



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**Diseño y construcción de un mini
microscopio de fluorescencia de
bajo costo**

TESIS

Que para obtener el título de
Ingeniero eléctrico electrónico

P R E S E N T A

Luis Gerardo Gutiérrez Trejo

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Laura Adriana Oropeza Ramos



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018

Índice General

Agradecimientos.....	4
Introducción	5
Objetivo.....	6
Objetivo particular	6
1. Capítulo 1. Antecedentes.....	7
1.1. Microscopio	7
1.1.1. Historia	7
1.1.2. Definición y clasificación de microscopio	8
1.1.3. Óptica del microscopio y partes que lo componen.....	9
1.2. Microscopio de fluorescencia	15
1.2.1. Fluorescencia y principales aplicaciones	15
1.2.2. Principio de funcionamiento.....	18
1.3. Mini microscopio de bajo costo	19
1.3.1. Métodos de construcción	20
1.3.2. Antecedentes de mini microscopio de fluorescencia de bajo costo	21
2. Capítulo 2. Criterios de diseño.....	23
2.1. Prototipo #1	24
2.1.1. Experimento Inicial	24
2.1.2. Construcción y experimentación	26
2.1.2.1. Magnificación y campo de visión.....	28
2.1.3. Criterio de diseño para el prototipo #2	30
2.2. Prototipo #2	30
2.2.1. Estructura mecánica.....	31
2.2.2. Sistema eléctrico de iluminación	35
2.2.3. Pruebas de funcionamiento	37
3. Capítulo 3. Diseño y construcción	42
3.1. Diseño final.....	43
3.1.1. Diseño mecánico.....	43
3.1.2. Diseño eléctrico	46
3.1.3. Construcción	47
3.1.4. Pruebas de funcionamiento	47
3.1.4.1. Modalidad de microscopio óptico convencional.....	47
3.1.4.2. Modalidad de microscopio de fluorescencia.....	48
4. Capítulo 4. Caracterización del mini microscopio.....	49
4.1. Arreglo experimental	49

4.1.1.	Preparación de diferentes concentraciones de fluoresceína	50
4.1.2.	Comparación de la detección de fluorescencia con un microscopio comercial.....	51
4.1.2.1.	<i>Detección #1 de concentraciones</i>	53
4.1.2.2.	<i>Detección #2 de concentraciones.</i>	57
4.2.	Análisis de resultados.....	60
4.2.1.	Análisis de Detección #1	60
4.2.2.	Análisis de Detección #2	60
4.2.3.	Comparación cualitativa de resultados con estudio de espectrometría de fluorescencia	62
4.3.	Otras comparaciones.....	63
4.3.1.	Ecónomica.....	63
4.3.2.	Comparación de la calidad de las imágenes	64
4.3.3.	Ventajas del mini microscopio.....	65
5.	Capítulo 5. <i>Conclusiones</i>	66
	Anexos.....	68
Anexo A.	Detalles de construcción del Prototipo #1.....	68
Anexo B.	Planos de construcción del Prototipo #2	69
Anexo C.	Imágenes del prototipo 2 construido.....	80
Anexo D.	Iluminación LED y Marcador fluorescente	82
Anexo E.	Hoja de especificaciones de LED RGB.....	87
Anexo F.	Construcción y prueba de filtros.	87
Anexo G.	Planos de construcción del diseño final	90
Anexo H.	Imágenes del diseño final construido.....	98
Anexo I.	Imágenes del experimento de validación con el microscopio comercial TCM 400 y el mini microscopio.	100
Anexo J.	Uso de las herramientas ROI y Multimeasure.	104
Anexo K.	Imágene y tablas del primer análisis de concentraciones.	106
Anexo L.	Imágenes y tablas del segundo análisis de concentración de fluoresceína.	108
	Bibliografía	114
	Enlaces web	115

Agradecimientos

Me gustaría agradecer de manera muy especial al apoyo otorgado por mi familia:

A mi madre por jamás dejarme de apoyar, ni en los momentos cuando más el viento soplaba en contra. Por siempre estar en las mañanas y las noches pendiente de todos sus hijos. Porque sin sus recomendaciones, nunca hubiera siquiera soñado con estar en esta bellísima institución.

A mi padre por ser el pilar de la familia que en ningún momento falló por darnos esta oportunidad de sin otra preocupación que no fuera estudiar. Por darme una clase diferente de impulso, que no se da con las palabras bonitas, sino con las situaciones difícil que en la vida he de encontrar.

A mis hermanos por entenderme mejor que nadie y por ser mi inspiración a seguir más allá de lo que pude imaginar y desarrollarme como un ejemplo para ellos.

Agradecer también a Alicia Mariano, cuyos consejos y experiencia me sirven en todo momento. Sus pláticas y compañía invaluable, y su bella y sencilla forma de ver la vida que hicieron que no perdiera el objetivo final.

A la Doctora Laura Oropeza por su gran paciencia y generosidad, por su experiencia y su gran oficio de formar a grandes personas. A los miembros del laboratorio donde encontré siempre una respuesta y algo nuevo que aprender.

Al Dr. Luis Olguín por su colaboración en todo momento, al Dr. Amado y a Sandra Sanchez del IIM de la Facultad de Ciencias por sus asesorías. A mis amigos y profesores que de alguna forma u otra, impulsaron mi andar a lo largo de mi carrera.

Y no olvidar a esta bella institución que me dio grandes logros en mi vida y que gracias a su formación, cosecharé más.

Introducción

El presente documento de tesis constituye la recopilación sintética de los trabajos de investigación sobre microscopía básica y su aplicación en el campo de la detección de muestras fluorescentes, así como del diseño, simulación, protipado, construcción y caracterización de un modelo funcional de microscopio fluorescente dentro de una modalidad de este tipo de instrumentos denominada *mini microscopios*, que se caracterizan por sus dimensiones reducidas, métodos de fabricación sencillos y costos bajos.

La importancia del presente trabajo recae en facilitar la realización de experimentos de fluorescencia que se especializan en llevar a cabo detecciones de puntos y comportamientos específicos bajo diferentes espectros de luz. La información que se puede obtener a través de este tipo de detecciones las vuelve versátiles, por lo que tienen una amplia aplicación en múltiples disciplinas, por ejemplo en biomedicina permitiendo realizar análisis basados en fluorescencia de observación de hepatocitos teñida con calceína / etodio homodímero-1 (EthD-1) antes y después del tratamiento con paracetamol dentro de incubadoras [14]. El tipo de medición descrita en este ejemplo resulta difícil de implementar usando tecnologías de microscopia de fluorescencia tradicionales.

La motivación principal de este trabajo fue crear un instrumento de dimensiones reducidas para la detección y observaciones de muestras tanto con luz blanca como por medio de microscopia de fluorescencia. Este instrumento fue diseñado tomando en cuenta que formará parte de una serie de instrumentos que conformen un mini laboratorio que deba ser portátil, barato y fácil de reproducir y mantener, con capacidad de realizar experimentos en lugares remotos o en situaciones que requieran monitoreo constante en condiciones de espacio reducido. Adicionalmente, existió una motivación personal de desarrollar un proyecto que involucrara áreas del conocimiento diferentes a mi especialidad y que sirviera a mi formación integral como ingeniero.

La base del diseño y la construcción de este instrumento se encuentra en la utilización de una cámara web y el método de lente invertida para la visualización magnificada de muestras, a lo que más adelante se les llama “mini microscopios” [13]. A partir de esto se realizaron pruebas de visualización de muestras magnificadas con de la cámara web y diversas computadoras para comprobar su facilidad de implementación y la nitidez de las imágenes. Posteriormente se crearon dos prototipos de validación: el primero sirvió para validar el método de construcción y la caracterización de la magnificación posible con el mismo; el segundo se creó para validar el principio del modelo publicado [14] y realizar experimentos de detección de fluorescencia.

Basándose en los resultados de estos primeros prototipos, surgieron las pautas para el modelo final que permitiera detectar fluorescencia y que posteriormente se usara para un experimento de caracterización con la intención de aterrizar cualitativa y cuantitativamente los resultados obtenidos en torno a su capacidad de detección, costo y las ventajas que presenta.

Se concluye que el instrumento generado constituye una mejora a lo que se ha publicado y abre una brecha de mejora continua para completar la idea de un laboratorio miniatura.

Objetivo

Realizar el diseño eléctrico, el diseño mecánico y llevar a cabo la construcción bajo un esquema de costo bajo, de un mini microscopio de fluorescencia capaz de detectar muestras de fluoresceína de manera cualitativamente similar a la detección que realiza un microscopio de fluorescencia comercial.

Objetivo particular

Caracterizar la sensibilidad y rango de detección del mini microscopio construido mediante un experimento de medición de intensidad de fluorescencia que arroje una curva característica de detección de fluoresceína.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. Microscopio

1.1.1. Historia

Los avances en la tecnología y la ciencia han perseguido, en la mayoría de las ocasiones, la meta de mejorar la calidad de vida. El desarrollo de los microscopios no se aleja de este camino dado su uso dentro de la medicina, la química, la biología, etc. Todos los microscopios tienen en común el auxiliar a los seres humanos en la observación de objetos y detalles miniatura, y la óptica como disciplina es la responsable del desarrollo de esta valiosa herramienta cuyo origen se remonta a los 1200 A.C. con la creación de los primeros espejos de cobre pulido; la ley de reflexión de Euclides y la distorsión de imágenes de Platón fueron los primeros registros del estudio de la luz en la antigüedad [1]. Por su parte la microscopía en la antigüedad se limitaba a la observación de cosas pequeñas a ojo desnudo, hasta que Séneca (4 a.C – 65 d.C), descubrió que al mirar a través de un recipiente esférico claro con agua clara escrituras con letras pequeñas, estas aumentaban su tamaño y cambiaban su forma.

Durante varios siglos se fabricaron instrumentos de visión con segmentos esféricos de minerales transparentes para ayudar a los ancianos a ver mejor y dentro del siglo XIV se hicieron los primeros vidrios de silicio en Italia, pero la superstición sobre ellos limitó y hasta prohibió su uso. El paso de los años demostró la utilidad de dicho invento y para el siglo XVI estos eran muy utilizados para mejorar la visión. El siglo XVII trajo consigo el desarrollo de piezas de vidrio en forma de *lentejas* para probar aumentos, dando así la denominación de lentes a estos materiales. Su principal uso se dirigió a los comerciantes como joyeros y mercaderes de tejidos para determinar la calidad de los productos, pero fue Galileo Galilei con sus observaciones astronómicas quién los usó con fines científicos [2].

Uno de los registros más antiguos de un microscopio fue el de Zacharias Jansen en 1608, con su microscopio de dos lentes convergentes. En 1611 el matemático y astrónomo Johannes Kepler (1571-1630) se percató de que el aumento de las imágenes se podía lograr también con el lente objetivo convexo (regularmente se hacía con cóncavo) y lente ocular convexo con la peculiaridad de que la imagen aparecía invertida. El ocular de Kepler sirvió para agrandar la imagen del objetivo, que es el principio de los microscopios de luz modernos. Así mismo explicó que los lentes convexos corregían la hipertrofia y los lentes cóncavos la miopía [3].

A partir de ese punto, la evolución de los microscopios estuvo de la mano de muchos científicos que adecuaban innovaciones como Robert Hooke, que en 1665, utilizando un microscopio óptico rudimentario reportó que todos los seres vivos están formados por unidades estructurales de vida llamadas *células*, O Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723) que logró una mejor forma de tallar lentes y obtener una amplificación de hasta 270 veces, con lo que fue el primero en observar protozoarios (1674) y posteriormente bacterias (1683).

Por otra parte, se empezó a desarrollar la teoría de la óptica y de la mano de Christian Huygens (1629-1695) se construyeron microscopios más poderosos con lentes plano-convexas de distintos tamaños. Sin embargo, aún existían dificultades para tener imágenes claras debido a las aberraciones cromáticas, apocromáticas, aplanáticas, etc. [4] A manera de solución, fue Joseph Jackson Lister en 1920 quién diseñó los microscopios acromáticos, y en años posteriores se desarrollaron las lentes apocromáticas y planapocromáticas y que estas últimas permitían la mayor cantidad de aberraciones y obtener imágenes sumamente nítidas.

Aunque el avance de la microscopía era lento y empírico, siempre fue constante. Carl Zeiss y Ernst Abbe sin embargo, produjeron microscopios de mejor calidad gracias a la teoría de formación de imágenes de Abbe en 1886. Poco después, el ímpetu por estudiar objetos, sistemas o microorganismos muy complejos de manera más específica utilizando el fenómeno de *fluorescencia*, observado por Sir David Brewster en 1833, abrió una nueva posibilidad. En 1903 se inventan tanto el filtro que deja pasar luz de UV (R.W. Wood) y bloquea la luz visible, y la invención de un microscopio con una fuente de luz UV (Köhler y von Rohr) para el estudio de tejidos auto fluorescentes. Finalmente, en 1911 Reichert construye el primer microscopio de fluorescencia comercial [5].

Estos descubrimientos y desarrollos fueron pilares fundamentales en diversas áreas del conocimiento a lo largo de 400 años (siglo XVII – siglo XXI), sin embargo, la microscopía óptica encuentra un límite cercano a 0.2 micrómetros de resolución con uso de medio acuoso y este no es posible mejorarlo debido al factor limitante de la longitud de onda (450-640nm) de la fuente de iluminación que se empleado para los mismos.

Fue hasta 1931 cuando se obtuvo una resolución 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico; a ésta generación se le conoce como microscopios electrónicos y posteriormente fueron los físicos Max Knoll y Ernst Ruska en Alemania quienes dieron a conocer el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) [2].

Aun cuando se han logrado imágenes de alta calidad de objetivos muy pequeños, la búsqueda por ver aún más allá persiste tanto por curiosidad científica como por desarrollo tecnológico orientado a la creación de sistemas y mecanismos micrométricos o nanométricos para aplicaciones médicas, industriales e incluso espaciales.

1.1.2. Definición y clasificación de microscopio

El microscopio es una herramienta utilizada por diversas disciplinas como la medicina, la biología y la química y con estrecha relación con la Ingeniería. Se define como cualquier instrumento que incrementa la resolución del ojo humano [3], y que, etimológicamente, corresponde a la conjunción de 2 palabras: *mikrós* que significa pequeño y *skopéoo* que significa observar, ambas de origen griego [4].

Derivado de lo visto en la historia de los microscopios, puede notarse que la diversidad de aplicaciones y usos de este instrumento es amplio, pero también especializado y su clasificación es necesaria. Una de las mejores formas de clasificarlos es en relación a la *fuentes de luz que emplean* para la formación de imágenes. Existen 2 tipos:

Microscopios fotónicos. - Microscopios cuya fuente de iluminación son fotones de un espectro determinado de longitud de onda (del ultravioleta al infrarrojo). Estos tienen una resolución máxima de aproximadamente de 0.2 micrómetros.

Microscopios electrónicos. - Microscopios que utilizan electrones en vez de fotones para formar imágenes de las muestras. Actualmente estos microscopios son capaces de entregar imágenes de muestras de 0.1 nanómetros de tamaño [4]. En la Tabla 1-1 se enlistan los más reconocidos según su fuente de iluminación.

TABLA 1-1. CLASIFICACIÓN DE ALGUNOS MICROSCOPIOS POR SU FUENTE DE ILUMINACIÓN[4].

Microscopio óptico	De luz ultravioleta
	Fluorescencia
	Petrográfico
	De campo oscuro
	De contraste de fases
	Luz polarizada
	Confocal
Microscopio electrónico.	Compuesto
	De Transmisión
	De barrido
	De sonda de barrido

1.1.3. Óptica del microscopio y partes que lo componen

Es notable que existen más variedad de microscopios fotónicos que electrónicos, esto se debe al tiempo que se le ha dedicado al estudio de la luz y de la óptica. El funcionamiento del microscopio, como muchos de los instrumentos grandes de la ciencia, se basa en conceptos físicos importantes de la óptica y sus leyes que se mencionan brevemente a continuación.

La óptica está definida como la ciencia que estudia los orígenes, la propagación y la detección de la luz y que luz se entiende no solo la radiación electromagnética visible, sino también la infrarroja y la ultravioleta [6]. Esta disciplina cuenta con una serie de leyes que describen el comportamiento la propagación de la luz y son conocidas como las Leyes de la óptica geométrica que se enuncian a continuación.

Ley de la propagación rectilínea: Establece que un haz de luz se propaga en trayectorias rectilíneas cuando se encuentra en un medio homogéneo. La aplicación más conocida de esta ley es el de la cámara fotográfica clara, expuesta en la Figura 1-1.

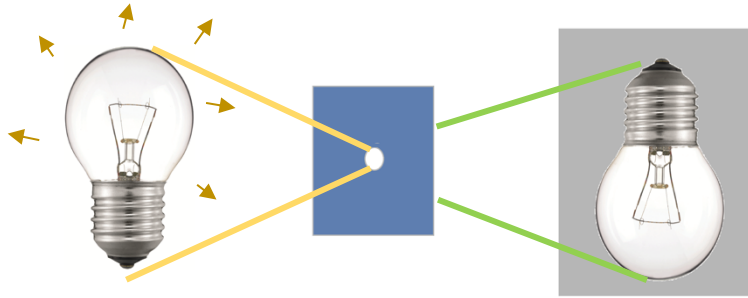


FIGURA 1-1. ESQUEMA QUE MUESTRA LA APLICACIÓN DE LA PROPAGACIÓN RECTILÍNEA EN LA CÁMARA CLARA [7].

Las dos leyes restantes son derivadas del paso de la luz por dos medios distintos, ambos homogéneos e isotrópicos, y la interacción con su frontera, idealmente una superficie plana.

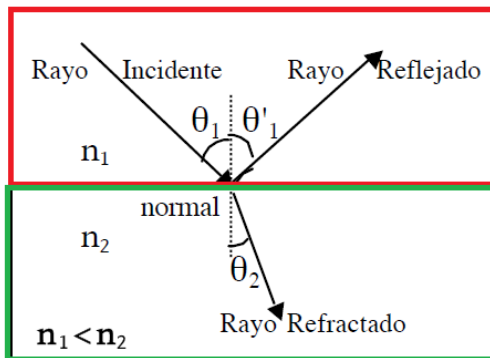


FIGURA 1-2. IMAGEN REPRESENTATIVA DE DOS MEDIOS (ROJO Y VERDE), Y UN RAYO DE LUZ INCIDENTE. TOMADA DE [A].

Este fenómeno provoca dos resultados: un rayo reflejado que regresa al medio del cual provino, y uno refractado que se conduce por el segundo medio como se muestra en la Figura 1-2.

Ley de reflexión: El rayo incidente y el rayo reflejado formarán ángulos iguales con la normal a la superficie de separación entre medios.

Ley de refracción: Sea θ_1 el ángulo entre el rayo incidente y la normal (comúnmente llamado ángulo de incidencia) y θ_2 el ángulo entre el rayo refractado y la normal (llamado ángulo de refracción), el cociente existente entre $\sin \theta_1 / \sin \theta_2$ es independiente al ángulo θ_1 . Dando como resultado una constante para ambos medios. Esta es también llamada Ley de Snell y se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = n_{12} \dots (1)$$

Así, n_{12} se conoce como *el índice de refracción* del segundo medio respecto al primero. Estos índices tienen la característica de que son recíprocos obedeciendo a esta relación $n_{12} = \frac{1}{n_{21}}$.

Esto implica afirmar que, si un haz de luz incide por el primer medio y continúa por el segundo, su trayectoria será la misma si incide desde el segundo medio hacia el primero, siempre y cuando el rayo de luz incida en el mismo ángulo como salió del primer medio. Cada medio traslúcido tiene su propio índice de refracción particular [7].

Además, para este trabajo, es necesario definir los conceptos de sistema óptico, lentes positivas, lentes negativas, imagen real, imagen virtual, foco y distancia focal.

Sistema óptico: Sistema compuesto por una sucesión de medios de diferentes índices de refracción separados [7].

Apegado a la definición anterior, una lente simple es un sistema óptico simple dado que al paso de un rayo de luz por él sufre refracción por dos distintos medios: ambiente (donde surge el rayo incidente) y el material de la lente (vidrio, policarbonato, etc) y de regreso al primer medio.

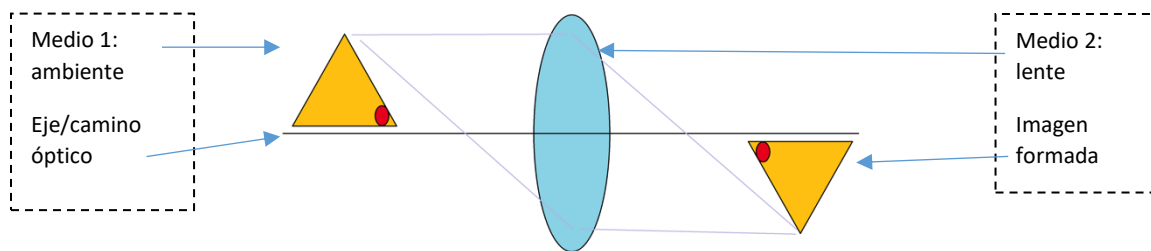


FIGURA 1-3. ESQUEMA DE LA FORMACIÓN DE UNA IMAGEN DE LA FIGURA FRENTE AL LENTE Y ESPECIFICANDO LOS MEDIOS POR LOS CUALES PASA: AIRE (AMBIENTE) Y MATERIAL DE LA LENTE.

