



Universidad Nacional Autónoma de México
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA ELÉCTRICA - INSTRUMENTACIÓN

**REFLECTIVIDAD ÓPTICA INTERNA COMO SENSOR DE
PROPIEDADES EFECTIVAS DE TEJIDO BIOLÓGICO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:

M.I. ANAYS ACEVEDO BARRERA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. AUGUSTO GARCÍA VALENZUELA, ICAT-UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. NEIL BRUCE DAVIDSON, ICAT-UNAM
DR. JUAN ARNALDO HERNÁNDEZ CORDERO, IIM-UNAM

Ciudad de México, Abril 2022



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Juan A. Hernández Cordero (IIM)

Secretario: Dr. Neil Charles Bruce Davidson (ICAT)

1er. Vocal: Dr. Augusto García Valenzuela (ICAT)

2do. Vocal: Dr. Santiago Camacho López (CICESE)

3er. Vocal: Dr. Oscar G. Rodríguez Herrera (ICAT)

Lugar donde se realizó la tesis: Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología
(ICAT- UNAM)

TUTOR DE TESIS:

Dr. Augusto García Valenzuela

FIRMA

Índice general

Resumen	III
Agradecimientos	V
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Objetivo general	5
1.3. Objetivos específicos	6
2. Esparcimiento de luz por una célula biológica	7
2.1. Aproximación de Difracción Anómala	7
2.1.1. Campo esparcido en $z = 0$	8
2.1.2. Método de la transformada de Fourier	9
2.1.3. Método de Rayleigh de fase estacionaria	11
2.2. Comparación con la teoría de Mie	14
3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos	16
3.1. La prueba de fragilidad osmótica en sangre	16
3.2. Arreglo experimental	19
3.3. Metodología de calibración y medición	20
3.3.1. Interpretación de la curva $n(t)$	24
3.4. Resultados	26
3.4.1. Sangre sana	26
3.4.2. Sangre con diagnóstico de anemia	29
3.4.3. Discusión	31
4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción	33
4.1. Modelos de reflectancia superficial	33

4.1.1.	Reflectancia coherente superficial	35
4.1.2.	Reflectancia total superficial	38
4.1.3.	Modelo combinado	39
4.2.	Resultados	40
4.2.1.	Comparación con simulaciones numéricas	40
4.2.2.	Aplicación experimental	45
4.3.	Discusión	47
5.	Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico	50
5.1.	Modelo de esparcimiento coherente basado en la ADA	50
5.1.1.	Retraso en fase en la película de biotejido	55
5.1.2.	Comparación con modelos de medio efectivo conocidos	58
5.1.3.	Efecto del cubreobjetos	62
5.2.	Resultados	63
5.2.1.	Sensibilidad del modelo a los parámetros de la microestructura	63
5.2.2.	Metodología experimental	66
5.2.3.	Comparación con curvas experimentales	68
5.3.	Discusión	71
6.	Conclusiones y perspectivas	74
	Apéndices	78
A.	Relación entre el vector de polarización y el vector de onda	78
B.	Coefficiente de reflexión coherente de la película confinada de biotejido	79
C.	Fórmula de reflectividad sin interferencia entre las múltiples reflexiones en la película de biotejido	81
D.	Cálculo de las funciones $l_{\pm}(r_p, \theta_1)$ para células elipsoidales	83
E.	Múltiples reflexiones en el interior del cubreobjetos	86
F.	Correcciones de superficie añadidas al problema de la película de biotejido confinada	89
G.	Publicaciones generadas durante el período del doctorado	90
	Referencias	105

Resumen

En este proyecto de investigación doctoral se desarrolló un modelo teórico para la reflectancia coherente de una interfaz plana en contacto con una película delgada de tejido biológico. Dicho modelo permite utilizar la medición de reflectividad como sensor para estudiar el contacto del tejido biológico con la interfaz y el índice de refracción del medio que rodea a las células y del interior de las mismas. Se desarrolló un segundo modelo teórico, basado en la Aproximación de Difracción Anómala, para calcular la reflexión de la componente coherente de la luz esparcida en una suspensión de células, confinada formando una película delgada entre dos interfaces planas y paralelas entre sí. La Aproximación de Difracción Anómala ofrece una herramienta versátil y simple en el modelado analítico de las células como esparcidores. En este trabajo nos enfocamos en particular en la reflexión interna de luz; esto es cuando la luz incide desde un medio con mayor índice de refracción. Las predicciones de nuestros modelos resultan consistentes con teorías de medio efectivo bien establecidas (como la teoría de medio efectivo de van de Hulst), y presenta mejores resultados que dichas teorías para ángulos de incidencia bajos, y para ángulos de incidencia mayores al ángulo crítico dado por el índice de refracción del medio matriz. Se obtuvo una excelente coincidencia de nuestro modelo con mediciones experimentales de la reflectividad interna de una película delgada de sangre completa, permitiéndonos inferir características promedio como la forma y tamaño de los eritrocitos, así como los índices de refracción intra y extracelular. La medición por reflexión tiene la ventaja de dejar libre el semiespacio de transmisión, lo cual permite interactuar con la muestra, activa o pasivamente durante la medición (por ejemplo, mediante el calentamiento de la muestra o la observación con un microscopio óptico). Por otro lado, la configuración de reflexión interna es muy sensible a cambios en el índice de refracción de los medios involucrados, en particular cerca de los ángulos críticos. Como parte del modelo para la película confinada, se analizó la contribución de células y/o biomoléculas en contacto óptico con el medio de incidencia, agregándose una corrección importante después del segundo ángulo crítico en la curva de reflectividad interna como función del ángulo de incidencia. Además, se discute el reto que impone medir correctamente la componente coherente de la luz esparcida en este tipo de sistemas, ya que debido al gran tamaño de las células en comparación a la longitud de onda incidente y al bajo contraste de índices de refracción tenemos luz difusa muy cerca de

la dirección de reflexión especular (mezclada con la luz coherente). Es decir, que las células por sí mismas no reflejan la luz; por lo cual la luz reflejada en una interfaz con un semiespacio de células en suspensión no contiene información de las células, sólo del medio matriz. Esta circunstancia hizo posible la implementación directa de un dispositivo para el monitoreo en tiempo real de un proceso de lisis celular, provocado al someter los eritrocitos (o glóbulos rojos de la sangre) a un estrés osmótico. El dispositivo detecta el cambio de índice de refracción en el medio extracelular debido al mezclado con la hemoglobina que sale del interior de los eritrocitos, con una precisión mayor a la de un refractómetro comercial (refractómetro de Abbe). El dispositivo permitió diferenciar entre sangre de individuos con anemia y sangre sana, aportando una aplicación segura en el diagnóstico de patologías relacionadas con este padecimiento. Se espera que el modelo y metodología desarrollados contribuyan a la generación de nuevos sensores para el monitoreo de otros procesos biológicos, como el crecimiento de bacterias o la coagulación de la sangre.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Augusto García Valenzuela por brindarme la oportunidad de trabajar en este tema y con él, y de quien he aprendido a disfrutar del trabajo, sobre todo cuando los resultados parecen ser correctos. Su apoyo y su experiencia, siempre disponibles, fueron fundamentales para mi formación en esta etapa.

Agradezco al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), por brindarme sus instalaciones como estudiante de doctorado. Es un orgullo haber realizado mis estudios de posgrado en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Gracias también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico, a través de la beca: 708764. De la misma manera agradezco al proyecto PAPIIT IN101821, a través del cual recibí una beca para la obtención del grado de doctor.

Doy gracias a toda mi familia por su apoyo emocional, que siempre hace falta. En primer lugar a mis padres, que son mi paradigma de dedicación laboral y superación personal. A mi hermana y mi tía Grisel, por su paciencia, su esfuerzo y respaldo. A mi abuela María, que es nuestro ejemplo de resistencia. A mi abuelo César y a tía Ana María, que seguro me contemplan orgullosos.

Por último, agradezco especialmente a Oliver por nuestras discusiones académicas llenas de substancia, por sus recomendaciones siempre certeras y por su ayuda infinita. No hay duda de que nuestra relación me favorece. Gracias por tu presencia en mi vida.

Introducción

1.1. Antecedentes

El uso de herramientas ópticas en aplicaciones médicas data del siglo XVII, con la invención del microscopio óptico. Este aparato permitió identificar la célula como la unidad fundamental en la actividad metabólica de un organismo, convirtiéndose en un equipo imprescindible, incluso en la actualidad, para el diagnóstico y seguimiento de la evolución de enfermedades a nivel de tejidos biológicos. Posteriormente, en el siglo XIX, el descubrimiento de los rayos X abrió las puertas hacia las técnicas de diagnóstico médico de carácter no invasivo, siendo particularmente importante en la obtención de imágenes de tejido óseo [1]. Actualmente, una larga lista de técnicas ópticas complementan y agilizan la metodología usada tradicionalmente para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Los ejemplos van desde los aparatos de uso más común, como oxímetros de flujo o pulseras inteligentes (que pueden detectar la oxigenación de la sangre, el ritmo cardíaco y la presión arterial), hasta las técnicas más sofisticadas a nivel de laboratorio, como la citometría de flujo (con la que se pueden determinar características de células individuales a partir del esparcimiento de la luz) o la espectroscopía de fluorescencia (que se puede usar para el monitoreo de un proceso de cicatrización *in vivo*) [1–3]. La rama de la ciencia donde el conocimiento y la tecnología existente en el campo de la óptica se ponen a disposición de aplicaciones médicas se conoce con el nombre de Óptica Biomédica [4]. Aunque algunos autores prefieren el término de Fotónica Biomédica [1] para referirse al uso de cualquier frecuencia dentro del espectro electromagnético, en este trabajo centramos nuestro interés en el intervalo de frecuencias ópticas o intervalo visible.

Para el desarrollo de nuevos dispositivos en el marco de la Óptica Biomédica y sacar el máximo provecho de la tecnología disponible, es necesario entender cómo se propaga la luz en un tejido biológico. El análisis de la propagación de luz en cualquier medio (o material) consiste básicamente en estudiar la reflexión y transmisión desde (o hacia) un medio de referencia. A partir de este enfoque, la propiedad óptica que adquiere mayor relevancia es el índice de refracción del medio bajo estudio. El índice de refracción determina la velocidad de propagación de

la luz en el medio en relación a la velocidad de la luz en el vacío, por lo cual está directamente relacionado con la composición del medio. En materiales homogéneos el índice de refracción tiene un valor constante o uniforme en todo el espacio. Si el material es, además, transparente su índice de refracción es una cantidad real; mientras que si este material presenta pérdidas por absorción hablaremos de un índice de refracción complejo, $n = n' + in''$, cuya parte imaginaria n'' cuantifica dichas pérdidas. En muchos textos de óptica, los autores referencia a la parte real del índice de refracción como el índice de refracción; aquí también utilizaremos dicha terminología, a menos que sea necesario aclarar si se trata de un índice de refracción complejo. Desde hace más de 100 años, existen equipos comerciales diseñados para medir sencilla y rápidamente (usando la ley de Snell) el índice de refracción de líquidos transparentes, el más conocido de ellos es el refractómetro de Abbe. En este aparato se hace incidir luz en varias direcciones a la vez, de modo que la luz atraviesa una película delgada de la muestra y luego se refracta hacia un prisma de vidrio, que tiene un índice de refracción mayor. La luz que se transmite al prisma está limitada a ángulos de viaje menores al ángulo crítico correspondiente a la interfaz vidrio-muestra, por lo que midiendo el ángulo que limita el cono de luz transmitida se determina el índice de refracción de la muestra bajo estudio [5]. Con el refractómetro de Abbe también es posible medir muestras absorbentes siempre que la atenuación que experimenta la luz al atravesar la muestra sea suficientemente pequeña, lográndose obtener una lectura clara de la parte real n' del índice de refracción [6, 36]. Cuando no se satisface esta condición es necesario recurrir a otros métodos para medir el índice de refracción, también llamados técnicas de refractometría no convencionales, como la medición de reflexión interna cercana al ángulo crítico [37]. De manera similar, esta condición es aplicable en el caso de medios no homogéneos, en donde las pérdidas se producen a causa del esparcimiento de la luz por discontinuidades del índice de refracción en el espacio.

En medios no homogéneos, tales como una suspensión de partículas o un tejido biológico, la luz incidente en una dirección determinada es esparcida en todas direcciones en mayor o menor medida. El patrón de esparcimiento específico depende principalmente del tamaño de los esparcidores, relativo a la longitud de onda de la luz incidente. Por ejemplo, partículas pequeñas comparadas a la longitud de onda esparcen la luz isotrópicamente (esparcimiento de Rayleigh) [7, 42]. A medida que el tamaño aumenta cambia el patrón de esparcimiento, concentrándose más alrededor de la dirección de incidencia para partículas grandes respecto a la longitud de onda. La distribución de intensidad de luz esparcida por una partícula se describe utilizando la matriz de amplitud de esparcimiento $S(\theta)$, donde θ es el ángulo de esparcimiento medido desde la dirección de incidencia. Dicha distribución también dependerá de la forma geométrica de la partícula, su orientación, su índice de refracción y el índice de refracción del medio que la rodea. Por ejemplo, el problema del esparcimiento de una onda electromagnética por una partícula esférica (no necesariamente dieléctrica) fue resuelto analíticamente y de manera exacta por Gustav Mie a inicios del siglo XX; dicha solución se denomina teoría de Mie y se ha extendido a otras geometrías con simetría esférica o cilíndrica [7]. Para geometrías de partícula más complicadas se suelen utilizar simulaciones numéricas o aproximaciones. En

1. Introducción

el caso de partículas grandes (comparadas a la longitud de onda) y tenues (que su índice de refracción no difiere mucho del circundante) una alternativa que ofrece muy buenos resultados es la aproximación de difracción anómala [24, 51], que se describirá más adelante.

Cuando se analizan sistemas de varias partículas también constituye un factor importante la fracción de volumen que estas ocupan; en este parámetro están ligados el tamaño y la densidad en número de partículas. En un sistema de partículas con baja fracción de volumen (partículas pequeñas y/o baja densidad), donde hay suficiente espacio entre las partículas como para asegurar que el campo electromagnético esparcido por una de ellas no afecta a las demás a su alrededor, se calcula el campo total esparcido por el conjunto de partículas como la suma de los campos esparcidos por las partículas individuales [7]. Este escenario describe el esparcimiento simple, y muy pocas veces se satisfacen estas condiciones. En caso contrario tendremos esparcimiento múltiple, como ocurre en suspensiones de células como la sangre completa (donde las células ocupan una fracción de volumen cercana al 50 %) o en un tejido biológico. Por otro lado, la luz esparcida por un conjunto de partículas suele analizarse por separado en dos componentes: coherente y difusa. La componente coherente está asociada al promedio de los campos electromagnéticos sobre todas las posibles configuraciones del sistema, esta componente mantiene una relación de fase determinista con el campo electromagnético incidente; esto quiere decir que ambos campos pueden producir interferencia (independientemente de la coherencia temporal o espacial de la fuente de iluminación). La componente difusa, también llamada incoherente, corresponde a las fluctuaciones alrededor del promedio y su relación de fase con la luz incidente es aleatoria. Podemos medir luz difusa en casi cualquier dirección de esparcimiento, mientras que la componente coherente sólo se localiza en la dirección de incidencia (o dirección de esparcimiento frontal, $\theta = 0$). La propagación del campo esparcido coherentemente se puede describir mediante una constante de propagación efectiva que caracteriza a un medio homogéneo equivalente (medio efectivo), y en algunos casos dicha constante puede ser interpretada como un índice de refracción efectivo (n_{ef}), que es un número complejo en general. En una película inhomogénea, como la que se muestra en la Figura 1.1, podemos hablar de reflectancia y transmitancia difusas, así como de una reflectancia y transmitancia coherente.

Si es posible definir un índice de refracción efectivo de la película de espesor d (en la Figura 1.1), entonces la componente coherente se refracta siguiendo la ley de Snell con la parte real de este índice de refracción efectivo complejo, y la transmitancia (T) a incidencia normal se calcula con la conocida ley de Lambert-Beer: $T = \exp(-\alpha_{ext}d)$, siendo α_{ext} el coeficiente de extinción del medio efectivo, que es proporcional a la parte imaginaria de n_{ef} [8]. En α_{ext} estarán mezclados, en el caso más general, el esparcimiento y la absorción de la luz por las partículas, así como la absorción por parte del medio matriz. A diferencia del fenómeno de absorción, el esparcimiento puede modificar también la parte real del índice de refracción efectivo.

Existen varios modelos teóricos de medio efectivo que proporcionan expresiones analíticas para calcular el índice de refracción efectivo de un medio turbio (o que esparce la luz); por ejemplo, el modelo de medio efectivo de Maxwell Garnett es muy utilizado para estudiar

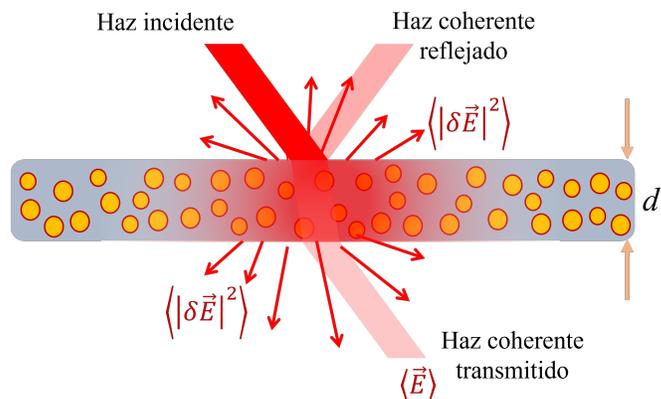


Figura 1.1: La luz incidente en una película inhomogénea se esparce en todas direcciones (luz difusa). La componente promedio (o coherente) de la luz esparcida se refleja y se transmite siguiendo la ley de Snell.

suspensiones de nanopartículas metálicas esféricas, pequeñas comparadas a la longitud de onda [8]. Para suspensiones de partículas grandes y tenues (por ejemplo, células biológicas), se han obtenido muy buenos resultados con la teoría de medio efectivo de van de Hulst [9, 10]. En el caso particular de tejidos biológicos y luz visible, se tiene que los esparcidores (las células) son grandes comparados a la longitud de onda y el índice de refracción efectivo correspondiente tiene un origen no local, por lo que hay que manejar cuidadosamente este concepto [11].

La componente difusa de la luz esparcida ha sido la más utilizada para interrogar y analizar tejido biológico. Por ejemplo, existen técnicas de medición basadas en la espectroscopía por reflexión o transmisión de luz difusa, se usa en la oximetría de flujo [12, 13], pero también para distinguir tejido sano de tejido enfermo o para estudiar la microcirculación de la sangre en tejido [14, 15], entre otras. Sin embargo, para aplicar correctamente las teorías que describen la propagación de luz difusa (teoría de transferencia radiativa) se requiere un recorrido largo de la luz dentro de la muestra, y la inferencia de parámetros microestructurales a partir de las mediciones no es directa [2, 16, 17]. La razón por la cual la componente coherente ha sido poco estudiada en esta área es que penetra muy poco en el tejido; sin embargo, penetra lo suficiente para interrogar una película delgada de biotejido. La ventaja de usar la componente coherente es la alta sensibilidad a los parámetros microestructurales del tejido y la relativa simplicidad en su interpretación y modelado. En particular, la medición de la reflectancia coherente o reflectividad (definida como la reflectancia de colimado a colimado), en configuración de reflexión interna, puede ser muy útil en la determinación de propiedades promedio de una capa delgada de células [18].

En las Figuras 1.2(a) y 1.2(b) se ilustra, respectivamente, la variación de la parte real n'_2 e imaginaria n''_2 del índice de refracción de una película delgada homogénea a partir de la curva de reflectividad interna como función del ángulo de incidencia $R(\theta_i)$. La película está confinada

1. Introducción

entre vidrio ($n_1 \approx 1.5$) y aire ($n_3 \approx 1$), y hemos calculado la reflectividad como el valor absoluto al cuadrado del coeficiente de reflexión de Fresnel para tres medios homogéneos [41, 42]. Dicha fórmula incluye la interferencia entre múltiples reflexiones en la película delgada, las cuales hemos borrado en este caso usando una integral gaussiana en el ángulo θ , simulando lo que ocurre experimentalmente.

En este caso, las curvas corresponden a polarización TM (o paralela al plano de incidencia),

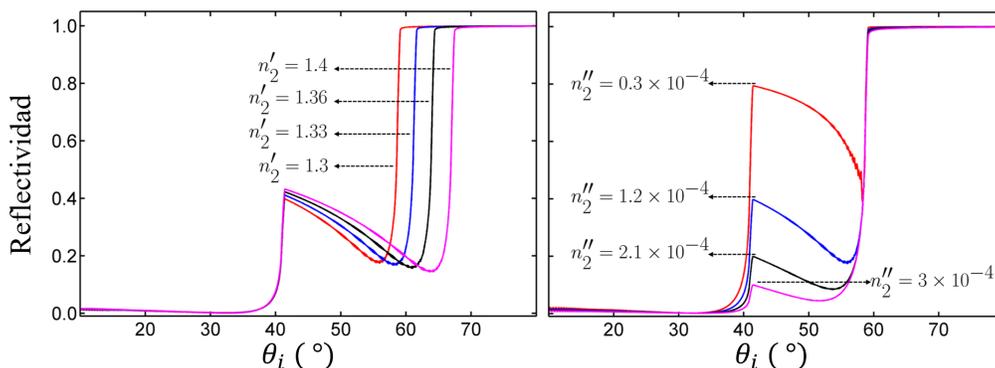


Figura 1.2: Curvas de reflectividad como función del ángulo de incidencia (en polarización TM) para una película delgada homogénea (con espesor $d = 100\mu\text{m}$) de índice de refracción complejo $n_2 = n'_2 + in''_2$; (a) variando la parte real n'_2 y (b) variando la parte imaginaria n''_2

pero los detalles que observaremos no varían con la polarización de la luz. Notemos que es posible encontrar regiones de alta sensibilidad en este tipo de curvas (cerca de los ángulos críticos), lo cual nos permite identificar rápidamente si la variable de cambio está afectando la extinción del medio o la parte real del índice de refracción n_2 . Si suponemos que n_2 es un índice de refracción efectivo, inmediatamente podemos asociar dichos cambios con propiedades microscópicas de la película. Sin embargo, si se trata de una película de tejido biológico o una suspensión de células, la teoría de medio efectivo no siempre es aplicable y es necesario desarrollar un modelo teórico específico para la componente coherente del campo eléctrico reflejado.

1.2. Objetivo general

El objetivo general de este proyecto de investigación doctoral consistió en estudiar teórica y experimentalmente la reflectancia coherente, en una configuración de reflexión interna, de tejidos biológicos y/o suspensiones de células biológicas para derivar valores promedio del tamaño y forma de las células, los índices de refracción dentro y fuera de ellas, así como la fracción de volumen que ocupan dichas células; además, parte del objetivo general fue adaptar la medición de la reflectividad óptica interna para el monitoreo específico de alguna de estas propiedades y mostrar su utilidad como sensor para estudiar la cinética de procesos biológicos.

1.3. Objetivos específicos

- Modelar teóricamente la reflectividad óptica de una interfaz plana en contacto con tejidos biológicos o suspensiones de células biológicas, utilizando la Aproximación de Difracción Anómala.
- Optimizar un dispositivo experimental para obtener la curva de reflectividad como función del ángulo de incidencia de la luz, $R(\theta_i)$.
- Analizar el error en la medición de reflexión coherente debido a la luz difusa y proponer maneras de reducirlo al mínimo posible.
- Revisar y mejorar el método de procesamiento de los datos experimentales de reflectividad interna, incluyendo la construcción de la escala angular en la curva $R(\theta_i)$.
- Comparar las predicciones de los modelos teóricos con mediciones experimentales de la reflectividad interna como función del ángulo de incidencia de la luz.
- Estudiar la validez de teorías de medio efectivo conocidas en su aplicación a medios biológicos.
- Abordar las limitaciones del concepto de índice de refracción efectivo para tejidos biológicos.
- Identificar qué propiedades físicas promedio de un tejido biológico pueden ser extraídas de la comparación con el experimento y explorar la sensibilidad de la curva $R(\theta_i)$ frente a cambios en dichas propiedades.
- Demostrar la aplicabilidad de la reflectividad óptica interna, medida a un ángulo de incidencia fijo y como función del tiempo, para monitorear un proceso de lisis de eritrocitos (células sanguíneas) y explorar su utilidad como herramienta de diagnóstico de anemias.

Esparcimiento de luz por una célula biológica

En este capítulo se presenta la aproximación de difracción anómala (ADA), que ha sido el punto de partida de los modelos desarrollados en este trabajo de tesis para el estudio de la reflectividad óptica de suspensiones de células y/o tejidos biológicos. También se muestra la aplicación detallada del método de expansión en ondas planas (o método de la transformada de Fourier) para calcular la distribución de amplitud de esparcimiento por una partícula esférica usando la ADA. Dicho método se utiliza en los capítulos 4 y 5. Hemos elegido el caso más sencillo para la geometría del esparcidor, con el objetivo de validar el uso de la ADA mediante la comparación de resultados con la teoría de esparcimiento de Mie, la cual ofrece la solución exacta de este problema. Con la aproximación de difracción anómala se pueden introducir otras geometrías de partícula, de manera sencilla y sin aumentar la complejidad del problema.

2.1. Aproximación de Difracción Anómala

En lo siguiente se obtendrá una expresión general para calcular el patrón de esparcimiento de una partícula esférica, de índice de refracción n_p constante, inmersa en un medio matriz que consideraremos infinito y con índice de refracción n_m , también constante (ver Figura 2.1). Para ello utilizaremos la aproximación de difracción anómala, que describiremos más adelante.

Supongamos que una onda electromagnética de la forma:

$$\mathbf{E}_i = E_0 e^{i\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} - i\omega t} \hat{\mathbf{e}}_m, \quad (2.1)$$

viajando en el medio matriz, incide sobre la partícula. La fase de la onda es $\phi = i\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} - i\omega t$, donde \mathbf{k}_m es el vector de onda incidente y \mathbf{r} es el vector de posición. Aquí hemos considerado que la luz incidente viaja en la dirección positiva del eje z ; es decir, que $\mathbf{k}_m = k_m \hat{\mathbf{a}}_z$, donde $k_m = n_m k_0$ es la magnitud del vector de onda en el medio matriz y k_0 es el número de onda en el vacío a la frecuencia ω , mientras que $\hat{\mathbf{e}}_m$ es el vector de polarización.

Supongamos que los índices de refracción n_m y n_p no difieren demasiado, es decir, que exis-

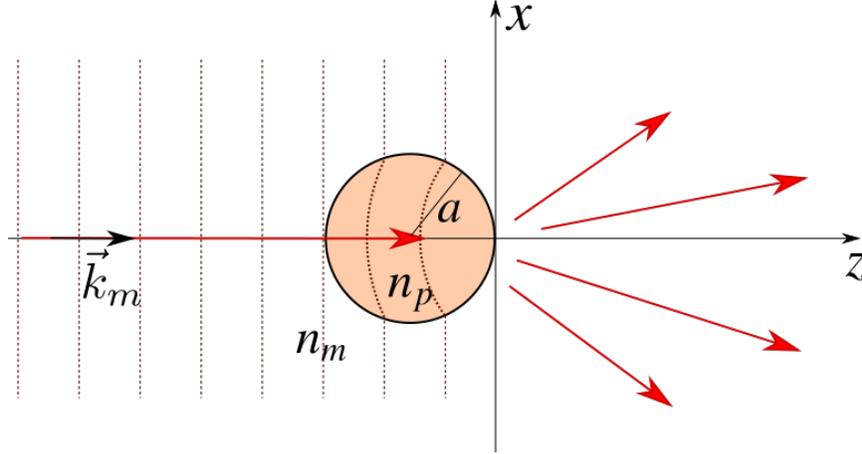


Figura 2.1: Esparcimiento por una partícula esférica con índice de refracción n_p , cercano al índice de refracción n_m del medio matriz. Estrictamente, los frentes de onda se curvan dentro de la partícula ($n_p > n_m$ en el caso representado), pero la ADA permite ignorar esta curvatura si $\left| \frac{n_p}{n_m} \right| \approx 1$.

te un bajo contraste de índice de refracción entre la partícula y el medio que la rodea ($\left| \frac{n_p}{n_m} \right| \approx 1$); por otro lado, las dimensiones características de la partícula deben ser mayores que la longitud de onda del haz incidente ($a \gg \lambda$). Bajo estas condiciones podemos aplicar la aproximación de difracción anómala (ADA), que consiste en suponer que la onda no se refleja ni se refracta al pasar por la partícula, solamente experimenta un cambio en su fase $\Delta(x, y, z)$ (retraso o incremento, dependiendo del signo de $(n_p - n_m)$), proporcional al camino geométrico $l(x, y, z)$ recorrido en el interior de la partícula [19, 20].

Teniendo en cuenta la ecuación (2.1) y que $\mathbf{k}_m \cdot \mathbf{r} = k_m z$, podemos calcular el campo total \mathbf{E}_T justo después de atravesar la partícula, en el plano $z=0$, como:

$$\mathbf{E}_T(x, y, z = 0) = E_0 e^{ik_0 \Delta(x, y, z=0)} e^{-i\omega t} \hat{\mathbf{e}}_i, \quad (2.2)$$

con $\Delta(x, y, z = 0) = l(x, y)(n_p - n_m)$, donde $l(x, y)$ es la distancia geométrica recorrida por la luz al atravesar toda la partícula. Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el apéndice D, pero en este caso para una partícula esférica y un vector de onda incidente paralelo al eje z obtenemos que $l(x, y) = 2\text{Re} \left\{ \sqrt{a^2 - (x^2 + y^2)} \right\}$. Notemos que $l(x, y)$ representa la sombra geométrica proyectada por la partícula en el plano xy , $l(x, y) = 0$ fuera de dicha sombra. En ese caso $\mathbf{E}_T(x, y, z = 0) = E_0 e^{-i\omega t} \hat{\mathbf{e}}_i$. A partir de ahora, no escribiremos el factor $e^{-i\omega t}$. Queda implícito que este factor está presente y sólo cuando se requiera se expresará explícitamente.

2.1.1. Campo esparcido en $z = 0$

Se define el campo esparcido o radiado \mathbf{E}_s por la partícula, como la diferencia entre el campo total \mathbf{E}_T y el campo incidente \mathbf{E}_i en $z = 0$:

2. Esparcimiento de luz por una célula biológica

$$\mathbf{E}_s(x, y, z = 0) = \mathbf{E}_T(x, y, z = 0) - \mathbf{E}_i(x, y, z = 0). \quad (2.3)$$

Sustituyendo las ecuaciones (2.1) y (2.2) en la ecuación (2.3), se tiene que:

$$\mathbf{E}_s(x, y, z = 0) = E_0 \left[e^{ik_0 l(x, y)(n_p - n_m)} - 1 \right] \hat{\mathbf{e}}_m, \quad (2.4)$$

donde se ha supuesto que no hay cambio en la polarización. Sin embargo, del campo $\mathbf{E}_s(x, y, z = 0)$ solo nos interesa su proyección en el plano xy , por lo que la ecuación (2.4) se modifica como sigue:

$$\mathbf{E}_{s\perp}(x, y, z = 0) = E_0 \left[e^{ik_0 l(x, y)(n_p - n_m)} - 1 \right] \hat{\mathbf{e}}_{i\perp}. \quad (2.5)$$

La ecuación (2.5) representa el campo esparcido o radiado por la partícula en $z = 0$ bajo la ADA. Para calcular el campo esparcido en cualquier punto del espacio para $z > 0$ realizaremos una expansión de ondas planas utilizando el método de la transformada de Fourier.

2.1.2. Método de la transformada de Fourier

En general, podemos escribir un campo eléctrico como una expansión en ondas planas. Escogemos un plano de referencia (en este caso $z = 0$) y aplicamos la transformada de Fourier en x e y a la componente transversal del campo eléctrico [21]:

$$\mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} \mathbf{E}_{s\perp}(x, y, z = 0) e^{-ik_x x - ik_y y} dx dy, \quad (2.6)$$

donde k_x y k_y son las coordenadas en el espacio de Fourier y $\mathbf{E}_{s\perp}(x, y, z = 0)$ es la componente transversal (a la normal del plano de expansión) del campo eléctrico esparcido. En este caso $\mathbf{E}_{s\perp}(x, y, z = 0)$ está en el plano xy y como el campo incidente tiene vector de onda a lo largo del eje z tenemos que el campo sólo tiene componente transversal y por lo tanto $\mathbf{E}_{s\perp}(x, y, z = 0) = \mathbf{E}_{s\perp}(x, y, z = 0)$.

Para expandir el campo en $z = 0$ y propagarlo en el semiespacio $z > 0$, debemos garantizar que el campo radiado satisface la ecuación de Helmholtz homogénea en tres dimensiones, suponiendo que no hay densidades de carga ($\nabla \cdot \mathbf{E} = 0$) ni corrientes ($\mathbf{J} = \mathbf{0}$). El campo eléctrico debe ser solución del sistema de ecuaciones:

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} - k_m^2 \mathbf{E} = 0, \quad (2.7a)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = 0. \quad (2.7b)$$

2.1. Aproximación de Difracción Anómala

Teniendo en cuenta la identidad $\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = \nabla(\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E}$, en la ecuación (2.7a), y desarrollando la ecuación (2.7b), tenemos que:

$$\nabla^2 \mathbf{E} + k_m^2 \mathbf{E} = \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k_m^2 \right) \mathbf{E} = 0, \quad (2.8a)$$

$$\left(\frac{\partial E_x(x, y, z)}{\partial x} + \frac{\partial E_y(x, y, z)}{\partial y} + \frac{\partial E_z(x, y, z)}{\partial z} \right) = 0. \quad (2.8b)$$

Si aplicamos la transformada de Fourier bidimensional (xy) a las ecuaciones (2.8a) y (2.8b) nos queda lo siguiente:

$$\left[\frac{\partial^2}{\partial z^2} + (k_m^2 - k_x^2 - k_y^2) \right] \mathbf{E}(k_x, k_y, z) = 0, \quad (2.9a)$$

$$k_x E_x(x, y, z) + k_y E_y(x, y, z) - i \frac{\partial E_z(x, y, z)}{\partial z} = 0. \quad (2.9b)$$

Si definimos $k_z = \sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2}$, entonces la ecuación (2.9a) nos queda como:

$$\left[\frac{\partial^2}{\partial z^2} + k_z^2 \right] \mathbf{E}(k_x, k_y, z) = 0, \quad (2.10)$$

cuya solución es de la forma:

$$\mathbf{E}(k_x, k_y, z) = \mathbf{f}(k_x, k_y) e^{ik_z z}, \quad (2.11)$$

que se trata de una onda que se propaga en la dirección positiva de z .

Sustituyendo la ecuación (2.11) en la ecuación (2.9a) obtenemos que:

$$k_x f_x(x, y, z) + k_y f_y + k_z f_z = \mathbf{k} \cdot \mathbf{f} = 0, \quad (2.12)$$

a partir de lo cual tenemos que:

$$f_z = \frac{-k_x f_x - k_y f_y}{k_z} = \frac{-\mathbf{k}_\perp \cdot \mathbf{f}_\perp}{k_z}, \quad (2.13)$$

donde \mathbf{f}_\perp es la transformada de Fourier en bidimensional en el plano xy del campo eléctrico transversal (en el plano $z = 0$). Por lo anterior concluimos que al campo $\mathbf{f}_\perp(k_x, k_y)$ de la ecuación (2.6) es necesario sumarle la componente $f_z \hat{\mathbf{a}}_z$ descrita por la ecuación (2.13), para que sea solución de la ecuación vectorial de Helmholtz propagante en la dirección $z > 0$. Entonces, utilizando la ecuación (2.11), obtenemos lo siguiente:

$$\mathbf{E}_s(k_x, k_y, z) = [\mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) + f_z(k_x, k_y) \hat{\mathbf{a}}_z] e^{ik_z z}. \quad (2.14)$$

2. Esparcimiento de luz por una célula biológica

Tomando transformada inversa de Fourier de la ecuación (2.14) en las componentes k_x y k_y , tenemos que:

$$\mathbf{E}_s(x, y, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \iint_{-\infty}^{\infty} [\mathbf{f}_{\perp}(k_x, k_y) + f_z(k_x, k_y) \hat{\mathbf{a}}_z] e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} dk_x dk_y, \quad (2.15)$$

con $\mathbf{k} = (k_x, k_y, k_z)$ y $\mathbf{r} = (x, y, z)$. $\mathbf{f}_{\perp}(k_x, k_y)$ está dado por la ecuación (2.6).

Nótese que la ecuación (2.15) representa una expansión de ondas planas (tanto homogéneas como evanescentes o inhomogéneas) que se propagan en la dirección $z > 0$. Este resultado se ha obtenido a partir del campo transversal en $z = 0$, esparcido por la partícula.

2.1.3. Método de Rayleigh de fase estacionaria

En general la integral en la ecuación (2.15) es difícil de resolver, excepto cuando tomamos el límite de campo lejano: $r \rightarrow \infty$. El razonamiento que utiliza el método de Rayleigh es considerar, que en el límite cuando $r \rightarrow \infty$, el término $e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}}$ en la expresión (2.15) oscila muy rápido, entonces su contribución a la integral en varios puntos del plano $k_x k_y$ es nula, excepto en un punto que se denomina de fase estacionaria, en el cual $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}$ se mantiene constante con cambios pequeños en k_x y k_y . Los puntos de fase estacionaria se encuentran donde las primeras derivadas de $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}$ con respecto a k_x y k_y se anulan. Para encontrarlos dichos puntos, escribimos:

$$\frac{\partial(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r})}{\partial k_x} = 0, \quad (2.16a)$$

$$\frac{\partial(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r})}{\partial k_y} = 0. \quad (2.16b)$$

Para facilitar la evaluación de las derivadas realizaremos un cambio de coordenadas cartesianas a esféricas, con $\mathbf{r} = (x, y, z) = (r \sin \theta \cos \phi, r \sin \theta \sin \phi, r \cos \theta)$. Expresando el producto $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}$ en este sistema de coordenadas, tenemos que:

$$\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} = k_x x + k_y y + k_z z = r \left(k_x \sin \theta \cos \phi + k_y \sin \theta \sin \phi + \sqrt{k_m^2 - k_x^2 - k_y^2} \cos \theta \right). \quad (2.17)$$

Sustituyendo la ecuación (2.17) en las ecuaciones (2.16a) y (2.16b), efectuando las derivadas y realizando el álgebra, obtenemos los valores de k_x y k_y en el punto de fase estacionaria, para el cual utilizaremos las coordenadas k_1 y k_2 , respectivamente:

$$k_1 = k_m \sin \theta \cos \phi, \quad (2.18a)$$

$$k_2 = k_m \sin \theta \sin \phi. \quad (2.18b)$$

Al evaluar la integral (2.15) en la región que rodea al punto de fase estacionaria, tendremos que el término $[\mathbf{f}_{\perp}(k_x, k_y) + f_z(k_x, k_y) \hat{\mathbf{a}}_z] = \mathbf{f}(k_x, k_y)$ toma el valor constante $\mathbf{f}(k_1, k_2)$ y sale de

2.1. Aproximación de Difracción Anómala

la integral, quedándonos por resolver solamente la integral de $e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}}$. Para resolver esta integral, realizaremos una expansión en serie de Taylor de $\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}$ en una vecindad del punto (k_1, k_2) hasta orden 2:

$$\mathbf{k}\cdot\mathbf{r} \approx \mathbf{k}\cdot\mathbf{r}|_{k_1, k_2} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \mathbf{k}\cdot\mathbf{r}}{\partial k_x^2} |_{k_1, k_2} (k_x - k_1)^2 + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \mathbf{k}\cdot\mathbf{r}}{\partial k_y^2} |_{k_1, k_2} (k_y - k_2)^2 + \frac{\partial^2 \mathbf{k}\cdot\mathbf{r}}{\partial k_x \partial k_y} |_{k_1, k_2} (k_x - k_1)(k_y - k_2). \quad (2.19)$$

En la expresión anterior se ha tenido en cuenta que las derivadas de orden 1 se anulan al evaluar en el punto de fase estacionaria. Desarrollando término a término, usando las expresiones (2.17), (2.18a) y (2.18b) y haciendo un poco de álgebra, obtenemos que:

$$\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}|_{k_1, k_2} = \left(\frac{k_1^2}{k_m} + \frac{k_2^2}{k_m} + k_m \cos^2 \theta \right) r = k_m r \quad (2.20a)$$

$$\frac{\partial^2 \mathbf{k}\cdot\mathbf{r}}{\partial k_x^2} |_{k_1, k_2} = \left(\frac{1}{k_m} + \frac{k_1^2}{k_m^3 \cos^2 \theta} \right) r \quad (2.20b)$$

$$\frac{\partial^2 \mathbf{k}\cdot\mathbf{r}}{\partial k_y^2} |_{k_1, k_2} = \left(\frac{1}{k_m} + \frac{k_2^2}{k_m^3 \cos^2 \theta} \right) r \quad (2.20c)$$

$$\frac{\partial^2 \mathbf{k}\cdot\mathbf{r}}{\partial k_x \partial k_y} |_{k_1, k_2} = \frac{k_1 k_2 r}{k_m^3 \cos^2 \theta} \quad (2.20d)$$

$$. \quad (2.20e)$$

Sustituyendo estos resultados de las ecuaciones (2.20a)-(2.20d) en la ecuación (2.19), veamos que se puede reescribir esta última como sigue:

$$\mathbf{k}\cdot\mathbf{r} \approx k_m r - (Pu^2 + Qv^2 + Ruv), \quad (2.21)$$

con $u = (k_x - k_1)$, $v = (k_y - k_2)$ y $P = \frac{r}{2} \left(\frac{1}{k_m} + \frac{k_1^2}{k_m^3 \cos^2 \theta} \right)$, $Q = \frac{r}{2} \left(\frac{1}{k_m} + \frac{k_2^2}{k_m^3 \cos^2 \theta} \right)$, $R = \frac{k_1 k_2 r}{k_m^3 \cos^2 \theta}$.

