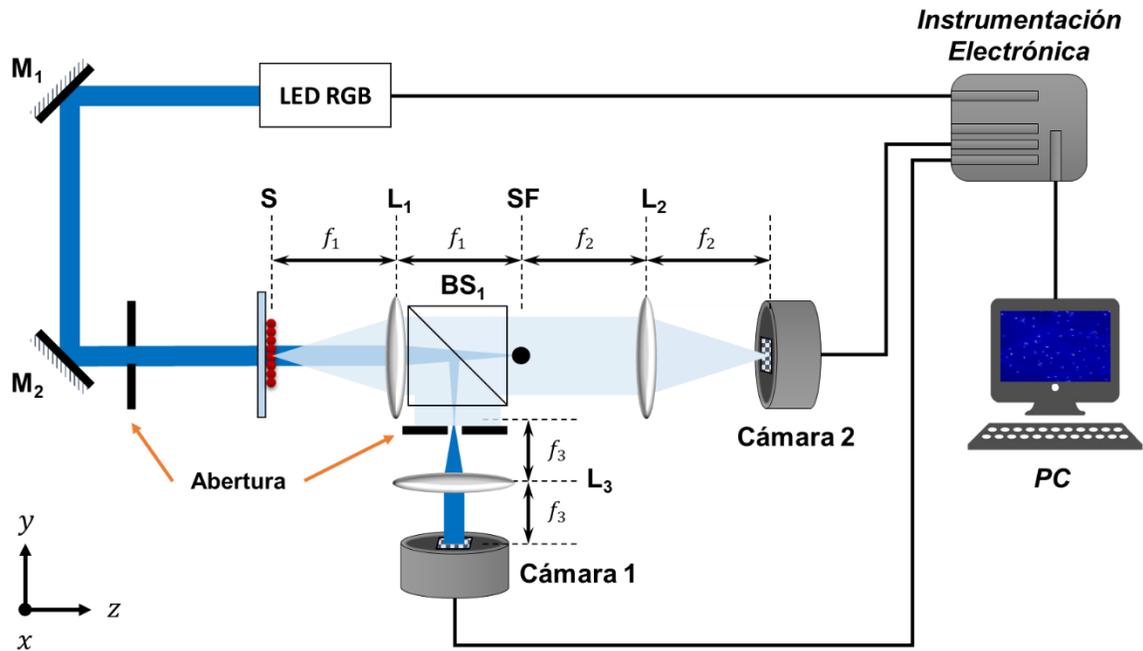


Fig. 3.8. Variación del arreglo experimental de la Fig. 3.2, para visualizar el haz de luz transmitido y la luz esparcida en la dirección de propagación del haz: M, espejo; BS, divisor de haz no polarizado; SF, pantalla circular opaca; L, lente acromática.

Con la cámara 1 se monitorea la imagen del haz de luz del LED incidente sobre la monocapa, es decir, su sección transversal. Esta sección transversal queda grabada en una imagen con la más alta resolución posible, donde los FPS (fotogramas por segundo) no son importantes porque solo se quiere obtener la silueta del haz de luz. Con un programa en MATLAB (ver Anexo B.1) se calcula el centro y circunferencia del círculo que es el haz de luz.

Primero, es necesario hallar la sección transversal  $\sigma_0$  del haz de la fuente de luz. En la Fig. 3.9 se ejemplifica el proceso llevado a cabo, aquí la imagen se transforma a escala de grises. Considerando que solo nos interesa el área circular total del haz de luz, por lo tanto, los píxeles que no sean parte del fondo serán píxeles iguales a 1 y los demás igual a 0, rellenando todo el círculo. Eliminando en el proceso todos los pequeños componentes que no estén conectados al haz. Para detectar los bordes de la imagen binaria, se utiliza la función *edge* que nos regresará

el borde la imagen. Por último, para obtener el círculo que más se ajuste a la imagen original se resuelve por el método de mínimos cuadrados, utilizando la ecuación de la circunferencia.

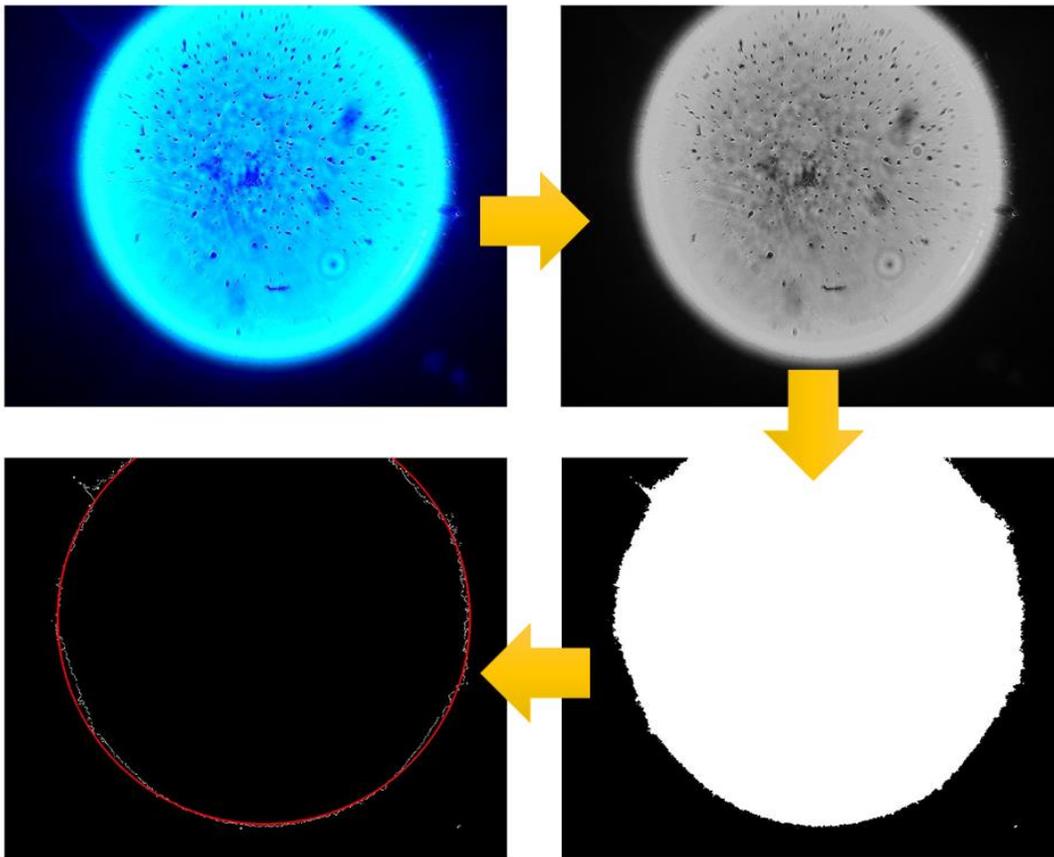


Fig. 3.9. Procesamiento digital de la imagen a color debida a la luz transmitida. La imagen RGB se convierte a escala de grises, después se transforma en una imagen binaria y se detectan los bordes. Finalmente, se traza un círculo con el centro  $(x_0, y_0)$  y radio  $r$  que encaja sobre el contorno de la imagen original.

De la circunferencia hallada, ver Fig. 3.9, se obtiene el área total  $A_T$ , en esta área estará confinada una  $N$  cantidad de partículas independientemente de su forma o tamaño. Para obtener una imagen de alto contraste de la muestra, será necesario filtrar la imagen adquirida por la cámara 1. Un ejemplo de esto se tiene en la Fig. 3.10 [62], donde la Fig. 3.10a, del esquema en la Fig. 3.8, correspondiente a la sección transversal de la muestra (iluminada por el LED RGB). Al quitar la imagen debida a la fuente de luz (Fig. 3.10b) del fondo mediante una pantalla circular opaca, S en el esquema en la Fig. 3.8. La imagen resultante (Fig. 3.10c) corresponde a la luz esparcida debido a todas las partículas presentes. Es evidente que al comparar las imágenes Fig. 3.10a y Fig. 3.10c, la cantidad de partículas observables es mucho mayor en la Fig. 3.10c.

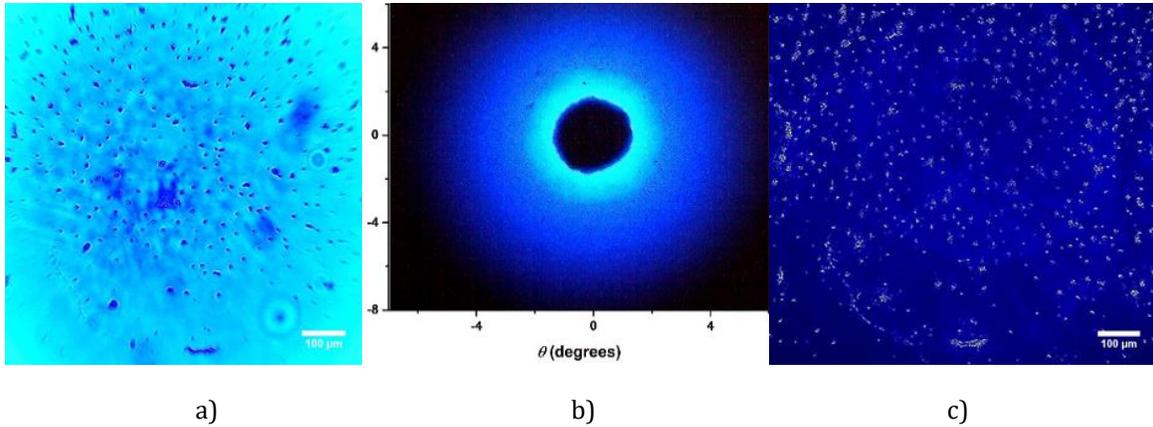


Fig. 3.10. Imágenes de las células de levadura a  $\lambda_0 = 460 \text{ nm}$ : a) Imagen con microscopia de campo claro con cámara 1; b) Patrón de esparcimiento debido a las células; c) Luz esparcida tomada por la cámara 2 [62].

### 3.3.1 Monocapa de partículas de levadura

Se utilizó una suspensión de levadura comercial Saf-Instant<sup>5</sup>, también denominada muestra madre, y para caracterizarla se prepararon tres diferentes monocapas. Para la elaboración de las monocapas, con la ayuda de una micropipeta P200 (Gilson™), se dejó caer una gota de volumen  $\bar{V}_T = 31.5 \pm 0.6 \mu\text{l}$  de la suspensión preparada con levadura sobre la superficie de un sustrato (ver Fig. C.1) hasta que se cubrió más del 80% de la superficie del portaobjetos. Mediante la micro balanza AL-64 (Acculab) se obtiene que la masa total es  $\bar{m}_T = 24.8 \pm 0.3 \text{ mg}$  (antes de que el líquido se evapore y sea drenado en la parte inferior del portaobjetos, Fig. C.1). Después de haberse evaporado el líquido, solamente queda la monocapa de levadura depositada sobre la superficie del portaobjetos (ver Fig. C.1) de masa  $\bar{m}_m = 0.1 \pm 0.1 \text{ mg}$  y resultando en una fracción de masa de  $m_f = 0.004$  sobre la superficie del sustrato plano transparente.

Mediante el arreglo experimental de la Fig. 3.8, cada monocapa fue iluminada a tres diferentes longitudes de onda ( $\lambda_0 = 462 \text{ nm}$ ,  $\lambda_0 = 518 \text{ nm}$  y  $\lambda_0 = 630 \text{ nm}$ ) y se monitorea la dependencia de la extinción y el esparcimiento de la luz, con las concentraciones, tamaño promedio y la distribución de tamaños. Se presenta en la Fig. 3.11, micrografías de la sección transversal de una de las monocapas iluminadas (colocadas en plano objeto, S, de la Fig. 3.8). Las Fig. 3.11a-c son micrografías de campo claro, luz transmitida, capturadas por la cámara 1 en el arreglo experimental, Fig. 3.8. Las Fig. 3.11d-f son micrografías de filtrado de fase, luz esparcida a lo largo del eje z y en ángulos cercanos a la dirección de propagación, capturadas por la cámara 2 en el arreglo experimental, Fig. 3.8. A pesar de la forma elipsoidal de la levadura, diversos

<sup>5</sup> Consultar el Anexo C.1.1 y la Tabla C.1 para más detalles sobre la elaboración de la suspensión

experimentos reportan en la literatura [1,32,63] que, en el límite del esparcimiento hacia adelante a ángulos pequeños, los elipsoides, y en particular la levadura, esparcen como si se tratase de esferas con un área superficial efectiva equivalente.

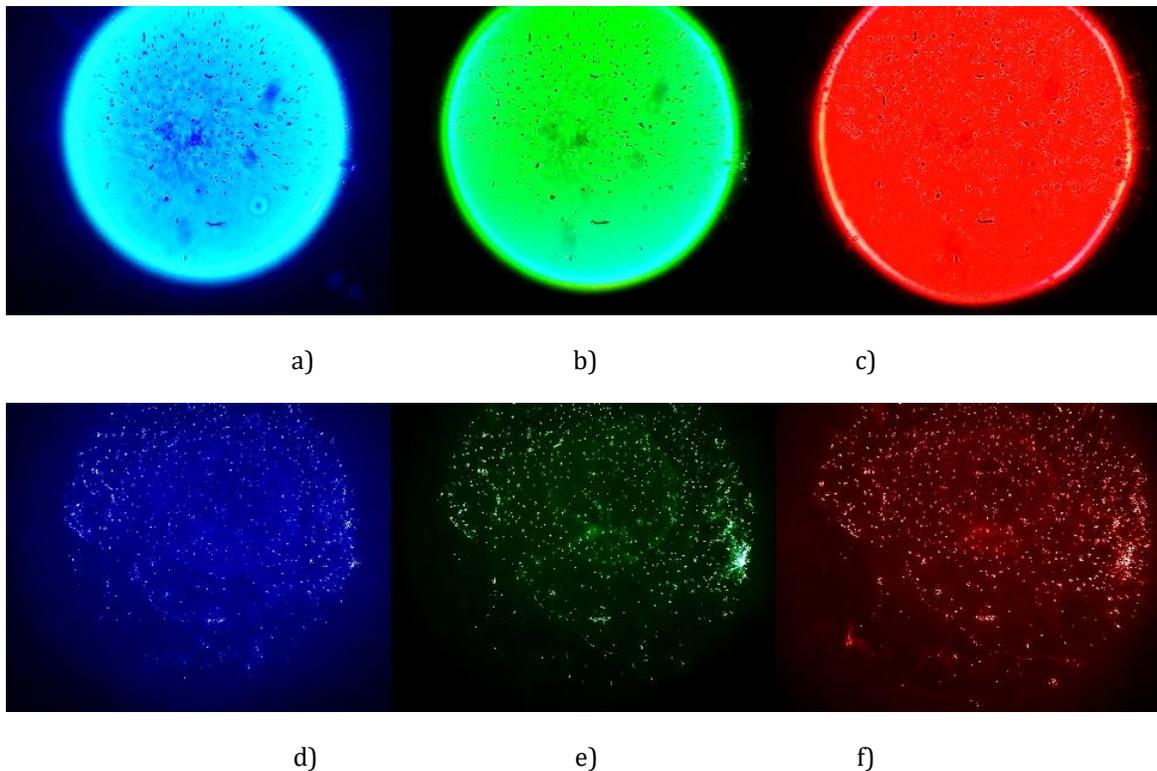


Fig. 3.11. Sección transversal de la muestra (en la posición S de la Fig. 3.8), donde las células de levadura son iluminadas a tres diferentes longitudes de onda:  $\lambda_0 = 462 \text{ nm}$  (a, d),  $\lambda_0 = 518 \text{ nm}$  (b, e) y  $\lambda_0 = 630 \text{ nm}$  (c, f). (a-c) Luz transmitida (d-f) Esparcimiento de la luz en la dirección de propagación del haz incidente.

Las micrografías de campo claro de la levadura (Fig. 3.11a-c), tienen un bajo contraste (generado por la baja atenuación de la luz transmitida a través del espécimen cuasi translúcido) y por tanto una reducción significativa en la cantidad de partículas observables; a diferencia de las micrografías de filtrado de fase (Fig. 3.11d-f). Se concluye que la única información relevante aportada por la cámara 1 (de la Fig. 3.8) es la silueta de  $\sigma_0$  (sección transversal de iluminación) para cada longitud de onda. Esta sección transversal es constante e independiente de cualquier muestra que sea colocada en el plano objeto, S, del arreglo experimental en la Fig. 3.8. Por tanto, esta configuración óptica es modificada y combinada con el arreglo de la Fig. 3.2 a fin de obtener la mayor cantidad información sobre la muestra. Esta variación se presentada en la Fig. 3.12, donde se reemplaza la cámara 1 por un fotodetector, PD<sub>2</sub>, y se agrega un fotodetector, PD<sub>3</sub>, para medir la potencia esparcida en la dirección de propagación del haz de luz colimado.

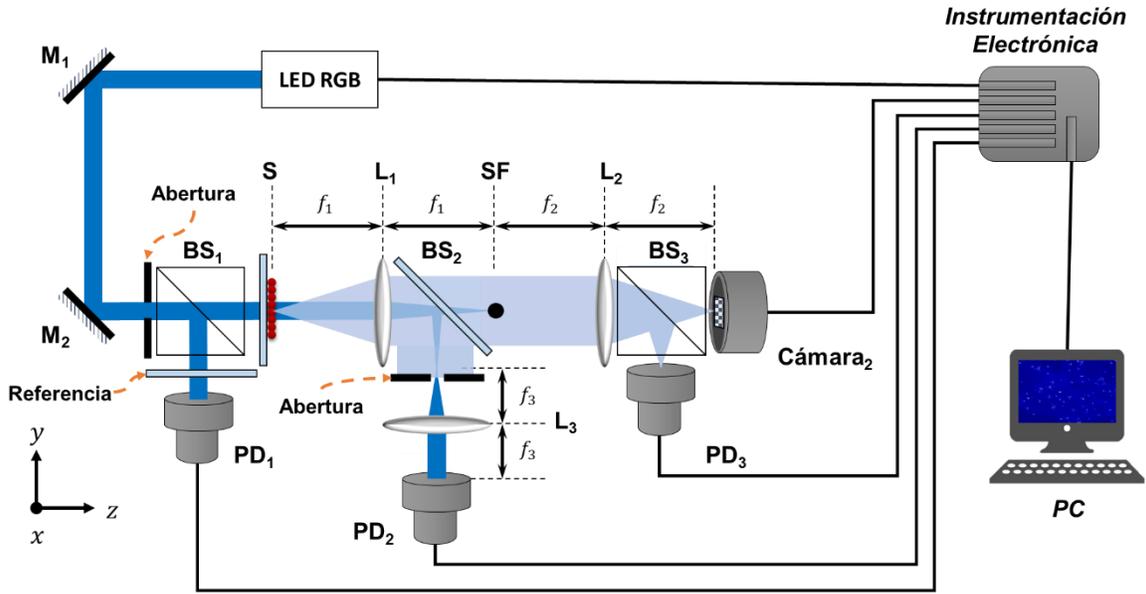


Fig. 3.12. Configuración óptica para la medición simultánea de la extinción ( $PD_2$ ) y esparcimiento de la luz ( $PD_3$ ), al igual que el monitoreo de la concentración (cámara 2) dada una sección transversal,  $\sigma_0$ , de iluminación debido al haz de luz.

Para calcular el área de  $\sigma_0$ , se utiliza el procesamiento digital de la imagen descrito con anterioridad (ejemplificado en la Fig. 3.9 y programado en el Anexo B.2), donde se asume que la sección transversal tiene una forma perfectamente circular. En este proceso se convierte la imagen a escala de grises, después se transforma a escala binaria y se detectan los bordes de la región con el comando *edge* de MATLAB. Finalmente, se traza un círculo en las coordenadas  $(x_0, y_0)$  y de radio  $r_0$  (tamaño más probable sobre la región del plano delimitada por la circunferencia) sobre las micrografías de la Fig. 3.11d-f. Estos valores calculados para  $\sigma_0$  son presentados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Parámetros calculados para la sección transversal de iluminación  $\sigma_0$ .

$\lambda_0$	Radio del haz de luz colimado, $r_0$		Área calculada, $\sigma_0$	
	(píxel)	( $\times 10^{-6}$ m)	(píxel <sup>2</sup> )	( $\times 10^{-9}$ m <sup>2</sup> )
462 nm	514 $\pm$ 3.1	624.5 $\pm$ 3.9	829996.2 $\pm$ 30.2	1225.22 $\pm$ 0.05
518 nm	544 $\pm$ 0.9	680.0 $\pm$ 1.1	929710.4 $\pm$ 2.5	1452.67 $\pm$ 0.01
630 nm	571 $\pm$ 2.4	713.8 $\pm$ 3.0	1024288 $\pm$ 28.3	1600.67 $\pm$ 0.03

Para estimar la cantidad de partículas por unidad de área,  $N_A$ , primero se debe transformar las micrografías de la luz esparcida por las muestras en imágenes blanco y negro, donde las partículas están en color blanco y el fondo es color negro. A través de MATLAB, mediante el comando *rgb2gray* y después se establece el umbral de píxeles para el cual las partículas son

separadas del fondo. Este proceso se expone en la Fig. 3.13 [62], utilizando el programa del Anexo B.2.

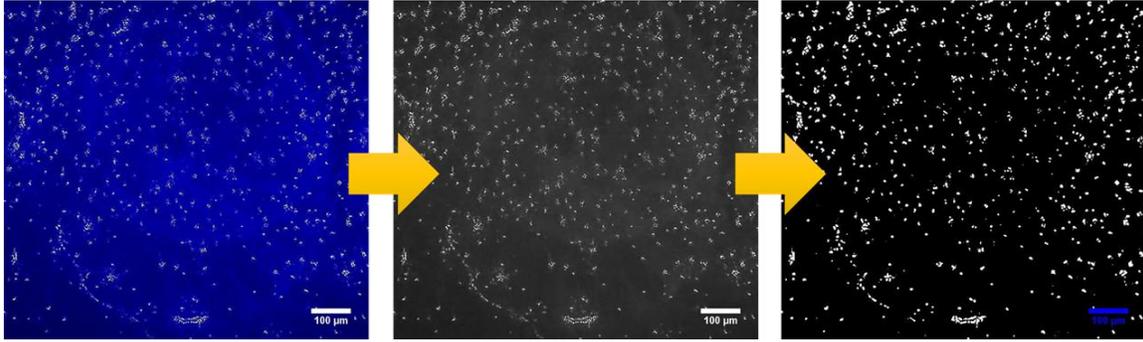


Fig. 3.13. Para contar la cantidad total de células por área iluminada, la imagen de la luz esparcida por la muestra es convertida a escala de grises y después a binario. Donde las células son presentadas como manchas blancas [62].

Sin embargo, experimentalmente, a veces es mejor primero trabajar con la fracción de área cubierta por las células en una superficie,  $A_f$ , en lugar de la densidad en número de células sobre una superficie  $N_A$  (número total de partículas sobre un área dada). A grandes rasgos, estas dos cantidades se relacionan<sup>6</sup> como  $N_A = A_f/A_p$ , donde  $A_p$  es área de la sección transversal de la partícula, o el área de la sombra geometría proyectada debido a la partícula iluminada por un haz de luz con incidencia normal. Trabajar con  $A_f$  evita tener que resolver o distinguir entre aglomerados y elementos individuales de gran tamaño.

Para estimar con rápidos  $A_f$ , es necesario haber convertido la micrografía de la sección transversal de esparcimiento (capturada por la cámara 2 en Fig. 3.12) a una imagen binaria, tal como se ejemplifica en la Fig. 3.14 (donde los píxeles blancos sobre un fondo negro representan las células y la sección transversal del haz de luz incidente,  $\sigma_0$ , está marcado en rojo). El término  $N \cdot A_p$ , en la Ec. 3.7, representa el área total cubierta por una monodispersión de células esparcidoras presentes en la micrografía de la sección transversal de esparcimiento, y se renombra como  $A_{NP} = N \cdot A_p$ . En el caso de una polidispersión, como la Fig. 3.14, el área total cubierta por las células será  $A_{NP} = N \cdot A_p \cdot \exp(2 \cdot \ln^2(s))$ , donde  $s$  es la desviación estándar (ancho de la distribución, generalmente log-normal). Para efectos prácticos, el valor de  $A_{NP}$  será igual a la sumatoria total de los píxeles blancos, en la imagen binaria de la sección transversal, independientemente de su forma o tamaño (ver Anexo B.2). El área total de la superficie en la Ec. 3.7,  $A_T$ , es equivalente a la sección transversal del haz de luz,  $\sigma_0$ , y su valor en píxeles se obtiene mediante el proceso expuesto en la Fig. 3.9, por lo tanto  $A_T = \sigma_0$ .