Otro concepto que surge de la figura es el *eje óptico* que se define como línea imaginaria colocada en el centro del sistema óptico para tener todos los elementos alineados y con la característica de que es perpendicular al plano de la imagen.

Un sistema óptico para un microscopio puede estar formado por más de una lente debido a las características que estas ofrecen, y se dividen en dos grandes grupos: lentes positivas y lentes negativas [6].

Lentes positivas. También llamadas convergentes, son aquellas que, considerando un haz de rayos paralelos que inciden sobre ella, provoca que los rayos refractados converjan al punto llamado *foco* de la lente. Físicamente se caracterizan por ser más gruesas en su centro que en su periferia.

Lentes negativas. Llamadas también divergentes, son aquellas que, al contrario de las positivas, provoca que los rayos refractados diverjan del *foco*. Se caracterizan por ser más delgadas por el centro que en la periferia.

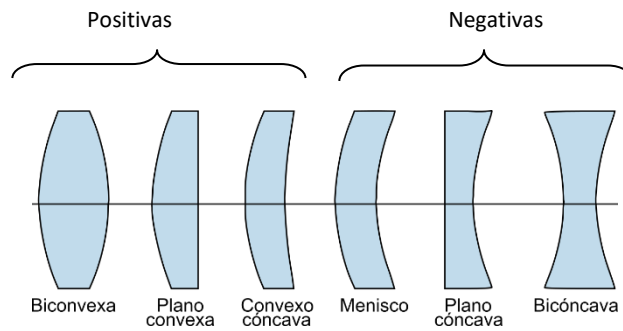


FIGURA 1-4. IMAGEN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LENTES SIMPLES ENUNCIADOS CON ANTERIORIDAD [6].

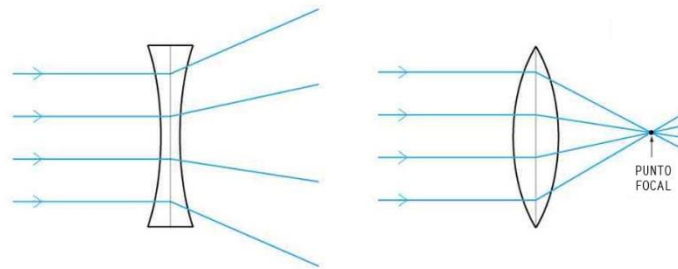


FIGURA 1-5. IMAGEN QUE MUESTRA EL COMPORTAMIENTO DE LAS LENTES NEGATIVAS (IZQUIERDA) Y POSITIVAS (DERECHA) CON LOS RAYOS DE LUZ INCIDENTES [6].

En la Figura 1-5 se introduce el concepto de foco el cual está asociado con la *distancia focal*, ambos inherentes a la óptica del microscopio y que se definen como:

Foco. O punto focal, es el punto donde los rayos refractados convergen sobre el eje óptico, tanto para lentes positivas como lentes negativas. **Distancia focal.** Es la distancia entre el foco y el vértice de la lente. **Vértice.** Es el punto sobre el eje óptico donde se toca la lente o los dos medios del sistema óptico. Para mayor entendimiento, ver la Figura 1-6.

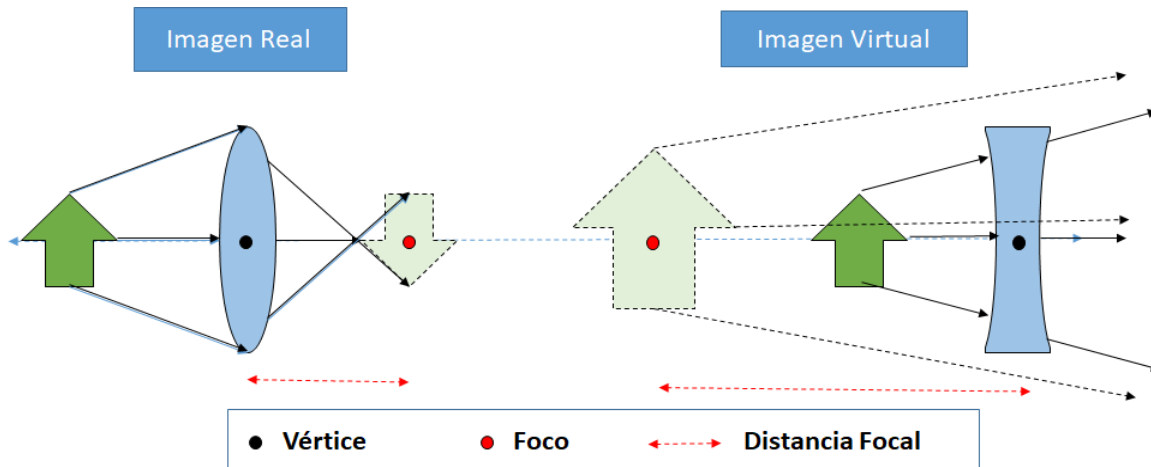


FIGURA 1-6. DIAGRAMAS DE LA FORMACIÓN DE IMÁGENES A TRAVÉS DE LENTES DONDE SE HACE MENCIÓN DE LOS FOCOS, DISTANCIAS FOCALES Y EL VÉRTICE.

Las diferentes lentes son capaces de producir entre dos tipos de imágenes: *imagen real*, que de manera general, es la imagen que se forma cuando los rayos de luz son convergentes saliendo del sistema óptico. Como característica especial, esta imagen *no es posible verla a simple vista*, pero si es posible proyectarla en una pantalla justo en el punto donde convergen.

En cambio, en una *imagen virtual*, los rayos de luz son divergentes saliendo del sistema óptico. Ésta *se puede ver a simple vista*, pero no pueden ser proyectadas en una pantalla como el caso anterior. Un ejemplo claro de esto es el uso de la lupa [7]. Ver Figura 1-6.

Con ayuda de todo lo anterior se puede concluir que el sistema óptico de un microscopio actual es como el mostrado en la Figura 1-7. Está compuesto por 2 lentes: lente objetivo y lente ocular. Ambas lentes están tratadas para reducir aberraciones, pero sus propósitos son distintos [7]. La *lente objetivo*, con una distancia focal muy reducida, es la más próxima al objeto de estudio y es capaz de proyectar una imagen real hacia la siguiente lente. Por su parte la *lente ocular* utiliza la imagen real generada por el lente objetivo y la aumenta proyectando ahora una imagen virtual en el punto en el que se encuentra nuestra vista.

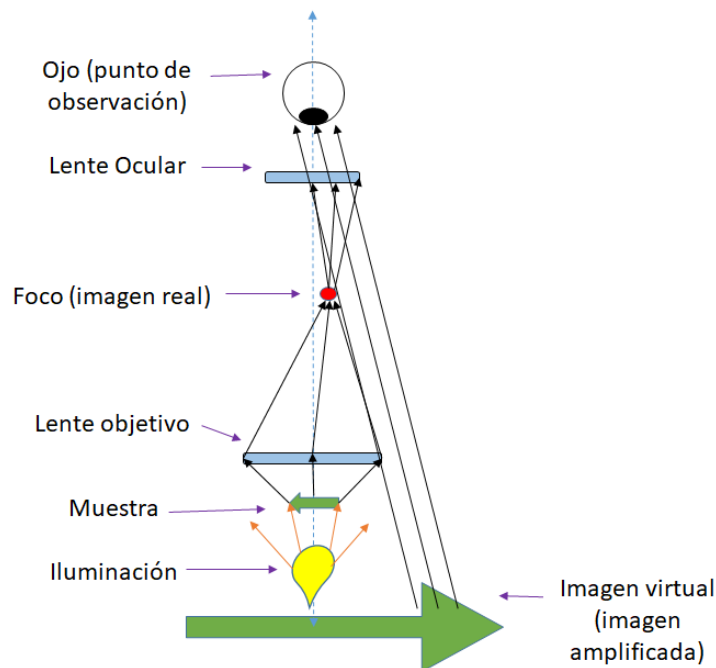


FIGURA 1-7. DIAGRAMA DE LA GENERACIÓN DE UNA IMAGEN DENTRO DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO SIMPLE.

La magnificación y la resolución son dos conceptos que nacen de una imagen aumentada [8].

La magnificación: capacidad de aumentar el tamaño de la imagen de una muestra.

La resolución: Capacidad de distinguir una distancia determinada entre dos puntos.

Partes de un microscopio.

En la Figura 1-8 se puede apreciar un esquema de un microscopio óptico de propósito general. El microscopio compuesto tiene elementos que podemos dividir en ópticos y mecánicos para concentrarlos de manera más fácil y se presentan en la Tabla 1-2.

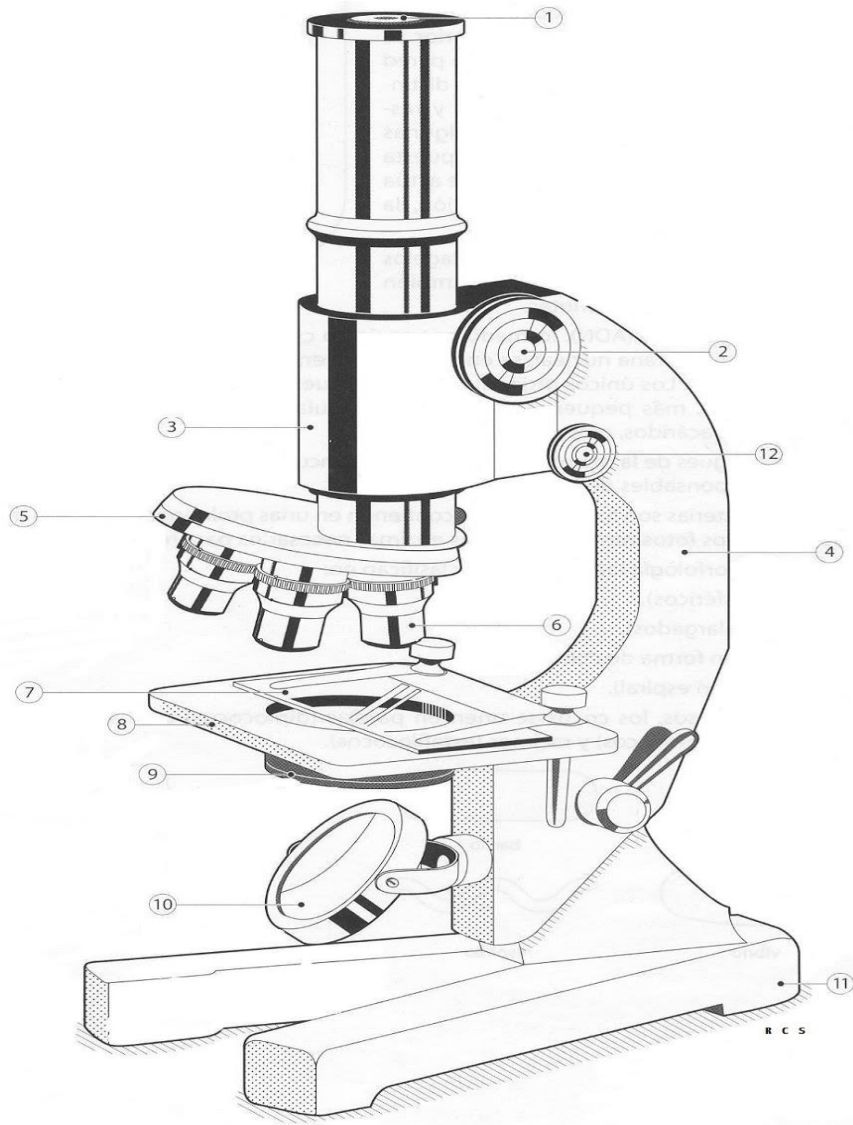


FIGURA 1-8. IMAGEN DE UN MICROSCOPIO COMPUESTO [9].

TABLA 1-2. PARTES DE UN MICROSCOPIO COMPUESTO [4].

Nombre	Elemento Mecánico	Elemento Óptico	Definición
Base (11)	X	---	Soporte generalmente metálico donde se apoyan los demás componentes del microscopio
Brazo (4)	X	---	Soporte del tubo óptico, la platina y el revolver. Sirve también para su traslado
Platina (8)	X	---	Superficie plana en posición horizontal con un orificio circular en su centro donde se colocan las muestras a examinar. Puede tener pinzas o carrito que permite la movilidad de la muestra en 2 direcciones.
Tubo óptico (3)	X	---	Cilindro en cuyos extremos localizamos los oculares y el revolver.
Revolver (5)	X	---	También conocido como porta objetivos, es la parte que gira sobre su propio eje para seleccionar entre varios lentes objetivos que contiene.
Tornillos macrométrico y micrométrico (2 y 12)	X	---	Permiten el desplazamiento de la platina hacia arriba o hacia abajo. El macrométrico lo hace de manera rápida y abarcando mucha distancia mientras que el micrométrico lo hace de manera fina.
Cabezal	X	---	Componente que alberga prismas o espejos para el acondicionamiento de dos o más oculares, o bases para cámaras fotográficas o de video
Iluminación (10)	X	---	Encontrado arriba o debajo de la platina, se encarga de irradiar el agujero principal de la platina con un haz de luz suficiente para las observaciones.
Condensador (9)	---	X	Es el encargado de regular y concentrar los rayos de luz provenientes de la iluminación hacia la abertura de la platina. Generalmente compuesto por una o dos lentes convergentes.
Objetivos (6)	---	X	Sistemas de lentes encargados de la resolución y nitidez del aumento de las imágenes microscópicas, son la parte más importante del microscopio

1.2. Microscopio de fluorescencia

1.2.1. Fluorescencia y principales aplicaciones

El microscopio de fluorescencia tiene su origen en la necesidad de realizar observaciones específicas dentro de una muestra compleja o un micro sistema. Así fue como logró considerarse una invaluable y muy popular herramienta en las ciencias biológicas: su habilidad no invasiva de capturar imágenes del interior de las células. Ejemplo de esto es la observación de partes específicas de la célula (mitocondria, vacuolas, etc.).

Para lograr su cometido, este instrumento hace uso de un fenómeno conocido como fluorescencia. Esto se define de la siguiente manera y se ilustra en la Figura 1-9.

“La fluorescencia es el fenómeno de emisión de luz, en nanosegundos, después de la absorción de luz que típicamente es de una menor longitud de onda” [9].

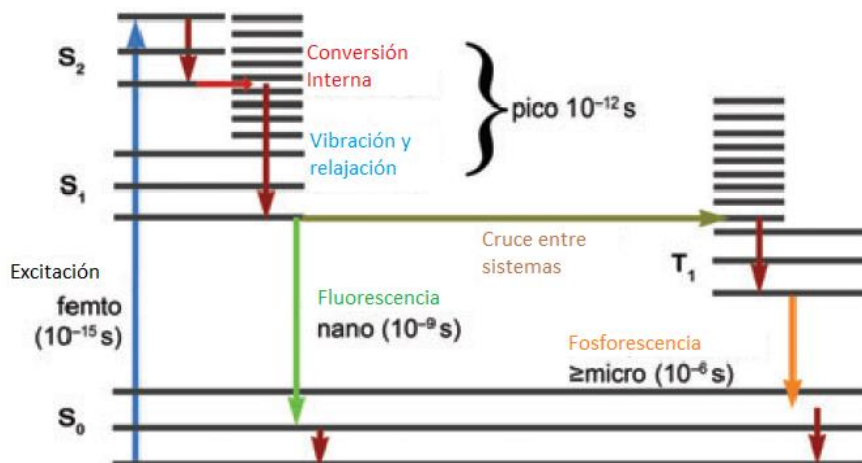


FIGURA 1-9 DIAGRAMA DE ABSORCIÓN Y LIBERACIÓN DE ENERGÍA DE UN ELECTRÓN, MEJOR CONOCIDO COMO DIAGRAMA DE JABLONSKI [9]

Lo que la figura representa es una gráfica de *tiempo contra estados* de un electrón de una partícula fluorescente. La flecha azul representa el inicio del tiempo del proceso cuando un electrón en su estado fundamental (S0) se excita gracias a un fotón que incide sobre él con cierta energía. Esto provoca un cambio de estado elevándolo a un nivel S1 mínimo, hasta un máximo nivel S2. Importante comentar que la diferencia de energía entre los estados S0 y S1 es suficientemente pequeña para que fotones de baja energía puedan excitar los electrones.

Posterior a la excitación, los dos procesos iniciales de pérdida de energía son la *conversión interna* y *vibración y relajación*, los cuales se llevan a cabo en el orden de $1 \cdot 10^{-12}$ segundos. Las partículas que tienen la capacidad de presentar fluorescencia, lo hacen una vez terminado estos procesos y es tienen una duración del orden de $1 \cdot 10^{-9}$ segundos, sino, pueden presentar fosforescencia con duración del orden de microsegundos y regresar a su nivel S0 o fundamental.

Aunque el proceso existe, no todos los elementos o muestras cuentan con esta característica. La fluorescencia conocida como primaria es aquella que existe gracias a una molécula o configuración inherente a la muestra. Ejemplos de ella son las partículas con moléculas aromáticas, minerales y piedras preciosas, así como en los quelatos como la clorofila.

La fluorescencia secundaria se presenta cuando se introduce a una muestra un marcador fluorescente. Éste es el procedimiento más usual en las aplicaciones biológicas que emplean este tipo de microscopía.

Los fluoróforos son las moléculas que se utilizan en virtud de obtener fluorescencia [11] y los más comúnmente utilizados en biomedicina pueden ser agrupados en tres categorías: los sensibles al micro ambiente, los que no se unen de manera covalente y los que sí lo hacen [5]. Cada fluoróforo presenta un *espectro de excitación* y un *espectro de emisión*. Estos espectros son básicamente los rangos de luz bien acotados donde se presentan la absorción y la emisión del marcador en cuestión. La Figura 1-10 corresponde a la interpretación general de cómo funcionan estos dos espectros. Como se puede ver, estos son muy próximos y se superponen, por lo que usar una fuente bien acotada en su espectro electromagnético toma relevancia.

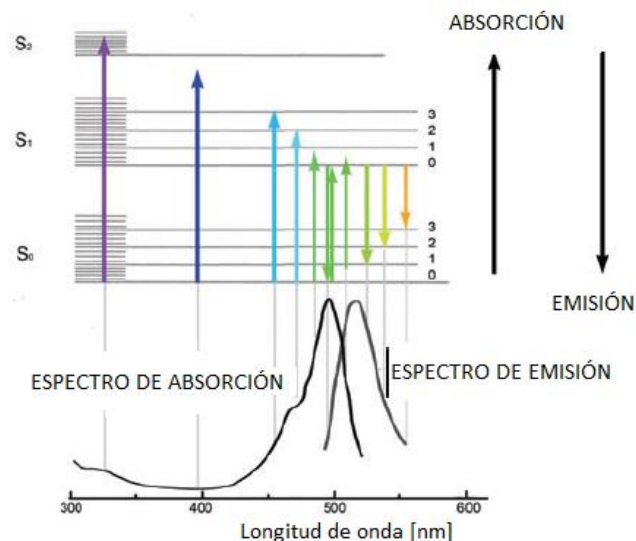
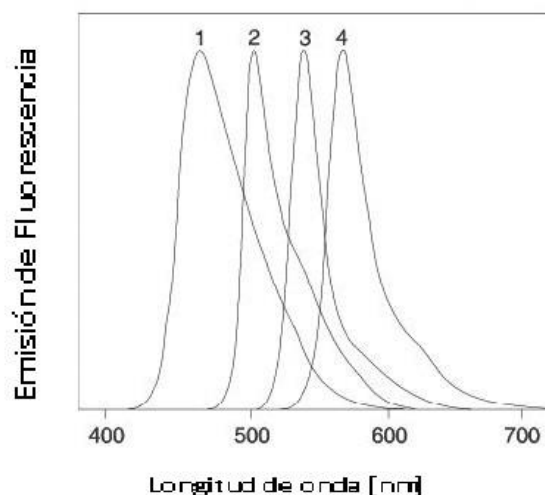


FIGURA 1-10. DIAGRAMA DE ESPECTRO DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN [9].

Para aterrizar esto, en la Figura 1-11 se muestra un diagrama de espectro de absorción y emisión de diferentes partículas fluorescente de carácter comercial.



