



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE  
INGENIERIA**



## **Monitoreo óptico de las características físicas de la sangre**

Tesis realizada por:  
**Rivera Clavel Carlos**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e Impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Carlos Rivera Clavel  
FECHA: 01 Junio 2005  
FIRMA: Rivera Clavel C

Para obtener el título de:  
**Ingeniero Eléctrico-Electrónico**

Dirigida por:  
**Dr. Augusto García Valenzuela**

Coasesora:  
**Dra. Celia A. Sánchez Pérez**

Ciudad Universitaria, D.F. mayo 2005

m. 345201



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# Índice

## Introducción

### 1. La sangre.

1.1. Propiedades del tejido sanguíneo.....	1
1.1.1. Glóbulos Rojos.....	2
1.1.2. Hemoglobina.....	3
1.1.3. Plaquetas.....	4
1.1.4. Glóbulos Blancos.....	5
1.1.5. Plasma.....	6
1.2. Preparación y soluciones .....	7
1.2.1. Coagulación de la sangre.....	7
1.2.2. Manipulación de muestras sanguíneas.....	8
1.2.3. Preparación de soluciones sanguíneas.....	10

### 2. Técnicas de caracterización física de la sangre.

2.1. Caracterización de formula roja.....	11
2.2. Sedimentación sanguínea.....	13
2.2.1. Método de Westergreen.....	14
2.2.2. Método de Transmisión láser.....	16
2.3. Hematocrito.....	17
2.4. Hemoglobina.....	18
2.4.1. Método de Hemiglobincianuro (HiCN).....	19

### 3. Conceptos básicos.

3.1. Haz de luz láser.....	22
3.1.1. Características de la luz láser.....	22
3.1.2. Polarización.....	24
3.1.3. Haz Gaussiano.....	25
3.1.3.1. Divergencia angular.....	26
3.1.3.2. Divergencia.....	28
3.1.3.3. Radio de curvatura.....	28
3.1.3.4. Campo de Rayleigh.....	29
3.1.3.5. Parámetro $M^2$ .....	29

---

---

3.2.	Reflexión y refracción en superficies planas.....	30
3.2.1.	Reflexión.....	30
3.2.2.	Refracción.....	31
3.3.	Instrumentación óptica.....	34
3.3.1.	Diafragma.....	34
3.3.2.	Prismas.....	34
3.3.2.1.	Angulo critico y reflexión total interna.....	35
3.3.2.2.	Refracción y desviación en un prisma.....	35
3.3.3.	Espejos.....	37
3.3.4.	Lentes.....	37
3.3.4.1.	Ecuación de las lentes (del fabricante de lentes).....	38
<b>4.</b>	<b>Implementación de sistemas experimentales.</b>	
4.1.	Principio básicos de la reflectometría.....	41
4.2.	Reflectómetro óptico simple.....	44
4.3.	Reflectómetro dinámico de barrido en ángulo.....	46
4.4.	Reflectómetro modulado en ángulo.....	48
<b>5.</b>	<b>Resultados y conclusiones.</b>	
5.1.	Monitoreo de la reflectancia cerca del ángulo crítico.....	51
5.2.	Uso de un reflectómetro dinámico para observación de las curvas de reflectancia alrededor del ángulo critico.....	54
5.3.	Monitoreo de la sedimentación usando la reflectometría modulada en ángulo.....	56

**Conclusiones.****Bibliografía.**

## Introducción

Los análisis sanguíneos son utilizados para establecer parámetros útiles en el diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades. Cada uno de estos parámetros depende de características específicas de la sangre, físicas o químicas. Un ejemplo de análisis que monitorea características físicas de la sangre es la velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSE), el cual presenta la evolución y variación de la reología sanguínea con respecto al tiempo, aprovechando que la sangre se sedimenta describiendo tres fases, una de agregación, otra de sedimentación rápida y otra lenta. Las fases de sedimentación varían respecto a factores diversos dependientes de concentraciones proteicas o enzimáticas, afecciones inflamatorias, infecciosas o tumorales, y otros factores desencadenantes de varios padecimientos.

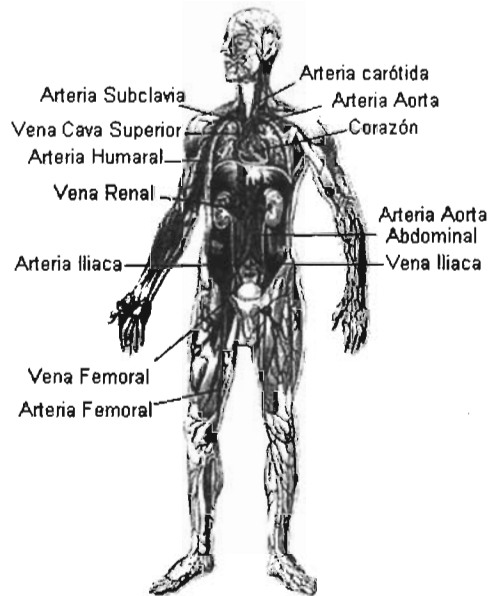
Proponer un método óptico para el monitoreo de la VSE se justifica teniendo como una de sus principales premisas la posibilidad de monitorear el proceso de sedimentación sanguínea y algunas características físicas de la sangre que afectan su reología.

En este trabajo se proponen tres configuraciones para monitoreo con base en la reflectometría cerca del ángulo crítico, usando las variaciones que sufre un haz láser en sus características de transmisión por variaciones resultantes de su interacción con otros medios. Mediante los sistemas propuestos esperamos monitorear las fases de sedimentación, contenidos de hemoglobina libre en la sangre y concentración de GR.

Al final, se espera obtener una cuantificación de estos parámetros estableciendo una metodología adecuada que permita encontrar la relación que existe entre las características físicas y las propiedades ópticas de la sangre.

## Capítulo 1. La sangre.

La sangre es un líquido de color rojo que circula a través de los vasos del cuerpo (con excepción de los linfáticos), en el sistema circulatorio (figura 1). Está constituida por elementos sólidos y uno líquido que es el plasma. La sangre es un líquido cinco veces más viscoso que el agua, y se desplaza lentamente. Su función principal es el transporte de  $O_2$ ,  $CO_2$  y nutrientes.



**Figura 1.** Sistema circulatorio.

En condiciones naturales la sangre posee una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , un pH entre 7.35–7.45 y una concentración de cloruro sódico de 3.5% similar al agua de mar, dándole un sabor salado. Supone el 8% del peso corporal. Con un volumen de 5 a 6 litros en persona adulta sana. [1,2,3].

La sangre, al igual que cualquier medio material es caracterizable ópticamente, su composición mixta, permite la diferenciación de componentes con características específicas. Esto debe permitirnos monitorear variaciones reológicas, químicas y físicas, para lo cual, se deben describir las características individuales de los elementos constituyentes del tejido sanguíneo.

## 1.1. Composición del tejido sanguíneo.

La sangre es un tejido compuesto por células (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). En una persona adulta sana, la sangre contiene un 45% en volumen de glóbulos rojos o eritrocitos (GR), glóbulos blancos o leucocitos (GB) y plaquetas. El 55% restante corresponde al plasma. Tal composición nos permite clasificarle como medio coloide.

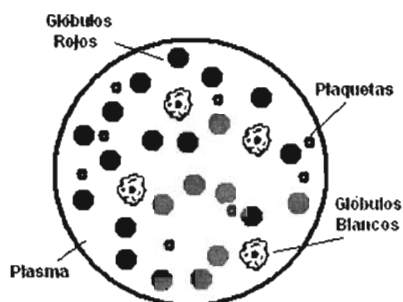


Figura 2. Composición de la sangre

### 1.1.1. Glóbulos Rojos

De entre los 4.5 y 5.5 litros de sangre que circulan por el cuerpo humano, los GR son el elemento más común en tal tejido. Su concentración es de unos 4.5 millones en cada milímetro cúbico. Tienen forma de discos redondeados, bicóncavos y con un diámetro aproximado de  $7,76 \mu\text{m}$  y  $94 \mu\text{m}^3$  de volumen [4]. Estos GR son producidos por la médula ósea (en el caso del embrión por el hígado).

La vida media de un GR es de 120 días, pasando de una etapa inicial de alrededor de 7 días, en los que dejan de ser célula al perder su núcleo y por lo tanto su

ADN, envejece y al final este proceso mueren y sus elementos constituyentes excretados al torrente sanguíneo principalmente el bazo y en menor cantidad por el hígado [5].

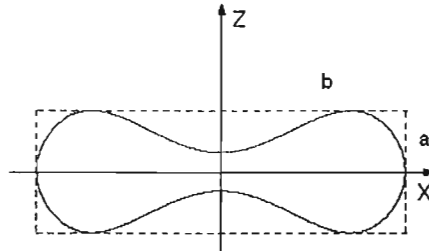


Figura 3. Sección transversal del eritrocito. (a) ancho (b) diámetro

De los componentes del GR, el principal es la hemoglobina (HG) pues constituye el 90% de su masa total.

### 1.1.2. Hemoglobina

La HG es la proteína que sirve para el transporte de  $O_2$  y  $CO_2$ , y es aproximadamente 600 g de la masa de los GR totales y cuando está saturada es capaz de transportar unos 800 ml de  $O_2$ .

La HG es la responsable de la tinción roja que presenta la sangre ante la luz natural. Esto se debe a que cada molécula de HG consta de 2 pares de cadenas polipeptídicas (unión de aminoácidos-globina) y 4 grupos proteicos HEM (son grupos proteicos que contienen cada uno un átomo de Fe). Los átomos de hierro son quienes permiten el transporte de oxígeno.

Molécula de HEMOGLOBINA

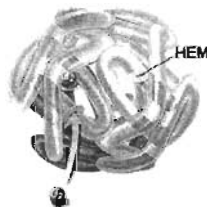


Figura 4. El  $O_2$  se fija al HEM.

*medline.com*



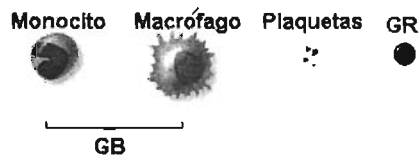
La hemoglobina reducida es hemoglobina con su hierro no asociado o no unido al  $O_2$ . Cuando cada grupo HEM se asocia con una molécula de  $O_2$ , la hemoglobina corresponde a la oxihemoglobina. Tanto en la hemoglobina como la oxihemoglobina el hierro permanece en estado ferroso  $Fe^{+2}$ .

Esta variación en la concentración de oxígeno en la HG y, por ende en los GR, genera una variación en la tonalidad del tejido sanguíneo, de un tono rojo de la hemoglobina a un tono azulado en la oxihemoglobina [2].

### 1.1.3. Plaquetas.

Las plaquetas carecen de núcleo y son pequeños fragmentos de citoplasma que se han desprendido de la periferia del megacariocito (célula de mayor tamaño contenida en la médula ósea). Su tamaño suele estar entre 2 y 4  $\mu m$ . Permanecen en la sangre entre 8–12 días, para después ser destruidas en el bazo.

Las plaquetas son extremadamente frágiles y se adhieren muy fácilmente a otros cuerpos cercanos (linfocitos, eritrocitos, etc.) o se aglutinan entre ellas formando coágulos, de todos los tamaños y formas. Rápidamente se deforman y pronto se desintegran.



**Figura 5** Comparación en el tamaño de los elementos del tejido sanguíneo. Se incluyen dos tipos de GB, para hacer más sencillo entender por que su diámetro varía tanto.

*medilíne.com*

En estado normal las plaquetas son lanceoladas. Son poco densas y flotan en el plasma. De su masa seca, un 60% es proteína y un 15% lípidos. Decoloran el azul de metileno y parecen consumir oxígeno; aunque su metabolismo no se conoce muy bien [2].

En la coagulación forman nudos en la red de fibrina y liberan sustancias importantes para acelerarla. Aumentan la retracción del coágulo sanguíneo

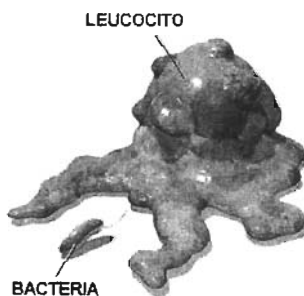
En las heridas las plaquetas aceleran la coagulación y además, al aglutinarse, obstruyen pequeños vasos y engendran sustancias que los contraen.

#### 1.1.4. Glóbulos Blancos

A diferencia de los GR, los GB son componentes sanguíneos con núcleo; es decir son células. Carecen de compuestos proteicos que les brinde tinción, por lo que se les considera blancos. Poseen movilidad propia, mediante pseudópodos e incluso se pueden desplazar contra el torrente sanguíneo y entre los tejidos.

Su concentración es de alrededor de 6 mil en cada milímetro cúbico que en comparación con los 4.5 millones de eritrocitos o las 150 mil plaquetas, es pequeña. Por el contrario, su tamaño es de entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ , mayor a las 7  $\mu\text{m}$  que promedia el eritrocito.

Algunos GB se forman en la médula roja, otros en el tejido linfático (de los órganos que producen lífa: nutrientes, GR y GB) porque son de diferentes formas o tipos. Hay en la sangre cinco tipos provistos de núcleo.



**Figura 6.**  
Fagocitosis bacteriana, realizada por un GB.

*medline.com*

Dos de los tipos de glóbulos blancos, linfocitos y monocitos son producidos en el tejido linfóide del bazo, el timo y los ganglios linfáticos. Los otros tres, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, son producidos en la médula.

La principal función de los glóbulos blancos es proteger al individuo contra los microorganismos patógenos por medio del fenómeno de fagocitosis. Los neutrófilos y monocitos por ejemplo, destruyen las bacterias invasoras ingiriéndolas. Las bacterias fagocitadas quedan ingeridas gracias a la acción de enzimas secretadas por el mismo glóbulo.

### 1.1.5. Plasma

Como mencionamos, el plasma constituye el 55% del tejido sanguíneo. De este plasma, el 92% es agua, y el 8% nutrientes como glucosa, grasas, proteínas, vitaminas, minerales y aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas.

El plasma desarrolla diferentes funciones entre las que destaca la inmunitaria (inmunoglobulinas), la hemostática (factores de coagulación), el transporte, la nutritiva (vitamina A y principios inmediatos), el equilibrio iónico y la eliminación de sustancias de deshecho (CO<sub>2</sub> y productos del metabolismo intermediario).

Es un líquido amarillento cuya composición química específica varía con las características patológicas del individuo.

Las principales proteínas que componen al plasma son:

*Albúminas*: representan más de la mitad de las proteínas plasmáticas. De producción hepática son responsables de la viscosidad de la sangre y ayudan a conservar el balance hídrico entre los tejidos pues regula el volumen entre la sangre.