<sup>6</sup> ver Ec. 2.18 y 2.20, monodispersión y polidispersión, respectivamente.

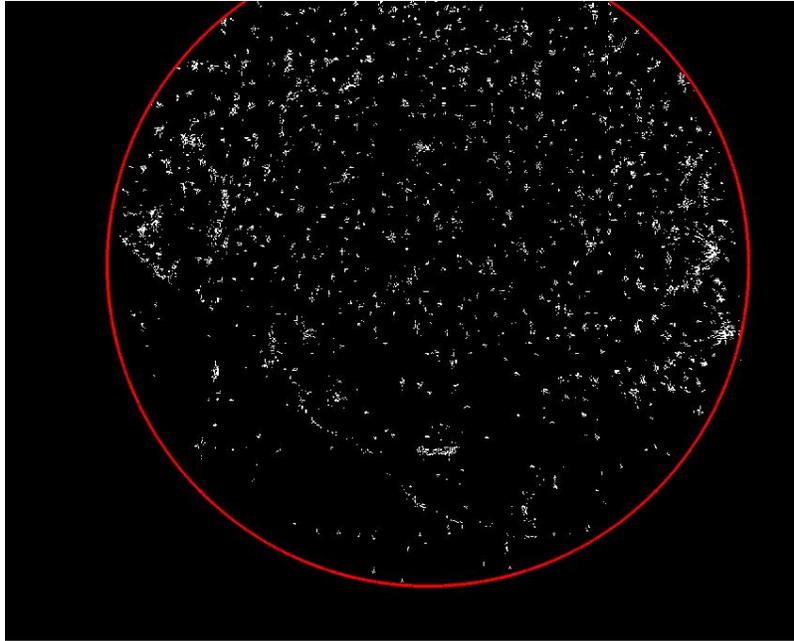


Fig. 3.14. Micrografía binaria de la sección transversal de esparcimiento, debido a la monocapa de levadura de la Fig. 3.11e, donde las células son presentadas como píxeles blancos sobre un fondo negro. En el esquema de la Fig. 3.8. esta imagen de la luz esparcida corresponde a la muestra en la posición S y es capturada por la cámara 2. Sobre la micrografía está el contorno del haz de luz colimado de la Fig. 3.11b, representado en rojo, y que se calculó con el método expuesto en la Fig. 3.9

Las distribuciones en los tamaños de las partículas (PSD, por sus siglas en inglés *Particle Size Distribution*) asumen que estas son esféricas. La forma de las partículas afecta el fenómeno físico utilizado para la medición de las partículas, por lo que los resultados del tamaño obtenidos mediante distintas técnicas de medición son influenciados por la forma de la partícula. La imagenología ofrece la habilidad de medir la PSD y proporcionar información sobre la forma de la partícula. Utilizando cámaras con una alta tasa de cuadros por segundo (FPS, por sus siglas en inglés *Frames Per Second*) y gran resolución en un sistema dinámico nos da la posibilidad de una adquisición en tiempo real. Sin embargo, un número significativo de partículas debe ser medido para generar un resultado robusto, el cual puede ser demandante de tiempo. El conteo de las partículas en las imágenes del esparcimiento de la luz, se utiliza el programa ImageJ, donde se utilizan imágenes binarias (los píxeles tienen dos valores posibles, 0 o 255); al modificar la imagen binaria para mejorar la separación de las partículas se realiza el recuento con base en el tamaño y la circularidad. Cuando existe una gran cantidad de elementos contables en una imagen, es útil este método, en caso contrario se puede contar “a mano” utilizando la opción *Cell Counter* en ImageJ.

La Fig. 3.15 presenta  $N$  respecto a  $A_f$  para las micrografías de las secciones transversales de levadura (Fig. 3.11d-f) dentro de un área dada por  $\sigma_0$ , e iluminada tres longitudes de onda diferentes (Fig. 3.11a-c). Cada valor graficado en la Fig. 3.15 corresponde al

Valor promedio  $\pm$  Desviación Estándar ( $s$ ) de cada una de las tres monocapas de levadura Saf-Instant. El rango de valores para cada una de las monocapas consiste de cuatro micrográficas aleatorias y representativas de la concentración celular (de la muestra en la suspensión de  $\bar{V}_T = 31.5 \pm 0.6 \mu\text{l}$  que fue depositada) sobre el sustrato; tratándose de que cada medición sea lo más independiente posible. Empleando ImageJ, se calcula la cantidad aproximada de partículas,  $N$ , presentes en cada micrografía binaria (debido a las muestras de levadura Fig. 3.11d-f). Mientras que  $A_f = A_{NP}/\sigma_0$ , fracción de superficie cubierta por la levadura dentro de un área  $\sigma_0$ , se calcula con el método anteriormente descrito y ejemplificado en la Fig. 3.14.

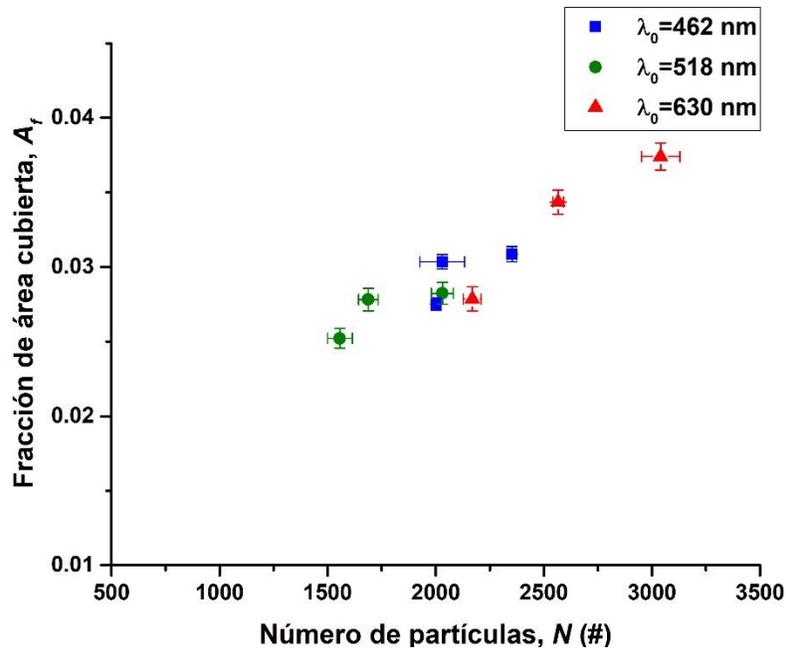


Fig. 3.15. Cantidad promedio de partículas,  $\bar{N}$ , dentro de  $\sigma_0$  (sección transversal de iluminación) versus la fracción de superficie cubierta por las partículas,  $A_f$ , en  $\sigma_0$ .

Cada micrografía de la sección transversal de esparcimiento (filtrado de fase) fue analizada y procesada digitalmente varias veces con el programa ImageJ. Esto se debe a que puede haber fallos en el recuento final, pero se estos pueden ser reducidos al ajustar las condiciones de la imagen. Esto incluyó el cambio del valor del umbral sobre la imagen en escala de grises, a fin de distinguir dentro de  $\sigma_0$  las partículas respecto del fondo, el proceso de segmentación de los aglomerados de partículas, así como la variación de los valores de entrada asignados en la función *Analyze Particles* tales como: la circularidad de la partícula y el rango de áreas más probables (en unidades cuadradas, píxeles<sup>2</sup> o  $\mu\text{m}^2$ ) que podría tener una partícula (para el tipo de muestra dado). A partir del rango de valores obtenido para cada uno de los cuatro puntos representativos, de cada una de las tres monocapas (colocadas en S de Fig. 3.12), en el eje x de la Fig. 3.15, se grafica la cantidad promedio calculada de partículas dentro de  $\sigma_0$ ,  $\bar{N} \pm s$ , donde  $s$  es la desviación estándar. Para  $\bar{A}_f \pm s$  en el eje y de la Fig. 3.15, solo fue necesario modificar los valores umbrales ("bw=gray\_image>12;" y "bwS=gray\_imageS>44;", del programa del

Anexo B.2) de cada micrografía en escala de grises (de campo claro y filtrado de fase), a fin de distinguir en la sección transversal las partículas respecto del fondo.

En la Fig. 3.16a se presentan las distribuciones de tamaños calculadas, de la muestra de Saf-Instant, a partir del análisis estadístico de las partículas (cantidad y tamaños para un intervalo  $1 \leq D \leq 21 \mu\text{m}$ ) realizado en ImageJ para las monocapas de levadura. Este análisis se realizó para cada longitud de onda de iluminación ( $\lambda_0 = 462 \text{ nm}$ ,  $\lambda_0 = 518 \text{ nm}$  y  $\lambda_0 = 630 \text{ nm}$ ). Las distribuciones calculadas (usando una distribución del tipo log-normal) concuerdan, con las distribuciones anteriormente reportadas [65] para las células de levadura. Ya que la densidad de partículas dentro del área de iluminación, denotada como  $N_A$  (partículas/ $\text{m}^2$ ), se asume que sea constante a lo largo del tiempo dentro del área iluminada. La Fig. 3.16b presenta la atenuación del haz de luz incidente, también llamada extinción de la luz, después de atravesar una sección de la monocapa con  $N_A$  partículas soportadas por el sustrato plano.

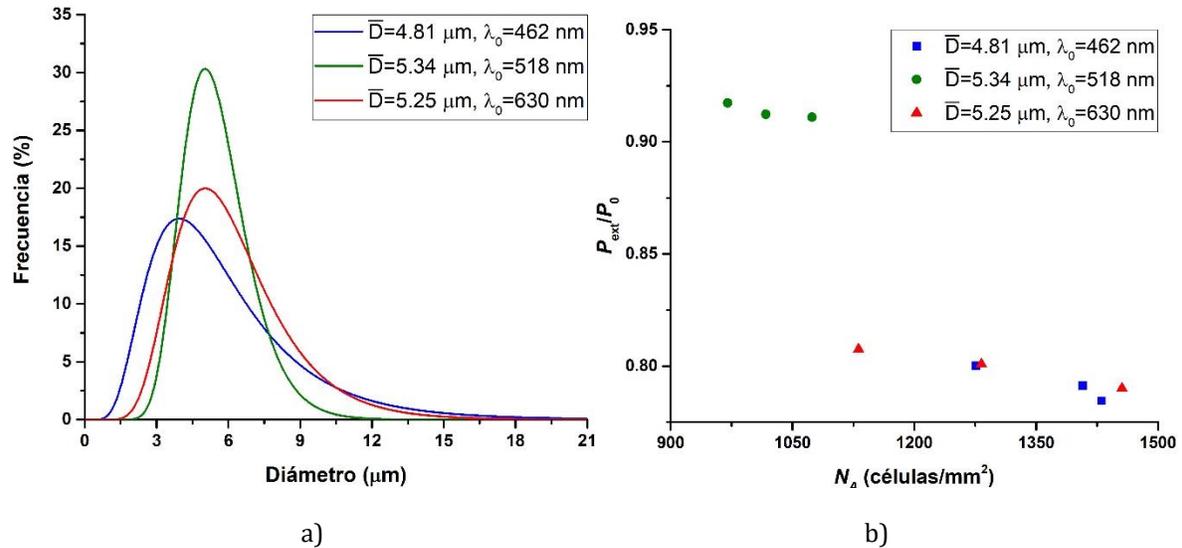


Fig. 3.16. Células de levadura iluminadas a tres longitudes de onda diferentes. a) Distribución log-normal de tamaños para células de levadura en un intervalo de tamaños de 1-21  $\mu\text{m}$ . b) Extinción normalizada para diferentes concentraciones de levadura.

La cantidad de células por unidad de área,  $N_A$ , se puede determinar a partir de la Ec. 2.20, la cual queda como,

$$N_A = \frac{4A_f}{\pi\bar{D}^2} e^{(-2\ln^2 s)},$$

donde  $A_f$  es la fracción cubierta por la levadura sobre la superficie del sustrato plano,  $\bar{D}$  es el diámetro promedio,  $s$  es el ancho de la distribución de tamaños. La Tabla 3.2 muestra los valores calculados para estimar  $N_A$ , donde  $\bar{D}$  y  $s$  se obtienen a partir de la distribución  $f_{LN}(D)$  de la Fig. 3.16a; mientras que los datos de  $A_f$  son obtenidos de la Fig. 3.15.

Tabla 3.2. Parámetros para estimar la cantidad de partículas por unidad de área,  $N_A$ .

$\lambda_0$	$\bar{D}$ ( $\mu\text{m}$ )	$s$	$A_f$	$N_A$ (células/ $\text{mm}^2$ )
462 nm	4.81	1.34	$0.0275 \pm 0.0004$	1275.6
			$0.0304 \pm 0.0005$	1407.3
			$0.0308 \pm 0.0005$	1430.5
518 nm	5.34	1.16	$0.0278 \pm 0.0008$	970.1
			$0.0282 \pm 0.0007$	1017.1
			$0.0252 \pm 0.0006$	1074.0
630 nm	5.25	1.24	$0.0278 \pm 0.0008$	1131.5
			$0.0344 \pm 0.0008$	1282.5
			$0.0374 \pm 0.0009$	1455.7

Para la levadura, conocer los tamaños de la levadura puede ser un buen indicador de la actividad reproductiva y de la salud en general de las células. Estos dos parámetros pueden ser de interés comercial o casero para los usuarios del cultivo de levadura [54,55,64].

### 3.3.2 Solución diluida: leucocitos

Se prepararon muestras de suspensiones de leucocitos a partir de 3 voluntarios (cortesía de la Dra. Argelia Pérez Pacheco, Hospital General de México). Estas muestras corresponden a leucocitos sanos que están suspendidas en una solución de fosfato salino o buffer fosfato salino (conocido también como PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*). Los técnicos de laboratorio (Hospital General de México) determinaron la densidad numérica de partículas de leucocitos,  $N_T$ , mediante el método de la cámara de Neubauer y los resultados son mostrados en la Tabla 3.3. Para analizar estas muestras, se extrajo un volumen de  $V_T = 1 \mu\text{l}$  de cada una de las suspensiones y se depositaron en cubetas de vidrio de espesor de  $w \approx 58 \mu\text{m}$ .

Tabla 3.3. Valores de las concentraciones de las tres muestras de leucocitos entregadas. Las muestras fueron preparadas por el Hospital General de México.

Muestra	Concentración celular, $N_T$ (células/ $\mu\text{l}$ )
#1	$4.6 \times 10^3$
#2	$6.3 \times 10^3$
#3	$6.7 \times 10^3$

La concentración celular, el tamaño promedio efectivo de las células y la distribución de tamaños son factores importantes en la salud humana. Esto se debe a que, enfermedades como la malaria, anemia, entre muchas otras, resultan en una distribución anormal de tamaños de células [66, 67]. Por tanto, una metodología que permita estimar estos parámetros rápidamente podría tener un impacto en las áreas de la salud, especialmente en áreas donde el acceso a la citometría de flujo (el estándar global para el conteo y medición de tamaños de las partículas) es limitado.

Cada una de las muestras de leucocitos sanos, enlistadas en la Tabla 3.3, en las cubetas se colocaron en la sección S del arreglo experimental de la Fig. 3.12. Las gráficas de la Fig. 3.17, muestran la dependencia lineal de fracción de la luz extinguida y esparcida en la dirección de incidencia del haz de luz con la concentración de leucocitos, dentro del intervalo de medición mostrado, la linealidad entre la extinción y la concentración tiene un valor de 96.97%.

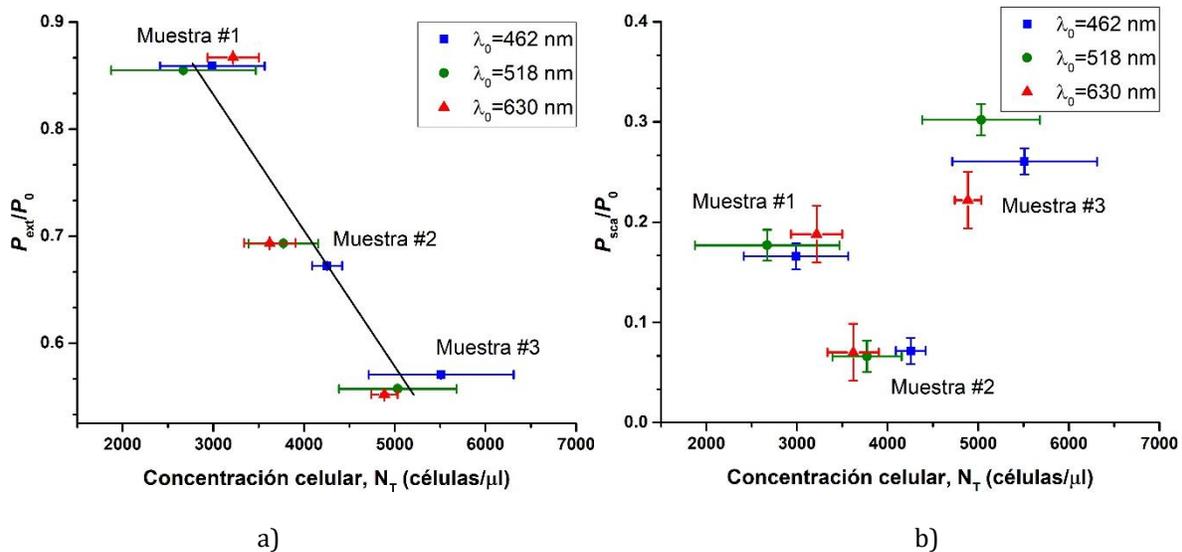


Fig. 3.17. Dependencia de la luz con la concentración a tres longitudes de onda diferentes: (a) fracción de la extinguida; (b) fracción de la total intensidad esparcida en la dirección de incidencia del haz de luz, y que se obtiene al bloquear el orden central del patrón de esparcimiento (en punto focal).

Para poder procesar y analizar digitalmente las muestras de leucocitos en ImageJ, que se realizaron videos de la sección transversal de la cubeta (colocada en S de la Fig. 3.12 y a una distancia  $f_1$  de  $L_1$ ). Cada video tuvo una duración  $\leq 4$  s, una tasa de cuadros por segundo de  $5 \pm 1$ , una resolución de  $1600 \times 1200$  píxeles y fue iluminado a tres longitudes de onda diferentes,  $\lambda_0$ . El procesamiento y análisis digital de cada fotograma del video fue realizado con ImageJ, donde se ajustaron las condiciones de la imagen, al igual que los valores de entrada en la función *Analyze Particles* (la circularidad de la partícula y el rango de áreas más probables en  $\mu\text{m}^2$ ). Con base en el rango de valores obtenidos para cada muestra a una  $\lambda_0$  diferente, en el eje  $x$  de la Fig. 3.17, se grafica la cantidad promedio calculada de partículas dentro del volumen iluminado

$V_T = \sigma_0 \times 58 \mu\text{m}$ ,  $N_T \pm s$ , donde  $s$  es la desviación estándar. El eje  $y$  corresponde la potencia incidente,  $P_0 \pm s$ , extinguida,  $P_{ext} \pm s$ , y esparcida,  $P_{sca} \pm s$ , registrados en la misma ventana de tiempo de los videos para cada muestra a una  $\lambda_0$  diferente.

Cada una de las muestras de leucocitos fue iluminada a tres longitudes de onda diferentes, midiéndose la extinción y el esparcimiento de la luz en la dirección de propagación. La Fig. 3.17a se aprecia el comportamiento en la cantidad de luz transmitida a través de la muestra conforme a la concentración celular, es decir, entre menor sea la cantidad de células presentes en la celda de vidrio (Muestra 1) la cantidad de luz transmitida será mayor y viceversa, cuando la cantidad de células en la celda de vidrio es grande (Muestra 3).

En la Fig. 3.17b, el nivel de esparcimiento para la muestra #2, debido a la cantidad de partículas por muestra (Tabla 3.3), no continua la linealidad esperada. Esto, se debe a que las mediciones de la luz esparcida se realizaron 19 horas después del tiempo límite de utilidad de las muestras. A causa de esto, la muestra pasó por un proceso de lisis, esto se traduce en una reducción en el tamaño de los leucocitos y una abrupta caída en la cantidad de luz esparcida debido a las partículas. Este proceso no se llega a distinguir cuando solamente se mide la extinción de la luz.

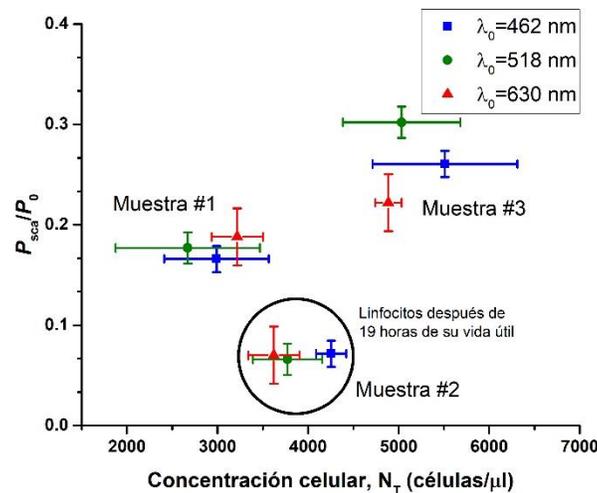


Fig. 3.18. Fracción de la luz esparcida debido a los leucocitos sanos (concentraciones de  $4.6 \times 10^3$  y  $6.7 \times 10^3$ ) y los muertos (concentración de  $6.3 \times 10^3$ ) al ser iluminados individualmente por una fuente de luz LED RGB.

La pendiente en la gráfica (Fig. 3.17a), extinción de la luz respecto a la concentración particulada está determinada por la longitud de camino óptico y de la extinción de la luz. Mientras que la Fig. 3.17b muestra la dependencia del esparcimiento con la concentración y demuestra la eficacia de colocar una pantalla circular opaca en la parte SF del esquema de la Fig. 3.2, que bloquea el foco de luz, formado por la fuente de iluminación y que no la esparce. Esto permite discriminar la extinción del esparcimiento debido a la concentración de las partículas en la solución de PBS. Esto puede servir como un indicador para realizar un monitoreo del ciclo de vida de los leucocitos en vivo. Los trabajos de Valenzeno y Trank [6]

demuestran la factibilidad del monitoreo del proceso de lisis, al graficar la caída de luz esparcida conforme se rompen los glóbulos rojos.

Para el análisis teórico, se considera que los leucocitos tienen una forma esférica [7], un índice de refracción  $n_p = n_{leucocito} \cong 1.3562$  [72-74] (cercano al del agua), un tamaño promedio efectivo  $\bar{D}$  (ver Tabla 3.4) e inmersa en un medio líquido, PBS. Para todas las longitudes de onda, el índice de refracción del PBS es, aproximadamente, 0.002 más alto que el índice de refracción del agua, es decir,  $n_{PBS} \approx n_{agua} + 0.002$  [75]. Estos parámetros describen el patrón de la intensidad esparcida por las células al atravesar un medio y de espesor  $w \approx 58 \mu\text{m}$  (espesor de la cubeta de las muestras) donde las partículas están suspendidas, para los casos de monodispersión y polidispersión. Asimismo, la Tabla 3.3 proporciona la cantidad de partículas por unidad de volumen,  $N_T$ . Por lo que, conociendo la distribución de tamaños,  $f_{LN}(D)$ , y la intensidad medida de la luz extinguida  $S(0^\circ)$ , se determina el tamaño promedio de las partículas (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Valores de los tamaños promedios de las tres muestras de leucocitos entregadas por el Hospital General de México.

Muestra	$\bar{D}$ ( $\mu\text{m}$ )
#1	$7.4 \pm 0.4$
#2	$5.7 \pm 0.8$
#3	$6.7 \pm 0.2$

Por propósitos de simplificación, se elige una distribución log-normal. Por tanto, utilizando los diámetros promedios obtenidos de la Tabla 3.3 se halla que la distribución de tamaños (Fig. 3.19) tiene sus diámetros en el rango de 4-8  $\mu\text{m}$ , donde los intervalos de tamaños estimados concuerdan con los reportados en la literatura [16,17,76,77].