Cat #	Color de Fluorescencia	Abs (nm) †	Em (nm) ‡
1	Azul-Verde (430/465)	427	468
2	Amarillo-Verde (505/515)	495	505
3	Naranja (540/560)	534	554
4	Rojo (580/605)	570	598

FIGURA 1-11. DIAGRAMA Y TABLA SOBRE LAS LONGITUDES DE ONDA DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN DE DIFERENTES FLUORÓFOROS [12].

1.2.2. Principio de funcionamiento

Llevado este fenómeno a un microscopio, se convierte en una herramienta de valor inestimable para la investigación científica donde frecuentemente se requiere del conteo de células, análisis de comportamiento de células [5], y de manera comercial para análisis de alimentos y de productos farmacéuticos [10]. Los requerimientos especiales para este tipo de microscopio son:

Fuente de luz. - Se necesita una intensa fuente de luz para excitar la fluorescencia en un espectro de longitud de onda específico. Ejemplos de ello son las lámparas de mercurio con una gran intensidad y un amplio espectro de luz.

Filtros. - Son elementos que seleccionan el espectro de luz que pasa a través de ellos y para este tipo de microscopios se utilizan dos. El primero se coloca en el área de la luz de excitación de amplio espectro para dejar pasar sólo el rango de luz necesario para la fluorescencia. El segundo se encuentra en el objetivo, capaz de filtrar la luz de excitación y solo deja pasar la luz de fluorescencia. Lo anterior se resume en las Figura 1-12 y Figura 1-13 en donde se muestra un efectivo resultado de la fluorescencia de uno o más colores a su vez.

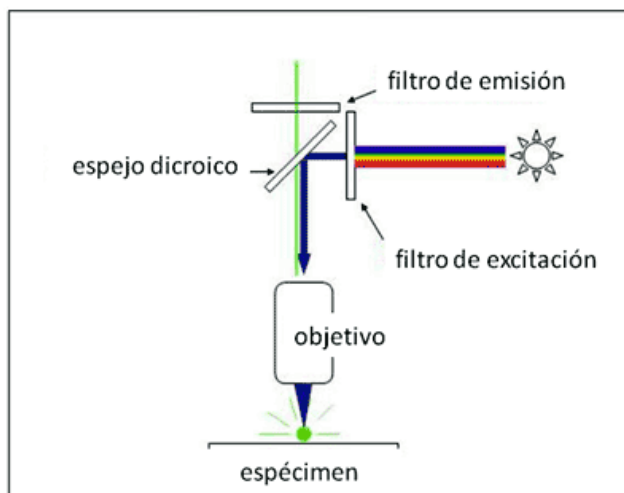


FIGURA 1-12. DIAGRAMA DEL EJEMPLO DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.

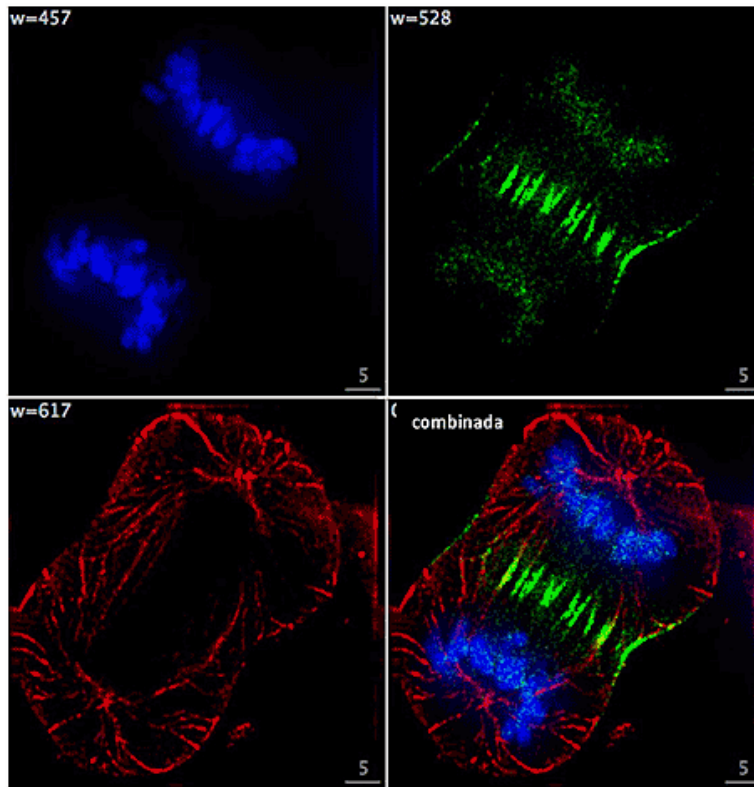


FIGURA 1-13. MICROGRAFÍAS DE CÉLULAS EN DIVISIÓN, TOMADAS CON UN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA. SE EMPLEARON TRES FLUOROCROMOS: DAPI (EMITE LUZ AZUL) PARA MARCAR CROMOSOMAS, GFP (PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE INTRACELULAR QUE EMITE LUZ VERDE) Y RODAMINA (LUZ ROJA) PARA MARCAR MICRO TÚBULOS. CADA FLUOROCROMO AMERITA EL USO DE FILTROS ESPECÍFICOS, DEPENDIENDO DE LA LONGITUD DE ONDA NECESARIA PARA SU EXCITACIÓN, SEÑALADA ARRIBA Y A LA IZQUIERDA EN CADA IMAGEN Y EXPRESADA EN NANÓMETROS [c].

Sus principales aplicaciones se presentan en el marcaje de moléculas en células y tejidos para su caracterización e identificación, el estudio de células normales y patológicas, estudios inmunológicos y mineralogía.

1.3. Mini microscopio de bajo costo

Este tipo de microscopios, denominados “mini” por sus dimensiones reducidas y de “bajo costo” por la implementación de tecnologías de costo reducido implementadas en su construcción, tiene cerca de 10 años de reproducción en diversas partes del mundo con la finalidad de realizar observaciones similares a muestras diminutas con el beneficio de ser ampliamente portables [13]. Esta herramienta está en constante desarrollo y más veces se utiliza para sistemas *lab on a chip* que integran varios procesos en espacios reducidos o en condiciones de infraestructura limitada.

Debido a las variedades que se presentan de este, se propusieron 3 principios básicos de construcción [13]. Cualquiera de los métodos mencionados conlleva el uso de una cámara web digital y una base dónde mantener el circuito integrado de la cámara fijo y firme.

1.3.1. Métodos de construcción

- a) Método sin lentes: Es el método más sencillo en el que sólo es necesario descubrir el circuito de la cámara web y colocar directamente las muestras sobre el chip con el sensor *complementary metal-oxide semiconductor* (CMOS), de un amplio rango de pixeles. Aunque sea un método sencillo de realizar, adolece de no tener una amplificación útil.
- b) Método de lente invertido: Consiste en desarmar la cámara y utilizar el mismo lente, sólo que invertido para obtener magnificación. Gracias a esto, es posible obtener más magnificaciones modificando la distancia focal a la muestra.
- c) Método de varios lentes: Método que contempla utilizar lentes adicionales al utilizado en la cámara, lo cual lo hace más complejo.

Tomando solo como ejemplo el método b), en la Figura 1-14 se puede observar un ejemplo del proceso que se realiza para tener un microscopio con el método de lente invertido.

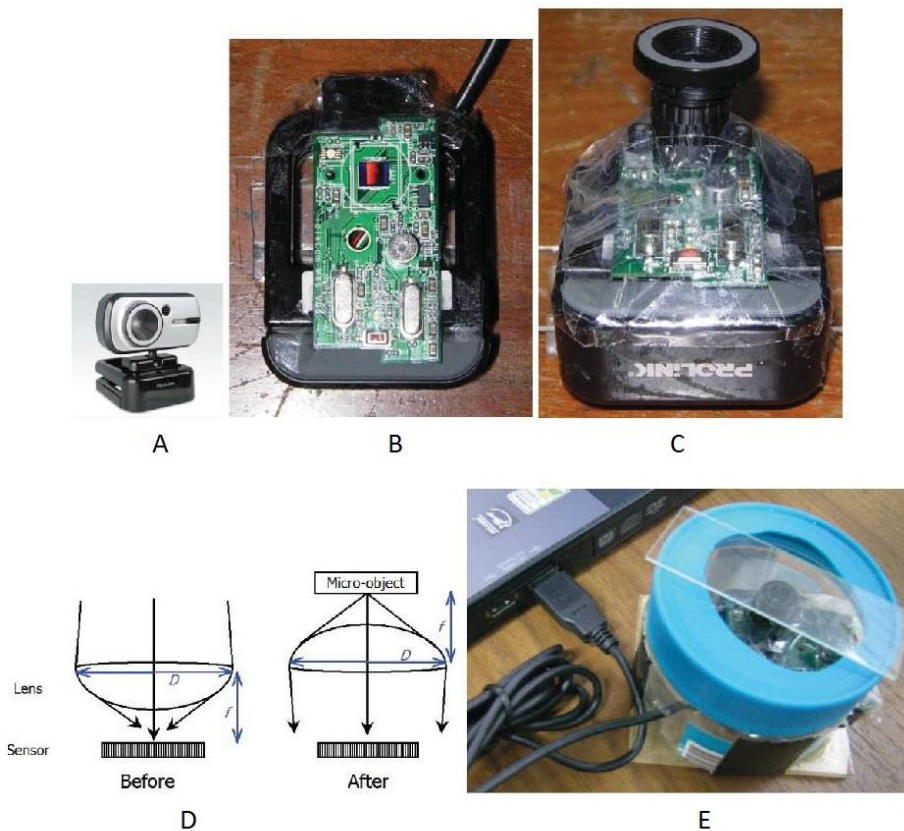


FIGURA 1-14. A) IMAGEN DE CÁMARA WEB, B) CÁMARA WEB REMOVIDA DE LA CARATULA FRONTAL, C) COLOCACIÓN DEL LENTE INVERTIDO D) DIAGRAMA EXPLICATIVO DE COMO AL INVERTIR EL LENTE DE LA CÁMARA WEB, LA FUNCIÓN SE INVIERTE, EN VEZ DE TOMAR UNA GRAN IMAGEN Y REDUCIRLA PARA EL SENSOR, TOMA UNA IMAGEN PEQUEÑA Y LA MAGNIFICA. E) PROTOTIPO FINAL DE MICROSCOPIO DE LENTE INVERTIDO [13].

1.3.2. Antecedentes de mini microscopio de fluorescencia de bajo costo

Finalmente, ciertos desarrollos de estos mini microscopios se han visto enfocados en el uso del principio de la fluorescencia por la necesidad de tener un instrumento así de especializado, pero a su vez barato y portátil, pero con resultados que sean confiables. El antecedente con el que se consideró como modelo a seguir está publicado en la revista *Lab on a Chip* [14] y cuyos resultados se presentan en las figuras siguientes. En la Figura 1-15 se muestra las imágenes correspondientes al proceso de construcción del mini microscopio con los siguientes materiales: cámara web digital Logitech C160m, la estructura fue diseñada y construida con Polimetilmetacrilato (PMMA) de 3 [mm] de grosor [14].

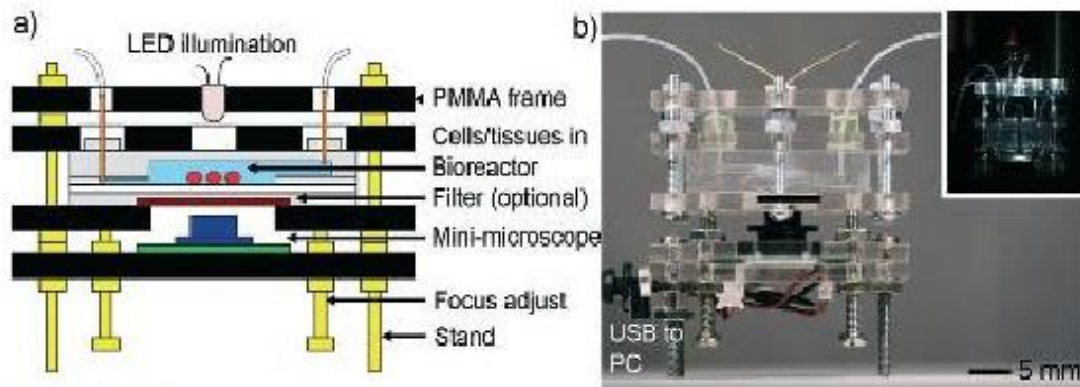


FIGURA 1-15. A) DIAGRAMA ILUSTRATIVO DEL MODELO CONSTRUIDO DEL MINI MICROSCOPIO. B) FOTOGRAFÍA DEL MODELO REAL CONSTRUIDO DEL MINI MICROSCOPIO [14].

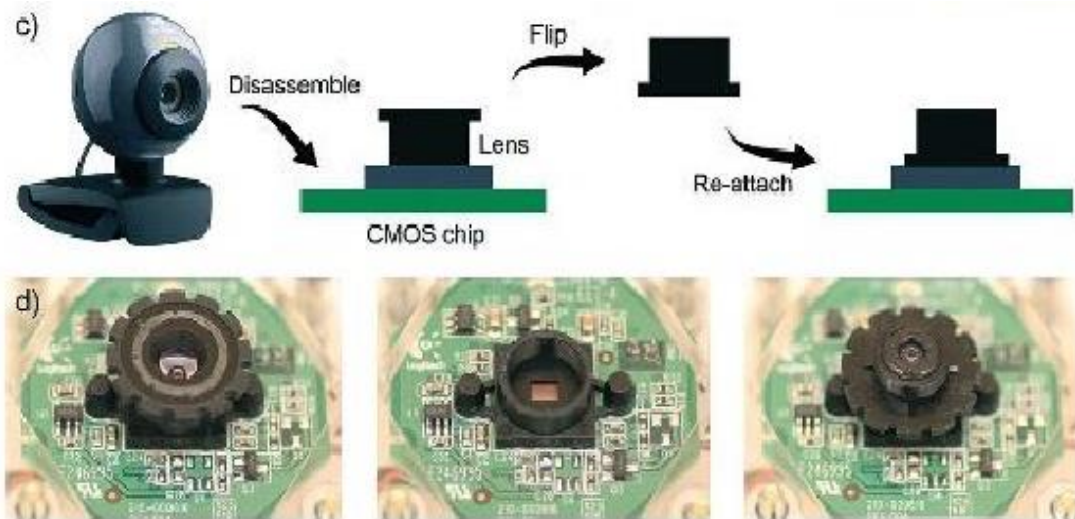


FIGURA 1-16. . C) SECUENCIA DE IMÁGENES DEL PROCESO GENERAL DE INVERSIÓN DEL LENTE. D) SECUENCIA DE IMÁGENES REALES DE INVERSIÓN DEL LENTE [15].

En este trabajo los resultados reportados de la Figura 1-17 (entre otros), son meramente cualitativos en torno a la detección de fluorescencia y no existe una forma de evaluación cuantitativa que rectifique la fiabilidad de los mismos (niveles de intensidad de la fluorescencia o espectro de emisión medido), así como presentan pocos detalles del método de construcción específico o la metodología de diseño.

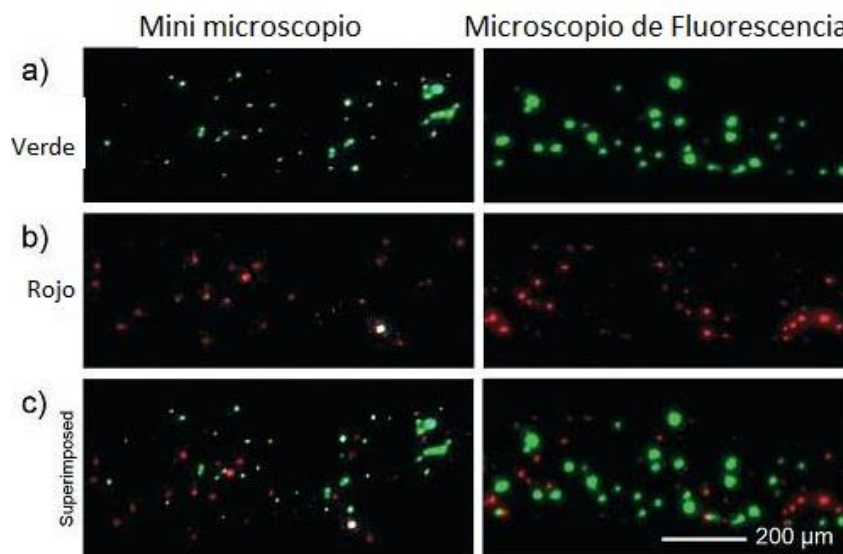


FIGURA 1-17. IMÁGENES DONDE SE OBSERVA LA COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EL MINI MICROSCOPIO Y UN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA. EN LA FILA A) SE MUESTRA FLUORESCENCIA COLOR VERDE, EN EL B) DE COLOR ROJA Y EN EL C) AMBAS [14].

Sin embargo, si se reportan mediciones cuantitativas en relación a los elementos utilizados para los experimentos (soluciones) y las distancias focales con las que se obtienen diferentes grados de magnificación de una muestra. Esto ayuda a la idea de que la lente invertida de cualquier cámara web puede ofrecer distintas magnificaciones modificando las distancias a las que se coloque de la muestra y el sensor. Complementario a la construcción de un mini microscopio y el uso de elementos como filtros y un cuarto oscuro, es necesario el uso de un programa para la obtención y filtrado digital de imágenes.

Capítulo 2. Criterios de diseño

El modelo anterior desarrollado por Ali Khademhosseini y publicado en *Lab on a Chip* [14] es un buen punto de partida para generar una idea de cómo reproducir esta herramienta de bajo costo. A continuación se muestra un diagrama resaltando sus partes y la tabla de su equivalente con un microscopio óptico convencional.

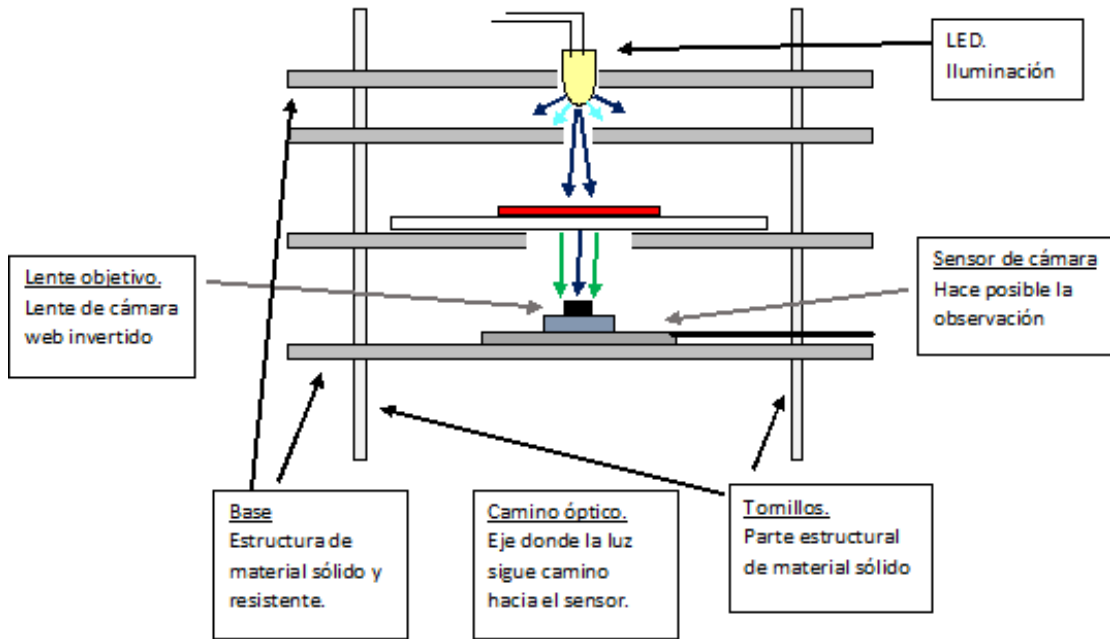


FIGURA 2-1. PRINCIPIO BÁSICO DE FUNCIONAMIENTO DEL MINI MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.

TABLA 2-1. TABLA DE PARTES EQUIVALENTES DE UN MINI MICROSCOPIO CON UNO CONVENCIONAL.

CONCEPTO		APLICACIÓN	OBSERVACIONES
Camino óptico		Alineación de 4 elementos en un mismo eje imaginario	Estos elementos son: El LED, el centro de la platina, la lente objetivo y el sensor de la cámara web. Todos ellos alineados al centro geométrico de las piezas que componen la base del microscopio
Lente objetivo (Sistema óptico compuesto.)	Lente negativa	Lente de la cámara web invertida	La composición de estas lentes generalmente suele contener al menos una lente negativa y una positiva de manera que se logre una imagen virtual a la entrada del sensor de la cámara web
	Lente positiva		
Receptor / ojo humano		Sensor de cámara web	Es el conducto por el cual se puede tener apreciación de las imágenes virtuales formadas por la lente objetivo y que facilita mucho el registro de las observaciones ya que esta embebido el uso de una computadora y software especial.