*Globulinas*: de éstas el grupo más importante son las gammaglobulinas que intervienen en la defensa inmunitaria.

*Fibrinógeno*: es una proteína de fase aguda que participa de manera especial en la coagulación sanguínea.

*Nitrógeno no proteico*: esta compuesto por sustancias que contienen  $N_2$  y no son proteínas. Son productos de desecho del metabolismo proteico que se eliminan por el riñón. Son el ácido úrico, urea, creatinina y las sales de amonio.

*Sustancias alimenticias*: una vez en el tubo digestivo se descomponen los productos. Éstos pasan a la sangre para ser distribuidos a todas las células del organismo. Estos productos son los aminoácidos, glucosa y lípidos.

*Sustancias reguladoras*: son enzimas y hormonas. Las enzimas son producidas por células del cuerpo y catalizan reacciones químicas. Las hormonas son producidas por las glándulas endocrinas y regulan la defensa de funciones orgánicas.

*Electrólitos*: son iones que constituyen las sales inorgánicas del plasma. Tales como: Na, K,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  y aniones como: P,  $SO^{-4}$ , bicarbonatos,  $Cl^{-}$ . Estas sales mantienen la presión osmótica adecuada, regulan el pH y mantienen un balance fisiológico adecuado entre la sangre y los tejidos.

La totalidad de los compuestos proteicos dan al plasma su tonalidad amarillenta y en función de la variación de la misma, se puede determinar enfermedades o variación en la producción hormonal. Otro factor que influye en la tonalidad del plasma es la concentración de hemoglobina, liberada por procesos de hemólisis (ruptura del GR que libera la HG contenida).

## **1.2. Manipulación sangre.**

### **1.2.1. Coagulación de la sangre.**

Al extraerse del cuerpo, la sangre se coagula. La coagulación es la propiedad de la sangre de encerrar a los GR en una red de filamentos constituidos por una sustancia denominada fibrina. Esta sustancia no existe como tal en la sangre pero se crea durante el proceso de la coagulación, por la acción de la trombina, enzima que estimula la conversión de una de las proteínas plasmáticas, el fibrinógeno en fibrina.

La trombina no está presente en la sangre circulante. Ésta se forma a partir de la protrombina, otra proteína plasmática, en un proceso complejo que implica a las plaquetas, ciertas sales de calcio y el contacto con el aire. Si existe algún déficit de estos factores la formación del coágulo es defectuosa. La adición de citrato de sodio elimina los iones de calcio de la sangre y por consiguiente previene la formación de coágulos [4].

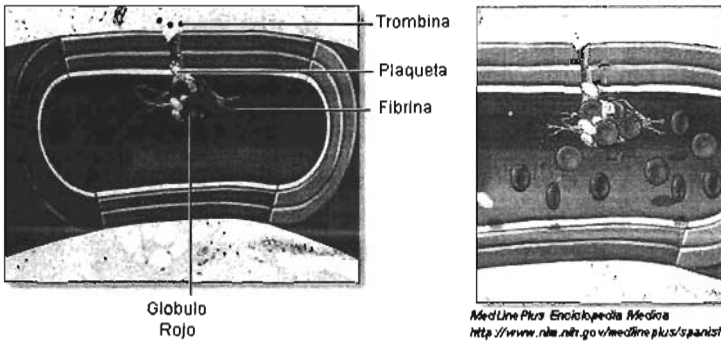


Figura 7. Formación de coágulos sanguíneos.

Las observaciones correspondientes al estudio de las características físicas de la sangre, requieren lapsos relativamente grandes, dependiendo de cada una de ellas, por lo que la necesidad de evitar la formación de coágulos es de gran importancia. Otra cuestión importante es que también en la coagulación, al igual que el citrato de sodio, existen sustancias que alteran en diferentes grados la coagulación, como el caso de las hormonales, por lo que al realizar este análisis es un factor a considerar.

### 1.2.2. Manipulación de muestras sanguíneas.

Al mismo tiempo que es preciso tener ciertas consideraciones en el manejo de las muestras sanguíneas para prevenir la formación de coágulos y por ende, la variación en las características ópticas de la sangre. Las medidas de seguridad para el manejo de muestras sanguíneas toman un papel importante, tanto en seguridad de la muestra como de quien la maneja, considerando riesgos de contagio o de otro tipo pueden presentarse.

Algunas de las medidas de seguridad para la manipulación de muestras sanguíneas son:

1. Las muestras extraídas deben ser almacenadas o mezcladas en recipientes de vidrio. Todo recipiente de vidrio está expuesto a romperse; por lo que se deben manejar dichos recipientes con la mayor cautela evitando que se rompan.
2. Todo recipiente y herramienta que ha estado en contacto con la sangre (agujas, contenedores, etc.) deben esterilizarse o desecharse, según sea el caso.
3. En caso de estar expuesto a cualquier tipo de muestras biológicas, se debe recurrir a revisiones periódicas, ya que esto representa un riesgo de contagio de enfermedades virales como hepatitis, SIDA u otras.
4. El manejo fuera de la inserción o retiro de muestras de las agujas debe ser con los protectores correspondientes.
5. Como requisito básico para el manejo de las muestras, se deberá contar con el uso de bata, guantes de látex, cubre boca y anteojos que eviten en lo posible cualquier tipo de contacto con la muestra.

Un punto sumamente importante de resaltar es que el manejo de muestras sanguíneas debe observar todas las medidas contempladas en normas mexicanas e internacionales como la NOM-003-SSA2-1993. Este listado contiene solo puntos esenciales en el manejo de muestras sanguíneas.

### 1.3. Preparación de soluciones sanguíneas.

La sangre que ha sido extraída de donadores sanos, recogiendo 3.75 ml de sangre venosa. La muestra requiere ser mezclada con 1.25ml al 0.105 Molar (M) de citrato trisódico amortiguado, con pH 5,5 a 5,6 que se obtiene con 84 mmol/l de citrato trisodico con 21mmol/l de ácido cítrico (citrato de sodio) para lograr una solución de 5ml, tal que evite la formación de coágulos.



**Figura 8.**

#### **Preparación para VSE.**

Se realiza en tubos esteriles graduados y con tapa negra (bajo normas ISO) en una mezcla a 1/4 de citrato de sodio por cada 5ml de sangre.

Las muestras son mezcladas en tubos graduados de 5ml, tapón negro, los cuales se mantienen bajo refrigeración durante la realización de las muestras, dado que cada lectura requiere de 0.5 ml únicamente. El mantener en refrigeración las muestras garantiza que los elementos sanguíneos no sufran alteraciones, por ello, esta temperatura de almacenamiento no debe exceder los 4 °C. Durante el monitoreo también este factor debe estar controlado para que la temperatura no afecte la velocidad de sedimentación, debe mantenerse dentro del rango natural de la misma, pues si es alta, la viscosidad se reduce, disminuyendo la resistencia al desplazamiento de los GR e influyendo en las observaciones.

## Capítulo 2. Técnicas de caracterización física de la sangre.

La caracterización física de la sangre incluye mediciones diversas de acuerdo con el comportamiento y composición de la misma. Esta caracterización es llamada también *Biometría Hemática* o *Hemograma* y que es uno de los estudios de rutina de mayor importancia, ya que la información que de aquí se deriva proporciona características confiables que permiten determinar el estado homeostático del donador. Esta caracterización se divide en dos:

- 1) Fórmula roja. Determina los parámetros relacionados con los GR.
- 2) Fórmula blanca. Determina los parámetros relacionados con los GB.

La caracterización con base en los GR es más fácil de realizar por la mayor concentración de GR, además de que poseen la hemoglobina que para la caracterización óptica es vital pues presenta gran absorción de la luz. Por lo anterior, ésta será la única estudiada en este trabajo, lo cual no quiere decir que no sea posible realizar un estudio óptico en fórmula blanca [6].

### 2.1. Caracterización de fórmula roja.

Dentro de esta caracterización es posible monitorear e interpretar los siguientes parámetros:

1. Velocidad de sedimentación de eritrocitos (**VSE**). Es el cambio en la posición de los eritrocitos en función del tiempo dentro de un recipiente de observación. Se expresa en mm/h.
2. Hematocrito (**Ht**). Es el porcentaje de la sangre que está compuesto por GR.
3. Hemoglobina (**Hb**). Determinación de la cantidad de esta sustancia en g/dl.



Todos estos parámetros dependen de la concentración de GR fundamentalmente, por lo que se ven afectados por los mismos factores internos o externos, los cuales pueden ser ajenos al estado homeostático del donador, pero que como citamos anteriormente, existen variaciones naturales. En la tabla 2 se muestran algunos factores no naturales que provocan variaciones en la VSE:

<b>Factores que afectan la reología sanguínea</b>		
	<b>Aumento</b>	<b>Disminución</b>
Hematológicos	Anemia Macrocitosis Aglutininas frías	Policitemia Drepanocitosis Microcitosis Esferocitosis Acantocitosis Aumento de sales biliares Leucocitosis
Proteicos	Hiperfibrinogenia  Aumento de globulinas ( $\alpha, \beta$ y $\gamma$ ) Proteínas monoclonales Heparina Hipoalbuminemia	Hipofibrinogenia Disfibrinogenemia Hipogammglobulinemia
Otros	Fiebre Obesidad extrema Aumento de colesterol Fallo renal Embarazo Inflamación Neoplasia	Hipotermia Caquexia Ingestión reciente Congestión cardiaca Aspirina Antiinflamatorios no esteroideos
Factores técnicos	Inclinación de la muestra Heparina Incorrecta dilución Aumento de temperatura en la muestra	Vibraciones durante la prueba Coágulo total o parcial Proceso después de 4 horas

<http://www.db2.doyma.es/pdf/49/49v88nSupl.6a13053715pdf001.pdf>

**Tabla 2.** Factores que afectan la reología sanguínea.

Además de cambios en el volumen plasmático, tales como estados de deshidratación que lo aumentan y sobre hidratación que lo disminuyen, aparentando estados anémicos de plasma.

Claramente podemos deducir que al ser variaciones que presentan resultados relativos, todos éstos son evaluados, dejando su interpretación en función del criterio y experiencia médica. Para esto requiere que cualquier situación de monitoreo evalúe estos parámetros y no trate de interpretarlos, pues en nuestro caso solo se usaran para justificar la búsqueda de mejores herramientas para su estimación.

## 2.2. Sedimentación sanguínea.

La velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSE) es una prueba de laboratorio simple y barata de realizar y se trata de una de las más usadas por los médicos. La prueba mide la distancia que los eritrocitos caen después de una hora en un tubo vertical de sangre entera mezclada con anticoagulante; por la influencia de la gravedad.

A finales del siglo XIX, un médico polaco, Edmund Biernacki, fue el primero que describió la relación entre el aumento de sedimentación de la sangre en individuos enfermos con el aumento de fibrinógeno. En 1918, Robert Fahraeus relacionó la VSE con el embarazo. Fue Alf Westergren, en 1921, quien demostró la utilidad de la técnica para predecir el diagnóstico y seguir la evolución de los pacientes afectados de tuberculosis y describió la técnica [5,6]. Una variación de la metodología fue publicada por M. Wintrobe en 1935. El Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH) recomendó, en 1977, la adopción del método de Westergren como método de referencia y que sigue vigente en la actualidad.

Como mencionamos en el inicio de este capítulo, la VSE es un prueba relativamente inespecífica, pero que se usa frecuentemente durante el monitoreo y diagnóstico de enfermedades. Los factores relacionados con enfermedades que afectan la VSE son el plasma y las concentraciones de fibrinógeno, además de la presencia y grado de anemia. Los factores no relacionados con enfermedades que afectan los valores de VSE incluyen la edad,

el sexo y terapias con medicamento. Debido a esto, es que no se admite el uso del VSE para determinar padecimientos específicos.

Valores de VSE elevados se presentan en una gran variedad de estados patológicos. Si la historia clínica y la inspección física sugieren procesos patológicos específicos, se considera apropiado el uso del VSE [7 ].

Con lo anterior, los valores altos de VSE sugieren serias enfermedades sistémicas, (tumorações malignas, infecciones, cirrosis, artritis reumatoide, tuberculosis, osteomielitis, etc.) que pueden ser detectadas solo por la historia clínica, pero con el uso del VSE se pueden verificar sospechas sobre dichos padecimientos.

### 2.2.1. Método de Westergren.

El método más usado en el análisis de la sedimentación sanguínea es el de Westergren. Este método sirve para estimar la velocidad de sedimentación de los GR mediante la observación de los niveles a los que caen en el transcurso de una hora en tubos graduados en milímetros de 0 a 100 (figura 9), cuando 3.75 ml de sangre venosa son mezclados con 1.25ml al 0.105 Molar (M) de citrato de sodio para lograr una solución de 5ml, evitando la formación de coágulos.

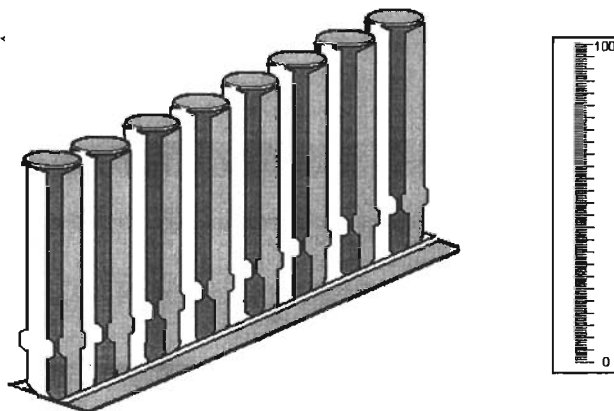
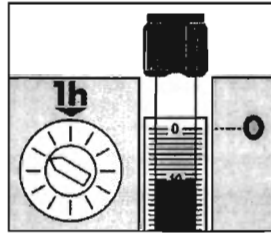


Figura 9. Tubos y rejillas Westergren.

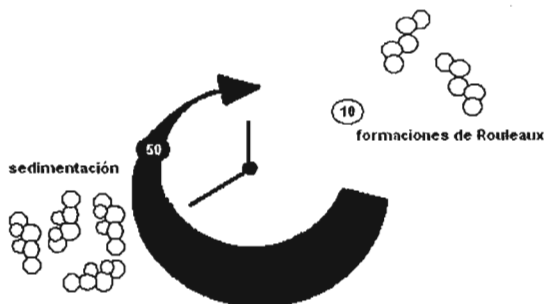


Este método fue introducido por el físico sueco Alf Vilhelm Westergren (n.1891) en 1921 mediante un artículo sobre tuberculosis pulmonar y sanguínea. Las muestras de sangre contenidas en los tubos deben permanecer totalmente verticales, en reposo, pues no se debe inducir turbiedad, que altere la reología de la muestra.