La solución a la integral en (2.15) va quedando de la forma:

$$\mathbf{E}_s(\mathbf{r}) \approx \frac{e^{ik_m r}}{(2\pi)^2} \mathbf{f}(k_1, k_2) \iint_{-\infty}^{\infty} e^{-i(Pu^2 + Qv^2 + Ruv)} dudv. \quad (2.22)$$

Nos queda por resolver la integral $\iint_{-\infty}^{\infty} e^{-i(Pu^2 + Qv^2 + Ruv)} dudv$, para lo cual reescribiremos el exponente del integrando como:

$$Pu^2 + Qv^2 + Ruv = \left(\sqrt{P}u + \frac{Rv}{2\sqrt{P}} \right)^2 - \frac{R^2 v^2}{4P} + Qv^2, \quad (2.23)$$

2. Esparcimiento de luz por una célula biológica

donde se realizó un completamiento cuadrático. Definiendo $w = \sqrt{P}u + \frac{Rv}{2\sqrt{P}}$, nos queda la integral como sigue:

$$I = \iint_{-\infty}^{\infty} e^{-i(Pu^2+Qv^2+Ruv)} dudv = \iint_{-\infty}^{\infty} e^{-iw^2} e^{-i\left(-\frac{R^2}{4P}+Q\right)v^2} \frac{dw}{\sqrt{P}} dv. \quad (2.24)$$

Las integrales en w y v son de la forma $\int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\gamma(t-t_0)^2} = \sqrt{\frac{\pi}{\gamma}} e^{-i\frac{\pi}{4}}$; así que:

$$I = \left(\frac{1}{\sqrt{P}} \sqrt{\pi} e^{-i\frac{\pi}{4}} \right) \sqrt{\frac{\pi}{\left(\frac{4PQ-R^2}{4P}\right)}} e^{-i\frac{\pi}{4}} = -\frac{2\pi i k_m \cos \theta}{r}, \quad (2.25)$$

donde hemos utilizado la definición de las constantes auxiliares P , Q y R , dadas en la ecuación (2.21). Sustituyendo el resultado de la ecuación (2.25) en la ecuación (2.22) obtenemos:

$$\mathbf{E}_s(\mathbf{r}) \approx \frac{-ik_m \cos \theta}{2\pi r} e^{ik_m r} \mathbf{f}(k_m \sin \theta \cos \phi, k_m \sin \theta \cos \phi). \quad (2.26)$$

La expresión (2.26) corresponde al campo eléctrico esparcido o radiado por la partícula, en un punto de observación, con radio vector $\mathbf{r} = (r \sin \theta \cos \phi, r \sin \theta \sin \phi, r \cos \theta)$, muy lejos de la partícula ($r \rightarrow \infty$). Por último, nótese que $\mathbf{f}(k_m \sin \theta \cos \phi, k_m \sin \theta \cos \phi) = \mathbf{f}(k_1, k_2)$, es la transformada de Fourier del campo en $z = 0$, expandida a $z > 0$, y evaluada en el punto de fase estacionaria.

De las ecuaciones (2.11) y (2.14), tenemos que:

$$\mathbf{f}(k_1, k_2) = \mathbf{f}_{\perp}(k_1, k_2) + \frac{-\mathbf{f}_{\perp}(k_1, k_2) \cdot \mathbf{k}}{\sqrt{k_m^2 - k_1^2 - k_2^2}} \hat{\mathbf{a}}_z. \quad (2.27)$$

Finalmente, la expresión (2.26), para el campo esparcido (en la aproximación de campo lejano) nos queda como:

$$\mathbf{E}_s(\mathbf{r}) \approx \frac{-ik_m \cos \theta}{2\pi r} e^{ik_m r} \left\{ \mathbf{f}_{\perp}(k_1, k_2) + \frac{-\mathbf{f}_{\perp}(k_1, k_2) \cdot \mathbf{k}}{\sqrt{k_m^2 - k_1^2 - k_2^2}} \hat{\mathbf{a}}_z \right\}, \quad (2.28)$$

y su magnitud al cuadrado $I_s(\mathbf{r})$ es proporcional a la irradiancia esparcida:

$$I_s(\mathbf{r}) \approx \left(\frac{-ik_m \cos \theta}{2\pi r} \right)^2 \left| \mathbf{f}_{\perp}(k_1, k_2) + \frac{-\mathbf{f}_{\perp}(k_1, k_2) \cdot \mathbf{k}}{\sqrt{k_m^2 - k_1^2 - k_2^2}} \hat{\mathbf{a}}_z \right|^2, \quad (2.29)$$

con $\mathbf{f}_{\perp}(k_1, k_2) = E_0 \hat{\mathbf{e}}_{i\perp} \iint_{-\infty}^{\infty} \left[e^{ik_0 l(x,y)(n_p - n_m)} - 1 \right] e^{-ik_1 x - ik_2 y} dx dy$, según las ecuaciones (2.5) y (2.6); los límites de integración de la integral doble se pueden simplificar, teniendo en cuenta que $l(x, y) = 0$ fuera de la sombra geométrica de la partícula.

2.2. Comparación con la teoría de Mie

La teoría de Mie nos da la solución exacta al problema del esparcimiento por una esfera [7]. Dicha teoría ha sido extendida para tratar otros casos con simetría esférica o cilíndrica; sin embargo, para geometrías más complejas, como la de un eritrocito humano (que tiene forma toroidal), la teoría de Mie no tiene solución analítica exacta. Para el caso de células (con dimensiones del orden de μm) y luz visible se satisfacen las condiciones de aplicación de la ADA, siendo muy simple el cambio de geometría mediante el cálculo de la función $l(x, y)$ [9, 22–24]. En la Figura 2.2 se grafica la potencia de luz esparcida por unidad de ángulo sólido (en W/sr), como función del ángulo de esparcimiento θ , para una partícula esférica de radio $a = 4\mu\text{m}$, con $n_p = 1.402$, $n_m = 1.33$ ($|n_p/n_m| \approx 1.05$). Se consideró una onda plana incidente, con vector de onda paralelo a la dirección z (como en la Figura 2.1), $\lambda = 670\text{nm}$, y una amplitud del campo eléctrico incidente $|E_i| = 1V/m$. Se comparan los resultados del cálculo de la potencia esparcida por unidad de ángulo sólido utilizando la ADA y la teoría de Mie. En el primer caso se multiplica la ecuación (2.29) por r^2 ($I_s \cdot r^2$); en el segundo caso, se calcula este producto como el valor absoluto del promedio entre los coeficientes de la matriz de amplitud de esparcimiento $S_1(\theta)$ y $S_2(\theta)$, dividido por k_m^2 (lo cual equivale a $I_s \cdot r^2$), según se describe en el capítulo 4 (ecuación 4.75) de la referencia [7].

De la comparación mostrada en la Figura 2.2 se puede notar que la ADA constituye una

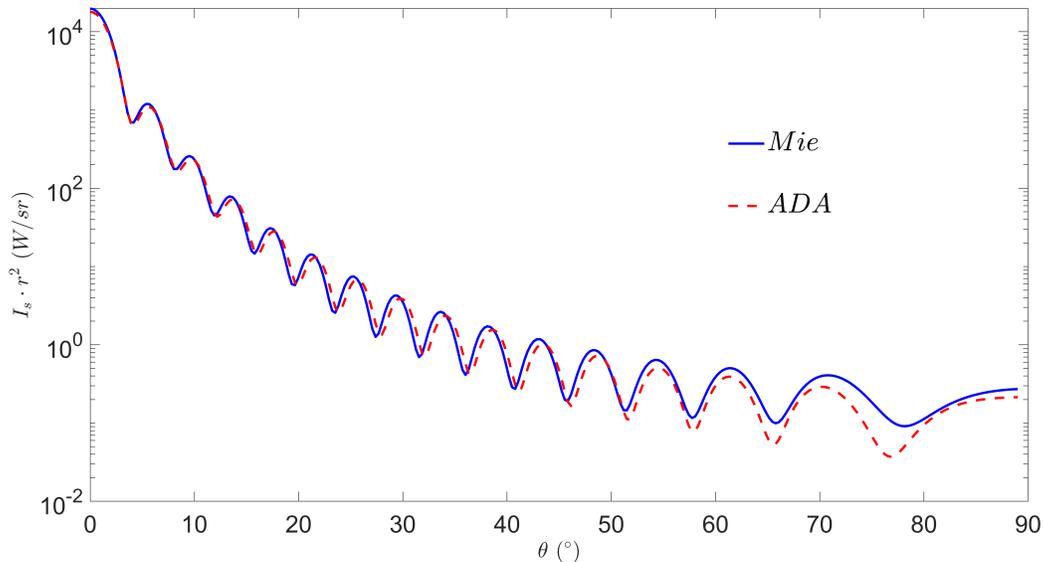


Figura 2.2: Potencia esparcida por unidad de ángulo sólido (W/sr) para una partícula esférica, como función del ángulo de esparcimiento θ . Se comparan las curvas obtenidas, utilizando la ADA y con la teoría de Mie. En este caso se cumplen las condiciones de aplicación de la ADA: bajo contraste de índices de refracción entre la partícula ($n_p = 1.402$) y el medio matriz ($n_m = 1.33$), $|n_p/n_m| \approx 1.05$; y el radio de la partícula ($a = 4\mu\text{m}$) es mucho mayor que la longitud de onda incidente ($\lambda = 670\text{nm}$), $a \approx 6\lambda$. Hemos considerado una onda plana incidente, con amplitud de campo eléctrico $|E_i| = 1V/m$.

2. Esparcimiento de luz por una célula biológica

muy buena aproximación, sobre todo para ángulos de esparcimiento cercanos a la dirección de incidencia. Este resultado nos permite utilizar la ADA con cierta libertad para otras geometrías de partícula, siempre que se cumplan las condiciones para su aplicación. Como veremos más adelante, la ADA continúa siendo válida cuando los índices de refracción de la partícula y/o del medio que la rodea son cantidades complejas; tal es el caso de los glóbulos rojos de la sangre (eritrocitos), que están llenos de una solución de hemoglobina (cromóforo) que presenta absorción de la luz.

Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

De acuerdo con la aproximación de van de Hulst, en una suspensión de partículas grandes comparadas a la longitud de onda, la parte real del índice de refracción (IR) efectivo es prácticamente igual al IR del medio que rodea a las partículas. Esto implica que el IR efectivo (parte real) es insensible a la mera presencia de células biológicas en suspensión. Sin embargo, si estas intercambian material con el medio que las rodea el IR del medio extracelular podría variar y afectar la parte real del IR efectivo. Esto nos lleva a especular que midiendo el IR efectivo de una suspensión de células biológicas podríamos monitorear el intercambio de sustancias entre el medio que rodea a las células y el interior de éstas. En este capítulo reportamos la demostración de la viabilidad de esta idea en un ejemplo específico: el proceso de lisis de eritrocitos, que se denomina hemólisis. Además, mostramos una posible aplicación de valor en el diagnóstico médico de enfermedades asociadas a la fragilidad de la membrana celular de los eritrocitos.

3.1. La prueba de fragilidad osmótica en sangre

De los biofluidos presentes en el cuerpo humano, la sangre es el que mayor información fisiológica aporta acerca de la salud general del organismo. El análisis de los parámetros sanguíneos es de los estudios médicos más recurrentes en las primeras etapas del diagnóstico de enfermedades [25]. La sangre es un fluido, considerado también como un tejido conectivo, y está compuesta principalmente por células suspendidas en un líquido conocido como plasma. Las células en suspensión en la sangre son: eritrocitos o glóbulos rojos, leucocitos o glóbu-

3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

los blancos, y las plaquetas. El plasma está compuesto principalmente por agua y es un medio isotónico para estas células, ya que su concentración de sales es similar a la del medio intracelular. Las células ocupan aproximadamente el 45 % del volumen total de la sangre; de esta cantidad alrededor del 96 % corresponde a los eritrocitos y el resto a los glóbulos blancos y plaquetas, que están relacionados al sistema inmunológico y la coagulación respectivamente. La simplicidad celular de los eritrocitos los convierte en un objeto de fácil estudio, ya que carecen de núcleo y de organelos en su interior. El citoplasma o medio intracelular de los eritrocitos es básicamente una solución acuosa rica en hemoglobina, que es la proteína encargada de transportar el oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos y de llevar el dióxido de carbono de regreso a los pulmones [26]. La molécula de hemoglobina es un cromóforo o pigmento, responsable del color rojo brillante de la sangre (oxigenada); esta molécula representa cerca del 90 % de las moléculas no acuosas dentro de los eritrocitos [27]. La forma característica de un eritrocito o glóbulo rojo es de disco bicóncavo (más delgado en el centro que en la periferia) y está delimitada por su membrana celular y el citoesqueleto en su interior. Esta forma propicia que el eritrocito se deforme con facilidad, y sin alterar su función, para pasar por capilares muy estrechos a lo largo del sistema circulatorio. Cualquier alteración en la morfología, densidad o en la resistencia de la membrana celular de los glóbulos rojos puede dar información del estado de salud de una persona [28].

Los eritrocitos tienen un tiempo de vida medio de 120 días en el organismo humano; este es el período que tarda la médula ósea en producir nuevos eritrocitos [26,27]. Sin embargo, puede existir la destrucción prematura de eritrocitos debido a alteraciones químicas y morfológicas de la célula, como ocurre en la anemia hemolítica [29]. En este tipo de anemia la membrana celular de los eritrocitos es más frágil, volviéndose poco resistente a deformaciones, lo cual ocasiona su rompimiento o hemólisis al pasar por capilares. Al haber menor cantidad de eritrocitos disminuye la viscosidad de la sangre lo cual puede desencadenar en problemas circulatorios y fallas cardíacas, al implicar un mayor esfuerzo del corazón para bombear la sangre [26, 29]. Dentro de la anemia hemolítica se agrupan la esferocitosis hereditaria (eritrocitos esféricos) y la drepanocitosis (eritrocitos con forma de hoz). El método utilizado, en laboratorios clínicos, para diagnosticar este tipo de anemias es la prueba de fragilidad osmótica. Esta prueba permite cuantificar la resistencia de la membrana celular comparando con los valores reportados para eritrocitos sanos [30, 31].

La prueba de fragilidad osmótica consiste en diluir sangre en soluciones acuosas de varias concentraciones diferentes de NaCl por debajo de la concentración isotónica ($< 0.9\% \text{ de NaCl}$), o hipotónicas. Cuando las células están en un ambiente hipotónico el agua comienza a entrar en las células a través de la membrana celular, por ósmosis [32], para equilibrar la salinidad dentro y fuera de los eritrocitos. Durante este proceso los eritrocitos van aumentando su volumen (se hinchan o inflan) hasta alcanzar el límite de estiramiento que la membrana celular puede soportar. Al sobrepasar dicho límite la membrana celular pierde su integridad y el contenido intracelular (solución de hemoglobina) se dispersa en el medio matriz. Pasados 30 minutos, se

3.1. La prueba de fragilidad osmótica en sangre

determina el porcentaje de hemólisis en cada muestra midiendo la absorbancia, que aumenta mientras mayor cantidad de hemoglobina haya disuelta en el medio extracelular. Posteriormente, los datos se organizan en una gráfica de porcentaje de hemólisis en función de la concentración de NaCl de la solución hipotónica correspondiente. A partir de dicha gráfica se determina el intervalo de concentraciones de NaCl donde se registra del 10% al 90% de la hemólisis, lo cual es el parámetro de comparación entre diferentes muestras de sangre [30]. Cualquier corrimiento o acortamiento del intervalo, con respecto al reportado para eritrocitos sanos, se correlaciona con anomalías de la membrana celular de los eritrocitos bajo estudio. Este método resulta bastante engorroso y requiere gran cantidad de tiempo por parte del experimentador, además de que proporciona información muy aproximada con pocos datos experimentales.

Una alternativa a la prueba de fragilidad osmótica convencional es estudiar la cinética del proceso de hemólisis, lo cual puede ofrecer mayor cantidad de información y puede ser más expedito desde el punto de vista experimental. Las mediciones eléctricas han sido una opción explorada exitosamente por Pribush *et al*, quienes mostraron en 2002 la posibilidad de monitorear la dependencia temporal de un proceso de hemólisis en suspensiones diluidas de eritrocitos en un medio hipotónico mediante mediciones de capacitancia y conductancia eléctrica [33]. En dicha investigación se observó un aumento exponencial de la conductancia, con un ligero retraso en tiempo respecto a la señal de capacitancia, lo cual los autores pudieron relacionar al inflamamiento de los eritrocitos y posterior ruptura de su membrana. Sin embargo, las señales eléctricas dependen de muchos factores lo cual representa un inconveniente para su modelado e interpretación [34]. Este problema también se ha abordado ópticamente a través de la medición de transmitancia en tiempo real de una suspensión de eritrocitos durante la hemólisis [35]. La desventaja de la medición de transmitancia en este caso es que, mezclado con la absorción de la hemoglobina hay esparcimiento de las células aún sin hemolizar, lo cual dificulta la interpretación de los resultados.

Recientemente, colaboradores de nuestro grupo de investigación, mostraron que es posible obtener la curva tradicional de fragilidad osmótica midiendo el índice de refracción (con un refractómetro de Abbe) de suspensiones de eritrocitos sometidos a diferentes valores de estrés osmótico [36]. En este capítulo se describirá un dispositivo óptico alternativo que se desarrolló con el objetivo de monitorear en tiempo real la evolución del proceso de hemólisis a través del cambio del índice de refracción (IR) de la solución bajo estudio [37]. A medida que se rompen los eritrocitos, y se libera más y más hemoglobina hacia la matriz, el IR aumenta. En este caso, el IR se mide a través del cambio en la reflectividad interna de una interfaz en contacto con la suspensión de eritrocitos. A continuación se describe el método y dispositivo propuestos, así como los resultados obtenidos.

3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

3.2. Arreglo experimental

A partir de lo discutido en el capítulo anterior, en una suspensión de eritrocitos, estrictamente deberíamos hablar de un índice de refracción efectivo de la suspensión (n_{ef}). En el caso de células y luz visible, la expresión de van de Hulst para n_{ef} es aplicable incluso para fracciones de volumen $f > 10\%$; y suponiendo células de radio a (esféricas) tiene la siguiente expresión:

$$n_{ef} = n_d \left\{ 1 + i \frac{3}{2} f \frac{S(0)}{x^3} \right\}, \quad (3.1)$$

donde n_d es el índice de refracción del medio matriz, $x = k_0 n_c a$ es el parámetro de tamaño de la partícula, o célula en este caso (de IR n_c), y f es la fracción de volumen que ocupan las células. La amplitud de esparcimiento en la dirección de incidencia, $S(0)$, es en general un número complejo que depende del tamaño y forma de las partículas, y del contraste de índices de refracción entre los esparcidores y el medio matriz. Para partículas no esféricas, como son los eritrocitos en condiciones normales y en un ambiente isotónico, el segundo término de la ecuación (3.1) debe promediarse sobre todos los tamaños y orientaciones posibles. Sin embargo, para valores de $f \leq 10\%$ y en agitación, es válido considerar que la orientación de las células es aleatoria [37]. En el rango de longitudes de onda de la luz visible, los esparcidores (eritrocitos) son grandes comparados a la longitud de onda y el segundo término de la ecuación (3.1) es prácticamente un número imaginario. Así que, podemos aproximar la parte real del IR efectivo como la del medio matriz, $n_{ef} \cong n_d$. Además, para mediciones de reflectividad en una interfaz plana en contacto con una suspensión de células es mucho menos relevante el esparcimiento, ya que la reflectividad depende de los coeficientes de amplitud de esparcimiento en direcciones alejadas a la de incidencia. Para partículas grandes, estos coeficientes decaen rápidamente con el ángulo de esparcimiento [38, 39]. Entonces, el IR medido por reflexión es básicamente el IR del medio que rodea a las células (medio matriz), y la presencia de los eritrocitos puede ignorarse.

La Figura 3.1(a) muestra un esquema del arreglo experimental utilizado para la medición del índice de refracción en tiempo real de una suspensión de eritrocitos. Se utiliza un diodo láser (con longitud de onda, $\lambda = 670$ nm) como fuente de luz, que incide sobre un prisma triangular de vidrio (con IR, $n_p = 1.5151$ a la longitud de onda incidente) cuya base está en contacto con la muestra bajo estudio. La luz reflejada en la interfaz prisma-muestra es colectada por el fotodetector 1 en la Figura 3.1(a)). Se trata de una configuración de reflexión interna, donde se cumple que $n_p > n_d$. Se ilumina la interfaz a un ángulo de incidencia cercano al ángulo crítico θ_c (a partir del cual hay reflexión total interna); en esta región la intensidad de luz reflejada tiene una fuerte dependencia con el ángulo de incidencia θ_i . La posición del ángulo crítico depende del IR del medio externo (biofluido), $\theta_c = \sin^{-1}(n_d/n_p)$; por lo que si fijamos θ_i justo antes de θ_c la medición de reflectividad tendrá una alta sensibilidad a los cambios de n_d .

Como se muestra en la Figura 3.1, la base del prisma junto con una cavidad semi-cilíndrica

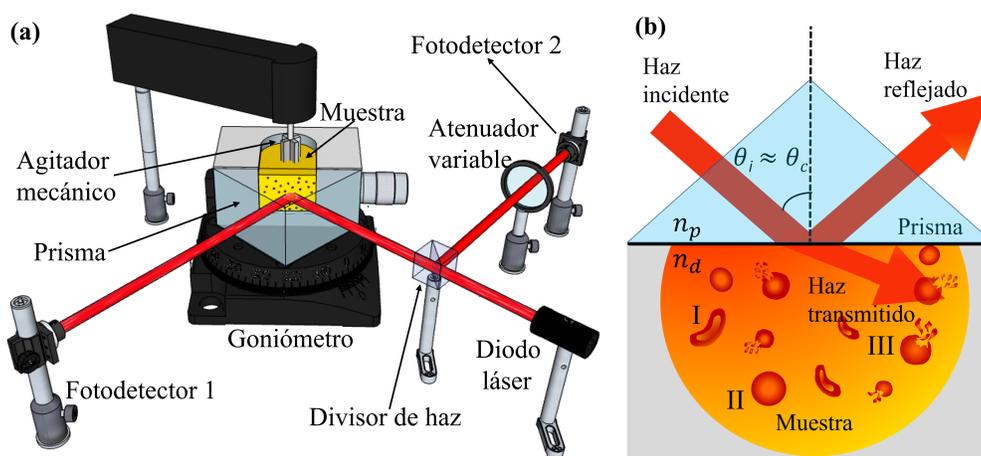


Figura 3.1: (a) Esquema del dispositivo experimental [37]. (b) Diagrama ilustrativo de los rayos incidente, reflejado y transmitido en la interfaz prisma-muestra. También se muestran las etapas del proceso de hemólisis inducida por hipotonicidad: (I) Forma normal del eritrocito; (II) inflamamiento debido a la entrada de agua al interior del eritrocito; (III) ruptura de la membrana celular y liberación del citosol hacia el medio matriz.

de teflón forman el recipiente que contiene a la suspensión de células. Este recipiente (o contenedor) tiene una capacidad de 2 ml, y dentro de él se coloca un agitador mecánico que evita la sedimentación y permite que la hemoglobina liberada por los eritrocitos (durante la hemólisis) se mezcle rápidamente con el medio matriz. La velocidad de rotación del agitador mecánico (100 rpm), así como sus aspas, fueron ajustadas de manera que no se induzca hemólisis mecánicamente. El prisma y la pieza de teflón se colocan sobre un goniómetro, que permite encontrar fácilmente el ángulo de incidencia cercano al ángulo crítico de la interfaz prisma-muestra (ver Figura 3.1(b)). Se utiliza además un haz de referencia que se obtiene con un divisor de haz colocado antes de la entrada al prisma. El haz de referencia es registrado por el fotodetector 2 en la Figura 3.1(a) y sirve para verificar la estabilidad del láser durante el experimento. Las señales de voltaje de ambos fotodetectores se guardan en una computadora para luego ser procesadas.

3.3. Metodología de calibración y medición

El ángulo de incidencia se fija alrededor de 61° y se registra la señal en el fotodetector 1 con el contenedor de la muestra vacío y limpio; es decir, se mide la intensidad reflejada por la interfaz vidrio-aire. A este ángulo la interfaz vidrio-aire da una reflectividad máxima (reflexión total interna), por lo que el voltaje medido se usa como referencia para normalizar las mediciones subsecuentes. La posición y velocidad del agitador mecánico se mantienen constantes para todos los experimentos.

Para fijar el ángulo de incidencia a utilizar durante el monitoreo de un proceso de hemólisis,

3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

se llena el contenedor con agua tridestilada y se ajusta el goniómetro en la posición angular que corresponde a una indicación de 0.8 en reflectividad. El ángulo resultante está a menos de 1° del ángulo crítico. Una vez concluido este paso debemos calibrar el instrumento para traducir las mediciones de reflectividad a IR del medio externo (la muestra). Para esto se prepararon una serie de cinco soluciones de NaCl en agua tridestilada, con diferentes concentraciones e IR conocido, a servir como puntos de calibración. El intervalo de calibración se escogió teniendo en cuenta los índices de refracción involucrados en el proceso de hemólisis; el IR de la hemoglobina en el intervalo visible es de aproximadamente 1.40 [40], mientras que una solución hipotónica tiene un IR cercano al del agua (aproximadamente 1.33).

Las muestras de calibración parten del IR del agua tridestilada ($n = 1.3324$) y se prepararon en orden ascendente en pasos de aproximadamente 0.0020 agregando cada vez una mayor concentración de NaCl (cloruro de sodio). El IR de cada muestra se midió usando un refractómetro de Abbe comercial. En la Figura 3.2(a) se muestra un ejemplo de la señal de voltaje obtenida durante el proceso de calibración, a medida que se llena y se vacía consecutivamente el contenedor del dispositivo. Además, esta gráfica permite tener una idea de la relación señal a ruido de nuestro dispositivo experimental con muestras transparentes y homogéneas, y con el mecanismo de agitación en funcionamiento. El ruido *RMS* extraído de la señal, en un intervalo de tiempo donde el contenedor está lleno, es de alrededor de ± 0.004 V. Tomando el cociente entre este valor y el voltaje promedio de la señal en ese intervalo, y luego elevando al cuadrado el resultado obtenemos una relación señal a ruido mayor que 100000.

Para construir la curva de calibración, se ajustó una curva teórica de reflectancia, R , como función del índice de refracción, n , y para un ángulo de incidencia, θ_i , fijo. Se asumió que la polarización luz reflejada está dada por una combinación lineal de la reflectancia de Fresnel para los estados de polarización TE y TM, como sigue:

$$R(n, \theta_i) = aR_{TE}(n, \theta_i) + bR_{TM}(n, \theta_i) \quad (3.2)$$

donde R_{TE} y R_{TM} son la magnitud al cuadrado de los coeficientes de reflexión de Fresnel correspondientes (r_{TE} y r_{TM}) en una interfaz plana [41, 42]. Los parámetros de ajuste de la ecuación (3.2) a los puntos de calibración son los coeficientes a , b y el ángulo de incidencia θ_i . Se tomó como IR del medio de incidencia el valor nominal del IR del vidrio BK7 [43] a la longitud de onda de trabajo. En la Figura 3.2(b) se muestra la curva ajustada a los puntos de calibración de la Figura 3.2(a). En este caso el ángulo de incidencia ajustado fue de 61.54° , y los coeficientes $a = 45\%$ para polarización TE y $b = 55\%$ para polarización TM. Con esta curva de calibración, es inmediata la conversión de los valores de reflectividad medidos, entre 0.35 y 0.85, al correspondiente IR del medio externo. De esta manera, el dispositivo queda listo para monitorear en tiempo real la evolución del IR durante un proceso de hemólisis en una suspensión diluida de eritrocitos.

Para asegurarnos de que durante la hemólisis la señal medida depende únicamente de la

3.3. Metodología de calibración y medición

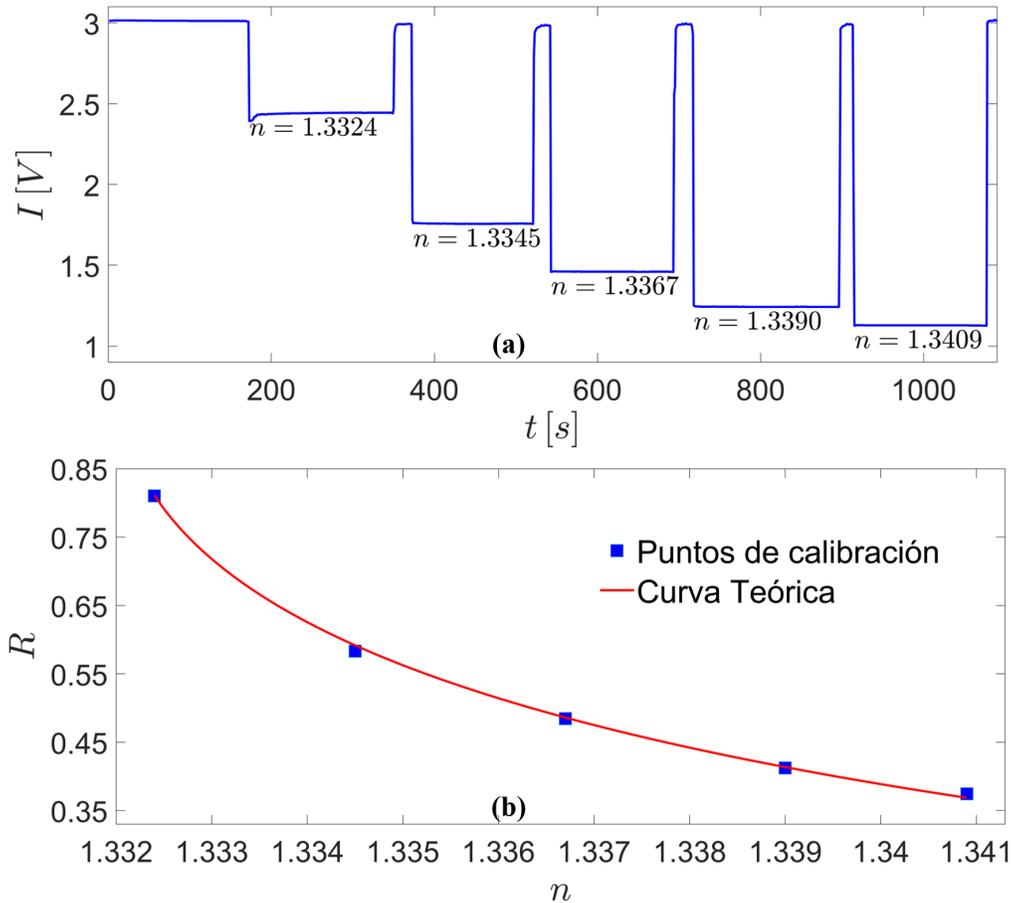


Figura 3.2: (a) Gráfica de la señal de intensidad (en V) como función del tiempo obtenida al llenar y vaciar el contenedor, consecutivamente, con las cinco muestras de calibración. (b) Curva de calibración de reflectividad como función del índice de refracción de la muestra, en un intervalo continuo entre $n = 1.3324$ y $n = 1.3409$; el ángulo de incidencia es $\theta_i = 61.54^\circ$ y la polarización de la luz es 45% TE y 55% TM.

liberación de hemoglobina por los eritrocitos, se centrifuga (a 3000 rpm por 15 minutos) la muestra de sangre para separar los eritrocitos del plasma. Luego de esto se toman (con una micropipeta) 200 μl de eritrocitos centrifugados y se depositan en el contenedor del dispositivo, que previamente se llena con 1.8 ml de solución hipotónica. La muestra de eritrocitos se introduce aproximadamente 2 minutos después de iniciarse la toma de datos, lo cual permite verificar la estabilidad de la señal de base. Para soluciones suficientemente hipotónicas, la liberación de hemoglobina y el consecuente incremento del IR comienza casi inmediatamente después de que se introducen los eritrocitos a analizar. La variación del IR es suave y continua durante todo el proceso de hemólisis, que dura alrededor de 10 minutos. En la Figura 3.3(a) se muestra una curva de R como función del tiempo, t , obtenida típicamente al utilizar la metodología descrita anteriormente.

La estabilización de la señal de reflectividad es un indicativo de que el proceso de hemólisis está terminando. En todos los casos estudiados en este trabajo la señal de reflectividad se

3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

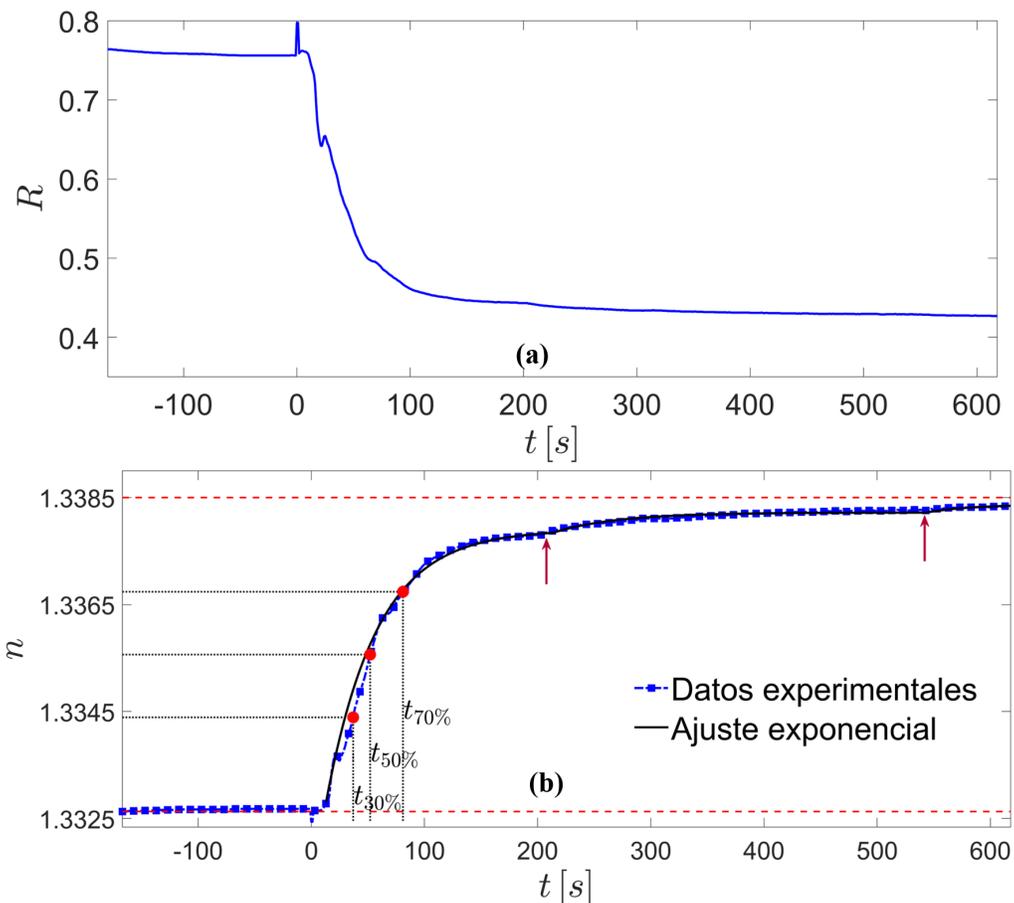


Figura 3.3: (a) Curva típica de reflectancia como función del tiempo obtenida con el dispositivo experimental durante un proceso de hemólisis. El tiempo en el cual se introducen los eritrocitos ($t = 0$) está claramente marcado por un pico en la señal. (b) Gráfica correspondiente de índice de refracción como función del tiempo y su ajuste usando tres funciones exponenciales.

estabilizó a los 12 o 15 minutos de iniciado el proceso. Los datos se almacenan para su posterior procesamiento. Cuando se detiene el experimento se toman unos microlitros de la mezcla hemolizada y se mide su IR en el refractómetro de Abbe, lo cual establece una asíntota para el IR de la solución de hemoglobina al final del proceso de hemólisis. Usando un programa de cómputo (MATLAB) y la curva de calibración, pasamos los datos obtenidos de reflectividad, $R(t)$, a índice de refracción, $n(t)$. Para resumir la información proporcionada por cada curva experimental de $n(t)$ y poder establecer un método de comparación entre muestras de sangre diferentes, propusimos identificar momentos específicos de la curva que pueden ser extraídos fácilmente. Por ejemplo, el momento en que los eritrocitos son introducidos en la solución hipotónica está claramente marcado por un pico en la curva de $R(t)$ (ver Figura 3.3(a)). Nuestra propuesta es identificar los instantes de tiempo cuando el aumento del IR corresponde a un 30%, 50% y 70% de su rango dinámico durante el proceso completo de hemólisis. Aquí nos referimos al rango dinámico como la diferencia entre el valor inicial y final del IR de la muestra,

marcados con líneas rojas discontinuas en la Figura 3.3(b). En este caso se puede observar que n varía desde 1.3325 hasta 1.3385, lo que corresponde a un rango dinámico de 0.0060.

3.3.1. Interpretación de la curva $n(t)$

En la Figura 3.3(b) podemos observar una dependencia temporal de tipo exponencial de la curva $n(t)$. A continuación proponemos un modelo que describe bastante bien el comportamiento de la dependencia del IR del medio matriz de una suspensión de eritrocitos (en agitación suave) durante un proceso de hemólisis inducida por estrés osmótico. Supongamos que en el instante inicial ($t = 0$) un conjunto de N_T glóbulos rojos están suspendidos en un volumen, V_m , de solución hipotónica. Inmediatamente, los glóbulos rojos comienzan a inflarse hasta llegar a un volumen máximo, v_E , debido a la entrada de agua a su interior por ósmosis. Pasados unos segundos, un subconjunto de N_0 eritrocitos del total experimentan una ruptura parcial de su membrana; es decir, se le hacen hoyos a la membrana [33]. El contenido de los eritrocitos (citoplasma rico en hemoglobina) comienza a difundirse hacia la matriz hasta que se alcanza un equilibrio [44]. Asumimos que dicho contenido es reemplazado por solución hipotónica, con lo cual durante el intercambio se modifica el IR del interior de los eritrocitos pero no el volumen, $N_0 v_E$, que estos ocupan. Por esta razón, el volumen, V_m , de la matriz permanece constante. De otra manera las células vacías esparcirían considerablemente, lo cual no ocurre experimentalmente.

Cuando inicia el proceso de difusión del citoplasma, en el instante $t = t_s$, la concentración de citoplasma en el exterior de las células es nula aún, $C_{ext}(t_s) = 0$. Para cualquier instante de tiempo posterior, $t > t_s$, tenemos que:

$$C_{ext}(t) = \frac{V_c(t)}{V_m}, \quad (3.3)$$

donde $V_c(t)$ es el volumen de citoplasma difundido al tiempo t , proveniente de los N_0 eritrocitos lisados en $t = t_s$. Si suponemos que todos los eritrocitos lisados al mismo tiempo son iguales, podemos definir la concentración de citoplasma en el interior de cualquiera de ellos como:

$$C_{int}(t) = \frac{v_c(t)}{v_E}, \quad (3.4)$$

donde $v_c(t = 0)$ es el volumen de un eritrocito antes de la entrada de agua por ósmosis, y al comenzar la hemólisis tenemos que $C_{int}(t_s) = v_c(0)/v_E$.