CONCEPTO	APLICACIÓN	OBSERVACIONES
Base	Estructura realizada con acrílico	Conforma gran parte del microscopio y lo que menor costo tiene en la elaboración de éste. Sirve de soporte para las demás partes y muestras a utilizar y para garantizar la alineación de los elementos críticos para el funcionamiento del instrumento. Crea el camino óptico
Platina		
Iluminación	LED	Fuente de luz de bajo costo que hace posible el funcionamiento del microscopio.
Tornillos micro/macro métricos	Tornillos de la estructura	Contemplados primeramente con función estructural, también funcionan para modificar la distancia focal de la lente objetivo que repercute en gran medida en la ampliación de las imágenes.

2.1. Prototipo #1

A lo largo del capítulo anterior se ha descrito cómo son los diferentes procesos de construcción de los llamados mini microscopios de implementación sencilla. Adicional a ello se ha explicado su principio de funcionamiento, mismo que se utilizará como base para pruebas de concepto, diseños y prototipo final. Esto llevó a validar mediante un experimento inicial y un primer prototipo de mini microscopio usando el método de construcción de lente invertido, con el fin de reportar información sobre distancias entre lente, muestra y sensor, que llamaré la caracterización del lente y posteriormente validar el funcionamiento como microscopio de fluorescencia. Para ello, lo primero a considerarse es la cámara web: en este caso se utilizó una cámara web de la marca Logitech, modelo C270. Ésta fue una donación del equipo de robótica UNAM Space (no presenta un costo inmediato en la realización de estos experimentos ni prototipos).

2.1.1. Experimento Inicial

O también denominado *prueba 1*, consistió en hacer un reporte fotográfico del método de inversión de lente de cámara web para obtener imágenes magnificadas. En la Figura 2-2 se muestra la cámara web a utilizar y el desensamble del circuito para su facilidad de uso y ayuda con el proceso de inversión de la lente, necesario para la magnificación.

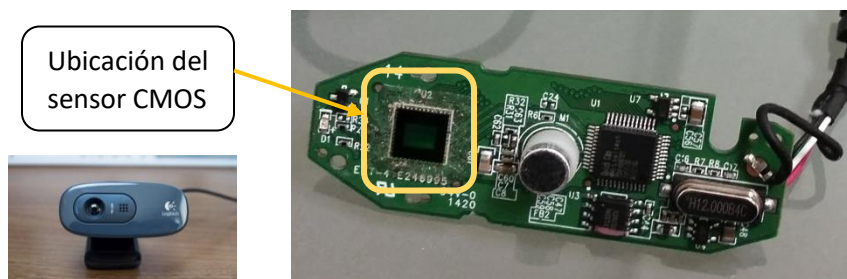


FIGURA 2-2. (IZQUIERDA) IMAGEN SIN DESARMARLA. (DERECHA) EL CIRCUITO DE LA CÁMARA WEB.

Este tipo de microscopios empiezan a surgir gracias a la característica óptica que la lente de una cámara web posee. Esta se presenta en el siguiente diagrama apoyado de los conceptos de imagen real y el tipo de lente que se trata.

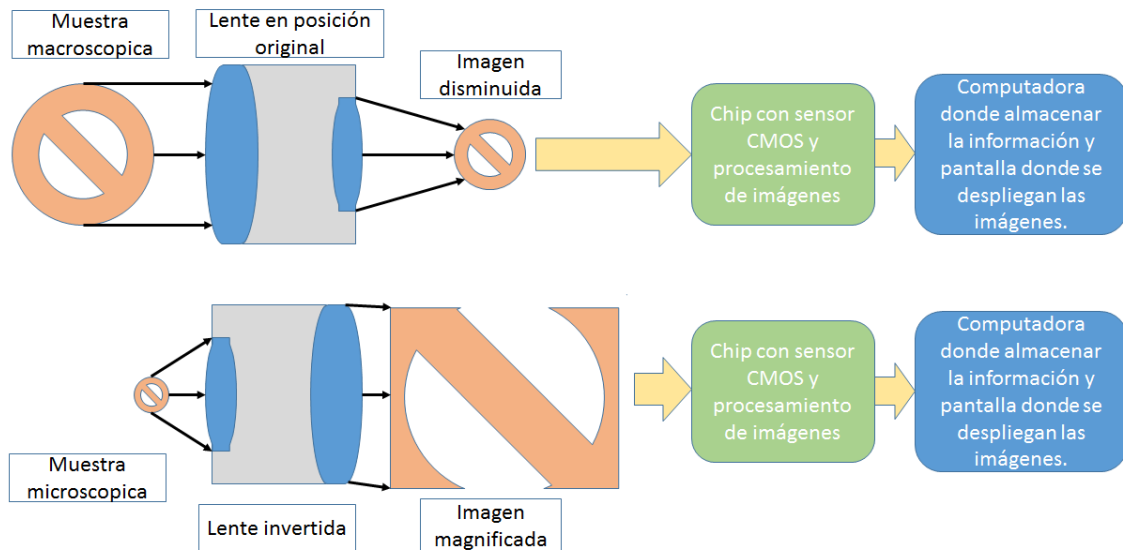


FIGURA 2-3. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE IMÁGENES CON LA CÁMARA WEB CON LA LENTE SIN INVERTIR E INVERTIDA.

Del diagrama se intuye que las distancias entre las muestras y el lente no son las mismas para poder generar las imágenes a la computadora. En el caso especial de la lente invertida, la muestra microscópica debe estar muy cercana a la lente para generar la imagen.

Por mostrar algunos ejemplos, las siguientes imágenes tomadas con la cámara web con la lente en distintas posiciones muestran el efecto descrito anteriormente.

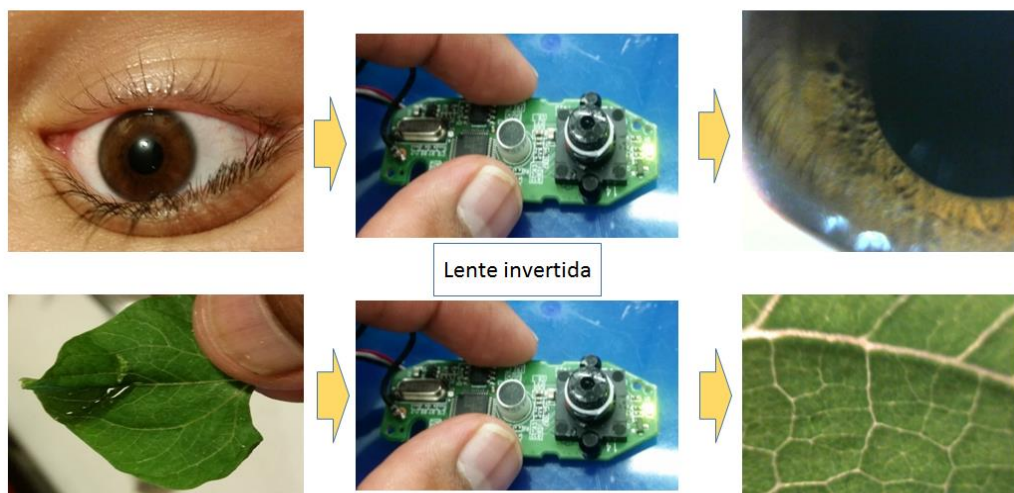


FIGURA 2-4. EJEMPLOS DE FOTOGRAFÍAS MAGNIFICADAS CON EL LENTE INVERTIDO.

Una vez corroborado que el principio de funcionamiento de la cámara web que utilicé, llega el momento de realizar el primer prototipo que me permita determinar las diferentes distancias focales a las que se obtienen imágenes nítidas y verificar el cambio en la magnificación, como se menciona en el publicación [14].

2.1.2. Construcción y experimentación

Dadas estas condiciones y tomando como eje principal que el microscopio es de bajo costo, el primer prototipo se llevó a cabo con los siguientes materiales:

TABLA 2-2. TABLA DE COSTO DE MATERIALES PARA EL PROTOTIPO 1.

Concepto	Cantidad / Medida	Precio (mxn)
Placa de cartón perforado (Perfocel)	1: 40 [cm] x 40 [cm]	\$20.00
Espárrago (ø 3/16 [in]) con cuerda estándar	1: 80 [cm]	\$20.00
Tuercas (ø 3/16 [in])	22	\$20.00
Barra de silicón para pistola de silicón caliente	3	\$10.00
Caimanes	2	\$10.00
LED opaco color blanco (5mm)	2	\$2.00
Chupón de plástico (traslúcido)	4	\$20.00
Total		\$102.00

El diagrama de implementación es el mostrado en la figura Figura 2-5. Adicional a este diagrama, en la Figura 2-6 se muestra una imagen del ensamble real.

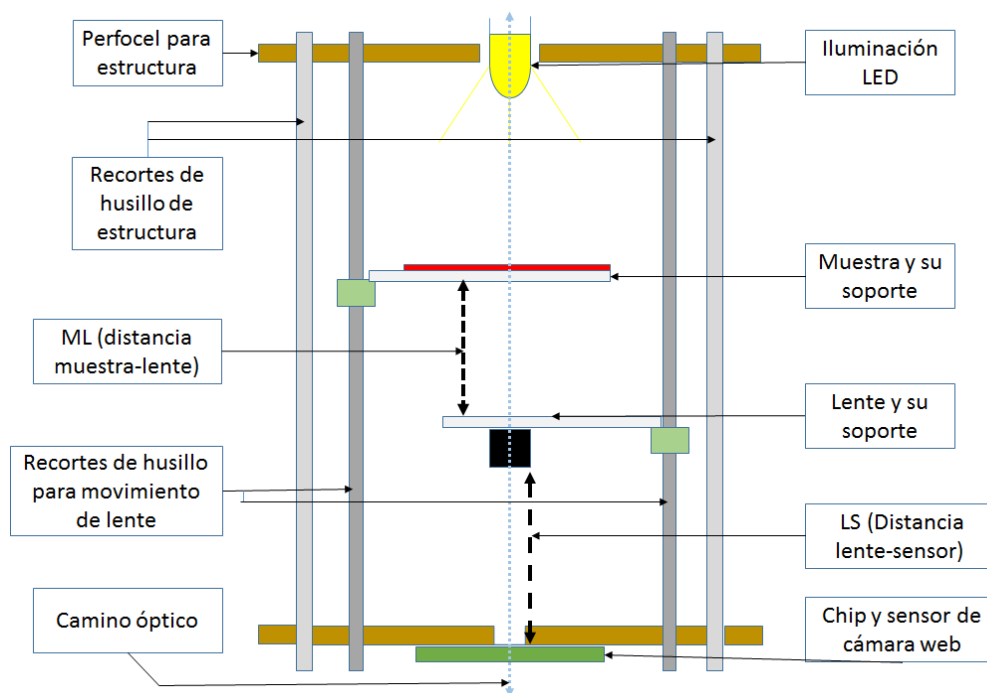


FIGURA 2-5. ESQUEMA DE PARTES DEL PROTOTIPO 1.

En este diagrama se anotan dos nuevos elementos: la distancia muestra-lente (ML) y la distancia lente-sensor (LS) que se dispondrán a medir y caracterizar con fotografías de muestras y su magnificación. Lo demás es congruente con el método de construcción y el prototipo realizado por Ali Khademhosseini y publicado en *Lab on a Chip* [14].

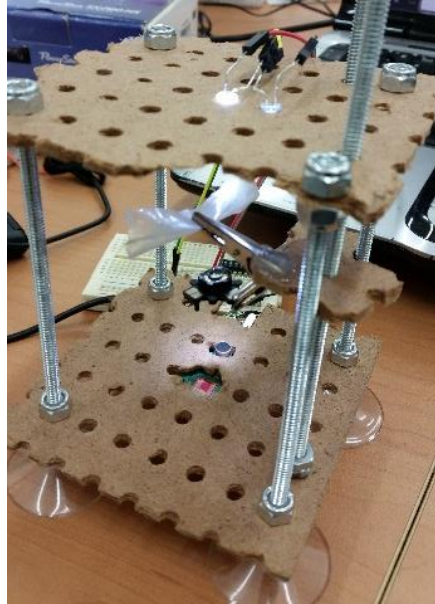


FIGURA 2-6. PROTOTIPO 1 DE MINI MICROSCOPIO.

Los primeros resultados de esta nueva implementación se tienen en la Figura 2-7, utilizando como muestra una lámina de plástico. Los detalles de su construcción se encuentran en el Anexo A.

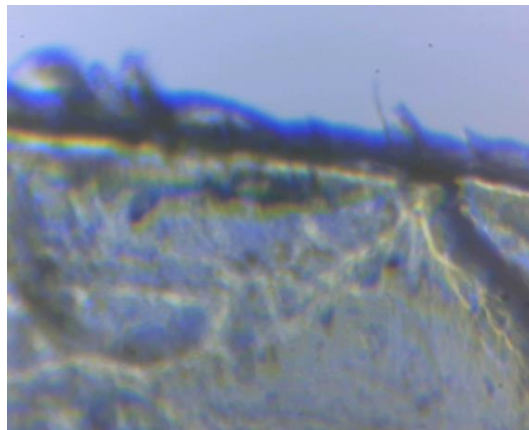


FIGURA 2-7. IMAGEN DE UNA LÁMINA DE PLÁSTICO TRASLUCIDO.

2.1.2.1. Magnificación y campo de visión.

Este experimento previo de caracterización de la magnificación del microscopio se llevó a cabo con el uso de un patrón de medida, de marca Dino-Lite, como se muestra en la Figura 2-8 y que como características tiene que su resolución (valor mínimo de medida) es de 0.2 [mm] o 200 [μm]. Esto nos abre la posibilidad de obtener un nuevo concepto: el **campo de visión** de las imágenes que se toman con el mini microscopio.

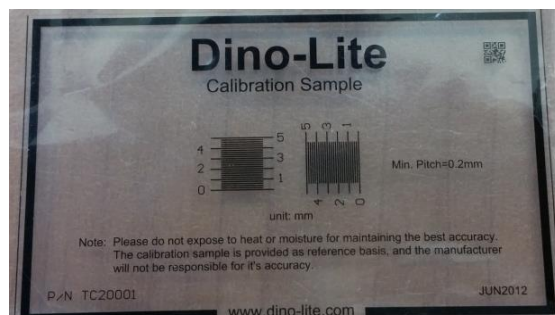


FIGURA 2-8. IMAGEN DEL PATRÓN DE MEDIDA DINO-LITE EN SU CUBIERTA PARA POLVO.

El campo de visión para las imágenes resultantes del mini microscopio se define como las medidas en alto y ancho de la imagen que pueda definir un patrón. Para aterrizarlo, se utiliza la siguiente Figura 2-9.

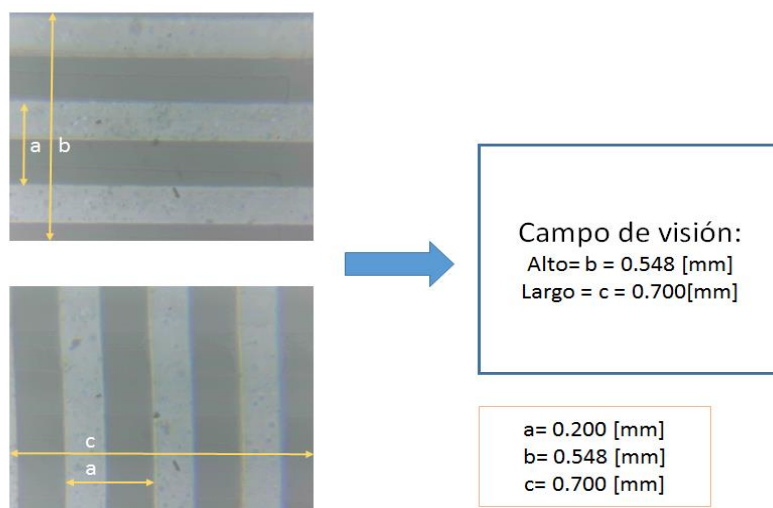


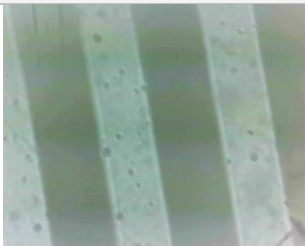
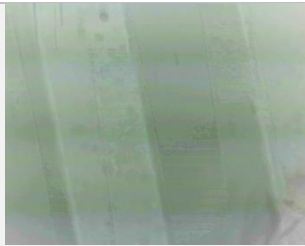
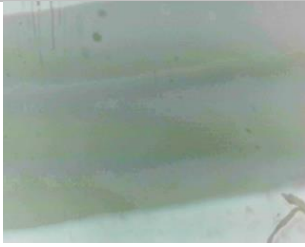
FIGURA 2-9. EXPLICACIÓN DEL CAMPO DE VISIÓN.

Para obtener estos valores de medida de las fotografías tomadas, existen varios programas de análisis y medición de imágenes como el programa aquí utilizado: ImageJ. Estos se basan en la asignación de un valor de medida en unidades que conozcamos de una imagen patrón (sea [mm], [μm], etc.), a una cantidad de píxeles determinada por un trazo realizado con el mismo programa. Al final ese valor es almacenado para próximas medidas de longitudes distintas a las del patrón. Por ello la necesidad de utilizar el patrón de medida Dino-Lite.

La realización de las fotografías se llevó de la siguiente manera: La primera captura se realiza con la lente lo más cercana al sensor y se acerca la muestra hasta lograr una imagen nítida. Posteriormente se aleja el lente considerando un primer paso de 1 [cm] y los posteriores de 2 [cm] (aproximadamente) y se mueve la muestra hasta encontrar una nueva imagen nítida y se realiza otra toma. Este procedimiento continúa hasta que las imágenes obtenidas carezcan de suficiente nitidez o claridad.

En la Tabla 2-3 se incluyen las diferentes distancias registradas y las fotografías representativas tomadas durante este proceso con los lentes antes mencionados.

TABLA 2-3. MEDIDAS DE DISTANCIAS ML Y LS Y SUS FOTOGRAFÍAS CORRESPONDIENTES

Toma	LS	ML	Fotografía	
1	27 [mm]	1 [mm]		
2	41.5 mm	1 mm		
3	72.8 [mm]	0.5 [mm]		

Las imágenes de la tabla anterior corroboran que la magnificación de las imágenes de la muestra utilizada aumenta conforme la distancia LS aumenta, pero a su vez mientras la distancia ML disminuye. Utilizando las imágenes que muestran la mayor magnificación con cada lente usado, es que analizaremos el campo de visión de la muestra.

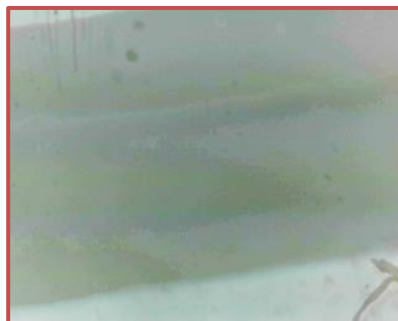


FIGURA 2-10. IMAGEN DE MAYOR MAGNIFICACIÓN.

TABLA 2-4. CUANTIFICACIÓN DEL CAMPO DE VISIÓN DE LA IMAGEN DE MAYOR MAGNIFICACIÓN.

Lente C	
Campo de visión (aproximado)	
Alto: 0.5 veces el paso mínimo = 100 [μm]	Ancho: 0.5 veces el paso mínimo = 100 [μm]

De este análisis podemos concluir que el campo de visión que ofrece la lente con el sensor de cámara web es de 100 [μm] x 100 [μm] aproximadamente.

2.1.3. Criterio de diseño para el prototipo #2

Teniendo como principio mantener el campo de visión antes descrito como la máxima resolución, las distancias LS y ML definen las dimensiones del diseño, específicamente en la parte de la estructura o base del mini microscopio donde están dispuestos la platina y el ocular.

2.2. Prototipo #2

El prototipo #2 concentra tanto los puntos fuertes de la experimentación anterior como la implementación de nuevos elementos con el propósito de mejorar la visualización de muestras a través de él. Para este prototipo se consideran dos sistemas del diseño: el sistema mecánico que concentra todo lo relacionado con partes de soporte y estructura, y el sistema eléctrico es el que se encarga de la alimentación de la iluminación del microscopio que hace posible la observación de muestras y que, añadiendo fuentes de luz de espectro limitado, sea posible la observación del fenómeno fluorescente.

Para este prototipo se utiliza ya un software de diseño asistido por computadora (CAD) llamado SolidWorks debido a que se planea llevar a etapa de construcción mediante una impresora 3D que se describirá más adelante. Ahora se procede a explicar los 2 sistemas.

2.2.1. Estructura mecánica

El diseño realizado es el que se muestra en la Figura 2-11 con sus respectivas partes similares a las que contempla un microscopio óptico convencional que se pueden considerar como etapas.