La sedimentación ocurre en tres etapas durante una prueba de una hora, como se esquematiza en la figura 10. Durante los primeros diez minutos forman las formas de Rouleaux, con una lenta sedimentación. Para los siguientes 40 minutos las células caen rápidamente, la sedimentación que ocurre en este lapso es la más importante y más rápida. Finalmente, durante los últimos 10 minutos, ocurre un empaquetamiento. Durante una hora más, continúa con la sedimentación [5,6,7].

De acuerdo con lo anterior podemos dividir la observación en tres fases:

1. Fase de agregación ( 0 – 10 min).
2. Fase de sedimentación ( 10 – 50 min).
3. Fase de empaquetamiento ( 50 – 110 min).



**Figura 10.** Fases de la sedimentación sanguínea.

Las velocidades de sedimentación normales en el método de Westergren se enlistan en la tabla 3.

### Westergren

Normal:	Hombre	0 – 10 mm/hr
	Mujer	0 – 15 mm/hr
	Niño	0 – 10 mm/hr

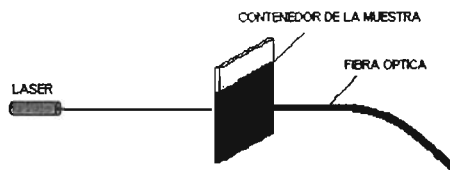
**Tabla 3.** Niveles normales Westergren

Niveles fuera de estos rangos se consideran anormales, sugiriendo enfermedades o la presencia de sustancias y factores diversos.

### 2.2.2. Método de transmisión láser.

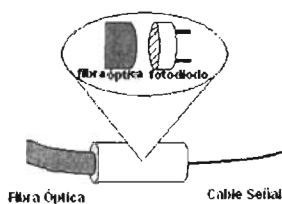
Es un método basado en la transmisión láser a través de una muestra delgada de sangre (figura 11). Puesto que la diferencia en la absorción y el esparcimiento entre el plasma y los GR es grande, la luz se atenúa fuertemente al atravesar la sangre, registrándose la potencia máxima en los fotodetectores cuando ésta se propague únicamente a través del plasma, el cual prácticamente es transparente.

El contenedor de la muestra debe ser suficientemente delgado o grueso para que permita la transmisión de la luz láser con sangre sin diluir. El nivel de potencia transmitida de la muestra es determinado por la distribución y principalmente por la concentración de GR [8].



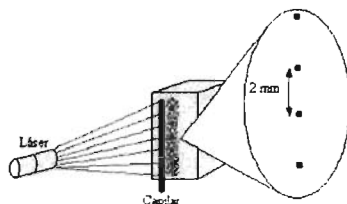
**Figura 11.** Sensado de la muestra para la determinación de VSE por espectrometría.

Para evitar pérdidas en el acoplamiento, se usa un fotodiodo con un área muy similar al espesor de la fibra óptica. La fibra recolecta la luz que se propaga en una dirección específica, la dirección de la luz incidente, sin la posibilidad de detectar la luz que se ha propagado en cualquier otra dirección, producto de la interacción con los GR.



**Figura 12.** Acoplamiento para el sensor de VSE

Otra forma de sensar la muestra sanguínea es monitorear la energía luminosa transmitida (transmitancia) en una muestra dentro de un tubo capilar a lo largo del mismo, como se muestra en la figura 12. Lo cual permite estimar los volúmenes de sedimentación a diferentes lapsos.



**Figura 13.** Sensado de una muestra para VSE por espectrometría usando muestreo múltiple.

Una variación de este método implica realizar pulsaciones en el haz láser incidente, tales que, provoquen una vibración en los GR debido a la absorción y liberación de energía. Estas vibraciones pueden llegar a ser perceptibles de forma acústica y representadas por su espectro, obedeciendo a las diferentes longitudes de onda de las vibraciones registradas. Este principio se esquematiza en la figura 13.

### 2.3.Hematocrito.

El hematocrito es el porcentaje del volumen total de sangre compuesto de glóbulos rojos. Es una medición dependiente del tamaño y número de GR. Dicha medición sirve para estimar el número de glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB), además de la cantidad total de hemoglobina en la sangre y la fracción de la sangre compuesta de células (hematocrito).

La determinación del hematocrito consiste en la centrifugación de la muestra, provocando un asentamiento de la masa de eritrocitos y otras partículas que la constituyen. Actualmente, en los estudios de laboratorio, se toma un poco de la sangre y se introduce en una máquina de centrifugación, tal proceso impulsa las células hacia el fondo del recipiente. La porción celular se compara con la cantidad total de la sangre y se expresa en porcentaje (figura 14).

De hecho, dicha porción celular representa casi la totalidad de los glóbulos rojos, mientras que el porcentaje de glóbulos blancos es muy pequeño.

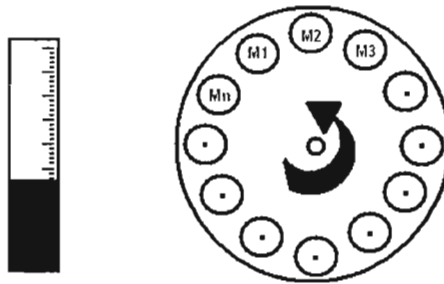


Figura 14. Índice hematocrito, centrifugación y estimación del índice.

## 2.4. Hemoglobina (HG).

Como se vio en el capítulo anterior, la HG es un compuesto proteico encargado del transporte de  $O_2$  y  $CO_2$ , y la masa total de eritrocitos de un adulto contiene unos 600g de hemoglobina capaces de transportar 800 ml de  $O_2$ .

Muchos datos se obtienen a simple vista, en relación con la coloración de las muestras; por ejemplo, en reposo una muestra nos permite ver el plasma, el cual debe ser amarillento, cualquier variación indica procesos de hemólisis. Al agitarla en presencia de aire, debe tomar un color rojo claro, el cual indica que la HG se ha convertido en oxihemoglobina.

Si la muestra tiene un color rojo cereza, el pigmento es carbo-oxihemoglobina e indica contaminación por CO<sub>2</sub>. Ahora, como fácilmente podemos entender, el hecho de que se pueden diferenciar tan fácilmente los diferentes tipos de HG, hace posible su caracterización por métodos ópticos, pues su espectro de absorción varía significativamente.

La cuantificación de la HG debería estar relacionada directamente con la cantidad de eritrocitos, pues son los que principalmente la contienen, pero puede variar debido a malformaciones en éstos o deficiencias en la producción de los mismos por la médula ósea. Tan importantes son estas variaciones que los índices se separan por edad y condición homeostáticas de los individuos ya que los eritrocitos varían sus características de acuerdo con este factor.

Lo anterior lleva a que los análisis de nivel de HG se basen en una descomposición globular para su realización, a fin de considerar tanto la contenida en los glóbulos como la HG libre en el plasma sanguíneo.

Una forma de monitorear los niveles de hemoglobina es un análisis cromático de la muestra, aprovechando el contenido de hierro en la misma, por una separación química de los elementos constituyentes de la hemoglobina. Este análisis es conocido como de cianometahemoglobina.

#### **2.4.1. Método de hemiglobincianuro (HiCn)**

Este método separa las cianometahemoglobina usando ferrocianuro potásico y cianuro potásico en relación (1:251) sangre-disolvente. El ferrocianuro potásico oxida las hemoglobinas a hemiglobinas Hi (metahemoglobinas) y el cianuro potásico proporciona los iones cianuro (Cn<sup>-</sup>) para formar hemiglobincianuro (HiCn, cianometahemoglobina) que tiene una absorción máxima a una longitud de onda de 540 nm.

La capacidad de absorción de la solución se mide en un fotómetro o espectrofotómetro a 540 nm y se compara con la de una solución de HiCn estándar.



La solución debe ser de color amarillo claro y pálido, tener un pH de 7 a 7.4 y dar una lectura de 0 cuando se miden en fotómetros a 540 nm con relación a un patrón de agua.

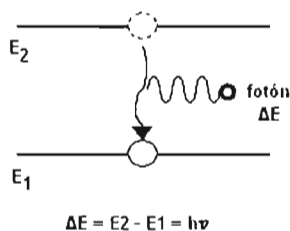
La ventaja del método del HiCn es que se miden la mayoría de las formas de hemoglobinas (Hb, HbO<sub>2</sub>, Hi y HbCO, pero no SHb). La muestra de la prueba se puede comparar directamente con el estándar HiCn y las lecturas se pueden hacer según conveniencia, gracias a la estabilidad de las muestras diluidas.

El aumento en la capacidad de absorción no debido a hemoglobina puede estar originado por la turbidez causada por proteínas plasmáticas anormales, hiperlipemias, grandes leucocitos o gotitas de grasa, factores todos ellos que pueden dar lugar a un incremento en la dispersión de luz y de la capacidad de absorción aparente[6,9].

## Capítulo 3. Conceptos básicos.

La luz se puede entender como un flujo de fotones, donde cada uno de ellos se puede representar como una onda electromagnética (OEM). Son capaces de interactuar entre sí, provocando fenómenos de interferencia y difracción, o interactuar con otras partículas, sacándolas de su estabilidad cinética y energética justificando la concepción del fotón como paquete o *cuanto* de energía.

Los fotones son emitidos durante un cambio de nivel energético de un electrón, provocado por absorción de energía seguido de un decaimiento del mismo. Éstos se desplazan como una onda electromagnética con longitudes de onda muy pequeñas, del orden de fracciones de micra.



**Figura 15.** La frecuencia es directamente proporcional a los niveles de energía.

Un fotón es una onda electromagnética, perturbación energética que se desplaza en tiempo y espacio. Tal energía es proporcional a la frecuencia de la onda asociada, dada por la relación de Planck:

$$E = h \cdot \nu$$

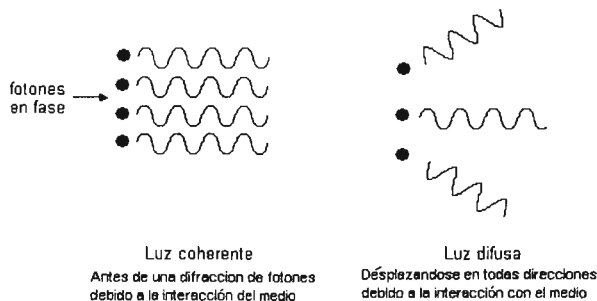
Donde:

**E** es la energía del fotón

**h** es la Constante de Planck

**$\nu$**  es la frecuencia de la onda.

Si se realiza emisión de un gran número de fotones con las mismas características de longitud de onda y energía, éstos podrán ser coherentes y viajar como rayos paralelos, colimados, siempre y cuando el medio de transmisión carezca de elementos capaces de romper este estado. Si dicho estado se mantiene, decimos que la luz se transmite como un haz de luz coherente.



**Figura 16.** Difracción de la luz debido a la interacción de los fotones con el medio de transmisión.

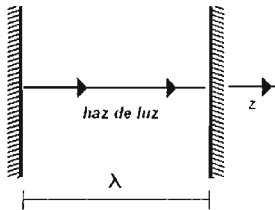
### 3.1. Haz de luz láser.

#### 3.1.1. Características de la luz láser.

La luz láser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), mientras que la luz ordinaria está compuesta por muchas longitudes de onda diferentes; la luz láser se caracteriza por tener fotones con una sola longitud de onda, lo cual le da propiedades no presentes en otro tipo de OEM.

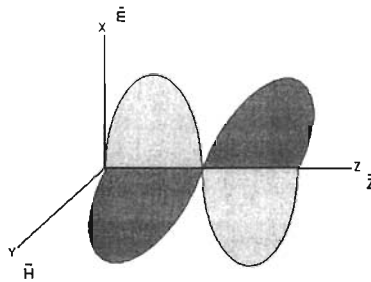
1. Coherencia. Al tratarse de una OEM se puede describir como una suma (superposición) de ondas en el tiempo, podemos concebir a la coherencia como considerando que estas ondas permanecen en fase a menos que las características del medio de transmisión no lo permitan.
2. Monocromaticidad. Debido a una única longitud de onda, la luz de un haz láser solo tiene un color.

El láser debe estas características al hecho de que se genera dentro de un resonador. Este resonador es un dispositivo que establece una frecuencia para las ondas luminosas que dentro de él se encuentran. Si el resonador es de muy buena calidad, la luz láser que se obtenga estará muy direccionada.



**Figura 17.** En un resonador, los fotones provocan la emisión de fotones a una sola longitud de onda y frecuencia, debido al material dentro del mismo. las características de los espejos limitarán la salida de electrones a solo una longitud de onda, frecuencia y dirección.

La concepción de la luz láser como OEM, permite situarla en región específica del espectro. Esta OEM es una onda transversal constituida por una combinación de un vector de campo eléctrico ( $\vec{E}$ ) y un vector de campo magnético ( $\vec{H}$ ) transversales, los cuales transportan energía y están oscilando en fase perpendicular a la dirección de propagación de la onda ( $\vec{z}$ ) [10,11].



**Figura 18.** Onda electromagnética

Descrita matemáticamente por:  $E = E \cos(k * r - \omega t)$ ,

la cual representa una onda de luz plana y monocromática, donde:

$\vec{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \hat{k}$  es el vector de propagación.

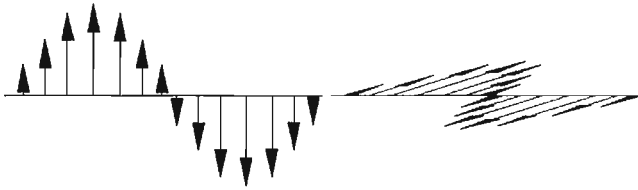
$r$  representa el vector de posición.  $r = [x, y, z]$ .

$\omega$  es la velocidad angular ( $\omega = 2 * \pi * f$ ).

### 3.1.2. Polarización.

Cada onda electromagnética se desplaza en una dirección dada por su vector característico  $k$ , si este vector es paralelo al vector de campo eléctrico, decimos que se trata de una OEM con polarización plana y con una distribución de intensidad transversal a la dirección de propagación.

Esta polarización, para el caso de los sistemas láser actuales, es definida por el mismo dispositivo. También tiene una clasificación de acuerdo con la orientación del campo de polarización.



**Figura 19.** La polarización puede ser TM o TE, dependiendo de la dirección del vector de propagación, y puede ser vertical u horizontal, dependiendo de la orientación del campo.

Pero, aún más importante que los modos transversales, es la misma distribución, la cual hipotéticamente debiera corresponder con una distribución plana, con la misma intensidad en cada punto de la misma. Esto supone un frente de onda<sup>1</sup> de longitud infinita. Lo anterior no es posible, dado que se presentan disminuciones de amplitud radial y longitudinalmente. Pero resulta útil pues, debido a las características repetitivas de las ondas armónicas podemos aproximar cualquier haz mediante frentes de onda planos<sup>2</sup>. La distribución de amplitud gaussiana<sup>3</sup> se ajusta más a las características de propagación y divergencia del láser.