A partir de la discusión anterior, podemos afirmar que el volumen de citoplasma liberado hacia el medio extracelular, varía según la siguiente expresión:

$$V_c(t) = N_0 [v_c(0) - v_c(t)]. \quad (3.5)$$

3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

Durante el proceso de difusión la concentración C_{ext} se incrementa mientras que C_{int} disminuye, hasta que se alcanza un equilibrio. Derivando la ecuación (3.3), tenemos que:

$$\frac{\partial C_{ext}(t)}{\partial t} = \frac{1}{V_m} \frac{\partial V_c(t)}{\partial t}. \quad (3.6)$$

Sustituyendo las ecuaciones (3.4) y (3.5) en (3.6), obtenemos la siguiente expresión:

$$\frac{\partial C_{ext}}{\partial t} = -\frac{N_0 v_E}{V_m} \frac{\partial C_{int}}{\partial t}. \quad (3.7)$$

Si suponemos que el intercambio de citoplasma y solución hipotónica en cada uno de los eritrocitos está gobernado por la ley de difusión de Fick [33], podemos escribir entonces que:

$$\frac{\partial C_{int}}{\partial t} = \beta \{C_{ext}(t) - C_{int}(t)\}, \quad (3.8)$$

donde β es el coeficiente de difusión que depende del número y el tamaño de los agujeros que se abren en la membrana celular durante la hemólisis. Las ecuaciones (3.7) y (3.8) forman un sistema de dos ecuaciones diferenciales acopladas de 1er orden, cuya solución está dada por:

$$C_{ext}(t) = C_{ext}(\infty) \{1 - \exp(-\alpha t)\}, \quad (3.9)$$

$$C_{int}(t) = [C_{int}(t_s) - C_{ext}(\infty)] \exp(-\alpha t) + C_{ext}(\infty). \quad (3.10)$$

Las expresiones (3.9) y (3.10) satisfacen las ecuaciones (3.7) y (3.8) para los siguientes valores de $C_{ext}(\infty)$ y α :

$$C_{ext}(\infty) = \frac{N_0 v_E}{V_m + N_0 v_E} C_{int}(t_s), \quad (3.11)$$

$$\alpha = \beta \frac{C_{int}(t_s)}{C_{int}(t_s) - C_{ext}(\infty)}, \quad (3.12)$$

donde $C_{ext}(\infty)$ es la concentración volumétrica de equilibrio que denota el final del proceso difusivo; y sustituyendo la ecuación (3.11) en la última expresión obtenemos que $\alpha = \beta \left\{ 1 + \frac{N_0 v_E}{V_m} \right\}$. Este modelo podría generalizarse para incluir variaciones del coeficiente de difusión β para células individuales dentro del conjunto de los N_0 eritrocitos hemolizados.

El modelo encontrado para $C_{ext}(t)$ establece la evolución temporal macroscópica del IR del medio exterior a las células, $n(t)$, que finalmente es lo que medimos con nuestro dispositivo experimental. Debido a la homogenización constante con el agitador mecánico, se puede hablar en cada momento del IR de la mezcla dado por el siguiente promedio volumétrico entre los índices de refracción involucrados, n_d y n_c :

$$n = \left[\frac{(V_m - V_c)}{V_m} \right] n_d + \left[\frac{V_c}{V_m} \right] n_c, \quad (3.13)$$

y usando la ecuación (3.3) obtenemos la expresión:

$$n(t) = n_d + C_{ext}(t)(n_c - n_d), \quad (3.14)$$

que junto con la ecuación (3.9) dicta la cinética del proceso de hemólisis de un subconjunto de células similares. Uno puede asumir que después de algún tiempo otro subconjunto de eritrocitos se hemoliza, y tendremos varios procesos de difusión sucesivos que se superponen. Esto se explica teniendo en cuenta que pueden coexistir diferentes poblaciones de eritrocitos, debido al recambio periódico que realiza el organismo. En la Figura 3.3(b), se incluye un ajuste a la curva experimental de IR; en este caso se requirieron dos funciones exponenciales de la forma dada por la ecuación (3.14). Podemos apreciar que el primer proceso empieza en $t = 0$ y el segundo alrededor de $t = 200$ s. Estos tiempos aparecen señalados en la gráfica de la Figura 3.3(b) con flechas rojas. Podemos decir que la teoría propuesta se ajusta bastante bien a los datos experimentales. En los resultados que se presentan a continuación, se utilizó el mismo modelo para ajustar todas las curvas experimentales de $n(t)$ obtenidas.

3.4. Resultados

Se llevaron a cabo varios experimentos siguiendo la metodología descrita anteriormente, usando eritrocitos separados a partir de muestras de sangre provenientes de individuos sanos y de otros individuos diagnosticados con anemia hemolítica. En ambos casos dichos individuos donaron voluntariamente 3 ml de sangre completa, que se almacenó en tubos de ensayo de vidrio (tubos Vacutainer) con anticoagulante (heparina) en su interior. Tanto la extracción de la sangre a los sujetos, como los análisis de biometría hemática y diagnóstico patológico fueron realizados por personal especializado en el laboratorio del banco de sangre del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Estos procedimientos fueron realizados en un período máximo de 3 horas a partir de que se extrajo la sangre a los sujetos, después de lo cual se almacenó en un refrigerador a -4°C hasta el momento de su recolección para aplicar la metodología propuesta.

3.4.1. Sangre sana

Las Figuras 3.4 y 3.5 muestran las curvas de IR como función del tiempo obtenidas para diferentes muestras de sangre de individuos sanos (a partir del análisis del banco de sangre). Las gráficas de la Figura 3.4 se obtuvieron usando una solución hipotónica con una concentración en peso de NaCl de 0.09% (10% del valor isotónico), mientras que para las gráficas presentadas en la Figura 3.5 se usó 0.18% de NaCl (20% del valor isotónico). En todas las gráficas la línea roja discontinua indica el valor final del IR de la mezcla (muestra totalmente hemolizada) obtenida posteriormente con un refractómetro de Abbe.

Nótese que en las curvas de la Figura 3.4 hay un pequeño lapso de tiempo, entre el momento en que se añaden los eritrocitos y el momento en que comienza a aumentar el IR de la muestra. Atribuimos esto al tiempo que le toma al primer grupo de eritrocitos alcanzar su volumen límite

3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

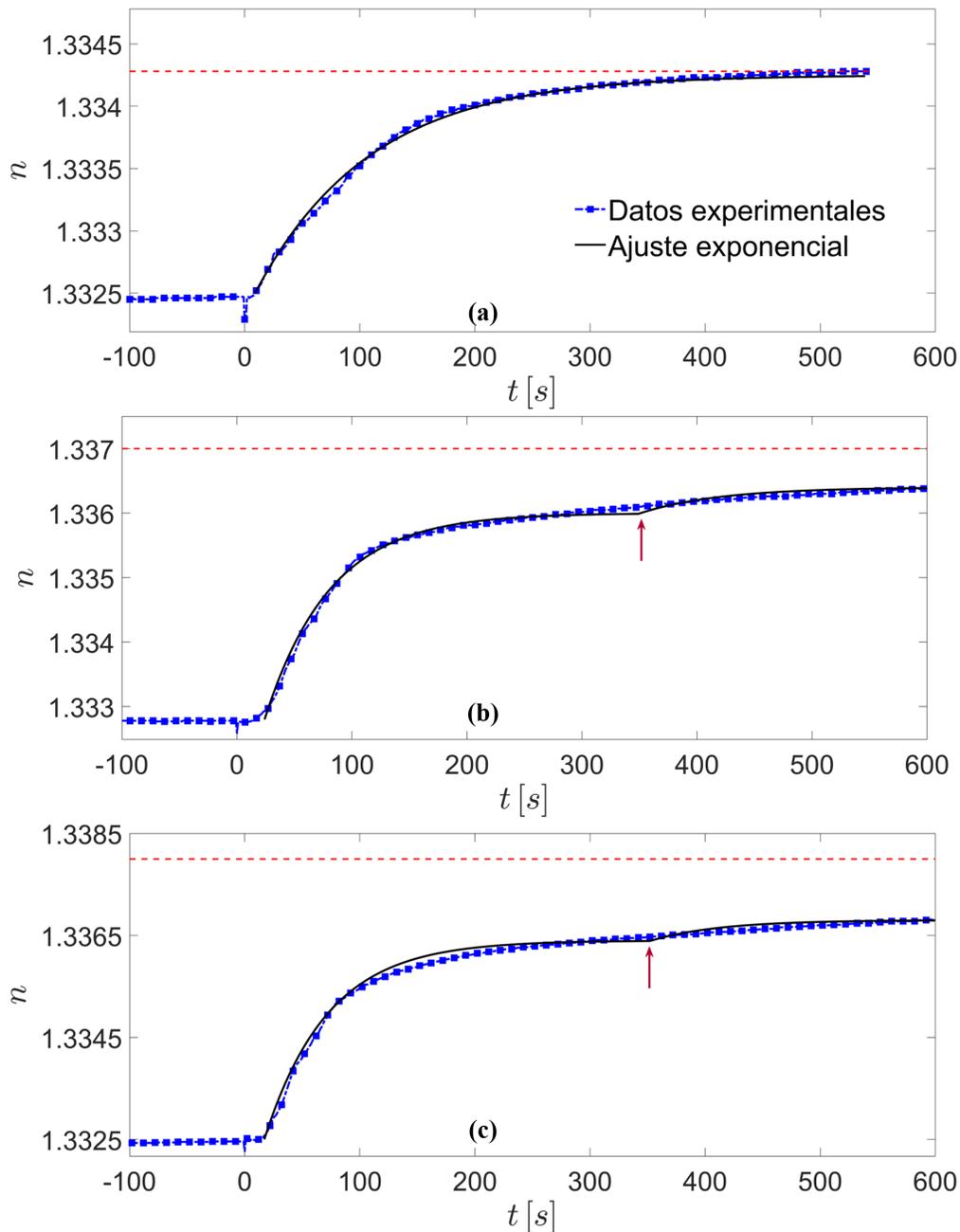


Figura 3.4: Curvas experimentales de índice de refracción como función del tiempo obtenidas a partir de una suspensión de eritrocitos provenientes de sangre sana en una solución hipotónica al 0.09% de concentración de NaCl. Se utilizó sangre de tres individuos distintos para obtener las curvas (a), (b) y (c).

y comenzar la hemólisis. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre este tiempo y el intervalo de tiempo que le toma a la muestra hemolizarse completamente. Estos lapsos de tiempo no son observables en las gráficas de la Figura 3.5.

Por otra parte, en algunos experimentos (ver Figura 3.4 (a) y (b)) la línea discontinua roja está

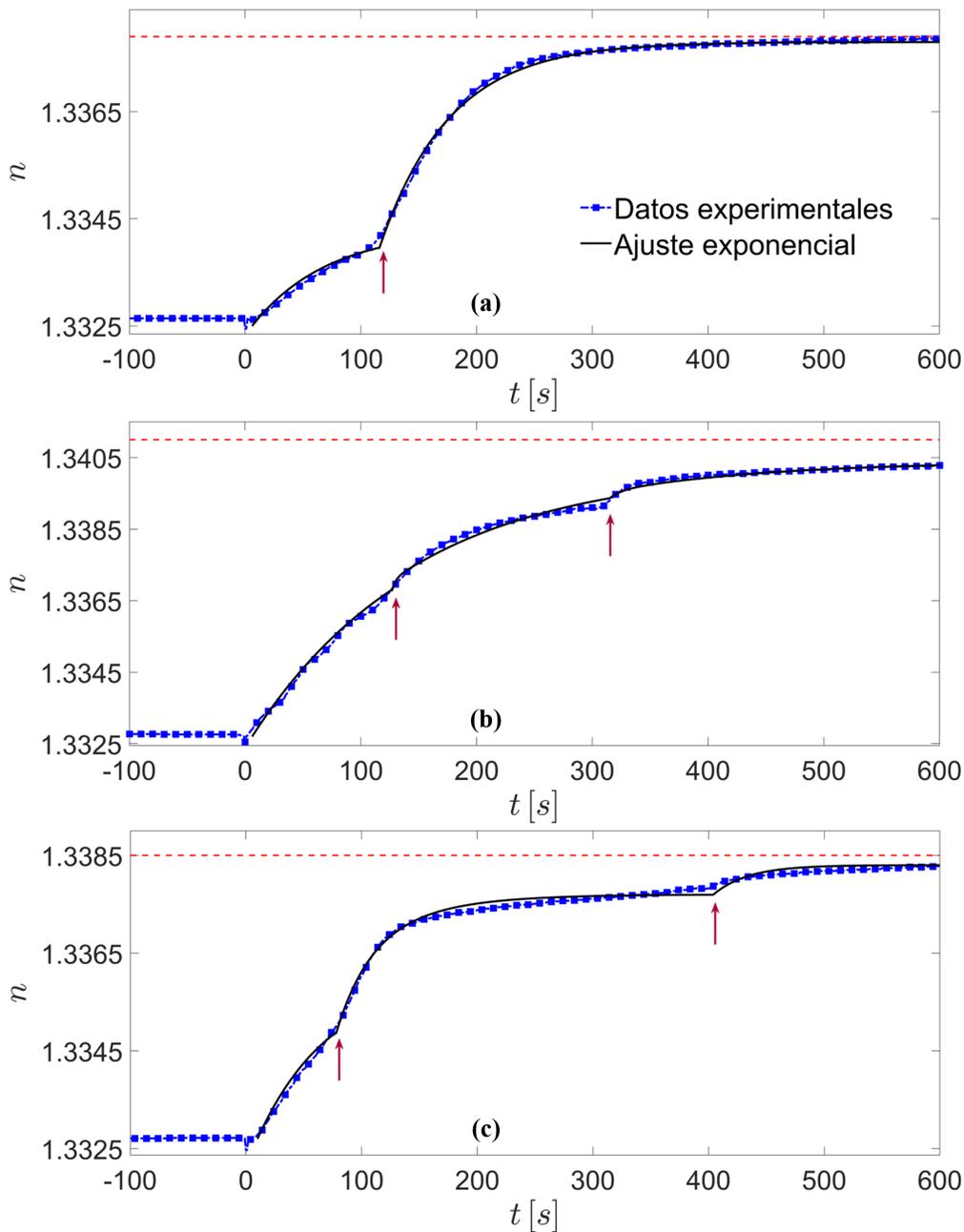


Figura 3.5: Curvas experimentales de índice de refracción como función del tiempo obtenidas a partir de una suspensión de eritrocitos provenientes de sangre sana en una solución hipotónica al 0.18 % de concentración de NaCl. Se utilizó sangre de tres individuos distintos para obtener las curvas (a), (b) y (c).

claramente separada del valor de IR alcanzado al final del intervalo de tiempo en el que se midió. Esto significa que la hemólisis aún no había concluido al momento de detener el experimento y que se completó cuando se extrajo la muestra para medir su IR en el refractómetro de Abbe. En el caso de la concentración de 0.18 % de NaCl utilizada en los experimentos de la Figura

3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

3.5 no se nota prácticamente esta diferencia, lo cual indica que la hemólisis ya había concluido. No tenemos una justificación concreta para explicar estas diferencias observadas entre las dos concentraciones utilizadas.

Las tablas 3.1 y 3.2 muestran los valores de tiempo: $t_{30\%}$, $t_{50\%}$ y $t_{70\%}$ para cada una de las curvas presentadas en las Figuras 3.4 y 3.5. Podemos apreciar que los tiempos de la tabla 3.1 son, en promedio, menores a los de la tabla 3.2. Esto se debe a que los datos de la tabla 3.2 corresponden a un ambiente con mayor concentración de NaCl (menos hipotónico) para los eritrocitos. Una mayor concentración de sales retrasa el proceso de inflamamiento y ruptura de los eritrocitos, al estar más cerca del valor isotónico. Se puede observar también que los valores de tiempo $t_{30\%}$, $t_{50\%}$ y $t_{70\%}$ en la tabla 3.1 están más cercanos entre sí que en la tabla 3.2; lo cual sugiere que la concentración correspondiente al 20% del valor isotónico permite apreciar mejor las diferencias entre distintas muestras de sangre. Se realizaron pruebas usando otras soluciones hipotónicas con concentraciones de NaCl mayores al 20% del valor isotónico, pero la hemólisis fue demasiado lenta y el comportamiento de la curva $n(t)$ fue menos reproducible para estos casos.

Muestra	$t_{30\%}$ [s]	$t_{50\%}$ [s]	$t_{70\%}$ [s]
a	50.0	82.0	263.0
b	55.0	86.0	175.0
c	43.0	84.0	126.0

Cuadro 3.1: Valores de tiempo $t_{30\%}$, $t_{50\%}$ y $t_{70\%}$ para muestras de sangre sana, hemolizadas en una solución hipotónica al 0.09% de NaCl (ver Figura 3.4).

Muestra	$t_{30\%}$ [s]	$t_{50\%}$ [s]	$t_{70\%}$ [s]
a	118.0	144.0	174.0
b	73.0	128.0	206.0
c	61.0	91.0	118.0

Cuadro 3.2: Valores de tiempo $t_{30\%}$, $t_{50\%}$ y $t_{70\%}$ para muestras de sangre sana, hemolizadas en una solución hipotónica al 0.18% de NaCl (ver Figura 3.5).

3.4.2. Sangre con diagnóstico de anemia

En la Figura 3.6(a) y (b) se muestran las curvas de IR como función del tiempo obtenidas para dos muestras de sangre de individuos diagnosticados con anemia hemolítica (por el laboratorio de Hematología del banco de sangre), presentando baja fracción de volumen de eritrocitos ($2.64 \times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$ y $1.64 \times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$, respectivamente) y bajos niveles de hemoglobina en sangre ($9.8 \text{ g}/\mu\text{l}$ y $5 \text{ g}/\mu\text{l}$). En la Figura 3.6(c) presentamos la curva para un caso de sangre de un individuo con anemia drepanocítica (fracción de volumen de eritrocitos $1.97 \times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$ y

nivel de hemoglobina en sangre $7\text{ g}/\mu\text{l}$). Se utilizó una solución hipotónica al 0.18% de NaCl, teniendo en cuenta que dicha concentración dio mejores resultados para la sangre sana.

En la tabla 3.3 se presentan los valores de los tiempos $t_{30\%}$, $t_{50\%}$ y $t_{70\%}$ correspondientes

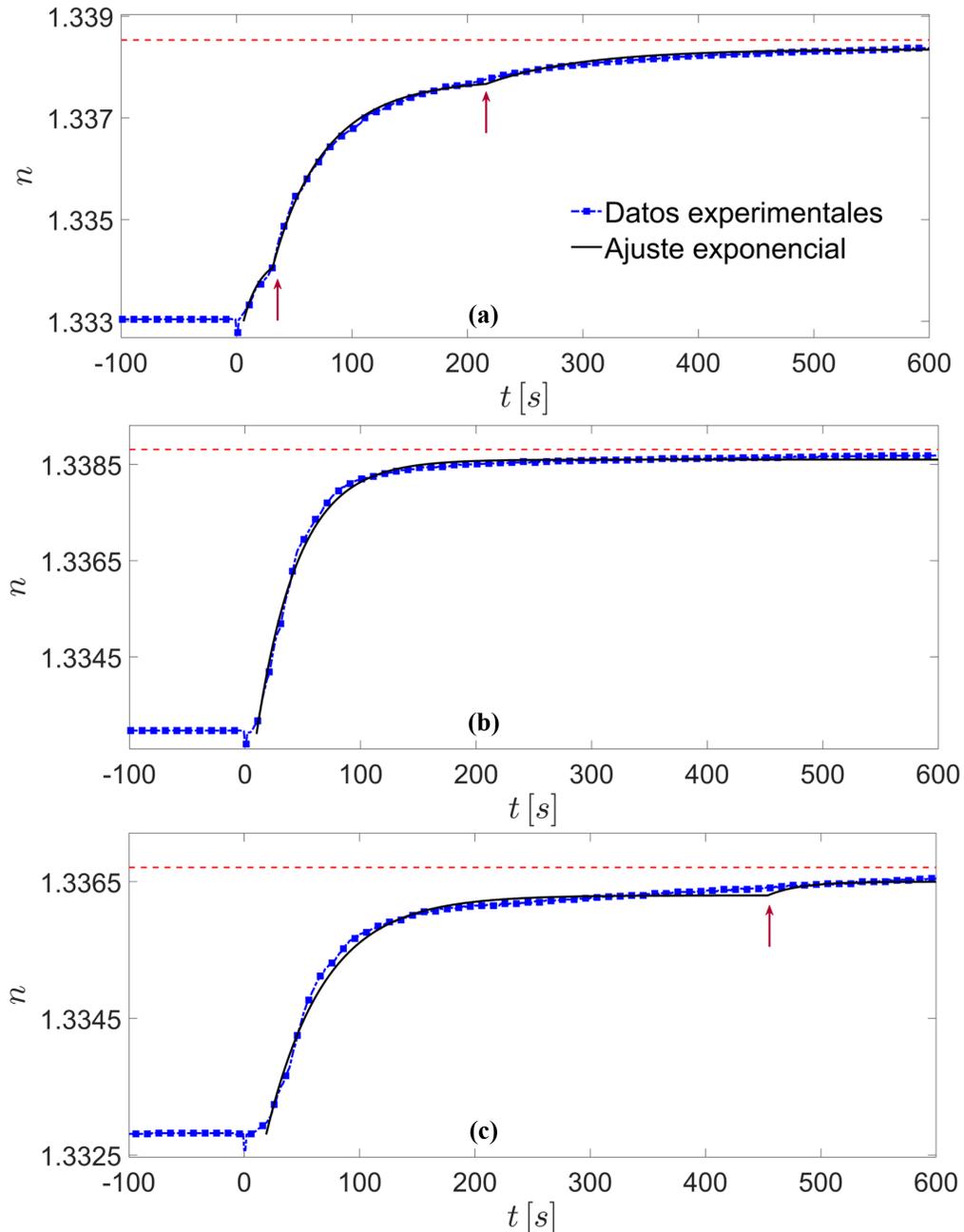


Figura 3.6: Curvas experimentales de índice de refracción como función del tiempo obtenidas a partir de sangre de tres individuos diferentes diagnosticados previamente con anemia y una solución hipotónica al 0.18% de concentración de NaCl.

a la Figura 3.6. Se puede notar que en este caso la hemólisis ocurrió más rápidamente que en los casos mostrados en la Figura 3.5, para eritrocitos sanos en un ambiente con la misma concentración de NaCl. Dicho resultado se puede atribuir al hecho de que los eritrocitos con

3. Monitoreo del índice de refracción efectivo de una suspensión de células y su aplicación al estudio de la fragilidad osmótica de eritrocitos

este padecimiento son menos resistentes al inflamiento provocado por el estrés osmótico.

Muestra	$t_{30\%}$ [s]	$t_{50\%}$ [s]	$t_{70\%}$ [s]
a	38.0	61.0	107.0
b	25.0	38.0	54.0
c	42.0	56.0	87.0

Cuadro 3.3: Valores de tiempo $t_{30\%}$, $t_{50\%}$ y $t_{70\%}$ para muestras de sangre de individuos con anemia, hemolizadas en una solución hipotónica al 0.18 % de NaCl (ver Figura 3.6).

3.4.3. Discusión

Todas las Figuras de la 3.4 a la 3.6 muestran una dependencia exponencial simple o una sucesión de funciones exponenciales. Esto soporta la idea de que la liberación de citoplasma (rico en hemoglobina) a través de los agujeros de la membrana de los eritrocitos lisados es un proceso continuo de principio a fin y que su cinética está gobernada por la superposición de procesos difusivos simples. De hecho, podemos apreciar en las Figuras de la 3.4 a la 3.6 que el ajuste del modelo matemático propuesto en la sección 3.3.1 se aproxima muy bien en todos los casos a las curvas experimentales.

En la mayoría de los casos se ajustó más de un proceso exponencial. Por ejemplo, las gráficas en las Figuras 3.4(b) y (c), 3.5(a) y 3.6(c) muestran un segundo proceso exponencial retrasado con respecto al primero; mientras que en las Figuras 3.5(b) y (c) y 3.6(c) podemos ver un tercer proceso exponencial. El inicio de cada nuevo proceso exponencial está marcado con una flecha de color rojo en las gráficas. Por lo anterior, podemos especular que nuestra metodología es capaz de distinguir entre poblaciones de eritrocitos con diferente fragilidad osmótica dentro de una misma muestra. Podríamos pensar que existe una distribución de tiempo de vida medio para el total de eritrocitos en la muestra. Sin embargo, en individuos sanos lo normal es que todos los eritrocitos tengan las mismas propiedades (incluido el tiempo de vida) [45]. Bajo ciertas circunstancias de salud los tiempos de producción de los eritrocitos de un individuo pueden verse afectados. Sería interesante investigar en el futuro próximo si las desviaciones del proceso exponencial simple, observadas en nuestros resultados, están correlacionadas con algún asunto de importancia médica.

La determinación de los coeficientes α (ver ecuación 3.12) y los tiempos de inicio del segundo o tercer proceso exponencial en cada caso, mediante el ajuste de varias funciones exponenciales consecutivas a los datos experimentales, supone otra manera de cuantificar la cinética del proceso de hemólisis. Sin embargo, pensamos que el método propuesto de encontrar los valores de tiempo $t_{30\%}$, $t_{50\%}$ y $t_{70\%}$ es más simple y por lo tanto más conveniente. Como se demostró en la subsección 3.4.2, dicho método es suficiente para distinguir entre eritrocitos sanos y con diagnosticados con anemia. La concentración seleccionada (0.18 % de concentración de NaCl) para la solución hipotónica de base, ralentiza el proceso de hemólisis con respecto a la

de 0.09 % de NaCl, pero permite obtener una medición más precisa de los tiempos $t_{30\%}$, $t_{50\%}$ y $t_{70\%}$.

Hemos señalado anteriormente que sin la agitación continua de la muestra no podríamos afirmar que el IR medido es un indicador de la cantidad de citoplasma (rico en hemoglobina) liberado en tiempo real por las células. En la sección 3.2, nos aseguramos de que el agitador mecánico utilizado no constituye, por sí solo, un agente causante de hemólisis por estrés mecánico. Sin embargo, una vez que se coloca a los eritrocitos en un ambiente de estrés osmótico la agitación mecánica pasa a ser un estrés adicional para las células, por lo cual puede afectar la cinética del proceso de hemólisis. Es por esto que enfatizamos en que, con la metodología propuesta, se deben mantener constantes las características del agitador (aspas y velocidad de rotación) para poder comparar los resultados obtenidos para diferentes muestras de sangre. Queda pendiente para el futuro, realizar una investigación detallada sobre la repercusión de la velocidad y forma de las aspas en la cinética de la hemólisis monitoreada a través del dispositivo propuesto.

También debemos considerar que el contenido intracelular de los eritrocitos, además de hemoglobina, tiene sales en solución, y cuando se difunde hacia el exterior causa un aumento en la concentración salina del medio extracelular, lo cual en teoría disminuye el estrés osmótico. Debemos investigar más adelante, si este cambio gradual de concentración salina es importante o no para la evolución temporal del IR con la metodología presentada. Por último, es posible introducir algunas mejoras al método de ajuste de funciones exponenciales sucesivas. Por ejemplo, podríamos considerar varios procesos exponenciales simultáneos (que comiencen al mismo tiempo) pero que tengan distintas constantes de tiempo α . Esto también es algo que consideramos investigar en el futuro.

Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

En el capítulo anterior analizamos el índice de refracción efectivo de una suspensión de células utilizando el modelo de van de Hulst ((3.1)). En el caso particular de la sangre, vimos que la medición de reflectividad de luz visible de una interfaz plana en contacto con la suspensión es más sensible a cambios en el índice de refracción del medio que rodea a las células, que a la propia presencia de éstas. Las células en suspensión no constituyen un problema, ya que, al ser tenues y grandes en comparación a la longitud de onda, el retroesparcimiento es casi nulo. Sin embargo, si algunas de estas células se adhieren a la interfaz ¿podríamos seguir aplicando el mismo análisis? La respuesta es no. En general, debemos separar el análisis de la reflectividad de la interfaz y del interior del medio externo para tomar en cuenta la contribución de las células en contacto con la interfaz.

En el presente capítulo, se derivan expresiones analíticas para la reflectancia superficial de una interfaz plana inhomogénea, donde tenemos partículas grandes de diferentes índices de refracción en contacto óptico con el medio de incidencia, lo que resulta en un patrón aleatorio de contraste de IR. Los resultados pueden ser aplicados al caso de células adheridas a la interfaz o microgotas rociadas sobre esta. Se ilustran y discuten algunas aplicaciones prácticas del modelo desarrollado [46].

4.1. Modelos de reflectancia superficial

Supongamos que una onda plana, proveniente de un medio homogéneo con índice de refracción (IR) real n_i , incide sobre una interfaz plana con un medio no homogéneo. Consideremos que el medio no homogéneo es un semiespacio infinito en las direcciones x , y y $z > 0$, compuesto por un medio externo de IR n_e e inclusiones o partículas de IR n_1 , que supondremos de tamaño

4.1. Modelos de reflectancia superficial

grande respecto a la longitud de onda λ incidente. Podemos pensar en dichas inclusiones como células o microgotas para el caso de λ en el intervalo visible. Nos interesa particularmente el caso en que algunas de las partículas realizan contacto óptico con la interfaz, como se ilustra en la Figura 4.1. Así que la interfaz tendrá algunas regiones (o áreas) de contraste de IR entre los medios n_i-n_e y entre los medios n_i-n_1 , formando un patrón aleatorio de áreas de contraste de IR. Si existe una diferencia considerable entre los índices de refracción n_e y n_i , la onda incidente será esparcida por la interfaz. En general, también puede haber luz esparcida por las partículas desde el interior del medio externo; sin embargo, en este análisis ignoraremos dicha contribución.

Supongamos que la onda incidente está polarizada linealmente y dada por $\mathbf{E}^i = E_0 \exp(i\mathbf{k}^i \cdot \mathbf{r} - i\omega t) \hat{\mathbf{e}}_i$,

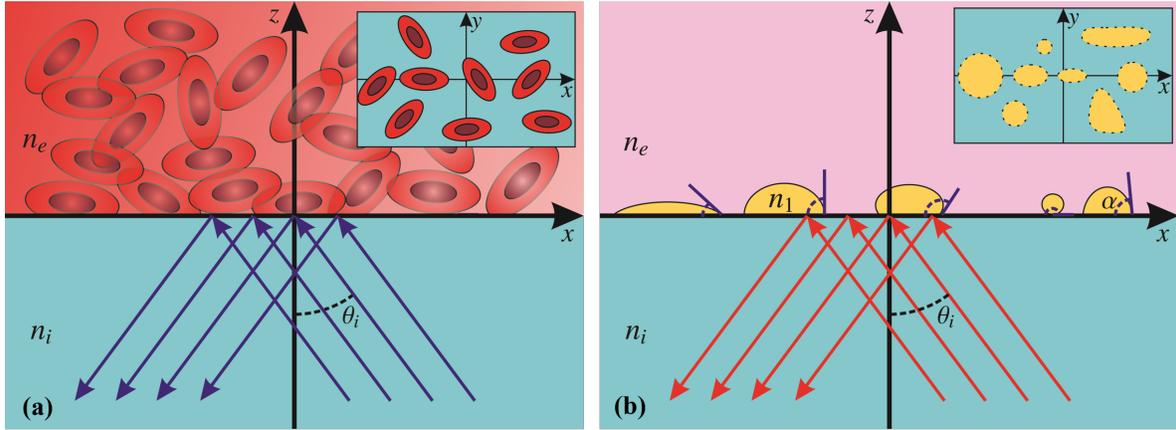


Figura 4.1: (a) Reflexión interna en una interfaz parcialmente cubierta por microgotas de índice de refracción n_1 o (b) en contacto óptico con un medio biológico. En cada caso se muestra una vista superior de la interfaz correspondiente (desde el semiespacio de transmisión) mostrando las áreas de contacto entre las microgotas, o células, y la interfaz

donde \mathbf{k}_i es el vector de onda en el medio de incidencia y ω es la frecuencia de la onda. Asumiremos que las áreas de contacto de IR externo n_1 , distribuidas a lo largo de la interfaz, tienen dimensiones grandes comparadas a λ . Entonces, podemos aproximar el campo eléctrico reflejado en cualquier lugar cercano a la interfaz desde el medio de incidencia, $\mathbf{E}^r(x, y, z = 0^-)$, como el producto entre el campo eléctrico incidente y el coeficiente de reflexión para una onda plana evaluado en los índices de refracción involucrados en esa posición de la interfaz y para la polarización correspondiente. La expresión del campo eléctrico reflejado cerca de la interfaz es la siguiente:

$$\mathbf{E}^r(x, y, z = 0^-) = E_0 r_0(\mathbf{r}_\perp) e^{ik_x x} \hat{\mathbf{e}}_r, \quad (4.1)$$

donde $\mathbf{r}_\perp = x\hat{\mathbf{a}}_x + y\hat{\mathbf{a}}_y$, $\hat{\mathbf{a}}_x$ y $\hat{\mathbf{a}}_y$ son los vectores unitarios en el plano xy , y $\hat{\mathbf{e}}_r$ es el vector de polarización de una onda reflejada especularmente en una interfaz homogénea e infinita. El coeficiente de reflexión de la onda plana, cerca de la interfaz, se define como:

$$r_0(\mathbf{e}_\perp) = \begin{cases} r_{ie} & \text{si el IR del medio externo es } n_e \\ r_{i1} & \text{si el IR del medio externo es } n_1 \end{cases} \quad (4.2)$$

4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

Aquí, r_{ie} y r_{i1} son los coeficientes de reflexión de Fresnel [41, 42] para una interfaz entre los medios de índices de refracción n_i y n_e , y una interfaz entre los medios de índices de refracción n_i y n_1 , respectivamente.

La aproximación en la ecuación (4.1) es análoga a la aproximación que se usa para modelar la difracción de la luz por una abertura grande en una pantalla opaca [47, 48], o a la aproximación de difracción anómala usada comúnmente para modelar el esparcimiento por células [49–51], o también puede considerarse equivalente a la aproximación del plano local tangente usada en superficies rugosas [52–54].

4.1.1. Reflectancia coherente superficial

La reflectancia coherente de la interfaz corresponde al cuadrado de la magnitud del coeficiente de reflexión superficial de la onda promedio. La onda promedio se obtiene a partir de promediar los campos magnéticos reflejados sobre todas las configuraciones permitidas para las posiciones y formas de las regiones de contacto de la interfaz con las partículas (de IR n_1). Resulta conveniente expresar la onda reflejada como una expansión de ondas planas. El procedimiento a seguir para esto es estándar en los casos donde la componente tangencial del campo electromagnético está sobre un plano de referencia usando el método de la transformada de Fourier [21]. Primero se indica la transformada bidimensional de Fourier de la componente tangencial del campo eléctrico ($\mathbf{E}^r(x, y, z = 0^-)$) en el plano de referencia (en este caso el plano es $z = 0$). Luego se indica la transformada inversa bidimensional de Fourier y se completa el kernel, de modo que satisfaga las ecuaciones de Maxwell, obteniéndose lo siguiente:

$$\mathbf{E}^r(x, y, z < 0) = \frac{1}{(2\pi)^2} \iint_{-\infty}^{\infty} \mathbf{f}(k_x, k_y) e^{i(k_x x + k_y y - k_z z)} dk_x dk_y, \quad (4.3)$$

donde $k_z = \sqrt{k_i^2 - k_x^2 - k_y^2}$, k_i es la magnitud del vector de onda en el medio de incidencia. $\mathbf{f}(k_x, k_y) = \mathbf{f}_{\perp}(k_x, k_y) + f_z(k_x, k_y) \hat{\mathbf{a}}_z$, con $\mathbf{f}_{\perp}(k_x, k_y)$ y $f_z(k_x, k_y) = -\mathbf{k}_{\perp} \cdot \mathbf{f}_{\perp}(k_x, k_y) / k_z$, son la componentes tangencial y perpendicular (al plano $z = 0$), respectivamente, del kernel de la expansión en ondas planas del campo eléctrico. $\hat{\mathbf{a}}_z$ es el vector unitario en la dirección z , y $\mathbf{f}_{\perp}(k_x, k_y)$ es la transformada bidimensional de Fourier de la componente tangencial del campo eléctrico en $z = 0^-$, tal que:

$$\mathbf{f}_{\perp}(k_x, k_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} \mathbf{E}_{\perp}^r(x, y, z = 0^-) e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy, \quad (4.4)$$

donde

$$\mathbf{E}_{\perp}^r(x, y, z = 0^-) = E_0 r_0(x, y) e^{ik_x^i x} (\hat{\mathbf{e}}_r)_{\perp}, \quad (4.5)$$

y $(\hat{\mathbf{e}}_r)_{\perp}$ es la componente tangencial de $\hat{\mathbf{e}}_r$ (es decir, sus componentes x e y).

4.1. Modelos de reflectancia superficial

Como se mencionó anteriormente, la onda reflejada coherentemente en la interfaz se obtiene de promediar la ecuación (4.3) sobre todas las posibles configuraciones del patrón de contraste de IR. El resultado queda en términos del promedio de las ecuaciones (4.4) y (4.5). En el miembro derecho de la ecuación 4.5 el operador promedio, $\langle \cdot \rangle$, solamente aplica sobre $r_0(\mathbf{r}_\perp)$. No es complicado obtener este promedio si asumimos que el promedio configuracional en cualquier punto de la interfaz, \mathbf{r}_\perp , es igual al promedio sobre una interfaz de dimensiones infinitas. Supongamos una interfaz cuadrada de lados $L \rightarrow \infty$. Entonces podemos escribir lo siguiente:

$$\langle r_0(\mathbf{r}_\perp) \rangle = \lim_{L \rightarrow \infty} \frac{1}{L^2} \int_{-L/2}^{L/2} \int_{-L/2}^{L/2} r_0(\mathbf{r}_\perp) d^2 \mathbf{r}_\perp. \quad (4.6)$$

Sustituyendo la ecuación (4.2) en la ecuación (4.6), es fácil ver que se obtiene:

$$\langle r_0(\mathbf{r}_\perp) \rangle = r_{ie} \Theta_e + r_{i1} \Theta_1, \quad (4.7)$$

donde Θ_e y Θ_1 son las fracciones del área de la interfaz donde el medio externo tiene IR n_e y n_1 , respectivamente. En lo siguiente, nos referiremos a Θ_e y Θ_1 como la fracción de contacto del medio e o del medio 1.

Usando la ecuación (4.7) en la ecuación (4.5), sustituyendo el resultado en la ecuación (4.4), haciendo las integrales y usando el resultado en la ecuación (4.4) nos queda la onda reflejada promedio como:

$$\langle \mathbf{E}^r \rangle = E_0 [r_{ie} \Theta_e + r_{i1} \Theta_1] e^{i\mathbf{k}^r \cdot \mathbf{r}} \hat{\mathbf{e}}_r. \quad (4.8)$$

El coeficiente de reflexión coherente superficial r_{Scoh} está dado por el cociente entre la amplitud de $\langle \mathbf{E}^r \rangle$ y la amplitud de la onda incidente. En un sistema de solo dos medios en contacto con la interfaz con el medio de incidencia, debemos tener que $\Theta_e + \Theta_1 = 1$, así que podemos escribir que $\Theta_e = 1 - \Theta_1$. Luego, el coeficiente de reflexión coherente superficial puede escribirse como sigue:

$$r_{Scoh} = r_{ie} + (r_{i1} - r_{ie}) \Theta_1, \quad (4.9)$$

veamos que el resultado no depende de la forma de las regiones de contacto.

Podemos generalizar la expresión anterior para casos donde haya más de un tipo de partículas en contacto con la interfaz. Si tenemos N medios distintos, adicionales al que identificamos como medio externo de IR n_e , con índices de refracción n_1, n_2, \dots, n_N , la ecuación (4.9) se modifica de la siguiente manera:

$$r_{Scoh} = r_{ie} + \sum_{j=1}^N (r_{ij} - r_{ie}) \Theta_j. \quad (4.10)$$

4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

La reflectancia coherente superficial R_{Scoh} está dada por el cuadrado de la magnitud de esta última expresión; o sea:

$$R_{Scoh} = \left| r_{ie} + \sum_{j=1}^N (r_{ij} - r_{ie}) \Theta_j \right|^2. \quad (4.11)$$

En la Figura 4.2 se muestran el cálculo correspondiente al modelo derivado para la reflectancia coherente superficial, R_{Scoh} , en configuración interna y como función del ángulo de incidencia con que se ilumina la interfaz para dos estados de polarización (TE y TM). En este caso se ha considerado que hay solamente un medio adicional (con IR $n_1 = 1.40$) al medio externo (con IR $n_e = 1.00$) haciendo contacto óptico con la interfaz, como en la ecuación (4.9). Las curvas corresponden a tres valores distintos de la fracción de contacto Θ_1 , para un medio de incidencia con IR $n_i = 1.50$.