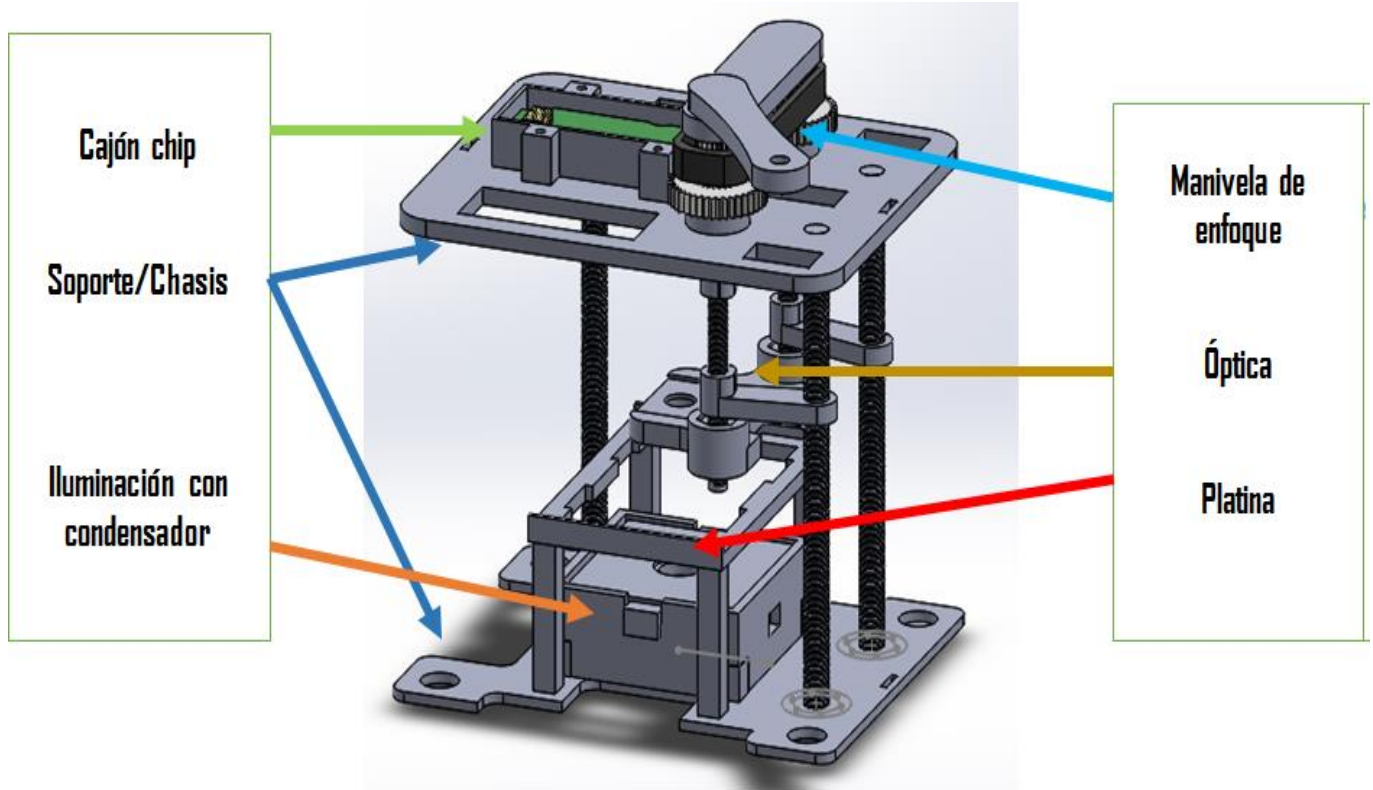


FIGURA 2-11. IMAGEN DEL ENSAMBLE DEL MINI MICROSCOPIO EN VISTA DIMÉTRICA SEÑALANDO SUS DIFERENTES ETAPAS.

En su totalidad, la estructura tiene una altura de 18 [cm] y las dimensiones del ancho y largo están contenidas en el Anexo B.

Adicional a lo que se ha visto hasta ahora como criterios de diseño, se tienen estos 3 particulares para este prototipo:

- Dimensiones pequeñas pero que respeten las distancias focales de la lente seleccionada y la colocación de circuitos pequeños de iluminación
- Usar piezas con poco tiempo de elaboración.
- No usar todo bajo diseño. Como el prototipo pasado, hacer uso de tornillos o husillos para la estructura y para la transmisión de movimiento.

Para explicar a detalle este prototipo, en la Figura 2-12 se tiene una vista en *explosión* del modelo a manera de poder enumerar las piezas diseñadas para este prototipo, así como la Tabla 2-5 con una breve descripción de su uso. Los planos de construcción y medidas de las piezas se encuentran en el Anexo B.

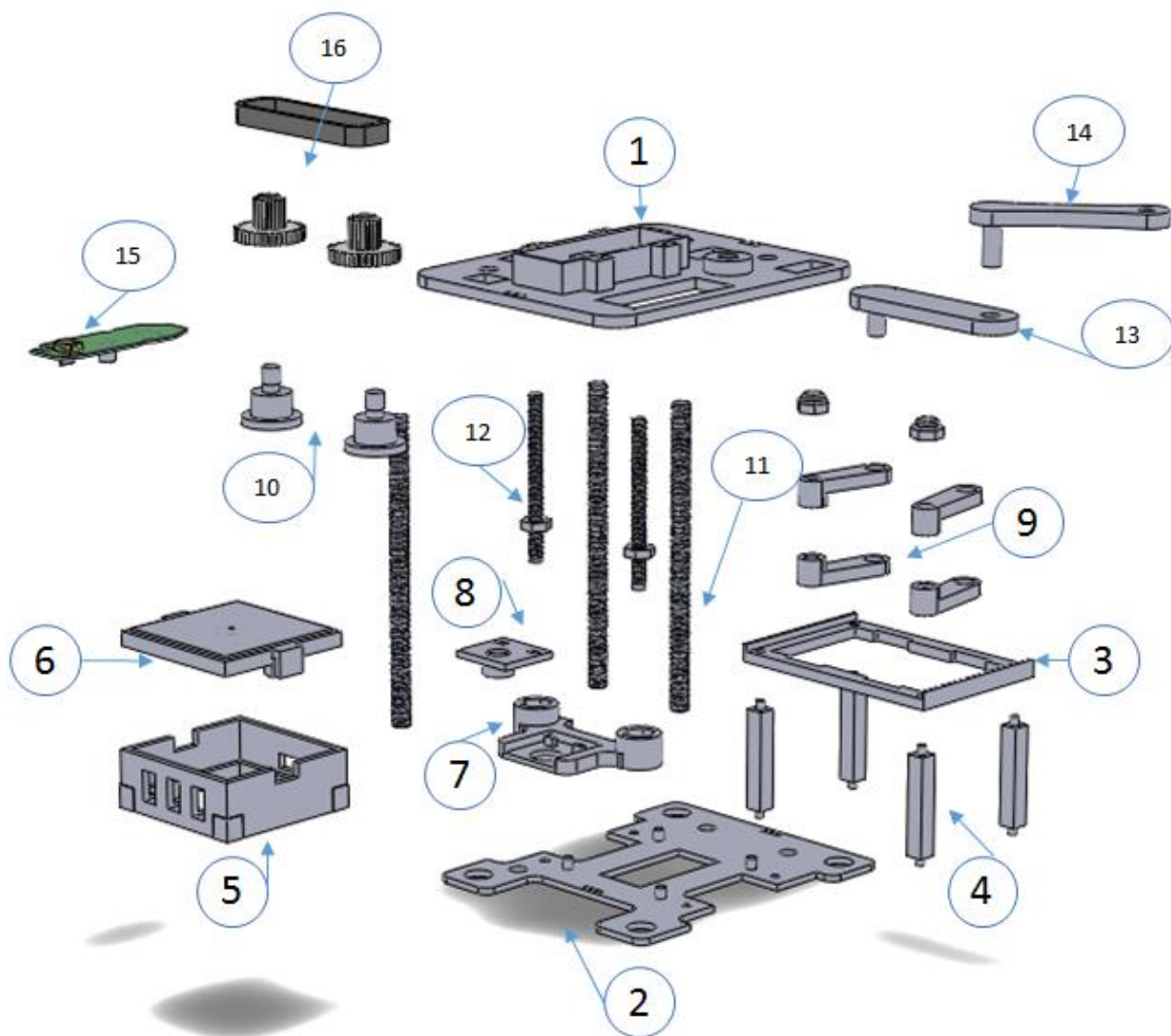


FIGURA 2-12. MODELO 3D DEL PROTOTIPO #2 EN EXPLOSIÓN.

TABLA 2-5. LISTA DE PIEZAS QUE COMPONEN AL PROTOTIPO #2 CON DESCRIPCIÓN.

No.	Nombre de Pieza	Etapas	Descripción
1	Superior Base	Soporte	Se localiza en lo más alto del microscopio e incluye en su diseño lo que se denominó cajón de sensor que mantiene fijo el chip a la estructura. Cuenta con 6 orificios con propósito especial: 3 circulares para unión con los tornillos de estructura, 2 para los coples de los tornillos de movimiento y uno rectangular para la entrada de luz hacia el sensor de la cámara web.
2	Inferior Base	Soporte	El ahorro de material y tiempo de manufactura son la razón de que esta pieza presente esa geometría con diferentes claros. Este diseño presenta características particulares: 4 pequeños orificios y 4 pequeñas extrusiones diseñados para poder unir 4 piezas iguales que son el soporte para la platina y una pieza de la etapa de

No.	Nombre de Pieza	Etapa	Descripción
			iluminación, respectivamente. Los agujeros más grandes y a los extremos se diseñaron para la colocación de 4 elementos más de sujeción al piso. Y los demás agujeros son para conectar con la parte superior.
3	Base muestra	Platina	Sin movimiento, es una pieza que ajusta perfectamente con el tamaño de un portaobjetos normal con dos pestañas que limiten su caída. Tiene la virtud de poder diseñarse con diferentes dimensiones para intercambiarse para muestras más grandes y ensamblarse con los postes a la estructura.
4	Postes de platina	Platina	Elementos que conectan la base de la muestra a la estructura, son delgados y que pueden imprimirse varios para modificar la altura a la que se coloque la muestra para variar su magnificación.
5	Base iluminación	Iluminación	Con el objetivo de ser modular, esta pieza es un cajón que almacena el circuito de iluminación LED para evitar rayos de luz en todas direcciones (luz residual), y que tiene cortes a medida para insertar los interruptores y la energización.
6	Tapa condensador	Iluminación	Pieza que embona en la parte superior de la base con un orificio en su centro por donde favorece la salida de luz LED que pasa por algún lente condensador para la concentración de los rayos.
7	Base lente	Óptica	Se caracteriza por servir de soporte a la pieza que envuelve la lente y por poderse mover de manera vertical. Cuenta con extrusiones en sus extremos que retienen tuercas que hacen posible la conversión de movimiento rotacional a lineal (como se explica en el Anexo C) y un orificio para el paso de luz sobre el eje óptico.
8	Agarre lente	Óptica	Pieza cuyo único fin es sujetar firme una sola lente y gracias sus cortes rectangulares, es posible colocarlo de manera fija en la pieza anterior. La función de este diseño es que sea posible utilizar diferentes lentes con sus sujeciones personalizadas por sus especiales dimensiones
9	Restrictores	Óptica	Se diseñó con la idea de extender la rigidez de la estructura fija al movimiento de los tornillos que establecen la distancia focal, limitando movimientos aleatorios que presentan estos.
10	Cople superior	Óptica	Es el elemento que da agarre al tornillo de movimiento del lente objetivo y de unir a las piezas de transmisión del movimiento con palanca, ensamblándose dentro de una camisa especialmente diseñada en la base superior.
11	Tornillos soporte	Estructura	Tornillos de $\varnothing \frac{1}{4}$ [in] que mantienen fija la estructura con ayuda de tuercas de seguridad.
12	Tornillos movimiento	Óptica	Tornillos de $\varnothing \frac{3}{16}$ [in] que giran con el sistema de manivela para el movimiento lineal del lente.

No.	Nombre de Pieza	Etapas	Descripción
13	Separador de engranes	Manivela de enfoque	Pieza diseñada por la necesidad para mantener la distancia correcta entre los engranes que tiende a disminuirse debido a la presión de la banda ejercida a estos.
14	Manivela	Manivela de enfoque	Es la pieza que tiene más contacto y movimiento en el mini microscopio porque, una vez sujeto con un opresor a uno de los engranes, se debe hacer girar en sentido a las manecillas del reloj para alejar el lente de la muestra y en sentido inverso para acercarlo.
15	Chip y sensor	Interfaz	Elemento que permite la obtención de imágenes de la muestra en el mini microscopio.
16	Engranes y banda	Manivela de enfoque	Elementos de bajo costo adecuados para el propósito de transmisión de movimiento para enfoque.

La construcción del microscopio se llevó a cabo gracias al uso de la Ultimaker 2, que es una impresora 3D de manufactura aditiva. El proceso para el uso de esta herramienta es bastante sencillo e intuitivo una vez que se tiene un modelo diseñado y exportado a formato STL para su uso dentro del software Cura. El prototipo ensamblado se muestra en la Figura 2-13.

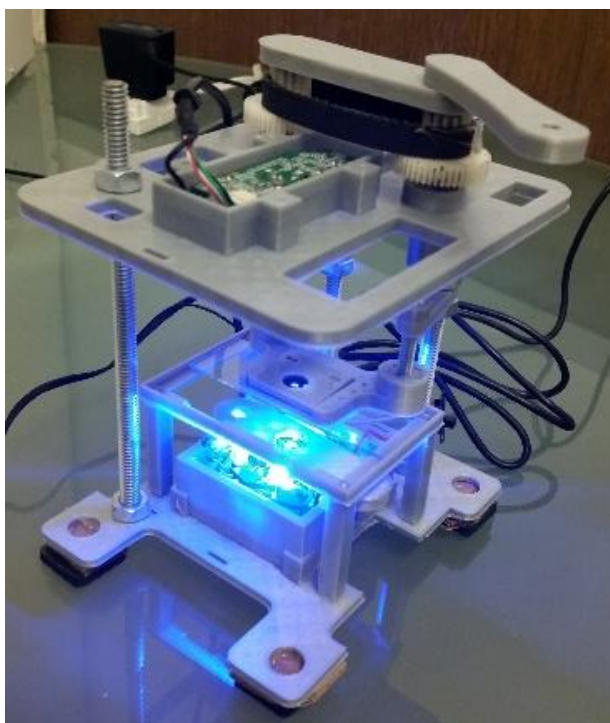


FIGURA 2-13. IMÁGENES DEL PROTOTIPO FUNCIONAL 2 IMPLEMENTADO.

En el Anexo C se presentan más imágenes sobre este prototipo armado. Este prototipo construido con éxito, que se basa en el principio de funcionamiento de la Figura 2-1.

2.2.2. Sistema eléctrico de iluminación

La iluminación es fundamental para la formación de imágenes en el microscopio. Este módulo de iluminación requiere de una fuente de alimentación que cumpla los objetivos de practicidad y bajo costo. A continuación se describen los principales componentes a utilizar en este prototipo.

TABLA 2-6. CARACTERÍSTICAS ELÉCTRICAS DE LA FUENTE DE ALIMENTACIÓN Y DEL LED A UTILIZAR.

Fuente de alimentación			LED RGB				
Voltaje de entrada [V _{AC}]	Voltaje de salida [V _{DC}]	Corriente [mA]	Color	Longitud de onda [nm]	Voltaje de alimentación [V]	Corriente [mA]	Potencia [W]
100 – 240	5.7 – 6.5	800	Rojo	624 – 635	2.2	400	0.8
			Verde	520 – 530	3.2	350	1.1
			Azul	460 – 475	3.2	350	1.1

El Anexo D comprende a detalle una descripción más completa del LED antes mencionado, el motivo de su elección, así como su caracterización empleando un espectroscopio y su compatibilidad con el marcador fluorescente que se usará en el desarrollo de los siguientes experimentos.

La fuente de alimentación utilizada es una fuente de DC para dispositivos móviles, mencionada en la Tabla 2-6. Esta fuente se seleccionó debido a su alta disponibilidad, reducidas dimensiones y a sus características eléctricas adecuadas para la alimentación de la iluminación LED.

Para el diseño eléctrico, se contempló solo el encendido y apagado de los LEDs para el funcionamiento de las modalidades de microscopio optico convencional y microscopio de fluorescencia, procurando que el la iluminación LED trabaje sin alcanzar los valores eléctricos máximos, pero que se obtenga la mayor iluminación posible.

El diagrama eléctrico representativo de la etapa de iluminación para un solo LED es como el que se presenta a continuación, utilizando la herramienta de simulación Proteus 8.0.

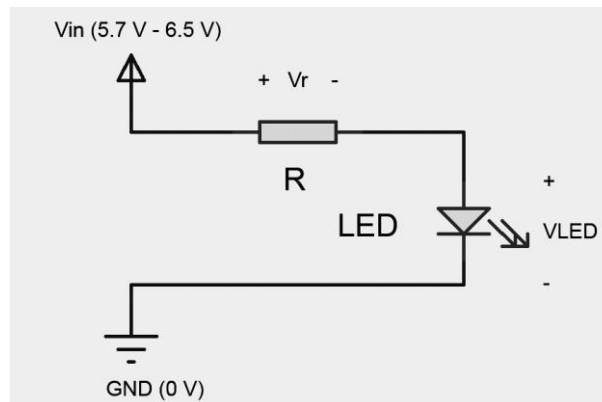


FIGURA 2-14. DIAGRAMA SIMPLIFICADO DEL CIRCUITO ELÉCTRICO DE ILUMINACIÓN.

Donde:

Bat₁: fuente de alimentación real con valores reales de 5.7 [V] y 6.5 [V].

R₁: Valor de la resistencia

D₁: LED RGB

I₀: Corriente eléctrica operativa

Realizando la ecuación de la malla por Ley de Voltajes de Kirchhoff se tiene la siguiente ecuación.

$$-V_{in} + V_R + V_{LED} = 0 \dots (2)$$

Donde:

V_{in}: voltaje de la alimentación

V_R: voltaje de la resistencia

V_{LED}: voltaje de funcionamiento del LED

Que, para obtener el valor de la resistencia bajo estas condiciones, se utiliza la siguiente:

$$R = (V_{in} - V_{LED}) / I_0 \dots (3)$$

Finalmente, seleccionando como límite una corriente eléctrica de 250 [mA] a manera de protección del LED para la ecuación 3, se obtienen los siguientes valores de resistencia al voltaje obtenido por el circuito anterior.

TABLA 2-7. VALORES DE LA RESISTENCIA NECESARIA PARA SUJETAR EL LED EN EL PUNTO DE TRABAJO DESEADO.

CÁLCULO DEL VALOR DE RESISTENCIA PARA CIRCUITO DE ALIMENTACIÓN								
COLOR	V. Encendido LED	Alimentación mínima	Alimentación máxima	Corriente de operación	Valor de resistencia equivalente		Valor promedio	
	V _{LED} [V]	V _{IN1} [V]	V _{IN2} [V]	I ₀ [mA]	R ₁ [Ω]	R ₂ [Ω]	R ₁ [Ω]	R ₂ [Ω]
Rojo	2	5.7	6.5	250	14.8	18	13.73	16.93
	2.2	5.7	6.5	250	14	17.2		
	2.6	5.7	6.5	250	12.4	15.6		
Verde	3	5.7	6.5	250	10.8	14	9.33	12.53
	3.3	5.7	6.5	250	9.6	12.8		
	3.8	5.7	6.5	250	7.6	10.8		
Azul	3	5.7	6.5	250	10.8	14	9.33	12.53
	3.3	5.7	6.5	250	9.6	12.8		
	3.8	5.7	6.5	250	7.6	10.8		

Los valores resultantes de resistencias requieren disipar potencia eléctrica en un rango de 400 a 800 [mW]. Lo anterior nos indica que será necesario el uso de resistores comerciales de al menos 1 [W].

Eligiendo un valor medio entre los que se encuentran en la tabla y los valores comerciales encontrados con algunos proveedores se eligió usar una resistencia de

potencia de $12\ \Omega$ y 2 W. El diagrama eléctrico mostrado en la Figura 2-15 muestra el circuito eléctrico de iluminación RGB.

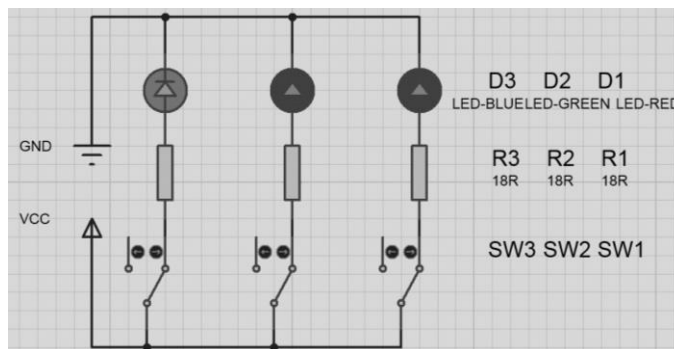


FIGURA 2-15. IMÁGENES DEL CIRCUITO DE ALIMENTACIÓN DEL LED RGB SIMULADO EN EL PROGRAMA PROTEUS.