<sup>1</sup> Frente de onda: *Es una superficie sobre la cual una perturbación óptica tiene fase constante.*

<sup>2</sup> Un frente de onda plano posee una distribución de amplitud igualmente constante.

<sup>3</sup> Se trata de un haz con frente de onda con distribución de amplitud gaussiana.

### 3.1.3. Haz gaussiano.

En muchas aplicaciones, es necesario enfocar o modificar el haz láser usando lentes y otros elementos ópticos. En general, un haz láser puede aproximarse asumiendo que tiene un perfil de intensidad gaussiano correspondiente a un modo ( $TEM_{00}$ ) del resonador [11,12].

El campo eléctrico en un haz gaussiano tiene una distribución de amplitud descrita por la siguiente expresión:

$$\Psi(x, y, z) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \sqrt{\frac{\exp\{-i[\phi(z) - \phi_0]\}}{\omega(z)}} \times \exp\left[-i \frac{k(x^2 + y^2)}{2R(z)} - \frac{(x^2 + y^2)}{\omega^2(z)}\right],$$

en donde:

$\omega(z)$  es el ancho del haz en función de la coordenada axial.

$\omega_0$  es el ancho del haz en mínimo.

$R(z)$  es la función que describe el radio de curvatura del haz.

$\Phi(z)$  es la inversión de fase de Guoy y representa la inversión igual a  $\pi$  que sufre el frente de onda al pasar por la región de ancho mínimo del haz.  $\Phi = \tan^{-1}(z/z_R)$  y  $z_R$  es la distancia de Rayleigh que se analizará en las subsecciones siguientes.

$x$  y  $y$  son las coordenadas transversales

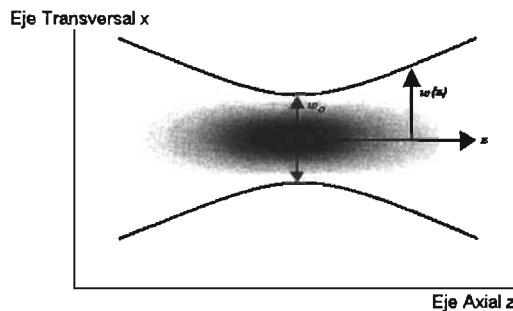


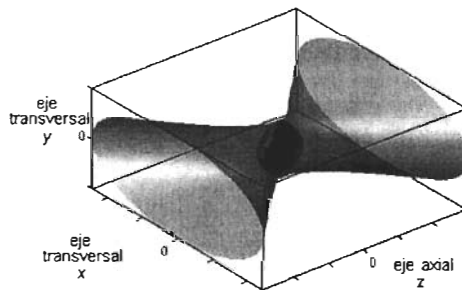
Figura 20. Distribución de amplitud gaussiana de un haz láser

Un frente de onda convergente esférico Gaussiano se hace plano en el foco, donde tiene también una distribución de intensidad gaussiana. Este tipo de haces, son los únicos cuya distribución de amplitudes no cambia al enfocarse. Lo anterior queda de manifiesto dado que la transformada de una gaussiana es también una gaussiana.

Este tipo de frente después de enfocarse diverge de nuevo, aun con esta divergencia, el haz permanece siendo perfectamente simétrico, donde su plano de simetría es el plano focal (que realmente no hay una verdadera focalización, véase 3.1.2.1).

### 3.1.3.1. Divergencia angular

El comportamiento de tipo de frente de onda en amplitud es función de la coordenada transversal y de la coordenada axial ( $z$ ). Es decir, su irradiancia se distribuye de manera tal que tiene su máximo valor cuando el ancho transversal es menor, alrededor de este punto se presenta una pseudo-focalización, el plano localizado en dicha pseudo-focalización se llama *cintura* del haz [11,12].



**Figura 21** Evolución del ancho del haz gaussiano. La cintura corresponde al punto cuyas coordenadas son  $(x,y,z)=(0,0,0)$ .

*Laser and Gaussian Beam Propagation and Transformation*  
Javier Akde  
University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

Esta característica es una de las más importantes a considerar en sistemas que emplean láser, pues la aproximación de un haz láser a un rayo láser es común y útil, pero depende de la amplitud del mismo.

En la exponencial de la ecuación anterior se tiene que la dependencia de la amplitud y la irradiancia es:

$$\Psi(x, z) \propto \exp\left[-\frac{x^2}{\omega^2(z)}\right]$$

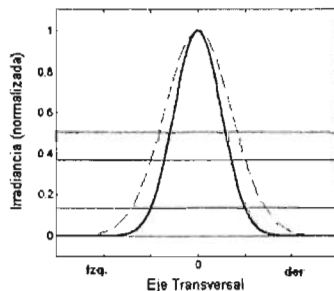
$$I(x, z) = |\Psi(x, z)|^2 \propto \exp\left[-\frac{2x^2}{\omega^2(z)}\right]$$

Donde  $\omega(z)$  describe la evolución a lo largo de la dirección de propagación, teniendo un decremento de  $1/e$  en amplitud, o  $1/e^2$  en irradiancia con respecto a la amplitud de propagación en el eje de propagación.

Al mismo tiempo que varía el frente en amplitud e irradiancia, el ancho del haz tendrá una variación en la misma dirección, esta variación se obtiene de la distribución de amplitud, obteniendo la siguiente relación [12]:

$$\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z\lambda}{\pi\omega_0^2}\right)^2}$$

Esta ecuación nos permite montar la distribución de irradiancia del haz gaussiano sobre una referencia tal que el punto de pseudo-focalización corresponda con  $z=0$ , donde tenemos la menor variación, es decir la mínima  $\omega_0$ . El parámetro que describe la evolución del frente después de este valor es la cintura del haz.



**Figura 22.** Distribución de irradiancia (→) y de amplitud(- -) en la cintura del haz gaussiano. Las líneas auxiliares indican los decrementos antes citados.



### 3.1.3.2. Divergencia

Para la ecuación del ancho del haz,

$$\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + \left( \frac{z\lambda}{\pi\omega_0^2} \right)^2}.$$

Es interesante observar que los valores grandes de  $z$ , hacen que dicha distribución presente una asíntota, con pendiente:

$$\theta_0 \cong \tan \theta_0 = \frac{\lambda}{\pi\omega_0}.$$

A esta pendiente se le da el nombre de divergencia del haz gaussiano y describe la velocidad y tendencia con la cual el haz se propaga hacia el infinito. Al mismo tiempo el ancho y la divergencia son parámetros recíprocos. Lo más importante de este parámetro es que nos permite saber que grado de colimación tiene el haz con el que se va a trabajar (o que tan poca divergencia).

### 3.1.3.3. Radio de curvatura

Si se toma el término de fase de un haz gaussiano, vemos que la ecuación resulta exponencial y depende de la coordenada transversal  $x$  :

$$\exp \left[ -i \frac{k(x^2 + y^2)}{2R(z)} \right]$$

Donde  $k$  es el número de onda y  $R(z)$  es una función que describe el radio de curvatura del frente de onda de un haz Gaussiano.

Este radio de curvatura depende de  $z$  y está dado por la siguiente expresión:

$$R(z) = z \left[ 1 - \left( \frac{\pi\omega_0^2}{z\lambda} \right)^2 \right]$$

#### 3.1.3.4. Distancia de Rayleigh

El ancho, la divergencia y el radio de curvatura son parámetros que dependen de  $\lambda_0$  y  $\omega_0$ . Esta dependencia puede ser descrita como:

$$z_R = \frac{\pi\omega_0^2}{\lambda}$$

Este parámetro es conocido como distancia de Rayleigh del haz gaussiano. Este parámetro describe el comportamiento del haz a lo largo de la distancia en la que se propaga. Con él, es posible conocer el ancho del haz a lo largo de su transmisión.

Cuando el ancho del haz a una distancia  $z=z_R$  es  $\sqrt{2}$  más grande que en la cintura y el radio de curvatura muestra su menor valor. Al mismo tiempo dado que existe una relación cuadrática con  $\omega_0$  sabemos que cuando más grande es la cintura, es más grande la longitud transversal, lo cual nos da un parámetro para estimar la colimación del haz [12].

#### 3.1.3.5. Parámetro $M^2$

En realidad ningún haz de luz láser es realmente gaussiano (sin embargo los láser de Neón y Argón son muy aproximados). Por lo cual se considera un grado de aproximación a ello con un factor de calidad  $M$  cuadrada ( $M^2$ ). Un haz totalmente gaussiano posee una  $M^2 = 1$ ; y para un láser real  $M^2 > 1$ . Para los citados láser de Neón y Argón la  $M^2$  está regularmente entre 1.1 y 1.3.

Los diodos láser colimados con  $TEM_{00}$  usualmente caen dentro de una  $M^2$  de 1.1 a 1.7. En todos los casos, este factor afecta directamente las características del haz láser por lo cual no puede ser ignorado en el diseño óptico en el cual esté implicado un sistema láser [11,12]. En el caso del diodo láser se presentan asimetrías y se obtiene astigmatismo, lo cual vuelve este problema mucho más complejo.

Para los láser que trabajan a una única longitud de onda problemas como aberración cromática no son importantes. De hecho, los fenómenos que más importan son la dispersión angular y la divergencia [12].

### 3.2. Reflexión y refracción de la luz en interfases planas.

La propagación de la luz depende de manera importante del medio de propagación, debido a éste se presentan en la transmisión fenómenos que afectan las características de la misma. Dos de estos fenómenos se presentan cuando un haz de luz pasa de un medio a otro, *la reflexión y la refracción*.

La presencia de estos fenómenos en algunos elementos es aprovechada por la instrumentación óptica y, su análisis, es principalmente fundamentado en la óptica geométrica usando la abstracción de un haz de luz como un rayo. Los elementos principales de la instrumentación óptica son las superficies planas y las lentes, además de variaciones de éstos.

Ahora bien, para este momento entendemos que trabajaremos con haz de luz láser y que este haz se describe mediante frentes de onda con distribución de potencia gaussiana. Conocemos las propiedades de los haces con estos frentes y que podemos estudiarlos considerándolos planos en un instante, así que procederemos a analizar los fenómenos que rodean a la propagación de la luz de tal manera que podamos describir y entender arreglos ópticos con tales características.

#### 3.2.1. Reflexión.

Cuando una onda luminosa incide sobre la superficie de separación entre dos medios, según el principio de Huygens, una parte de ella se refleja. En el mejor de los casos, el medio sobre el cual incide la onda es completamente plano, y la reflexión será *especular*, en caso contrario se tiene una reflexión *difusa*.

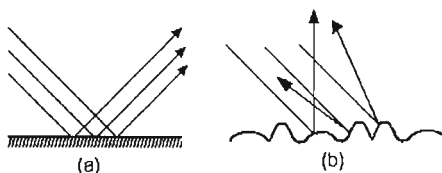
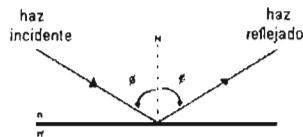


Figura 23. Reflexión especular (a) y difusa (b).

Suponiendo únicamente superficies planas y reflexión especular, la porción de luz reflejada se desplaza en una dirección distinta al haz de luz que incide el medio. Sin embargo, si se traza una normal a la superficie en el punto de incidencia (N), se puede ver que el haz reflejado se encuentra dentro del mismo plano que el incidente, lo que se conoce como la *primera ley de la reflexión*.

Por otro lado, el ángulo que forma el haz incidente con N y el formado por la misma con el haz reflejado son iguales. Este fenómeno de igualdad entre el ángulo de incidencia y el ángulo de reflexión es la *segunda ley de la reflexión*.

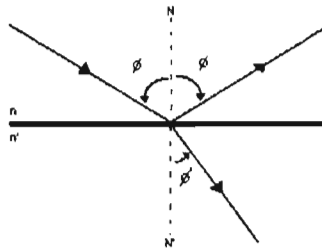


**Figura 24.** Cuando un haz es reflejado, el ángulo de incidencia es igual al de reflexión.

### 3.2.2. Refracción

La parte de la luz que penetra en el medio altera su trayectoria con respecto a la del haz incidente. Este cambio se debe principalmente a que la luz se propaga con velocidades distintas en medios de transmisión distintos.

Que la luz se desplace con diferente velocidad en diferentes medios se debe a la característica de densidad de los mismos, así, si un haz de luz incide con un ángulo  $\varphi_{inc}$  entre  $90^\circ$  y  $180^\circ$  desde una sustancia menos densa a otra más densa como es el caso del vidrio, su dirección cambia, transmitiéndose con un ángulo  $\varphi_{tr}$ .



**Figura 25.** Reflexión y refracción.

Lo anterior se relaciona mediante la ley de Snell, la cual establece que existe una relación constante entre las funciones seno de ambos ángulos. Tal relación indica que el cociente entre el seno del *ángulo incidencia*  $\varphi_{inc}$  y el seno del *ángulo de refracción*  $\varphi_{rx}$  es constante e igual a la relación de las velocidades de la luz  $v_1 / v_2$  en ambas sustancias.

$$\text{sen } \alpha / \text{sen } \beta = v_1 / v_2$$

Para el caso en el que tenemos un haz de luz desplazándose en el vacío, al incidir éste en un medio material cualquiera (isotrópico idealmente), de acuerdo con la ley de Snell:

$$\frac{\text{sen } \varphi_{inc}}{\text{sen } \varphi_{rx}} = \frac{c_0}{v_{rx}}$$

Donde  $c_0$  es la velocidad de la luz en el vacío.

El índice de refracción (IR) de un medio es el cociente entre la velocidad de la luz en el vacío entre la velocidad de la misma en el medio. Este índice representa las variaciones en velocidad y amplitud que sufre el haz de luz al interactuar con el medio.

$$\bar{N} = c_0/v_{rx}$$

El IR  $\bar{N}$  es adimensional, por ser el cociente de dos velocidades, y es siempre mayor que 1, en función de que la velocidad de la luz en el vacío es el máximo valor posible que toma ésta. En el caso del aire, el IR se acerca a 1, ya que la velocidad de la luz en él es aproximadamente  $2.9989 \times 10^8$  m/s [13,14,15].

$\bar{N}$  es una magnitud compleja que depende del coeficiente de transmisión del medio  $\alpha$ , mediante el coeficiente de extinción  $k_{ext}$ , y representa la velocidad con la que la amplitud de la luz refractada disminuye, y al mismo tiempo la elevación de temperatura en las partículas del medio por el cual se transmite. En el IR, la parte real describe las propiedades radiativas del material, mientras que la parte imaginaria describe las características de absorción de la partícula

$$\bar{N} = n - ik_{ext}$$

$$k_{ext} = \frac{\lambda}{4\pi} \alpha$$

El IR para medios translúcidos es puramente real, suponiendo que no absorbe al haz de luz y se representa únicamente por n.