Podemos apreciar de la Figura 4.2 que las curvas presentan dos ángulos críticos (cuya posición

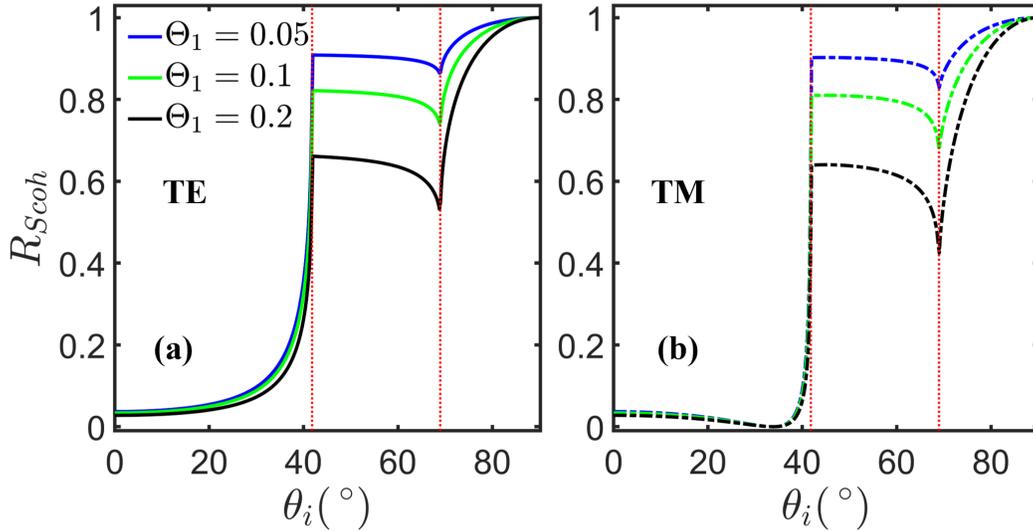


Figura 4.2: Curvas teóricas para la reflectancia coherente superficial como función del ángulo de incidencia para polarización (a) TE y (b) TM de una interfaz plana vidrio-aire, en contacto con una distribución aleatoria de partículas (inmersas en el medio externo). En cada caso se graficaron las curvas para tres valores diferentes de la fracción de área de contacto de las partículas sobre la interfaz.

está marcada por las líneas rojas verticales), uno correspondiente al contraste de índices de refracción de la interfaz n_i-n_e y el siguiente a la interfaz n_i-n_1 . Además, las curvas de R_{Scoh} se caracterizan por tener un pico invertido en el segundo ángulo crítico, que es más profundo a medida que aumenta la fracción de contacto de las partículas. Para polarización TM (Figura 4.2(b)) se observan picos más acentuados, en comparación a la polarización TE (Figura 4.2(a)), en todos los valores de Θ_1 . Después del segundo ángulo crítico, las curvas transitan suavemente hacia la reflexión total interna (que se alcanza en 90°). Este comportamiento difiere del observado en una interfaz homogénea, donde la curva de reflectancia interna como función del ángulo de incidencia presenta un cambio drástico de pendiente en el ángulo crítico (pasa de

estar indefinida a pendiente cero, indicando la reflexión total interna). La razón de que la forma observada para R_{Scoh} , cerca del segundo ángulo crítico, sea diferente es la interferencia entre los dos términos en el miembro derecho de la ecuación (4.9). Nótese que r_{ie} y r_{i1} son números complejos, de magnitud 1 después de sus correspondientes ángulos críticos; y su fase depende del ángulo de incidencia. Entonces, al tomar la magnitud al cuadrado (ver ecuación (4.11)) aparece un término que depende de la diferencia de fase entre r_{ie} y r_{i1} . Dicha interferencia también es responsable del pico invertido observado en las Figuras 4.2 (a) y (b), con mínimo situado en el segundo ángulo crítico de todas las curvas.

4.1.2. Reflectancia total superficial

Como mencionamos al inicio de esta sección, la aproximación utilizada en la ecuación (4.1) es válida cuando las regiones o áreas de contacto de las partículas, sobre la interfaz, son grandes comparadas a las dimensiones de la longitud de onda de la radiación incidente. En ese caso, el campo esparcido en la dirección de reflexión por una determinada área de contacto se concentra alrededor de una región cercana a la dirección de reflexión especular. Entonces, en la práctica, si la medición de la reflectividad de la interfaz (entendida como la reflectancia de colimado a colimado) se realiza usando un fotodetector simple, cuyo ángulo sólido de detección es pequeño pero de tamaño finito, lo que estaremos midiendo en realidad es la reflectancia total de la superficie.

La reflectancia total superficial R_{ST} se puede calcular directamente integrando la componente z del vector de Poynting de la onda electromagnética reflejada \mathbf{S}^r , dividido por la componente z del vector de Poynting de la onda incidente \mathbf{S}^i ; es decir:

$$R_{ST} = \lim_{L \rightarrow \infty} \frac{1}{L^2} \int_{-L/2}^{L/2} \int_{-L/2}^{L/2} \left[\frac{|S_z^r|}{|S_z^i|} \right]_{z=0^-} d^2\mathbf{r}_\perp, \quad (4.12)$$

donde tenemos que:

$$\left[\frac{|S_z^r|}{|S_z^i|} \right]_{z=0^-} = |r_0(\mathbf{r}_\perp)|^2. \quad (4.13)$$

Esto es, para la correspondiente polarización de la luz incidente. Sustituyendo la ecuación (4.2) en la ecuación (4.13), e introduciendo el resultado en la ecuación (4.12), tenemos que $R_{ST} = |r_{ie}|^2 \Theta_e + |r_{i1}|^2 \Theta_1$. Luego, si usamos que $\Theta_e = 1 - \Theta_1$ nos queda la siguiente expresión:

$$R_{ST} = |r_{ie}|^2 + (|r_{i1}|^2 - |r_{ie}|^2) \Theta_1. \quad (4.14)$$

Nuevamente, podemos notar que el resultado no depende de la forma de las áreas de contacto, ni tampoco existe alguna correlación entre áreas de contacto vecinas, sólo depende de Θ_1 .

4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

Aquí también podemos intuir fácilmente la generalización de la ecuación (4.14) para N medios, adicionales al medio externo de IR n_e , en contacto con la interfaz:

$$R_{ST} = |r_{ie}|^2 + \sum_{j=1}^N \left(|r_{ij}|^2 - |r_{ie}|^2 \right) \Theta_j. \quad (4.15)$$

La Figura (4.3) muestra el cálculo de R_{ST} como función del ángulo de incidencia para dos polarizaciones diferentes (TE y TM). Las tres curvas en cada caso, se obtuvieron variando la fracción de contacto Θ_1 .

Puede verse, de las Figuras 4.3 (a) y (b), que la reflectancia total superficial es mayor que la

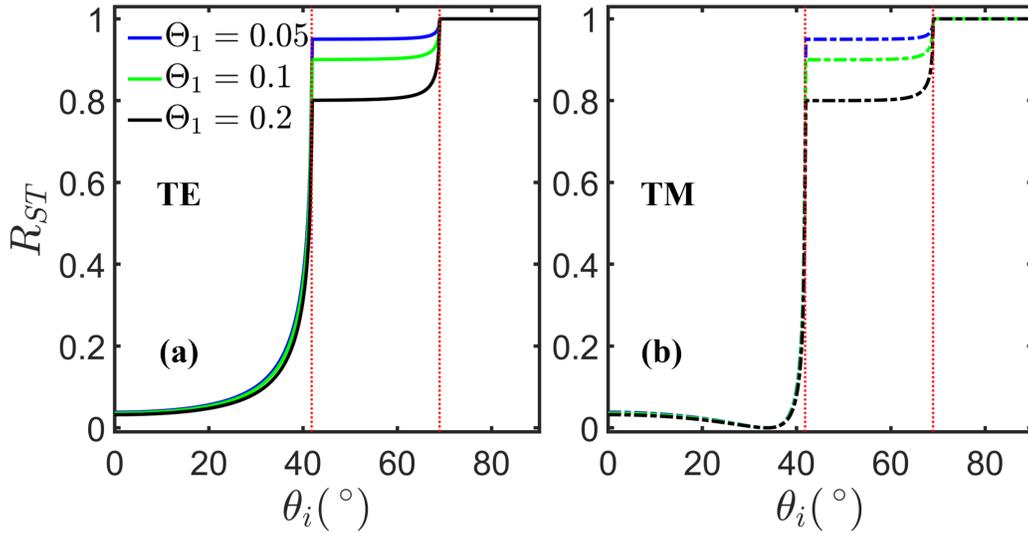


Figura 4.3: (a) Curvas teóricas para la reflectancia superficial total como función del ángulo de incidencia para polarización (a) TE y (b) TM de una interfaz plana vidrio-aire, en contacto con una distribución aleatoria de partículas (inmersas en el medio externo). En cada caso se graficaron las curvas para tres valores diferentes de la fracción de área de contacto de las partículas sobre la interfaz.

reflectancia coherente superficial (Figuras 4.2 (a) y (b)) para cualquier ángulo de incidencia, como era de esperarse ya que R_{ST} contiene a R_{Scoh} . Al igual que para R_{Scoh} , las gráficas de R_{ST} como función del ángulo de incidencia presentan dos ángulos críticos en las mismas posiciones (marcadas por las líneas verticales de color rojo). El comportamiento de R_{ST} es más parecido, cerca de los dos ángulos críticos, al observado para una interfaz homogénea: la reflectividad se aproxima al ángulo crítico con una pendiente infinita, y después del ángulo crítico la pendiente cae abruptamente a cero.

4.1.3. Modelo combinado

El éxito en la medición de la reflectancia total superficial (R_{ST}) está condicionado por la dispersión angular de la luz esparcida alrededor de la dirección especular y del ángulo sólido de detección del fotodetector utilizado para medir. Si el haz óptico incidente tiene una divergencia angular menor que el ángulo sólido de detección, entonces toda la luz coherentemente reflejada

(R_{Scoh}) es capturada por el fotodetector. Sin embargo, puede ocurrir que la proyección del haz de luz difusa (divergente) que viaja cerca de la dirección especular (en el caso discutido de áreas de contacto grandes respecto a λ) ocupe un área mayor al área fotosensible del detector utilizado. Entonces, en general, la reflectividad superficial medida es la suma de la reflectancia coherente y una parte de la reflectancia incoherente (que es la diferencia $R_{ST} - R_{Scoh}$). De acuerdo con este análisis, podemos plantear este modelo combinado como:

$$R_m = R_{Scoh} + x(R_{ST} - R_{Scoh}), \quad (4.16)$$

donde x es un parámetro ajustable que depende de las características del experimento.

4.2. Resultados

4.2.1. Comparación con simulaciones numéricas

El propósito de esta sección es establecer la validez de los modelos desarrollados y respaldar su uso en diferentes aplicaciones. Las simulaciones numéricas exactas son una opción muy confiable para comparar con el cálculo teórico, ya que se pueden explorar una gran cantidad de configuraciones. La simulación numérica del esparcimiento por partículas, con forma y posición aleatorias, sobre una superficie infinita y de tamaño mayor que la longitud de onda incidente tiene un alto grado de dificultad, en general. Sin embargo, debido a que los modelos derivados anteriormente no dependen ni del tamaño ni de la forma de las regiones de contacto podemos usarlos en casos donde haya invarianza de traslación a lo largo de una dirección específica, lo cual es equivalente a un problema de dos dimensiones. Por simplicidad, también asumiremos que el patrón de IR sobre la interfaz es periódico, lo cual puede introducir algunas oscilaciones en la curva de reflectividad como función del ángulo de incidencia. Como veremos a continuación, dicha periodicidad no impone ningún inconveniente para la comparación con los modelos teóricos. Así que, se simuló un arreglo periódico bidimensional de partículas (de sección transversal triangular) en contacto con una interfaz usando el Método de Elemento Finito (MEF) [55], como se muestra en la Figura 4.4. Elegimos una forma de prisma triangular para simular las partículas, para evitar que estas introduzcan otras reflexiones en la dirección especular. Así nos aseguramos que las contribuciones a la reflectancia coherente solo provienen de la superficie de contacto.

Para llevar a cabo el cálculo de la reflectancia coherente como función del ángulo de incidencia, en configuración interna, se usó el MEF mediante el programa de cómputo COMSOL 5.3, el cual permite resolver numéricamente la ecuación de Helmholtz en el dominio de la frecuencia. Se utilizó un equipo de cómputo con un procesador de seis núcleos a 2.4 GHz y 32Gb de memoria RAM. El tiempo que toma realizar las simulaciones depende del tamaño de la celda unitaria; en este caso varió entre 1 y 32 horas.

En la Figura 4.4 (a) se muestra un esquema bidimensional de la celda unitaria que que

4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

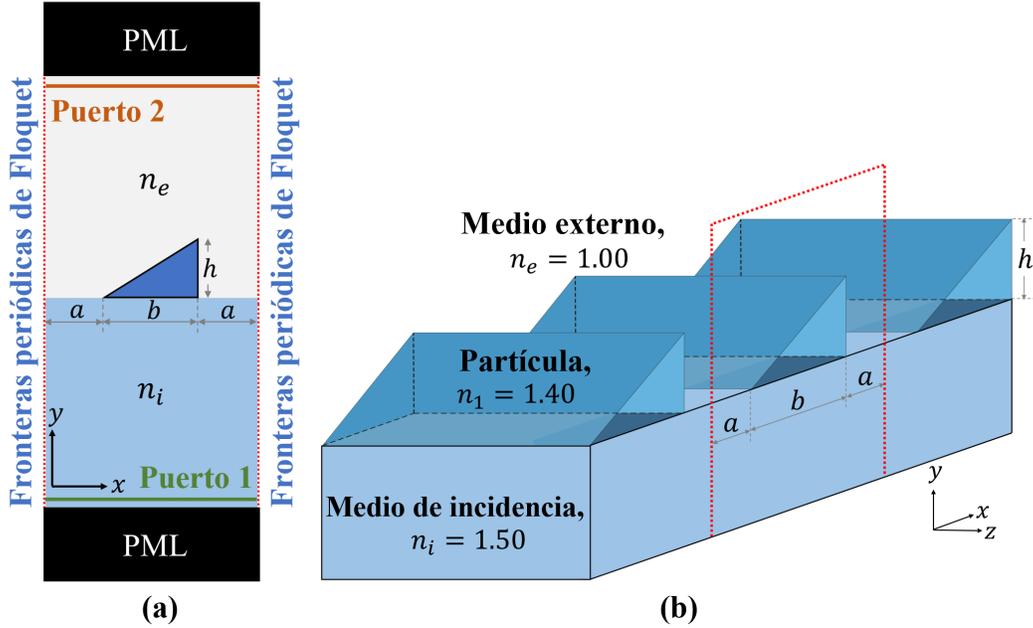


Figura 4.4: (a) Esquema del sistema simulado. Las partículas están representadas por prismas triangulares que cubren parcialmente la interfaz con el medio de incidencia. (a) Vista bidimensional de la celda unitaria simulada. (b) Vista tridimensional del sistema periódico simulado.

compone la estructura periódica simulada. Su representación equivalente en tres dimensiones se muestra en la Figura 4.4 (b). Esto corresponde a tener invarianza de traslación a lo largo del eje y . El período de la red bidimensional, a lo largo del eje x es $2a + b$, donde b es la base del prisma triangular (partícula) y $2a$ es la distancia entre los bordes más próximos de dos partículas contiguas. Entonces, podemos definir la fracción de contacto para este sistema como:

$$\Theta_1 = \frac{b}{2a + b}. \quad (4.17)$$

En todas nuestras simulaciones se utilizó una longitud de onda $\lambda = 630$ nm para la luz incidente y se fijó una altura $h = 2 \mu\text{m}$ para las partículas triangulares. El IR de las partículas se tomó como $n_1 = 1.40$, rodeadas por aire ($n_e = 1.00$) y en contacto con el medio de incidencia con IR $n_i = 1.50$ (vidrio). En ambos lados de la celda unitaria (Figura 4.4 (a)), usamos las condiciones periódicas de Floquet para reproducir la periodicidad de la red a lo largo del eje x . Además, ponemos condiciones de frontera en los puertos de entrada y salida de la celda unitaria (puertos 1 y 2 en la Figura 4.4 (a)). En el Puerto 1, definimos una onda plana incidente con polarización TM, que viaja en una dirección específica (θ_i). Las capas que se incluyen en los extremos superior e inferior de la celda unitaria bidimensional (PML: “perfectly matched layer”, por sus siglas en inglés) nos permiten trabajar con una celda unitaria de tamaño finito para modelar semiespacios infinitos, absorbiendo todos los campos que inciden sobre ellas. Por como están

definidas, las capas PML no absorben perfectamente las ondas que llegan con ángulos mayores a 75° . Esto se corrige ajustando la longitud de onda, por un factor $1/\cos\theta_i$, en el dominio de la capa PML [54, 56].

Se calculó el campo electromagnético reflejado y el campo transmitido en los puertos 1 y 2, respectivamente. A partir de los campos en el Puerto 1 podemos calcular la intensidad de la componente reflejada en la dirección especular, y posteriormente la reflectancia coherente. Integrando el vector de Poynting en el Puerto 1 podemos calcular también la reflectancia total.

Con el fin de evaluar el error numérico en nuestras simulaciones, se calculó el mismo problema usando dos mallados diferentes. En el mallado más grueso se varió el tamaño de la partición entre 0.6 nm y 60 nm, para todo el espacio de simulación. En el mallado más fino se redujo el tamaño de la partición dentro de las partículas, quedando en un intervalo entre 0.3 nm y 10 nm. En todos los casos, la máxima tasa de crecimiento utilizada fue de 1.1. En la Figura 4.5, se muestran las simulaciones numéricas de la reflectividad como función del ángulo de incidencia para la geometría representada en la Figura 4.4 y con $\Theta_1 = 0.17$ y $b = 5\mu\text{m}$, usando los mallados grueso y fino descritos. Podemos apreciar que las diferencias entre las curvas de reflectividad obtenidas son menores que 0.02 aproximadamente. Por lo tanto, en lo adelante usaremos el mallado fino para nuestras simulaciones, y podemos asumir que el error en el valor de la reflectividad es menor que 0.02.

El resultado de las simulaciones corresponde a toda la luz reflejada coherente e incoherente-

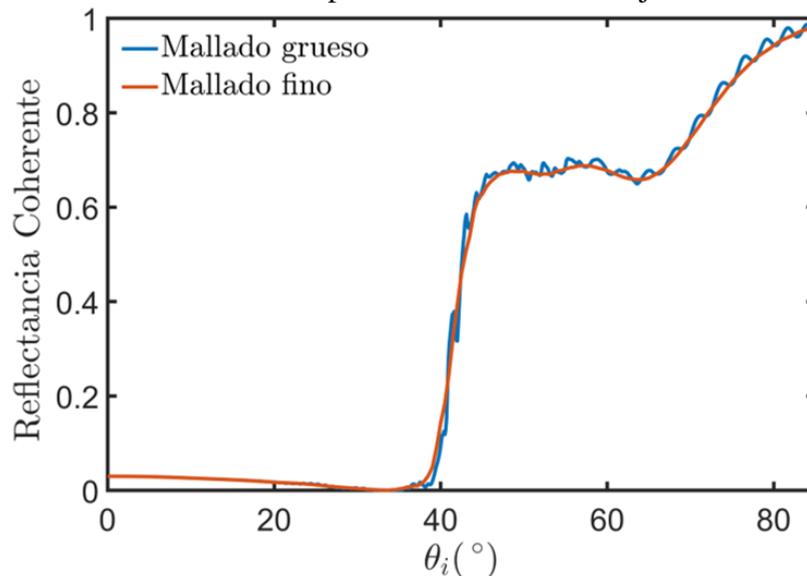


Figura 4.5: Comparación entre las curvas de reflectancia interna coherente como función del ángulo de incidencia para la misma celda unitaria y dos mallados distintos, con $\Theta_1 = 0.17$ y $b = 5\mu\text{m}$. Pueden observarse oscilaciones de interferencia espúreas al ser insuficiente la discretización del dominio de simulación.

mente, en la dirección especular. Esto incluye las contribuciones de la reflexión en la superficie y del esparcimiento proveniente del interior de las partículas. Sin embargo, dada la forma de

4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

las partículas (Figura 4.4), para la reflectancia coherente no se espera una contribución significativa del interior de las partículas; es decir, la reflectancia coherente calculada a partir de la simulación corresponde a la reflectancia coherente superficial que modelamos en la sección 4.1. Pero no podemos decir lo mismo en el caso de la reflectancia total. Para probar esta hipótesis, llevamos a cabo dos simulaciones, manteniendo iguales todos los parámetros excepto la forma de las partículas. En la Figura 4.6 se muestran los resultados de dichas simulaciones, asumiendo en un caso partículas triangulares y en el otro partículas rectangulares con su segunda interfaz rugosa (como se muestra en las subfiguras al interior de la gráfica en la Figura 4.6 (a)). Se puede apreciar, a partir de la Figura 4.6 (a), que las curvas de reflectancia coherente para ambos tipos de partícula son iguales dentro de los límites del error numérico, para todos los ángulos de incidencia. Por el contrario, en las curvas de reflectancia total graficadas en la 4.6 (b), podemos ver que hay diferencias importantes entre las dos curvas, particularmente antes del primer ángulo crítico. La razón es que las reflexiones en las interfaces partícula-aire contribuyen de manera importante a la reflectancia total. Entonces, en lo siguiente solo compararemos los resultados de las simulaciones para la reflectancia coherente con el modelo de reflectancia coherente superficial, R_{Scoh} . Sin embargo, la aproximación subyacente para derivar el modelo de reflectancia coherente superficial es la misma que se usa para obtener el modelo de reflectancia total superficial. Por lo tanto, podemos suponer que ambos modelos tienen los mismos límites de validez. En la Figura 4.7 se grafican las curvas de reflectancia coherente, en configuración interna, como función del ángulo de incidencia de una interfaz vidrio-aire en contacto parcial con partículas de IR $n_1 = 1.40$, simuladas con el MEF. Usamos un ancho de la celda unitaria de $2a + b = 29 \mu\text{m}$, y tres valores diferentes para la longitud de la base b de las partículas triangulares: 5, 10 y 16 μm . Los valores correspondientes de la fracción de contacto Θ_1 son: 17 %, 34 % y 55 %, respectivamente. En la Figura 4.7 se incluyeron las gráficas de la reflectancia coherente superficial R_{Scoh} (ecuación (4.11), con $N = 1$) utilizando los valores de la fracción de contacto mencionados y el mismo contraste de IR considerado para las simulaciones.

Podemos observar que las simulaciones con el MEF y las curvas del modelo tienen la misma tendencia y en algunas secciones tienen una buena coincidencia. Las oscilaciones en las curvas de reflectancia simuladas con el MEF, observadas entre 40° y 70° , se deben a la periodicidad introducida por simplicidad en la simulación. Las curvas que predice el modelo R_{Scoh} , para un patrón aleatorio de contraste de IR en la interfaz, no presenta estas oscilaciones. Sin embargo, obviando esta diferencia la simulación y el modelo tienen buena coincidencia, excepto cerca de los ángulos críticos en $\theta_i = 41.8^\circ$ y 69.0° . Nótese que la coincidencia entre la simulación y el modelo mejora detrás del segundo ángulo crítico a medida que aumenta la fracción de contacto Θ_1 . En este caso, el aumento de Θ_1 se debe a un aumento del tamaño de las partículas. Este comportamiento es esperado, ya que la aproximación utilizada en la ecuación (4.1), para derivar los modelos, es mejor lejos de los bordes de las áreas de contacto, y para partículas más grandes la razón entre el área y su contorno aumenta. En la subfigura, dentro de la Figura 4.7 (a la izquierda), podemos ver que las simulaciones y el modelo coinciden satisfactoriamente para ángulos bajos, para todos los tamaños de partícula considerados. A partir de este resultado po-

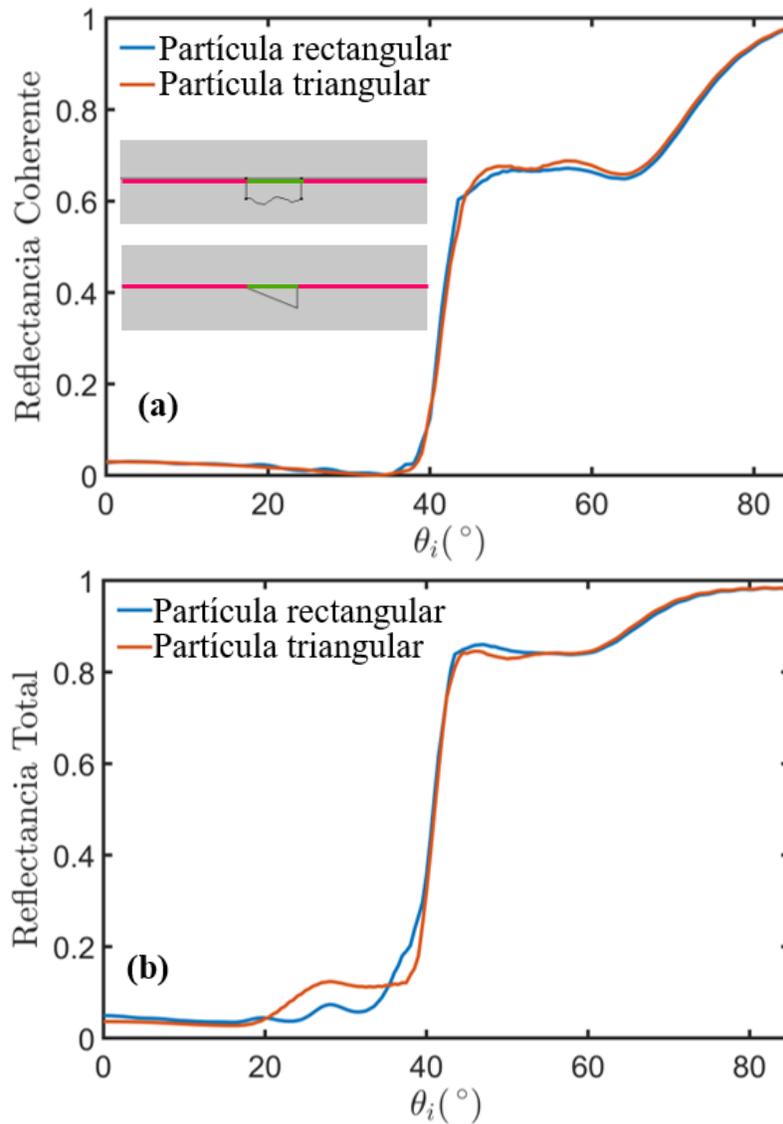


Figura 4.6: (a) Simulación de la reflectancia interna coherente como función del ángulo de incidencia para dos formas diferentes de partícula; a la izquierda se muestran las secciones transversales de cada geometría utilizada. (b) La misma comparación en términos de la reflectancia total. Para ambas simulaciones usamos $\Theta_1 = 0.17$ y $b = 5\mu\text{m}$.

demos aseverar que la aproximación usada en la derivación del modelo es muy buena, incluso para áreas de contacto con dimensión lineal de $5\mu\text{m}$.

A continuación abundaremos en el punto discutido anteriormente. En la Figura 4.8 se grafican las simulaciones de la reflectancia coherente como función del ángulo de incidencia, usando el MEF, para dos casos: $b = 5\mu\text{m}$ y $b = 10\mu\text{m}$, manteniendo una fracción de área de contacto de las partículas constante $\Theta_1 = 0.34$. Estas gráficas ayudan a evaluar la exactitud del modelo comparado a las simulaciones.

4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

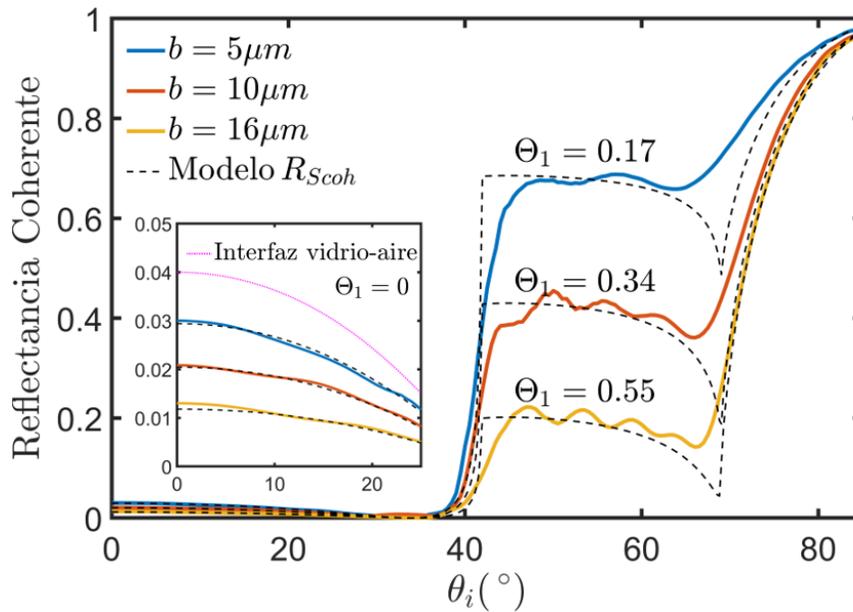


Figura 4.7: Curvas de reflectancia interna coherente, como función del ángulo de incidencia, para tres valores distintos de la fracción de contacto de las partículas sobre una interfaz plana vidrio-aire. Las curvas continuas fueron obtenidas mediante simulaciones usando el MEF (descrito en el texto). Las curvas discontinuas se obtuvieron usando el modelo para R_{Scoh} , dado por la ecuación (4.11) (con $N = 1$). Se muestra una ampliación de la región angular entre 0° y 25° .

La diferencia entre ambas curvas simuladas es la razón área/perímetro de las regiones de contacto de las partículas con la interfaz entre los medios interno y externo (ver subfiguras dentro de la Figura 4.8). Podemos notar una mayor cercanía entre la simulación y el modelo R_{Scoh} , cuando las partículas son de mayor tamaño (mayor razón área/perímetro). De hecho, la curva simulada para $b = 10 \mu m$ parece mostrar un pico invertido en el segundo ángulo crítico, como predice el modelo. Es presumible, que para partículas más grandes podamos observar un pico más evidente en el segundo ángulo crítico. Sin embargo, la capacidad de cómputo requerida para realizar estas simulaciones sobrepasa nuestras posibilidades actuales.

4.2.2. Aplicación experimental

Como se mencionó en la sección 4.1, las aplicaciones de los modelos propuestos pueden ir desde la medición del IR de líquidos rociados sobre una superficie de vidrio hasta el monitoreo de la adherencia o caracterización de un tejido biológico a una superficie plana [57–62]. En esta sección, presentamos un ejemplo de aplicación experimental como prueba de concepto para mostrar cómo se usa el método propuesto. Se midió la reflectividad interna, como función del ángulo de incidencia, de una interfaz en contacto con una película delgada de tejido epitelial de *Allium cepa* (nombre científico de la cebolla blanca comestible). La muestra se presionó suavemente y se extendió sobre la cara plana de un prisma semicilíndrico de vidrio (BK7;

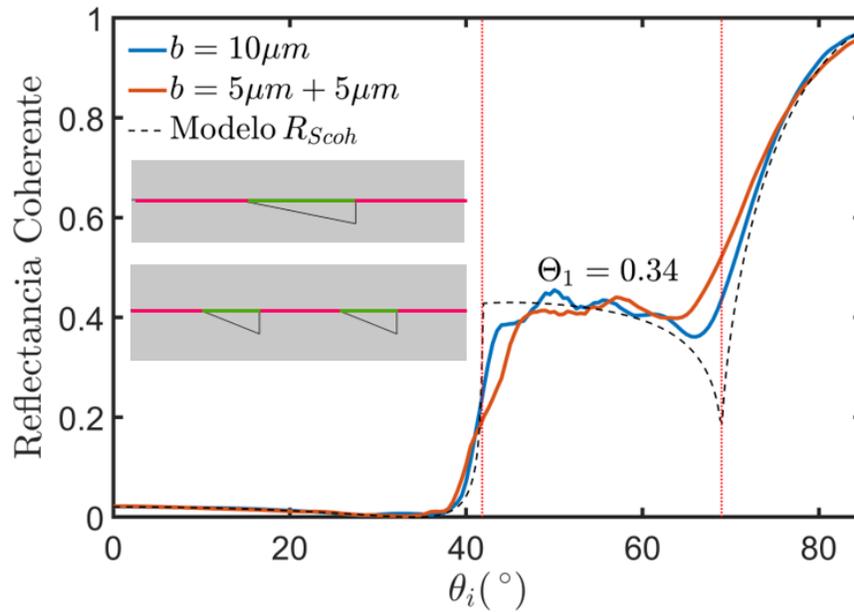


Figura 4.8: Comparación entre las curvas de reflectancia coherente como función del ángulo de incidencia, simuladas para los sistemas representados a la izquierda. Ambos sistemas tienen la misma fracción de contacto, $\Theta_1 = 0.34$, y se muestra la curva correspondiente calculada con el modelo de R_{Scoh} .

$n_i(\lambda) \approx 1.52$ [43]). En la Figura 4.8 aparece representado un esquema del arreglo experimental usado [11, 63]. Se iluminó la interfaz prisma-tejido usando una fuente láser de $\lambda = 515$ nm y variamos el ángulo de incidencia con una resolución de 0.2° . Con un fotodetector de silicio se midió, para cada posición angular, la luz reflejada por la interfaz en la dirección especular. Nos aseguramos de no tener contribuciones de la interfaz externa tejido-aire, colocando un pedazo de algodón mojado detrás de la película delgada de tejido (esto no se muestra en la Figura 4.9). Las fibras del algodón generan esparcimiento de la luz y el agua nos da un menor contraste de IR en la nueva interfaz tejido-algodón mojado. De esta manera, borramos la reflexión en esta segunda interfaz y es como si tuviéramos un semiespacio de tejido.

En la Figura 4.10 se muestra la comparación entre la curva de reflectividad experimental (línea roja con círculos rojos) y las predicciones de los modelos teóricos, de reflectancia superficial, propuestos anteriormente. La reflectividad medida muestra claramente tres ángulos críticos en: 41.1° , 63.4° y 69.1° . Esto nos indica, según el análisis teórico desarrollado en la sección 4.1, que en total hay tres medios haciendo contacto óptico con la superficie plana del prisma de vidrio. Nuestra hipótesis es que las células no están en contacto directo con el prisma, sino que hay una película delgada de medio extracelular, con IR n_e , entre ellos (región I en la ampliación de la Figura 4.9). En algunas zonas de contacto, cuya fracción de contacto llamaremos Θ_1 , la película de medio extracelular es tan delgada que localmente la interfaz es vista (por la luz) como una interfaz vidrio-medio intracelular, este último de IR n_1 . La fracción de contacto con el medio extracelular, la denotamos como Θ_e . También habrá regiones de la interfaz, donde el

4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

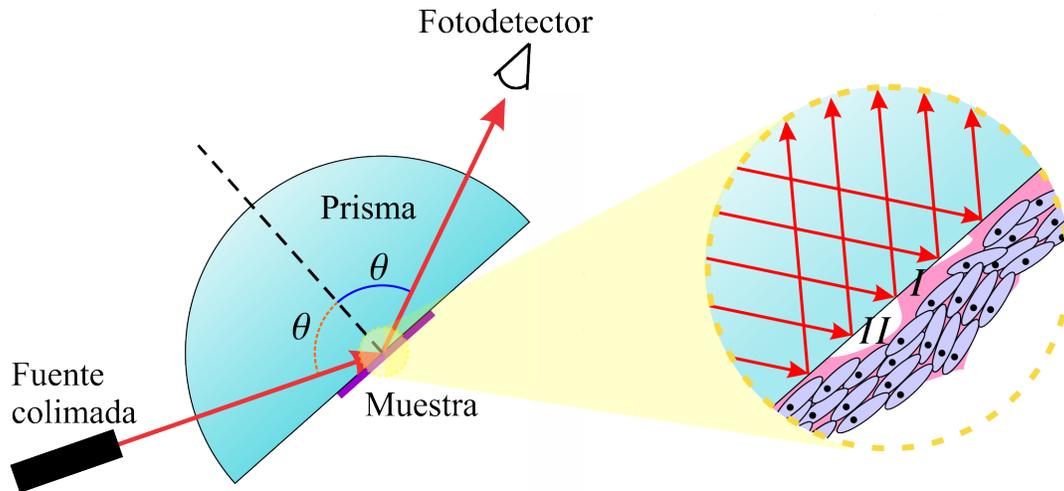


Figura 4.9: Diagrama esquemático del principio de medición utilizado. Se muestra una ampliación de la zona de contacto. Las células no están en contacto directo con el vidrio, sino que hay una película delgada de medio extracelular en medio (región I). En las regiones de tipo II, hay bolsas de aire entre el vidrio y la película de tejido biológico.

tejido no haga contacto (quedando espacios llenos de aire en medio, con IR $n_2 = 1.00$); a estas zonas les llamamos región tipo II (4.9).

Ajustamos entonces, el modelo para R_m dado por la ecuación (4.16), y usando las ecuaciones (4.11) y (4.15) para $N = 2$. Del ajuste del modelo combinado, pudimos determinar que el tejido tiene una adherencia o fracción de contacto del 45%; es decir, que $\Theta_e + \Theta_1 \approx 0.45$. De la misma manera, obtuvimos los índices de refracción de los medios intracelular y extracelular. Aunque no podemos asignar de manera inequívoca un IR a cada uno de estos medios, sí sabemos que el segundo ángulo crítico observado en la curva de reflectividad está relacionado con un IR de 1.36 y el tercer ángulo crítico corresponde a un IR de 1.42, en contacto con el prisma. Suponemos que, como en otros tejidos biológicos, el medio intracelular tiene una mayor concentración de solutos y por tanto tiene mayor IR [60, 64]; o sea, que $n_1 = 1.42$ y $n_e = 1.36$. Del ajuste de la altura de la curva de reflectividad, entre el segundo y tercer ángulo crítico, separamos los valores de la fracción de contacto como: $\Theta_e = 0.25$ y $\Theta_1 = 0.20$. El valor ajustado del parámetro experimental x fue de 0.9.

4.3. Discusión

Debemos resaltar que, en general, no es complicado ajustar los parámetros involucrados en el modelo. En este caso, no fue necesario utilizar ningún algoritmo especial de ajuste para encontrar dichos parámetros, dados por la ecuación 4.16: x , n_e , n_1 , n_2 , Θ_e , Θ_1 y Θ_2 . Como primer paso, se selecciona el valor de x en el modelo combinado R_m . Para ello, se debe prestar atención a la sección de la curva de reflectividad, detrás del último ángulo crítico (en este caso es 69.1°). Se elige el valor de x que reproduce la forma suavizada de la curva experimental después de

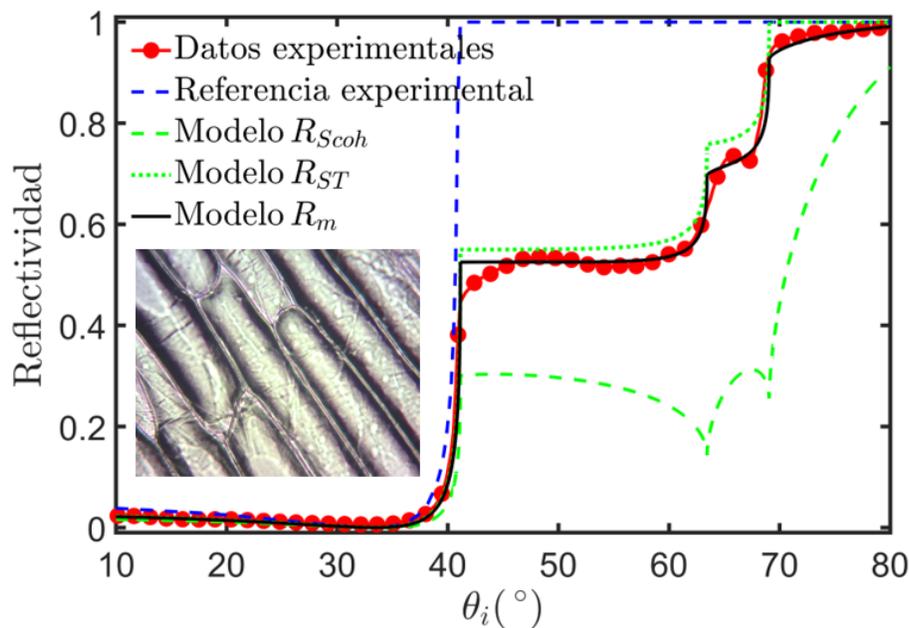


Figura 4.10: Reflectividad interna experimental como función del ángulo de incidencia de una interfaz vidrio-aire en contacto con un tejido epitelial vegetal (*Allium cepa*). Se ajustó el modelo de R_m como una combinación lineal de las componentes coherente y total de los modelos de reflectancia superficial, para un valor del parámetro experimental $x = 0.90$. Se muestra (a la izquierda) una imagen de microscopía óptica de la película de tejido biológico medida.

este ángulo. De esta parte de la curva se puede medir la contribución relativa de los modelos de reflectancia superficial coherente e incoherente. Nótese que el modelo de reflectancia total superficial R_{ST} (ecuación 4.16 con $x = 1$), representado por la curva verde punteada en la Figura 4.10, predice reflexión total interna después del último ángulo crítico, lo cual no ocurre experimentalmente. Esto significa que una parte de la reflectancia incoherente ($R_{ST} - R_{Scoh}$) no fue capturada o quedó fuera del fotodetector. Solamente un valor del parámetro x permite reproducir el comportamiento de la curva de reflectividad después de 69.1° (en este caso fue $x = 0.9$), siendo esta parte poco sensible a los valores exactos de los demás parámetros del modelo. En la práctica, esta región angular es la más importante de la curva para identificar rápidamente si hay contacto de uno o más medios adicionales al medio externo, al no observarse el tránsito abrupto hacia la reflexión total interna inmediatamente después del último ángulo crítico. En el siguiente capítulo veremos cómo la contribución del modelo desarrollado es muy relevante para lograr el ajuste en esta región angular, incluso cuando tenemos reflexiones provenientes del interior del medio externo.

Luego procedemos a determinar los índices de refracción en contacto con el medio de incidencia. En este caso hay dos medios, adicionales al medio extracelular (n_e): el medio intracelular (n_1) y el aire (n_2). La determinación de cada uno de estos índices de refracción es totalmente

4. Reflectividad óptica de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción

independiente de la del otro y de los demás parámetros del modelo. Básicamente, consiste en encontrar las posiciones de los ángulos críticos correspondientes en la curva de reflectividad, dadas por las posiciones angulares de los máximos locales de la derivada de la curva con respecto a θ_i . El IR correspondiente en cada caso se calcula, según la ley de Snell, como $n_j = n_i \sin \theta_{cj}$; siendo θ_{cj} el ángulo crítico j-ésimo observado en la curva de reflectividad. Dada la resolución angular del sistema, podemos estimar una incertidumbre del 0.5 % en la medición de los valores de IR en contacto con la interfaz. Cuando los medios involucrados no se pueden analizar por separado (como en un tejido biológico), es necesario conocer o suponer alguna relación entre los índices de refracción en cuestión; por ejemplo, en el caso presentado suponemos que $n_1 > n_e$ y sabemos que $n_2 = 1.0$ corresponde al aire.