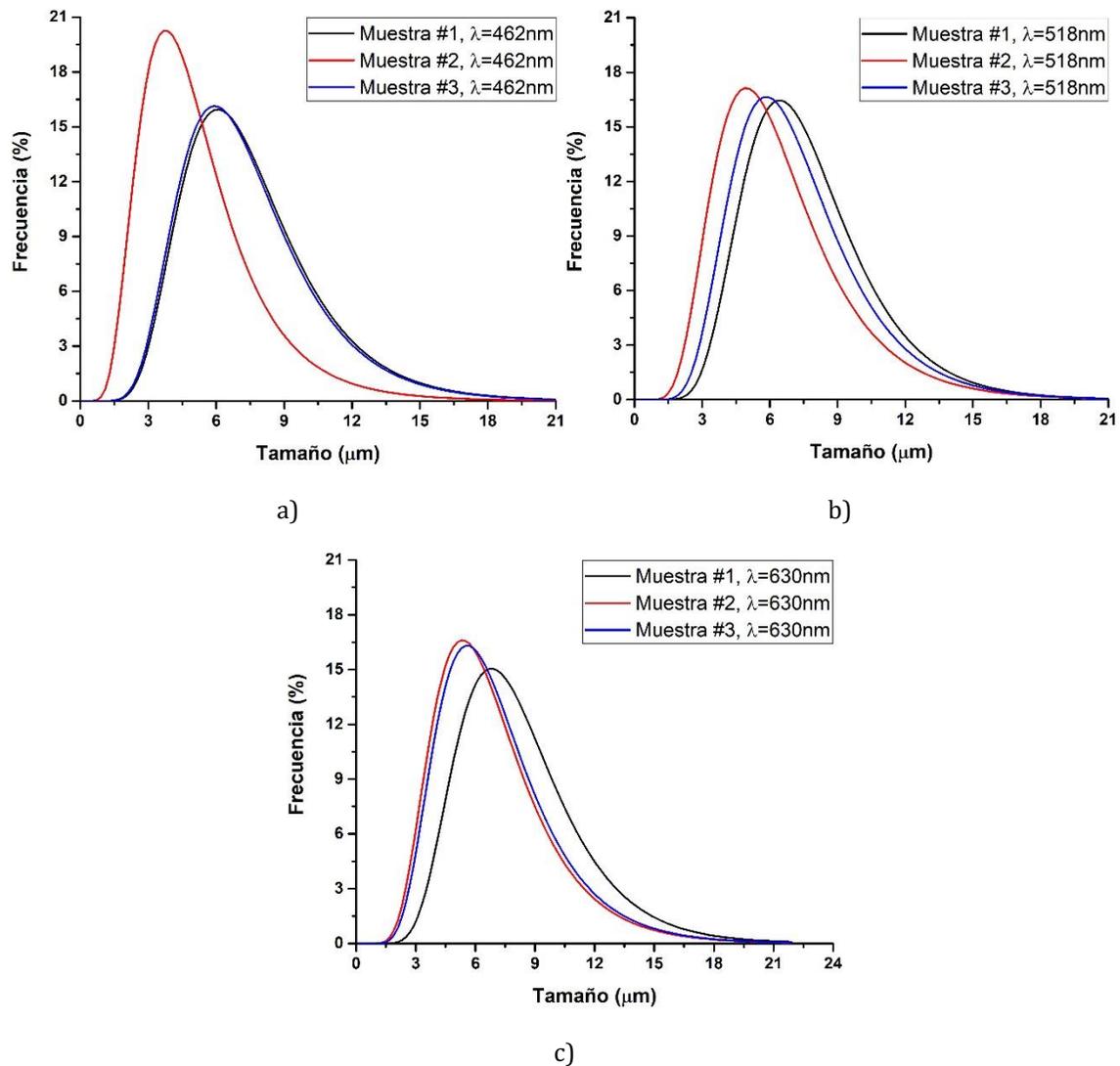


Fig. 3.19. Distribución de los tamaños obtenidas a partir de las muestras con suspensiones de leucocitos de la Tabla 6.1 y los tamaños promedio calculados, iluminados a tres longitudes de onda.

Una modificación en el esquema de medición mostrado en la Fig. 3.8, nos permite monitorear los patrones del esparcimiento de la luz que se forma en la parte SF del esquema y la sección transversal del esparcimiento de la luz debido a una suspensión de leucocitos (S) e iluminado a tres longitudes de onda diferentes:  $\lambda_0 = 462\text{ nm}$ ,  $\lambda_0 = 518\text{ nm}$  y  $\lambda_0 = 630\text{ nm}$ .

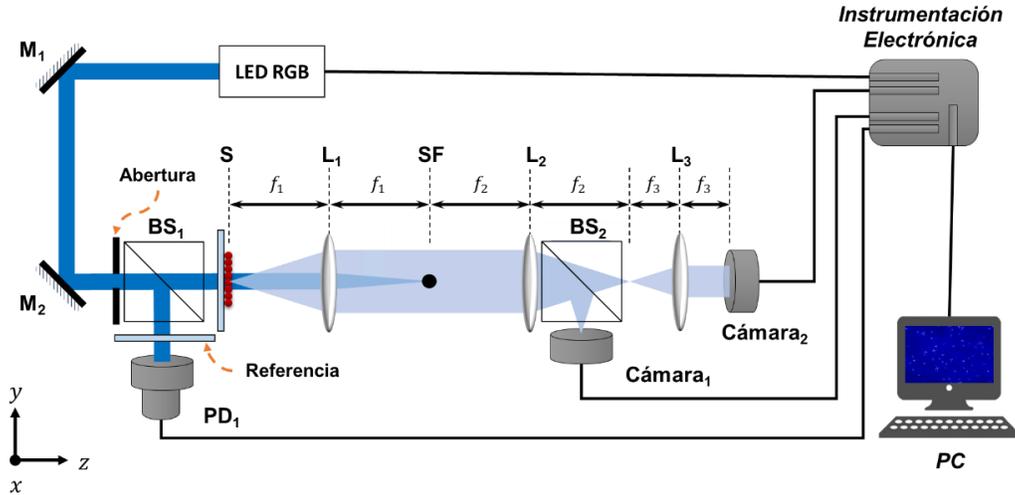


Fig. 3.20. Variación del arreglo experimental de la Fig. 3.8, para visualizar la luz esparcida debido a las muestras de leucocitos. Mediante la cámara 1 se visualiza la sección transversal de la imagen de las células esparciendo la luz, en el plano S, y la cámara 2 corresponde al patrón de la luz esparcida, en el plano SF, debido a la muestra. Las imágenes obtenidas por la cámara 2 son utilizadas posteriormente para obtener el perfil de esparcimiento y posteriormente compararla con simulaciones utilizando la teoría de Mie.

Los resultados del monitoreo de las muestras #1, #2 y #3 utilizando el esquema óptico Fig. 3.20 se muestran en las Fig. 3.21, Fig. 3.22 y Fig. 3.23, respectivamente. En las Fig. 3.20-Fig. 3.23 son iluminadas a tres longitudes de onda diferentes:  $\lambda_0 = 462$  nm (a-c),  $\lambda_0 = 518$  nm (d-g) y  $\lambda_0 = 630$  nm (h-j). En la parte izquierda (a, d, h) se exhibe una micrografía de la suspensión correspondiente a la muestra #1 en plano S de la Fig. 3.8. La parte central (b, f, i) corresponde al patrón de la luz esparcida en el plano SF de la Fig. 3.8, donde una pantalla circular opaca bloquea la luz no esparcida. La parte derecha (c, g, j) están los perfiles angulares de intensidad alrededor del foco de la fuente de luz (b, f, i) y los mejores ajustes del modelo óptico, dado por la teoría.

Mediante el sensor CMOS, se observa el plano del foco, que da la distribución de la intensidad esparcida versus los ángulos azimutales y polares en el plano objeto. El máximo ángulo polar que puede ser recolectado por el sistema de medición está restringido por la limitante de la apertura de la lente  $L_3$ . En el sistema, el máximo ángulo está dado por  $\theta_{max} = \sin^{-1}(M \times NA_{L_3}) \approx 11.45^\circ$ , donde  $NA_{L_3} = 0.357$  es la apertura numérica de la lente  $L_3$  y  $M$  es la magnificación entre las lentes  $L_1$  y  $L_2$ . Esto se confirma al colocar una regla de calibración de 100 divisiones/mm en plano objeto del sistema Fig. A.7, las posiciones en el plano de Fourier se obtienen mediante un punto de calibración con un diámetro de  $150 \mu\text{m}$ , Fig. A.7a. Con la regla de calibración, se convierten las posiciones de los píxeles de la imagen a ángulos polares. A partir de la Fig. A.7b, se determina que en el plano objeto S la resolución es de  $1.25 \mu\text{m}/\text{píxel}$  y en el plano focal P es de  $10.5 \times 10^{-3}$  grados/píxel.

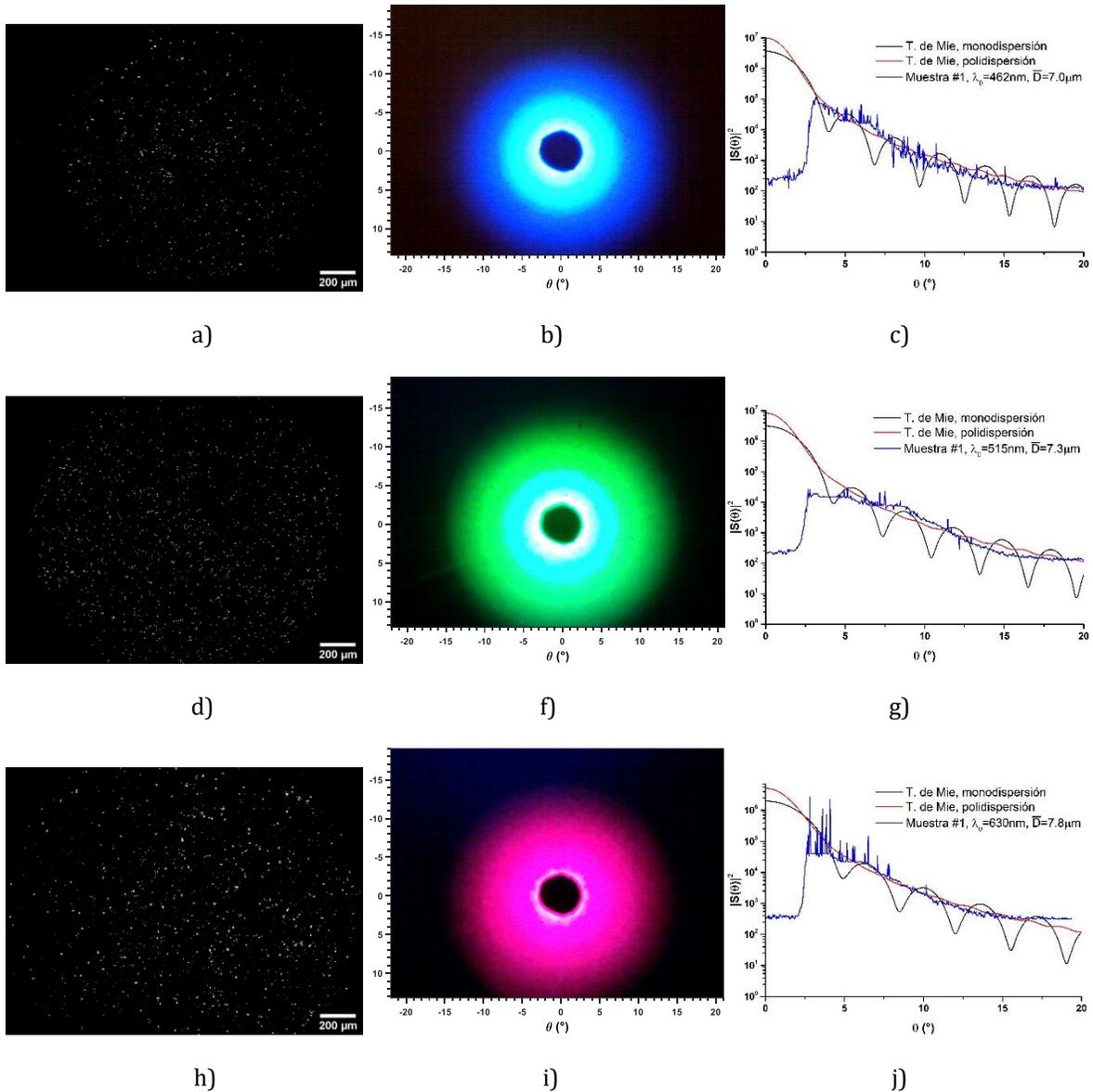


Fig. 3.21. Sección transversal del esparcimiento de la luz debido a una suspensión de leucocitos (muestra #1) e iluminado a tres longitudes de onda diferentes:  $\lambda_0 = 462\text{nm}$  (a-c),  $\lambda_0 = 518\text{nm}$  (d-g) y  $\lambda_0 = 630\text{nm}$  (h-j). En la parte izquierda (a, d, h) se exhibe una micrografía de la suspensión correspondiente a la muestra #1 en plano S de la Fig. 3.8. La parte central (b, f, i) corresponde al patrón de la luz esparcida en el plano SF de la Fig. 3.8, donde una pantalla circular opaca bloquea la luz no esparcida. La parte derecha (c, g, j) están los perfiles angulares de intensidad alrededor del foco de la fuente de luz (b, f, i) y los mejores ajustes del modelo óptico, dado por la teoría de Mie, para una monodispersión y polidispersión una esfera, obtenido al utilizar  $\bar{D} =$  a)  $7.0\ \mu\text{m}$ , b)  $7.3\ \mu\text{m}$ , c)  $7.8\ \mu\text{m}$ ,  $Re\{n_m\} =$  a)  $1.340$ , b)  $1.337$ , c)  $1.334$ ,  $n_p = 1.3562$ .

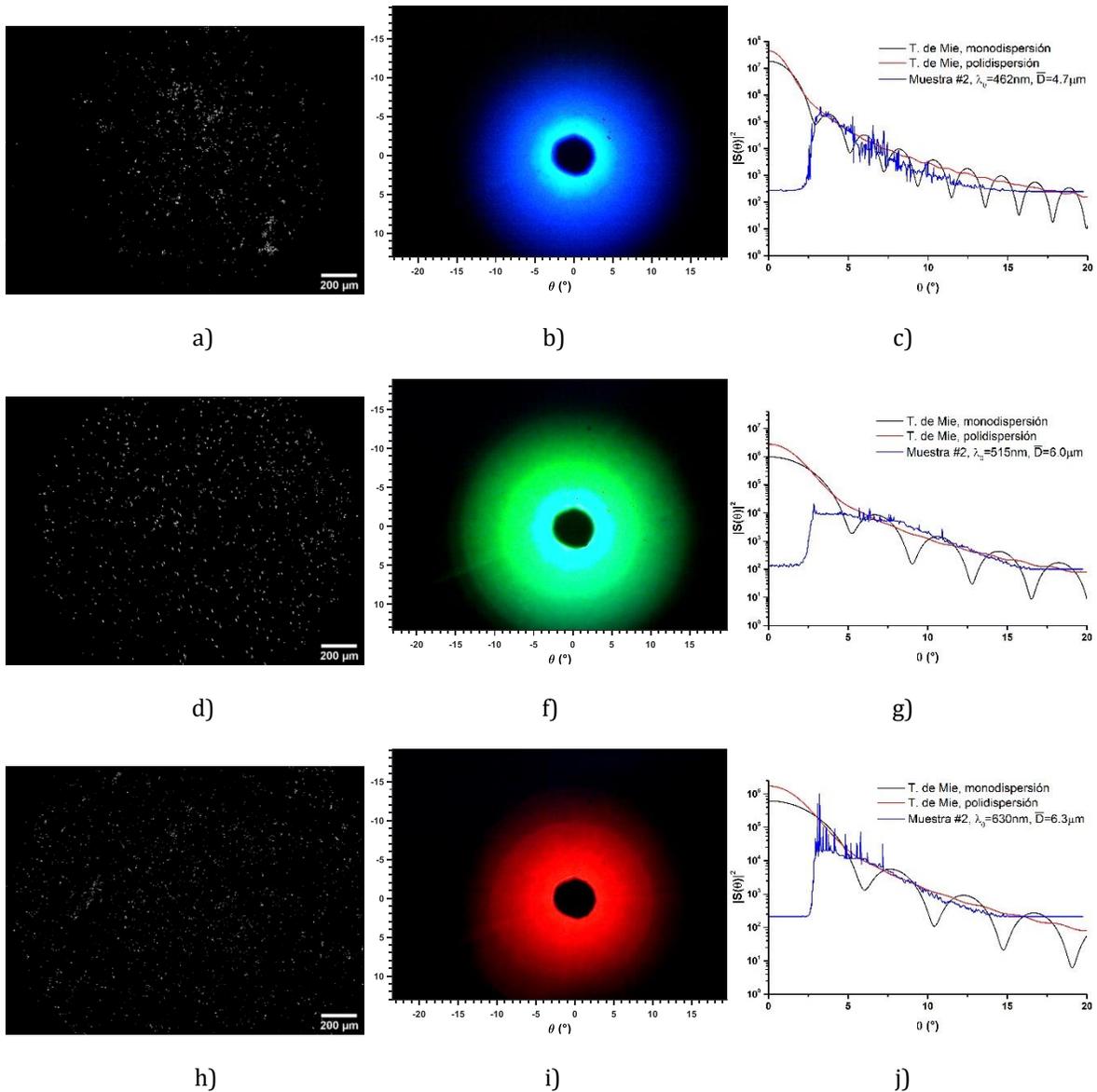


Fig. 3.22. Sección transversal del esparcimiento de la luz debido a una suspensión de leucocitos (muestra #2) e iluminado a tres longitudes de onda diferentes:  $\lambda_0 = 462\text{nm}$  (a-c),  $\lambda_0 = 518\text{nm}$  (d-g) y  $\lambda_0 = 630\text{nm}$  (h-j). En la parte izquierda (a, d, h) se exhibe una micrografía de la suspensión correspondiente a la muestra #2 en plano S de la Fig. 3.8. La parte central (b, f, i) corresponde al patrón de la luz esparcida en el plano SF de la Fig. 3.8, donde una pantalla circular opaca bloquea la luz no esparcida. La parte derecha (c, g, j) están los perfiles angulares de intensidad alrededor del foco de la fuente de luz (b, f, i) y los mejores ajustes del modelo óptico, dado por la teoría de Mie, para una monodispersión y polidispersión una esfera, obtenido al utilizar  $\bar{D} =$  a)  $4.7\ \mu\text{m}$ , b)  $6.0\ \mu\text{m}$ , c)  $6.3\ \mu\text{m}$ ,  $Re\{n_m\} =$  a) 1.340, b) 1.337, c) 1.334,  $n_p = 1.3562$ .

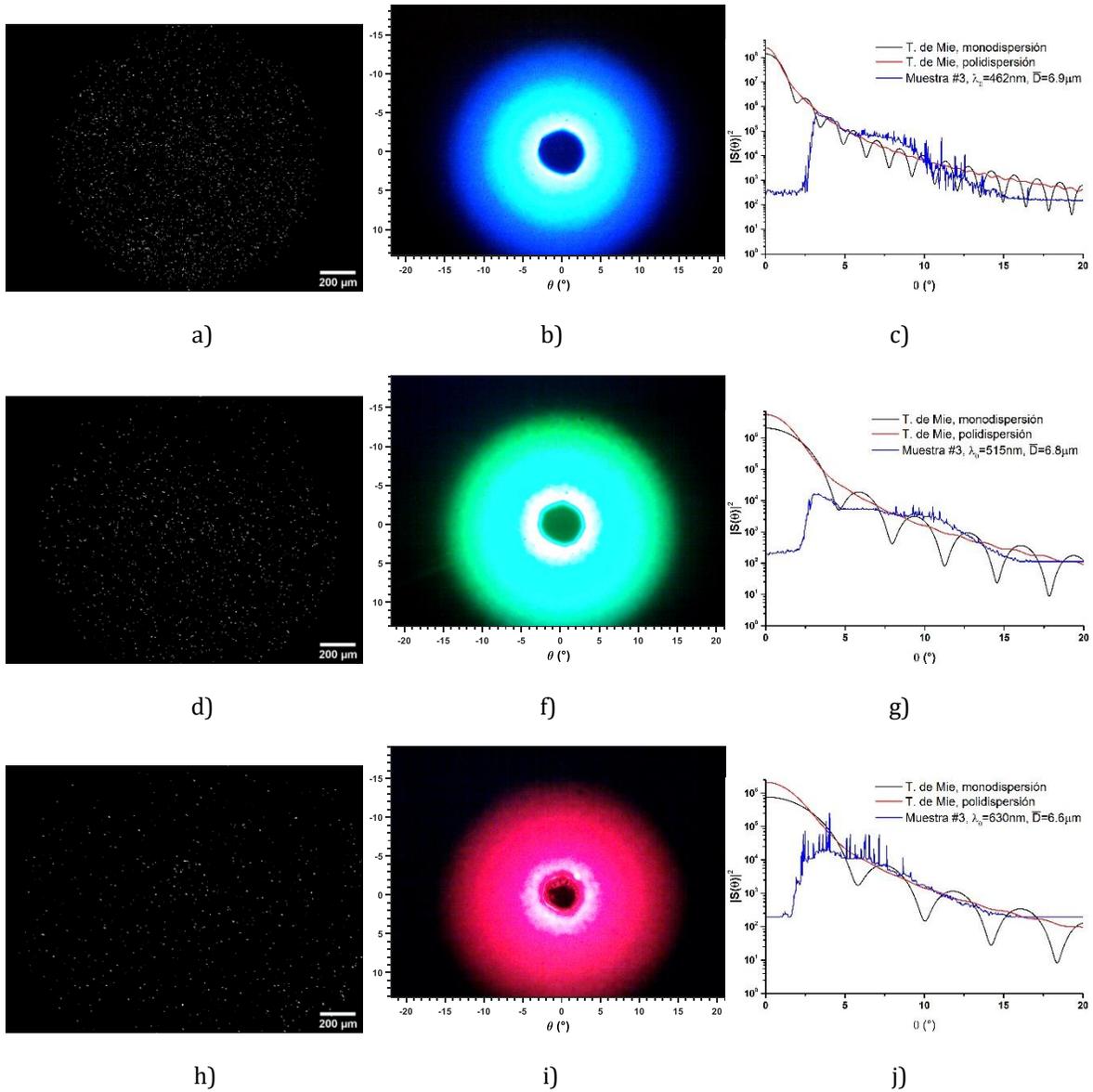


Fig. 3.23. Sección transversal del esparcimiento de la luz debido a una suspensión de leucocitos (muestra #3) e iluminado a tres longitudes de onda diferentes:  $\lambda_0 = 462\text{nm}$  (a-c),  $\lambda_0 = 518\text{nm}$  (d-g) y  $\lambda_0 = 630\text{nm}$  (h-j). En la parte izquierda (a, d, h) se exhibe una micrografía de la suspensión correspondiente a la muestra #3 en plano S de la Fig. 3.8. La parte central (b, f, i) corresponde al patrón de la luz esparcida en el plano SF de la Fig. 3.8, donde una pantalla circular opaca bloquea la luz no esparcida. La parte derecha (c, g, j) están los perfiles angulares de intensidad alrededor del foco de la fuente de luz (b, f, i) y los mejores ajustes del modelo óptico, dado por la teoría de Mie, para una monodispersión y polidispersión una esfera, obtenido al utilizar  $\bar{D} =$  a)  $6.9\ \mu\text{m}$ , b)  $6.8\ \mu\text{m}$ , c)  $6.6\ \mu\text{m}$ ,  $Re\{n_m\} =$  a) 1.340, b) 1.337, c) 1.334,  $n_p = 1.3562$ .

En la columna derecha (c, g, f) de las Fig. 3.20 a la Fig. 3.23, la teoría de Mie para partículas perfectamente esféricas reproduce bien las curvas experimentales. Para generar las curvas teóricas, se asume que el índice de refracción del leucocito es de 1.3562 y se utilizan los tamaños promedios efectivos de los leucocitos. Se asume que la parte imaginaria del índice de refracción de la muestra y del medio es muy pequeño en el orden de  $1 \times 10^{-9}$ . En el rango de los  $0^\circ$ - $3^\circ$  corresponden a la pantalla circular opaca, además se puede apreciar un pequeño corrimiento en la intensidad experimental respecto a la curva teórica, esto se debe a que la luz captada por el sensor CMOS llega a saturarse, para incrementar la precisión del perfil de intensidad experimental con nuestro arreglo experimental actual se podría emplear un filtro de densidad neutra. A pesar de lo anterior, se puede asegurar la validez de emplear una partícula perfectamente esférica en el modelo óptico para ajustarse a los perfiles experimentales.