Ahora si consideramos que la expresión del cociente entre los senos de los ángulos con los que se desplaza la luz en el vacío y el medio se puede expresar como:

$$\frac{1}{v_{inc}} \text{sen} \varphi_{inc} = \frac{1}{v_{rfx}} \text{sen} \varphi_{rfx}$$

Si multiplicamos ambos términos por la velocidad de la luz en el vacío:

$$\frac{c_0}{v_{inc}} \text{sen} \varphi_{inc} = \frac{c_0}{v_{rfx}} \text{sen} \varphi_{rfx}$$

Pero como:

$$c_0 / v_{inc} = n_{inc}$$

$$\bar{N}_{inc} \text{sen} \varphi_{inc} = \bar{N}_{rfx} \text{sen} \varphi_{rfx}$$

Anteriormente concluimos que la velocidad de la luz en un medio depende de la densidad del mismo, pero en la misma medida importante es la longitud de onda con la cual se desplazan los fotones que componen el haz de luz.

Considerando lo anterior, la magnitud  $\bar{N}$  vale para haces de luz propagándose en una longitud de onda específica y amplitud constante. Pero para medios no isotrópicos, existe un IR efectivo, promedio de los materiales o sustancias que lo componen.

### 3.3. Instrumentación óptica.

Como mencionamos al principio de la sección 3.2, el análisis de la instrumentación óptica es fundamentado en la óptica geométrica, ésta incluye la ley de Snell antes vista, además de ciertas características de la geometría de los componentes. Ahora bien, si lo que nos interesa es saber las variaciones en amplitud que tienen los rayos que son sometidos a variaciones en su trayectoria se utilizarán los coeficientes derivados de las ecuaciones de Fresnel, los cuales describen las características de los haces incidente, reflejado y transmitido como ondas electromagnéticas.

#### 3.3.1. Diafragma

En un sistema óptico se cuenta con un eje imaginario de referencia comúnmente llamado eje óptico, este eje se mantiene en una sola dirección a menos que exista algún elemento capaz de desviar el haz de luz empleado, tal como un espejo.

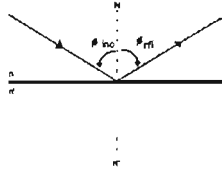
En el caso de que el haz de luz con el cual se trabaje sea difuso o posea una dispersión angular lo suficientemente grande para que el ángulo sólido formado por él exceda las dimensiones de los elementos se limita dicho ángulo mediante el uso de elementos llamados diafragmas [14].

#### 3.3.2. Prismas.

La incidencia de un haz de luz sobre una superficie plana supone reflexión y refracción, que son fenómenos que permiten aprovechar a las superficies planas como herramientas de instrumentación, mediante su uso se obtienen desviaciones o desplazamientos laterales, así como la descomposición de la luz en sus colores [11]. De estas superficies planas, las más usadas son los prismas, que concentran las características antes mencionadas.

### 3.3.2.1. Ángulo crítico y reflexión total interna.

Cuando un haz de luz pasa de un medio translucido a otro similar como el aire, el agua o vidrio, con un IR menor, la refracción siempre aumenta inversamente con el ángulo de incidencia.



**Figura 26.** La reflexión total interna ocurre cuando un haz que se desplaza en un medio, incide a otro con IR menor.

Entonces, para ángulos de incidencia cercanos a  $90^\circ$ , la refracción correspondiente tiende a cero y se presenta lo que se conoce como *reflexión total interna* y estos ángulos dependen exclusivamente del índice de refracción por lo que a este ángulo se le denomina *ángulo crítico* y su cálculo es sencillo mediante la ley de Snell.

Para medios no translúcidos, este ángulo no coincide con el antes mencionado, ya que cuanto menos translúcido sea, se aproximará a la normal. Cerca de este ángulo las variaciones en la cantidad de luz reflejada con las propiedades ópticas del medio externo son grandes [15].

El hecho de que se presenten cambios sustanciales en el haz transmitido, como energía perdida por la refracción nos presenta un parámetro fácil de monitorear, al mismo tiempo que nos requiere el diseño de circuitos de sensado suficientemente exactos para tener mediciones confiables.

### 3.3.2.2. Refracción y desviación en un prisma.

Un prisma es un medio transparente limitado por dos caras no paralelas que forman un ángulo al cual se le llama ángulo del prisma. Dado que de la misma manera que cualquier medio, el prisma cuenta con un índice de refracción diferente al del aire ( $n=1$ ), al hacer incidir un haz de luz sobre alguna de las caras del mismo, se



presentarán los fenómenos de reflexión y refracción. Lo anterior nos permite averiguar el índice de refracción del prisma.

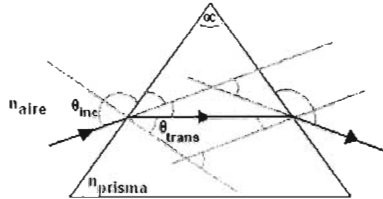


Figura 27. Incidencia y refracción de la luz en una cara del prisma.

$$n_{\text{aire}} \text{ sen } \theta_{\text{inc}} = n_{\text{prisma}} \text{ sen } \theta_{\text{trans}}$$

$$n_{\text{aire}} = 1 \quad \text{sen } \theta_{\text{inc}} = n_{\text{prisma}} \text{ sen } \theta_{\text{trans}}$$

$$n_{\text{prisma}} = \frac{\text{sen } \theta_{\text{inc}}}{\text{sen } \theta_{\text{trans}}}$$

Así mismo, el rayo continúa su transmisión a través del prisma, hasta incidir en la otra cara del mismo. El ángulo con el cual incide en dicha cara es dependiente del ángulo del prisma ( $\alpha$ ) y con él, podemos obtener el ángulo con el cual ha de emerger el haz transmitido en el prisma [13,15].

$$n_{\text{prisma}} \text{ sen } \theta_{\text{trans}} = n_{\text{aire}} \text{ sen } \theta_{\text{emergente}}$$

$$n_{\text{prisma}} \text{ sen } \theta_{\text{trans}} = \text{sen } \theta_{\text{emergente}}$$

Al observar la incidencia y transmisión del haz en el prisma, podemos ver que se forma un cuadrilátero con vértices ABCD.

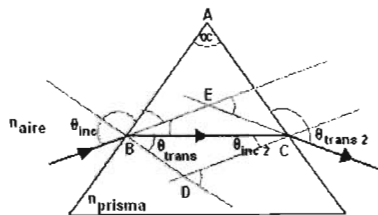


Figura 28. Relación de ángulos respecto a la geometría del prisma y trayectoria del haz.

Los ángulos ABD y ACD valen  $90^\circ$  por lo que:

$$BDC = 180^\circ - \alpha \quad \text{al mismo tiempo que} \quad BDC = \theta_{\text{trans}} + \theta_{\text{inc } 2}$$

Del triángulo BCD se puede deducir la desviación de los rayos dada por:

$$d = (\theta_{\text{inc}} - \theta_{\text{trans}}) + (\theta_{\text{trans } 2} - \theta_{\text{inc } 2}) = \theta_{\text{inc}} + \theta_{\text{trans } 2} - (\theta_{\text{inc } 2} + \theta_{\text{trans}}) = \theta_{\text{inc}} + \theta_{\text{trans } 2} - \alpha$$

El ángulo de desviación del rayo dentro del prisma depende del ángulo de incidencia, del ángulo emergente y del ángulo del prisma. Este ángulo de desviación,  $d_{\text{min}}$  es mínimo cuando el ángulo de incidencia es tal que:

$$\theta_{\text{inc}} = \theta_{\text{trans } 2} \quad \text{y} \quad d_{\text{min}} = 2 \theta_{\text{inc}} - \alpha$$

### 3.3.3. Espejos

Otra superficie plana sumamente importante es el espejo. Los espejos son superficies que idealmente no permiten la refracción, pero también son caracterizados por la incapacidad de cumplir con esta suposición.

Generalmente son superficies de cristal recubiertas de una superficie pulida de algún metal o películas formadas de materiales altamente pulidos. Su comportamiento queda definido por la ley de Snell y la refracción que presentan se traduce en pérdidas que dependen de la fineza del mismo, pero para nuestras aplicaciones consideraremos que reflejan el 100 % de la luz que sobre ellos inciden.

### 3.3.4. Lentes

Son elementos capaces de realizar cambios en la focalización de un haz de luz. Físicamente, se trata de elementos translucidos compuestos por dos superficies curvas. La luz al pasar por ellos sufrirá dos refracciones que idealmente no generarán pérdidas.

Una lente posee dos centros y dos radios de curvatura, uno para cada superficie. La línea que une ambos centros es el eje óptico de la lente. Los puntos de intersección entre el eje óptico de la lente y la superficie se llaman vértices (frontal y anterior). El punto desde el cual se emite la luz se llama foco, y al incidir los rayos en la lente se formará otro punto focal, sin importar si se trata de una lente convergente o divergente.

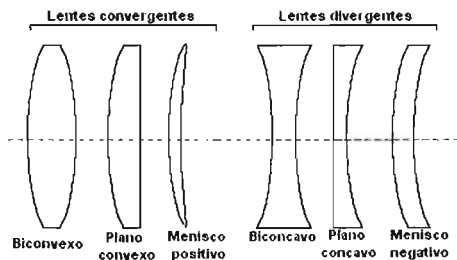


Figura 29. Tipos de Lentes.

La única diferencia es que cuando la luz incide del lado izquierdo, en las lentes convergentes o positivas el punto focal se forma por convergencia en el lado derecho de la misma lente y en las lentes divergentes o negativas no existe tal punto pero hay un pseudo foco que se ubica del lado izquierdo de la lente.

#### 3.3.4.1. Ecuación de las lentes (del fabricante de lentes)

Si comparado con la longitud del radio de curvatura de las superficies de la lente, el espesor de la misma puede ser despreciado, podemos hablar de una lente delgada. En este caso, el poder de refracción es simplemente la suma algebraica del poder de refracción de cada superficie de la lente.

$$P_{lente} = P_1 + P_2$$

$$\text{Si } P_1 = \frac{n_{lente} - n_0}{R_1} \quad \text{y} \quad -P_2 = \frac{n_0 - n_{lente}}{R_2}$$

Donde  $R_1$  es el radio de curvatura  
 $n_{lente}$  es el índice de refracción del material del que esta hecha la lente  
 $n_0$  es el índice de refracción del aire

$$P_{Lente} = (n_{lente} - n_0) \left( \frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right)$$

Que es la fórmula de las lentes (del fabricante de lentes).

Esta ecuación relaciona los radios de curvatura con el poder de refracción, pero también es interesante conocer la relación que existe entre la distancia focal del lente con las distancias al objeto y a la imagen, para lo cual:

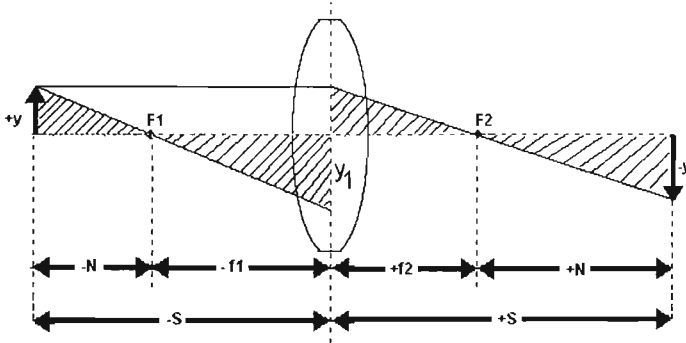


Figura 30. Relación de distancias focales de una lente.

$$\frac{y}{y_1} = \frac{N}{f_1}$$

$$\frac{y}{y_1} = \frac{f_2}{N'}$$

$$NN' = f_1 f_2$$

Que es la ecuación de las lentes de Newton.

## Capítulo 4.

### Implementación de sistemas experimentales.

La caracterización de las propiedades físicas de la sangre por medios ópticos, requiere la implementación de sistemas robustos capaces de entregar resultados confiables y comprobables con otras técnicas de caracterización en uso. En esta tesis estudiamos el potencial de la reflectometría óptica para la caracterización de sangre sin diluir. Se proponen e implementan tres dispositivos de reflectometría láser en configuración de reflexión total interna, trabajando siempre en ángulos de incidencia cercanos al ángulo crítico.

La sangre como sabemos, es un medio coloide que tiende a sedimentarse por estar compuesto de partículas sólidas (GR). Dado que el plasma es un medio prácticamente transparente y la HG contenida en los GR absorbe la luz visible dándoles un color rojo intenso, es posible distinguir a simple vista la frontera entre plasma simple y sangre (plasma con GR). Monitoreando la altura de esta frontera como función del tiempo; es posible caracterizar la velocidad de sedimentación. Sin embargo, como ya dijimos el proceso de sedimentación es un proceso complicado en el que se definen al menos tres etapas. Sería de utilidad poder distinguir las tres etapas del proceso de sedimentación con un método óptico simple.

En el caso de un coloide, se puede definir un IR efectivo ( $I_{Ref}$ ) el cual se refiere a la propagación de la luz "coherente" en el medio de índice de refracción IR [16]. En el caso de la sangre, este  $I_{Ref}$  es igual al IR del plasma más una contribución debida a los GR. La contribución de los GR es compleja debido a que los GR esparcen y absorben la luz, lo cual implica que la luz coherente se atenúa al atravesar la sangre. La atenuación de luz coherente es debida tanto a la absorción como al esparcimiento de la luz.

La luz esparcida que sale del haz coherente se convierte en luz difusa. Debido a que la reflectancia cerca del ángulo crítico es función de la concentración de GR podemos pensar en que es función del  $I_{Ref}$  de la sangre. Aunque como ya se dijo la relación entre el  $I_{Ref}$  y la reflectancia se obtiene de un modelo de esparcimiento

coherente y no de las relaciones de Fresnel. De cualquier manera nos referiremos a un cambio en reflectancia como a un cambio del IR de la sangre o plasma.

#### 4.1. Principios básicos de la reflectometría.

La reflectometría es, por principio, la técnica de medición que cuantifica la energía radiante reflejada por un material o superficie como función del ángulo de incidencia o de la longitud de onda.

En el caso de la reflexión total interna sabemos que:

1. La energía reflejada siempre será menor o igual que la energía incidente.
2. La diferencia entre ambas, es la energía refractada; es decir, aquella que se transmitió al medio externo.
3. En el caso de un medio externo absorbente y turbio, la energía total refractada es la suma de la energía absorbida y la esparcida, más la que sale en forma de haz coherente.