Las fracciones de contacto con el tejido, en este caso Θ_1 y Θ_e , más los espacios de aire donde el tejido no está adherido a la interfaz (Θ_2), deben cumplir que $(\Theta_1 + \Theta_e) + \Theta_2 = 1$. Así que podemos determinar la fracción de contacto total del tejido (o adherencia) mediante el ajuste de la altura de la curva después del primer ángulo crítico (41.1°). Esto fija el valor de $\Theta_1 + \Theta_e$. Luego ajustamos el valor de Θ_1 o Θ_e (uno de los dos), sin variar la suma obtenida anteriormente y hasta obtener la altura correcta de la curva después del segundo ángulo crítico (63.4°). Finalmente, debemos señalar que las fluctuaciones de la intensidad del láser, en nuestro dispositivo experimental, introduce un error aleatorio en nuestras mediciones de reflectividad. La incertidumbre correspondiente a los datos de reflectividad medidos es aproximadamente igual al radio de los círculos rojos usados en la Figura 4.10. Las mediciones experimentales tienen un errores adicionales relacionados al tamaño finito del área iluminada por el láser (“spot” en inglés) y su leve, aunque notable, desplazamiento por la superficie de la interfaz durante el barrido angular. Dichos errores resultan en un valor estimado del 1 % para la incertidumbre en la determinación de las fracciones de contacto.

Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

En capítulos anteriores, vimos cómo la medición de reflectividad óptica interna se puede utilizar para monitorear (con alta precisión) el índice de refracción de una suspensión de células biológicas y para estudiar células en contacto con una interfaz plana. De manera general, podemos decir que en ambos casos se resolvió el problema de reflexión en una sola interfaz con el medio biológico en cuestión. Sin embargo, si confinamos una película delgada de ese medio biológico entre dos interfaces planas y paralelas, tendremos una contribución adicional a la reflectividad, que contiene información de la propagación de la componente coherente en el interior de dicho medio, ya sea un tejido o una suspensión de células. No está claro si la teoría de medio efectivo es aplicable a este problema. En este capítulo proponemos investigar esta interrogante y desarrollar un modelo de esparcimiento coherente totalmente independiente del concepto de índice de refracción efectivo [65]. Nuestro análisis se basa en la aproximación de difracción anómala y se reduce al modelo, previamente implementado en nuestro grupo de trabajo, para una monocapa de células sobre un sustrato de vidrio [18].

5.1. Modelo de esparcimiento coherente basado en la ADA

Consideremos una película de tejido biológico, de espesor d , que consiste en una suspensión de células esféricas de índice de refracción (IR) n_p , confinada entre dos interfaces planas y paralelas. Los medios en contacto con la película de tejido, y entre los cuales está confinada, se consideran homogéneos con índices de refracción real, n_0 y n_2 , como se ha representado en la Figura 5.1. El medio que rodea a las células (o medio matriz), en el interior de la película confinada, también se considera homogéneo con IR n_1 . Se ilumina la película de tejido con una onda plana dada por $\mathbf{E}_i = E_0 \exp(i\mathbf{k}_i \cdot \mathbf{r} - i\omega t) \hat{\mathbf{e}}_i$, donde $\mathbf{k}_i = k_{ix} \hat{\mathbf{a}}_x + k_{iz} \hat{\mathbf{a}}_z$ es el vector de onda incidente en el medio n_0 , formando un ángulo θ_i con la normal a la interfaz (en $z = -d$). Una

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

parte de la onda incidente entra al medio matriz y se refracta hacia el interior de la película de tejido. La componente coherente se propaga a través de la película confinada hasta encontrar la segunda interfaz (en $z = 0$), con el medio de IR n_2 , y una fracción de ésta se refleja. La onda reflejada viaja de regreso y se refracta hacia el medio de incidencia, en $z = -d$, con su vector de onda apuntando en la dirección especular (formando un ángulo $-\theta_i$ con la normal a la interfaz). Este proceso ocurre repetidamente, ya que hemos considerado que la película confinada es infinita en las direcciones x e y . Luego, la reflectancia especular neta (o resultante) en el semiespacio $z < -d$ se obtiene de la superposición entre la primera reflexión en la interfaz superior y la contribución de las múltiples reflexiones en el interior de la película de tejido.

Durante su trayecto por la película de tejido, la luz cruza alguna que otra célula. De acuerdo con

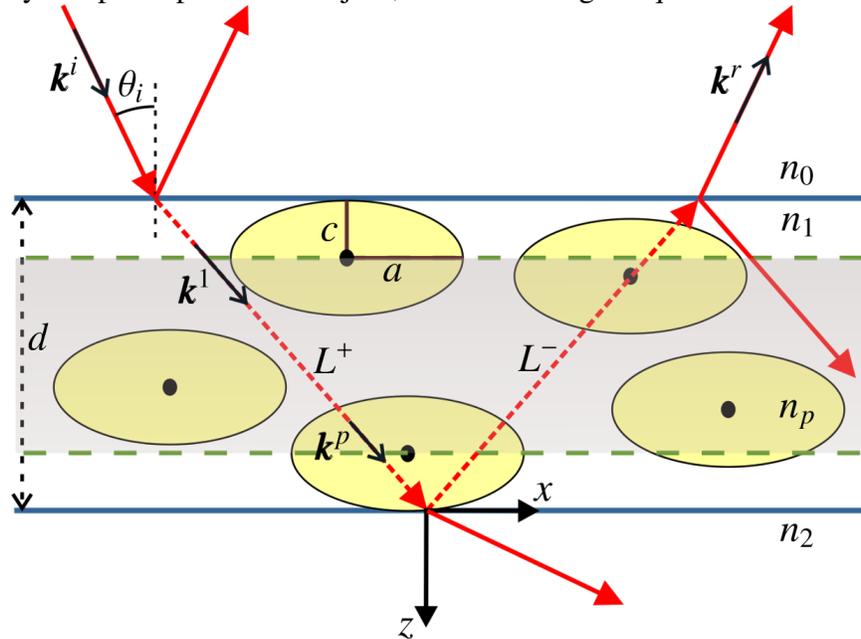


Figura 5.1: Película de tejido biológico confinada entre dos interfaces planas (líneas azules), que delimitan las fronteras con el medio de incidencia (n_0) y el medio externo (n_2). Las trayectorias de reflexión y transmisión, que sigue la onda electromagnética dentro de la película de tejido, se representan en color rojo. Las células se representan como esferoides oblatos, de semiejes a y c , con $a > c$. La región sombreada representa el volumen permitido para los centros de las células, cuyo espesor en z es $d - 2c$.

la conocida aproximación de difracción anómala (ADA), si el contraste de índices de refracción $\Delta n = n_p - n_1$ entre los medios intracelular y extracelular es bajo (es decir, $\left| \frac{\Delta n}{n_p} \right| \ll 1$), y las células son grandes comparadas a la longitud de onda (λ) incidente, entonces podemos asumir que la luz no se desvía en su paso por las células. Sin embargo, la onda experimenta un cambio de fase $\Delta(x, y, \theta_i)$, que depende de la diferencia entre los índices de refracción (Δn), como:

$$\Delta(x, y, \theta_i) = k \int_L \Delta n(\mathbf{r}) dl, \quad (5.1)$$

donde k es el número de onda en el vacío, \mathbf{r} es el vector de posición y $L = L^+ + L^-$ es la longitud del camino geométrico que recorre la luz en la película confinada. L^+ corresponde a la

5.1. Modelo de esparcimiento coherente basado en la ADA

distancia recorrida desde $z = -d$ hacia la segunda interfaz y L^- a la distancia recorrida desde $z = 0$ hasta la interfaz con el medio de incidencia, como se muestra en la Figura 5.1 (flechas rojas discontinuas). L varía con el ángulo de incidencia θ_i .

Aplicando la ADA y considerando solamente las dos primeras reflexiones de la onda coherente, el campo eléctrico reflejado en la interfaz de incidencia (del lado del medio de incidencia), o sea en $z = -d^-$, puede aproximarse como:

$$\mathbf{E}_r(x, y, z = -d^-) = E_0 \left(r_{01} + r_{12} t_{01} t_{10} e^{2ik_{1z}d} e^{i\Delta(x, y, \theta_i)} \right) e^{i\mathbf{k}_r \cdot \mathbf{r}} \hat{\mathbf{e}}_r, \quad (5.2)$$

donde r_{01} y r_{12} son los coeficientes de reflexión de Fresnel de las interfaces $n_0 - n_1$ y $n_1 - n_2$, respectivamente; t_{01} y t_{10} son los coeficientes de transmisión de la interfaz $z = -d$, dependiendo de si la luz está entrando o saliendo de la película de tejido biológico, $k_{1z} = k \sqrt{n_1^2 - n_0^2 \sin^2 \theta_i}$ es la componente z del vector de onda en el medio matriz de la película de tejido biológico, $\mathbf{k}_r = k_{ix} \hat{\mathbf{a}}_x - k_{iz} \hat{\mathbf{a}}_z$ es el vector de onda reflejado, y $\hat{\mathbf{e}}_r$ es el vector de polarización de la onda reflejada en la dirección especular.

Los dos índices de refracción que caracterizan a la película de tejido, n_1 y n_p , en general son números complejos. Entonces, los vectores de onda \mathbf{k}_1 fuera de las células y \mathbf{k}_p al interior de ellas, son vectores complejos que corresponden a ondas inhomogéneas. La ecuación (5.1) se puede reescribir en términos de estos vectores de onda, obteniéndose una expresión más general:

$$\Delta(x, y, \theta_i) = \int_L \Delta \mathbf{k}(\mathbf{r}) \cdot d\mathbf{l} = \int_{L^+} \Delta \mathbf{k}^+ \cdot d\mathbf{l} + \int_{L^-} \Delta \mathbf{k}^- \cdot d\mathbf{l}, \quad (5.3)$$

donde

$$\Delta \mathbf{k}^\pm(\mathbf{r}) = \begin{cases} \mathbf{k}_p^\pm - \mathbf{k}_1^\pm & \text{dentro de las células} \\ 0 & \text{fuera de las células} \end{cases} \quad (5.4)$$

donde

$$\mathbf{k}_p^\pm = k_{ix} \hat{\mathbf{a}}_x \pm (k'_{pz} + ik''_{pz}) \hat{\mathbf{a}}_z = (k_{ix} \hat{\mathbf{a}}_x \pm k'_{pz} \hat{\mathbf{a}}_z) \pm ik''_{pz} \hat{\mathbf{a}}_z, \quad (5.5)$$

y

$$\mathbf{k}_1^\pm = k_{ix} \hat{\mathbf{a}}_x \pm (k'_{1z} + ik''_{1z}) \hat{\mathbf{a}}_z = (k_{ix} \hat{\mathbf{a}}_x \pm k'_{1z} \hat{\mathbf{a}}_z) \pm ik''_{1z} \hat{\mathbf{a}}_z. \quad (5.6)$$

La parte real de ambos vectores de onda apunta en la dirección de propagación del frente de onda, y su parte imaginaria apunta en la dirección en que la onda se atenúa (paralela al eje z). Nótese que al usar las expresiones de la (5.2) a la (5.6), estamos extendiendo el uso estándar de la ADA al incluir ondas inhomogéneas y evanescentes en el cálculo del término de retraso en fase en la ecuación (5.3). Originalmente la ADA asume ondas incidentes homogéneas sobre

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

una partícula (en este caso, célula).

Al igual que en el capítulo anterior, realizaremos una expansión en ondas planas de la componente tangencial del campo eléctrico reflejado, $\mathbf{E}_r(x, y, z = -d^-)$ (ecuación (5.2)), hacia el semiespacio $z \leq -d$. Usaremos el método de la transformada de Fourier [21] tomando el plano $z = -d^-$ como plano de referencia. Grosso modo, este método consiste en indicar la transformada de Fourier bidimensional de la ecuación (5.2) y luego aplicar la transformada inversa bidimensional, pero completando el kernel para satisfacer las ecuaciones de Maxwell (en tres dimensiones) en el semiespacio de reflexión. Tenemos lo siguiente:

$$\mathbf{E}_r(x, y, z \leq -d^-) = \frac{1}{(2\pi)^2} \iint_{\pm\infty} \mathbf{f}(k_x, k_y) e^{i(k_x x + k_y y - k_z z)} dk_x dk_y, \quad (5.7)$$

donde k_x y k_y son las coordenadas del espacio de Fourier y $k_z = \sqrt{k_i^2 - k_x^2 - k_y^2}$. En la ecuación (5.7), $\mathbf{f}(k_x, k_y) = \mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) + f_z(k_x, k_y) \hat{\mathbf{a}}_z$, donde $\mathbf{f}_\perp(k_x, k_y)$ y $f_z(k_x, k_y) = -\mathbf{k}_\perp \cdot \mathbf{f}_\perp(k_x, k_y)/k_z$ son, respectivamente, las componentes tangencial y perpendicular de \mathbf{f} en el plano de referencia ($z = -d^-$) y $\mathbf{f}_\perp(k_x, k_y)$ está dado por:

$$\mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) = \iint_{\pm\infty} \mathbf{E}_r^\perp(z = -d) e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy. \quad (5.8)$$

La ecuación (5.7) es la parte eléctrica de la onda electromagnética reflejada en el semiespacio $z \leq -d$.

Es necesario considerar que, en su paso por las células, la luz experimenta esparcimiento múltiple en diferentes direcciones. Aquí solo nos enfocaremos en modelar la onda promedio reflejada $\mathbf{E}_r^{coh}(x, y, z) = \langle \mathbf{E}_r(x, y, z \leq -d^-) \rangle$, conocida como la componente coherente de la luz reflejada. Promediando la ecuación (5.7) sobre las posiciones de las células (promedio configuracional), obtenemos que:

$$\mathbf{E}_r^{coh}(x, y, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \iint_{\pm\infty} \langle \mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) + f_z(k_x, k_y) \hat{\mathbf{a}}_z \rangle e^{i\mathbf{k}^- \cdot \mathbf{r}} dk_x dk_y, \quad (5.9)$$

donde $\mathbf{k}^- = (k_x, k_y, -k_z)$. Como el promedio configuracional se calcula sobre variables estocásticas del sistema, podemos tomar los promedios individuales de los dos términos dentro de la integral:

$$\langle \mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) \rangle = \iint_{\pm\infty} \langle \mathbf{E}_r^\perp(z = -d) \rangle e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy \quad (5.10)$$

y

$$\langle f_z(k_x, k_y) \rangle = \frac{-\mathbf{k}_\perp \cdot \langle \mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) \rangle}{k_z}. \quad (5.11)$$

De la ecuación (5.10), y usando la ecuación (5.2), tenemos lo siguiente:

5.1. Modelo de esparcimiento coherente basado en la ADA

$$\langle \mathbf{E}_r^\perp(z = -d) \rangle = \langle E_0 \left(r_{01} + r_{12}t_{01}t_{10}e^{2ik_1z} e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \right) e^{ik_{ix}x} \hat{\mathbf{e}}_{r\perp} \rangle, \quad (5.12)$$

y aquí, el promedio solo aplica al término $e^{i\Delta(x,y,\theta_i)}$. Además, si suponemos invarianza de traslación de los promedios estadísticos en el plano xy , entonces el promedio será independiente de estas variables, y $e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} = e^{i\Delta(\theta_i)}$. Por lo tanto, sustituyendo este resultado en la ecuación (5.12) y al combinarlo con la ecuación (5.10) obtenemos:

$$\langle \mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) \rangle = E_0 \left(r_{01} + r_{12}t_{01}t_{10}e^{2ik_1z} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle \right) \hat{\mathbf{e}}_{r\perp} \iint_{\pm\infty} e^{-i(k_x - k_{ix})x} e^{-ik_y y} dx dy, \quad (5.13)$$

donde la expresión entre paréntesis se ha sacado de la integral, ya que es una constante en el dominio xy . Las integrales que quedan se pueden resolver inmediatamente, aplicando la definición de la función delta de Dirac ($\delta(\beta) = (1/2\pi) \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i\beta x} dx$), así que:

$$\langle \mathbf{f}_\perp(k_x, k_y) \rangle = E_0 \left(r_{01} + r_{12}t_{01}t_{10}e^{2ik_1z} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle \right) \hat{\mathbf{e}}_{r\perp} \delta(k_x - k_{ix}) \delta(k_y). \quad (5.14)$$

Finalmente, combinando las ecuaciones (5.9), (5.11) y (5.14) se obtiene la siguiente expresión para la componente coherente del campo eléctrico reflejado:

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_r^{coh}(x, y, z) &= \frac{1}{(2\pi)^2} E_0 \left(r_{01} + r_{12}t_{01}t_{10}e^{2ik_1z} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle \right) \\ &\times \left(\hat{\mathbf{e}}_{r\perp} + \frac{-\mathbf{k}_\perp \cdot \hat{\mathbf{e}}_{r\perp}}{k_z} \hat{\mathbf{a}}_z \right) \iint_{\pm\infty} \delta(k_x - k_{ix}) \delta(k_y) e^{i(k_x x + k_y y)} e^{-ik_z z} dk_x dk_y. \end{aligned} \quad (5.15)$$

Aquí las integrales en k_x y k_y se pueden resolver directamente usando las propiedades de la delta de Dirac [66]. También se puede demostrar que $\left[\hat{\mathbf{e}}_{r\perp} + \frac{-\mathbf{k}_\perp \cdot \hat{\mathbf{e}}_{r\perp}}{k_z} \hat{\mathbf{a}}_z \right] = \hat{\mathbf{e}}_r$ (ver apéndice A) y de la ecuación (5.15) resulta que:

$$\mathbf{E}_r^{coh}(x, y, z) = E_0 \left(r_{01} + r_{12}t_{01}t_{10}e^{2ik_1z} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \right) e^{i\mathbf{k}_r \cdot \mathbf{r}} \hat{\mathbf{e}}_r. \quad (5.16)$$

Como se dijo anteriormente, un campo eléctrico proporcional al segundo término de la suma en la ecuación (5.16) se refleja en la interfaz superior (ver Figura 5.1), atravesando nuevamente la película de tejido biológico y luego se vuelve a reflejar en la interfaz inferior. Una parte se transmite al medio de incidencia, añadiendo una tercera contribución a la onda coherente reflejada, y otra parte se refleja de nuevo hacia la película confinada. Este proceso se repite indefinidamente. La amplitud de las contribuciones al campo coherente reflejado decae en cada paso por la película inhomogénea. En general, la suma de las infinitas reflexiones converge rápidamente (ver apéndice B); así que podemos añadir el resultado a la ecuación 5.16 para obtener una expresión más completa:

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

$$\mathbf{E}_r^{coh}(x, y, z) = E_0 \left(\frac{r_{01} + r_{12} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle e^{2ik_1z} d}{1 + r_{01}r_{12} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle e^{2ik_1z} d} \right) e^{i\mathbf{k}_r \cdot \mathbf{r}} \hat{\mathbf{e}}_r. \quad (5.17)$$

La fracción entre paréntesis, en la ecuación (5.17), es el coeficiente de reflexión coherente r_{coh} , y la reflectancia coherente se calcula como:

$$R_{coh} = \left| \frac{r_{01} + r_{12} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle e^{2ik_1z} d}{1 + r_{01}r_{12} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle e^{2ik_1z} d} \right|^2. \quad (5.18)$$

Para películas de tejido gruesas, o que su espesor abarque varias longitudes de onda ($d \gg \lambda$), la curva teórica de R_{coh} como función del ángulo de incidencia θ_i muestra oscilaciones muy rápidas, debido a la interferencia entre las múltiples reflexiones. Experimentalmente, dichas oscilaciones en $R_{coh}(\theta_i)$ se borran total o parcialmente, lo cual puede deberse a una resolución angular insuficiente o a que las interfaces no queden perfectamente paralelas. Si la película de tejido no es demasiado delgada, es posible quitar estas oscilaciones también en la fórmula teórica para R_{coh} sumando las irradiancias reflejadas en vez de los campos eléctricos correspondientes [67]. En este caso obtenemos lo siguiente:

$$R_{coh} = \frac{R_{01} + R_{12} \left| \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \right|^2 |e^{2ik_1z} d|^2 (1 - 2\text{Re}(r_{01}^2))}{1 - R_{01}R_{12} \left| \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \right|^2 |e^{2ik_1z} d|^2}, \quad (5.19)$$

donde $R_{01} = |r_{01}^2|$, $\text{Re}(r_{01}^2)$ es la parte real de r_{01}^2 , y $R_{12} = |r_{12}^2|$. Un análisis más detallado para llegar a la ecuación (5.19), se realiza en el apéndice C. Solamente quedaría calcular el promedio del término que contiene al retraso en fase $e^{i\Delta(\theta_i)}$.

5.1.1. Retraso en fase en la película de biotejido

Supongamos que la película de tejido contiene un número N de células, con forma de esferoides oblatos (con simetría de revolución respecto al eje z). Además, consideremos que dichas células están orientadas como muestra la Figura 5.1, con su eje mayor paralelo al plano xy . Las células no pueden penetrar las interfaces (en $z = -d$ y $z = 0$), y supondremos que son indeformables, lo cual limita el volumen V en el cual podemos encontrar sus centros. Dicho volumen V está dado por un área infinita $s \times s$ multiplicada por el espesor $d - 2c$, y está representado por región sombreada en la Figura 5.1). Denotaremos el vector de posición de la p -ésima célula como $\mathbf{r}_p = (x_p, y_p, z_p)$. Si una onda plana que viaja en el interior de la película de tejido, se encuentra a la p -ésima célula en su trayecto de bajada o de subida a lo largo del eje z (en la dirección positiva o negativa del eje z), podemos definir la distancia recorrida dentro de la célula con el vector \mathbf{l}_+ (\mathbf{r}_p, θ_1) o \mathbf{l}_- (\mathbf{r}_p, θ_1), respectivamente. El ángulo θ_1 indica la dirección de viaje de la parte real de los vectores de onda \mathbf{k}_1 y \mathbf{k}_p en la película de tejido. Así que considerando las ecuaciones (5.3) y (5.4) tenemos que:

$$\Delta(\theta_i) = \int_L \Delta \mathbf{k}^\pm \cdot d\mathbf{l} = \sum_{p=1}^N [(\mathbf{k}_p^+ - \mathbf{k}_1^+) \cdot \mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) + (\mathbf{k}_p^- - \mathbf{k}_1^-) \cdot \mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)]. \quad (5.20)$$

Nótese que, si ningún rayo atraviesa, por ejemplo, la j -ésima célula ni de bajada ni de subida, entonces $\mathbf{l}_+(\mathbf{r}_j, \theta_1) = 0$ o $\mathbf{l}_-(\mathbf{r}_j, \theta_1) = 0$, o ambos. El ángulo de incidencia θ_i y el ángulo de viaje de la luz dentro de la película de tejido θ_1 se relacionan por la ley de Snell en la interfaz $z = -d$. A partir de la ecuación (5.20), la exponencial del promedio del retraso en fase es:

$$\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle = \left\langle \prod_{p=1}^N e^{i[(\mathbf{k}_p^+ - \mathbf{k}_1^+) \cdot \mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) + (\mathbf{k}_p^- - \mathbf{k}_1^-) \cdot \mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)]} \right\rangle. \quad (5.21)$$

Formalmente, el promedio estadístico $\langle \cdot \rangle$ se obtiene de multiplicar por la función densidad de probabilidad $g(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$ de encontrar una configuración específica $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N$ de la posición de los centros de las células en el volumen permitido V , e integrando sobre todo el espacio N -dimensional $d^3\mathbf{r}_1 d^3\mathbf{r}_2 \dots d^3\mathbf{r}_N$. Nótese que cualquier $g(\mathbf{r}_p)$ valdrá cero si \mathbf{r}_p está fuera del volumen V .

Ahora, por simplicidad, asumiremos que las posiciones de las células no están correlacionadas entre sí e ignoraremos el volumen de exclusión, y en este caso la función densidad de probabilidad se puede aproximar como $g(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \approx g(\mathbf{r}_1)g(\mathbf{r}_2) \dots g(\mathbf{r}_N)$. Esto es válido solamente en el límite diluido, pero puede dar resultados razonables para valores finitos de la densidad en número de células. Bajo las aproximaciones mencionadas, la expresión para el promedio configuracional del retraso en fase introducido por las células se simplifica de la siguiente manera:

$$\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle = \left\langle e^{i \int_L \Delta \mathbf{k}^\pm \cdot d\mathbf{l}} \right\rangle = \prod_{p=1}^N \int_V g(\mathbf{r}_p) e^{i[(\mathbf{k}_p^+ - \mathbf{k}_1^+) \cdot \mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) + (\mathbf{k}_p^- - \mathbf{k}_1^-) \cdot \mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)]} d^3\mathbf{r}_p, \quad (5.22)$$

donde $d^3\mathbf{r}_p = dx_p dy_p dz_p$ es el diferencial de volumen. De la ecuación (5.22) puede entenderse que la luz no atraviesa la misma célula más de una vez, en cada una de las direcciones de viaje (hacia abajo o hacia arriba) en la película de tejido confinada.

Si asumimos una densidad de probabilidad uniforme de encontrar los centros de las células dentro del volumen permitido V , tendremos que $g(\mathbf{r}_p) = 1/V$. Luego, la ecuación (5.22) queda:

$$\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \approx \left[\frac{1}{V} \int_V e^{i[(\mathbf{k}_p^+ - \mathbf{k}_1^+) \cdot \mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) + (\mathbf{k}_p^- - \mathbf{k}_1^-) \cdot \mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)]} d^3\mathbf{r}_p \right]^N. \quad (5.23)$$

Sumando y restando 1 en el integrando de la ecuación (5.23), y teniendo en cuenta que $\frac{1}{V} \int_V (+1) d^3\mathbf{r}_p = 1$, nos queda lo siguiente:

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

$$\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \cong \left[1 + \frac{1}{V} \int_V \left(e^{i[(\mathbf{k}_p^+ - \mathbf{k}_1^+) \cdot \mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) + (\mathbf{k}_p^- - \mathbf{k}_1^-) \cdot \mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)]} - 1 \right) d^3 \mathbf{r}_p \right]^N, \quad (5.24)$$

donde N y V se relacionan por la densidad en número de células, $\rho = N/V$. Definiendo la variable auxiliar $\Psi \equiv \int_V \left(e^{i[(\mathbf{k}_p^+ - \mathbf{k}_1^+) \cdot \mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) + (\mathbf{k}_p^- - \mathbf{k}_1^-) \cdot \mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)]} - 1 \right) d^3 \mathbf{r}_p$, obtenemos la siguiente expresión:

$$\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \cong \left(1 + \frac{1}{V} \Psi \right)^{\rho V}. \quad (5.25)$$

Dicha expresión se puede reescribir como:

$$\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \cong \left[\left(1 + \frac{1}{V} \Psi \right)^{V/\Psi} \right]^{\rho \Psi}. \quad (5.26)$$

Asumiendo que $\frac{\Psi}{V} \ll 1$ en la ecuación (5.26), se puede usar la identidad $(1 + \frac{1}{n})^n = e$, y obtenemos $\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \cong e^{\rho \Psi}$; es decir:

$$\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle \cong e^{\rho \Psi} \cong e^{\rho \int_V \left(e^{i[(\mathbf{k}_p^+ - \mathbf{k}_1^+) \cdot \mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) + (\mathbf{k}_p^- - \mathbf{k}_1^-) \cdot \mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)]} - 1 \right) d^3 \mathbf{r}_p}, \quad (5.27)$$

la cual, combinada con la ecuación (5.19), nos da una expresión analítica completa para la componente coherente de la reflectancia, R_{coh} .

Los detalles del cálculo específico para la geometría de células utilizada se pueden consultar en el apéndice D. Aquí solo señalaremos que los límites de integración en la ecuación (5.27) se pueden reducir, considerando que las funciones $\mathbf{l}_{\pm}(\mathbf{r}_p, \theta_1)$ son distintas de cero solamente dentro de la p -ésima célula. Entonces, los límites de integración en el plano xy están dados por la proyección geométrica de la célula en ese plano para el ángulo de incidencia correspondiente. Luego, integraremos en los intervalos $-a - d \tan \theta_1 \leq x_p \leq a + d \tan \theta_1$ (de la ecuación (5.6) tenemos que $\tan \theta_1 = k_{ix}/k'_{1z}$), y $-a \leq y_p \leq a$. Los límites de integración en la dirección z son: $-d + c \leq z_p \leq -c$, indicando que las células no pueden penetrar las interfaces (ver Figura 5.1). Generalmente, es más común escribir la ecuación (5.27) en términos de la fracción de volumen f que ocupan las células, cuya determinación experimental es más fácil que la de ρ . La fracción de volumen está relacionada con la densidad en número de células ρ como sigue:

$$\rho = \frac{(V_T/V)}{V_p} f, \quad (5.28)$$

donde V_p es el volumen de una sola célula y V_T es el volumen de toda la película de tejido biológico, con $\frac{V_T}{V} = \frac{d}{d-2c}$. Tomando el límite $d \rightarrow 2c$ en la ecuación (5.27), la integral en z_p se resuelve analíticamente y da $(d - 2c)$, y se llega a la fórmula equivalente para una monocapa,

coincidiendo con el resultado de la referencia [18].

En lo adelante, nos referiremos a la aproximación para la reflectancia coherente R_{coh} , que resulta de usar las ecuaciones (5.19) y (5.27), como el Modelo de Esparcimiento Coherente (CSM, por sus siglas en inglés) basado en ADA.

5.1.2. Comparación con modelos de medio efectivo conocidos

Debido a que el CSM basado en ADA no es propiamente un modelo de medio efectivo (MME), resulta interesante compararlo con modelos de medio efectivo conocidos. En este caso, usaremos dos MME: van de Hulst y Promedio volumétrico. Un MME homogeneiza las propiedades locales (que microscópicamente pueden variar) mediante la definición de un índice de refracción (IR) efectivo macroscópico. Dicha homogeneización incurre en algunas fallas, particularmente cerca de las interfaces. Con esta comparación también buscamos entender bajo qué condiciones sería correcto usar un MME para estudiar ópticamente una película de tejido biológico.

Consideraremos una película de tejido, de espesor $d = 7.6\mu\text{m}$, confinada entre dos medios semi-infinitos y homogéneos: vidrio ($n_0 \approx 1.52$) y aire ($n_2 \approx 1.00$), en una configuración de reflexión interna. Para la película de tejido, supongamos una suspensión de células esféricas llenas de una solución isotónica de hemoglobina (Hb), usando una concentración similar a la de los eritrocitos sanos en la sangre humana, con 340 g/L de Hb [26]. La solución en el interior de las células tiene un IR complejo debido a las propiedades de absorción de la Hb, siendo la parte real $n'_p \approx 1.42$ para el intervalo visible de longitudes de onda y para la concentración de Hb dado anteriormente [18, 68, 69]. La comparación se efectuó para tres longitudes de onda distintas, $\lambda = \{690 \text{ nm}, 515 \text{ nm}, 415 \text{ nm}\}$, corresponden a regiones diferentes del espectro de absorción de la Hb. Entonces se usó $n_p = 1.42 + in''_p$, donde la parte imaginaria tiene una fuerte dependencia con λ [69]. Es bien conocido que la forma exacta de un eritrocito es la de un disco bicóncavo; sin embargo, al considerarlos esféricos se simplifican los cálculos sin modificar los objetivos de la comparación entre los modelos teóricos. Las células fueron consideradas como esferas equivalentes de $95\mu\text{m}^3$ de volumen [26] y radio $a = 2.8\mu\text{m}$ [9, 70]. El medio matriz o medio extracelular se consideró con IR constante $n_1 = 1.35$, similar al del plasma en la sangre [9, 68, 71].

El MME del Promedio volumétrico consiste en sumar los índices de refracción de los medios intra y extracelular, pesados por su fracción de volumen [72], obteniéndose un IR efectivo dado por la siguiente expresión:

$$n_{ef}^{PV} = n_1(1 - f) + n_p f, \quad (5.29)$$

donde f es la fracción de volumen de las células. En el MME de van de Hulst, el IR efectivo está dado por la siguiente expresión:

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

$$n_{ef}^{vdH} = n_1 \left(1 + i \frac{3}{2} f \frac{S(0)}{(k_p a)^3} \right), \quad (5.30)$$

donde $S(0)$ es la amplitud de esparcimiento en la dirección de incidencia de una célula aislada. Cualquiera de estas dos expresiones, (5.29) y (5.30), puede usarse para calcular la reflectividad de un sistema de tres medios, como si estos fueran medios homogéneos. La teoría de Fresnel proporciona una fórmula para la reflectividad de este tipo de sistemas, que nosotros modificamos para obtener la reflectividad R sin interferencia por las múltiples reflexiones en la película delgada, usando las mismas consideraciones que se tuvieron en cuenta para llegar a la ecuación (5.19). Se obtiene lo siguiente:

$$R = \frac{R_{0ef} + R_{ef2} |e^{2ik_{efz}d}|^2 \left(1 - 2\text{Re} \left(r_{0ef}^2 \right) \right)}{1 - R_{0ef} R_{ef2} |e^{2ik_{efz}d}|^2}, \quad (5.31)$$

donde r_{0ef} es el coeficiente de reflexión de Fresnel de la primera interfaz, que separa la película de biotejido efectivo y el medio de incidencia; R_{0ef} y R_{ef2} son las reflectividades correspondientes de la interfaz mencionada y de la otra entre la película efectiva y el medio externo (aire), respectivamente; y $k_{efz} = \sqrt{n_{ef}^2 - n_0^2 \sin^2 \theta_i}$, donde n_{ef} es n_{ef}^{PV} en la ecuación (5.29), o n_{ef}^{vdH} en la ecuación (5.30).

En la Figura 5.2, se muestran las gráficas de la reflectividad como función del ángulo de incidencia, calculadas con los dos modelos de medio efectivo y con el CSM basado en ADA, con los parámetros escogidos y para los tres valores de λ mencionados anteriormente. Todas las curvas tienen un ángulo crítico cerca de 41° debido a la reflexión total interna con el aire.

Si la película de tejido biológico fuera un medio sin atenuación, ya sea por absorción o esparcimiento, la reflectividad debería valer 1 después del ángulo crítico con el aire. De hecho, este comportamiento puede verse en la curva correspondiente al MME del Promedio volumétrico (curva azul discontinua), para $\lambda = 690$ nm, en la Figura 5.2(a). En el MME del Promedio volumétrico, la atenuación surge solo si hay absorción en alguno de los medios combinados en la fórmula (5.29) (no incluye pérdidas por esparcimiento); en este caso ($\lambda = 690$ nm), las pérdidas producidas por la absorción de la Hb en el interior de las células son despreciables ($n_p''(\lambda) = 0.00002$), siendo prácticamente cero la parte imaginaria de la ecuación (5.29) ($\text{Im} \left(n_{ef}^{PV}(\lambda) \right) = 1.16 \times 10^{-6}$). Por otra parte, tanto el MME de van de Hulst como el CSM basado en ADA predicen una reflectividad menor que 1 (≈ 0.4) en el ángulo crítico con el aire, y que luego continúa decreciendo, para mayores ángulos de incidencia, hasta llegar al ángulo crítico entre el medio de incidencia y la película de biotejido (cerca de 62°). Las diferencias con el MME del Promedio volumétrico son bastante notables. La parte imaginaria del IR efectivo del MME de van de Hulst, calculado con la ecuación (5.30), es $\text{Im} \left(n_{ef}^{vdH}(\lambda) \right) = 0.0023$.

En la Figura 5.2(b) podemos observar nuevamente un comportamiento similar entre el MME

5.1. Modelo de esparcimiento coherente basado en la ADA

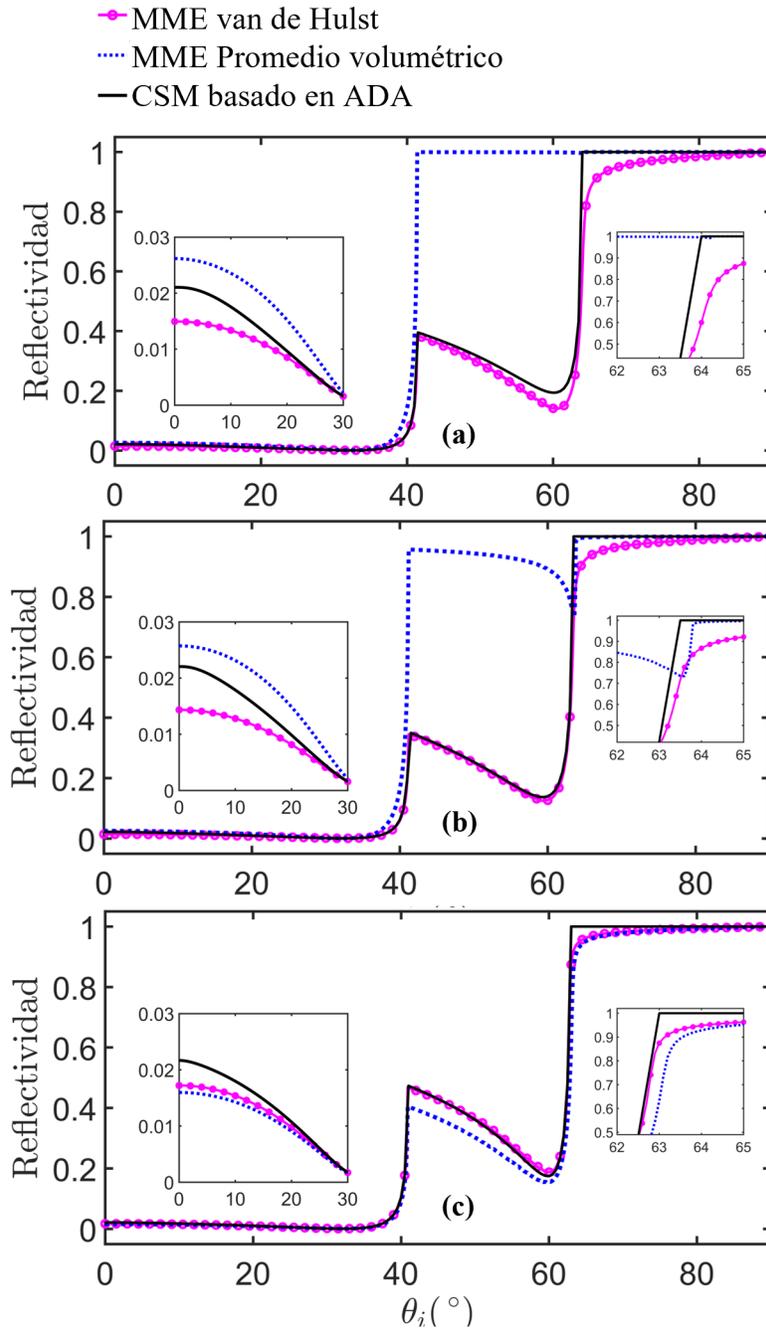


Figura 5.2: Comparación entre dos modelos de medio efectivo simples y el CSM basado en ADA, para una suspensión de células esféricas con una solución de hemoglobina en su interior. Gráficas de la reflectividad interna como función del ángulo de incidencia para tres longitudes de onda distintas: (a) $\lambda = 690$ nm, (b) $\lambda = 515$ nm, (c) $\lambda = 415$ nm, que corresponden a diferentes zonas del espectro de absorción de la hemoglobina.

de van de Hulst y el CSM basado en ADA. Las pérdidas por absorción son mayores para esta longitud de onda ($\lambda = 515$ nm, $n_p''(\lambda) = 0.0014$), por lo que se puede apreciar que la re-

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

reflectividad es menor que 1 entre los ángulos críticos para el MME del Promedio volumétrico. Sin embargo, dada su notable discrepancia con los otros dos modelos, podemos decir que aún dominan las pérdidas por esparcimiento. En este caso, la parte imaginaria del IR efectivo del Promedio volumétrico y de van de Hulst son, respectivamente, $\text{Im}\left(n_{ef}^{PV}(\lambda)\right) = 0.0001$ y $\text{Im}\left(n_{ef}^{vdH}(\lambda)\right) = 0.0019$.

En la Figura 5.2(c), la longitud de onda utilizada es $\lambda = 415$ nm y las pérdidas por absorción debido a la Hb son mucho mayores ($n_p''(\lambda) = 0.023$), porque la Hb tiene un pico de absorción en esta λ . Podemos ver, que en este caso, el MME del Promedio volumétrico está mucho más cerca de la predicción de los otros dos modelos. Esto significa que en este ejemplo, las pérdidas por absorción son más importantes; sin embargo, el MME del Promedio volumétrico sobrestima dichas pérdidas. En este ejemplo, la parte imaginaria del IR efectivo que predicen ambos MME están en el mismo orden de magnitud, $\text{Im}\left(n_{ef}^{PV}(\lambda)\right) = 0.0013$ y $\text{Im}\left(n_{ef}^{vdH}(\lambda)\right) = 0.0011$.