## 4. Aplicaciones

En este capítulo se presentan dos ejemplos de muestras biológicas, para las cuales es de interés la medición simultánea de la luz esparcida y transmitida a través de estas. La primera aplicación corresponde a la medición simultánea del esparcimiento de la luz a ángulos pequeños y la transmitancia, donde se presenta la posibilidad de utilizar la actual metodología para la identificación de especímenes en un volumen sin necesidad de ordenarlas (como sucede en la citometría de flujo) y la fiabilidad de tales mediciones. La segunda aplicación se analiza y propone el monitoreo del proceso de hemólisis/lisis correspondiente a los eritrocitos, mediante el monitoreo de la luz esparcida (de manera similar a lo descrito por Valenzano y Trank [6]) y como hay un pico en la intensidad de la luz esparcida correspondiente a la ruptura de una célula en tiempo real, y al mismo tiempo se establece nuevamente la viabilidad de monitorear dicho proceso en tiempo real.

### 4.1 Monitoreo del proceso de hemólisis

La medición de las concentraciones de la sangre, incluso en pequeñas cantidades, es ampliamente utilizada, debido a que puede proveer de información relevante (especialmente en medicina) sobre la fisiología de esta y conducir a un diagnóstico médico [29,78]; esto hace de la sangre el fluido más importante en el cuerpo humano. Con relación al tema del diagnóstico, esto es especialmente válido si se observa la amplia variedad de desórdenes médicos que pueden ser detectados e identificados mediante el monitoreo de la sangre, tales como la anemia, leucemia e infecciones; uno de los métodos para lograr tal cometido es el conteo de glóbulos rojos/células de sangre. Por lo que se necesita un dispositivo para analizar la sangre y permita obtener rápidamente algunas de las propiedades promedio de las células de sangre, así como darle seguimiento a su evolución a tiempo de forma más cercana.

En esta sección se propone el monitoreo del grado de hemólisis<sup>7</sup> en monocapas de eritrocitos o RBCs (por sus siglas en inglés *Red Blood Cells*), mediante la metodología presentada en este trabajo. Este monitoreo utilizará el esquema de medición en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, donde la muestra fue puesta en la parte S de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**. La preparación de la monocapa de RBCs sobre un portaobjetos se realizó mediante la técnica de frotis, descrita en la sección C.1.2. La muestra de sangre fue extraída de una joven voluntaria con los parámetros de sangre de una paciente sana. La monocapa de RBCs resultante fue colocada en la parte S del arreglo experimental **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y monitoreada continuamente durante un lapso de 6 horas, a una tasa de muestreo de 2 Hz. La Fig. 4.1a muestra los cambios en la intensidad, como función del tiempo para la monocapa, para monitorear el proceso de hemólisis.

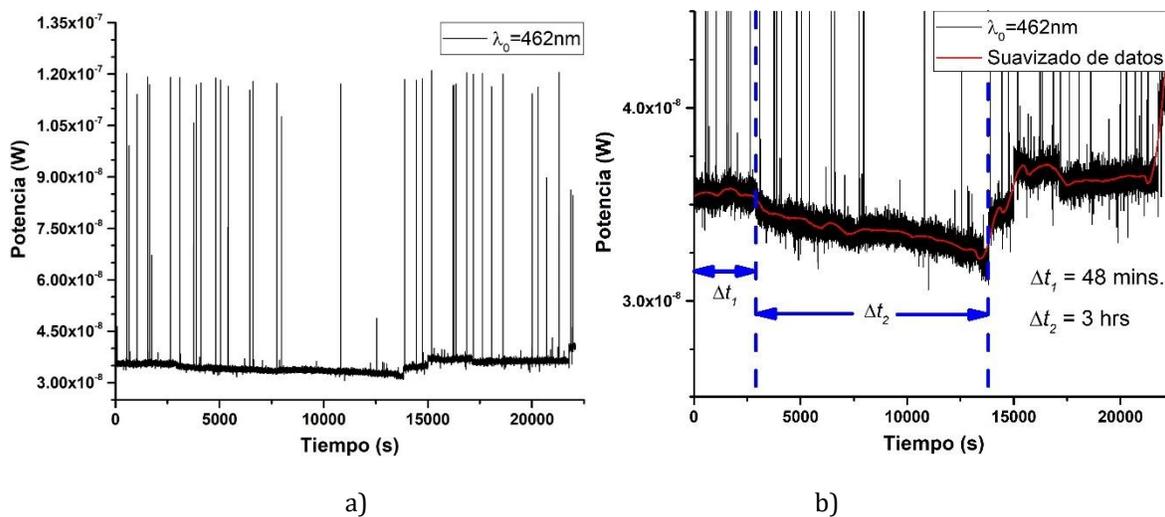


Fig. 4.1. Proceso de hemólisis durante el monitoreo de la intensidad de la señal esparcida recolectada el fotodiodo.

Al inicio del monitoreo en la señal esparcida por los eritrocitos (ver Fig. 4.1b), se observa un periodo de estabilidad con una potencia media de  $\bar{P} = 35.59 \pm 1.86$  nW y una duración de  $\Delta t_1 = 48$  mins; sin embargo, después la potencia media decae lentamente durante  $\Delta t_2 = 3$  horas con una pendiente  $-1.97541 \times 10^{-13} \cdot t$ . Después de  $\Delta t_1$ , se estima que las células dentro de  $\sigma_0 = 1.368 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup> (sección transversal correspondiente al haz de luz

<sup>7</sup> El proceso de hemólisis es la muerte de RBC cuando el plasma sanguíneo (medio matriz), que lo rodea, sufre de una significativa reducción en la salinidad de esta debido a que se mezcló con otra sustancia (p.ej., agua). Por tanto, la baja concentración de sal en el medio matriz hace que el RBC se hinche por ósmosis y posteriormente revienten. Esto último provoca que la hemoglobina que estaba al interior de los eritrocitos se mezcle con el plasma diluido [105, 106].

incidente y  $D_{LED} = 1.32$  mm) alcanzaron su límite, provocándose la lisis celular, donde la membrana se rompe, todo su contenido intracelular es liberado y disuelto en el medio.

Así mismo, se monitoreo (mediante el sensor CMOS, en Cámara<sub>2</sub> de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) la sección transversal correspondiente a la luz esparcida,  $\sigma_{sca}$ , debido a la monocapa de eritrocitos, iluminada a una longitud de onda de 462 nm. En la Fig. 4.2 se presentan las imágenes de  $\sigma_{sca}$  al principio ( $t = 0$  hr, Fig. 4.2a) y final ( $t = 6$  hr, Fig. 4.2b) del lapso de medición.

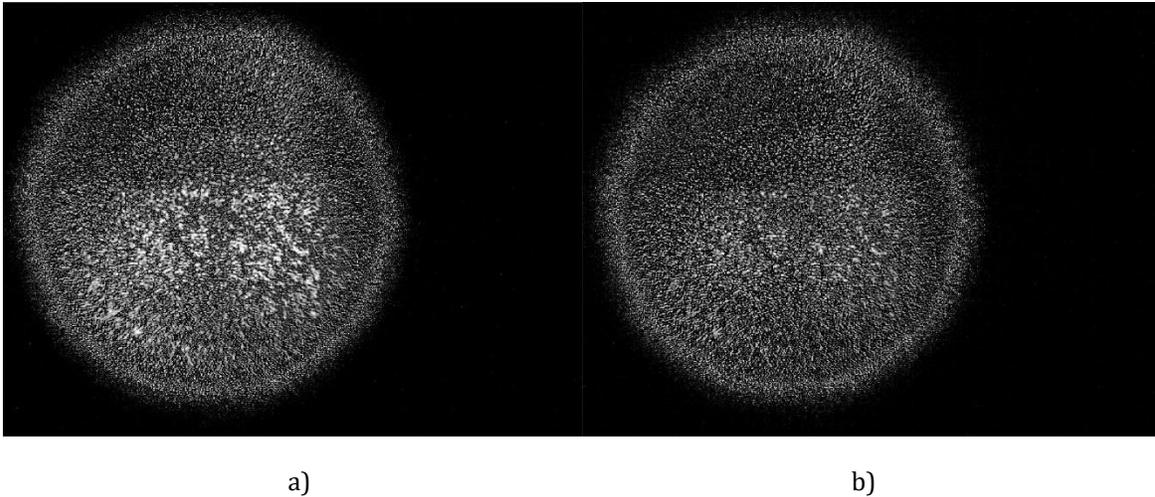


Fig. 4.2. Imagen de la monocapa de eritrocitos debido a la luz esparcida. a) muestra al inicio de la medición,  $t = 0$  s. b) muestra en  $t = 360$  s muestreo.

Examinar el comportamiento temporal del esparcimiento de la luz debido a la hemólisis, es de interés general, para determinar la pérdida celular cuantitativamente, así como la pérdida de linfocitos, monocitos y granulocitos, por mencionar algunos. Esto cobra mayor relevancia al utilizar una fuente de iluminación a  $\lambda_0 = 462$  nm, en esta longitud de onda los fotones son absorbidos y esparcidos por los RBCs, dando como resultado una reducción significativa en  $\Delta\sigma_{sca} = \sigma_{sca}/\sigma_{sca,t=0}$  (fracción de la sección transversal esparcida) integrada sobre el ángulo de detección,  $\theta \leq 14^\circ$ , donde  $\sigma_{sca,t=0}$  es la micrografía de control o referencia de la luz esparcida en el tiempo de medición inicial  $t = 0$  s. La reducción de  $\Delta\sigma_{sca}$  es evidente si se observa la Fig. 4.2, donde existe una caída en la intensidad esparcida al final de la medición. Además, en la Fig. 4.1b se muestra los diferentes periodos de tiempo que ocurren en la muestra, donde la señal es estable ( $\Delta t_1$ ) y después decae lentamente debido a la lisis ( $\Delta t_2$ ); no obstante, en la miniatura de la Fig. 4.3 se observa que la caída en la intensidad esparcida ocurre después de un periodo de tiempo  $\Delta t = 14$  mins a diferencia de  $\Delta t_1 = 48$  mins en la Fig. 4.1b.

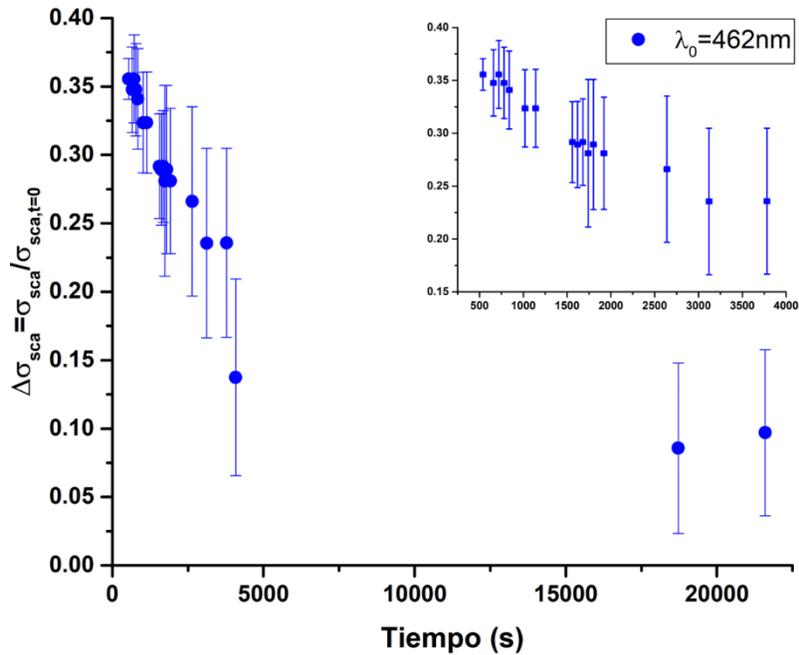


Fig. 4.3. Debido al proceso de lisis celular, la sección transversal esparcida total experimenta una caída con una aparente forma logarítmica durante un periodo total de 6 horas. Después de haber alcanzado el límite aparente en  $t = 5$  horas para el proceso de lisis, las variaciones en  $\sigma_{sca} / \sigma_{sca,t=0}$  no parecen diferir entre sí.

Durante el monitoreo en tiempo real de  $\sigma_{sca}$ , se observó una correlación entre los picos de intensidad (Fig. 4.1a) y caída gradual de la intensidad de los píxeles (en diferentes sectores de la micrografía) de la sección transversal esparcida (Fig. 4.2). Esto es más notable si se expresa como la fracción de la sección transversal esparcida (a ángulos cercanos a la dirección de propagación del haz incidente) debido a la monocapa de sangre y representado en la Fig. 4.3. Además, podría explicar la diferencia en los tiempos en la caída de la intensidad esparcida. Los picos de intensidad observados, en la Fig. 4.1, ocurren a determinados intervalos de tiempo y con un ancho de  $FWHM \leq 1$  s, donde la Fig. 4.4 presenta un ejemplo de la aparición de estos picos. Cabe señalar que el ruido de fondo fue  $28.9 \pm 2.4$  pW, por tanto, se descarta el ruido ambiental.

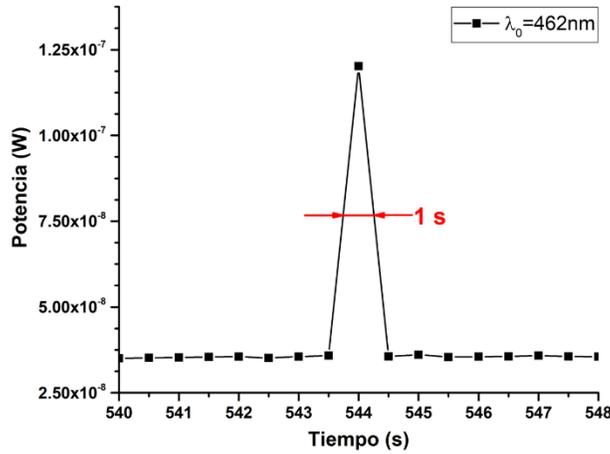


Fig. 4.4. Picos en la señal de luz esparcida detectada por el fotodetector PD<sub>3</sub> a una frecuencia de muestreo de 2 Hz.

Aunque estos picos de intensidad tienen un  $\text{FWHM} \leq 1$  s, la realidad es que la frecuencia de muestreo utilizada fue insuficiente para recabar la información sobre sus métricas de pulso y transición, tales como: tiempo de subida, tiempo de caída, tiempo de estabilización y ancho de pulso. Estas métricas podrían aportar más información sobre estos eventos y cuál es su relación con la reducción de  $\Delta\sigma_{\text{sca}}$ .

A partir de la Fig. 4.3, se podría estimar la cantidad de eritrocitos dentro del haz de iluminación (en la Fig. 4.2) de  $D_{\text{LED}} = 1.32$  mm y  $\sigma_0 = 1.389$  mm<sup>2</sup>. Si se considera que, una persona normal tiene RBCs con un diámetro entre 7-8  $\mu\text{m}$  y un espesor de 2.5  $\mu\text{m}$ , además de tener una forma bicóncava [79,80]. En general, la cantidad de eritrocitos presentes por milímetro cúbico dependerá del género de la persona, para hombres estará en el rango de  $4.3 - 9 \times 10^6$  RBC/mm<sup>3</sup> y para mujeres estarán en el rango de  $3.5 - 6 \times 10^6$  RBC/mm<sup>3</sup> [80-82]. Además, si se asume que la monocapa de RBC es una monodispersión con un tamaño  $\bar{D} = 7.5$   $\mu\text{m}$ , los eritrocitos son perfectamente circulares y estos no se superponen entre sí, se obtiene que la cantidad promedio inicial es de  $\bar{N} = 8485 \pm 151$  células durante los primeros 14 minutos y después decae con una aparente forma logarítmica hasta alcanzar una cantidad promedio final de  $\bar{N} = 2218 \pm 194$  células.

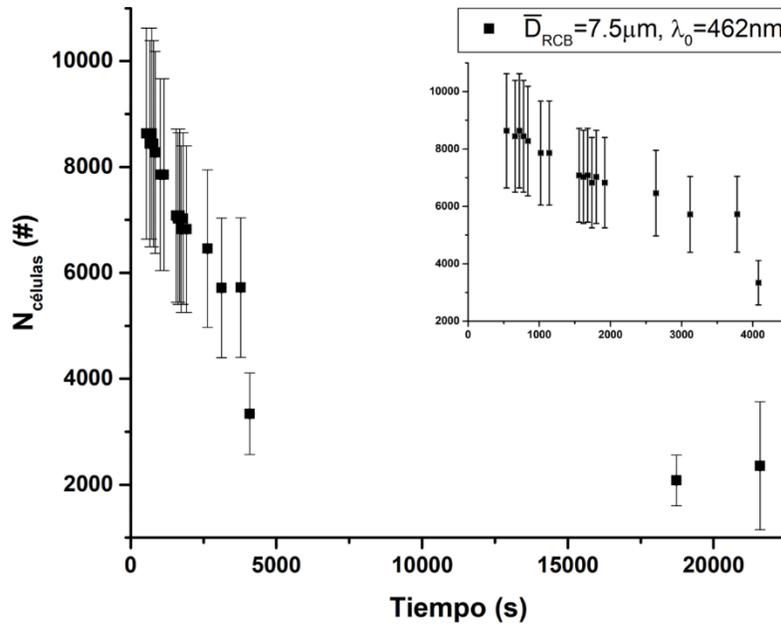


Fig. 4.5. La población inicial detectable, dentro de  $\sigma_0$ , en  $t = 9$  min se estima que fue de  $N = 8633 \pm 1991$  células y al final de la medición, en  $t = 6$  horas, la cantidad calculada fue de  $N = 2355 \pm 1208$  células. Para cuantificar los eritrocitos, se asumió que existe únicamente una monodispersión, los eritrocitos son perfectamente circulares y estos no se superponen unos con otros.

El monitoreo de los eritrocitos es importante, debido a que estos transportan oxígeno, para lo cual han desarrollado sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos eficientes de protección frente a las sustancias oxidantes a las que están expuestos. Estos sistemas sirven principalmente a los requisitos de los glóbulos rojos, pero también pueden influir en otras células vecinas, convirtiendo los glóbulos rojos en agentes protectores antioxidantes de los medios celular e intracelular de todo el cuerpo. Su gran número, movilidad, presencia en todo el cuerpo y renovabilidad los convierten en buenos candidatos para esta función.

Sin embargo, una disminución en su número a causa de la destrucción acelerada (hemólisis) de los eritrocitos maduros es una característica que si media en muchos de los síntomas de la anemia. Esta situación sugiere que se puede utilizar los RBC como bioindicadores para monitorear el estado del hierro como del redox durante el tratamiento.

## 4.2 Identificación de especímenes

Las células tienen distintos tamaños y formas, además de que sus estructuras internas están hechas de diferentes materiales. Esto ha llevado a estudiar los efectos de las propiedades físico-ópticas de la célula en el esparcimiento de la luz, dichas propiedades están dadas por la composición de la estructura interna de la célula, asociada al índice de refracción, y los

diferentes tamaños que esta puede tener [21-23,83,84]. Se ha documentado que las pequeñas estructuras internas de la célula, como las mitocondrias, afectan la distribución angular de la luz esparcida, y que las variaciones en los tamaños de las células conducen a diferencias en la amplitud de la luz esparcida [22,83,84]. Adicionalmente, en estos estudios se utiliza típicamente una baja potencia continua de unos pocos mW para no dañar las células.

Para evaluar las propiedades de células individuales y distinguir poblaciones celulares respecto del fondo y los residuos, normalmente se utiliza la citometría de flujo. Para diferenciar distintas poblaciones en una muestra dada se utiliza un discriminador. El discriminador, tradicionalmente, está basado en el umbral del esparcimiento en la dirección de incidencia, donde se asume que la luz esparcida hacia adelante se correlaciona con el tamaño de la célula o partícula y bajo ciertas condiciones, respecto del volumen de la célula [21-24,83,84]. Esto se muestra en la Fig. 4.6 donde se muestran las regiones angulares del esparcimiento de luz y la información que puede obtenerse. La complejidad de la célula y sus propiedades sugieren que el tamaño no es el único factor que afecta el esparcimiento de la luz. Otros factores relevantes incluyen la longitud de onda de la fuente de luz utilizada, el ángulo de detección de la señal de luz esparcida, diferencias en el índice de refracción, las propiedades de la membrana plasmática y la presencia de estructuras celulares internas [21,23,85].

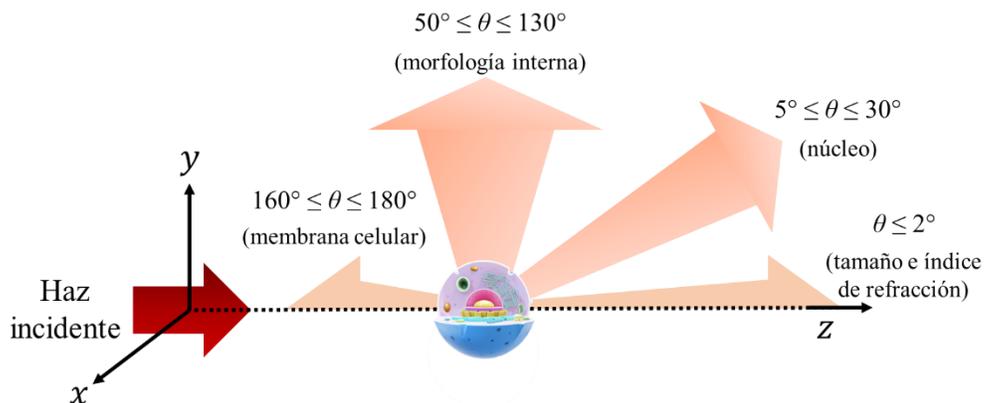


Fig. 4.6. Esquema de las regiones e información contenida en el esparcimiento angular de la luz.

Diversos estudios sugieren cómo la intensidad y la distribución angular de la luz esparcida (como función del ángulo respecto a la dirección de propagación del haz incidente,  $\theta = 0^\circ$ ) lleva información sobre las propiedades ópticas y físicas de las células. Para un rango angular muy pequeño de  $\theta \leq 2^\circ$ , la luz esparcida es, en gran medida, dependiente del tamaño e índice de refracción de la célula [21-24]. Para ángulos un poco más grandes,  $5^\circ \leq \theta \leq 30^\circ$ , el esparcimiento de la luz dependerá del núcleo de célula y la relación  $V_{\text{núcleo}}/V_{\text{célula}}$  [23]. Los orgánulos, como las mitocondrias, los peroxisomas, los lisosomas, contribuyen al esparcimiento de la luz a mayores ángulos de  $50 \leq \theta \leq 130^\circ$  [21,23,26]. Por último, el rango de

$160^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$ , también conocido como región del retro esparcimiento, está principalmente afectado por la membrana celular [23].

Como se menciona anteriormente, en la citometría de flujo tradicional, los dos factores principales que son medidos son la fracción o porción normalizada de luz esparcida hacia adelante (FSC, por sus siglas en inglés *Forward Scatter*) y lateralmente (SSC, por sus siglas en inglés *Side Scatter*, normalmente a  $90^\circ$ ), las cuales estiman los tamaños y formas de las células, respectivamente [21]. Cuando estas dos fracciones de luz esparcidas se grafican una respecto a la otra, para un gran número de células individuales, se pueden aplicar métodos estadísticos para identificar diversas poblaciones celulares presentes dentro de una muestra. El único detrimento de este método es también su aspecto clave, en la citometría de flujo las células se muevan en una sola fila para que puedan ser interrogadas individualmente por el sistema de detección óptica. Generalmente, esto se logra mediante el enfoque hidrodinámico [86]. Donde la velocidad del flujo que rodea desde ambos lados y guía a las muestras se puede ajustar para que el flujo del medio transportador sea lo suficientemente delgado como para llevar células en una sola fila. Esto también ayuda a reducir que se formen agregados particulados que puedan obstruir el dispositivo. El enfoque hidrodinámico normalmente limita las células en ambos lados, pero no en la dirección del flujo que puede ser  $y$  o  $x$  en la Fig. 4.6, debido a que la dirección  $z$  está reservada para la incidencia del haz de iluminación. Esto implica que se debe tener de antemano dispositivos y aparatos necesarios para llevar las partículas del volumen muestra al micro canal y hacerlas fluir una por una a través de un haz de luz a una velocidad constante.