Para una interfase plana entre dos medios homogéneos y no absorbentes, uno de IR  $n_1$  y otro de IR  $n_2$ , el coeficiente de reflexión de una onda plana linealmente polarizada en TE o TM está dado por las relaciones de Fresnel,

$$r^{TE} = \frac{n_1 \cos \theta_1 - n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2}, \quad r^{TM} = \frac{n_2 \cos \theta_1 - n_1 \cos \theta_2}{n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2}$$

donde  $\theta_1$  es el ángulo de incidencia y  $\theta_2$  el de transmisión como se muestra en la figura.

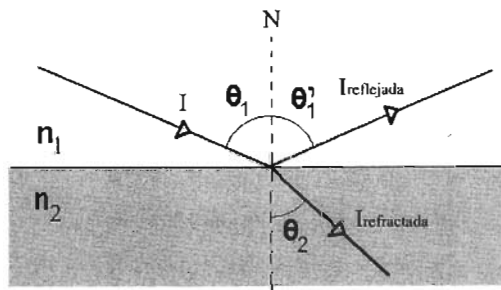


Figura 31. Relación de irradiancias en una interfaz especular.

La reflectancia,  $R$ , está dada por la magnitud al cuadrado del coeficiente de reflexión  $R = |r|^2$ . En una configuración de reflexión total interna, esto es,  $n_1 > n_2$  existe un ángulo crítico,  $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ , tal que, si el ángulo de incidencia es mayor a éste, la reflectancia es idénticamente uno. En este caso nos referimos a reflexión total interna.

En la figura 32 se muestra la gráfica de la reflectancia y de su derivada angular en polarización TE como función del ángulo para una interfase vidrio ( $n_1 = 1.51$ ) – plasma ( $n_2 = 1.345$ ). Se puede observar que en el ángulo crítico hay una discontinuidad en la derivada angular de la reflectancia: es infinita antes del ángulo crítico y cero después de éste,

$$\left. \frac{\partial R(\theta_1)}{\partial \theta_1} \right|_{\theta_1 \rightarrow \theta_c^-} \rightarrow \infty \quad \text{y} \quad \left. \frac{\partial R(\theta_1)}{\partial \theta_1} \right|_{\theta_1 > \theta_c} = 0.$$

Esto es cierto para una polarización TM también y para cualquier interfase entre dos medios transparentes en configuración de reflexión total interna. Esta divergencia de la derivada de la reflectancia implica que la reflectancia justo antes del ángulo crítico es muy sensible al IR del medio externo. Cuando el medio externo es absorbente y / o turbio, la divergencia de la derivada desaparece y estrictamente ya no existe un ángulo crítico. Sin embargo sigue habiendo un máximo de la derivada angular muy marcado en un ángulo de incidencia cercano a lo que sería el ángulo crítico si suponemos que el medio externo tiene un IR dado por su parte real solamente [17].

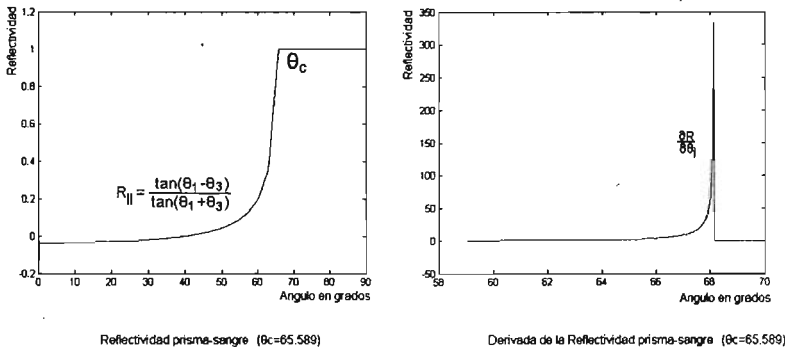


Figura 32. Reflectancia y su derivada angular como función del ángulo de incidencia para una interfase vidrio-plasma. Caso polarización TE.

En el caso de un haz óptico con distribución de amplitud gaussiana no hay discontinuidad en el ángulo crítico [17]. Pero si el haz está bien colimado, la derivada angular de la reflectancia muestra un máximo muy pronunciado en el ángulo crítico. Si el medio es turbio o absorbente el máximo en la derivada angular es menor que en el caso de un medio externo transparente [17]. Sin embargo el máximo en la derivada angular seguir siendo muy notorio y se mantiene una gran sensibilidad a cambios en el IR del medio externo.

Dado que la sangre es un medio coloide y las partículas (GR) absorben luz, es el caso de un medio turbio y absorbente a la vez. Una de las hipótesis de este trabajo es que la turbidez de la sangre debida a la presencia de los GR en el plasma puede ser monitoreada por reflexión de luz cerca del ángulo crítico en una configuración de reflexión total interna.

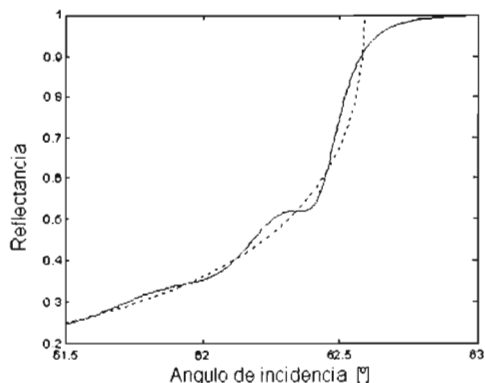
La reflexión de luz de una interfase plana entre un medio homogéneo y un medio turbio como es el caso de una interfase entre un prisma y la sangre no puede ser descrita con los coeficientes de reflexión de Fresnel [17]. Es necesario recurrir a un modelo de esparcimiento coherente de luz. Un modelo aproximado válido para medios turbios "tenues" como la sangre fue propuesto y verificado experimentalmente en las referencias [17] y [18]. Este modelo hace uso de la teoría de Mie para calcular el esparcimiento por las partículas. Aunque la Teoría de Mie se refiere a partículas esféricas, es sabido que las partículas no esféricas se pueden aproximar como esferas de volumen equivalente. Se ha mostrado que esta aproximación de esfera equivalente es valida para los GR que componen la sangre [19].

En la figura 33 se presenta una gráfica de la reflectancia de una onda plana en polarización TE y de longitud de onda  $\lambda = 0.633 \mu\text{m}$  usando el modelo de esparcimiento coherente de las referencias [17] y [18] en una interfase vidrio ( $n_1 = 1.5151$ ) y sangre (línea continua) alrededor del ángulo crítico. Para la sangre supusimos que ésta está compuesta de plasma con IR 1.345 y volumen de 40% de eritrocitos esféricos de radio  $2.8 \mu\text{m}$  e IR 1.406.

Estos parámetros para la sangre son los valores promedio según la referencia [19] También se muestra la gráfica de la reflectancia en la misma polarización para el caso de una interfase vidrio-plasma. La diferencia entre las dos curvas es debida a la presencia de los eritrocitos. De la gráfica podemos observar que la contribución de los



eritrocitos a la reflectancia es pequeña y es necesaria una alta resolución en la técnica experimental.

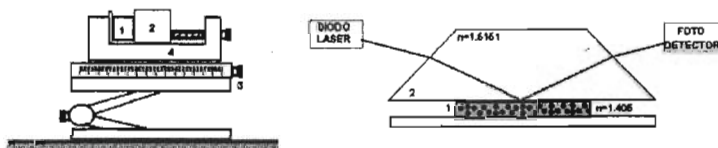


**Figura 33.** Reflectancia en una onda plana con polarización TE como función del ángulo de incidencia, para una interfase. (---) vidrio-plasma, (—) vidrio-sangre.

Las oscilaciones que se alcanzan a ver en la curva para la sangre se deben en parte a que supusimos todos los eritrocitos del mismo tamaño. Estas oscilaciones se reducirán al promediar sobre diferentes tamaños de GR como sería en el caso de la sangre real.

## 4.2. Reflectómetro óptico simple.

Sabemos que una medición de reflectancia cerca del ángulo crítico en configuración de reflexión total interna permite registrar los cambios en el IR del medio externo como función del tiempo. En el caso de medios homogéneos, estos cambios de reflectancia se pueden deber a la dilución de una sustancia en una fase continua en otra, pero para medios coloides, se pueden relacionar generalmente con procesos de sedimentación.



**Figura 34.** Sección transversal (1) Muestra sanguínea con citrato de sodio (2) Prisma Dove BK7 (3) Goniómetro Giratorio de precisión (4) Soporte Muestra interfaz.

Este sistema consiste en un prisma (BK7) en corte Dove, montado sobre un goniómetro de precisión que permite ubicarnos alrededor del ángulo crítico. El recipiente donde se deposita la sangre, es un aro de silicón sujeto entre la base del prisma y un portaobjetos de vidrio, como se aprecia en el esquema izquierdo de la figura 34.

Sobre el prisma se hace incidir un haz de luz colimada, emitido por un diodo láser Coherent IEC 80625-1 con longitud de onda de 633 nm a 1 mW. El haz reflejado es recolectado en un fotodetector de Si para su medición (figura 35), posteriormente se monitorea la muestra en un intervalo de una hora, de forma estática de acuerdo con el método de Westergreen para la sedimentación sanguínea.

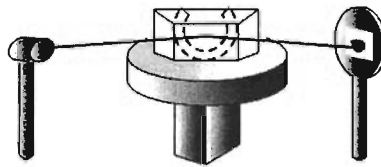


Figura 35. Reflectómetro óptico simple.

La fotocorriente generada en el fotodiodo es amplificada por un amplificador de transimpedancia y el voltaje de salida DC se registra usando un multímetro digital Fluke con precisión de 5 dígitos, el cual toma los promedios en periodos de tiempo menores a 1 segundo.

Para tener una referencia, se hacen mediciones de reflectancia de agua destilada, dada la composición del plasma (92% agua). Los resultados esperados, dependen de la diferencia en los índices de refracción,  $n_{\text{agua}}=1.331$ ,  $n_{\text{plasma}}=1.345$ ,  $n_{\text{H}_2\text{O}}=1.406$ , asociados a los diferentes procesos que ocurren en la sedimentación.

Experimentalmente es difícil la ubicación del ángulo crítico, pues debe corresponder a un máximo en el cambio de la irradiancia reflejada respecto al ángulo de incidencia, debido a las propiedades coloidales de la sangre. La ubicación del ángulo crítico se realiza aproximadamente en función de la referencia establecida con agua.

Como sabemos, la VSE es únicamente función del tiempo y se realiza de manera lenta los primeros 10 minutos, intervalo en el que los GR salen de su estabilidad de fuerzas electrostáticas, donde tienden a repelerse, para luego aglomerarse al salir de dicha estabilidad y agruparse en formaciones de Rouleaux durante los 40 minutos subsecuentes. Finalmente, la VSE disminuye para continuar durante cerca de dos horas.

Al monitorear la reología sanguínea en función del tiempo, esperamos encontrar variaciones en la reflectancia proporcionales a las etapas de sedimentación. Tales variaciones serán también proporcionales a cambios en el IR dentro del intervalo de valores del plasma-HG (1.345-1.406).

Este monitoreo de la reflectometría dependerá de manera importante, de la ubicación precisa del ángulo crítico, pues las variaciones en reflectancia se modifican de acuerdo a las características físicas de la muestra, pudiendo presentarse variaciones pequeñas entre los IR de la sangre y el plasma, las cuales serán difícilmente monitoreables.

Dado que en este sistema no se puede realizar un barrido angular de forma rápida con respecto a los tiempos de sedimentación, se utilizó otro sistema que se presenta en la siguiente sección. Además de que el hecho de girar la muestra angularmente induce turbiedad en la muestra alterando el proceso de sedimentación

### **4.3. Reflectómetro dinámico de barrido en ángulo.**

Una curva de reflectancia como función del ángulo de incidencia puede arrojar más información sobre las características físicas de la sangre. Sin embargo, la obtención de la curva de reflectancia como función del ángulo de incidencia requiere tomar una gran cantidad de datos a la misma cantidad de ángulos, es decir un barrido angular. Pero, los coloides tienden a un estado turbio, dependiente del tiempo, por lo cual sería conveniente obtener las curvas de tal manera que no se indujera variaciones de tal estado.

Una manera de realizar un barrido angular rápido, es mediante el uso de un espejo giratorio que rote el haz de luz reflejado, y luego usar una lente para enfocarlo

hacia la muestra, para más tarde recoger las variaciones en intensidad de la reflectancia con un detector rápido y un osciloscopio digital.

El haz resultante de la incidencia sobre la superficie del espejo, es redireccionado angularmente en un intervalo de casi  $360^\circ$ , por lo que se utiliza un diafragma para delimitarlo, como se muestra en la figura 37.

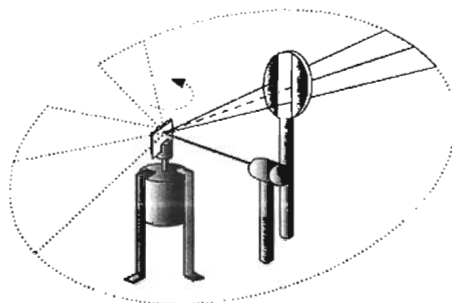


Figura 37. Barrido angular

El sistema mostrado en la figura 38, está compuesto de un diod láser cuyo haz incide en un espejo que gira con la ayuda de un motor.

El haz pasa enseguida por una lente cuyo cono de aceptación está limitado por un diafragma. El diafragma está montado sobre una lente que permite enfocar el haz, realizando el barrido sobre la muestra y conservando fijo el ángulo de incidencia.

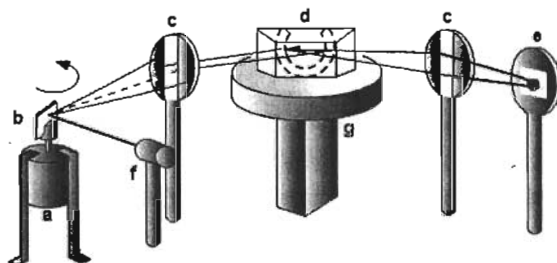


Figura 38. Reflectómetro dinámico. (a) Motor (b) Espejo giratorio (c) Diafragma (d) Muestra (e) Detector (f) Láser (g) Goniómetro.

A la salida del prisma se tiene una lente donde incide el haz reflejado por la interfase prisma sangre. Esta lente enfoca el haz haciéndolo incidir sobre la superficie del fotodetector, en donde el transductor asociado entrega la lectura a un osciloscopio digital.

El osciloscopio interpreta y almacena los datos como un arreglo ordenado, mostrando en tiempo real la curva de voltaje, proporcional a la reflectancia de la muestra. Sin embargo, la lectura del osciloscopio, debido a la frecuencia de muestreo, presenta voltajes instantáneos, mucho más susceptibles al ruido eléctrico del sistema. El instrumento usado es un osciloscopio Tektronik TDS500 que permite promediar un número especificado de curvas muestreadas respecto a intervalos de tiempo.