En los tres ejemplos mostrados en la Figura 5.2, el MME de van de Hulst (curva rosa con círculos) presenta una transición suave hacia la reflexión total interna después del segundo ángulo crítico, alcanzando $R = 1$ pocos grados después. Este comportamiento no se observa en el CSM basado en ADA, para ninguno de los valores de λ utilizados. A partir del segundo ángulo crítico, se espera que la reflectividad del sistema estudiado transite rápidamente a 1 (reflexión total interna), ya que después de ese ángulo de incidencia la onda transmitida a $z > -d$ es evanescente (penetrando unos pocos cientos de nanómetros en la película de biotejido o menos, dependiendo del valor de θ_i). Además de que las células son grandes comparadas a la longitud de onda, por lo cual prácticamente no esparcen luz hacia el semiespacio de reflexión y podemos concluir que el MME de van de Hulst exagera las pérdidas después del segundo ángulo crítico.

Por otra parte, es sorprendente la coincidencia entre el MME de van de Hulst y el CSM basado en ADA en la región entre los dos ángulos críticos. Esto significa que podemos usar el MME de van de Hulst para modelar la reflectividad de la película de biotejido en este intervalo de ángulos, el cual delimita la región de la curva que aporta mayor información sobre la microestructura de la película inhomogénea. Este es un resultado importante, considerando que los cálculos usando un MME son más simples y rápidos computacionalmente. Sin embargo, debemos notar que para ángulos bajos el MME de van de Hulst subestima, en todos los casos, la reflectividad de la película de biotejido (ver Figura 5.2). Mientras que el MME del Promedio volumétrico no es una buena opción para modelar la reflectividad de la película confinada, por la ausencia de una contribución del esparcimiento, excepto en el ejemplo de la Figura 5.2(c) donde aparentemente domina la absorción.

5.1.3. Efecto del cubreobjetos

Usualmente, la película de tejido biológico está confinada entre la superficie plana de un prisma y un sustrato de vidrio (o un cubreobjetos), paralelos entre sí. Específicamente, cuando trabajamos con una muestra líquida como una suspensión de células, el confinamiento se logra colocando una gota de la suspensión sobre el cubreobjetos y presionando éste cuidadosamente sobre la superficie del prisma, hasta que la suspensión llene todo el espacio entre ambas superficies. Este es el caso de todas nuestras mediciones experimentales, presentadas en la siguiente sección 5.2. La reflexión de la onda coherente no es en una simple interfaz con el aire, sino en un sustrato de espesor finito. De hecho, el espesor d_s del sustrato de vidrio es generalmente mayor que el espesor de la película de tejido biológico bajo estudio (ver Figura E.1 en el apéndice E).

El coeficiente de reflexión coherente del sistema difiere del dado en la ecuación (5.17), cuando se coloca el cubreobjetos como soporte de la película de tejido. En este caso, el promedio del retraso en fase introducido por las células $\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle$ se separa en el producto $\langle e^{i\Delta_+} \rangle \langle e^{i\Delta_-} \rangle$, donde Δ_+ y Δ_- son los retrasos en fase sobre los caminos L_+ y L_- , respectivamente. La razón para esto es que los retrasos en fase sobre L_+ y L_- no están correlacionados, en general, excepto para ángulos de incidencia muy pequeños. Esto se debe al ancho del cubreobjetos, que es mucho mayor que las dimensiones de las células. Para ángulos de incidencia no tan pequeños (menores que el segundo ángulo crítico), las reflexiones consecutivas dentro del cubreobjetos se separan lateralmente una distancia considerable en comparación a las dimensiones de las células. Por lo tanto, un “rayo” de luz dado no puede atravesar la misma célula más de una vez. Una discusión más detallada se puede encontrar en el apéndice E.

El coeficiente de reflexión coherente modificado por la presencia del sustrato de vidrio está dado por:

$$r_{coh} = \frac{r_{01} + r_{1s2} e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta_+} \rangle \langle e^{i\Delta_-} \rangle}{1 + r_{01} r_{1s2} e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta_+} \rangle \langle e^{i\Delta_-} \rangle}, \quad (5.32)$$

donde $r_{1s2} = \frac{r_{1s} + r_{s2} e^{2ik_2z d_s}}{1 + r_{1s} r_{s2} e^{2ik_2z d_s}}$. Aquí r_{1s} y r_{s2} son los coeficientes de reflexión de Fresnel en las interfaces entre el medio 1 y el cubreobjetos, y entre el cubreobjetos y el medio 2, respectivamente.

Finalmente, quitaremos la interferencia entre las múltiples reflexiones dentro de la película de biotejido y el cubreobjetos, mediante la suma de intensidades ópticas en vez de los campos, justo como en la ecuación (5.19). En este caso, tenemos que la reflectancia coherente de la película de biotejido, confinada usando un cubreobjetos, es:

$$R_{coh} = \frac{R_{01} + R_{1s2} |e^{2ik_1z d}|^2 |\langle e^{i\Delta_+} \rangle|^2 |\langle e^{i\Delta_-} \rangle|^2 (1 - 2\text{Re}(r_{01}^2))}{1 - R_{01} R_{1s2} |e^{2ik_1z d}|^2 |\langle e^{i\Delta_+} \rangle|^2 |\langle e^{i\Delta_-} \rangle|^2}, \quad (5.33)$$

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

donde $R_{1s2} = \frac{R_{1s} + R_{s2} - 2\text{Re}(r_{1s}^2)R_{s2}}{1 - R_{1s}R_{s2}}$, donde $R_{1s} = |r_{1s}|^2$ y $R_{s2} = |r_{s2}|^2$ y $\text{Re}(r_{1s}^2)$ es la parte real del cuadrado de r_{1s} .

La Figura 5.3 muestra la comparación entre dos curvas teóricas de reflectancia coherente R_{coh} como función del ángulo de incidencia, usando en un caso la ecuación (5.19) (curva negra continua) y en el otro la ecuación (5.33) (curva roja discontinua), para mostrar la influencia del cubreobjetos. Ambas curvas se calcularon utilizando el mismo conjunto de parámetros para la película de biotejido: $d = 4.4\mu\text{m}$, $f = 0.14$, $n_p = 1.42 + i0.0014$ y $n_1 = 1.35$. Aunque no se observaron exactamente las mismas diferencias para otros conjuntos de parámetros (ni en magnitud, ni en posición angular), este ejemplo demuestra que en algunos casos la corrección que introduce la ecuación (5.33) no es para nada despreciable. Dicha corrección, solo es importante antes del segundo ángulo crítico, ya que para ángulos mayores toda la luz se refleja en la primera interfaz y no llega al cubreobjetos.

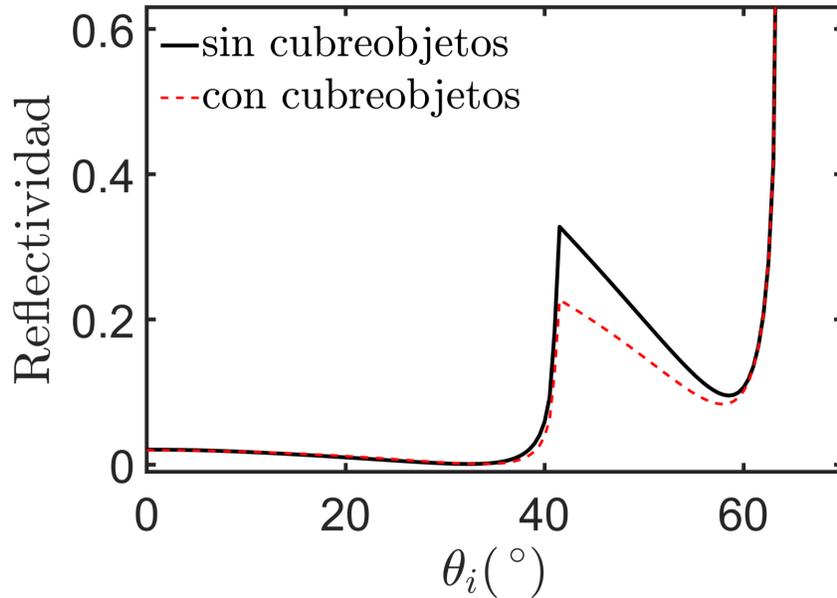


Figura 5.3: Comparación entre dos curvas de reflectancia coherente como función del ángulo de incidencia, calculadas con el CSM basado en ADA y usando el mismo conjunto de parámetros, en un caso considerando la interfaz simple n_1/n_2 (sin cubreobjetos) y en el otro caso una interfaz compuesta $n_1/n_s/n_2$ (con cubreobjetos).

5.2. Resultados

5.2.1. Sensibilidad del modelo a los parámetros de la microestructura

En la Figura 5.4 se muestran varias gráficas, calculadas usando el CSM basado en ADA, para identificar qué zonas de la curva de reflectividad como función del ángulo de incidencia son más

sensibles a los parámetros del modelo. Usamos la ecuación (5.33) para calcular la reflectancia coherente del sistema (ver Figura 5.1), asumiendo que $n_s = n_0 = 1.52$ y que $n_2 = 1.0$. Se asume que la película de tejido biológico es una suspensión de células, con IR complejo, como si estuviesen llenas de una suspensión de hemoglobina. En todos los casos, el volumen de cada célula se fijó en el valor reportado en la literatura para el volumen corpuscular medio de un eritrocito (o glóbulo rojo de la sangre), que es $V_p = 95 \mu\text{m}^3$ [26, 70, 73]. Seleccionamos cuatro parámetros a variar en la microestructura de la película de biotejido. En la Figura 5.4(a) variamos la elipticidad de las células, definida como $A = 1 - c/a$, considerando que son esferoides oblatos con semiejes a y c ($c < a$). En las partes (b), (c) y (d) de la Figura 5.4, se asumen células esféricas ($a = c = 2.8 \mu\text{m}$) de volumen equivalente igual a $V_p = 95 \mu\text{m}^3$, y variando, respectivamente, la fracción de volumen de las células f , la concentración de Hb dentro de las células y el IR del medio extracelular n_1 . Para cada parámetro se presentan cuatro curvas, que corresponden a cuatro valores del parámetro bajo estudio y manteniendo constantes todas las demás variables del sistema. En todos los casos se consideran valores de los parámetros dentro de los intervalos fisiológicos reportados para los eritrocitos de la sangre.

De la manera en que se definió la elipticidad A puede ir desde cero, cuando tenemos ($a = c$), hasta cerca de 1 para $a \gg c$. La Figura 5.4(a) ilustra el cambio de la pendiente de la curva en la región entre los ángulos críticos (de 41.14° a 62.7°), al cambiar la elipticidad de las células; en este caso se usó $f = 0.058$, $n_p = 1.42 + i0.0014$ y $n_1 = 1.36$. Por otro lado, la Figura 5.4(b) muestra que el incremento de la fracción de volumen f disminuye significativamente la altura de la parte central de la curva y, en menor medida, en la zona de ángulos bajos; es decir, que aumenta la opacidad de la película de biotejido (se calculó con $n_p = 1.42 + i0.0014$ y $n_1 = 1.36$). En la Figura 5.4(c) las partes real e imaginaria de n_p cambian en correspondencia con la variación de la concentración de Hb dentro de las células ($n_{p1} = 1.386 + i0.00078$, $n_{p2} = 1.394 + i0.00091$, $n_{p3} = 1.402 + i0.001$ y $n_{p4} = 1.425 + i0.0014$). Se escogieron los siguientes valores de concentración de Hb: 260 g/L, 300 g/L, 340 g/L y 460 g/L, distribuidos alrededor del valor normal reportado para eritrocitos humanos (340 g/L) [68–70, 73, 74], usando $\lambda = 515 \text{ nm}$, $f = 0.058$ y $n_1 = 1.36$. Podemos apreciar que la porción central de la curva cae con el aumento de la concentración de Hb, lo que significa que la luz se extingue más rápido en el interior de la película de tejido biológico (mayor opacidad); sin embargo, en este caso la pendiente de la curva prácticamente no se modifica.

Finalmente, en la Figura 5.4(d) se ilustra el efecto sobre la curva de reflectividad, al cambiar el IR del medio extracelular n_1 . El valor de n_1 se varió alrededor del valor promedio del IR del plasma sanguíneo en humanos, que es 1.351, y usando $f = 0.058$ y $n_p = 1.42 + i0.0014$. El efecto es distinguible de la variación de otros parámetros, debido a un claro desplazamiento del segundo ángulo crítico. Este caso puede darse en circunstancias reales, por ejemplo, en presencia de hemólisis o de coagulación [37, 75].

A partir de los cálculos realizados podemos resumir que la configuración de reflexión interna

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

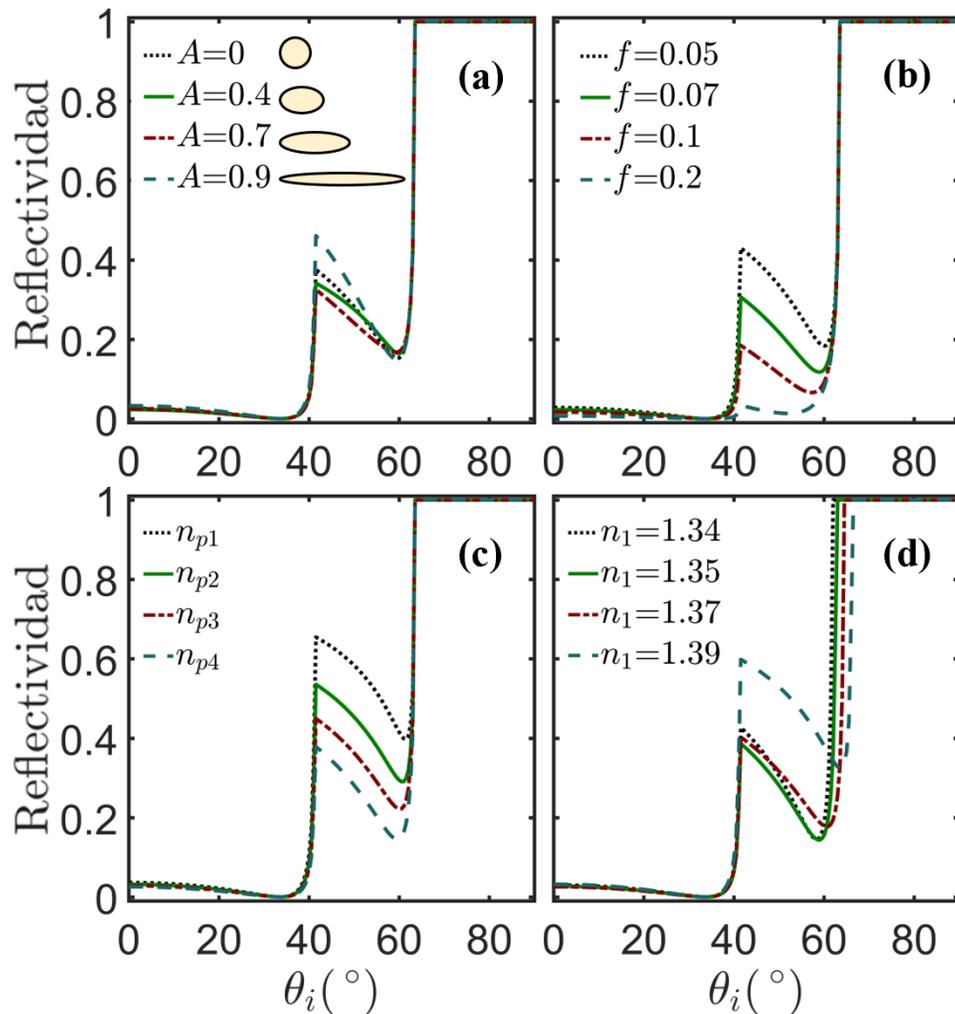


Figura 5.4: Sensibilidad de la curva de reflectividad como función del ángulo de incidencia para cuatro parámetros representativos en la microestructura de la película de biotejido, fijando el volumen de las células en $95\mu\text{m}$. (a) Se asume que las células son esferoides oblatos y se varía la elipticidad A entre 0 y 0.9. Todos los demás ejemplos asumen células esféricas. En (b) se varía la fracción de volumen f entre 5% y 20%. En (c) se varía el contenido de hemoglobina en el interior de las células, resultando en la variación del IR n_p y manteniendo constantes los demás parámetros. En (d) se varía el IR del medio matriz n_1 entre 1.34 y 1.39. Todos los ejemplos fueron calculados utilizando $d = 7\mu\text{m}$, $n_0 = n_s = 1.52$ y $n_2 = 1.0$.

es ideal para explorar ópticamente una película de tejido biológico confinada, y el CSM basado en ADA muestra que la reflectividad entre los ángulos críticos es muy sensible a cambios en los parámetros de la microestructura de la película bajo estudio.

5.2.2. Metodología experimental

Para medir la curva de reflectividad como función del ángulo de incidencia usamos un prisma semicircular de vidrio (BK7, $n_0 = 1.52$), montado de manera concéntrica sobre un sistema de goniómetros cuyo movimiento está automatizado. Un haz de luz proveniente de un diodo láser (con longitud de onda $\lambda = 515\text{nm}$ y potencia de salida de 50 mW) entra de manera radial al prisma, se refleja en su base y sale nuevamente de manera radial como se representa en la Figura 5.5. Se utiliza un fotodetector de Si (con una superficie activa circular de 9.5 mm de radio), montado sobre un brazo rotatorio, para capturar el haz reflejado en la dirección especular. Para obtener las curvas de reflectividad como función del ángulo de incidencia, se rota el prisma a velocidad constante y el brazo del fotodetector rota a una velocidad dos veces mayor; a la vez, la señal del fotodetector se registra cada fracción de segundo. Este sistema puede medir la curva de reflectividad en un intervalo angular amplio (entre 10° y 80°), con resolución de 0.2° . La curva de reflectividad como función del ángulo de incidencia sin muestra (interfaz BK7/aire) se utiliza como referencia para construir la escala angular y también para normalizar la potencia de la luz reflejada medida por el fotodetector. En el arreglo experimental se utiliza una lente convergente que ayuda a corregir los errores de alineación, garantizando que el *spot* de luz reflejada coherentemente caiga siempre sobre el área activa del fotodetector, el cual se coloca cercano al plano focal de la lente.

Como modelo experimental para la película de biotejido, usamos pequeñas cantidades de sangre humana completa (sin diluir) confinada entre un cubreobjetos y la base del prisma. Las muestras de sangre se obtuvieron directamente haciendo una punción en el dedo de un voluntario en nuestro laboratorio. Las películas de biotejido se formaron depositando una gota de sangre fresca sobre el cubreobjetos y presionando éste suavemente contra la cara plana del prisma. La sangre se expande llenando el área cuadrada del cubreobjetos ($\approx 4\text{ cm}^2$) y formando la película confinada. Para obtener una estimación del espesor d de la película, pesamos la gota de sangre (previo a la medición) y calculamos su volumen, utilizando la densidad másica promedio de la sangre completa ($\approx 1.07\text{ g/cm}^3$ [76]). El espesor d de la película de sangre se calcula dividiendo el volumen de la gota entre el área del cubreobjetos. El procedimiento completo, desde la extracción de la gota de sangre, pesarla, formar la película confinada y medir su reflectividad, no toma más de 4 minutos. Por tanto, podemos asegurar que en este intervalo de tiempo aún no ha tenido lugar la coagulación de la sangre [26].

Como comentamos en la sección 5.1, debido a las características del esparcimiento por parte de la película de tejido bajo estudio tendremos una cantidad significativa de luz difusa distribuida alrededor de la componente coherente, muy cerca de la dirección de reflexión especular por el gran tamaño de los esparcidores (células) con respecto a la longitud de onda y por el bajo contraste de índices de refracción. Una gran parte de la luz difusa puede entrar al fotodetector, causando una medición errónea de la reflectancia coherente (ver foto en la Figura 5.5(a)). Para aislar la reflectancia coherente de la difusa, se coloca un iris (o diafragma) justo en frente del fotodetector bloqueando la mayor cantidad posible de luz difusa. Sin este iris, el ángulo de de-

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

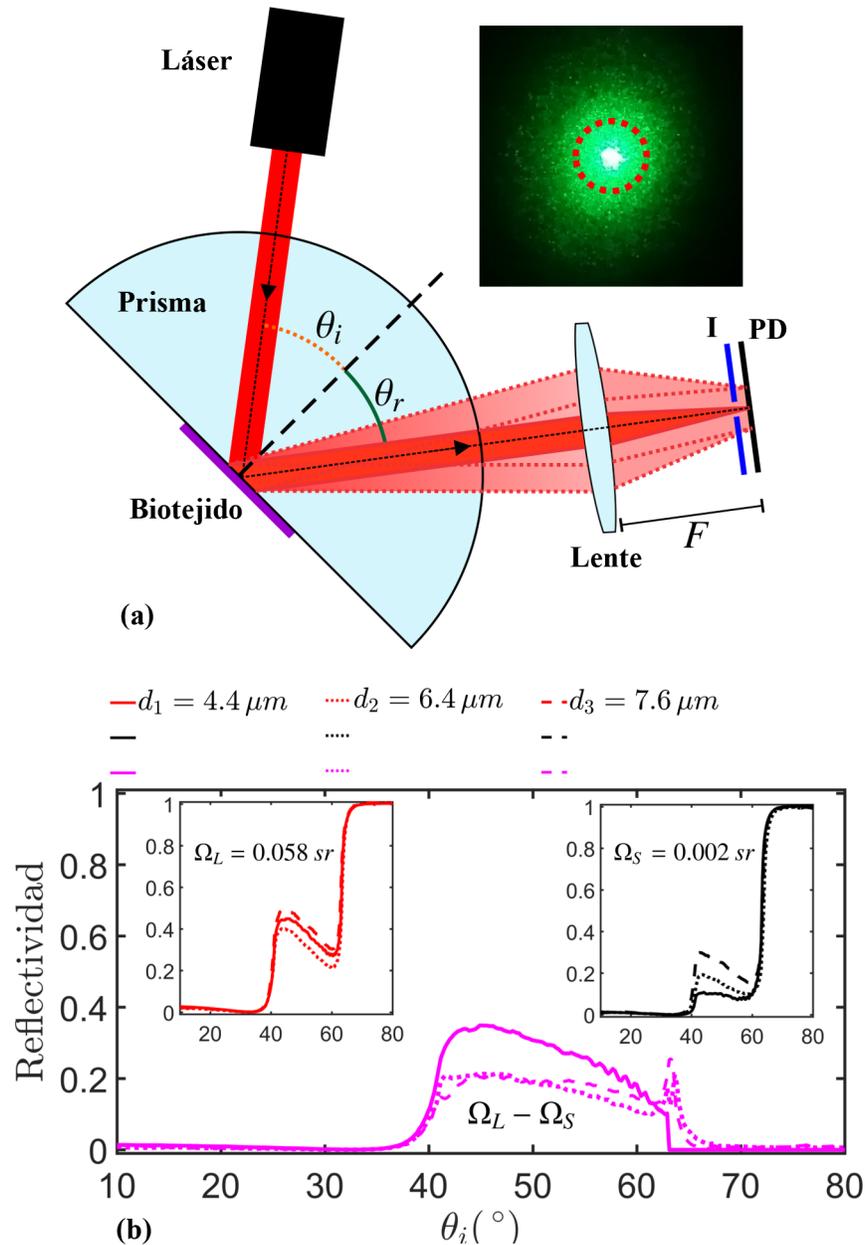


Figura 5.5: (a) Esquema del arreglo experimental usado para medir la reflectividad de una película confinada de biotejido en configuración de reflexión interna. En la foto a la derecha, se muestra el patrón de moteado observado típicamente en el plano de detección (PD), en el cual están mezcladas luz coherente y difusa. Se coloca un iris (I) delante del fotodetector, para reducir la cantidad de luz difusa detectada. (b) Curvas experimentales de reflectividad como función del ángulo de incidencia tomadas usando el iris ($\Omega_S = 0.002 \text{ sr}$), sin el iris ($\Omega_L = 0.058 \text{ sr}$), y la diferencia. Las curvas corresponden a tres muestras diferentes de sangre completa. El espesor de la película confinada en cada caso se indica en la leyenda.

tección es $\Omega_L = 0.058$ sr. Utilizando el iris, y ajustándolo para dejar pasar sólo la luz reflejada coherentemente, el ángulo sólido se reduce a $\Omega_S = 0.002$ sr. Nótese que al usar Ω_S en lugar de Ω_L la apertura de detección se reduce en un 97 %, representado por la luz que se queda fuera del círculo rojo punteado en la foto a la derecha de la Figura 5.5(a). Sin embargo, aunque se reduzca al mínimo posible la apertura de detección, siempre queda una pequeña cantidad de luz difusa que no se puede eliminar.

En la Figura 5.5(b) se muestran curvas de reflectancia como función del ángulo de incidencia para tres muestras diferentes de sangre completa, en forma de película confinada, medidas con el arreglo representado en la Figura 5.5(a). Las curvas rojas se obtuvieron usando $\Omega_L = 0.058$ sr; es decir, sin el iris (subfigura de la izquierda). Al colocar el iris delante del fotodetector (con $\Omega_S = 0.002$ sr) se obtuvieron las curvas negras (subfigura de la derecha), para las mismas tres películas de sangre que en el caso anterior. La diferencia en reflectancia entre cada curva roja y su correspondiente curva negra se muestra en la gráfica principal de la Figura 5.5(b) (curvas de color rosa). Los espesores estimados para cada una de las muestras de película de biotejido son $4.4\mu\text{m}$, $6.4\mu\text{m}$ y $7.6\mu\text{m}$.

A partir de los resultados en la Figura 5.5(b) podemos estimar el error en la medición de reflectancia coherente de películas de sangre, con el arreglo experimental utilizado. Las curvas de la diferencia en reflectancia, mostradas en la Figura 5.5(b), nos indican el orden de magnitud de la intensidad de luz difusa que entra al fotodetector cuando ángulo de apertura es Ω_L . Si suponemos que la luz difusa está distribuida uniformemente sobre este ángulo de apertura Ω_L , entonces la luz difusa remanente, al reducir el ángulo de detección a Ω_S , tiene una contribución en la reflectividad medida del orden del 3 % de las curvas de la diferencia en la Figura 5.5(b). El máximo en intensidad de dichas curvas es aproximadamente 0.2, así que la contribución de la luz difusa a la reflectividad medida con Ω_S es 0.006. Justo después del primer ángulo crítico, la reflectividad medida con Ω_S es 0.3. Entonces la contribución de la luz difusa, para dicha lectura, equivale al 2 % de su valor. Por lo tanto, para la curva negra discontinua estimamos que el error en la medición de la reflectancia coherente es $\leq 2\%$, a lo largo de todo el intervalo de ángulos de incidencia. Para las otras dos curvas, la punteada y la continua (de color negro) el error estimado es del 3 % y del 10 %, respectivamente. Mientras menor es el valor de la reflectancia coherente, mayor será el error relativo que se comete en su medición debido a la luz difusa mezclada con el haz coherente reflejado. Dichos errores son suficientemente pequeños para justificar la comparación de curvas experimentales con nuestro modelo teórico.

5.2.3. Comparación con curvas experimentales

En este apartado, compararemos el CSM basado en ADA con curvas experimentales de reflectividad como función del ángulo de incidencia para películas delgadas de sangre. Nuestro principal objetivo es mostrar la posibilidad de extraer información de la microestructura de la película de biotejido, mediante el ajuste de los parámetros del modelo; específicamente,

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

la fracción de volumen f , el IR del medio matriz n_1 , el IR del medio intracelular n_p y la elipticidad de las células A . La fracción de volumen de eritrocitos en la película de sangre, en la región iluminada por el láser, no necesariamente debe coincidir con el valor reportado para una muestra de sangre completa de una persona sana ($f = 50\%$). Inspeccionamos varias películas delgadas de sangre (formadas con la metodología descrita) utilizando un microscopio óptico y observamos que la fracción de volumen de los eritrocitos variaba considerablemente en la región central de la película, concentrándose principalmente en los bordes de la muestra y resultando en una densidad de eritrocitos desconocida bajo el área iluminada (ver la Figura 5.6).

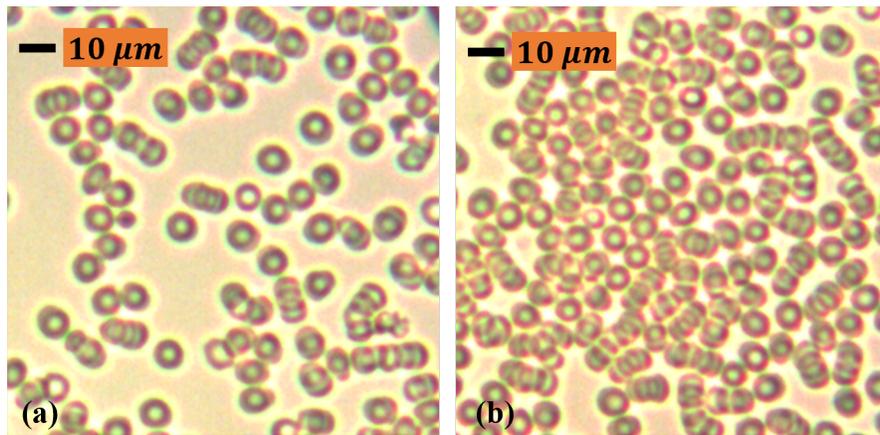


Figura 5.6: Imágenes de microscopía óptica de una película delgada de sangre entera, confinada entre un portaobjetos y un cubreobjetos. (a) y (b) corresponden a diferentes zonas de una misma muestra, indicando la variabilidad de la densidad en número de células (y por tanto, de la fracción de volumen).

En la Figura 5.7, se muestran los datos experimentales (curvas verdes con símbolos cuadrados) y ajustes teóricos para las tres muestras de película delgada de sangre completa presentadas en la Figura 5.5(b). En todas las gráficas de la Figura 5.7 aparece la curva de reflectividad correspondiente a la interfaz prisma/aire, que se usa como referencia experimental (curva azul discontinua y punteada). Los ajustes del modelo teórico a las curvas experimentales se realizaron como se explica a continuación.

Para comenzar, asumimos eritrocitos con volumen $V_p = 95\mu\text{m}^3$ y elipticidad nula $A = 0$ (células esféricas) y, en cada caso, se ajustó el valor de la fracción de volumen f de manera que la curva teórica reprodujera los datos experimentales, garantizando la mejor coincidencia posible, principalmente en la zona cercana al primer ángulo crítico (41.1° , que corresponde a la interfaz BK7/aire) y anterior a éste (región de ángulos bajos). Luego se aumentó gradualmente la elipticidad hasta lograr reproducir la pendiente de la curva experimental en la región entre los dos ángulos críticos. Seguido de esto, se ajustó el IR extracelular n_1 para coincidir con la posición del segundo ángulo crítico, marcada por la pendiente casi infinita de la curva de reflectividad cerca de 62° . Durante todo el proceso de ajuste se mantuvo constante el IR del interior de las células en $n_p = 1.42 + i0.0014$, que corresponde al IR de los eritrocitos para

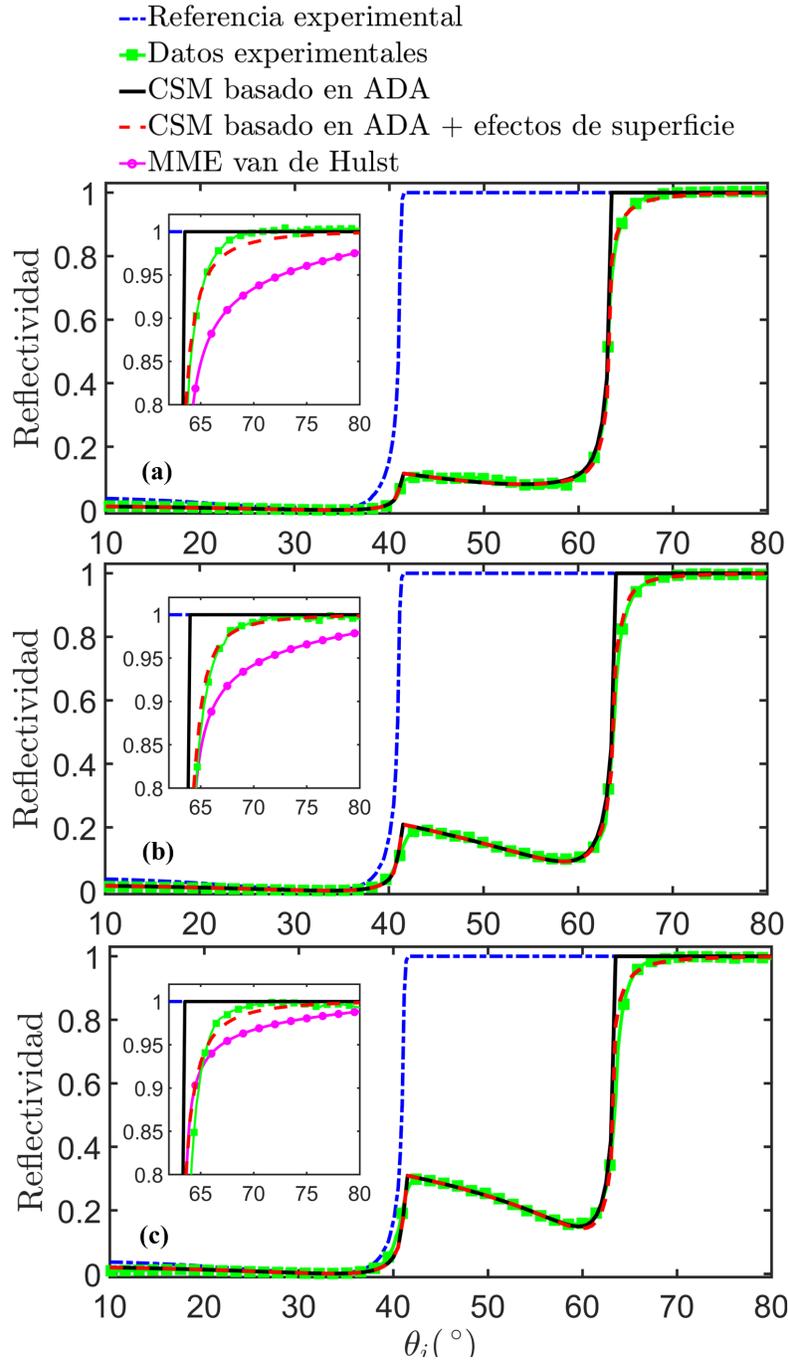


Figura 5.7: Comparación entre curvas experimentales de reflectividad interna como función del ángulo de incidencia, y el CSM basado en ADA para tres muestras diferentes de película confinada de sangre completa. Los espesores estimados para cada película de biotejido son: (a) $d = (4.4\mu\text{m} \pm 4\%)$, (b) $d = (6.4\mu\text{m} \pm 4\%)$ y (c) $d = (7.6\mu\text{m} \pm 4\%)$. Los demás parámetros del modelo se ajustaron, manteniendo constante el volumen de cada célula en $V_p = 95\mu\text{m}^3$. El CSM basado en ADA se calculó también suponiendo células en contacto óptico con el prisma.

5. Modelado y medición de la reflectividad óptica interna de una película delgada de tejido biológico

una longitud de onda de trabajo $\lambda = 515$ nm y para la concentración promedio de hemoglobina en una persona sana, 340 g/L [26]. Posteriormente, fuimos realizando pequeñas variaciones al valor de n_p , alrededor de su valor inicial, para mejorar el ajuste general de la curva teórica a los datos experimentales antes del segundo ángulo crítico. Finalmente, para reproducir el ascenso gradual hacia la reflexión total interna, a partir del segundo ángulo crítico en las curvas experimentales, supusimos que algunas células, o restos de ellas, se adhieren a la primera interfaz (en $z = -d$) por atracción electrostática, acumulándose en forma de islas sobre la cara plana del prisma (realizando contacto óptico) y cubriendo una fracción Θ_q de esta superficie. Bajo dicha suposición, podemos aplicar el modelo de reflectancia superficial, desarrollado en el capítulo 4, los detalles de su aplicación en este caso se discuten en el apéndice F. Los parámetros ajustados en este caso fueron la fracción de área cubierta Θ_q por las islas de biomaterial, el IR n_q de la biopelícula delgada efectiva formada por dichas islas y el espesor h_q de esta película efectiva. Debemos destacar que el efecto de la variación de estos últimos parámetros está muy localizado entre 62° y 75° , y que no introduce prácticamente ninguna modificación en la forma de la curva antes del segundo ángulo crítico. Entonces dichos parámetros se pueden ajustar de manera independiente de los otros parámetros del CSM basado en ADA (f, A, V_p, d, n_1 y n_p). Los valores inferidos de los parámetros del modelo a partir del ajuste realizado fueron los siguientes: $f = 0.14 \pm 3.6\%$, $A = 0.69 \pm 1\%$ y $d = 4.4\mu\text{m} \pm 4\%$ en la Figura 5.7(a); $f = 0.10 \pm 5\%$, $A = 0.42 \pm 1\%$ y $d = 6.4\mu\text{m} \pm 4\%$ en la Figura 5.7(b); $f = 0.06 \pm 8\%$, $A = 0.42 \pm 1\%$ y $d = 7.6\mu\text{m} \pm 4\%$ en la Figura 5.7(c). Para los tres gráficos obtuvimos $n_1 \approx 1.36 \pm 0.2\%$ y $n_p = (1.42 \pm 0.7\%) + i(0.0014 \pm 3.6\%)$. Para la corrección por efectos de superficie aplicada al CSM basado en ADA en la interfaz prisma/muestra (curvas rojas punteadas), los parámetros ajustados fueron $n_q = 1.4 \pm 3.6\%$, $\Theta_q = 0.07 \pm 7\%$ y $h_q = 350$ nm $\pm 10\%$ en todos los casos.

5.3. Discusión

En general, el CSM basado en ADA muestra una excelente similitud con las curvas medidas de la reflectividad como función del ángulo de incidencia para películas delgadas de sangre. Al añadir las correcciones por efectos de superficie propuestas (discutidas en el apéndice F), se puede reproducir de mejor manera la tendencia de los datos experimentales después del segundo ángulo crítico, lográndose una excelente coincidencia con los datos medidos. Debemos resaltar que el MME de van de Hulst (calculado para células esféricas de volumen equivalente) también predice esta transición suavizada, pero exagerada, hacia la reflexión total interna (ver las subfiguras en la Figura 5.7). Sin embargo, no se justifica físicamente la utilización del MME de van de Hulst después del segundo ángulo crítico [11], ya que la luz no entra a la película a partir de dicho ángulo de incidencia.

Los valores ajustados para la fracción de volumen de los eritrocitos (14%, 10% y 6%, en ese orden) son considerablemente menores que el $\sim 50\%$ reportado para sangre entera. Como

se explicó anteriormente, la fracción de volumen local varía notablemente entre el centro y los bordes de las películas confinadas, como se muestra en la Figura 5.6.

Debido a que todas las curvas experimentales mostradas se obtuvieron utilizando muestras de sangre de la misma persona voluntaria, es lógico considerar a la dispersión observada en los valores de cualquiera de los parámetros ajustados, n_1 , A , n_p , como una estimación de la incertidumbre en la determinación de dichos parámetros. Por lo tanto, los valores a reportar en este caso son: $n_1 \approx 1.36 \pm 0.2\%$, $A = 0.51 \pm 30\%$ y $n_p \approx (1.42 \pm 0.7\%) + i(0.0014 \pm 3.6\%)$. Nótese que en los tres casos de la Figura 5.7 se ajustó una parte imaginaria $n_p'' = 0.0014$, cuya incertidumbre debe ser menor que 0.00005, la cual está contenida en el 3.6% estimado.

El IR n_1 del medio extracelular (plasma) es ligeramente mayor que el valor medio reportado en la literatura, de ~ 1.35 [9, 68, 71]. Una posible explicación es la presencia de un poco de hemoglobina en el medio extracelular, debido a la ruptura de la membrana de algunos eritrocitos por la misma manipulación de la sangre. La incertidumbre de la elipticidad es bastante grande (30%). Por un lado, debemos hablar de una elipticidad efectiva, ya que realmente los eritrocitos tienen una geometría más compleja que la de un esferoide; por otro lado, probablemente no todos los eritrocitos se encontraban orientados de manera horizontal al interior de la película confinada. También debemos remarcar que no se añadió anticoagulante a las muestras de sangre, así que durante las mediciones pudo haber comenzado la agregación y/o coagulación de las células.

A pesar de los errores e incertidumbres en la inferencia de los parámetros microestructurales de la película de biotejido, el hecho de que hayamos podido ajustar el modelo teórico a los datos experimentales soporta la idea de que la reflectividad óptica interna constituye un buen sensor para monitorear diferentes procesos, que involucren la variación de estos parámetros, en la película confinada.