Empleando la metodología expuesta en este trabajo, se propuso un sistema de clasificación basado en la técnica de citometría de flujo. En lugar de iluminar una partícula a la vez, una sección transversal de iluminación,  $\sigma_0$ , grande incide sobre una parte de la muestra dada (película delgada o una sección suspensión). Al iluminar una porción grande de la muestra se tiene la ventaja prescindir de equipos y personal especializado que transporten la suspensión que contiene la muestra hasta un microcanal y pasar cada una de las células (en la muestra) enfrente de un haz de luz a través de este microcanal a una velocidad constante.

La Fig. 4.7 presenta gráficas del esparcimiento de la luz en la dirección de propagación del haz incidente versus la extinción aparente de la luz, a diferentes longitudes de onda en el espectro visible, para diferentes muestras. Estas muestras consisten en seis tipos de monocapas diferentes: dos especies distintas de levaduras comerciales, hongo de la fruta (naranja), coloide partículas de polimetilmetacrilato (PMMA) de  $\bar{D} = 0.25 \mu\text{m}$ , microgotas de agua sobre un sustrato y polvo acumulado durante 12 horas al aire libre sobre un sustrato (CDMX, México,  $19^\circ 19' 19.4''\text{N}$ ,  $99^\circ 11' 06.2''\text{O}$ ). Estas muestras fueron evaluadas a tres diferentes longitudes de onda  $\lambda_0 = 462 \text{ nm}$ ,  $\lambda_0 = 518 \text{ nm}$  y  $\lambda_0 = 630 \text{ nm}$ .

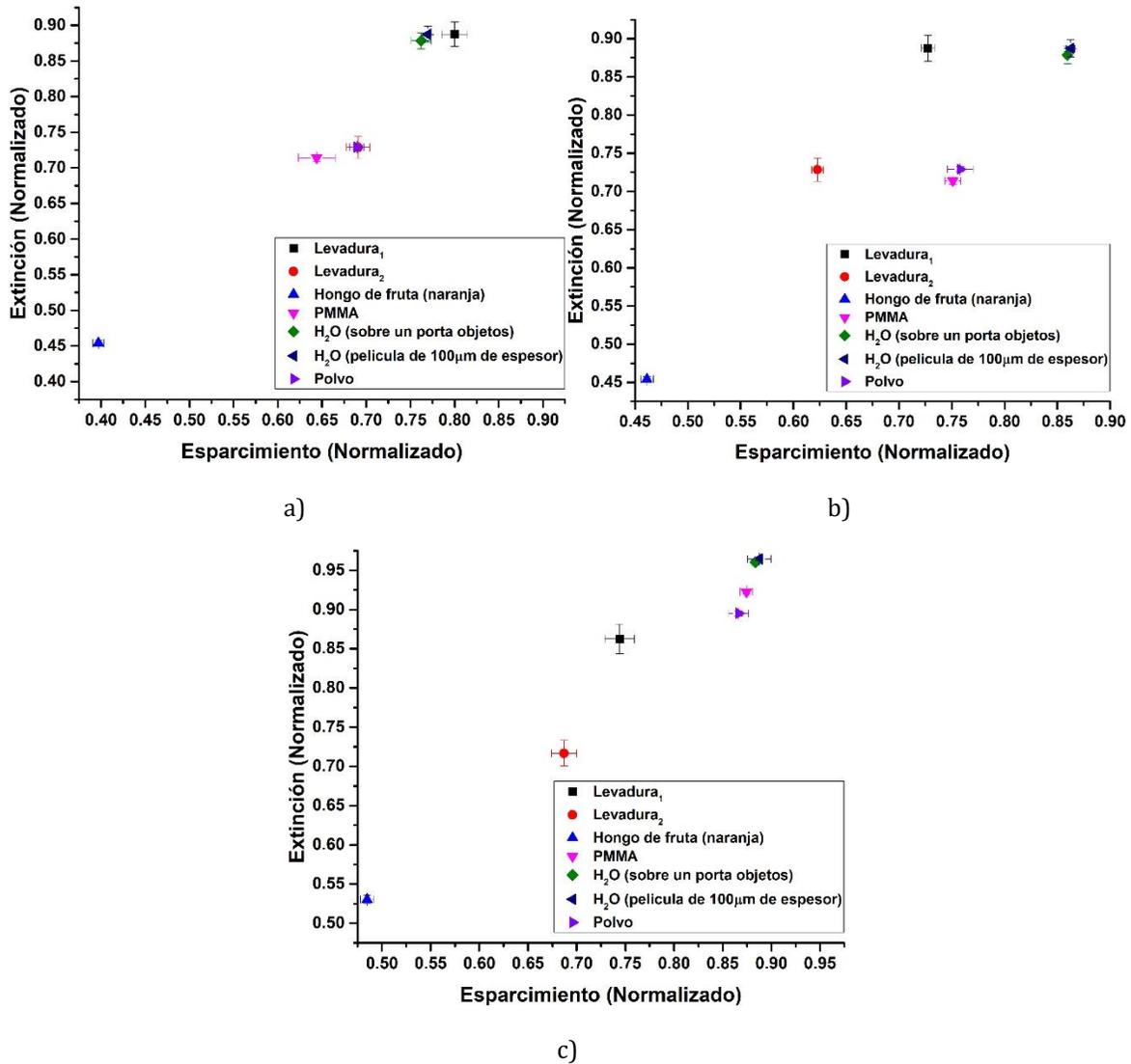


Fig. 4.7. Identificación de especímenes. a)  $\lambda_0 = 462$  nm; b)  $\lambda_0 = 518$  nm; c)  $\lambda_0 = 630$  nm.

El rango angular de esparcimiento detectable por el arreglo experimental es de  $\theta \leq 14^\circ$  donde se tiene acceso a dos regiones de esparcimiento, ver Fig. 4.6, a  $\theta \leq 2^\circ$  (dependiente del diámetro e índice de refracción) cerca del foco del haz y  $5^\circ \leq \theta \leq 30^\circ$  (dependiente de la relación entre volumen del núcleo y la célula) después de la pantalla circular opaca, BS en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Al comparar los datos experimentales de la luz esparcida y la extinción para las diferentes monocapas (levadura, hongo, agua, PMMA y polvo), se evalúa si es posible distinguir el tipo de muestra, dentro de un finito número de posibilidades como las listadas en anteriormente, respecto de otras. En la Fig. 4.7, las monocapas de polvo y partículas de PMMA permanecen cercanas entre sí independientemente de la longitud de onda incidente. La cercanía entre ambas muestras en los gráficos puede deberse a, la presencia de partículas menores a  $10 \mu\text{m}$  (PM10) y menores a  $2.5 \mu\text{m}$  (PM2.5) sobre el sustrato de la

monocapa de polvo y el tamaño de las partículas de PMMA. Süring et al. (2016) publican sobre la posibilidad de que las partículas ambientales pueden transportar alérgenos. Estas partículas ambientales, también llamadas PM10 en la Fig. 4.8a, inhaladas pueden actuar como portadores de alérgenos (como el polen de abedul Bet v 1, ver Fig. 4.8b). Los autores emplearon la citometría de flujo para cuantificar estas partículas cargadas de alérgenos. Los resultados del estudio indican que, el Bet v 1 se unió a las partículas PM10 y que las muestras de PM10 en la temporada alta de polen contienen proporciones significativamente más altas de partículas Bet v 1 positivas que las muestras de PM10 en la temporada baja de polen [87]. La muestra de polvo fue recolectada durante la temporada invernal en la CDMX, México, en la cual existe una alta concentración de polen; por tanto, no se puede descartar la presencia de estas en la monocapa, así como otros contaminantes y metales.

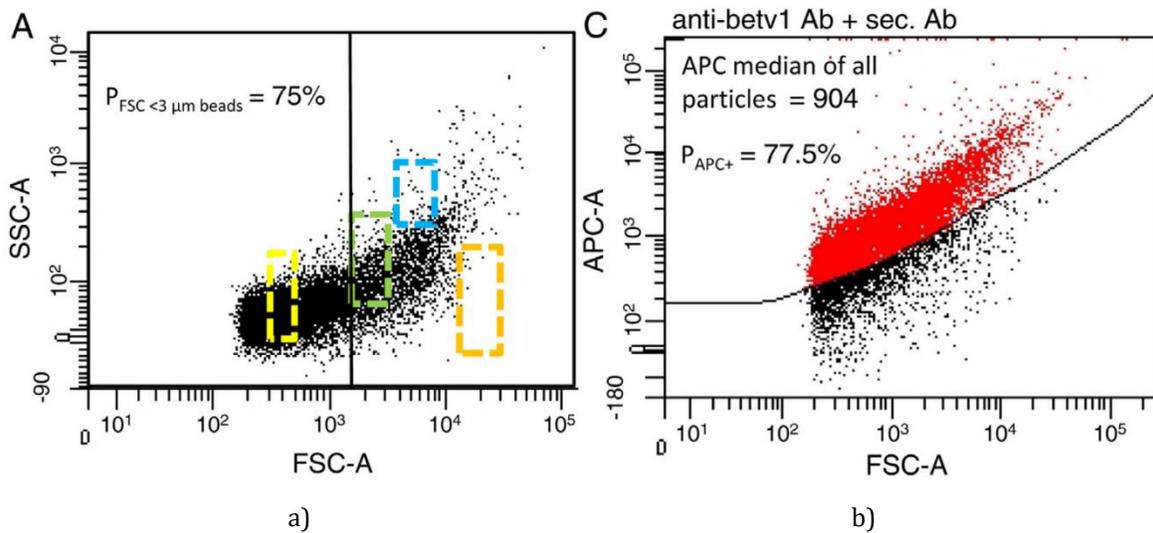


Fig. 4.8 Análisis de citometría de flujo de partículas menores a 10  $\mu\text{m}$  (PM10). a) El esparramiento de la luz en la dirección de propagación del haz incidente (FSC) versus el esparramiento lateral (SSC). Los rectángulos indican el tipo de partícula analizada: microesferas de 2  $\mu\text{m}$  (amarillo) y 3  $\mu\text{m}$  (verde) parte del kit *Cytometer Setup & Tracking Beads Kit* (Becton Dickinson, USA), partículas de calibración blancas (azul) de 6–6.4  $\mu\text{m}$  (Becton Dickinson, USA) y RBCs (naranja). b) Después de procesar la muestra, se presenta la intensidad de la fluorescencia de la alofocianina (APC) para una muestra de polvo PM10 (en temporada alta de polen) versus FSC, se indica en rojo el polen detectado. Crédito: Süring et al. (2016) [87].

Colling et al. (2005) desarrollan un método para determinar si la levadura y las microesferas de poliestireno podían distinguirse unas de otras. Esto se logró mediante citometría de flujo, donde se analizó los patrones FSC versus SSC. Las suspensiones de levadura y microesferas (de poliestireno teñidas de azul oscuro) se elaboraron con PBS. La Fig. 4.9 muestra que las células de levadura, que generalmente tienen un diámetro de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , se distinguían claramente de las microesferas (tamaño submicrométrico, 0.834  $\mu\text{m}$ ) sobre la base de la geometría de las partículas. Los autores encontraron que las microesferas y la levadura, en general, eran

distinguibiles en base al tamaño a través de la luz esparcida hacia adelante, FSC [25]. De manera similar, en la Fig. 4.7 se observa como las dos muestras de levadura son claramente diferenciables respecto de las partículas de PMMA.

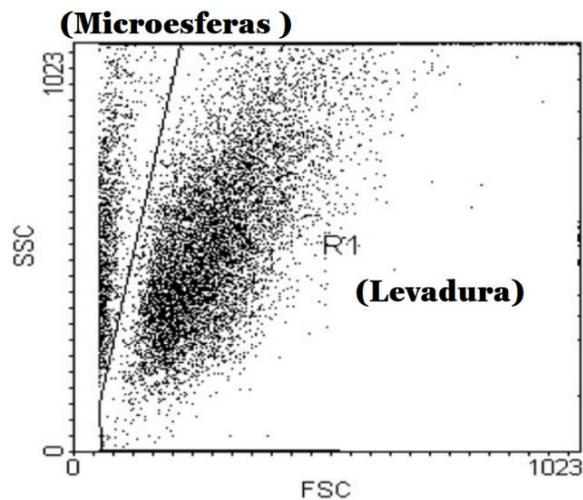


Fig. 4.9. La citometría de flujo se utiliza para distinguir levaduras y microesferas de poliestireno teñidas. Las microesferas muestran un esparcimiento hacia adelante más pequeño en comparación con las levaduras. Crédito: Colling et al. (2005) [25].

El moho verde causado por el *Penicillium digitatum* es la principal enfermedad postcosecha en los cítricos. Liu et al. (2020) estudian la actividad antifúngica del dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) para combatir el *P. digitatum* tanto *in vivo* como *in vitro*, mediante la citometría de flujo y microscopía electrónica de barrido. Los resultados mostraron que 200–1800 mg/L de  $\text{ClO}_2$  inhibieron significativamente el moho verde en varios cítricos (kumquats, mandarinas, naranjas peruanas y pomelos). Además, 200 mg/L de  $\text{ClO}_2$  indujeron significativamente la apoptosis celular (muerte celular) de *P. digitatum* al aumentar la intensidad de fluorescencia, esto redujo la tasa de células vivas de 96.8% a 6.1%. Estos resultados indicaron que el  $\text{ClO}_2$  podría inhibir el crecimiento de hongos al destruir la integridad de la membrana de *P. digitatum*, y el uso de  $\text{ClO}_2$  puede ser una estrategia alternativa para controlar el moho verde en frutos cítricos postcosecha [28]. El estudio realizado por Liu et al. (2020) abre la posibilidad a aplicar, a futuro, la actual metodología al campo de la micología. Partiendo de la muestra del hongo fijado sobre el portaobjetos, de la Fig. 4.7, correspondiente a la naranja *Citrus sinensis* L., se podría diferenciar de otros especímenes (hongos) o medir el nivel de apoptosis celular.

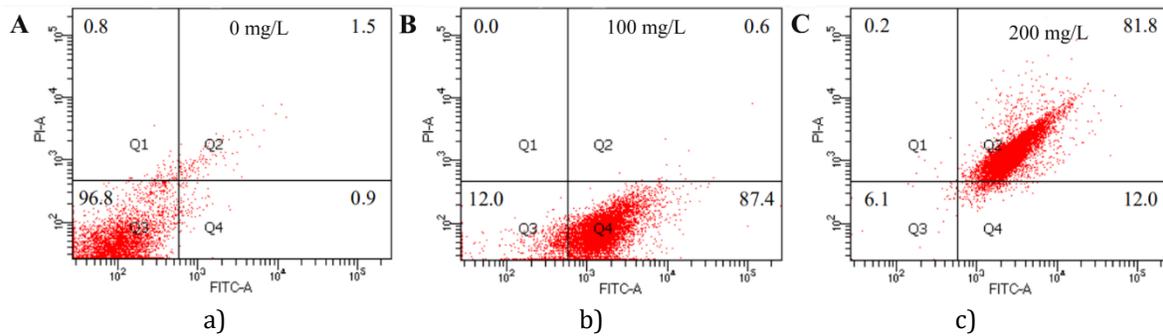


Fig. 4.10. Integridad de la membrana plasmática de *Penicillium digitatum* tratada con (a) 0 mg/L, (c) 100 mg/L y (c) 200 mg/L de ClO<sub>2</sub>. Las esporas se tiñeron y se monitorearon con un citómetro de flujo, detectando un total de 10.000 eventos por muestra. Crédito Liu et al. (2020) [28].

La aplicación propuesta en la sección 4.1, podría extenderse a diferenciar eritrocitos de leucocitos (sección 3.3.2). Una aplicación similar fue propuesta por Neukammer y Rinneberg (1998). Ellos expusieron en su trabajo la posibilidad de diferenciar eritrocitos de leucocitos (ver Fig. 4.11), en muestras de sangre diluida, a través del monitoreo del esparcimiento total de la luz a  $\lambda_0 = 413.1$  nm y en la dirección de propagación del haz incidente ( $3.3^\circ \leq \theta \leq 17.4^\circ$ ) y ortogonalmente en un rango de ángulos de  $63^\circ \leq \theta \leq 117^\circ$ . A esta longitud de onda de iluminación, los fotones son absorbidos y esparcidos por los eritrocitos, resultando en una reducción importante en la sección transversal esparcida que fue integrada alrededor del ángulo de apertura del fotodetector. Esta metodología tiene la posibilidad de diferenciar entre granulocitos, monocitos y linfocitos [27].

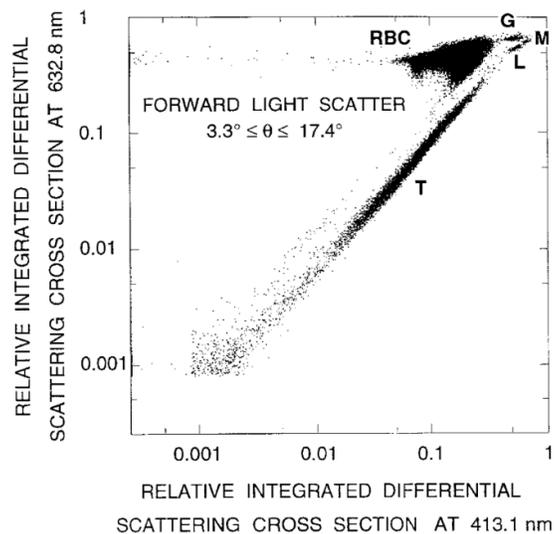


Fig. 4.11. Diagrama de esparcimiento de una muestra diluida de sangre entera de un adulto varón sano correspondiente a la luz esparcida en la dirección de incidencia a  $\lambda_0 = 413.1$  nm y  $\lambda_0 = 632.8$  nm. Los aglomerados de eritrocitos (RBC), y leucocitos consistentes de linfocitos (L), granulocitos (G), monocitos (M), y trombocitos (T), pueden ser identificados. Crédito: Neukammer y Rinneberg (1998) [27].

Sin embargo, en lo respectivo a los RBC y glóbulos blancos o leucocitos (WBC, por sus siglas en inglés *White Blood Cells*), será necesario realizar mediciones sobre sus señales de luz para que este método de identificación sea capaz por sí mismo de diferenciar entre los dos especímenes e identificar precursores celulares normales y células malignas (empleándose para ello paneles extensos de marcación celular).

El método utilizado puede llegar a ser más rápido y específico que los métodos corrientes usados para la identificación de organismos. Esto se debe a la inferencia de forma indirecta y aproximada de las diferencias en las señales de luz dadas por las muestras, al ser introducidas en el arreglo experimental. La clasificación certera, así como también el pronóstico de diversas muestras depende, entre otros factores, de un conocimiento previo de las muestras, es decir, crear una base de datos con varias muestras y características a fin de poder estimar estadísticamente que la señal extinción y esparcimiento dentro de una zona lógica de interés se correlaciona significativamente mejor con alguna de las muestras de la base de datos en base a sus parámetros.



# Conclusiones

En este trabajo se desarrolló una metodología que permite resolver poblaciones celulares dentro de un haz de luz colimado, a través de la medición de la extinción y esparcimiento de la luz a ángulos menores a  $11.45^\circ$ , respecto a la dirección de propagación del haz. Se analizó su aplicación para la estimación de tamaños y densidad de población, dentro del espectro visible (462 nm hasta 630 nm). Además, se condujeron experimentos para explorar la viabilidad de medir procesos biológicos, tales como la lisis celular, y la identificación de especímenes. A partir de los estudios realizados, se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

- La luz extinguida monitoreada (para un área iluminada de la monocapa de levadura,  $\sigma_0$ ) en un intervalo de tiempo  $\Delta t = 10$  s es constante y solo varía respecto a la densidad de levadura (partículas/mm<sup>2</sup>),  $N_T$ , presente dentro de  $\sigma_0$ . Esta densidad se puede calcular rápidamente por medio de la fracción de área ocupada por la levadura dentro del área del haz de luz incidente,  $A_f$ , y del tamaño promedio  $\bar{D}$ . Resultando en una fracción de área promedio  $A_f=0.0299\pm 0.0008$  y una concentración promedio  $N_T=1227\pm 175$ . Además, las distribuciones de tamaños obtenidas con forma log-normal concuerdan con las distribuciones que se reportan en la literatura para la levadura.
- A partir de las concentraciones celulares de los leucocitos dadas por el laboratorio (del Hospital General de México) para tres donantes voluntarios que no presentan alguna patología aparente, están en el rango de  $4.6\times 10^3$ - $6.7\times 10^3$  partículas/ $\mu$ l. Se mostró que, la luz extinguida es invariante en el tiempo y solo depende de la concentración de leucocitos. Sin embargo, la luz esparcida se ve afectada por el paso del tiempo, el cual daña severamente la morfología de los leucocitos, causando lisis celular. El esquema de medición puede distinguir variaciones en el recuento de leucocitos en suspensiones. Esto resulta en un rango calculado de concentraciones de  $1.5\times 10^3$ - $6.5\times 10^3$  partículas/ $\mu$ l debido a la cinemática de los leucocitos en la celda.

- Utilizando una monocapa de eritrocitos de una donante sana, se mostró la posibilidad de monitorear la hemólisis al medir simultáneamente potencia de la luz esparcida y la sección transversal de esparcimiento de la monocapa. En el experimento realizado se monitoreó la potencia de la luz esparcida, al principio de la medición la potencia esparcida tiene un valor promedio de  $\bar{P} = 35.59 \pm 1.86$  nW en un periodo de  $\Delta t_1 = 48$  mins y finalmente la señal decae con una pendiente  $-1.97541 \times 10^{-13} \cdot t$  a lo largo de un periodo de  $\Delta t_2 = 3$  horas. Sin embargo, durante la medición de la caída de la potencia óptica, se observaron la aparición de picos de intensidad. Estos picos están correlacionados con la caída gradual en la intensidad de los píxeles (en diferentes secciones de la micrografía) de la sección transversal esparcida. Esto fue más notable al comparar las secciones transversales,  $\sigma_{sca}$ , a lo largo del periodo de medición respecto a la micrografía de referencia en  $t = 0$  s,  $\sigma_{sca,t=0}$ , es decir,  $\Delta\sigma_{sca} = \sigma_{sca}/\sigma_{sca,t=0}$  (denominado fracción de la sección transversal esparcida). Para estimar la pérdida celular cuantitativamente, se consideró que la cantidad promedio de eritrocitos en mujeres normalmente está en el rango de  $3.5\text{-}6.0 \times 10^6$  RBC/mm<sup>3</sup>. Además, se asumió que la monocapa de RBC es una monodispersión con un tamaño promedio  $\bar{D} = 7.5$   $\mu\text{m}$ , donde los eritrocitos son perfectamente circulares y no se superponen entre sí. Esto resultó en una cantidad promedio inicial de  $\bar{N} = 8485 \pm 151$  RBC durante los primeros 14 minutos y después decae hasta alcanzar una cantidad promedio final de  $\bar{N} = 2218 \pm 194$  células.
- En relación con el diseño de la instrumentación electrónica, los amplificadores de transimpedancia fueron especialmente esenciales para la medición de luz, identificación de las muestras y su posterior análisis. Al disponer de una ganancia programable hubo la capacidad de medir con precisión rangos dinámicos muy grandes. Para garantizar la estabilidad y al mismo tiempo lograr un gran ancho de banda y un bajo nivel de ruido, se tomó en cuenta que el valor de  $R_F$  influencia el ancho de banda deseado, para lo cual se pueden conectar varias resistencias en serie de menor valor para alcanzar el valor deseado, de igual manera en el valor de  $C_F$ . Este capacitor fue añadido, para eliminar el pico de ganancia, rizado en la señal escalonada de salida y problemas de ruido en el pico de ganancia.
- Al comparar los datos experimentales de la luz esparcida y extinguida (a  $\lambda_0 = 462$  nm,  $\lambda_0 = 518$  nm y  $\lambda_0 = 630$  nm) para diferentes monocapas (levadura, hongo, agua, PMMA y polvo), se evaluó la posibilidad de discernir, dentro de un finito número de posibilidades, un tipo de muestra respecto a otra. En las gráficas las monocapas de polvo y PMMA permanecen cercanas entre sí independientemente de la longitud de onda incidente. La cercanía entre ambas muestras en los gráficos podría indicar que, en la monocapa de polvo hay presencia de partículas menores a 10  $\mu\text{m}$  (PM10) y menores a 2.5  $\mu\text{m}$  (PM2.5) sobre el sustrato. A  $\lambda_0 = 462$  nm y  $\lambda_0 = 518$  nm, la señal

correspondiente a la levadura permanece cercana respecto a las microgotas de agua. Sin embargo, las esporas del hongo de la naranja permanecen aisladas de las demás muestras para cada longitud de onda. capa. Estos datos sugieren la capacidad de distinguir, en principio, algunas especies de muestras.