A través del uso del programa de simulación Proteus 8.0 es que fue posible integrar los diagramas del circuito y realizar simulaciones de voltaje y corriente. El mismo concepto del circuito es el que se usa en la etapa de iluminación blanca, sólo que para un solo led y es exactamente igual al de la Figura 2-14.

Con ello, e implementando el circuito necesario para la iluminación, el resultado final para este primer prototipo funcional se muestra a continuación.

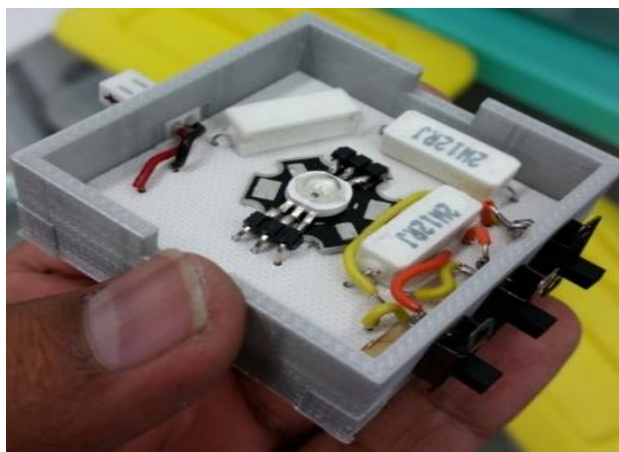


FIGURA 2-16. IMÁGENES DEL CIRCUITO REALIZADO PARA LA ILUMINACIÓN RGB DEL MINI MICROSCOPIO.

Para su construcción se utilizó:

- LED RGB 3W con disipador de calor integrado, LED 5mm color blanco
- Resistencia $12\ \Omega$ y 2W (3)
- Alambre.
- Interruptor deslizable de 1 tiro 2 polos (3)

2.2.3. Pruebas de funcionamiento

El funcionamiento del prototipo #2 como microscopio óptico convencional, se presenta en las imágenes siguientes tomadas por computadora con el uso de micro canales hechos

en PDMS a forma de préstamo [16], donde se aprecia una mejora con su antecesor en cuanto a nitidez.

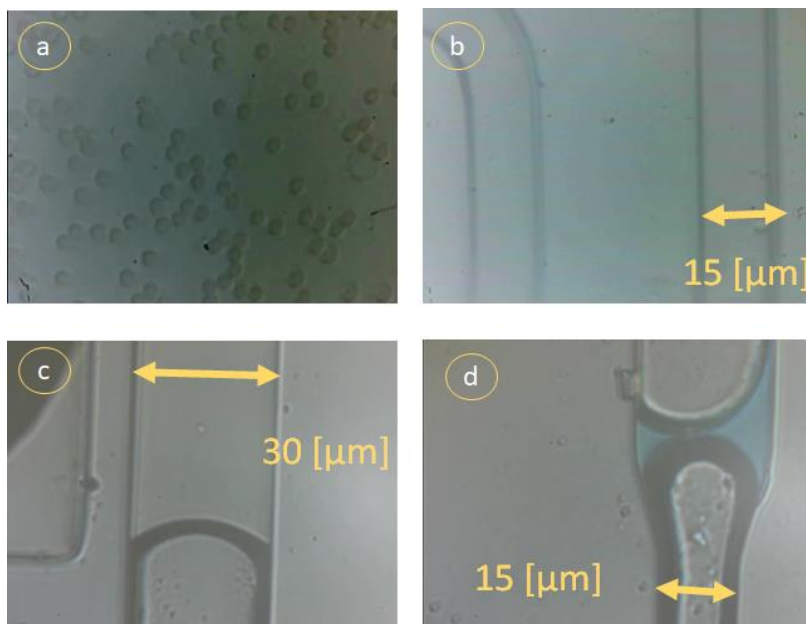


FIGURA 2-17. IMÁGENES DE: A) GOTA DE SANGRE; B), C) Y D) DIFERENTES ZONAS DE UN MICRO CHIP [16].

Las siguientes fotografías de la Figura 2-18 tomadas con el mini microscopio son muestra del primer acercamiento al funcionamiento de un microscopio de fluorescencia utilizando muestras de fluoresceína que, gracias al diseño modular del prototipo #2 que permite el intercambio entre el uso de luz blanca o luz de algún color en específico, excitan la muestra.

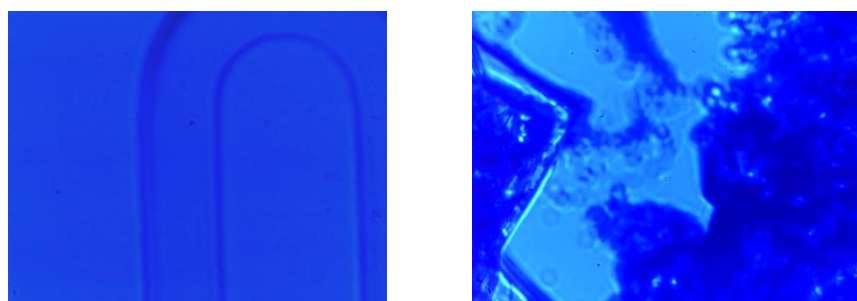


FIGURA 2-18. IMAGEN DEL MICRO CANAL DE SEPARACIÓN DE GOTAS [16] Y UNA GOTA DE FLUORESCÉINA SOBRE UN PORTA OBJETOS.

En la imagen de la gota de fluoresceína no se apreció un resultado positivo de detección debido a que presenta distintas tonalidades de azul y no un definido color verde, como se muestra en la siguiente imagen de la misma gota de fluoresceína con el uso de un microscopio comercial.

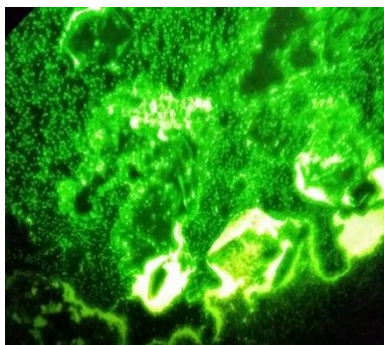


FIGURA 2-19. IMAGEN DE UNA GOTA DE FLUORESCÉINA TOMADA CON UNA CÁMARA DE CELULAR DIRECTO DE LOS OCULARES DEL MICROSCOPIO TCM400.

Aun realizado el mismo experimento muchas veces, no fue posible ver una imagen con el prototipo #2 que se asemejase al de la Figura 2-19. Esto ayudo a tomar en cuenta una primera hipótesis del mal funcionamiento del mini microscopio: El no usar un filtro que retenga la luz de excitación y permita el paso de la luz de emisión al sensor nos lleva a un resultado negativo en la observación. Esto nos lleva a dibujar un nuevo diagrama con el filtro.

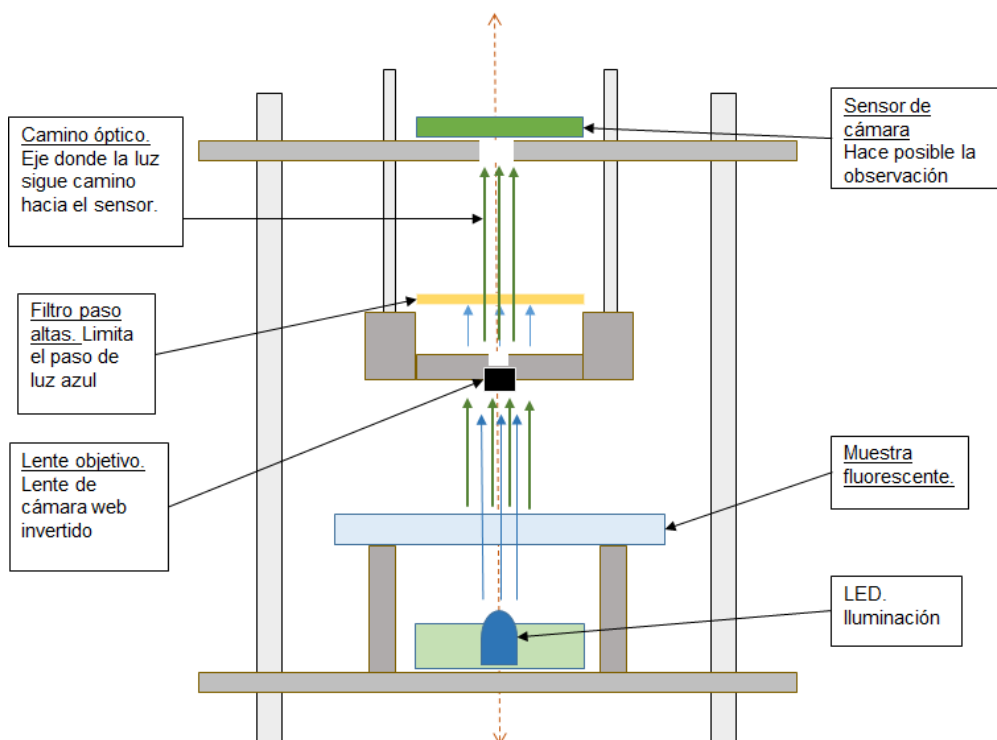


FIGURA 2-20. DIAGRAMA DE FUNCIONAMIENTO AÑADIENDO EL FILTRO PARA LUZ DE EXCITACIÓN.

En el artículo [14], se menciona la posibilidad de usar un filtro como se tiene contemplado en el diagrama anterior.

Para poner a prueba esto se utilizaron dos tipos de filtro paso altas: uno de bajo costo construido de mica para ventanas que filtra longitudes de onda iguales o inferiores al UV, y un filtro prestado de Edmund Optics, los cuales se muestran en la siguiente figura.

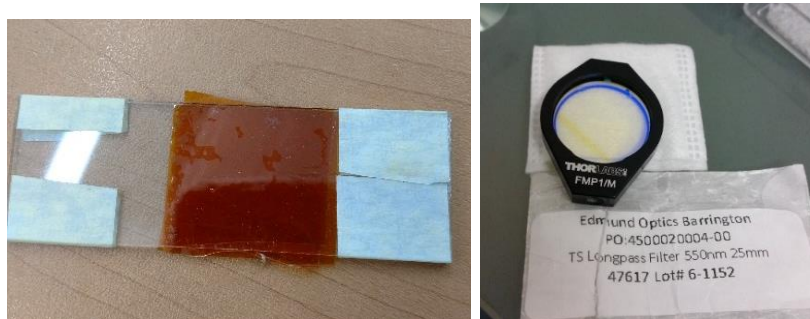


FIGURA 2-21. FILTROS UTILIZADOS. IZQUIERDA FILTRO DE BAJO COSTO, DERECHA FILTRO COMERCIAL.

Los detalles de las pruebas y construcción del filtro de bajo costo se encuentran en el Anexo F. Los resultados obtenidos, sin embargo, no fueron del todo lo esperado debido a que en ambos casos se tenía la particularidad de que toda la imagen tenía el mismo color verde, pero que no caracteriza al de la fluoresceína, sin importar si estas se veían alteradas por defectos del filtro construido o buena nitidez gracias al filtro profesional.

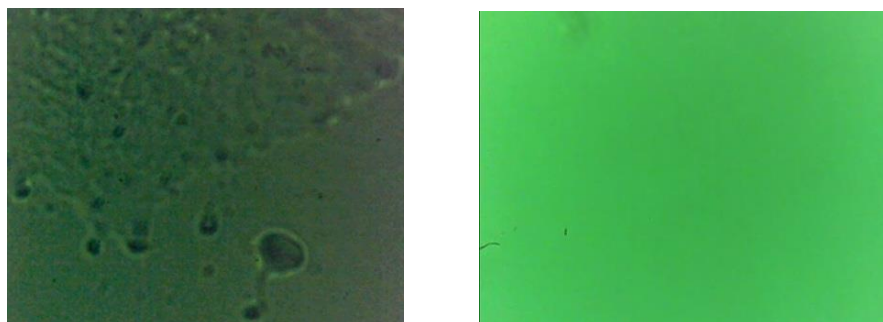


FIGURA 2-22. IMAGEN DE UNA GOTA DE FLUORESCÉINA: (IZQUIERDA) FILTRO DE BAJO COSTO, (DERECHA) FILTRO EDMUND.

El prototipo no ha podido cumplir del todo su objetivo respetando el principio de funcionamiento de la Figura 2-1. En el momento que se implementó un método distinto de iluminación a la muestra es que fue posible obtener imágenes fiables de observación del fenómeno fluorescente: Excitar la muestra con el haz de luz sin que éste se involucre directamente en el camino óptico del mini microscopio. Este método se explicará más adelante en el Capítulo 3.

En la siguiente figura se muestra los resultados de usar la iluminación RGB del prototipo #2 de manera ortogonal, sujeta con la mano.

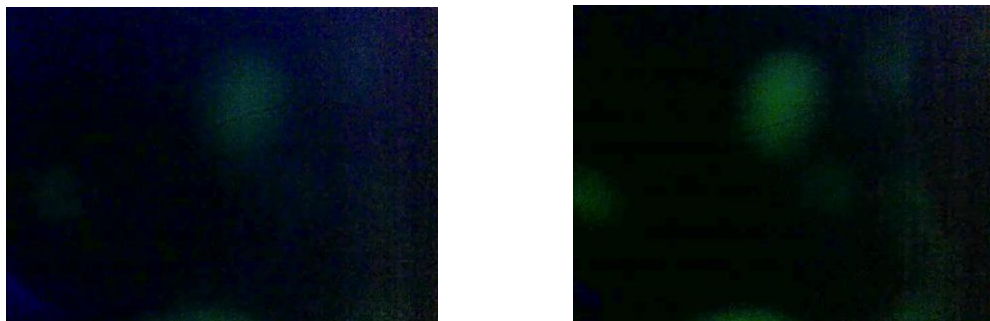


FIGURA 2-23. IMÁGENES OBTENIDAS DEL VIDEO 19 DONDE SE PRUEBA EL NUEVO CONCEPTO DE EXCITACIÓN DE LA MUESTRA.

Estas primeras imágenes, aunque con poca nitidez y sin forma definida, corroboraron que es un método que se adecua mucho al modelo de microscopio. Utilizando un micro canal con una solución de fluoresceína altamente concentrada se obtuvieron los siguientes resultados.



FIGURA 2-24. FIGURA OBTENIDAS DE LOS VIDEOS 21 Y 22. LAS TOMAS DE LA IZQUIERDA SON TOMADAS CON ILUMINACIÓN BLANCA Y LOS DE LA DERECHA CON ILUMINACIÓN AZUL.

Es apreciable como el verde y la forma del canal son nítidos y sin exceso de luz de excitación en ellos, aunque sigue presente, y aquello que no constituye la muestra fluorescente es de color negro. El resultado de estas pruebas, exhibido en la Figura 2-24, es una clara validación de que el principio modificado de un mini microscopio de fluorescencia funciona de manera correcta, como se vio en la imagen del microscopio profesional, y más importante aún, sin ayuda de filtros físicos o digitales.

Capítulo 3. Diseño y construcción

Como se empezó a explicar en el Capítulo anterior se tuvo que modificar el principio de funcionamiento del mini microscopio, como se había estado manejando para su modalidad de microscopio de fluorescencia y esta variación se presenta en el siguiente diagrama.

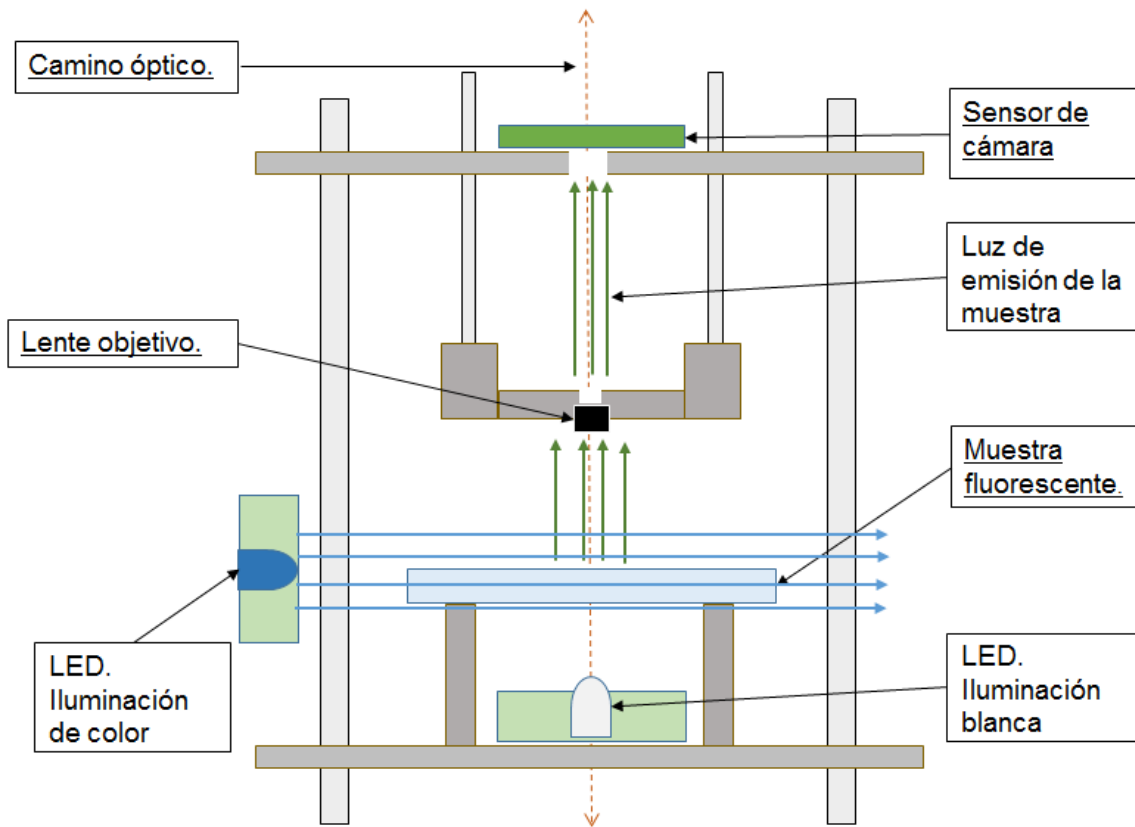


FIGURA 3-1. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO ALTERANDO EL POSICIONAMIENTO DE LA LUZ DE EXCITACIÓN.

En la Figura 3-1, tenemos que las líneas verdes ilustran el camino de la luz de fluorescencia y las líneas azules la luz de excitación. Para este modelo están presentes dos circuitos de iluminación diferentes, alimentados simultáneamente, ya que la luz blanca sirve para colocar de manera correcta la muestra (zona de interés) y la iluminación RGB para excitarla.

La solución fue excitar la muestra con la misma fuente de iluminación, pero sólo que este rayo de luz incidente no interviniera, en la medida de lo posible, con el camino óptico al sensor de la cámara. Al realizar la excitación de manera perpendicular, se limitaba a irradiar a la muestra y que este haz de luz siguiera un camino distinto lejos del sensor de la cámara, mientras que la emisión de luz fluorescente, irradiada en todas direcciones, fuese posible de ser captada por el sensor ya sin contaminación o que ésta fuese mínima. Tomando como nuevo principio de funcionamiento el presentado anteriormente, es que se realiza el diseño final y se presenta a continuación.

3.1. Diseño final

Al igual que el prototipo #2, este incluye las mejoras que se tomaron a lo largo de la serie de experimentos realizados con éste y se presentan a continuación. Los planos de estas nuevas piezas se encuentran en el Anexo G.

3.1.1. Diseño mecánico

El cambio radical de uno con el otro se debe a la lista de mejoras que obtuve a lo largo de un periodo de experimentos. Estas mejoras se reducen a la siguiente lista:

- Reducir la cantidad de piezas (sobre todo del mecanismo con manivela)
- Modelo de Estructura sin presentar espacios o huecos que favorecían el ahorro de material y que mejora la solidez de la estructura.
- Platina móvil.
- Eliminar el mecanismo con manivela para el movimiento del lente objetivo.
- Tener piezas que limiten mucho más la luz que incide en el sensor del chip de la cámara web.
- Minimizar obstáculos en la zona de colocación de muestras y experimentos.
- Incorporar un sistema de iluminación en dos etapas según el nuevo principio de funcionamiento.
- Variación en la altura y ángulo de incidencia de la luz de excitación (solo presente para el LED RGB).