Iván Mendoza presenta en la Ref. [18], resultados acerca de este tipo de mediciones en barrido angular, obteniendo que existen diferencias respecto a una referencia en barrido mecánico y un factor de corrección constante y con magnitud de alrededor de 1%.

Con base en lo anterior, podemos considerar que las pérdidas ocasionadas por la instrumentación óptica, y de medición, serán constantes y no significativas en el análisis cualitativo ni el cuantitativo de nuestros resultados.

#### **4.4. Reflectómetro modulado en ángulo.**

Los cambios en el IR como lo hemos propuesto en las técnicas anteriores, se miden a través del monitoreo de la reflectancia con respecto al ángulo de incidencia en configuración de reflexión total interna. Otra manera, es tomar la derivada de la reflectancia cerca del ángulo crítico, donde sabemos presenta su discontinuidad y así midiendo el voltaje de la potencia reflejada determinar un cambio en el IR.

Lo anterior se logra modulando el ángulo de incidencia, mediante un vibrador piezoeléctrico excitado por un generador de funciones. El piezoeléctrico tiene colocado en su placa un espejo de alto índice de reflectancia el cual, oscila a la frecuencia de la onda eléctrica del generador, la cual será la frecuencia resonante del oscilador, de tal manera que se obtenga una oscilación completamente sinusoidal, y poder darle una amplitud suficiente para abarcar transversalmente la muestra.

El arreglo experimental utilizado se muestra en la figura 39. Como podemos ver, los elementos son los mismo que el la figura 38, solo que ésta vez el movimiento del espejo está modulado en ángulo mediante un elemento piezoeléctrico.

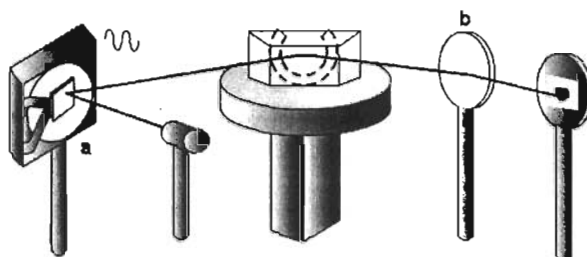


Figura 39. Reflectómetro modulado. (a) piezoeléctrico (b) Lente

La región que obtendremos con esta oscilación será lineal, y la señal resultante, es la señal de oscilación del piezoeléctrico modulada en un mensaje que corresponde a las variaciones de reflectancia de la muestra.

La portadora oscilará alrededor del ángulo crítico, variando en amplitud con respecto a él. Por lo que nuestro punto de muestreo corresponderá al máximo de la portadora (figura 40).

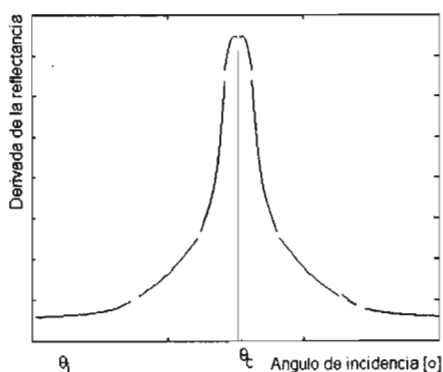


Figura 40. Señal registrada con el sistema modulado en ángulo.

Esta señal corresponde a la derivada de la reflectancia en el material, y será registrada por el osciloscopio a fin de localizar el valor máximo que corresponde al ángulo crítico. Este valor máximo podría permitir monitorear variaciones en las características físicas de la sangre en tiempo real, pero nuestro objetivo principal al usar esta técnica, es el monitoreo de la sedimentación con respecto al tiempo. El monitoreo de la reflectancia respecto al tiempo se logrará usando un multímetro, exactamente de la misma manera que en el monitoreo con el reflectómetro simple.

La localización del ángulo de esta manera, al mismo tiempo de no necesitar un ajuste mecánico es mas precisa, pues no necesitaremos realizar mediciones completas para saber si estamos o no ante una señal correspondiente a un monitoreo cercano al ángulo crítico.

## Capítulo 5.

### Resultados y Conclusiones

Considerando que esta tesis propone técnicas de análisis sanguíneo y que se busca evaluar cualitativamente su potencial, por lo que en este capítulo presentamos algunos resultados y la interpretación de los mismos.

Si bien los tres sistemas implementados en esta tesis están fundamentados en los mismos principios, cada uno de ellos presenta diferentes limitaciones.

#### 5.1 Monitoreo de la reflectancia cerca del ángulo crítico.

Cada uno de las sustancias presentes en tejido sanguíneo presentan características ópticas diferentes debido a la concentración de GR. Una de estas características, es una marcada diferencia en el índice de refracción.

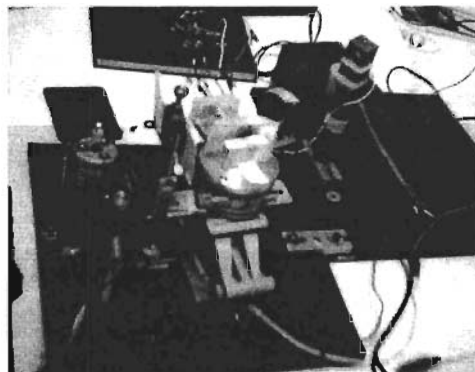


Figura 41. Reflectómetro Óptico

Mediante el uso del reflectómetro óptico propuesto, hemos monitoreado este proceso, de acuerdo con los tiempos establecidos por el método de Westergreen, obteniéndose las siguientes gráficas.



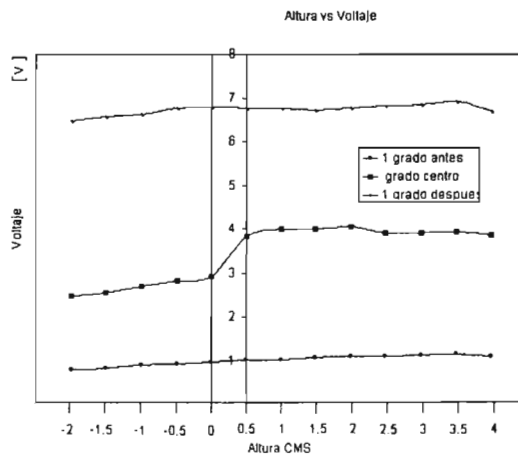


Figura 42. Variación de la Reflectancia alrededor del ángulo crítico.

En la gráfica 42 se muestran los resultados obtenidos al hacer un barrido en altura de una muestra completamente sedimentada, después de 2 horas. Se observa la diferencia que hay entre el voltaje, proporcional a la irradiancia que tenemos antes, después y cerca del ángulo crítico.

Cuando hemos logrado incidir a un ángulo cerca del ángulo crítico, la diferencia en reflectancia de la sangre respecto al plasma se registra como un aumento en la irradiancia sensada pero, en las curvas superior e inferior vemos también el efecto que produce una variación en cuanto a dicho ángulo. Estas curvas superior e inferior tienen variaciones insignificantes respecto a las obtenidas cerca del ángulo crítico, a pesar de ser ángulos apenas con un grado de diferencia.

En estas mediciones, el ángulo escogido como crítico depende de una apreciación de las variaciones observadas. Este ángulo fue ajustado mecánicamente usando este criterio como referencia. Lo anterior infiere un error muy grande, comprobado por el gran número de mediciones que fueron necesarias para obtener solo dos curvas que permitieron ver este comportamiento de forma relativamente clara, de las cuales se presenta únicamente la que tuvo una mayor variación.

Al mismo tiempo, después de establecer un ángulo cercano al crítico, se realizó un monitoreo contra el tiempo, en intervalos de un segundo, de la variación en reflectancia debido a la VSE de la sangre, observando, figura 43, que el ruido presente es grande, y en ocasiones comparable con la magnitud de las variaciones de reflectancia, pero al mismo tiempo permite ver que se trabajó en un ángulo no tan cercano al crítico.

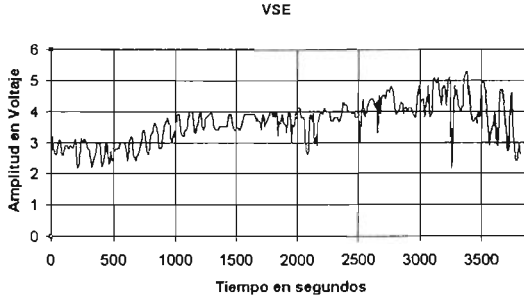


Figura 43. VSE con el reflectómetro óptico.

Las variaciones de IR aunque pequeñas, son vistas como incrementos de la señal, permitiendo observar un aumento inicial durante los primeros diez minutos, el cual obedece a las formaciones de Rouleaux. En los minutos siguientes se observa el cambio en la reflectancia, el cual conserva un comportamiento ascendente correspondiente a la fase en la que las partículas de mayores dimensiones (GR) se han sedimentado totalmente.

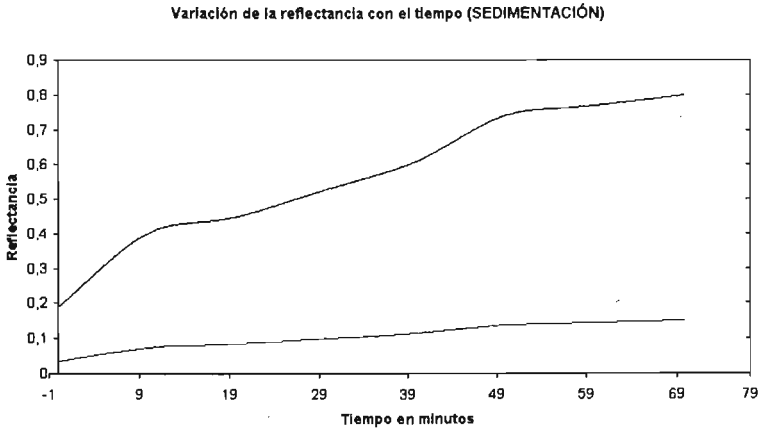


Figura 44. Monitoreo de la reflectancia a intervalos de 1min

El comportamiento descrito, se monitoreo también en la figura 44, registrando las variaciones de reflectancia cada minuto, a fin de tener una curva de reflectancia libre de ruido. En esta gráficas el comportamiento es mas definido debido a que en base a los experimentos anteriores, la ubicación del ángulo crítico mejoró, permitiéndonos una discriminación clara de las etapas de sedimentación anteriormente descritas.

La diferencia en cuanto a la variación de amplitud de la reflectancia entre las gráficas mostradas es fácilmente perceptible, lo cual, lejos de indicar que nuestros experimentos contienen resultados imprecisos justifica la necesidad de implementar una técnica que nos brinde la posibilidad de establecer de manera precisa el ángulo crítico.

## 5.2 Reflectometría de barrido angular.

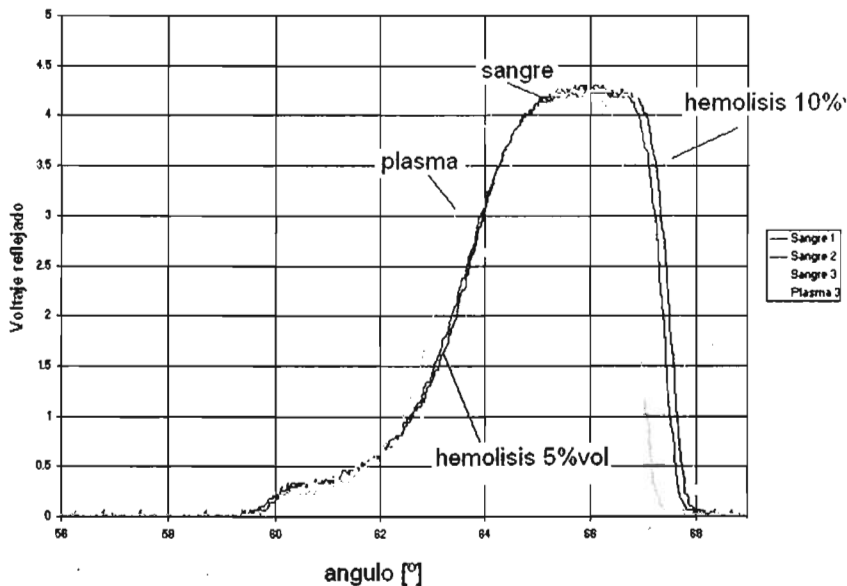
Una de las ventajas al caracterizar ópticamente la sangre, es la de asegurar que permanecerá en total reposo. Debido a que, como sabemos, se trata de un líquido coloide cuyo proceso de sedimentación ofrece varias fases de interés. Pero que fácilmente se vuelve turbio y cambia su comportamiento reológico.



Figura 46. Reflectómetro de barrido angular.

El establecimiento de una referencia sobre el ángulo al cual se debe monitorear el proceso de sedimentación, mejorará las observaciones acerca de dicho proceso. En este caso, la reflectometría de barrido angular permite realizar monitoreo en tiempo real de la reflectancia de los medios en estudio, entregándonos la referencia buscada como una curva de la derivada de la reflectancia contra el ángulo de incidencia. Pero no únicamente nos ofrece este dato, sino que también en esta curva podemos ver variaciones en la concentración de HG en la sangre, aprovechando que al tratarse de un medio coloide que esparce la luz, la ruptura de GR liberará HG en el plasma, promoviendo una absorción reflejada como una variación en el IR real del mismo, y por ende una variación mayor en la reflectancia.

La manera en la que se infieren cambios en la concentración de HG es la hemólisis, por lo que en la figura 47 se han registrado gráficas correspondientes al plasma y sangre completa, donde se indujeron procesos de hemólisis en diferentes grados.



**Figura 47.** Reflectancia de una muestra de sangre. con procesos de hemólisis inducidos.

En la figura 47, podemos ver que existe una variación neta en la concentración de HG libre en el plasma al inducir hemólisis, lo que se ve como un desplazamiento en la curva de reflectancia. Estas variaciones si bien en este momento sería difícil cuantificar de manera precisa, dejan claro que es tangible monitorear estos parámetros. Al mismo tiempo de que nos entregan un valor angular de la zona en la cual la curva de reflectancia tiene su mayor variación, el ángulo crítico.

Los resultados obtenidos muestran una la sensibilidad de la técnica de reflectometría en configuración de reflexión interna que nos deja claro también que las partículas contenidas en la sangre esparcen fuertemente la luz coherente que sobre ellas incide, mostrándose como una diferencia angular menor en la ubicación del ángulo crítico que la esperada teóricamente en función de los IR reales. Esta diferencia de ángulo crítico entre el plasma y la HG es de  $6.5^\circ$ , y vemos que en la gráfica 47 esta diferencia es apenas de un grado, debido a las características físicas de los GR.