# A. Electrónica

En esta sección se abordan los principales elementos relacionados al diseño e implementación electrónica de la adquisición y el acondicionamiento de la señal debida a la luz transmitida y esparcida por el esquema óptico de medición (véase Fig. 3.2). Esto incluye un análisis de los principales aspectos a considerar, tales como el ancho de banda, la ganancia de ruido y las principales fuentes de ruidos que afectan su funcionamiento, con el fin de garantizar su correcto funcionamiento mediante la estabilidad de este sistema y haciendo hincapié en las características de los componentes utilizados.

## A.1 Amplificador de transimpedancia (TIA)

Un fotodiodo puede generar una pequeña corriente, en una magnitud de picoamperes o menor, cuando su superficie es iluminada con una energía mayor que la energía de la banda prohibida ancha del material [89]. Existen dos modos de funcionamiento para el fotodiodo, el modo fotovoltaico y el modo fotoconductor, a fin de medir la luz incidente sobre el mismo. Ambos modos tienen sus propias ventajas y desventajas, y la selección del modo dependerá exclusivamente de la aplicación.

Modo fotovoltaico, Fig. A.1a: este modo tiene un potencial de voltaje igual a cero a través del fotodiodo, es decir, no fluye corriente oscura a través del fotodiodo. La linealidad y la sensibilidad se maximizan y el nivel de ruido es relativamente bajo (quedando únicamente el ruido térmico  $R_j$ ), lo que hace este modo el adecuado para aplicaciones de precisión.

Modo fotoconductor, Fig. A.1b: en este modo hay un voltaje de polarización inverso a través del fotodiodo. Este voltaje reduce la capacitancia de la unión del diodo y acorta el tiempo de respuesta. Por lo tanto, este modo es adecuado para aplicaciones de alta velocidad. Los principales inconvenientes de este modo son la no linealidad y altos niveles de ruido (ruido térmico de  $R_j$  y corriente oscura  $I_D$ ).

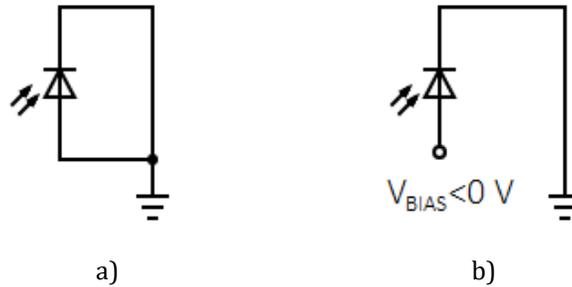


Fig. A.1. Modos de operación del fotodiodo. a) Modo fotovoltaico. b) Modo fotoconductor

Si el fotodiodo es utilizado en aplicaciones de baja frecuencia (hasta 350 kHz) [90], se requiere linealidad y su aplicación para la detección de niveles ultra bajos de luz, el tipo de modo que debe ser utilizado es el del tipo fotovoltaico. Además de ofrecer una configuración operacional simple, las fotocorrientes en este modo tienen muchas menos variaciones en la responsividad con la temperatura.

Se sabe que la fotocorriente es proporcional a la potencia de luz incidente, por lo que ahora debe ser convertida a voltaje. Considere como ejemplo el convertidor de corriente a voltaje de fotodiodo de la Fig. A.2 que se denominará pasivo pues implementa solo con componentes pasivos. Su voltaje de salida es igual a  $I_P \cdot R_F$ , pero presenta la desventaja de que a grandes valores de  $R_F$  pueden resultar en un tiempo de respuesta relativamente largo.

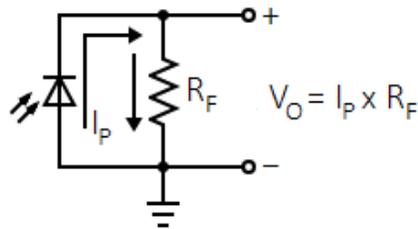


Fig. A.2. Conversor pasivo de corriente del fotodiodo a voltaje.

Como elemento sensor se empleó el fotodiodo PD-10D (OSI Optoelectronics) [91] en modo fotovoltaico. Este fotodiodo es utilizado para aplicaciones de alta sensibilidad, alta velocidad y con una excelente respuesta espectral, en un rango de longitudes de onda que se extiende de 350 a 1100 nm, haciéndolo ideal para aplicaciones, en el rango visible e infrarrojo cercano, en equipamiento analítico y de mediciones ópticas. Dos de sus características eléctricas más importantes son su capacitancia ( $C_J$ ) de 1500 pF y su resistencia shunt ( $R_{SH}$ ) que es de 125 M $\Omega$ .

Dentro del gran abanico de posibles configuraciones del circuito para la lectura de las mediciones de voltajes, se opta por la configuración del amplificador de transimpedancia (TIA), representado en la Fig. A.3. Este se le denomina amplificador de fotodiodo al dispositivo que convierte la corriente del fotodiodo activo a voltaje. Este circuito es un convertidor de corriente a voltaje que ofrece la ventaja de una baja impedancia al fotodiodo, una respuesta en frecuencia

uniforme para el ancho de banda requerido y una ganancia ajustable al seleccionar la resistencia de retroalimentación  $R_F$ .

El valor de la resistencia  $R_F$  debe ser lo más grande posible para dar una alta ganancia de transimpedancia a la fotocorriente.

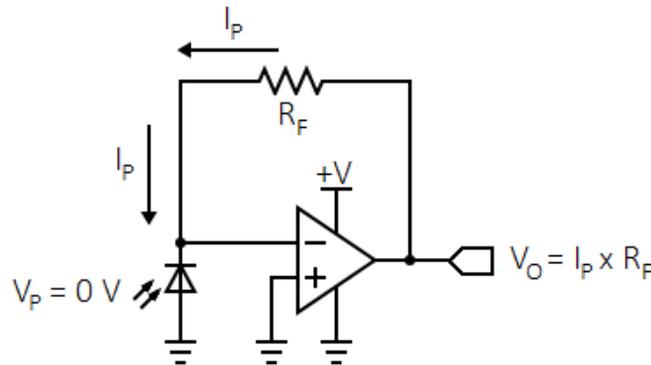


Fig. A.3. Esquema de amplificador de transimpedancia

## A.2 Selección del amplificador operacional (OPAMP)

La selección de un amplificador operacional (OPAMP) adecuado para el amplificador de fotodiodo es fundamental. En la hoja de datos de un amplificador operacional hay muchas especificaciones de corriente continua (CC) y corriente alterna (CA). Por tanto, se analizarán varios puntos clave para el diseño del amplificador del fotodiodo, a fin de mejorar el funcionamiento del circuito.

- Una corriente de polarización de entrada ( $I_B$ ) lo suficientemente baja para mantener el error de voltaje dentro de un rango aceptable para su implementación.
- Bajo voltaje de offset ( $V_{OS}$ ) y una baja deriva en el  $V_{OS}$  con la temperatura.
- Un producto ganancia-ancho de banda ( $GBWP$ ) lo suficientemente grande para cumplir con el requisito del tiempo de respuesta del paso de salida, que se analizará con más detalle más adelante.
- Baja densidad del ruido de corriente de entrada ( $i_{ni}$ ) y baja densidad del ruido de voltaje de entrada ( $e_n$ ).
- Baja capacitancia a la entrada ( $C_{OP}$ ).

Considerando los parámetros anteriores, se selecciona el amplificador operacional MCP6491T (Microchip) [92], algunas de sus las características más importantes se enlistan en la Tabla A.1.

Tabla A.1. Especificaciones del amplificador operacional MCP6491T

Descripción	Valor
Voltaje de offset ( $V_{OS}$ )	$\pm 1.5$ mV (máximo)
Deriva del voltaje de offset ( $\Delta V_{OS}/\Delta T_A$ )	$\pm 2.5$ $\mu$ V/ $^{\circ}$ C
Corriente de polarización ( $I_B$ )	$\pm 1$ pA
Producto ganancia-ancho de banda ( $GBWP$ )	7.5 MHz
Densidad de ruido del voltaje ( $e_{ni}$ )	19 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$
Densidad de ruido de corriente ( $i_{ni}$ )	0.6 fA/ $\sqrt{\text{Hz}}$
Capacitancia de entrada ( $C_{OP}$ )	12 pF (típica)

### A.2.1 Selección de la resistencia de realimentación ( $R_F$ )

Se sabe que la fotocorriente es proporcional a la potencia de la luz incidente en el fotodiodo, estas corrientes son muy pequeñas, por lo que el valor de  $R_F$  suele ser lo más grande posible para tener una alta ganancia de transimpedancia respecto a la fotocorriente. Por lo general, esta ganancia debe ser lo suficientemente grande para utilizar la mayor parte del voltaje de salida del amplificador operacional cuando la fotocorriente esté en su máximo valor, en la primera etapa de acondicionamiento de la señal. Sin embargo, en la realidad el valor de  $R_F$  no puede ser más alto que el de  $R_{SH}$ , el ruido del voltaje de offset y el ruido a la entrada del amplificador se multiplicarían por  $1 + R_F/R_{SH}$  y se superpondrá con el voltaje de salida  $V_o$ , además un incremento en el error debido por la corriente de polarización [93].

Por lo general, esta ganancia debe ser lo suficientemente grande para utilizar la mayor parte del voltaje de salida del amplificador operacional cuando la fotocorriente esté en su valor máximo. La señal de salida viene dada por

$$V_o = R_F \cdot I_p \quad (\text{A.1})$$

y la ecuación que rige la ganancia es

$$R_F = \frac{V_o}{I_p} \quad (\text{A.2})$$

Con un voltaje de alimentación en el TIA de  $V_{DD} = 2.5$  V, la salida de voltaje del TIA oscila entre 0 V y 2.5 V. Este intervalo de salida de voltaje corresponde a la corriente del fotodiodo a escala completa de  $I_p$  medida cuando el LED, Fig. 3.1, está trabajando con un ciclo máximo de trabajo del 85% en la señal de reloj. Los valores de corriente máxima detectado por cada uno de los fotodiodos del esquema de la Fig. 3.5 a cada una de las  $\lambda_0$  y el valor resistivo de  $R_F$ , para tener la escala completa de voltaje a la salida del TIA, son presentados en la Tabla A.2.

Tabla A.2. Valores resistivos de  $R_F$ .

$\lambda_0$	PD <sub>1</sub>		PD <sub>2</sub>		PD <sub>3</sub>	
	$I_{PD1}$ (nA)	$R_{F1}$ (MΩ)	$I_{PD2}$ (nA)	$R_{F2}$ (MΩ)	$I_{PD3}$ (nA)	$R_{F3}$ (MΩ)
460 nm	190.70	13.1	106.35	23.5	77.60	32.2
515 nm	209.00	12.0	144.00	17.3	123.00	20.3
638 nm	251.70	9.9	231.35	10.8	194.80	12.8

Los valores de resistencias calculados en la Tabla A.1 son muy específicos y puede que no coincidan con los valores estándar disponibles en el mercado. Con el fin de mantener el ancho de banda deseado, que es inherente a los valores de resistencia de la Tabla A.1, se pueden conectar en serie varias resistencias o en paralelo hasta conseguir el valor nominal deseado [94].

### A.2.2 Selección del capacitor de realimentación ( $C_F$ )

El amplificador de transimpedancia no siempre se comporta como se desea. Esto se refiere a los fenómenos anómalos, que ocurre en la región de las altas frecuencia, el pico de ganancia y sobreoscilación o *ringing* en el flanco de salida [93,95]. Esto es provocado por la reactancia capacitiva del fotodiodo y la  $C_{OP}$  del AO utilizado por el TIA, y resulta en altos niveles de ruido a la salida que pueden degradar severamente la integridad de la señal de salida.

Lo anterior hace que el TIA sea inestable y un pequeño capacitor ( $C_F$ ) puede ser añadido en el bucle de retroalimentación para eliminar el pico de ganancia, rizado en la señal escalonada de salida y problemas de ruido en el pico de ganancia. La se logra la estabilidad a través de  $C_F$  y la expresión de cómo determinar el valor de  $C_F$  para obtener la respuesta óptima de salida [95,96].

$$C_F \approx 2 \sqrt{\frac{C_J + C_{OP}}{2\pi \cdot R_F \cdot GBWP}} \quad (A.3)$$

Los valores capacitivos presentados en la Tabla A.3 muestran que se requieren valores muy pequeños para estabilizar el TIA y lograr el ancho de banda deseado.

Tabla A.3. Tabla de valores  $C_F$  calculados para cada canal.

Longitud de onda, $\lambda_0$	$C_{F1}$ (pF)	$C_{F2}$ (pF)	$C_{F3}$ (pF)
460 nm	3.1	2.3	2.0
515 nm	3.3	2.7	2.5
638 nm	3.6	3.4	3.2

### A.2.3 TIA de ganancia programable

Debido a que una muestra cualquiera puede tener bandas de absorción a ciertas longitudes de onda y ser casi transparente a otras longitudes de onda, es necesario agregar diversas ganancias programables para aumentar el rango dinámico de la señal de salida, Fig. A.4. La forma de implementar la ganancia programable en un TIA es que la salida se mantenga lineal en una región, inclusive con intensidades luminosas muy altas a la entrada del sistema [96].

Para implementar la ganancia programable normalmente en el TIA se utilizó interruptores (o *switches*) analógico SP3T (por sus siglas en inglés *Single Pole Tree-way Throw*) TS5A3357 (Texas Instrument), en sus características incluyen: una resistencia de e  $5\text{-}\Omega$  al encendido del interruptor, posee una baja corriente de fuga  $\pm 1\ \mu\text{A}$ , las entradas soportan hasta 5.5 V, una baja distorsión armónica total THD (por sus siglas en inglés *Total Harmonic Distortion*) y un voltaje de operación de 1.65 V a 5.5 V. Siendo estos interruptores pequeños, de rápida operación, que facilitan la implementación protecciones contra el ruido.

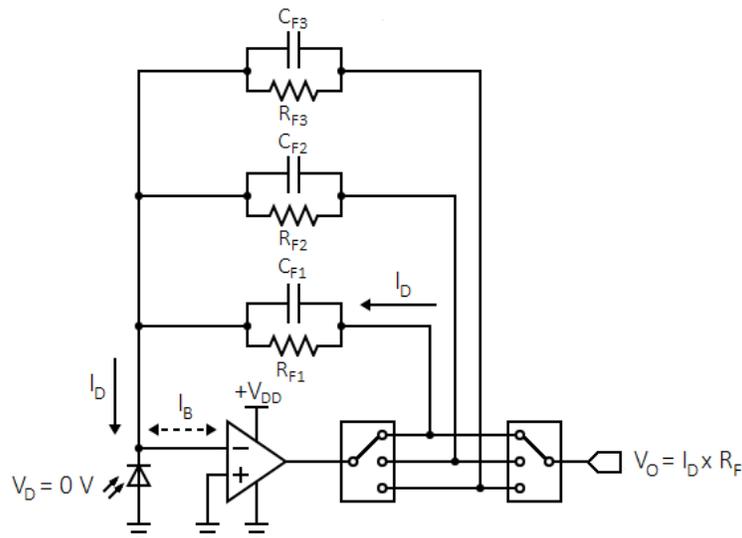


Fig. A.4. Esquema general de un TIA con ganancia programable

### A.3 Calibración del sistema

En la presente sección se presentan los datos correspondientes a la fuente de iluminación tricolor, tales como su respectivo espectro de luz correspondiente a la Fig. 3.1 y la linealidad del consumo de corriente, mediante el controlador de la Fig. 3.4, respecto al ancho del ciclo de trabajo.

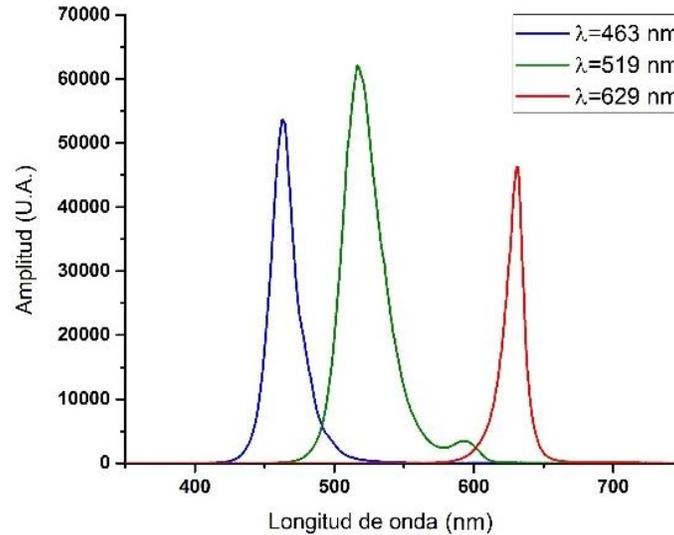


Fig. A.5. Espectros de luz correspondientes al LED-P1RGB60-120/43 (SiLed) utilizando un espectrómetro LR1-T (ASEQ Instruments, Canadá).

El diodo LED RGB (por sus siglas en inglés *Red* (Rojo), *Green* (Verde) y *Blue* (Azul)) comercial con una potencia de salida de 3 W y cuyas características son mostradas en la Tabla A.4.

Tabla A.4. Especificaciones ópticas del LED RGB de alta potencia LED-P1RGB60-120/43.

Color	Longitud de onda, $\lambda_0$	FWHM (nm)
Rojo (R)	$629.93 \pm 0.01$ nm	$17.34 \pm 0.10$
Verde (G)	$517.7 \pm 0.04$ nm	$32.43 \pm 0.51$
Azul (B)	$462.2 \pm 0.2$ nm	$25.7 \pm 0.17$

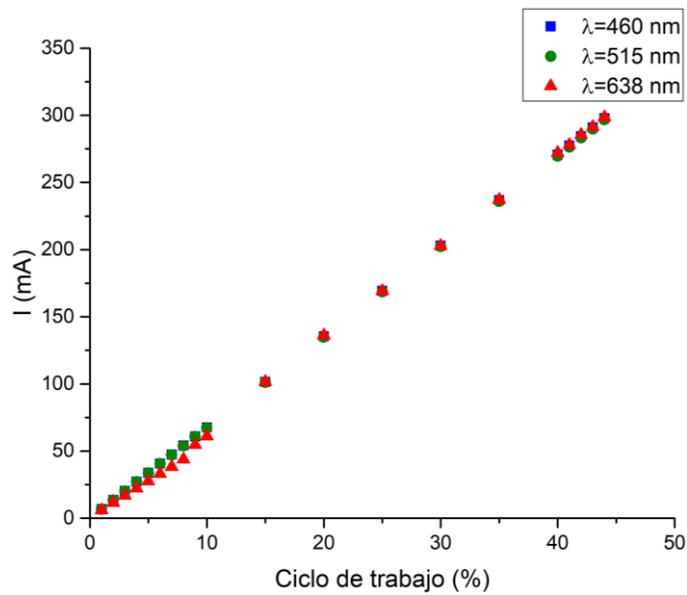


Fig. A.6. Corriente consumida en función del ancho del pulso del ciclo de trabajo de la señal de reloj. El gráfico muestra la linealidad y estabilidad de la señal en las tres diferentes longitudes de onda de emisión para el LED RGB, cuya potencia máxima de salida es de 1 W y corriente máxima de consumo es 350 mA.

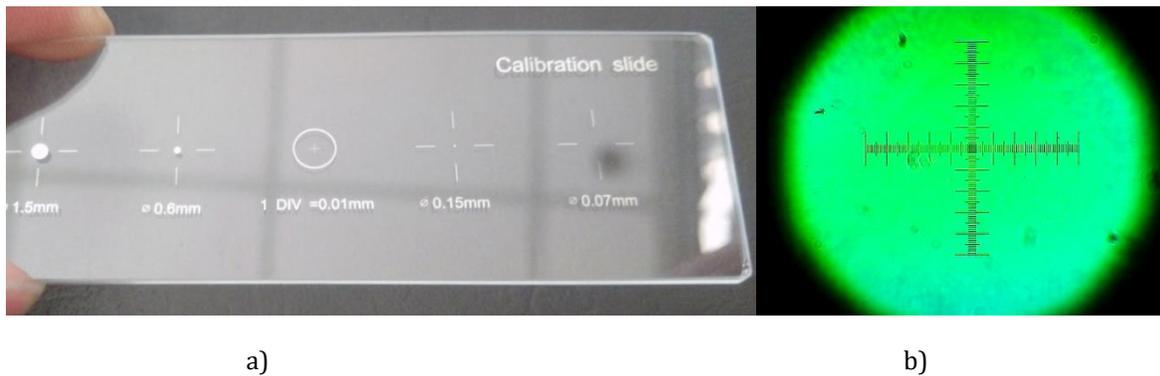


Fig. A.7. La calibración del plano objeto se realiza con una regla de calibración (a) en los ejes  $x$  y  $y$ , con una longitud de 1 mm en cada eje y dividido en 100 partes (mínima división de 10  $\mu\text{m}$ ), se coloca en la posición S de la Fig. Fig. 3.2 y Fig. 3.8, donde (b) ejemplifica la regla de calibración en la posición S.

# B. Listado de código en MATLAB

## B.1 Evaluación numérica de la teoría de Mie: código en MATLAB

Christian Mätzler en 2002 [97,98] presenta una versión del código del apéndice A de Bohren y Huffman en “*Absorption and scattering of light by small particles*” [15]. Este código está programado para esferas homogéneas.