El análisis combinado de los ajustes en la Figura 5.7 y del estudio teórico de la sensibilidad de la curva a los diferentes parámetros de la película biológica confinada (Figura 5.4), nos permite corroborar que la parte más importante de la curva de reflectividad interna como función del ángulo de incidencia, en este caso, es la región entre los dos ángulos críticos. Podemos ver que en esta zona está mezclada la información de la fracción de volumen de las células, la elipticidad y el IR de las mismas. Si quisieramos implementar un método más sencillo para monitorear en tiempo real algún proceso que introduzca cambios en estos parámetros de la película (sin tener que medir todo el intervalo angular), podemos medir la reflectividad en dos posiciones angulares fijas ($\theta_1 \approx 42.5^\circ$ y $\theta_2 \approx 56.5^\circ$), con lo cual podríamos tener información de la pendiente de la curva en esta zona. De la Figura 5.4(a) podemos ver que cuando varía la elipticidad se modificará la reflectividad solo cerca de θ_1 , sin mucha variación cerca de θ_2 ; mientras que, con el cambio de la fracción de volumen (Figura 5.4(b)) o del IR en el interior de las células (Figura 5.4(c)) variará la reflectividad en ambos puntos (θ_1 y θ_2), pero en el segundo

caso no habrá variación de la pendiente. Por otra parte, se puede medir de manera aislada (respecto a los demás parámetros) los cambios de IR en el medio extracelular, detectando el valor de la reflectividad cerca del segundo ángulo crítico, fijándonos en $\theta_3 \approx 61^\circ$ (Figura 5.4(d)). Por último, si hay células o material biológico en contacto con el prisma, podremos detectarlo si medimos un valor de reflectividad distinto de 1, después del segundo ángulo crítico (por ejemplo, fijando el ángulo de incidencia en $\theta_4 \approx 65^\circ$).

Conclusiones y perspectivas

- Se demostró la factibilidad de monitorear el proceso de hemólisis en una suspensión de eritrocitos sometidos a estrés osmótico en una solución hipotónica, midiendo en tiempo real el índice de refracción efectivo. El dispositivo utilizado se basa en la medición de la reflectividad interna de una interfaz vidrio-suspensión de eritrocitos, siendo capaz de determinar en tiempo real el cambio en el índice de refracción del medio extracelular, debido a la liberación de hemoglobina desde el interior de las células durante el proceso. Se determinó que la concentración de NaCl idónea para inducir y monitorear el proceso de hemólisis con nuestro dispositivo equivale al 20 % del valor isotónico. Se demostró que se pueden medir con bastante precisión (0.1 s) los tiempos que indican un avance del 30 %, 50 % o 70 % del proceso de hemólisis inducido, y que estos tiempos pueden usarse como una medida de la fragilidad osmótica de los eritrocitos. Nuestros resultados mostraron que la velocidad de la hemólisis es mayor para eritrocitos de sangre con anemia hemolítica que para eritrocitos sanos; es decir, que su fragilidad osmótica es mayor. Se encontró que la cinética de un proceso de hemólisis puede modelarse usando una o varias funciones exponenciales, lo cual es consistente con procesos de difusión simple subyacentes ocurriendo consecutivamente. La metodología y dispositivo propuestos resultan en una prueba más rápida, que brinda una mayor cantidad de información sobre la muestra de eritrocitos analizada, en contraste a la prueba de fragilidad osmótica que se realiza tradicionalmente en laboratorios clínicos. Este trabajo establece un precedente para el estudio de la cinética de procesos, en suspensiones celulares, donde ocurra un intercambio de material entre los medios intra y extracelular; por ejemplo, la absorción de algún medicamento hacia el interior de las células. La técnica propuesta también podría ser modificada para monitorear lisis de otro tipo de células (aparte de los eritrocitos) y bajo diferentes condiciones de estrés (osmótico, mecánico, o químico).
- Se derivaron dos expresiones matemáticas simples para la reflectancia coherente de superficie y la reflectancia total de superficie de una interfaz plana que presenta una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción, entre el medio de incidencia y un medio externo inhomogéneo. La simplicidad de los modelos desarrollados deriva de

6. Conclusiones y perspectivas

suponer que las inhomogeneidades en la interfaz son de dimensiones lineales mayores a la longitud de onda incidente. Este puede ser el caso de células biológicas o microgotas, en contacto óptico con un medio homogéneo, desde el cual se ilumina con luz visible. Una ventaja de estos modelos es que no se necesita especificar el tamaño ni la forma de las partículas en contacto con la interfaz, ya que solo dependen de los índices de refracción de dichas partículas y del medio externo, así como de la fracción de área de contacto cubierta por cada tipo de inhomogeneidad presente. Mediante la comparación del modelo de reflectancia coherente superficial con simulaciones numéricas, se probó que, en una configuración de reflexión interna y para tamaños de las inhomogeneidades mayores o iguales a $5\mu\text{m}$, los modelos tienen una exactitud de 0.001 para ángulos de incidencia bajos y de 0.02 para ángulos altos. Cerca de los ángulos críticos la exactitud de los modelos aumenta cuando tenemos mayores dimensiones de las áreas de contacto, a pesar de mantenerse constante la fracción de área que representan. Aunque los modelos son aplicables tanto a reflexión interna como a externa, en la primera es más directa la determinación de los índices de refracción de las sustancias que están en contacto con la interfaz. Se propuso un modelo que combina linealmente las contribuciones de la reflectancia coherente e incoherente en la superficie, resultando más útil en la práctica para comparar con mediciones de reflectividad, ya que la luz esparcida por este tipo de partículas se concentra cerca de la dirección de incidencia. El modelo combinado incluye un parámetro empírico, cuyo valor es menor o igual que 1, que indica la fracción de luz difusa que logra capturar el fotodetector utilizado en el experimento para medir la reflectividad. Se mostró un ejemplo de aplicación experimental, donde se obtuvieron los índices de refracción intracelular y extracelular de un tejido vegetal en contacto parcial con una interfaz plana de vidrio, con una exactitud de 0.5%; también se determinó la adherencia o fracción de área de contacto del tejido, con 1% de exactitud. Este modelo se puede usar en conjunto con el de reflectividad de una película confinada de biotejido (capítulo 5) para incorporar la adherencia de células o "islas" de material biológico a la interfaz con el medio interno. Por otra parte, también tiene aplicaciones en la medición del índice de refracción de microgotas en contacto óptico con una interfaz.

- Se desarrolló un modelo teórico de esparcimiento coherente basado en la aproximación de difracción anómala, para estudiar la reflectividad de una película delgada de tejido biológico confinada entre interfaces planas y paralelas entre sí. Se determinó mediante la comparación del modelo desarrollado con la teoría de medio efectivo de van de Hulst, que ésta última predice correctamente la reflectividad interna de una película delgada de biotejido en la región entre los ángulos críticos, donde la curva es más sensible a los parámetros microestructurales de la película confinada. Se concluyó también que más allá del segundo ángulo crítico la aproximación de medio efectivo de van de Hulst no da resultados confiables en este caso de aplicación, ya que exagera las pérdidas de la película efectiva. Esta última parte de la curva de reflectividad se logró describir de mejor manera suponiendo que algunas células realizan contacto óptico con la interfaz con el

medio interno y se utilizó el modelo discutido en el capítulo 4. Se realizaron mediciones de reflectividad interna como función del ángulo de incidencia para tres muestras de sangre completa, confinadas en forma de película delgada, y se obtuvo un excelente ajuste de la teoría implementada asumiendo los eritrocitos como esferoides oblatos. Mediante el ajuste de la teoría al experimento se infirieron parámetros importantes de la microestructura, como la elipticidad efectiva de las células y el índice de refracción dentro y fuera de ellas. Nuestros resultados sugieren que la medición de la reflectividad interna de una película delgada de biotejido puede usarse para explorar indicadores de la salud celular, así como para seguir la evolución de algún proceso biológico. Aunque nuestro modelo es aplicable también en configuración de reflexión externa, las mediciones de reflectividad como función del ángulo de incidencia son más sensibles en configuración interna, las cuales permiten estudiar la transmisión de la componente coherente de la luz a través de la muestra con solo una pequeña cantidad de esta. Además, el arreglo de reflexión nos deja libre el espacio detrás de la película confinada, desde el cual podríamos excitar la muestra o inspeccionarla con un microscopio, en paralelo a la realización del experimento. La medición de reflectancia coherente en películas de tejido biológico impone el reto de filtrar la luz difusa que viaja muy cerca de la componente coherente; nosotros resolvimos este problema reduciendo el ángulo sólido de detección al mínimo posible para dejar pasar la luz reflejada coherentemente. Finalmente, nuestra medición de la reflectancia coherente de una película delgada de sangre tiene una exactitud entre el 2% y el 10%, entre los ángulos críticos, que es la región más interesante de la curva desde el punto de vista del desarrollo de sensores.

- Los tres sistemas analizados a lo largo de este trabajo de tesis nos permitieron aislar diferentes escenarios que pueden observarse, casi siempre combinados, al estudiar la reflectividad de un tejido biológico o una suspensión de células biológicas. Por ejemplo, la reflexión cuasicrítica de una suspensión de células biológicas (en agitación) reveló que la reflectividad interna no es sensible a la presencia de las células, solamente al índice de refracción del medio extracelular. Sin embargo, si las células hacen contacto óptico con la interfaz con el medio de incidencia, podemos medir también el índice de refracción dentro de ellas y la fracción de contacto. Por otra parte, si introducimos una segunda interfaz en el sistema, confinando la suspensión de células en una película delgada, se agrega al menos una segunda componente a la reflectividad, que contiene información de la transmisión de la luz en la película y por tanto, de la fracción de volumen que ocupan las células, así como de su morfología. La combinación del CSM basado en ADA y el modelo de reflectividad superficial, mostró resultados impresionantes al poder reproducir de manera muy cercana todas las regiones de las curvas experimentales de reflectividad como función del ángulo de incidencia. Un resultado importante de este trabajo radica en haber encontrado que el índice de refracción efectivo de van de Hulst es una buena aproximación para describir la película delgada de biotejido en la región entre los ángulos críticos. Aunque nuestro modelo combinado es mejor y nos brinda una mayor cantidad

6. Conclusiones y perspectivas

de información, el cálculo de la reflectividad con la teoría de van de Hulst es mucho más sencillo de programar y por tanto, se puede usar para interpretar las señales obtenidas de manera más directa. Sin embargo, pudimos constatar que no es correcto definir un índice de refracción efectivo cerca de las interfaces con una suspensión de células o biotejido, error que se hace más evidente en el tratamiento por reflexión.

- Por último, la configuración de película delgada confinada, junto con los modelos desarrollados, es un buen punto de partida para la implementación de un sensor de procesos biológicos, ya sea en un tejido biológico o suspensión de células. Observando los resultados, es claro que el trabajo del capítulo 3 se puede trasladar a película delgada, ya que fijándonos en la posición del segundo ángulo crítico podríamos detectar cambios en el índice de refracción de la matriz, provocado por la lisis celular o por la entrada de algún fármaco de interés hacia las células. En esta configuración también es posible monitorear y diferenciar entre cambios de forma, fracción de volumen o tamaño promedio de célula (que está relacionado a fracción de volumen) si medimos la reflectividad entre los dos ángulos críticos. Además, se puede detectar el contacto óptico de células o restos de ellas con la superficie del prisma, midiendo a un ángulo fijo detrás del segundo ángulo crítico. De manera que, si medimos a dos o tres ángulos fijos simultáneamente (usando varios pares de láser-fotodetector) se podría monitorear en tiempo real un proceso biológico a nivel celular en una película de biotejido o suspensión de células.

Relación entre el vector de polarización y el vector de onda

La siguiente identidad se utiliza en el capítulo 5 para obtener la ecuación (5.15) a partir de la ecuación (5.16):

$$\left(\hat{\mathbf{e}}_{r\perp} - \frac{\mathbf{k}_\perp \cdot \hat{\mathbf{e}}_{r\perp}}{k_z} \hat{\mathbf{a}}_z \right) = \hat{\mathbf{e}}_r; \quad (\text{A.1})$$

en este apartado veremos su demostración.

En nuestro problema hemos supuesto, por simplicidad y sin perder generalidad, que el vector de onda \mathbf{k} es paralelo al plano xz , tal que $\mathbf{k} = k_x \hat{\mathbf{a}}_x + k_z \hat{\mathbf{a}}_z$. El vector de polarización del campo eléctrico reflejado está dado por:

$$\hat{\mathbf{e}}_r = e_x \hat{\mathbf{a}}_x + e_y \hat{\mathbf{a}}_y + e_z \hat{\mathbf{a}}_z \equiv \hat{\mathbf{e}}_{r\perp} + e_z \hat{\mathbf{a}}_z. \quad (\text{A.2})$$

Sabemos por definición que $\mathbf{k} \cdot \hat{\mathbf{e}}_r = 0$, ya que ambos vectores definen una onda electromagnética transversal. Por lo tanto,

$$k_x e_x + k_z e_z = 0, \quad (\text{A.3})$$

y

$$\frac{k_x}{k_z} = -\frac{e_z}{e_x}. \quad (\text{A.4})$$

Luego, expandiendo la fracción del segundo término en el miembro izquierdo de la ecuación (A.1), y usando la ecuación (A.4) obtenemos lo siguiente:

$$\frac{\hat{\mathbf{k}}_\perp \cdot \hat{\mathbf{e}}_{r\perp}}{k_z} = \frac{k_x \hat{\mathbf{a}}_x \cdot (e_x \hat{\mathbf{a}}_x + e_y \hat{\mathbf{a}}_y)}{k_z} = -e_z. \quad (\text{A.5})$$

Finalmente, combinando las ecuaciones (A.2) y (A.5) obtenemos la identidad de la ecuación (A.1).

Coeficiente de reflexión coherente de la película confinada de biotejido

En este apartado brindamos una breve derivación de la expresión para el coeficiente de reflexión coherente, r_{coh} , que se puede identificar en la ecuación (5.17) para una película delgada de biotejido confinada entre dos medios homogéneos (0 y 2, sin cubreobjetos). Después de la primera reflexión (r_{01}), los siguientes términos de la suma se multiplican por los coeficientes de transmisión t_{01} y t_{10} , que corresponden a la luz que entra y sale de la película de biotejido; otro de los factores en cada multiplicación está dado por el retraso en fase y el factor de atenuación introducido por la película, elevado al correspondiente orden de reflexión. De esta manera, obtenemos que:

$$r_{coh} = r_{01} + t_{01}t_{10}(r_{12}e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle + r_{10}r_{12}^2e^{4ik_1z d} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle^2 + r_{10}^2r_{12}^3e^{6ik_1z d} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle^3 + \dots). \quad (\text{B.1})$$

Tomando el término $r_{12}e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle$ como factor común dentro del paréntesis en la ecuación (B.1) y haciendo un poco de álgebra nos queda lo siguiente:

$$r_{coh} = r_{01} + t_{01}t_{10}r_{12}e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle \sum_{p=0}^{\infty} \left(r_{10}r_{12}e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle \right)^p, \quad (\text{B.2})$$

donde la suma sobre p es la conocida serie geométrica, $\sum_{p=0}^{\infty} h^p = \frac{1}{(1-h)}$, con $h = r_{10}r_{12}e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle$. Entonces obtenemos que:

$$r_{coh} = r_{01} + \frac{t_{01}t_{10}r_{12}e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta(x,y,\theta_i)} \rangle}{1 - r_{10}r_{12}e^{2ik_1z d} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle}. \quad (\text{B.3})$$

Sumando los dos términos en el lado derecho de la ecuación (A.3) para obtener una sola fracción, y usando que $t_{01}t_{10} = (1 + r_{01})(1 + r_{10})$ y que $r_{01} = -r_{10}$, se obtiene finalmente que:

$$r_{coh} = \frac{r_{01} + r_{12} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle e^{2ik_1 z d}}{1 + r_{01} r_{12} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle e^{2ik_1 z d}}. \quad (\text{B.4})$$

Fórmula de reflectividad sin interferencia entre las múltiples reflexiones en la película de biotejido

El cuadrado de la ecuación (B.4) es la reflectancia coherente R_{coh} de la película de biotejido. Siguiendo un razonamiento similar al usado en el apéndice anterior para obtener la ecuación (B.1), sumaremos directamente la potencia de cada una de las múltiples reflexiones en la película de tejido biológico, evitando así la interferencia entre ellas:

$$R_{coh} = |r_{01}|^2 + |t_{01}t_{10}|^2 \left[|r_{1a}|^2 + |r_{10}|^2 (|r_{1a}|^2)^2 + (|r_{10}|^2)^2 (|r_{1a}|^2)^3 + \dots \right], \quad (C.1)$$

donde $|r_{1a}|^2 = \left| r_{12} \langle e^{i\Delta(\theta_i)} \rangle e^{2ik_{1z}d} \right|^2$. La nueva definición de R_{coh} , dada por la ecuación (C.1), difiere de la definición original solamente por un término de fase.

Si definimos $R_{xy} \equiv |r_{xy}|^2$, la ecuación anterior se escribe como sigue:

$$R_{coh} = R_{01} + |t_{01}t_{10}|^2 \left[R_{1a} + R_{10} (R_{1a})^2 + (R_{10})^2 (R_{1a})^3 + \dots \right], \quad (C.2)$$

y tomando como factor común al término R_{1a} , dentro de los corchetes, obtenemos que:

$$R_{coh} = R_{01} + |t_{01}t_{10}|^2 R_{1a} \left[1 + R_{10}R_{1a} + (R_{10})^2 (R_{1a})^2 + \dots \right]. \quad (C.3)$$

La suma dentro de los corchetes es una serie geométrica, $\sum_{p=0}^{\infty} h^p = \frac{1}{(1-h)}$, con $h = R_{10}R_{1a}$. Por lo tanto, la ecuación (C.3) se transforma como:

$$R_{coh} = R_{01} + \frac{|t_{01}t_{10}|^2 R_{1a}}{1 - R_{01}R_{1a}}, \quad (C.4)$$

donde hemos usado que $R_{10} = R_{01}$.

En la ecuación (C.4) podemos escribir que:

$$\begin{aligned}
 |t_{01}t_{10}|^2 &= |(1+r_{01})(1+r_{10})|^2 \\
 &= |(1+r_{01})(1-r_{01})|^2 \\
 &= |1-r_{01}^2|^2;
 \end{aligned} \tag{C.5}$$

por otra parte, usando que $|x|^2 = xx^*$ tenemos que:

$$\begin{aligned}
 |1-r_{01}^2|^2 &= (1-r_{01}^2)(1-r_{10}^2)^* \\
 &= (1-r_{01}^2)(1-(r_{10}^2)^*) \\
 &= 1+R_{01}^2-2\text{Re}\{r_{01}^2\}.
 \end{aligned} \tag{C.6}$$

Luego, combinando los términos de la ecuación (C.4) en una sola fracción:

$$R_{coh} = \frac{R_{01}(1-R_{01}R_{1a}) + |t_{01}t_{10}|^2 R_{1a}}{1-R_{01}R_{1a}}, \tag{C.7}$$

y usando los resultados de las ecuaciones (C.5) y (C.6) obtenemos que:

$$R_{coh} = \frac{R_{01} + R_{1a} - 2\text{Re}\{r_{01}^2\}}{1-R_{01}R_{1a}}, \tag{C.8}$$

que es la ecuación (5.19), con $R_{1a} = R_{12} \left| \left\langle e^{i\Delta(\theta_i)} \right\rangle \right|^2 |e^{2ik_{1z}d}|^2$. En la expresión (C.8) se debe tener en cuenta que R_{1a} no es una reflectancia, ya que puede tomar valores mayores que 1; sin embargo, R_{coh} siempre es menor o igual que la unidad [67].

Cálculo de las funciones $l_{\pm}(\mathbf{r}_p, \theta_1)$ para células elipsoidales

Partiremos de la suposición, tomada al inicio del capítulo 5, de que cada célula al interior de la película de biotejido tiene la forma geométrica de un elipsoide oblato, descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{(x - x_p)^2 + (y - y_p)^2}{a^2} + \frac{(z - z_p)^2}{c^2} = 1, \quad (\text{D.1})$$

donde (x_p, y_p, z_p) son las coordenadas del centro de la p -ésima célula, en un sistema cartesiano como el que se muestra en la Figura D.1.

En la Figura D.1 también se representa una línea recta (paralela al plano xz), cuya pendiente coincide con la del vector de onda de la luz que atraviesa la célula. Recordemos que, debido a la aproximación de difracción anómala (ADA), consideramos que la luz no se desvía al pasar por la célula. La ecuación de la recta es la siguiente:

$$x = \tan \theta_1 z. \quad (\text{D.2})$$

Para determinar la distancia recorrida por la luz dentro de la célula, debemos calcular los puntos de intersección entre la recta y el elipsoide, (x_1, y_1, z_1) y (x_2, y_2, z_2) . Sustituyendo la ecuación (D.2) en (D.1) y haciendo un poco de álgebra, nos queda la siguiente ecuación:

$$z^2 (c^2 \tan^2 \theta_1 + a^2) - 2z (c^2 \tan \theta_1 x_p + a^2 z_p) + [c^2 (x_p^2 + y_p^2) + a^2 z_p^2 - a^2 c^2] = 0, \quad (\text{D.3})$$

que debemos resolver para la variable z . Se puede notar que la ecuación (D.3) es de la forma $Az^2 + Bz + C = 0$, cuya solución es:

$$z_{1,2} = \frac{-B \pm \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \quad (\text{D.4})$$

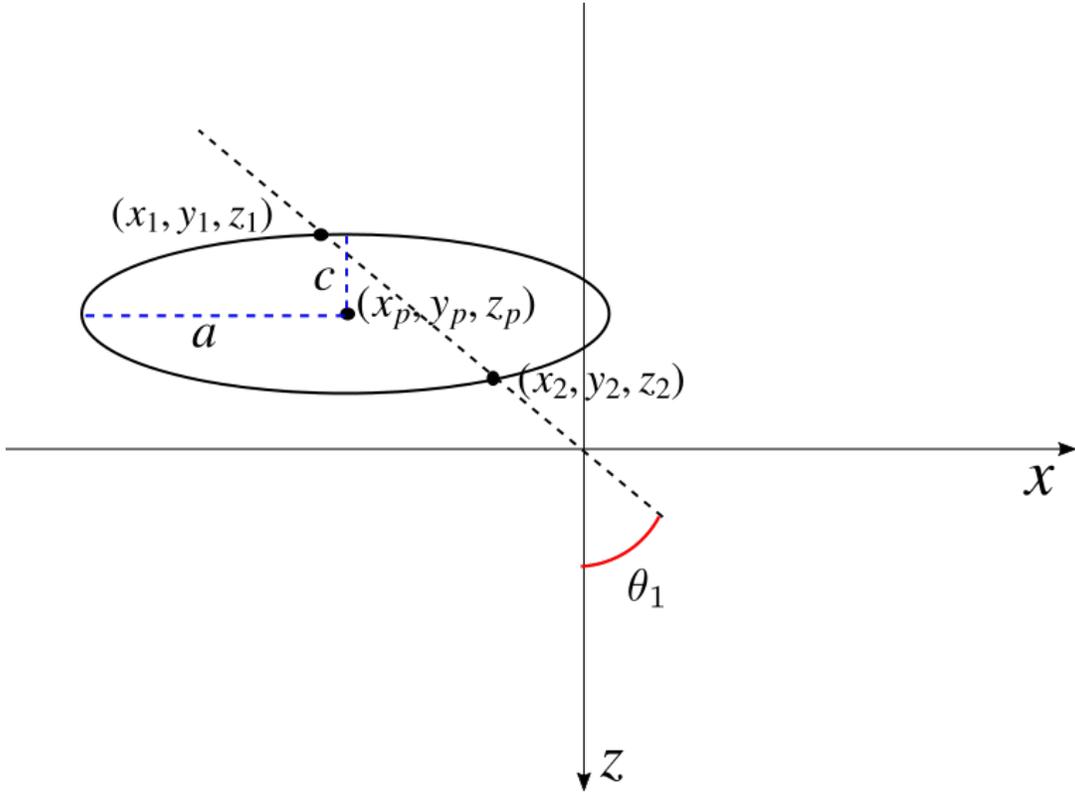


Figura D.1: Representación geométrica de la distancia recorrida por la luz en el interior de una célula elipsoidal, cuyo semieje mayor es paralelo al plano xy .

con $A = c^2 \tan^2 \theta_1 + a^2$, $B = -2(c^2 \tan \theta_1 x_p + a^2 z_p)$ y $C = c^2(x_p^2 + y_p^2) + a^2 z_p^2 - a^2 c^2$.

Entonces, la distancia recorrida en la dirección positiva del eje z está descrita por el siguiente vector:

$$\mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) = (x_2 - x_1)\hat{\mathbf{a}}_x + (z_2 - z_1)\hat{\mathbf{a}}_z. \quad (\text{D.5})$$

A partir de la ecuación (D.2), tenemos que $x_1 = \tan \theta_1 z_1$ y $x_2 = \tan \theta_2 z_2$; mientras que haciendo un poco de álgebra con la ecuación (D.4) tenemos que $(z_2 - z_1) = \frac{\sqrt{B^2 - 4AC}}{A}$, con lo cual la ecuación (C.5) queda de la siguiente manera:

$$\mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) = \frac{\text{Re} \left\{ \sqrt{B^2 - 4AC} \right\}}{A} (\tan \theta_1 \hat{\mathbf{a}}_x + \hat{\mathbf{a}}_z), \quad (\text{D.6})$$

donde se ha tomado la parte real de $\sqrt{B^2 - 4AC}$, que se anula cuando el elipsoide y la recta no se intersecan; es decir, cuando la luz no atraviesa la célula $\mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1) = 0$. La ecuación (D.6) puede obtenerse para otras geometrías de célula, simplemente modificando la ecuación (D.1).

Para obtener la expresión equivalente a la ecuación (D.6), para $\mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)$, cuando el vector de onda que atraviesa la célula viaja en la dirección negativa del eje z , solamente debemos

D. Cálculo de las funciones $l_{\pm}(\mathbf{r}_p, \theta_1)$ para células elipsoidales

cambiar el signo de la pendiente de la recta en la ecuación (D.2). En este caso la recta que se interseca con el elipsoide es:

$$x = -\tan \theta_1 z, \quad (\text{D.7})$$

obteniéndose que:

$$\mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1) = \frac{\text{Re} \left\{ \sqrt{(B')^2 - 4AC} \right\}}{A} (\tan \theta_1 \hat{\mathbf{a}}_x - \hat{\mathbf{a}}_z), \quad (\text{D.8})$$

con los mismos valores anteriores para los parámetros A y C , mientras que $B' = -B$. Aquí se ha tenido en cuenta que $(z_2 - z_1) = \frac{-\sqrt{(B')^2 - 4AC}}{A}$, ya que se debe cumplir que $z_2 < z_1$. La magnitud de los vectores $\mathbf{l}_+(\mathbf{r}_p, \theta_1)$ y $\mathbf{l}_-(\mathbf{r}_p, \theta_1)$ es la distancia recorrida por la luz en el interior de la célula de bajada y de subida, respectivamente.

Múltiples reflexiones en el interior del cubreobjetos

En este apartado se explican las consideraciones a tener en cuenta para obtener la expresión modificada para r_{coh} presentada en el capítulo 5 (ecuación (5.32)) cuando se utiliza un cubreobjetos o sustrato de vidrio para soportar la película de biotejido. El espesor del cubreobjetos es mucho mayor que el espesor de la película confinada de biotejido, $d_s \gg d$, como se muestra en la Figura E.1 (el dibujo no está a escala).

Si consideramos solamente la primera reflexión en la interfaz prisma-biotejido y la primera

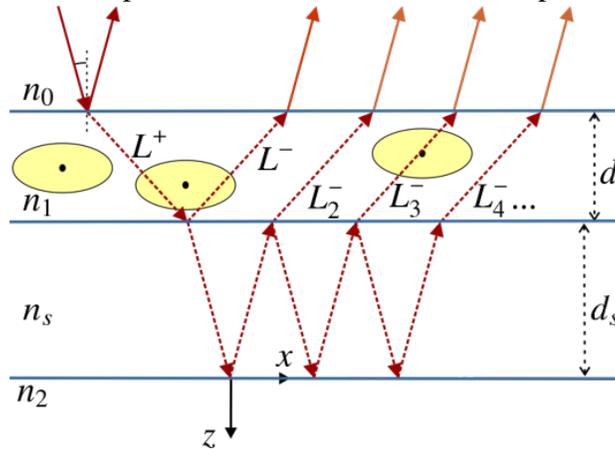


Figura E.1: Análisis de las principales contribuciones a la reflectividad en $z = -d^-$, cuando se coloca un sustrato de vidrio (o cubreobjetos, de espesor $d_s \gg d$) entre la película de tejido y el medio externo, como soporte para lograr el confinamiento. Las múltiples reflexiones en el cubreobjetos provocan que el retraso en fase a lo largo de L_+ ya no se correlacione con el retraso en fase sobre L_{-j} , para $j \geq 2$.

reflexión en el cubreobjetos de vidrio, la contribución a la onda reflejada, $\mathbf{E}_r = E_0[\cdot]e^{ik_x x}\hat{\mathbf{e}}_r$, en $z = -(d_s + d)$, está dado por el siguiente coeficiente de reflexión:

$$[\cdot] = r_{01} + t_{01}t_{10}e^{2ik_1z}d \left(r_{1s}e^{i\Delta} + e^{i\Delta}M \right), \quad (\text{E.1})$$

E. Múltiples reflexiones en el interior del cubreobjetos

donde M contiene la información de las múltiples reflexiones en el interior del cubreobjetos,

$$M = t_{1s}t_{s1} \left(r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}e^{i\Delta_{-2}} + r_{s1}r_{s2}^2e^{4ik_{sz}d_s}e^{i\Delta_{-3}} + r_{s1}^2r_{s2}^3e^{6ik_{sz}d_s}e^{i\Delta_{-4}} + \dots \right), \quad (\text{E.2})$$

siendo r_{1s} , r_{s1} , r_{2s} , t_{1s} y t_{s1} los coeficientes de reflexión y transmisión de Fresnel en las interfaces del cubreobjetos con la película confinada y con el medio externo. $k_{zs} = k_0\sqrt{n_s^2 - n_0^2\sin^2\theta_i}$ es la componente z del vector de onda dentro del cubreobjetos. En concordancia con la ecuación (5.3) (en el capítulo 5), tenemos que $\Delta_{-j}(x, y, \theta_i) = \int_{L_{-j}} \Delta \mathbf{k}^- \cdot d\mathbf{l}$, para $j \geq 2$, es el retraso en fase que experimenta la onda al pasar por la película de biotejido en la dirección negativa del eje z , durante la j -ésima reflexión en el sustrato de vidrio.

Notemos que, al ser muy grande el espesor d_s del sustrato de vidrio comparado con el tamaño de las células ($\approx 150^m\mu\text{m}$ para un cubreobjetos de microscopio), para ángulos de incidencia no muy pequeños, los caminos L_{-2} , L_{-3} , \dots , están desplazados lateralmente (con respecto a L_- y entre sí) una distancia mayor al tamaño de una célula. Entonces, dichos caminos no atravesarán la misma célula, originalmente atravesada en la dirección positiva de z , ni el mismo conjunto de células. Así que, podemos afirmar que no existe correlación entre las ondas que viajan a lo largo de cada uno de estos caminos. Por otro lado, asumimos que hay invarianza de traslación en el promedio sobre el plano xy . Luego, cuando tomamos el promedio configuracional, los factores correspondientes $\langle e^{i\Delta_{-j}(x, y, \theta_i)} \rangle$ son todos iguales. De hecho, podemos asumir que $\langle e^{i\Delta_{-j}(x, y, \theta_i)} \rangle = \langle e^{i\Delta_{-}(\theta_i)} \rangle$, y sustituyendo esto en la ecuación (E.2) y haciendo el álgebra obtenemos que:

$$M = \frac{t_{1s}t_{s1}r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}}{1 - r_{s1}r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}}e^{i\Delta_{-}}. \quad (\text{E.3})$$

Combinando las ecuaciones (E.1) y (E.3) resulta lo siguiente:

$$[\cdot] = r_{01} + t_{01}t_{10}e^{2ik_{1z}d} \left(r_{1s}e^{i\Delta} + e^{i\Delta_{+}} \frac{t_{1s}t_{s1}r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}}{1 - r_{s1}r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}}e^{i\Delta_{-}} \right). \quad (\text{E.4})$$

Teniendo en cuenta que los factores $e^{i\Delta_{+}}$ y $e^{i\Delta_{-}}$ no están correlacionados, el promedio configuracional de la última expresión nos da el coeficiente de reflexión coherente:

$$\langle \cdot \rangle = r_{01} + t_{01}t_{10}e^{2ik_{1z}d} \left(r_{1s} \langle e^{i\Delta} \rangle + \langle e^{i\Delta_{+}} \rangle \frac{t_{1s}t_{s1}r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}}{1 - r_{s1}r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}} \langle e^{i\Delta_{-}} \rangle \right). \quad (\text{E.5})$$

El factor $e^{i\Delta}$, en el primer término dentro del paréntesis, se puede escribir como el producto de dos factores, $e^{i\Delta} = e^{i\Delta_{+}}e^{i\Delta_{-}}$. Sin embargo, aquí los exponentes sí están correlacionados, ya que los caminos correspondientes, L_{+} y L_{-} , usados para calcular Δ_{+} y Δ_{-} en este factor se encuentran cercanos entre sí (ver la Figura E.1), y por tanto ambos podrían cruzar la misma célula. Así, $\langle e^{i\Delta} \rangle = \langle e^{i\Delta_{+}}e^{i\Delta_{-}} \rangle \neq \langle e^{i\Delta_{+}} \rangle \langle e^{i\Delta_{-}} \rangle$.

A partir de lo anterior, vemos que los términos dentro del paréntesis en la ecuación (E.5) no pueden agruparse. Sin embargo, en el caso en que el medio de incidencia es vidrio y el cubreobjetos es de vidrio también, la contribución del primer término (reflexión con el coeficiente r_{1s}) es pequeña en general, comparada con la suma de todas las otras reflexiones. Por lo tanto, para simplificar las expresiones de trabajo podemos ignorar la desigualdad expresada en el párrafo anterior, cometiendo un error pequeño, considerando el promedio del producto $\langle e^{i\Delta_+} e^{i\Delta_-} \rangle$, como el producto de los promedios $\langle e^{i\Delta_+} \rangle \langle e^{i\Delta_-} \rangle$. Luego, usando que $r_{1s} = -r_{s1}$ y que $t_{1s}t_{s1} = (1 - r_{1s}^2)$, y realizando un poco de álgebra, la ecuación (E.5) toma la forma:

$$\langle \cdot \rangle = r_{01} + t_{01}t_{10}r_{1s2}e^{2ik_{1z}d} \langle e^{i\Delta_+} \rangle \langle e^{i\Delta_-} \rangle, \quad (\text{E.6})$$

donde $r_{1s2} = \frac{r_{1s} + r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}}{1 + r_{1s}r_{s2}e^{2ik_{sz}d_s}}$.

Como sabemos, la onda reflejada correspondiente al segundo término de la ecuación (E.6) también experimenta múltiples reflexiones dentro de la película de biotejido, delimitada por la interfaz con el medio interno y el cubreobjetos. Sumando entonces las múltiples reflexiones en la película confinada, resulta lo siguiente:

$$\langle \cdot \rangle = \frac{r_{01} + r_{1s2}e^{2ik_{1z}d} \langle e^{i\Delta_+} \rangle \langle e^{i\Delta_-} \rangle}{1 + r_{01}r_{1s2}e^{2ik_{1z}d} \langle e^{i\Delta_+} \rangle \langle e^{i\Delta_-} \rangle}. \quad (\text{E.7})$$

La ecuación (E.7) reemplaza al coeficiente de reflexión r_{coh} , utilizado en la ecuación (5.17), cuando consideramos un sustrato de vidrio, como soporte, a continuación de la película de biotejido confinada.

Correcciones de superficie añadidas al problema de la película de biotejido confinada

Una película de biotejido es, en general, una mezcla compleja, y es posible que algunas biopartículas, como proteínas o restos de células (o plaquetas en el caso de la sangre) se adhieran a las interfaces. Esto puede deberse a la atracción electrostática, a la sedimentación o algún otro fenómeno físico. Suponemos que el material que se adhiere a las superficies lo hace de manera irregular, formando islas o cúmulos de material (con índice de refracción efectivo n_q) en diferentes regiones de la interfaz plana con el prisma (en este caso). En el capítulo 4 se determinó una expresión analítica para calcular el coeficiente de reflexión coherente r_{Scoh} de una interfaz con una distribución aleatoria de contraste de índice de refracción:

$$r_{Scoh} = r_{01} + (r_{0q} - r_{01}) \Theta_q, \quad (\text{F.1})$$

donde r_{0q} es el coeficiente de reflexión entre el medio interno (con índice de refracción n_0) y las islas de material adherido, que cubren una fracción Θ_q de la superficie. Aquí además, consideraremos dichas islas de material como películas muy delgadas de espesor h_q y calculamos r_{0q} a partir de la siguiente expresión:

$$r_{0q} = \frac{\bar{r}_{0q} + r_{q1} e^{2ik_{qz}h_q}}{1 + \bar{r}_{0q}r_{q1} e^{2ik_{qz}h_q}}, \quad (\text{F.2})$$

donde \bar{r}_{0q} y r_{q1} son los coeficientes de reflexión de Fresnel de las interfaces simples $n_0 - n_q$ y $n_q - n_1$, respectivamente; y $k_{qz} = k\sqrt{n_q^2 - n_0^2 \sin^2 \theta_i}$. El valor absoluto al cuadrado de la ecuación F.1 se puede usar para sustituir la reflectancia R_{01} en la ecuación (5.19) o en la (5.33) (capítulo 5), si queremos introducir esta corrección al modelo CSM basado en ADA.

Publicaciones generadas durante el período del doctorado

1. A. Acevedo-Barrera and A. García-Valenzuela, “Theoretical assessment of single-frequency electrical sensors for continuous monitoring of cell lysis in dilute suspensions,” *Sens. Bio-Sensing Res.* 21, 7-16 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2018.09.001>
2. A. Acevedo-Barrera and A. García-Valenzuela, “Analytical approximation to the complex refractive index of nanofluids with extended applicability,” *Opt. Express* 27, 28048 (2019). <https://doi.org/10.1364/OE.27.028048>
3. A. Acevedo-Barrera, D. Cerecedo, and A. García-Valenzuela, “Viability and resolution of sensing hemolysis with a capacitive sensor,” *Rev. Médica del Hosp. Gen. México* 83, 5-12 (2020). <https://doi.org/10.24875/hgmx.m20000035>
4. A. Acevedo-Barrera, O. Vázquez-Estrada, and A. García-Valenzuela, “Optical reflectivity of an interface with random refractive-index-contrast patterns,” *Appl. Opt.* 59, D221 (2020). <https://doi.org/10.1364/AO.383166>
5. R. Márquez-Islas, A. Pérez-Pacheco, L. B. Salazar- Nieva, A. Acevedo-Barrera, E. Mendoza-García, and A. García-Valenzuela, “Optical device and methodology for optical sensing of hemolysis in hypotonic media,” *Meas. Sci. Technol.* 31, (2020). <https://doi.org/10.1088/1361-6501/ab8430>
6. V. Solis-Tinoco, A. Acevedo-Barrera, O. Vazquez-Estrada, J. Munguia-Cervantes, N. Hernandez-Como, L. F. Olguin, and A. Garcia-Valenzuela, “Fast and accurate optical determination of gold-nanofilms thickness,” *Opt. Laser Technol.* 134, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2020.106604>
7. A. Pérez-Pacheco, N. E. Álvarez-Chávez, I. Olarte-Carrillo, A. Martínez-Tovar, R. Márquez-Islas, A. Acevedo-Barrera, and A. García-Valenzuela, “Basic optical sensor

G. Publicaciones generadas durante el período del doctorado

for monitoring leukocyte properties in suspension,” *Opt. Quantum Electron.* 53, (2021). <https://doi.org/10.1007/s11082-020-02728-4>

8. A. Acevedo-Barrera and A. García-Valenzuela, “Probing bio-tissue films by optical internal reflectivity: modeling and measurements,” *Appl. Opt.* 60, 8588 (2021). <https://doi.org/10.1364/AO.433499>
9. O. Vázquez-Estrada, A. Acevedo-Barrera, A. Nahmad-Rohen, and A. García-Valenzuela, “Analysis of wavelength-scale 1D depth-dependent refractive-index gradients at an interface by their effects on the internal reflectance near the critical angle,” *Opt. Lett.* 46, 4801 (2021). <https://doi.org/10.1364/OL.434090>



Theoretical assessment of single-frequency electrical sensors for continuous monitoring of cell lysis in dilute suspensions

Anays Acevedo-Barrera, Augusto García-Valenzuela*

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal, 70-186, Ciudad de México 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Electrical sensing
Biological-cell suspensions
Lysis
Resistance
Capacitance
Effective dielectric function

ABSTRACT

We analyze the sensitivity of electrical measurements to lysis of biological cells in suspensions. We aim at discerning the electrical parameter and measuring conditions that are more convenient to monitor the kinetics of a lysis process. We consider single-frequency measurements of the capacitance and resistance of an electrical capacitor containing a suspension of biological cells at mid-radiofrequencies. We use well-established models to estimate the relative sensitivities to variations of the volume fraction of cells during a lysis process. Then we estimate values for the resolution in measuring the fraction of cells that have been lysed with commercially available LCR meters. Unexpectedly, our results indicate that, despite the total number of ions in solution remains constant during a lysis process, in general, the electrical resistance provides a more appropriate signal for sensing the evolution of cell lysis than the capacitance. This is contrary to the case when the cell's volume fraction without lysis is to be measured. We predict that, with single-frequency resistance measurements, a resolution better than 0.1% in volume fraction of lysed cells should be attainable without much difficulty.