La referencia angular práctica establecida para el plasma y la sangre, nos permite ubicar un ángulo cercano al punto en que la curva correspondiente a la derivada de la reflectancia tiene su valor máximo. Al mismo tiempo, nos ofrece la posibilidad de estimar niveles de concentración de HG libre en la sangre y aunque para esta tesis es un tema que queda fuera de alcance, justifica de manera clara un estudio posterior que permita determinar dicho parámetro.

### **5.3. Monitoreo de la sedimentación usando la reflectometría modulada en ángulo.**

Como sabemos, al tomar la derivada de reflectividad cerca del ángulo crítico y medir el voltaje proporcional, tendremos oportunidad de detectar tanto cambios en amplitud de la potencia reflejada, como variaciones en los ángulos de máxima reflectancia y, por ende, del IR.

Fundamentado en la necesidad de un sistema que permita el monitoreo en que la muestra permanezca estática, este sistema entrega una señal de AC que contiene tanto la información acerca de los procesos que se realizan dentro de la muestra, así

como también nos da la oportunidad de ubicarnos solamente en el punto de interés para nuestras mediciones.

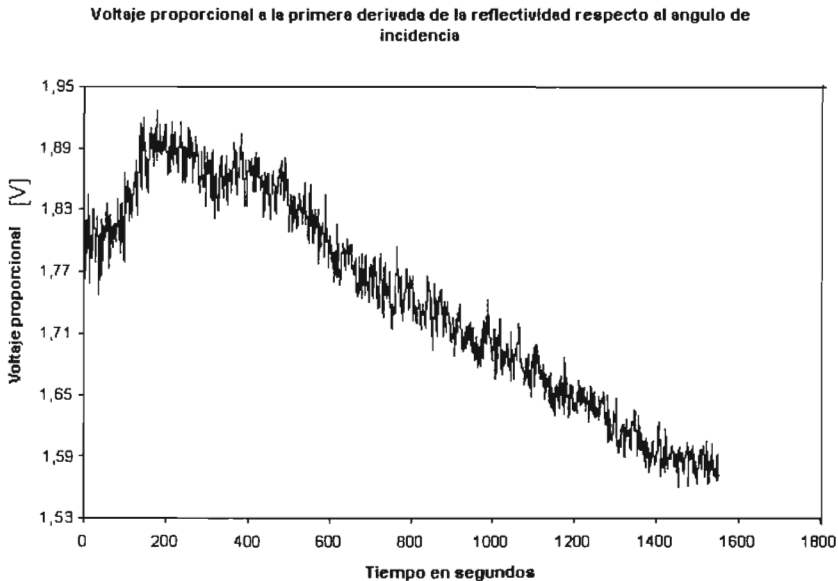


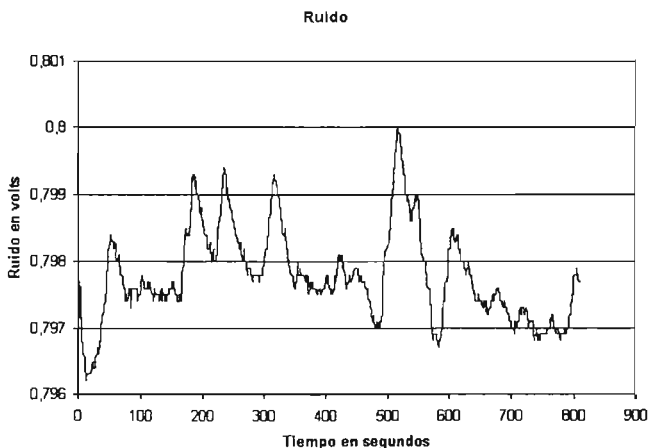
Figura 48

La figura 48 muestra el voltaje proporcional a la primera derivada de la reflectividad, después de localizar el ángulo en el cual la portadora de la señal modulada es máxima, se pudo monitorear las variaciones en la reflectancia alrededor del ángulo crítico. La variación en la señal AC muestra un cambio en la concentración de GR en la zona monitoreada, donde se puede ver la aparición de las formaciones de Rouleaux pero, debido a la disminución en la VSE se observa una pendiente negativa durante el resto del proceso.

Para el análisis de VSE es más complicado el análisis de las curva de AC de la derivada de reflectancia de la sangre, pero este sistema nos ofrece la posibilidad de un monitoreo de DC, idéntico al que se realizó con el reflectómetro óptico simple. Lamentablemente por falta de tiempo y disponibilidad en las muestras sanguíneas no se presenta una gráficas correspondiente a este monitoreo, pero de acuerdo a los resultados hasta aquí obtenidos, se justifica esta técnica como viable en la

determinación del ángulo crítico, y obtención de las características del proceso de sedimentación.

Finalmente, en la figura 49 se observa la gráficas del ruido presente en el proceso de monitoreo, lo que nosotros consideramos como inherente, aunque para experimentos relacionados posteriores debiera ser compensado o corregido, muestra una señal grande, pero que permite observar el comportamiento del proceso de sedimentación, de acuerdo a las variaciones registradas mediante el uso del reflectómetro simple.



**Figura 49.** Amplitud del ruido en el reflectómetro modulado.

Existen diversas técnicas incluidas en la adquisición de datos orientadas a la disminución o parcial supresión de el ruido de las señales obtenidas. Sin embargo debido a las mismas características de esta tesis bastará comentar que este sistema es susceptible de mejoras en cuanto a corrección de ruido e implementación, pero establece que existe variaciones suficientes en la reflectancia de la sangre tal que permite el monitoreo de algunos procesos físicos que en ella ocurren.

## 5.4. Conclusiones.

De los resultados mostrados en las secciones anteriores se desprenden las siguientes conclusiones. En esta tesis se verificó que es posible monitorear las características físicas de la sangre por reflexión de luz en el ángulo crítico en una configuración de reflexión interna, en particular se obtuvo evidencia clara de que es posible monitorear la sedimentación de ésta. Aparentemente es posible distinguir las diferentes etapas del proceso de sedimentación lo que ofrece una ventaja clara respecto al monitoreo de la frontera entre plasma y sangre que realizan los equipos optoelectrónicos actuales.

Adicionalmente se mostró que se puede cuantificar la concentración de HG en el plasma lo cual podría ser un indicativo práctico de un proceso de hemólisis.

Se implementaron tres sistemas de reflectometría láser para el monitoreo de características físicas de la sangre, permitiéndonos concluir que:

1. La sensibilidad del sistema óptico de medición depende principalmente de que tan cercano es al ángulo de incidencia al ángulo crítico de la interfase vidrio-plasma. El reflectómetro óptico simple, es muy preciso en el monitoreo de la reflectancia, pero la dificultad de ubicar el ángulo crítico, en particular en medios coloidales como la sangre, resulta en una baja reproducibilidad.
2. Si bien el cambio en la reflectancia de la sangre respecto al plasma en el ángulo crítico es grande, un pequeño error en el ángulo de incidencia resulta en una sensibilidad mucho menor.
3. La reflectometría de ángulo dinámico es una herramienta nueva que se encuentra en desarrollo y permitirá el monitoreo de cambios en los parámetros ópticos de la sangre durante procesos que en ella se inducen. Sin embargo la resolución que ofrece en los valores de la reflectancia es mucho menor con los otros reflectómetros estudiados.



4. Por las razones antes expuestas, la reflectometría modulada es, claramente la mejor herramienta para el monitoreo de la sedimentación sanguínea, pues ofrece la oportunidad de ubicar el ángulo crítico mediante un valor de amplitud fácilmente medible. Lo anterior hace que los resultados experimentales obtenidos mediante el uso de esta técnica sean fácilmente reproducibles.

En resumen, la propuesta que se deriva de éste trabajo para el monitoreo óptico de procesos en sangre es emplear un reflectómetro de modulación en ángulo. La señal AC del sistema nos permite ubicar el ángulo crítico con precisión y reproducibilidad.

Hay que recordar que éste puede ser diferente para diferentes muestras de sangre ya que el IR del plasma puede ser diferente debido a variaciones en la concentración de glucosa o de diferentes proteínas que se encuentran en solución. Una vez localizado el ángulo crítico es más conveniente monitorear la señal DC, la cual es proporcional a la reflectancia, como función del tiempo. La razón es que el cambio en la reflectancia en el ángulo crítico es mucho más grande (hasta de 400%) que la variación de la señal AC (del orden de 1%).

Por otro lado la señal a ruido en la medición de una señal DC es mejor que para la señal AC, como fue mostrado con el reflectómetro óptico simple.

## **Conclusiones.**

De los resultados mostrados en las secciones anteriores se desprenden las siguientes conclusiones. En esta tesis se verificó que es posible monitorear las características físicas de la sangre por reflexión de luz en el ángulo crítico en una configuración de reflexión interna, en particular se obtuvo evidencia clara de que es posible monitorear la sedimentación de ésta. Aparentemente es posible distinguir las diferentes etapas del proceso de sedimentación lo que ofrece una ventaja clara respecto al monitoreo de la frontera entre plasma y sangre que realizan los equipos optoelectrónicos actuales.

Adicionalmente se mostró que se puede cuantificar la concentración de HG en el plasma lo cual podría ser un indicativo práctico de un proceso de hemólisis.

Se implementaron tres sistemas de reflectometría láser para el monitoreo de características físicas de la sangre, permitiéndonos concluir que:

1. La sensibilidad del sistema óptico de medición depende principalmente de que tan cercano es al ángulo de incidencia al ángulo crítico de la interfase vidrio-plasma. El reflectómetro óptico simple, es muy preciso en el monitoreo de la reflectancia, pero la dificultad de ubicar el ángulo crítico, en particular en medios coloidales como la sangre, resulta en una baja reproducibilidad.
2. Si bien el cambio en la reflectancia de la sangre respecto al plasma en el ángulo crítico es grande, un pequeño error en el ángulo de incidencia resulta en una sensibilidad mucho menor.
3. La reflectometría de ángulo dinámico es una herramienta nueva que se encuentra en desarrollo y permitirá el monitoreo de cambios en los parámetros ópticos de la sangre durante procesos que en ella se inducen. Sin embargo la resolución que ofrece en los valores de la reflectancia es mucho menor con los otros reflectómetros estudiados.

4. Por las razones antes expuestas, la reflectometría modulada es, claramente la mejor herramienta para el monitoreo de la sedimentación sanguínea, pues ofrece la oportunidad de ubicar el ángulo crítico mediante un valor de amplitud fácilmente medible. Lo anterior hace que los resultados experimentales obtenidos mediante el uso de esta técnica sean fácilmente reproducibles.

En resumen, la propuesta que se deriva de éste trabajo para el monitoreo óptico de procesos en sangre es emplear un reflectómetro de modulación en ángulo. La señal AC del sistema nos permite ubicar el ángulo crítico con precisión y reproducibilidad.

Hay que recordar que éste puede ser diferente para diferentes muestras de sangre ya que el IR del plasma puede ser diferente debido a variaciones en la concentración de glucosa o de diferentes proteínas que se encuentran en solución. Una vez localizado el ángulo crítico es más conveniente monitorear la señal DC, la cual es proporcional a la reflectancia como función del tiempo. La razón es que el cambio en la reflectancia en el ángulo crítico es mucho más grande (hasta de 400%) que la variación de la señal AC (del orden de 1%).

Por otro lado la señal a ruido en la medición de una señal DC es mejor que para la señal AC, como fue mostrado con el reflectómetro óptico simple. Lo que nos permite decir, que a pesar de no ser del todo concluyentes, los resultados obtenidos permiten esbozar una buena técnica de monitoreo óptico de procesos y características de la sangre.

## **Bibliografía.**

1. Bioquímica.  
BOHINSKI, Robert.  
Edit. Fondo Educativo Interamericano. 1976
2. Fisiología Humana  
Guyton, Arthur C. Fisiología Humana. Sexta edición  
Edit. Interamericana 1980
3. Química.  
Michael Chang  
Ed. Mc Graw Hill Sexta Edición
4. Light Scattering by Multiple Red Blood Cells Jiangping He, Anders Karlsson  
Department of Electrosience, Electromagnetic Theory, Lund Institute of  
Technology of Sweden.
5. MedLinePlus Enciclopedia Medica  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish>
6. Hematología básica  
Cesar Ulloa Arteaga, Juan Carlos Ulloa Toral  
Edit. Salvat, 1995 Mexico, D.F.
7. Sedimentation rate, from folklore to facts  
Bedell SE and Bush BT: Erythrocyte Am J Med 78:1001-9, 1985
8. Análisis de la sedimentación de sangre por espectrometría fotoacústica.  
A. Landa-Hernandez. CINVESTAV - México  
<http://www.mda.cinvestav.mx/> Enero 2001



18. Desarrollo y aplicaciones de un reflectómetro dinámico.  
Mendoza, Iván  
Tesis de Licenciatura, escritura en proceso. Facultad de Ingeniería UNAM
19. Single scattering by red blood cells  
M. Hammer, D. Schweitzer, B. Michel, E. Thamm, A. Kolb, , Appl. Optics, 37 (31), pp. 7410-7418, 1998.
20. Dynamic Reflectometry near the critical angle for high resolution sensing of the index of refraction  
Augusto García Valenzuela, M. Peña Gomar  
CCADET UNAM 1998
21. Absorption and Scattering of Light by Small Particles.  
Boren and Huffman New York, Wiley 1983
22. Coherent reflection of light from a turbid suspension of particles in an internal reflection configuration: Theory versus experiment', por enviarse para su publicación.  
  
Augusto García-Valenzuela, Rubén G. Barrera, Celia Sánchez-Pérez, Alejandro Reyes-Coronado, Eugenio Méndez.
23. International Council for Standardization in Hematology.  
ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate.  
J Clin Pathol 1993;46:198-203.
24. Seditainer: Evacuated Blood Collection Tube For ESR  
Becton-Dickinson USA Cat. 366016 2004
25. Theoretical study of immersion optical clearing of blood in vessels  
Valery V. Tuchin, Dmitry M. Zhestkov  
*Division of Optics, Department of Physics, Saratov State University*  
*83 Astrahanskaya str., Saratov, 410012 Russia*
26. Laser beam scintillation with applications.  
Larry C. Andrews, Ronald L. Phillips, Cynthia Y. Hopfen.  
SPIE PRESS Washington USA 2001

27. BCHealth Services "Erythrocyte sedimentation rate"  
British Columbia Medical Association.  
<http://www.hlth.gov.bc.ca/msp/protocols/index.html>
  
28. Saadeh C. The erythrocyte sedimentation rate: Old and new clinical applications.  
South Med J 1998;91:220-5.
  
29. Sistema Nacional de Espectrofotometría  
Diario Oficial de la Federación y CENAM  
[http://www.simet.gob.mx/mv/PN/Fisica\\_PNF/1997/CNM\\_PNF\\_3.asp](http://www.simet.gob.mx/mv/PN/Fisica_PNF/1997/CNM_PNF_3.asp)