### B.1.1 Función de Mie

El código a continuación es el programa para calcular las eficiencias de Mie.

```
function result = Mie(m, x)

% Computation of Mie Efficiencies for given
% complex refractive-index ratio m=m'+im"
% and size parameter x=k0*a, where k0= wave number in ambient
% medium, a=sphere radius, using complex Mie Coefficients
% an and bn for n=1 to nmax,
% s. Bohren and Huffman (1983) BEWI:TDD122, p. 103,119-122,477.
% Result: m', m", x, efficiencies for extinction (qext),
% scattering (qsca), absorption (qabs), backscattering (qb),
% asymmetry parameter (asy=<costeta>) and (qratio=qb/qsca).
% Uses the function "mie_abcd" for an and bn, for n=1 to nmax.
% C. Mätzler, May 2002.

if x==0 % To avoid a singularity at x=0
result=[real(m) imag(m) 0 0 0 0 0 0 1.5];
elseif x>0 % This is the normal situation
nmax=round(2+x+4*x^(1/3));
n1=nmax-1;
n=(1:nmax);cn=2*n+1; c1n=n.*(n+2)./(n+1); c2n=cn./n./(n+1);
x2=x*x;
f=mie_abcd(m,x);
```

```

anp=(real(f(1,:))); anpp=(imag(f(1,:)));
bnp=(real(f(2,:))); bnpp=(imag(f(2,:)));
g1(1:4,nmax)=[0; 0; 0; 0]; % displaced numbers used for
g1(1,1:n1)=anp(2:nmax); % asymmetry parameter, p. 120
g1(2,1:n1)=anpp(2:nmax);
g1(3,1:n1)=bnp(2:nmax);
g1(4,1:n1)=bnpp(2:nmax);
dn=cn.*(anp+bnp);
q=sum(dn);
qext=2*q/x2;
en=cn.*(anp.*anp+anpp.*anpp+bnp.*bnp+bnpp.*bnpp);
q=sum(en);
qsca=2*q/x2;
qabs=qext-qsca;
fn=(f(1,:)-f(2,:)).*cn;
gn=(-1).^n;
f(3,:)=fn.*gn;
q=sum(f(3,:));
qb=q*q'/x2;
asy1=c1n.*(anp.*g1(1,:)+anpp.*g1(2,:)+bnp.*g1(3,:)+bnpp.*g1(4,:));
asy2=c2n.*(anp.*bnp+anpp.*bnpp);
asy=4/x2*sum(asy1+asy2)/qsca;
qratio=qb/qsca;
result=[real(m) imag(m) x qext qsca qabs qb asy qratio];
end;

```

## B.1.2 Función para los coeficientes de esparcimiento $a$ , $b$ , $c$ y $d$

El código a continuación calcula los coeficientes de Mie  $a_n$ ,  $b_n$ ,  $c_n$ ,  $d_n$  y producir una matriz de  $n_{max}$  de vectores columna  $[a_n; b_n; c_n; d_n]$ :

```

function result = mie_abcd(m,x)

% Computes a matrix of Mie coefficients, a_n, b_n, c_n, d_n,
% of orders n=1 to nmax, complex refractive index m=m'+im'',
% and size parameter x=k0*a, where k0= wave number
% in the ambient medium, a=sphere radius;
% p. 100, 477 in Bohren and Huffman (1983) BEWI:TDD122
% C. MŠtzler, June 2002

nmax=round(2+x+4*x^(1/3));
n=(1:nmax); nu = (n+0.5); z=m.*x; m2=m.*m;
sqx= sqrt(0.5*pi./x); sqz= sqrt(0.5*pi./z);
bx = besselj(nu, x).*sqx;
bz = besselj(nu, z).*sqz;
yx = bessely(nu, x).*sqx;
hx = bx+i*yx;
blx=[sin(x)/x, bx(1:nmax-1)];
blz=[sin(z)/z, bz(1:nmax-1)];
ylx=[-cos(x)/x, yx(1:nmax-1)];
hlx= blx+i*ylx;
ax = x.*blx-n.*bx;
az = z.*blz-n.*bz;
ahx= x.*hlx-n.*hx;

```

```

an = (m2.*bz.*ax-bx.*az)./(m2.*bz.*ahx-hx.*az);
bn = (bz.*ax-bx.*az)./(bz.*ahx-hx.*az);
cn = (bx.*ahx-hx.*ax)./(bz.*ahx-hx.*az);
dn = m.*(bx.*ahx-hx.*ax)./(m2.*bz.*ahx-hx.*az);
result=[an; bn; cn; dn];

```

### B.1.3 Funciones las funciones angulares $\tau_n$ y $\pi_n$

El código a continuación calcula la matriz de las funciones angulares  $\tau_n$  y  $\pi_n$  para  $n = 1$  hasta  $n = n_{max}$ .

```

function result=Mie_pt(u,nmax)

% pi_n and tau_n, -1 <= u= cos <= 1, n1 integer from 1 to nmax
% angular functions used in Mie Theory
% Bohren and Huffman (1983), p. 94 - 95
p(1)=1;
t(1)=u;
p(2)=3*u;
t(2)=3*cos(2*acos(u));
for n1=3:nmax,
    p1=(2*n1-1)./(n1-1).*p(n1-1).*u;
    p2=n1./(n1-1).*p(n1-2);
    p(n1)=p1-p2;
    t1=n1*u.*p(n1);
    t2=(n1+1).*p(n1-1);
    t(n1)=t1-t2;
end;
result=[p;t];

```

### B.1.4 Funciones de amplitud $S_1$ y $S_2$

El código a continuación calcula las dos amplitudes de esparcimiento  $S_1$  y  $S_2$ :

```

function result = Mie_S12(m, x, u)

% Computation of Mie Scattering functions S1 and S2
% for complex refractive index m='m'+im",
% size parameter x=k0*a, and u=cos(scattering angle),
% where k0=vacuum wave number, a=sphere radius;
% s. p. 111-114, Bohren and Huffman (1983) BEWI:TDD122
% C. Mätzler, May 2002
nmax=round(2+x+4*x^(1/3));
abcd=Mie_abcd(m,x);
an=abcd(1,:);
bn=abcd(2,:);
pt=Mie_pt(u,nmax);
pin =pt(1,:);
tin=pt(2,:);
n=(1:nmax);
n2=(2*n+1)./(n.*(n+1));
pin=n2.*pin;

```

```

tin=n2.*tin;
S1=(an*pin'+bn*tin');
S2=(an*tin'+bn*pin');
result=[S1;S2];

```

### B.1.5 Función para calcular la intensidad en función $\theta$

El código a continuación calcula la matriz de las intensidades  $i_1 = |S_1|^2$  y  $i_2 = |S_2|^2$  del esparcimiento de Mie como función de  $\cos(\theta)$ , y visualiza el resultado del diagrama polar de  $\theta$  con la intensidad  $i = i_1 + i_2$ .

```

function result = Mie_tetascan(m, x, nsteps)

% Computation and plot of Mie Power Scattering function for given
% complex refractive-index ratio m=m'+im", size parameters x=k0*a,
% according to Bohren and Huffman (1983) BEWI:TDD122
% C. Mätzler, May 2002.
nsteps=nsteps;
m1=real(m); m2=imag(m);
nx=(1:nsteps); dteta=pi/(nsteps-1);
teta=(nx-1).*dteta;
for j = 1:nsteps,
u=cos(teta(j));
a(:,j)=Mie_S12(m,x,u);
SL(j)= real(a(1,j)'*a(1,j));
SR(j)= real(a(2,j)'*a(2,j));
end;
y=[teta teta+pi;SL SR(nsteps:-1:1)]';
polar(y(:,1),y(:,2))
title(sprintf('Mie angular scattering: m=%g+%gi, x=%g',m1,m2,x));
xlabel('Scattering Angle')
result=y;

```

## B.2 Calcular la densidad de partículas por unidad de área iluminada

```

clear;
clc;
close all;

% Cargar las imágenes correspondientes de: transmitancia y esparcimiento
[file,rtn]=fopenimgESv1();
if rtn==0
return
else
[filepath,name] = fileparts(file);
n = 1;
rgb = imread(file(1)); % Imagen Original
figure, imshow(rgb)
gray_image = rgb2gray(rgb); % Convertir imagen a escala de grises

```

```

figure,imshow(gray_image)

bw = gray_image > 12;          % Convertir imagen de grises a binaria
imshow(bw)
se = strel('disk',2);
closeBW = imclose(bw,se);    % Rellenar espacios
imshow(closeBW)
BW1 = edge(closeBW, 'canny'); % Busca los bordes de la imagen
figure, imshow(BW1)

% Total de puntos correspondientes a los bordes en la imagen binaria
% BW1, donde los bordes=1 y fondo=0,
Nedge=sum(BW1>0, 'all');
% Crear una matriz para las coordenadas de los bordes
pt = zeros(Nedge,2);

% Hallar las coordenadas (x,y)>0
for i=1:size(BW1,1)
    for j=1:size(BW1,2)
        if BW1(i,j)==1
            pt(n,1)=j;
            pt(n,2)=i;
            n=n+1;
        end
    end
end

% Argumentos:
x = pt(:,1); % x = coordenadas x
y = pt(:,2); % y = coordenadas y
% Resolver por minimos cuadrados
% Empezamos con la ec. de la circunferencia
% (x-x0).^2 + (y-y0).^2 = r.^2
% y expandimos
% x.^2 - 2*x*x0 + x0^2 + y.^2 - 2*y*y0 + y0.^2 = r.^2
% Cambiamos a la forma matricial
% [-2x -2y 1] [x0 y0 -r.^2+x0^2+y0^2]' = -(x.^2 + y.^2)
% Resolver sistemas de ecuaciones lineales Ax = B para x:
A = [-2*x -2*y ones(length(x),1)];
B = -(x.^2+y.^2);
x = A\B;
% Salida de datos de la sección transversal del haz de luz:
x0 = x(1); % x0 = coordenada x del centro del haz
y0 = x(2); % y0 = coordenada y del centro del haz
r = sqrt(x0.^2+y0.^2-x(3)); % r = radio del haz
% Crear círculo con los datos calculados (x0,y0,r)
Areal=pi*r^2;

th = 0:pi/n:2*pi;
xunit = r * cos(th) + x0;
yunit = r * sin(th) + y0;
hold on
plot(round(xunit), round(yunit), '-r', 'LineWidth',2);
hold off

rgbS = imread(file(2));
gray_imageS = rgb2gray(rgbS); % Convertir imagen a escala de grises

```

```

figure,imshow(gray_imageS)

bwS = gray_imageS > 44;          % Convertir imagen de grises a binaria
figure,imshow(bwS)
% # de partículas dentro del haz de luz colimado
Npart = sum(bwS>0, 'all')
vf = Npart/Areal;
fprintf('La fracción de partículas es %f\n',vf);
end

```

## B.2.1 Función fopenimgESv1()

Función para buscar y verificar que los archivos de imágenes (transmisión y esparcimiento) de la muestra de acuerdo con el siguiente formato,

Color(R/G/B)+Número\_de\_la\_imagen+"\_" + ext/sca(Extinción/Esparcimiento).\*,

exista en la ubicación seleccionada.

```

function [file,rtn] = fopenimgESv1()

% Verificar que el formato de la imagen sea válido
% "ColorNúmero_ext/sca"
pathname = uigetdir('','Abrir directorio raíz de las imágenes');
pathname = pathname+"\\";
Colorlist = {'Azul','Verde','Rojo'};
RGBlist = {'B','G','R'};% B = Azul, G = Verde, R = Rojo
ES = ["ext";"sca"];      % ext = Extinción, sca = Esparcimiento
fname = strings(size(ES));
fpath = strings(size(ES));
file = strings(size(ES));
fextend = [".bmp"; ".jpg"; ".jpeg"; ".jpe"; ".png"];

[indx,tf] = listdlg('PromptString',{'Elige un color.',...
    '(Solo se puede elegir una opción a la vez)',''},...
    'SelectionMode','single','ListString',Colorlist);
if isempty(indx)
    disp('No se seleccionó una opción');
    rtn=0;
else
    strRGB = string(RGBlist(indx));
    prompt = {'Digita el número de la imagen (int)'};
    dlgtitle = "# de imagen";
    definput = '1';
    dims = [1 40];
    opts.Interpreter = 'tex';
    Imgnum = inputdlg(prompt,dlgtitle,dims,{num2str(definput)},opts);

    if isempty(Imgnum),return,end % En caso de hacer clic en "Cancel"
    numericValue = str2double(cell2mat(Imgnum));
    if isempty(numericValue) || isnan(numericValue)
        % No se ingreso un número
        % Se hizo clic en "Cancel", o se ingresó un carácter, símbolo, o

```

```

    % algo no permitido
    numericValue = definput;
    message = sprintf("Tiene que ser un valor numerico entero.\nSe
usar %d para continuar.", numericValue);
    uiwait(warndlg(message));
end

for a=1:length(ES)
    fname(a) = strRGB+string(Imgnum)+"_"+ES(a);
    fpath(a) = pathname+fname(a);
end
a=1;
while a<length(fextend)
    if exist(fpath(1)+fextend(a), 'file')==2 &&
exist(fpath(2)+fextend(a), 'file')==2
        fprintf("Archivos encontrados\n");
        for a1=1:length(ES)
            file(a1) = fpath(a1)+fextend(a);
        end
        rtn=1;
        break;
    else
        file = strings(size(ES));
        rtn=0;
        if exist(fpath(1)+fextend(a), 'file')==2 &&
exist(fpath(2)+fextend(a), 'file')==0
            fprintf("No se encontr %s\n", fname(1)+fextend(a));
        elseif exist(fpath(1)+fextend(a), 'file')==0 &&
exist(fpath(2)+fextend(a), 'file')==2
            fprintf("No se encontr %s\n", fname(2)+fextend(a));
        else
            fprintf("Ningún archivo encontrado\n");
        end
        break;
    end
    a=a+1;
end
end
end

```



## C. Preparación de las muestras

Antes de depositar la monocapa sobre el portaobjetos o fabricar la celda de la suspensión (sección C.2), es necesario realizar la limpieza exhaustiva del portaobjetos y cubreobjetos (solo aplica para la fabricación de la celda). Este proceso se lleva a cabo para eliminar la grasa, polvo y cualquier otro agente que impida que la monocapa pueda depositarse correctamente sobre el sustrato. El proceso para la limpieza del portaobjetos es:

1. Lavar con detergente.
2. Lavar con acetona.
3. Lavar con alcohol isopropílico.
4. Enjuagar con agua tridestilada.
5. Secar con un paño limpiador diseñado para material óptico.

Nótese que la limpieza exhaustiva no garantiza que la monocapa depositada no esté contaminada debido a alguna partícula ajena, sin embargo, la probabilidad de contaminación será casi nula y así se garantiza mediciones experimentales más exactas. Los portaobjetos utilizados durante este trabajo son CLS294775X25 (75 mm × 25 mm, grosor 0.90 – 1.10 mm, Corning®) y los cubreobjetos 2865-22 (22 mm×22 mm, grosor 0.13-0.16 mm, Corning®). Después de limpiar el portaobjetos, ahora se procede a depositar la monocapa o suspensión sobre el sustrato plano.

### C.1 Monocapa

En esta sección se describe, de manera general, el procedimiento experimental utilizado para la fabricación de las monocapas, con partículas de levadura y con partículas RBCs, depositadas sobre los portaobjetos CLS294775X25.

### C.1.1 Levadura

Previo a preparar las suspensiones de levadura de panadero, es necesario conocer (de antemano) la densidad de la muestra y del líquido de la suspensión,

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (C.1)$$

donde  $m$  es la masa y  $V$  es el volumen. La fracción de masa depende de la cantidad de masa de la muestra respecto de la masa total,  $m_T$ ,

$$m_f = \frac{m_m}{m_T} = \frac{m_m}{(m_m + m_{\text{líquido}})}, \quad (C.2)$$

donde  $m_m$  es la masa de la muestra y  $m_{\text{líquido}}$  es la masa de líquido. Es recomendable empezar que la fracción inicial sea de 0.01, para después calcular la masa de muestra necesaria para mantener la suspensión al 1%. A partir de la Ec. C.2, se obtiene la expresión de la masa de muestra total necesaria,  $m_m$ , dado un líquido,  $m_{\text{líquido}}$ , empleado para la suspensión,

$$m_f = 0.01 \rightarrow 0.01 = \frac{m_m}{m_{\text{líquido}} + m_m}$$

$$m_m = \frac{m_{\text{líquido}} \cdot 0.01}{0.99} \quad (C.3)$$

Para la preparación de cada suspensión, se utilizó levadura de panadería comercial (Saf-Instant y Pakmaya) que será disuelta en un volumen de  $V_{\text{líquido}} = 16.0$  ml de alcohol isopropílico, la cual tiene una densidad de  $\rho_{\text{alcohol}} = 0.7809$  g/ml a 25 °C [99], y utilizando la Ec. C.1 se obtiene  $m_{\text{líquido}} \approx 12.5$  g. Considerando una fracción objetivo de  $m_f = 0.01$  y empleando la Ec. C.3, se requiere  $m_m = 126.2$  mg. La Tabla C.1 presenta las cantidades experimentales utilizadas en cada suspensión de partículas.

Tabla C.1. Valores de volumen y masa utilizados para la elaboración de las suspensiones de levadura.

Levadura	$V_{\text{líquido}}$ (ml)	$m_m$ (mg)	$m_f \times 100$ (%)	$V_m$ (ml)	$V_f \times 100$ (%)
Saf-Instant	14.028±0.025	148.0±0.1	1.330±0.003	0.1598±0.1	1.244±0.002
Pakmaya	12.806±0.024	148.0±0.1	1.458±0.003	134.0±0.1	1.036±0.002

En la Tabla C.1, para calcular el volumen correspondiente a la muestra pura de levadura,  $V_m$ , se utiliza la Ec. C.1 ( $V_m = m_m / \bar{\rho}_{\text{levadura}}$ ), donde se considera que la densidad promedio de la

levadura es  $\bar{\rho}_{levadura} = 1.1042 \pm 0.0066$  g/ml [100,101]. De manera análoga a la Ec. C.2, se obtiene que la fracción de volumen que ocupan las partículas en una suspensión es

$$v_f = \frac{v_m}{v_T} = \frac{v_m}{(v_{líquido} + v_m)}$$

donde  $v_m$  es volumen que ocupa la muestra y  $v_T$  es el volumen total (partículas más líquido).  $m_f \times 100\%$  y  $v_f \times 100\%$  en la Tabla C.1 representan las fracciones porcentuales de masa y volumen, respectivamente, de las muestras de levadura.

Cada suspensión se sometió a un baño ultrasónico durante un tiempo aproximado de 10 minutos, a fin de, evitar aglomeraciones de células durante el depósito sobre la superficie del portaobjetos. Para elaborar la monocapa se deja caer una gota de solución preparada con levadura, con la ayuda de una micropipeta P200 (Gilson™), sobre la superficie del sustrato (ver Fig. C.1) hasta cubrir más del 80% de la superficie del portaobjetos. Mediante micro balanza AL-64 (Acculab) se obtiene la masa total de la suspensión ( $\bar{m}_T =$  líquido + levadura) antes de que el líquido se evapore y sea drenado en la parte inferior del portaobjetos, Fig. C.1. Después de la evaporación del líquido, solamente queda la monocapa de levadura depositada sobre la superficie del portaobjetos, ver Fig. C.1, de masa  $\bar{m}_m$  y utilizando la Ec. C.2 se obtiene la fracción  $m_f$  de masa sobre el área del portaobjetos.

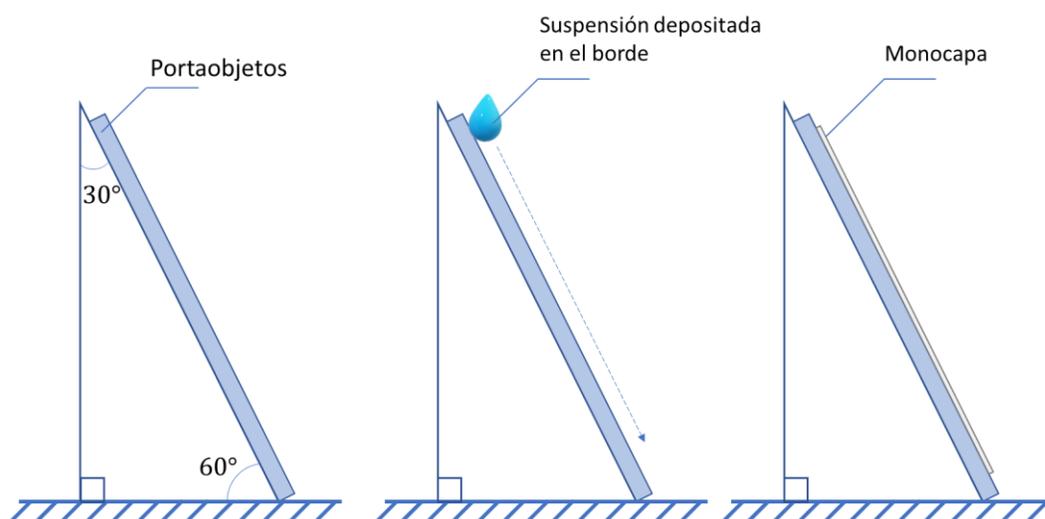


Fig. C.1. Diagrama empleado para depositar las muestras de partículas sobre la superficie plana del portaobjetos.

### C.1.2 Eritrocitos, RBC

El depósito de la monocapa con eritrocitos (RBC) sobre un portaobjetos se realizó mediante la técnica de frotis [102,103], la cual es una técnica dentro del ámbito médico para examinar mediante microscopía una muestra de sangre que fue sometida a un tratamiento especial, de la siguiente manera:

1. Con las manos previamente lavadas y desinfectadas, y con la palma de la mano hacia arriba. Se elige cualquier dedo y se limpia la yema del dedo frotando un algodón impregnado en alcohol, a fin de eliminar la suciedad o grasa que todavía pueda existir, se seca el dedo con un algodón seco y se frota el dedo a fin de estimular la circulación sanguínea.
2. Con una lanceta estéril se realiza una punción con un movimiento de rotación puncione la yema del dedo.
3. Se mantiene una presión suave en el dedo y se deposita una gota de sangre sobre el portaobjetos limpio y esterilizado (procedimiento detallado al principio del Anexo C), dejándola caer sobre el sustrato, Fig. C.2a, que se encuentra sobre una superficie plana y firme; si el portaobjetos tiene una parte esmerilada hay que dejar la gota a una distancia de esta parte esmerilada. La gota para el extendido por frotis debe ser pequeña.
4. Tocar la pequeña gota de sangre con un segundo portaobjetos limpio, PO<sub>2</sub> en la Fig. C.2b, entonces la gota se adhiere a este segundo portaobjetos mediante la tensión superficial, y se extiende con firmeza esta gota de sangre, Fig. C.2c, con un ángulo aproximado de 45°, en dirección a la parte limpia del sustrato. Esto se realiza con el fin de extender la gota uniformemente sobre la superficie del sustrato plano y así conseguir una monocapa sobre PO<sub>1</sub>.

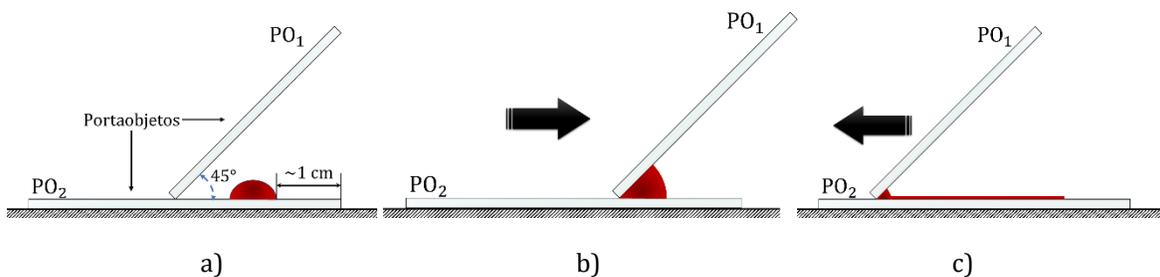


Fig. C.2. Extendido de frotis, los portaobjetos están etiquetados como PO<sub>1</sub> y PO<sub>2</sub>. a) Se coloca una gota de sangre 1 cm abajo del borde de PO<sub>1</sub> y PO<sub>2</sub> se coloca a 45° respecto a PO<sub>1</sub>; b) PO<sub>2</sub> se desplaza hacia la gota de sangre y se llena el borde por capilaridad; c) Se desplaza PO<sub>2</sub> hacia adelante hasta que la gota se termine.

## C.2 Suspensiones

La teoría de Mie está basada en la suposición de que la luz entrante interactúa con una única esfera esparcidora homogénea. Por lo tanto, se preparó una celda plana que contiene únicamente una delgada sección de la suspensión de partículas, en la dirección del haz de luz colimado para reducir el esparcimiento múltiple.

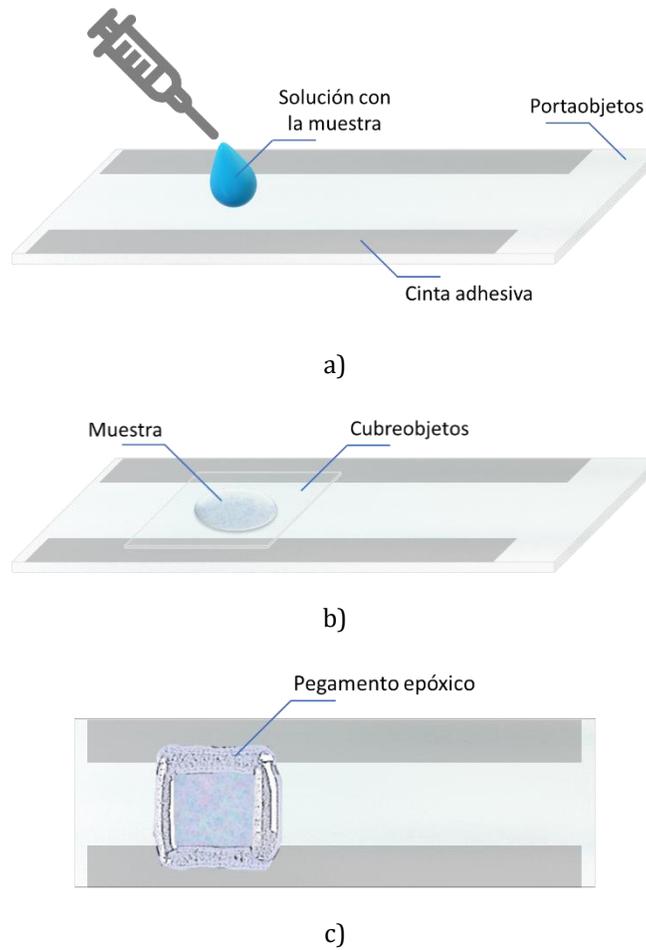


Fig. C.3. Esquema de la fabricación de una celda plana con un espesor menor a  $58 \mu\text{m}$ . a) Se colocan los espaciadores o separaciones, cinta adhesiva; b) Se coloca el cubreobjetos sobre la "gotita" de muestra; c) suspensión de partículas sellada con pegamento epóxico.

Se depositó una pequeña gota de la solución muestra sobre el portaobjetos (Fig. C.3a), donde dos cintas adhesivas son utilizadas como espaciadores, estas tienen un espesor de  $\sim 58 \mu\text{m}$  [104]. Para contener la suspensión y evitar que se derrame, se colocó sobre esta un cubreobjetos, Fig. C.3b. Finalmente, la celda fue sellada por medio de un pegamento epóxico, Fig. C.3c.