Con lo anterior se produjo un modelo cuyo resultado es el que se muestra en la Figura 3-2, señalando también sus etapas o módulos.

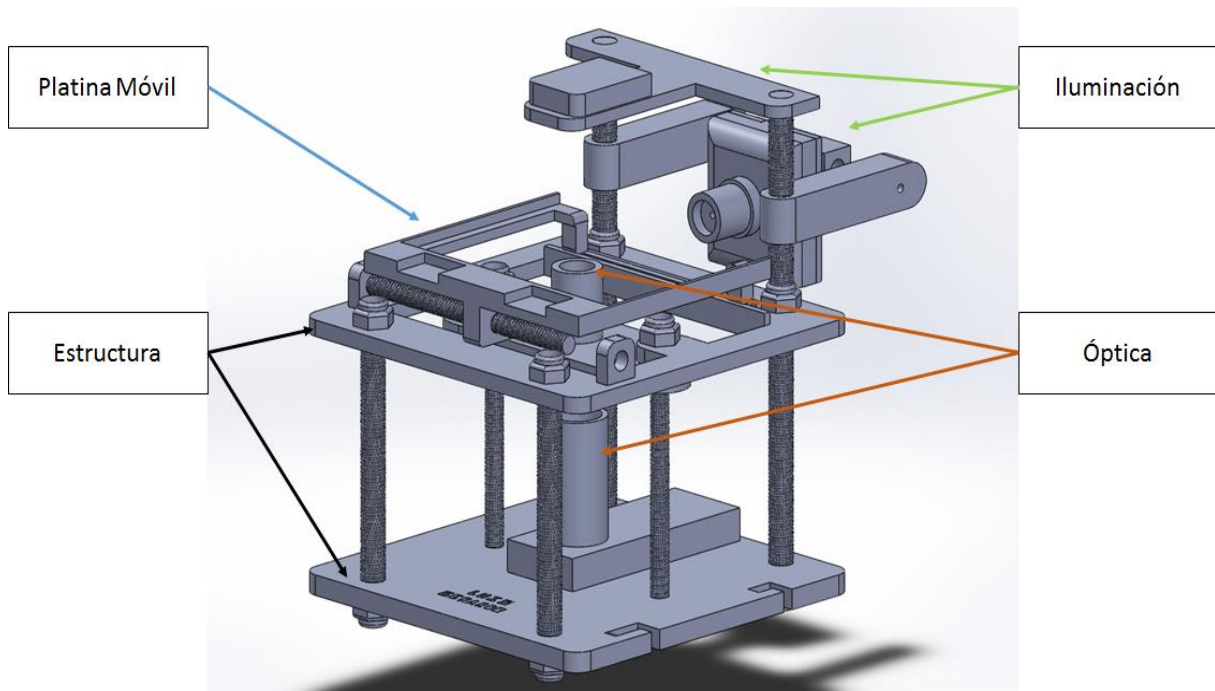


FIGURA 3-2. IMAGEN ISOMÉTRICA DEL ENSAMBLE COMPLETO CON SUS RESPECTIVOS MÓDULOS.

Para explicar a detalle este prototipo, en la Figura 3-3 se tiene una vista en *explosión* del modelo a manera de poder enumerar las piezas diseñadas para este prototipo, así como la con una breve descripción de su uso. Los planos de construcción de las piezas se encuentran en el Anexo G.

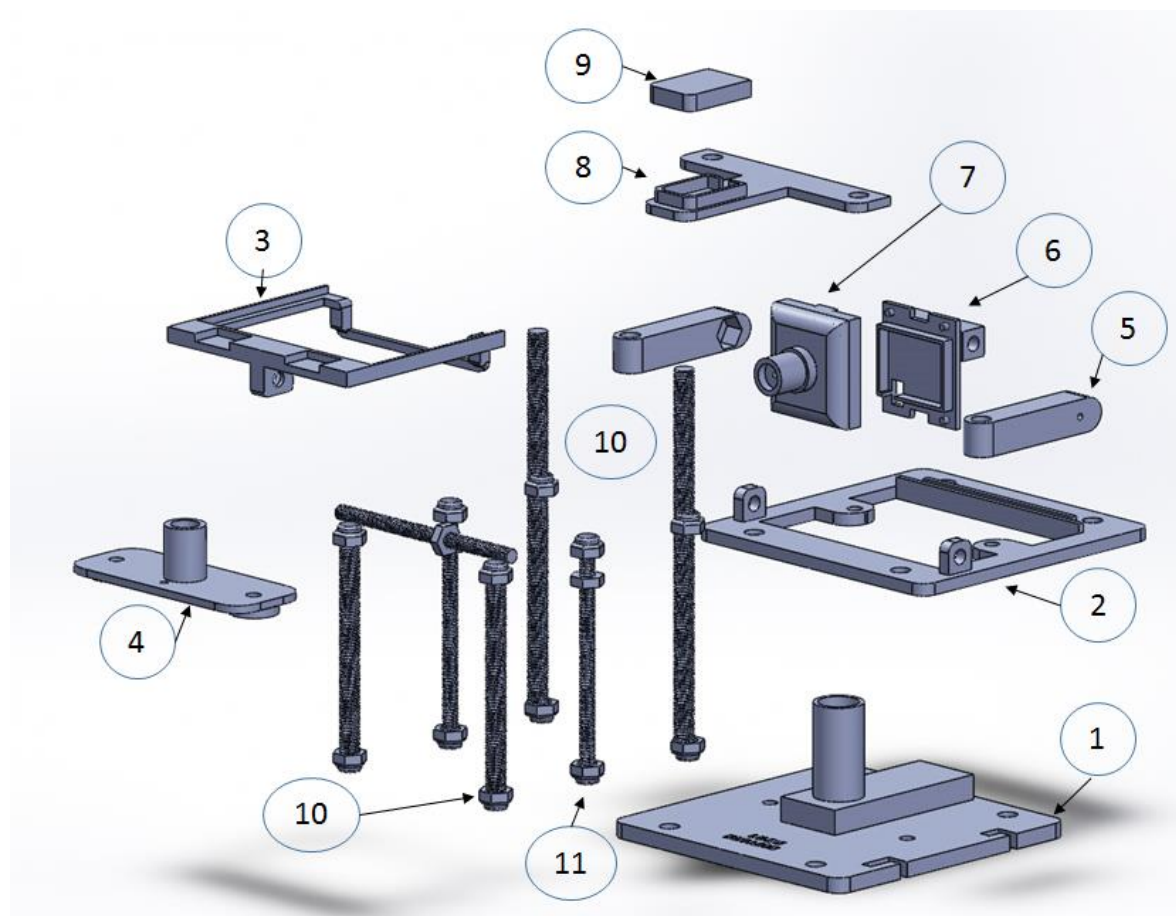


FIGURA 3-3. IMAGEN DEL MODELO FINAL EN EXPLOSIÓN INDICANDO SUS PIEZAS.

TABLA 3-1. LISTA DE PIEZAS QUE COMPONEN EL DISEÑO FINAL DE MINI MICROSCOPIO.

No.	Nombre de Pieza	Etapas	Descripción
1	Inferior Base	Soporte	Sirve para 2 cosas importantes: sujetar en la posición correcta al chip de la cámara web para la obtención de imágenes y para ser el contacto directo con la superficie donde se recargue el instrumento. Las mejoras en este modelo son: una extrusión tubular encima del orificio de entrada de luz del sensor para reducir en gran medida la luz residual que genera el LED RGB.
2	Platina Fija	Soporte/platina	Considera en su rediseño un gran espacio rectangular por dentro que permita el paso de luz hacia el sensor y la inclusión de dos extrusiones con agujeros para un tornillo de

No.	Nombre de Pieza	Etapas	Descripción
			Ø 3/16 [in] para la inclusión de la pieza móvil de la platina y un carril pequeño para la pieza móvil de la platina.
3	Platina móvil	Platina	La pieza tiene dos partes esenciales: el recorte o acoplamiento para una tuerca de Ø 3/16 [in] y el extremo que opuesto donde se recarga. El primero sirve de camisa para alojar una tuerca que al estar fija y al mover un tornillo insertado en ella, provoca el cambio de movimiento rotacional a movimiento lineal, precisamente como sucede con la parte óptica. Y la segunda es una guía que sigue el carril contenido en la platina fija y así restringe el movimiento de la platina fija en un solo eje.
4	Agarre Lente	Óptica	La pauta principal para el diseño de esta pieza fue: ser una pieza de dimensiones mayores para obstruir la mayor cantidad de luz residual en el camino óptico. Adicional continúa teniendo acoplamientos para tuercas que permitan el movimiento de enfoque.
5	RGB móvil Z	Iluminación	Es un elemento de conexión con la estructura para mantener firme el sistema de iluminación RGB pero con el detalle que permite que este mismo pueda colocarse a lo largo de los tornillos de la estructura para variar su altura.
6	Base Fija RGB	Iluminación	Pieza base donde se alberga el pequeño circuito del LED RGB y que presenta una extrusión trasera fundamental para lograr variar el ángulo de incidencia de la luz de excitación.
7	Tapa RGB	Iluminación	Tiene el propósito de condensar la luz emitida por el LED de potencia en un haz controlado y concentrado hacia la muestra, además de evitar salida de luz en direcciones.
8	Base LED Blanco	Iluminación	Es la base para el pequeño circuito de iluminación blanca y sirve también para asegurar la estructura en su parte superior.
9	Tapa LED Blanco	Iluminación	Cubre el pequeño circuito de la luz blanca y evita la salida de luz hacia arriba.
10	Tornillo estructural	Soporte	Tornillos de Ø ¼ [in] que mantienen fija la estructura con ayuda de tuercas de seguridad.
11	Tornillo de movimiento	Óptica	Tornillos de Ø 3/16 [in] que giran para el movimiento lineal del lente.

3.1.2. Diseño eléctrico

Contemplando que el circuito anterior cumplió su objetivo de excitar las muestras sin que el LED RGB mostrase daño o variación de intensidad durante la serie de experimentos, se contempla utilizar un diseño de características eléctricas similares al anterior salvo que el circuito se divide en dos módulos distintos:

- Módulo con interruptores de control para cada LED y potenciómetros para la selección de la intensidad de la iluminación
- Módulos con los LED's de iluminación (un módulo RGB y otro de iluminación blanca)

Este último favorece en gran medida el poder alternar entre diferentes usos de la iluminación rápidamente sin mover la base del microscopio y, por ende, la muestra. Utilizando los mismos valores de voltaje y corriente, ahora incluyendo un potenciómetro que ayude a variar la resistencia equivalente, la iluminación tiene ligeros cambios de intensidad.

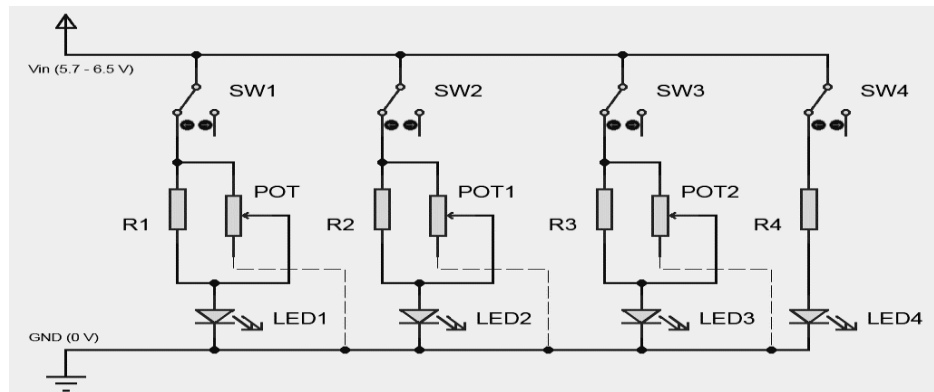


FIGURA 3-4. DIAGRAMA DE SIMULACIÓN CON PROTEUS.

Este diagrama es más apegado al real ya que todo, salvo los LEDs, estarán incluidos en el y servirá como tableta de encendido para todas las formas de iluminación. Físicamente este circuito tiene puentes en las terminales que van directo a los LEDs que se encuentran encapsulados dentro del cuerpo del mini microscopio.

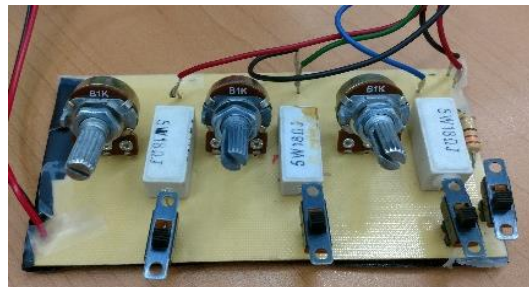


FIGURA 3-5. FOTOGRAFÍAS DEL CIRCUITO FABRICADO.

Para su construcción fueron necesarios elementos similares que los del prototipo mostrado en la sección 2.2.2. pero agregando un potenciómetro de 1K (3).

3.1.3. Construcción

Al igual que el punto pasado, su construcción se basó en su modelo en computadora y el uso de una impresora 3D. En el Anexo H se encuentran más imágenes del modelo construido.



FIGURA 3-6. FOTOGRAFÍA DEL MODELO REALIZADO EN 3D Y ENSAMBLADO CON UNA MUESTRA COLOCADA EN LA PLATINA.

3.1.4. Pruebas de funcionamiento

3.1.4.1. *Modalidad de microscopio óptico convencional*

Este ensamble del microscopio, debido a que todas las piezas están alineadas y el uso del lente de manera inversa magnifica lo que el sensor ve, permite tomar fotos como las siguientes.

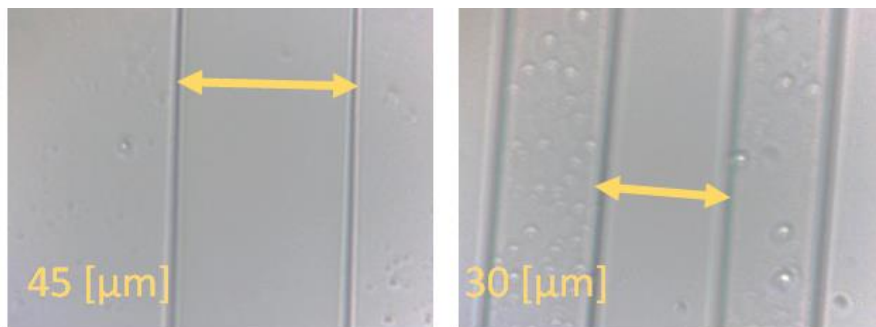


FIGURA 3-7. IMÁGENES DE SECCIONES DE UN CHIP DE MICRO FLUÍDICA.

3.1.4.2. Modalidad de microscopio de fluorescencia

Con este diseño se logró excitar la muestra para que logre emitir fotones sin que el sensor perciba de manera directa la luz de excitación. Al final, las imágenes obtenidas con este método son como las siguientes.

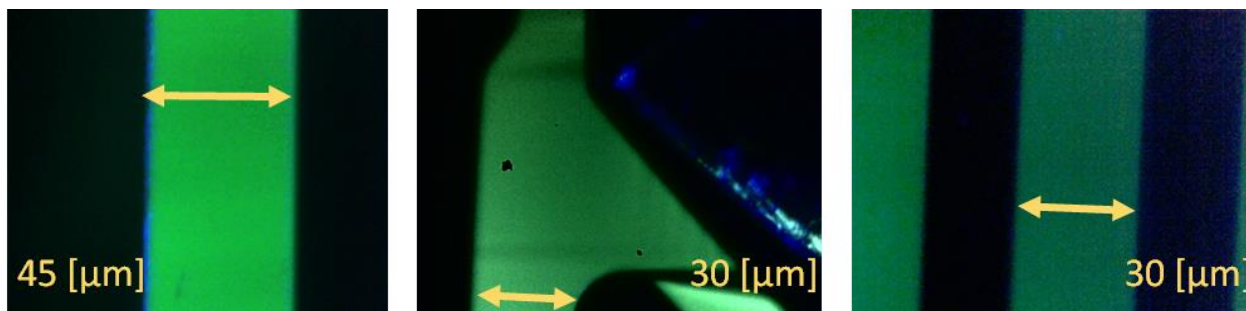


FIGURA 3-8. FOTOGRAFÍAS DE MICRO CANALES DE UN CHIP MICRO FLUÍDICO CON MARCADORES FLUORESCENTES DE DIFERENTES CONCENTRACIONES (FLUORESCÉINA) INTRODUCIDO MEDIANTE JERINGAS.

Los resultados obtenidos al final de la construcción y prueba de concepto de este diseño final fueron concluyentes al cumplimiento para lo que este fue diseñado: realizar observaciones magnificadas de muestras muy pequeñas de muestras fluorescentes o no.

Además de ello, se presentó una simplicidad en el modelo, mínimo uso de material óptico convencional que utilizan microscopios comerciales como son múltiples lentes objetivo, lentes oculares, filtros y polarizadores, así como espejos y fuentes de luz especializadas.

Sin embargo, no se puede finalizar el trabajo debido a que no se tiene una clara caracterización del modelo: no sabemos los límites de detección del mismo y que tan capaz es de ofrecer resultados fiables o cercanos a la realidad. Todo esto se presenta a continuación con el experimento de validación.

Capítulo 4. Caracterización del mini microscopio

4.1. Arreglo experimental

Una vez realizada la construcción del modelo de mini microscopio diseñado, falta caracterizar su capacidad de detección de fluorescencia en muestras microscópicas y tener una representación cuantitativa de ello. Para ello el experimento contempló hacer fluir diferentes concentraciones de solución fluorescente a través de un canal microfluídico, empleando para esto una bomba de jeringa.

Posteriormente se hace uso de la fuente de iluminación LED para excitar la muestra y detectar fluorescencia y registrar fotografías y/o video con el sensor de la cámara web y un ordenador. La siguiente figura muestra de manera general la idea del experimento.

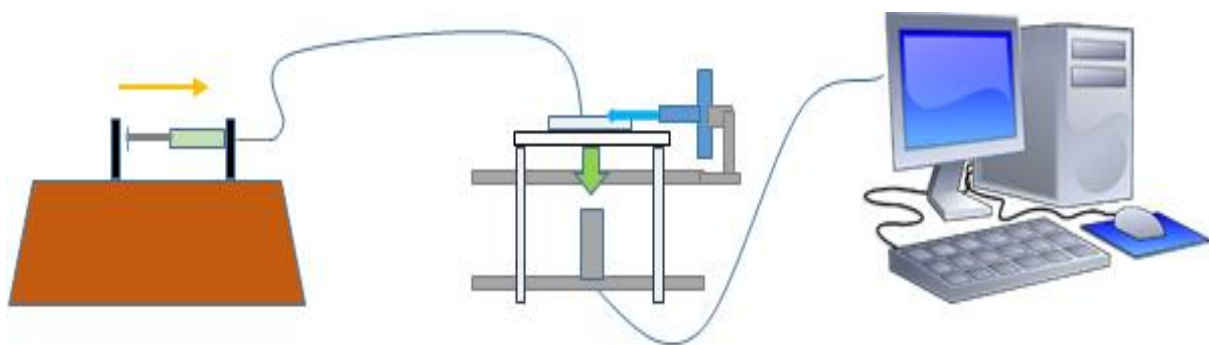


FIGURA 4-1. DIAGRAMA GENERAL DE LA PUESTA EN MARCHA DEL EXPERIMENTO CON USO DE UNA BOMBA DE INYECCIÓN/RETRACCIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN, UN ORDENADOR Y EL MINI MICROSCOPIO

Los objetos y herramientas cruciales para este experimento son tres: La bomba de inyección/retracción controlada con alta resolución para uso de jeringas, la solución fluorescente y los micro canales. En el laboratorio se cuentan con bombas *kdScientific®* para uso de una o dos jeringas, y por último los micro canales con una donación de Erick Omar derivado de su trabajo de tesis de maestría [16].



FIGURA 4-2. A) IMÁGENES DEL COMPUESTO LLAMADO FLUORESCÉINA SÓDICA EN POLVO Y DILUYÉNDOSE. B) BOMBA PARA INYECCIÓN/RETRACCIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN [E], C) EJEMPLO DE UN CHIP MICROFLUÍDICO [F].

4.1.1. Preparación de diferentes concentraciones de fluoresceína

Para determinar el rango de detección de fluorescencia del microscopio propuesto se realizaron soluciones de fluoresceína a diferentes concentraciones.

En el Anexo D se detalla el principio de funcionamiento de los fluoróforos, y se describe la importancia de cuidar el pH de las diferentes concentraciones de fluoresceína a emplear en cada experimento, ya que de este parámetro depende la máxima intensidad de la señal emitida

Para lograr esto fue necesario usar un disolvente capaz de mantener el pH de la solución en un valor constante. Con base en la información del marcador fluorescente presente en el Anexo D, esta sustancia tiene un máximo de emisión con un pH 8 u 9. Esto se logró con el buffer TRIS, debido a que este agente estabilizador tiene una capacidad estabilizadora efectiva en el intervalo de 7 a 9.2 de la escala de pH [19].