1. Introduction

Biological cells may go through the process of lysis in which the cell's membrane ruptures and the cytosol dilutes in the surrounding medium. The degree of ease with which cells are lysed can be a measure of their integrity and health [1,2]. The endurance of blood cells, such as erythrocytes or lymphocytes, to some specific stresses, may give valuable information about the cells that may help diagnose some health disorders. For instance, determining the resistance of erythrocytes to an osmotic stress, which may cause lysis, depending on the state of cells, can be used in the diagnostics of certain common diseases [2–4]. Therefore, having sensors to monitor the process of cell lysis under a controlled stress could be used in developing new medical diagnostics tools.

Currently, there are many techniques to measure the number of cells lysed during processes such as the addition of solvents or enzymes that disrupt the cells' membranes, or through mechanical perturbations by using a blender or sonication [5–8]. These techniques can be divided mainly in optical and electrical. The optical techniques are the most popular in the medical area, but they are generally time-consuming [4,9]. On the other hand, electrical methods are arising as an alternative. Recent works show significant advances in electrical measurements combined with microfluidics technology applications [10–16].

These works have focused mainly on single-cell measurements at a fast rate so that a large number of cells can be analyzed in a reasonable time. Although single-cell studies can give information regarding what is occurring locally inside a cell, for developing medical diagnostics tools it should be more convenient to monitor a large number of cells and obtaining average properties in a simple and rapid way. Also, the average electrical response of a volume of suspended cells can be readily interpreted to infer average properties of cells with well-established theories.

Monitoring in time a cell-lysis process *via* impedance measurements has already been addressed in Refs. [12, 13]. In these works, impedance spectroscopy measurements were obtained a few times during a lysis process in a cell suspension demonstrating the viability of using electrical impedance measurements to distinguish different stages of the lysis process. However, in order to obtain more detailed information about the kinetics of a lysis process it would be needed to monitor the process continuously in time. Although time-continuous spectroscopy or multi-frequency impedance measurements are viable, the cost and complexity of such a device would be considerable. For continuous time monitoring, single-frequency impedance measurements are more appealing and should be the first option to be considered.

The electrical properties of cell suspensions and tissues have been studied for many years. Reviews of the electrical properties of tissues

* Corresponding author.

E-mail addresses: anays.acevedo@icat.unam.mx (A. Acevedo-Barrera), augusto.garcia@icat.unam.mx (A. García-Valenzuela).

Analytical approximation to the complex refractive index of nanofluids with extended applicability

ANAYS ACEVEDO-BARRERA AND AUGUSTO GARCIA-VALENZUELA*

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-186, Ciudad de México 04510, Mexico

*augusto.garcia@icat.unam.mx

Abstract: Currently, there are available a few simple analytical approximations to the complex effective refractive index that may be used for nanofluids. Namely, the Maxwell Garnett mixing formula with scattering corrections, the Maxwell Garnett Mie approximation, the Foldy-Lax approximation and the small particle limit of the quasi-crystalline approximation. These approximations are valid either for very small nanoparticles (below a few nanometers in radius) or for very dilute nanofluids (below about 1% in particles' volume fractions) and therefore, do not cover the whole domain of particle suspensions referred to as nanofluids. Here we propose a new simple analytical approximation based on local field corrections to the Foldy-Lax approximation. The new mixing formula coincides with the mentioned approximations when they are expected to be valid and provides physically sound predictions when the mentioned approximations are no longer valid, within the realm of nanofluids. We compare predictions of the analytical approximations considered in this work with experimental data published earlier for nanofluids of polystyrene in water.

© 2019 Optical Society of America under the terms of the [OSA Open Access Publishing Agreement](#)

1. Introduction

A nanofluid is a homogenous liquid with nanoparticles of sizes smaller than 100 nm in suspension. Nanofluids have become of interest in recent years because some of the physical properties of a fluid can be affected dramatically by a small amount of nanoparticles in suspension [1,2], opening a new way for designing composite fluids with properties not found in homogeneous fluids. Different applications of nanofluids have been investigated in recent years, ranging from heat transfer and solar absorbers to medical applications [1–4].

In order to understand, verify and control the properties of a nanofluid it is desirable to have simple means to characterize the nanoparticles in suspension. A simple tool could be measuring at optical frequencies, and correctly interpreting, the complex refractive index of a nanofluid. Nanofluids are in general, light scattering media. The amount of scattering losses on the propagation of a collimated beam of light will depend on the size of the nanoparticles and their refractive index contrast with the host liquid. In light scattering media it is usual to define an average (or coherent) electromagnetic wave and assign an effective propagation constant to it [5–9]. From the effective propagation constant one can define an effective Refractive Index (RI). Such RI has a non-local nature and some precautions may be needed to use it in continuous electrodynamics formulae [10,11]. Nevertheless, since it is a more common concept when dealing with fluids, in this work we will be referring to the effective refractive index of nanofluids.

The effective RI of nanofluids depends on the amount, size and state of dispersion of NanoParticles (NPs) in suspension, as well as on their RI and that of the medium surrounding the nanoparticles, commonly called the host, base fluid or matrix. The effective RI of the nanofluid is in general a complex quantity, with both its real and imaginary parts, being a function of the wavelength of light. To a very good approximation light refracts into the nanofluid according

Viability and resolution of sensing hemolysis with a capacitive sensor

Anays Acevedo-Barrera^{1*}, Doris Cerecedo², and Augusto García-Valenzuela¹

¹Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México; ²Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional. Mexico City, Mexico

Abstract

Background: Monitoring lysis in cell's suspensions can be a good indicator of cell's integrity and health. The current techniques to measure the number of lysed cells in some process are generally time consuming. **Objective:** In this paper, we investigate the viability of a simple method for sensing hemolysis in real time through the electrical impedance of a parallel-plate capacitor that holds a biological cell suspension. **Materials and methods:** The method is based on measuring variations of the effective dielectric function of an erythrocyte suspension during a lysis process induced by osmotic stress. Our sensor is strongly affected by the so-called electrode polarization phenomenon which prevents sensing variations of the real part of the effective dielectric function. However, measurements of the imaginary part, and thus of the electrical resistivity of the suspension, is straight forward. **Results:** We show that from resistivity measurements, it is possible to sense variations of the lysed erythrocytes' volume fraction with a resolution better than 0.1%. **Conclusions:** The proposed sensor can offer a high resolution in monitoring hemolysis and is a viable option for developing new rapid diagnostic medical tests.

Key words: Hemolysis. Biological cell suspensions. Electrical sensing. Equivalent circuit.

Introduction

Cell lysis occurs when external stress ruptures the membrane of a cell, releasing its cytosol to the extracellular medium (Fig. 1). The nature of the mentioned stress could be mechanical, chemical, viral, osmotic, etc. Hence, measuring cells' vulnerability to a particular stress could be useful to get information about the cells' state and integrity¹⁻³. For instance, a low resistance of red blood cells (RBCs) or erythrocytes to osmotic stress is commonly related with some kinds of anemia.

The primary function of RBCs is to enable respiration in tissues by providing oxygen and removing carbon dioxide through gas exchange in the lungs. During

the lifespan of an RBC, it circulates through arteries, veins, and small capillaries traveling a distance that represent 500 km⁴. The characteristic shape of a biconcave disc is fundamental for conferring to the cell its peculiar deformability; this ability of the RBC to change shape is essential for successful passage through these capillaries and splenic sinuses⁵. Normal human RBCs circulate for approximately 120 days and they are then cleared in a strictly time-dependent fashion by macrophages⁶. However, premature destruction of RBCs, also known as hemolytic anemia, is a life-threatening condition⁷. Hemolysis may result from diverse pathologies that are intrinsic or extrinsic to the erythrocytes but whatever the underlying cause or trigger, although hemolytic anemia is a relatively

Correspondence:

*Anays Acevedo-Barrera

E-mail: anays.acevedo@icat.unam.mx

Date of reception: 29-06-2018

Date of acceptance: 09-08-2018

DOI: 10.24875/HGMX.M20000035

Available online: 17-01-2020

Rev Med Hosp Gen Mex. 2020;83(1):5-12

www.hospitalgeneral.mx

0185-1063/© 2018 Sociedad Médica del Hospital General de México. Published by Permanyer. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Optical reflectivity of an interface with random refractive-index-contrast patterns

ANAYS ACEVEDO-BARRERA,¹ OMAR VÁZQUEZ-ESTRADA,² AND AUGUSTO GARCÍA-VALENZUELA^{1,*}

¹Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-186, Ciudad de México 04510, Mexico

²Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca, División de Ingeniería Electrónica, Tantoyuca 92100, Veracruz, Mexico

*Corresponding author: augusto.garcia@icat.unam.mx

Received 12 November 2019; revised 24 February 2020; accepted 28 February 2020; posted 2 March 2020 (Doc. ID 383166); published 31 March 2020

We develop simple models for the optical reflectivity of an interface in optical contact with random media consisting of discrete volumes of arbitrary form and different refractive indices. Examples of interest are surfaces sprinkled with microdroplets or an interface with biological cells adhered to it at random locations. We focus our attention to the case of internal reflectivity, in which the incidence medium has a larger refractive index than the refractive indices at the other side of the interface. Assuming an incident plane wave, we provide simple approximate expressions for the surface's coherent reflectance and for the surface's total reflectance. We compare predictions of the surface coherent-reflectance model with numerical simulations. Then we use the surface's reflectance models to interpret experimental measurements obtained with an optical prism and a thin vegetable tissue adhered to its base. In general, the surface reflectivity can be used to determine fractional contact area between the interface and microdroplets or biological cells and infer their refractive indices with an accuracy of about 0.5%. © 2020 Optical Society of America

<https://doi.org/10.1364/AO.383166>

1. INTRODUCTION

Most macroscopic media and surfaces around us are inhomogeneous. Characterizing and sensing the properties of inhomogeneous media and rough surfaces can often be done expediently by optical means. The propagation and reflection of light from random media and surfaces has been of interest for many years. Different types of inhomogeneous media are studied with different techniques and theoretical models [1–8]. From an optical point of view, inhomogeneous media are described with random spatial changes of the refractive index (RI). In inhomogeneous media, light gets scattered depending on the statistics of the RI variations. Particle suspensions, monolayers, emulsions, turbulent fluids, and biological media are notable examples of optically inhomogeneous media [9–15].

Scattered light is commonly split into a coherent component and a diffuse or incoherent one [1,3,16]. The sum of both components gives the total optical fields. The coherent component corresponds to the average electromagnetic fields, whereas the incoherent or diffuse component corresponds to the fluctuations around the average. Since the power flux is determined by the magnitude square of electromagnetic fields, both components carry optical energy. Inhomogeneities at an interface can result in light scattering and contribute to an incoherent or

diffuse component and a coherent component of light [16,17]. In many problems, light scattering occurs within the bulk and at the interface of the inhomogeneous medium [18,19]. However, in some problems most of the scattering occurs at the interface, and the surface's optical reflectivity can be the best option to investigate the inhomogeneous medium.

Understanding the reflection of light from an interface with an inhomogeneous medium can have many applications [1]. Here we are specifically interested in the optical reflectivity of flat interfaces with an inhomogeneous medium consisting of distinct regions of space, large compared to the wavelength of light, with two or more discrete values of the RI, which in general may be considered complex quantities. For simplicity we may refer to regions of different RI embedded in a boundless medium as particles. By reflectivity we mean the directional-directional reflectance. That is, we assume the incident light arrives at a specific angle of incidence and the reflected light is measured in the specular direction. It might be also called the collimated-to-collimated reflectance. The detector must be such that all the coherently scattered light is captured. However, we must bear in mind that, depending on the size of the particles and the areas of contact with the interface, the incoherent component of light may be distributed very close to the specular

Optical device and methodology for optical sensing of hemolysis in hypotonic media

Roberto Márquez-Islas¹ , Argelia Pérez-Pacheco¹, Laura Beatriz Salazar-Nieva², Anays Acevedo-Barrera³, Emma Mendoza-García⁴ and Augusto García-Valenzuela³

¹ Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, Dr. Balmis No.148, Colonia Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc, Ciudad de México 06726, México

² Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México 04510, México

³ Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-185, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México 04510, México

⁴ Laboratorio de Hematología Especial, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, Dr. Balmis No.148, Colonia Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc Ciudad de México 06726, México

E-mail: roberto.marquez@icat.unam.mx

Received 17 October 2019, revised 9 March 2020

Accepted for publication 27 March 2020

Published 16 June 2020



CrossMark

Abstract

Identifying abnormalities in red blood cells can provide important medical clues for the diagnosis, prognosis, and treatment of some health disorders. A common test used to examine the conditions of erythrocytes in humans is osmotic fragility. The standard technique to determine the osmotic fragility of red blood cells is laborious and time-consuming, and provides only approximate values with a few experimental data. In this work, we propose and investigate a way to measure the osmotic fragility of erythrocytes, rapidly and in a straightforward, more quantitative and less laborious way, with an optical sensor. The basic idea is monitoring in real time the refractive index of a suspension of erythrocytes to follow the kinetics of their lysis as the hemoglobin-rich cytosol is released from the erythrocytes in the surrounding hypotonic solution during hemolysis, resulting in an increase of the refractive index. We propose a device to measure in real time the refractive index and demonstrate the feasibility of monitoring the hemolysis process with high resolution. Our results show that the release of hemoglobin-rich cytosol during the progress of the hemolysis of erythrocytes in hypotonic media is generally an exponential-like function of time. We provide a mathematical model that reproduces experimental curves effectively. We show results for erythrocytes obtained from human blood stored in a blood bank and from volunteers diagnosed with two different types of anemia: hemolytic and drepanocytic. We define times, measurable from the kinetics of the refractive index signal, to quantify the progress of hemolysis as a possible new method of measuring osmotic fragility.

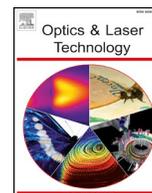
Keywords: medical optics instrumentation, reflection, sensors, cell analysis, total internal reflection, refractive index measurements

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

The analysis of biofluids in the human body, even small amounts, can provide relevant physiological information of

medical importance [1–6]. Many methods have been proposed to analyze biofluids [7, 8]. We can mention a few of the main works in this field: study of changes in the scattering properties of whole blood, correlating them with a difference in



Full length article

Fast and accurate optical determination of gold-nanofilms thickness

V. Solis-Tinoco^{a,*}, A. Acevedo-Barrera^a, O. Vazquez-Estrada^b, J. Munguia-Cervantes^c,
N. Hernandez-Como^c, Luis.F. Olguin^d, A. Garcia-Valenzuela^a^a Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico^b Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca, División de Ingeniería Electrónica, Veracruz 92100, Mexico^c Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 07738, Mexico^d Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

HIGHLIGHTS

- Optical determination of gold-nanofilms thickness.
- Adhesive layer and nanodefects analysis.
- Measurement of the internal TM reflectivity as a function of the angle of incidence.

ARTICLE INFO

Keywords:

Nanotechnology
Gold nanofilm
Thickness
Reflectivity

ABSTRACT

We propose and investigate an alternative optical method to determine the thickness of metallic nanofilms thinner than about 50 nm deposited on glass substrates. The method consists of measuring the internal TM reflectivity as a function of the angle of incidence and fitting the curve with Fresnel formulae for a bilayer system to find the film thickness. Gold nanofilms were fabricated by electron beam evaporation (nominal thicknesses of 20 nm, 30 nm and 50 nm) and characterized by common methods (SEM, AFM, Profilometer). The reflectivity curve of TM (or *p*) polarized light presents a clear peak around the critical angle with air and then a dip due to the excitation of a surface plasmon-polariton mode at the gold/air interface. Fitting the theoretical model around the reflectivity peak readily gives the film's thickness, and fitting other sections of the curve away from the critical angle with air without altering the fit around the peak, provides the thickness and effective refractive index of the adhesive layer (Cr, Ti). The present approach to gold nanofilm's thickness measurement is robust and expeditious. It is less sensitive to surface roughness, contamination and nanofabrication defects such as nanometer sized holes.

1. Introduction

An important motivation of nanotechnology is to develop reproducible nanodevices fabricated with large-scale and low-cost techniques in as short a time as possible. For instance, the quality of the fabrication of nanostructures (e.g., size, geometry, separation, thickness) is critical to guarantee their operation or excite a specific property [1–4]. Electron beam evaporation is one of the fabrication techniques most used for depositing metals (e.g., Au, Cr, Ti, Al) of size smaller than 100 nm. For this, the control of the thicknesses of the deposited metal films is crucial to ensure the quality and operation of the devices [5–11]. Particularly, manufacturing and studying thin film surfaces is a very useful option to characterize materials with important applications in the field of chemistry, optics and electronics [12–14].

However, measuring thicknesses of metal nanolayers thinner than 50 nm by standard methods is time consuming and not very accurate. The most commonly used characterization techniques have several disadvantages. For example, the thickness measurement by Atomic Force Microscopy (AFM) [15–17] depends on the mechanisms of the tip-sample interaction, and the system must be isolated from external vibrations. Contact profilometry [18] requires a flat surface as a reference, and it does not distinguish between the surface contamination and the sample. In addition, a lithography process is commonly necessary to define an abrupt layer step to improve the accuracy of the AFM or profilometry measurement. Electronic scanning microscope (SEM) [19–20] is a costly and time-consuming service, it requires vacuum conditions and a cross section of the sample to measure its thickness which implies a careful sample preparation methodology. The

* Corresponding author.

E-mail address: irais.solis@icat.unam.mx (V. Solis-Tinoco).



Basic optical sensor for monitoring leukocyte properties in suspension

A. Pérez-Pacheco¹ · N. E. Álvarez-Chávez² · I. Olarte-Carrillo³ · A. Martínez-Tovar³ · R. Márquez-Islas¹ · A. Acevedo-Barrera⁴ · A. García-Valenzuela⁴

Received: 27 March 2020 / Accepted: 30 December 2020

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

The aim of this work is to propose and evaluate a suitable sensor to determine the leukocyte density in suspension. This sensor could be used to development of a home device that allows having relevant medical information on the leukocytes of an individual. To this end, we investigate a simple optical device to measure the average extinction coefficient of leukocytes in suspension. This is equivalent to the measurement of the so-called optical density of cell's suspensions, extensively used in microbiology laboratories. The device utilizes a LED to illuminate a large volume of the sample and a simple lens to collect the coherently scattered light into a photodetector. The resulting transmittance signal has a high signal-to-noise ratio and follows Beer Lambert's law, thus, allowing a straightforward measure of leukocytes average optical properties in suspension or number-density. Compared to the standard way of measuring the optical density of cells suspensions, the proposed device is much simpler and robust. Measurements are insensitive to settling of cells during measurements. The proposed device could be the basis for designing a 'point-of-care' device to follow up progress of leukemia patients at home.

Keywords Coherent transmittance · Biological cell suspensions · Leukocytes · Scattering

✉ A. Pérez-Pacheco
argeliapp@ciencias.unam.mx

¹ Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT), Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Dr. Balmis 148, Cuauhtémoc, Doctores, Mexico City, CDMX 06726, Mexico

² Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, CDMX 04510, Mexico

³ Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Hematología, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Mexico City, CDMX 06726, Mexico

⁴ Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-186, Mexico City, CDMX 04510, Mexico



Probing bio-tissue films by optical internal reflectivity: modeling and measurements

ANAYS ACEVEDO-BARRERA*  AND AUGUSTO GARCÍA-VALENZUELA 

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-186, Ciudad de México 04510, Mexico

*Corresponding author: anays.acevedo@icat.unam.mx

Received 7 June 2021; revised 26 August 2021; accepted 28 August 2021; posted 30 August 2021 (Doc. ID 433499); published 20 September 2021

In this paper, we develop a detailed theoretical model for the optical reflectivity of a bio-tissue film confined between two flat interfaces based on the anomalous-diffraction approximation. We consider bio-tissue films consisting of a few layers of spheroidal cells surrounded by extracellular medium. We explore numerically the predictions of our model and compare them with simple effective medium theories, sometimes used as a first attempt to understand the optical properties of biological media. Then, we fit the model to experimental reflectivity-versus-angle-of-incidence curves of confined whole-blood films measured in an internal reflection configuration. Measurements were performed by confining a drop of fresh blood between a prism and a coverslip. Our experimental results show that it is possible to measure the coherent reflectance with small enough error to infer microstructural parameters with a good precision. The errors in measuring the coherent reflectance depend on the reflectivity magnitude. For instance, for a reflectivity of about 0.3 the error is below 2%, and the refractive indices of cells and surrounding medium can be obtained with a precision better than 1%. These results also indicate that the present model can readily be used to figure out the physical changes experienced at the microscale in bio-tissue films during a physicochemical process. © 2021 Optical Society of America

<https://doi.org/10.1364/AO.433499>

1. INTRODUCTION

Optical techniques have many applications in the analysis of biological tissues and medical-diagnostics instrumentation [1,2]. Regarding medical diagnostics, optical methods stand out mostly because of their noninvasive character and the small amount of sample requirements for measurements. Understanding light propagation in biological media is an essential tool in the development of new optical instruments and biosensors for medical applications [2–6]. However, biological media are generally inhomogeneous and anisotropic. Thus, modeling the interaction of light with biological material, such as tissues or cells' suspensions, requires taking into account the scattering and absorption by cells. Even though the propagation of light in biological media has extensively been studied, there are still many challenges remaining [7]. There are many cases where no practical models for the interaction of light with biological media are applicable. Such is the case, for instance, of the reflectivity of thin confined bio-tissue films. Here, we refer to a bio-tissue film as a few layers of cells embedded in a biocompatible matrix.

Transmitted and reflected light by an inhomogeneous medium are usually divided in a coherent and a diffuse component. The coherent component is associated to the average of the electromagnetic (EM) fields over all the permitted

configurations of the system and the diffuse component relates to fluctuations around the average [8–11]. In general, the propagation, reflection, and transmission of the coherent component is simpler to model and understand than for the diffuse component. Thus, when possible it is more attractive to use the coherent component of light to interrogate biological media and obtain microstructural and composition information. The coherent component's propagation can be described with an effective propagation constant in an equivalent homogeneous medium and sometimes can be interpreted as an effective refractive index (RI) [12–14]. For instance, the coherent component refracts following Snell's law with a complex effective refractive index and attenuates accordingly with the imaginary part of this effective refractive index.

However, when inhomogeneities are large compared to the wavelength of the incident light (as the case of biological cells illuminated with visible light) the corresponding effective RI has non-local nature, and it is not possible to use an effective refractive index in reflection formulas, such as Fresnel's equations [14]. Also, in biological media, the intensity of the coherent component decays rapidly as it propagates due to strong scattering by the cells. Thus, only bio-tissue films of thickness comparable to the penetration depth of the coherent component can be probed.

Analysis of wavelength-scale 1D depth-dependent refractive-index gradients at an interface by their effects on the internal reflectance near the critical angle

OMAR VÁZQUEZ-ESTRADA,¹ ANAYS ACEVEDO-BARRERA,²  ALEXANDER NAHMAD-ROHEN,^{2,*} 
AND AUGUSTO GARCÍA-VALENZUELA² 

¹Tecnológico Nacional de México/ITS de Tantoyuca, Desviación Lindero Tametate S/N, La Morita, Tantoyuca, Veracruz, Mexico

²Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Avenida Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico

*Corresponding author: alexander.nahmad@icat.unam.mx

Received 14 June 2021; revised 1 August 2021; accepted 15 August 2021; posted 16 August 2021 (Doc. ID 434090); published 24 September 2021

Light's internal reflectivity near a critical angle is very sensitive to the angle of incidence and the optical properties of the external medium near the interface. Novel applications in biology and medicine of subcritical internal reflection are being pursued. In many practical situations, the refractive index of the external medium may vary with respect to its bulk value due to different physical phenomena at surfaces. Thus, there is a pressing need to understand the effects of a refractive-index gradient at a surface for near-critical-angle reflection. In this work, we investigate theoretically the reflectivity near the critical angle at an interface with glass assuming the external medium has a continuous depth-dependent refractive index. We present graphs of the internal reflectivity as a function of the angle of incidence, which exhibit the effects of a refractive-index gradient at the interface. We analyze the behavior of the reflectivity curves before total internal reflection is achieved. Our results provide insight into how one can recognize the existence of a refractive-index gradient at the interface and shed light on the viability of characterizing it. © 2021 Optical Society of America

<https://doi.org/10.1364/OL.434090>

Total internal reflection (TIR) occurs at a flat interface between two transparent media in an internal-reflection configuration for angles of incidence greater than the critical angle. By internal-reflection configuration it is meant that light is incident from a medium of higher refractive index (RI) than that of the external medium. For angles of incidence slightly smaller than the critical angle, the reflectivity has a steep dependence on the angle of incidence. Ideally, for an incident plane wave, the angular derivative of the reflectance diverges as the angle of incidence approaches the critical angle from the smaller-angle side and is identically zero for larger angles of incidence. Therefore, at the critical angle there is an infinitely large discontinuity in the angular derivative of the reflectance. Locating the critical

angle for light reflection in an internal-reflection configuration is thus a convenient and accurate way of measuring the RI of the external medium, assuming that of the internal medium is known. This is the working principle of Abbe and Abbe-type refractometers [1–7].

TIR microscopy and TIR fluorescence (TIRF) microscopy are established techniques used in physics and biology to track single molecules and record concentration maps of molecules near a glass interface [8–11]. TIRF microscopy uses light incident from the glass side at a well-defined angle of incidence above the critical angle. Only a thin layer of the external medium is illuminated by an evanescent wave. The penetration depth of light can be controlled with the angle of incidence, allowing depth information to be obtained. Recently, near-TIR microscopy was proposed as a technique able to image molecular interactions on a glass surface [12] and to map the local RI inside cells [13]. This technique employs the steep increase in the reflectivity with the angle of incidence just before the critical angle to achieve high sensitivity in refractive-index measurement. However, the reflectivity near the critical angle is very sensitive to the surface conditions at the wavelength scale. A thin layer with a different RI between the interior of a cell and the medium of incidence must be considered. The practicality and high sensitivity of near-critical-angle reflectometry [6,12,13] lead to exciting new applications.

In view of the aforementioned works, we may ponder the relevance of a refractive-index gradient in the external medium in an internal-reflection configuration. Refractive-index gradients can appear in many physical systems due to concentration or temperature gradients at the interface. Concentration gradients can in turn occur due to flows, sedimentation, diffusion processes, ablation processes, etc. Other systems, such as a disordered monolayer of transparent particles, can be studied as an equivalent graded-refractive-index film (GRIF) [14], reproducing the reflectivity predictions of more sophisticated multiple-scattering models for sub-wavelength particle sizes at

Referencias

- [1] T. Vo-Dinh, ed., "Biomedical Photonics Handbook," 1ra ed. (CRC Press LLC, 2003).
- [2] V. V. Tuchin, "Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis," 3ra ed. (SPIE, 2015).
- [3] B. V. Bronk, W. P. van de Merwe, and M. Stanley, "In Vivo Measure of Average Bacterial Cell Size From a Polarized Light Scattering Function," *Cytometry* 13, 155-162 (1992).
- [4] C. Boudoux, *Fundamentals of Biomedical Optics*, 1st ed. (Pollux, 2017).
- [5] D. Malacara, "VI.7. Refractómetros," en *Óptica Básica*, 3ra ed. (FCE, 2015), pp. 158-161.
- [6] A. García-Valenzuela, H. Contreras-Tello, R. Márquez-Islas, y C. Sánchez-Pérez, "Rigorous modelling of light's intensity angular-profile in Abbe refractometers with absorbing homogeneous fluids," *J. Phys. Conf. Ser.* 450, (2013).
- [7] D. R. Huffman y C. F. Bohren, "1.4 Collections of Particles," en *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (Wiley, 1998), p. 9.
- [8] A. Acevedo-Barrera and A. García-Valenzuela, "Analytical approximation to the complex refractive index of nanofluids with extended applicability," *Opt. Express* 27, (2019).
- [9] A. Nahmad-Rohen, H. Contreras-Tello, G. Morales-Luna, and A. García-Valenzuela, "On the effective refractive index of blood," *Phys. Scr.* 91, 15503 (2015).
- [10] A. Pérez-Pacheco, N. E. Álvarez-Chávez, I. Olarte-Carrillo, A. Martínez-Tovar, R. Márquez-Islas, A. Acevedo-Barrera, and A. García-Valenzuela, "Basic optical sensor for monitoring leukocyte properties in suspension," *Opt. Quantum Electron.* 53, (2021).
- [11] G. Morales-Luna, A. García-Valenzuela, y R. G. Barrera, "Optical Coherent Reflection from a Confined Colloidal Film: Modeling and Experiment," *J. Phys. Chem. B* 122, 8570-8581 (2018).
- [12] J. Mendelson, Y. Kent, "An In Vitro Tissue Model for Evaluating the Effect of Carboxyhemoglobin Concentration on Pulse Oximetry," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 36, 625-627 (1989).
- [13] D. R. Marble, D. H. Burns, and P. W. Cheung, "Diffusion-based model of pulse oximetry: in vitro and in vivo comparison," *Appl. Opt.* 33, 1279-1285 (1994).
- [14] I. V. Meglinskii, A. N. Korolevich, and V. V. Tuchin, "Investigation of Blood Flow Microcirculation by Diffusing Wave Spectroscopy," *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 29, 535-548 (2001).
- [15] H. Cheng, Q. Luo, Q. Liu, Q. Lu, H. Gong, and S. Zeng, "Laser Speckle Imaging of Blood Flow in Microcirculation," *Phys. Med. Biol* 49, 1347-1357 (2004).

- [16] M. I. Mishchenko, L. D. Travis, and A. A. Lacis, *Multiple Scattering of Light by Particles: Radiative Transfer and Coherent Backscattering* (Cambridge University Press, 2006).
- [17] A. Ishimaru, *Wave Propagation and Scattering in Random Media* (Wiley-IEEE Press, 1999).
- [18] O. Vázquez-Estrada and A. García-Valenzuela, "Reflectivity and transmissivity of a surface covered by a disordered monolayer of large and tenuous particles: theory versus experiment," *Appl. Opt.* 56, 7158 (2017).
- [19] H. C. van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles* (Wiley, 1957).
- [20] W. A. Farone and M. J. Robinson, "The range of validity of the anomalous diffraction approximation to electromagnetic scattering by a sphere," *Appl. Opt.* 7, 643-645 (1968).
- [21] R. E. Collin, "Aperture-Type Antennas," in *Antennas and Radiowave Propagation*, 1st ed. (McGraw-Hill, 1985), pp. 164-168.
- [22] O. Vázquez-Estrada, "Reflectividad óptica de películas inhomogéneas y su aplicación a sensores," Universidad Nacional Autónoma de México (2017).
- [23] P. Chýlek and J. Klett, "Extinction cross sections of nonspherical particles in the anomalous diffraction approximation," *J. Opt. Soc. Am. A* 8, 274-281 (1991).
- [24] G. J. Streekstra, A. G. Hoekstra, and R. M. Heethaar, "Anomalous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: applications in ektacytometry," *Appl. Opt.* 33, 7288-7296 (1994).
- [25] L. A. Liotta, M. Ferrari, and E. Petricoin, "Written in blood," *Nature* 425, 905 (2003).
- [26] A. C. Guyton and J. E. Hall, "Red Blood Cells, Anemia, and Polycythemia," in *Textbook of Medical Physiology*, 7th ed. (Elsevier Inc., 2006).
- [27] K. Lichtman M, P. J. K, L. M, and A. J, Williams Hematology, 9th ed. (McGraw Hill Education), 2016).
- [28] HeeSu Byuna, T. R. Hillmanb, J. M. Higginsc, M. Diez-Silvae, Z. Penge, M. Daoe, S. S. Ramachandra R. Dasarib, and Y. Parka, "Optical measurement of biomechanical properties of individual erythrocytes from a sickle cell patient," *Acta Biomater* 8, 4130-4138 (2012).
- [29] H. Liebman and I. Weitz, "Autoimmune Hemolytic Anemia," *Med. Clin. North Am.* 101, 351-359 (2017).
- [30] Y. Alonso-Geli, Y. Alonso-Moreno, L. E. José Falcón-Diéguez, E. Liset Lucambio-Miró, and E. Mariana Castro-Piñol, "Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica," *Rev. Cuba. Quím* (2015).
- [31] Z. Saleh, H. Giti, G. Asghar, P. R. Shahrokh, and S. Nilufar, "Hematological parameters and osmotic fragility of red blood cells in experimentally induced hyperthyroidism in rats," *Med. Int. J. Endocrinol. Metab.* 8, 74-78 (2010).
- [32] D. L. Shaffer, J. R. Werber, H. Jaramillo, S. Lin, and M. Elimelech, "Forward osmosis: Where are we now?," *Desalination* 356, 271-284 (2015).
- [33] A. Pribush, D. Meyerstein, and N. Meyerstein, "Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1558, 119-132 (2002).
- [34] A. Acevedo-Barrera, D. Cerecedo, and A. García-Valenzuela, "Viability and resolution of sensing hemolysis with a capacitive sensor," *Rev. Médica del Hosp. Gen. México* 83, 5-12 (2020).
- [35] P. Mazon, J. Didelon, S. Muller, and J.-F. Stoltz, "A Theoretical Approach of the Measurement of Osmotic Fragility of Erythrocytes by Optical Transmission," *Photochem. Photobiol.* 72, 172 (2000).
- [36] A. Pérez-Pacheco, L. B. Salazar-Nieva, A. García-Valenzuela, E. R. Mendoza-García, A. Martínez-Tovar, I. Olarte-Carrillo, and R. Márquez-Islas, "Erythrocytes' osmotic fragility test with a standard Abbe refractometer," *Rev. Médica del Hosp. Gen. México* 83, 20-25 (2020).

REFERENCIAS

- [37] R. Márquez-Islas, A. Pérez-Pacheco, L. B. Salazar-Nieva, A. Acevedo-Barrera, E. Mendoza-García, and A. García-Valenzuela, "Optical device and methodology for optical sensing of hemolysis in hypotonic media," *Meas. Sci. Technol.* 31, (2020).
- [38] R. G. Barrera and A. García-Valenzuela, "Coherent reflectance in a system of random Mie scatterers and its relation to the effective-medium approach," *J. Opt. Soc. Am. A* 20, 296-311 (2003).
- [39] A. García-Valenzuela, R. G. Barrera, C. Sánchez-Pérez, A. Reyes-Coronado, and E. R. Méndez, "Coherent reflection of light from a turbid suspension of particles in an internal-reflection configuration: Theory versus experiment," *Opt. Express* 13, 6723-6737 (2005).
- [40] M. Friebel and M. Meinke, "Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250-1100 nm dependent on concentration," *Appl. Opt.* 45, 2838-2842 (2006).
- [41] M. Born and E. Wolf, "1.5.2 Fresnel formulae," in *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*, 7th ed. (Cambridge University Press, 1999), p. 40.
- [42] E. Hecht, "4.6.2 The Fresnel Equations," in *Optics* (2017), p. 725.
- [43] "RefractiveIndex.INFO," <https://refractiveindex.info>
- [44] H. Rondon-Berrios, C. Argyropoulos, T. S. Ing, D. S. Raj, D. Malhotra, E. I. Agaba, M. Rohrscheib, Z. J. Khitan, G. H. Murata, J. I. Shapiro, and A. H. Tzamaloukas, "Hypertonicity: Clinical entities, manifestations and treatment," *World J. Nephrol.* 6, 1 (2017).
- [45] R. S. Franco, "Measurement of red cell lifespan and aging," *Transfus. Med. Hemotherapy* 39, 302-307 (2012).
- [46] A. Acevedo-Barrera, O. Vázquez-Estrada, and A. García-Valenzuela, "Optical reflectivity of an interface with random refractive-index-contrast patterns," *Appl. Opt.* 59, D221 (2020).
- [47] M. Born and E. Wolf, "8.5 Fraunhofer diffraction at apertures of various forms," in *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*, 7th ed. (Cambridge University Press, 1999), p. 436.
- [48] M. Nieto-Vesperinas, *Scattering and Diffraction in Physical Optics*, 2nd Editio (John Wiley & Sons, Inc., 2006).
- [49] V. J. Morris and B. R. Jennings, "Anomalous diffraction approximation to the low-angle scattering from coated spheres: A model for biological cells," *Biophys. J.* 17, 95-101 (1977).
- [50] G. L. Stephens, "Scattering of planewaves by soft obstacles: anomalous diffraction theory for circular cylinders," *Appl. Opt.* 23, 954-959 (1984).
- [51] O. Vazquez-Estrada and A. García-Valenzuela, "Collimated light reflection and transmission of a surface partially covered by large and tenuous particles," *Appl. Opt.* 55, 8657-8666 (2016).
- [52] P. Beckmann and A. Spizzichino, *The Scattering of Electromagnetic Waves from Rough Surfaces* (MacMillan, 1963).
- [53] A. G. Voronovich, *Wave Scattering from Rough Surfaces* (Springer Berlin Heidelberg, 1999).
- [54] W. Frei, "How to Model the Optical Properties of Rough Surfaces," <https://www.comsol.se/blogs/how-to-model-the-optical-properties-of-rough-surfaces/>.
- [55] P. Dechaumphai, *Finite Element Method: Fundamentals and Applications* (Alpha Science International, 2010).
- [56] COMSOL, "Wave optics module user's guide," <https://www.comsol.com/wave-optics-module>.
- [57] K. Yoshida, K. Ohkubo, N. Ojima, and K. Iwata, "Application of the critical angle method to refractive index measurement of human skin in vivo under partial contact," *J. Biomed. Opt.* 18, (2013).

- [58] H. Ding, J. Q. Lu, K. M. Jacobs, and X.-H. Hu, "Determination of refractive indices of porcine skin tissues and Intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm," *J. Opt. Soc. Am. A* 22, 1151 (2005).
- [59] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel, and X. H. Hu, "Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm," *Phys. Med. Biol.* 51, 1479-1489 (2006).
- [60] J. Wang, Q. Ye, Z.-C. Deng, W.-Y. Zhou, T.-Q. Sun, C.-P. Zhang, and J.-G. Tian, "Effect of tissue fluid on accurate determination of the complex refractive index of animal tissue," *J. Biomed. Opt.* 17, (2012).
- [61] J. S. Park, Y. Lie, H.-J. Kim, H.-C. Kim, and I. I. Kim, "Development of aperture total internal reflection (A-TIR) for micro droplets and fingerprint patterns characterization," *Opt. Commun.* 453, 124414 (2019).
- [62] I. N. Pavlov, B. S. Rinkevichyus, and A. V. Tolkachev, "A setup for visualizing the evaporation of a liquid drop using the method of frustrated total internal reflection of a laser beam," *Instruments Exp. Tech.* 56, 242-246 (2013).
- [63] G. Luna and A. Garcia, "Viability and fundamental limits of critical-angle refractometry of turbid colloids," *Meas. Sci. Technol.* 28, (2017).
- [64] S. Liu, Z. Deng, J. Li, J. Wang, and N. Huang, "Measurement of the refractive index of whole blood and its components for a continuous spectral region," *J. Biomed. Opt.* 24, 1 (2019).
- [65] A. Acevedo-Barrera and A. García-Valenzuela, "Probing bio-tissue films by optical internal reflectivity: modeling and measurements," *Appl. Opt.* 60, 8588 (2021).
- [66] D. J. Griffiths, "The Dirac Delta Function," in *Introduction to Electrodynamics*, 3rd ed. (Prentice-Hall, 1999), pp. 45-51.
- [67] G. P. Ortiz and W. L. Mochán, "Nonadditivity of Poynting vector within opaque media," *J. Opt. Soc. Am. A* 22, 2827 (2005).
- [68] A. G. Borovoi, E. I. Naats, and U. G. Oppel, "Scattering of light by red blood cells," *J. Biomed. Opt.* 3, (1998).
- [69] E. N. Lazareva and V. V. Tuchin, "Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range," *J. Biomed. Opt.* 23, 1 (2018).
- [70] D. H. Tycko, M. H. Metz, E. A. Epstein, and A. Grinbaum, "Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration," *Appl. Opt.* 24, 1355 (1985).
- [71] M. Meinke, G. Müller, J. Helfmann, and M. Friebel, "Optical properties of platelets and blood plasma and their influence on the optical behavior of whole blood in the visible to near infrared wavelength range," *J. Biomed. Opt.* 12, 014024 (2007).
- [72] I. Y. Yanina, E. N. Lazareva, and V. V. Tuchin, "Refractive index of adipose tissue and lipid droplet measured in wide spectral and temperature ranges," *Appl. Opt.* 57, 4839 (2018).
- [73] N. Ghosh, P. Buddhiwant, A. Uppal, S. K. Majumder, H. S. Patel, and P. K. Gupta, "Simultaneous determination of size and refractive index of red blood cells by light scattering measurements," *Appl. Phys. Lett.* 88, 1-4 (2006).
- [74] K. V. Gilev, M. A. Yurkin, E. S. Chernyshova, D. I. Strokotov, A. V. Chernyshev, and V. P. Maltsev, "Mature red blood cells: from optical model to inverse light-scattering problem," *Biomed. Opt. Express* 7, 1305 (2016).
- [75] X. Xu, J. Lin, and F. Fu, "Optical coherence tomography to investigate optical properties of blood during coagulation," *J. Biomed. Opt.* 16, 096002 (2011).

REFERENCIAS

- [76] D. J. Vitello, R. M. Ripper, M. R. Fettiplace, G. L. Weinberg, and J. M. Vitello, "Blood Density Is Nearly Equal to Water Density: A Validation Study of the Gravimetric Method of Measuring Intraoperative Blood Loss," *J. Vet. Med.* 2015, 1-4 (2015).