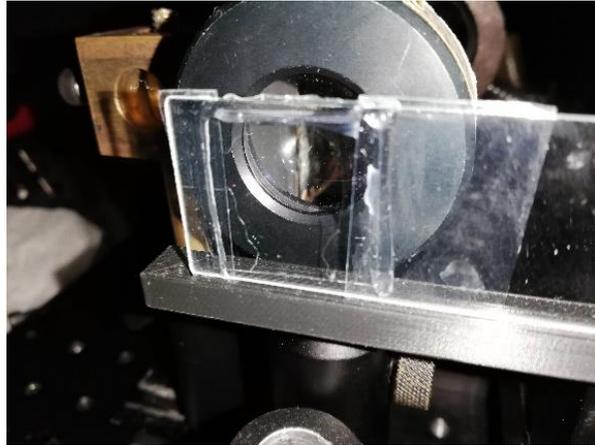


Fig. C.4. Celda colocada en la posición S del arreglo experimental de la Fig. 3.2 y Fig. 3.8.

# Referencias

- [1] P. Latimer y B. Tully, «Small-angle scattering by yeast cells—a comparison with the mie predictions,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 27, nº 3, pp. 475-478, 1968.
- [2] J. R. Lorenzo, *Principles of Diffuse Light Propagation: Light Propagation in Tissues with Applications in Biology and Medicine*, Nueva Jersey: World Scientific, 2012.
- [3] R. Xu, *Particle Characterization: Light Scattering Methods*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [4] H. Rumpf, *Particle Technology*, 1 ed., vol. 1, Múnich: Springer, Dordrecht, 1975.
- [5] H. G. Merkus, *Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality*, vol. 17, Nueva York, NY: Springer, Dordrecht, 2009.
- [6] D. P. Valenzeno y J. W. Trank, «Measurement of cell lysis by light scattering,» *Photochemistry and photobiology*, vol. 42, nº 3, pp. 335-339, 1985.
- [7] V. P. Maltsev, A. G. Hoekstra y M. A. Yurkin, «Optics of White Blood Cells: Optical Models, Simulations, and Experiments,» de *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*, V. V. Tuchin, Ed., Weinheim, John Wiley & Sons, 2011, pp. 63-93.
- [8] G. J. Streekstra, A. G. Hoekstra, E.-J. Nijhof y R. M. Heethaar, «Light scattering by red blood cells in ektacytometry: Fraunhofer versus anomalous diffraction,» *Applied Optics*, vol. 32, nº 13, pp. 2266-2272, 1993.

- [9] J. R. Mourant, I. J. Bigio, J. Boyer, R. L. Conn, T. Johnson y T. Shimada, «Spectroscopic diagnosis of bladder cancer with elastic light scattering,» *Lasers Surg. Med.*, vol. 17, p. 350–357, 1995.
- [10] J. R. Mourant, I. J. Bigio, J. Boyer, T. Johnson y J. Lacey, «Detection of gastrointestinal cancer by elastic-scattering spectroscopy,» *J. Biomed. Opt.*, vol. 1, p. 192–199, 1996.
- [11] V. V. Tuchin, *Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis*, SPIE, 2007.
- [12] L. T. Perelman y et al., «Observation of periodic fine structure in reflectance from biological tissue: a new technique for measuring nuclear size distribution,» *Physical Review Letters*, vol. 80, n° 3, p. 627, 1998.
- [13] E. Żymańczyk-Duda, M. Brzezińska-Rodak, M. Klimek-Ochab, M. Duda y A. Zerka, «Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology,» de *Yeast - Industrial Applications*, A. Morata y I. Loira, Edits., Londres, IntechOpen, 2017, pp. 3-40.
- [14] J. B. Fishkin, O. Coquoz, E. R. Anderson, M. Brenner y B. J. Tromberg, «Frequency-domain photon migration measurements of normal and malignant tissue optical properties in a human subject,» *Appl. Opt.*, vol. 36, pp. 10-20, 1997.
- [15] C. F. Bohren y D. R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1998.
- [16] G. P. Downey y et al., «Retention of leukocytes in capillaries: role of cell size and deformability,» *Journal of Applied Physiology*, vol. 69, n° 5, pp. 1767-1778, 1990.
- [17] R. Kuse y et al., «Blood lymphocyte volumes and diameters in patients with chronic lymphocytic leukemia and normal controls,» *Blut*, vol. 50, n° 4, pp. 243-248, 1985.
- [18] T. Vo-Dinh, *Biomedical Photonics Handbook*, Primera ed., Boca Raton: CRC Press, 2003.
- [19] Z. J. Smith, K. Chu y S. Wachsmann-Hogiu, «Nanometer-scale sizing accuracy of particle suspensions on an unmodified cell phone using elastic light scattering,» *PloS one*, vol. 7, n° 10, p. e46030, 2012.
- [20] Y. Yang, Z. Zhang, X. Yang, J. H. Yeo, L. Jiang y D. Jiang, «Blood cell counting and classification by nonflowing laser light scattering method,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 9, n° 5, pp. 995-1001, 2004.

- [21] H. M. Shapiro, *Practical flow cytometry*, Hoboken, Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2003.
- [22] L. Zhang, Y. Qin, K.-X. Li, X. Zhao, Y.-F. Xing, H. Zhao, Z. Jiang, W. Chen, N.-L. Yao y L. Yuan, «Light scattering properties in spatial planes for label free cells with different internal structures,» *Optical and Quantum Electronics*, vol. 47, p. 1005–1025, 2015.
- [23] D. Watson, N. Hagen, J. Diver, P. Marchand y M. Chachisvilis, «Elastic Light Scattering from Single Cells: Orientational Dynamics in Optical Trap,» *Biophysical Journal*, vol. 87, n° 2, pp. 1298-1306, 2004.
- [24] X. C. Li, J. M. Zhao, C. C. Wang y L. H. Liu, «Improved transmission method for measuring the optical extinction coefficient of micro/nano particle suspensions,» *Applied Optics*, vol. 55, n° 29, pp. 8171-8179, 2016.
- [25] L. Colling, R. N. Carter, M. Essmann y B. Larsen, «Evaluation of Relative Yeast Cell Surface Hydrophobicity Measured by Flow Cytometry,» *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, vol. 13, n° 1, p. 43–48, 2005.
- [26] Z. Wang, J. El-Ali, M. Englund, . T. Gotsæd, I. R. Perch-Nielsen, K. B. Mogensen, D. Snakenborg, J. P. Kutter y A. Wolff, «Measurement of scattered light on a microchip flow cytometer with integrated polymer based optical elements,» *Lab on a Chip*, vol. 4, n° 4, pp. 372-377, 2004.
- [27] V. O. J. Neukammer y H. Rinneberg, «Flow cytometric differentiation of erythrocytes and leukocytes in dilute whole blood by light scattering,» *Cytometry*, vol. 32, n° 2, pp. 191-197, 1998.
- [28] X. Liu, W. Jiao, Y. Du, Q. Chen, Z. Su y M. Fu, «Chlorine Dioxide Controls Green Mold Caused by *Penicillium digitatum* in Citrus Fruits and the Mechanism Involved,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 68, n° 47, p. 13897–13905, 2020.
- [29] R. Márquez-Islas, A. Pérez-Pacheco, L. B. Salazar- Nieva, A. Acevedo-Barrera, E. Mendoza-García y A. García-Valenzuela, «Optical device and methodology for optical sensing of hemolysis in hypotonic media,» *Measurement Science and Technology*, vol. 31, p. 095701, 2020.
- [30] A. Radbruch, *Flow Cytometry and Cell Sorting*, 1 ed., Berlín: Springer, 1992.
- [31] S. A. Sincock y J. P. Robinson, «Flow cytometric analysis of microorganisms,» *Methods in Cell Biology*, vol. 64, n° B, pp. 511-537, 2001.

- [32] V. Backman, R. Gurjar, K. Badizadegan, I. Itzkan, R. R. Dasari, L. T. Perelman y M. S. Feld, «Polarized light scattering spectroscopy for quantitative measurement of epithelial cellular structures in situ,» *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 5, n° 4, pp. 1019 - 1026, 1999.
- [33] L. B. Scaffardi, F. A. Videla y D. C. Schinca, «Visible and near-infrared backscattering spectroscopy for sizing spherical microparticles,» *Applied Optics*, vol. 46, n° 1, pp. 67-75, 2007.
- [34] F. A. Videla, D. C. Schinca y L. B. Scaffardi, «Sizing particles by backscattering spectroscopy and Fourier analysis,» *Optical Engineering*, vol. 45, n° 4, p. 048001, 2006.
- [35] K. A. Popov, «Determination of the Size of Dielectric Particles Using White Light Spectroscopy,» (Tesis Doctoral) Universidad de Drexel, Filadelfia, 2012.
- [36] B. Beauvoit, H. Liu, K. Kang, P. D. Kaplan, M. Miwa y B. Chance, «Characterization of absorption and scattering properties for various yeast strains by time-resolved spectroscopy,» *Cell Biophysics*, vol. 23, p. 91-109, 1993.
- [37] J. Goodman, Introduction to Fourier optics, 2004.
- [38] E. G. Steward, Fourier Optics: An Introduction, 2 ed., Nueva York, NY: Dover Publications, Inc., 2004.
- [39] G. O. Reynolds, J. B. DeVelis, G. B. Parrent Jr. y B. J. Thompson, The New Physical Optics Notebook: Tutorials in Fourier Optics, Bellingham, Washington: SPIE Optical Engineering Press, 1989.
- [40] N. C. Bruce Davidson, «Introducción a la Óptica de Fourier,» notas del curso "Óptica de Fourier," CCADET, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2015.
- [41] F. Zernike, «How I Discovered Phase Contrast,» *Science*, vol. 121, n° 3141, pp. 345-349, 1955.
- [42] Y. S. Yurchuk, V. D. Ustinov, S. Y. Nikitin y A. V. Priezhev, «Scattering of a laser beam on a wet smear of blood and measurement of red blood cell distribution width,» *Quantum Electronics*, vol. 46, n° 6, pp. 515-520, 2016.
- [43] H. C. van de Hulst, Light Scattering by Small Particles, Nueva York, NY: Dover Publications, Inc., 1981.

- [44] M. Kerker, *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation*, Nueva York, NY: Academic Press, 1969.
- [45] L. P. Bayvel y A. R. Jones, *Electromagnetic Scattering and its Applications*, Dordrecht: Springer, 1981.
- [46] G. W. Petty, *A first course in atmospheric radiation*, 2 ed., Madison, Wisconsin: Sundog Publishing, 2006.
- [47] N. L. Swanson, B. D. Billard y T. L. Gennaro, «Limits of optical transmission measurements with application to particle sizing techniques,» *Applied Optics*, vol. 38, n° 27, pp. 5887-5893, 1999.
- [48] E. Limpert, W. A. Stahel y M. Abbt, «Log-normal Distributions across the Sciences: Keys and Clues,» *BioScience*, vol. 51, n° 5, p. 341–352, 2001.
- [49] O. W. Vázquez Estrada, «Reflexión y transmisión de luz coherente por una monocapa aleatoria de partículas polidispersas soportadas por una superficie plana,» (Tesis de Maestría) Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2013.
- [50] A. García-Valenzuela, R. G. Barrera, C. Sánchez-Pérez, A. Reyes-Coronado y E. R. Méndez, «Coherent reflection of light from a turbid suspension of particles in an internal-reflection configuration: Theory versus experiment,» *Optics Express*, vol. 13, n° 18, pp. 6723-6737, 2005.
- [51] E. Hecht, *Optics*, Harlow: Pearson, 2017.
- [52] A. Deepak y M. A. Box, «Forward scattering corrections for optical extinction measurements in aerosol media. 1: Monodispersions,» *Applied Optics*, vol. 17, n° 18, pp. 2900-2908, 1978.
- [53] A. Deepak y M. A. Box, «Forwardscattering corrections for optical extinction measurements in aerosol media. 2: Polydispersions,» *Applied Optics*, vol. 17, n° 19, pp. 3169-3176, 1978.
- [54] M. Parapouli, A. Vasileiadis, A.-S. Afendra y E. Hatziloukas, «*Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications,» *AIMS microbiology*, vol. 6, n° 1, pp. 1-31, 2020.
- [55] M. Zakhartsev y M. Reuss, «Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature,» *FEMS Yeast Research*, vol. 18, n° 6, p. foy052, 2018.

- [56] P. Herman, B. P. Maliwal, H.-J. Lin y J. R. Lakowic, «Frequency-domain fluorescence microscopy with the LED as a light source,» *Journal of Microscopy*, vol. 203, n° 2, pp. 176-181, 2001.
- [57] B. M. Salzberg, P. V. Kosterin, M. Muschol, A. L. Obaid, S. L. Romyantsev, Y. Bilenko y M. S. Shur, «An ultra-stable non-coherent light source for optical measurements in neuroscience and cell physiology,» *Journal of neuroscience methods*, vol. 141, n° 1, pp. 165-169, 2005.
- [58] Y. Deng y D. Chu, «Coherence properties of different light sources and their effect on the image sharpness and speckle of holographic displays,» *Scientific Reports*, vol. 7, n° 5893, pp. 1-12, 2017.
- [59] N. L. Swanson y B. D. Billard, «Particle Sizing Technique». Estados Unidos de America (EUA) Patente 09/480.535, 10 Enero 2000.
- [60] PowTech, «PT4115B89E-B, 30V, 1.2A Step-down High Brightness LED Driver with 5000:1 Dimming,» [En línea]. Available: [https://www.lcsc.com/product-detail/LED-Drivers\\_PT4115B89E-B\\_C15425.html](https://www.lcsc.com/product-detail/LED-Drivers_PT4115B89E-B_C15425.html). [Último acceso: 25 Mayo 2018].
- [61] E. Berrocal, I. Meglinski y M. Jermy, «New model for light propagation in highly inhomogeneous polydisperse turbid media with applications in spray diagnostics,» *Optics Express*, vol. 13, n° 23, pp. 9181-9195, 2005.
- [62] M. A. Casas-Ramos y G. E. Sandoval-Romero, «Yeast cells characterization through near-forward light scattering,» *Optical and Quantum Electronics*, vol. 52, n° 3, p. 159, 2020.
- [63] J. D. Wilson, «Measurements and interpretations of light scattering from intact biological cells,» (Tesis Doctoral) Universidad de Rochester, Nueva York, 2007.
- [64] R. Inge, «Understanding yeast fundamentals,» de *The alcohol textbook*, 4 ed., K. A. Jacques, T. P. Lyons y D. R. Kelsall, Edits., Nottingham, Nottingham University Press, 2003, pp. 531-537.
- [65] R. Nash, G. Tokiwa, S. Anand, K. Erickson y A. B. Futcher, «The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog,» *The EMBO Journal*, vol. 7, n° 13, pp. 4335-4346, 1988.
- [66] R. Green y R. King, «A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor,» *Blood Cells*, vol. 15, p. 481-491, 1989.

- [67] J. D. Bessman, P. R. J. Gilmer y F. H. Gardner , «Improved classification of anemias by MCV and RDW,» *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 80, p. 322–326, 1983.
- [68] I. Oshina y J. Spigulis, «Beer–Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, n° 100901, p. 26, 2021.
- [69] M. Friebel y M. C. Meinke, «Determination of the complex refractive index of highly concentrated hemoglobin solutions using transmittance and reflectance measurements,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, n° 6, p. 064019, 2005.
- [70] W. Ma, Y. Fu, J. Zhao, S. Lu y H. Zhang, «Ultra-fine powder extinguishing agent concentration measurement based on extinction method,» *Optical Engineering*, vol. 60, n° 9, p. 094110, 2021.
- [71] A. K. Sharma, U. Tiwari, M. S. Gaur y R. K. Tiwari, «Assessment of malathion and its effects on leukocytes in human blood samples,» *The Journal of Biomedical Research*, vol. 30, n° 1, p. 52–59, 2016.
- [72] S. Poonam, «Spectral Analysis of Lymphocyte Cell for Early Detection of Leukemia by Using Photonic Crystal Based Biosensor,» *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, vol. 7, n° 8, pp. 202-208, 2017.
- [73] K. W. Keohane y W. K. Metcalf, «The cytoplasmic refractive index of lymphocytes, its significance and its changes during active immunization,» *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, vol. 44, n° 4, pp. 343-350, 10 Octubre 1959.
- [74] J. G. Wilde y W. K. Metcalf, «Changes in the lymphocyte cytoplasmic refractive index following typhoid vaccination,» *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 5, n° 1, pp. 23-26, 1975.
- [75] J. D. Kindt, «Optofluidic intracavity spectroscopy for spatially, temperature, and wavelength dependent refractometry,» (Tesis de Maestría) Universidad Estatal de Colorado, Fort Collins, 2012.
- [76] G. W. Schmid-Schönbein, Y. Y. Shih y S. Chien, «Morphometry of Human Leukocytes,» *Blood*, vol. 56, n° 6, pp. 866-875, 1980.

- [77] I. Saknite, Z. Zhao, J. R. Patrine, M. Byrne, M. Jagasia y E. R. Tkaczyk, «Individual cell motion in healthy human skin microvasculature by reflectance confocal video microscopy,» *Microcirculation*, vol. 27, nº 6, p. e12621, 2020.
- [78] R. B. Northrop, *Noninvasive instrumentation and measurement in medical diagnosis*, 2a. ed., Boca Ratón: CRC Press, 2019, p. 526.
- [79] M. Kinnunen, A. Kauppila, A. Karmenyan y R. Myllylä, «Effect of the size and shape of a red blood cell on elastic light scattering properties at the single-cell level,» *Biomedical Optics Express*, vol. 2, nº 7, pp. 1803-1814, 2011.
- [80] J. M. Moraleda Jiménez, *Pregrado de Hematología*, Madrid: Luzán 5, 2017.
- [81] L. Dean, *Blood Groups and Red Cell Antigens* [Internet], Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, 2005.
- [82] D. Ah-Moye, C. Davies, J. Goody, P. Hayward y R. Frewin, «Introduction to haematology and transfusion science,» de *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*, Tercera ed., W. J. Marshall, M. Lapsley y A. P. Day, Edits., Londres, Churchill Livingstone, 2014, pp. 497-514.
- [83] X. Su, M. Gupta, C. E. Capjack, Y. Y. Tsui, Y. Qiu, L. Marquez-Curtis, A. Janowska-Wieczorek y W. Rozmus, «Label-free and noninvasive optical detection of the distribution of nanometer-size mitochondria in single cells,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, nº 6, p. 067003, 2011.
- [84] X. Su, S. E. Kirkwood, M. Gupta, L. Marquez-Curtis, Y. Qiu, A. Janowska-Wieczorek, W. Rozmus y Y. Y. Tsui, «Microscope-based label-free microfluidic cytometry,» *Optics Express*, vol. 19, nº 1, pp. 387-398, 2011.
- [85] L. Mátyus y M. Edidin, «Flow Cytometry and Cell Sorting,» de *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 1 Techniques*, J. R. Lakowicz, Ed., Boston, MA: Springer, 2002, p. 411-449.
- [86] H. Mohamed, «Use of Microfluidic Technology for Cell Separation,» de *Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology*, T. E. Moschandreou, Ed., Londres, InTech, 2012.
- [87] K. Süring, S. Bach, K. Bossmann, E. Wolter, A. Neumann, W. Straff y C. Höflich, «PM10 contains particle-bound allergens: Dust analysis by Flow Cytometry,» *Environmental Technology & Innovation*, vol. 5, p. 2016, 60-66.

- [88] K. M. Yoo, F. Liu y R. R. Alfano, «When Does the Diffusion Approximation Fail to Describe Photon Transport in Random Media?», *Physical Review Letters*, vol. 65, p. 2210, 1990.
- [89] I. R. Kenyon, *The Light Fantastic: A Modern Introduction to Classical and Quantum Optics*, Nueva York: Oxford University Press, 2008.
- [90] A. Rogalski, *Infrared and Terahertz Detectors*, Tercera ed., CRC Press: CRC Press, 2019.
- [91] Company, OSI Optoelectronics: An OSI Systems, «Datasheet: Planar Diffused Silicon Photodiodes», [En línea]. Available: <https://osioptoelectronics.com/Libraries/Datasheets/Photoconductive-Photodiodes.sflb.ashx>. [Último acceso: 28 Junio 2021].
- [92] Microchip Technology Inc., «Datasheet: MCP6491/2/4 7.5 MHz, Low-Input Bias Current Op Amps», 11 Noviembre 2012. [En línea]. Available: <https://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/20002321C.pdf>. [Último acceso: 28 Junio 2021].
- [93] Hamamatsu Photonics K.K., «Si photodiodes / Technical note», Diciembre 2020. [En línea]. Available: [https://www.hamamatsu.com/content/dam/hamamatsu-photonics/sites/documents/99\\_SALES\\_LIBRARY/ssd/si\\_pd\\_kspd9001e.pdf](https://www.hamamatsu.com/content/dam/hamamatsu-photonics/sites/documents/99_SALES_LIBRARY/ssd/si_pd_kspd9001e.pdf). [Último acceso: 20 06 2021].
- [94] J. C. Álvarez Antón, J. C. Campo Rodríguez, F. J. Ferrero Martin, G. J. Grillo Ortega y M. Á. Pérez García, *Instrumentación electrónica*, Thomson Paraninfo, S.A., 2003.
- [95] Zhen, Yang; Microchip Technology Inc., «AN1494: Using MCP6491 Op Amps for Photodetection Applications», 29 Noviembre 2012. [En línea]. Available: <https://ww1.microchip.com/downloads/en/Appnotes/01494A.pdf>. [Último acceso: 26 Junio 2021].
- [96] L. Orozco y Analog Devices Inc., «Programmable-Gain Transimpedance Amplifiers Maximize Dynamic Range in Spectroscopy Systems», Mayo 2013. [En línea]. Available: <https://www.analog.com/en/analog-dialogue/articles/programmable-gain-transimpedance-amplifiers.html>. [Último acceso: 28 Junio 2013].
- [97] C. Mätzler, «MATLAB Functions for Mie Scattering and Absorption, Version 1 Bern», Instituto de Física Aplicada, Universidad de Berna, Suiza, 17 Septiembre 2020. [En línea]. Available: <https://boris.unibe.ch/146551/>. [Último acceso: 30 Junio 2021].

- [98] C. Mätzler, «MATLAB Functions for Mie Scattering and Absorption, Version 2,» Instituto de Física Aplicada, Universidad de Berna, Suiza, 17 Septiembre 2020. [En línea]. Available: <https://boris.unibe.ch/146550/>. [Último acceso: 30 Junio 2021].
- [99] W. M. Haynes, Ed., Handbook of Chemistry and Physics, 95 ed., Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 2014-2015, p. 2704.
- [100] F. F. Delgado, «Measuring compositional and growth properties of single cells,» (Tesis Doctoral) Instituto Tecnológico de Massachusetts, Cambridge, Massachusetts, 2013.
- [101] A. K. Bryan, A. Goranov, A. Amon y S. R. Manalis, «Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, n° 3, pp. 999-1004, 2010.
- [102] P. C. J. Ward, «The CBC at the Turn of the Millennium: An Overview,» *Clinical Chemistry*, vol. 46, n° 8, pp. 1215-1220, 2000.
- [103] S. R. Comar, M. Malvezzi y R. Pasquin, «Evaluation of criteria of manual blood smear review following automated complete blood counts in a large university hospital,» *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 39, n° 4, pp. 306-317, 2017.
- [104] 3M, «3M™ Scotch® Transparent Film Tape 600,» Noviembre 2018. [En línea]. Available: [https://technicaldatasheets.3m.com/en\\_US?pif=833](https://technicaldatasheets.3m.com/en_US?pif=833). [Último acceso: 15 Abril 2020].
- [105] R. N. Makroo, V. Raina, A. Bhatia, R. Gupta, A. Majid, U. K. Thakur y N. L. Rosamma, «Evaluation of the red cell hemolysis in packed red cells during processing and storage,» *Asian Journal of Transfusion Science*, vol. 5, n° 1, p. 15-17, 2011.
- [106] R. A. Cooper y S. J. Shattil, «Mechanisms of Hemolysis — The Minimal Red-Cell Defect,» *The New England Journal of Medicine*, vol. 285, n° 27, pp. 1514-1520, 1971.
- [107] P. Latimer, «Light scattering vs. microscopy for measuring average cell size and shape,» *Biophysical Journal*, vol. 27, n° 1, pp. 117-126, 1979.
- [108] S. P. Srinivas, J. A. Bonanno, E. Larivière, D. Jans y W. V. Driessche, «Measurement of rapid changes in cell volume by forward light scattering,» *Pflügers Arch - Eur J Physiol*, vol. 447, p. 97-108, 2003.