El propósito final de esta caracterización es realizar una gráfica que describa cómo el mini microscopio detecta las diferentes intensidades del marcador fluorescente con respecto a distintas concentraciones: 500 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM , 40 μM y 30 μM , siguiendo el método siguiente.

Materiales y herramientas

- Fluoresceína en una concentración de 2600 μM
- *Buffer* TRIS con pH 8.0 y una concentración 100 μM
- Tubo eppendorf de 2[mL] de capacidad. (6)
- Papel aluminio
- Micro pipeta (2)

Cálculo de las distintas concentraciones

El procedimiento que se realizó para este cálculo se compone de una regla de 3, derivado de la fórmula para la preparación de una solución a partir de una solución concentrada, como se muestra en la fórmula 4.

$$C_i V_i = C_f V_f \dots (4)$$

Donde:

C_i : Concentración inicial

C_f : Concentración final

V_i : Volumen inicial

V_f : Volumen final

Se partió de tener una solución altamente concentrada de 2600 μM , para diluirla en otras menos concentradas. En este proceso nuestros parámetros de control son el volumen final (1 [mL]), la concentración final e inicial. Es entonces que el volumen inicial de la solución concentrada es el valor a encontrar de la ecuación 5.

$$V_i = (C_f * V_f) / (C_i) \dots (5)$$

A continuación, se muestra los resultados de los volúmenes iniciales, para tener muestras de las concentraciones deseadas.

TABLA 4-1. OBTENCIÓN DE DIFERENTES VOLÚMENES DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA Y DE TRIS PARA LAS NUEVAS SOLUCIONES.

Concentración final μM	Volumen final [mL]	Concentración inicial μM	Volumen inicial [mL]	Volumen de buffer [mL]
500	1	2600	0.1923	0.8077
200	1	2600	0.0769	0.9231
100	1	2600	0.0385	0.9615
50	1	2600	0.0192	0.9808
40	1	2600	0.0154	0.9846
30	1	2600	0.0115	0.9885

El siguiente paso fue mezclar cada volumen inicial de fluoresceína con el volumen de buffer correspondiente en otro tubo Eppendorf de 2 [mL], utilizando micropipetas de 1 [mL] y resolución de ± 10 [μL] y otra con capacidad de 0.5 [mL] y una resolución de ± 5 [μL] [20] para utilizarse con el *buffer* y la fluoresceína, respectivamente.

Estos tubos se recubren con material reflejante o no traslucido para evitar el contacto con otra fuente de luz que desgaste la fluoresceína (foto blanqueamiento).



FIGURA 4-3. TUBOS EPPENDORF CON LAS SOLUCIONES PREPARADAS.

4.1.2. Comparación de la detección de fluorescencia con un microscopio comercial

Se compararon los resultados de detección de fluorescencia del minimicroscopio con los que puede proporcionar un microscopio comercial como lo es el Labomed TCM 400. El montaje del arreglo experimental y su funcionamiento con muestras fluorescentes es como el que se muestra en la Figura 4-4.

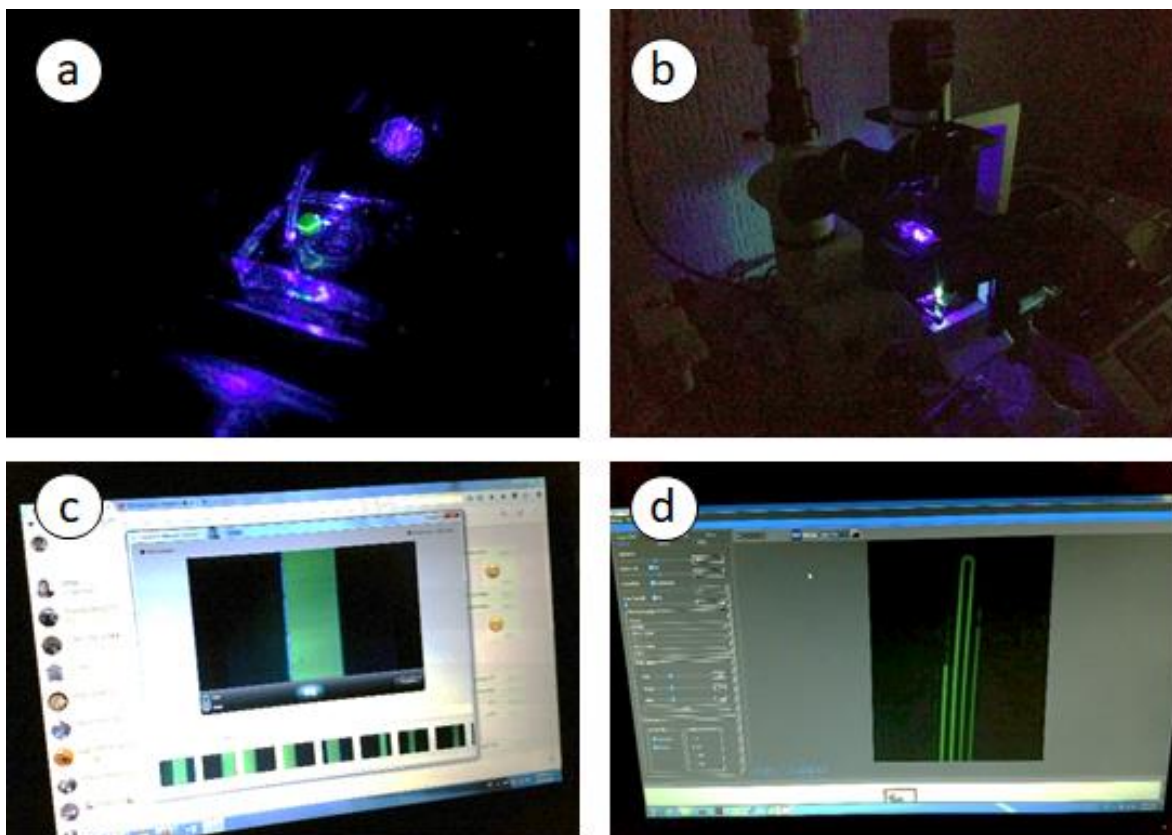


FIGURA 4-4. IMÁGENES A) Y C) QUE MUESTRAN EL USO DEL MINI MICROSCOPIO Y LA DETECCIÓN DE MUESTRA FLUORESCENTE; IMÁGENES B) Y D) QUE MUESTRAN EL USO Y DETECCIÓN CON EL TCM400 DE UNA MUESTRA FLUORESCENTE.

El montaje del experimento se llevó a cabo en el *Laboratorio de Caracterización de Micro-Sistemas Lab on a Chip* a cargo de la Dra. Laura Oropeza. Los detalles fotográficos del arreglo experimental están contenidos en el Anexo I.

El procesamiento de las imágenes se realizó por medio del software libre **ImageJ** que permite el análisis de fotos y videos de una amplia serie de formatos, para muchas aplicaciones: mejorar calidad de las imágenes, análisis de espectros, intensidad y separación de colores.

Las dos principales herramientas utilizadas en este experimento son las explicadas a continuación, junto con sus imágenes para explicar de manera concreta su uso con fotografías del mini microscopio.

Despliegue de canales. Este comando incluido en la ruta *Image* → *Color* → *split colors*, permite dividir la imagen colocada en el programa en tres imágenes en escala de grises, donde cada una representa un canal distinto (rojo, verde y azul) y mientras más claro sea el color en su respectivo canal, implica más presencia de este en la imagen.

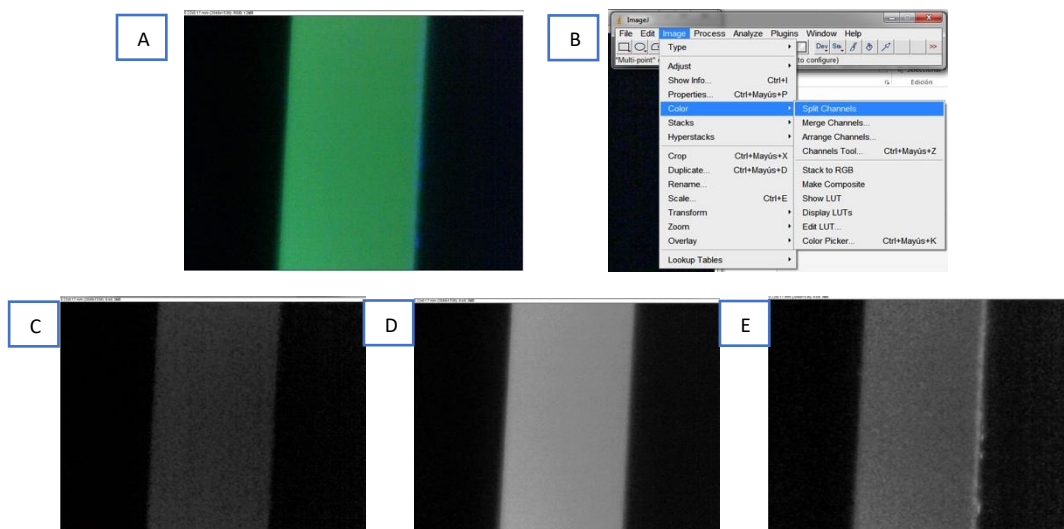


FIGURA 4-5. A) FOTOGRAFÍA 351 TOMADA CON EL MINI MICROSCOPIO SIN ÁREA DE SELECCIÓN ALGUNA. B) IMAGEN DEL COMANDO SPLIT CHANNELS. C) IMAGEN REPRESENTANDO EL CANAL O ESPECTRO ROJO DE LA IMAGEN D) IMAGEN REPRESENTANDO EL CANAL O ESPECTRO VERDE DE LA IMAGEN E) IMAGEN REPRESENTANDO EL CANAL O ESPECTRO AZUL DE LA IMAGEN.

ROI Manager. Region Of Interest por sus siglas en inglés y cuya traducción sería área de interés, es un asistente que permite introducir contornos sobre la imagen (ya sean ovaladas o rectangulares) para obtener de su interior la información que se desee del amplio catálogo de variables que puede calcular el software, como los son: área, promedio de color gris, desviación estándar, valor modal de color gris, valor mínimo y máximo, centroide, entro de masa, perímetro, rectángulo envolvente, elipse de ajuste, diámetro de Feret, densidad integrada, mediana, curtosis, entre otras.

El hecho de seleccionar las opciones de *promedio de color gris*, *valores máximo y mínimo* y *desviación estándar* recae en que el objetivo del experimento es analizar el valor de intensidad (escala de grises), que estas imágenes registran en mediante el programa. El uso de esta herramienta es basto para muchas aplicaciones y su uso se explicara en el Anexo J.

4.1.2.1. Detección #1 de concentraciones

La realización del experimento siguió un orden descendente con respecto a las concentraciones utilizadas hasta encontrar el límite inferior de detección de fluorescencia. El proceso de análisis de las imágenes se hizo como se muestra a continuación utilizando como ejemplo la concentración de 500 μM .

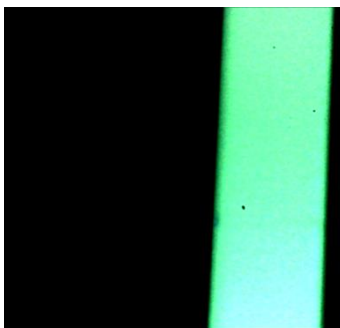


FIGURA 4-6. IMAGEN MÁS REPRESENTATIVA DE LA CONCENTRACIÓN DE 500 μM .

Realizando el despliegue de sus diferentes canales como se explicó en la sección anterior, tenemos el resultado de la Figura 4-7.



FIGURA 4-7. DE IZQUIERDA A DERECHA CORRESPONDEN A LOS CANALES ROJO, VERDE Y AZUL PARA LA CONCENTRACIÓN DE 500 μM .

Por último, el análisis final se realizó utilizando la herramienta de *Region Of Interest Manager* con varias regiones a lo largo de los canales y la característica de estas secciones son las siguientes: Región ovalada de 50*50 píxeles y Color del contorno de la región por definición, verde.

La imagen resultante después de agregar 9 ROI a lo largo del canal se muestra en la Figura 4-8 y cuyos resultados se resumen en Tabla 4-2.

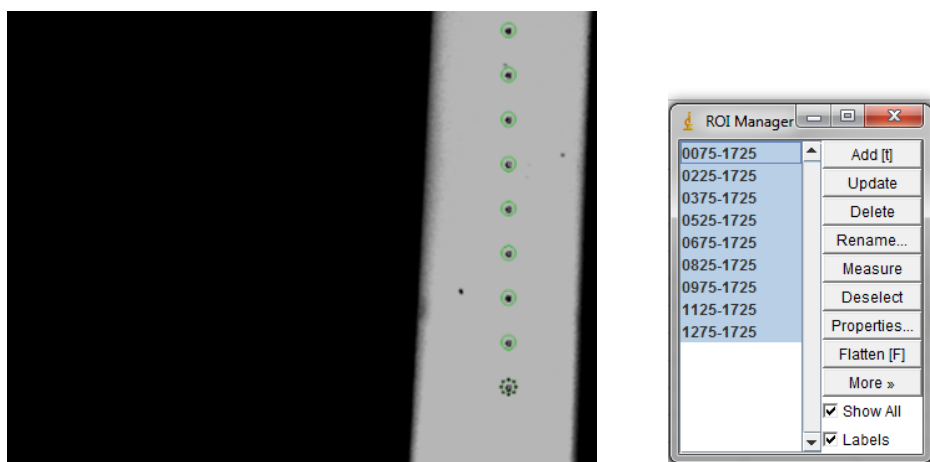


FIGURA 4-8. IMÁGENES DEL CANAL SÓLO TOMANDO EL ESPECTRO DE COLOR VERDE Y DEL ROI MANAGER.

TABLA 4-2. LISTA DE VALORES OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE LAS 9 REGIONES DE INTERÉS

Concentración 500 μM				
ROI	Mean [bits]	Dev stdr	Min	Max
1	250.504	17.331	145	255
2	254.635	0.581	251	255
3	254.703	0.541	251	255
4	254.725	0.516	253	255
5	254.757	0.48	252	255
6	254.774	0.439	253	255
7	254.719	0.532	252	255
8	254.731	0.502	252	255
9	254.727	0.5	253	255
PROMEDIO	254.252	1.4063		

A continuación, se muestra la gráfica de la Figura 4-9, de todos los valores promedio de intensidad de fluorescencia y su correspondiente dispersión, con respecto a cada una de las concentraciones medibles. Como se puede apreciar, esta relación tiene una tendencia aproximadamente lineal positiva donde, a mayor concentración, mayor es el grado de emisión de luz de fluorescencia. Las tablas e imágenes de todas las concentraciones detectadas se encuentran en el Anexo K.

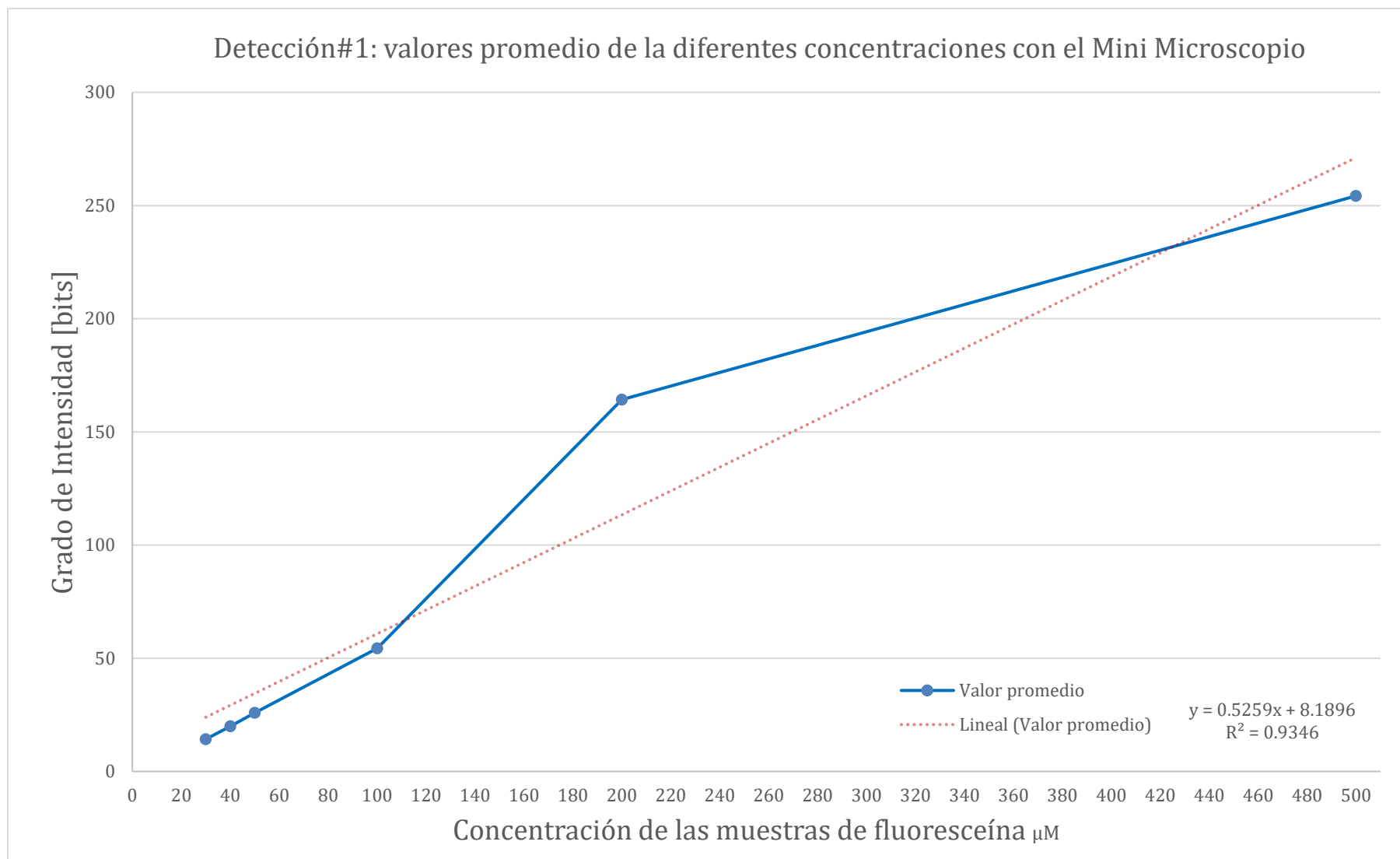


FIGURA 4-9. GRÁFICA DE LOS VALORES PROMEDIO DE LAS REGIONES DE INTERÉS DETECTADAS CON EL MINI MICROSCOPIO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLUORESCÉINA A PH 8.0

4.1.2.2. Detección #2 de concentraciones.

Para verificar la reproducibilidad del instrumento se realizó una segunda ronda de experimentos usando la misma metodología descrita anteriormente, pero considerando más mediciones entre puntos, cuyas tablas de resultados se incluyen en el Anexo L.

Cálculo de nuevas concentraciones.

La siguiente tabla muestra el resultado del cálculo de las nuevas concentraciones utilizando un volumen final reducido para minimizar el consumo de insumos.

TABLA 4-3. VALORES CALCULADOS DE LOS NUEVOS VOLÚMENES PARA LAS NUEVAS CONCENTRACIONES.

Concentración final μM	Volumen final [mL]	Concentración inicial μM	Volumen inicial [mL]	Volumen de buffer [mL]
400	0.5	2600	0.0769	0.4231
300	0.5	2600	0.0577	0.4423
200	0.5	2600	0.0385	0.4615
150	0.5	2600	0.0288	0.4712
100	0.5	2600	0.0192	0.4808
50	1	2600	0.0192	0.9808
40	0.5	400	0.0500	0.4500
30	0.5	300	0.0500	0.4500
20	0.5	200	0.0500	0.4500
10	0.5	100	0.0500	0.4500

La razón de incluir una mayor cantidad de soluciones con diferentes concentraciones fue la de poder suavizar la gráfica (tener más puntos que graficar), y facilitar la comparación de los resultados obtenidos con ambos microscopios.

En la Figura 4-10 se muestra la gráfica de todos los valores promedio de intensidad de fluorescencia, y su correspondiente dispersión, con respecto a cada una de las concentraciones medibles. En esta ocasión la respuesta no tiene una tendencia lineal positiva tan marcada, pero si confrima que a mayor concentración, mayor es el grado de emisión de luz de fluorescencia. Las tablas e imágenes de todas las concentraciones detectadas se encuentran en el Anexo L.

Los resultados de esta segunda ronda de experimentos se compararán con la detección de estas mismas concentraciones empleando un microscopio comercial que cuenta con una cámara digital especializada, cuyos resultados se despliegan en la Figura 4-11, cuyo arreglo experimental se encuentra en el Anexo I.

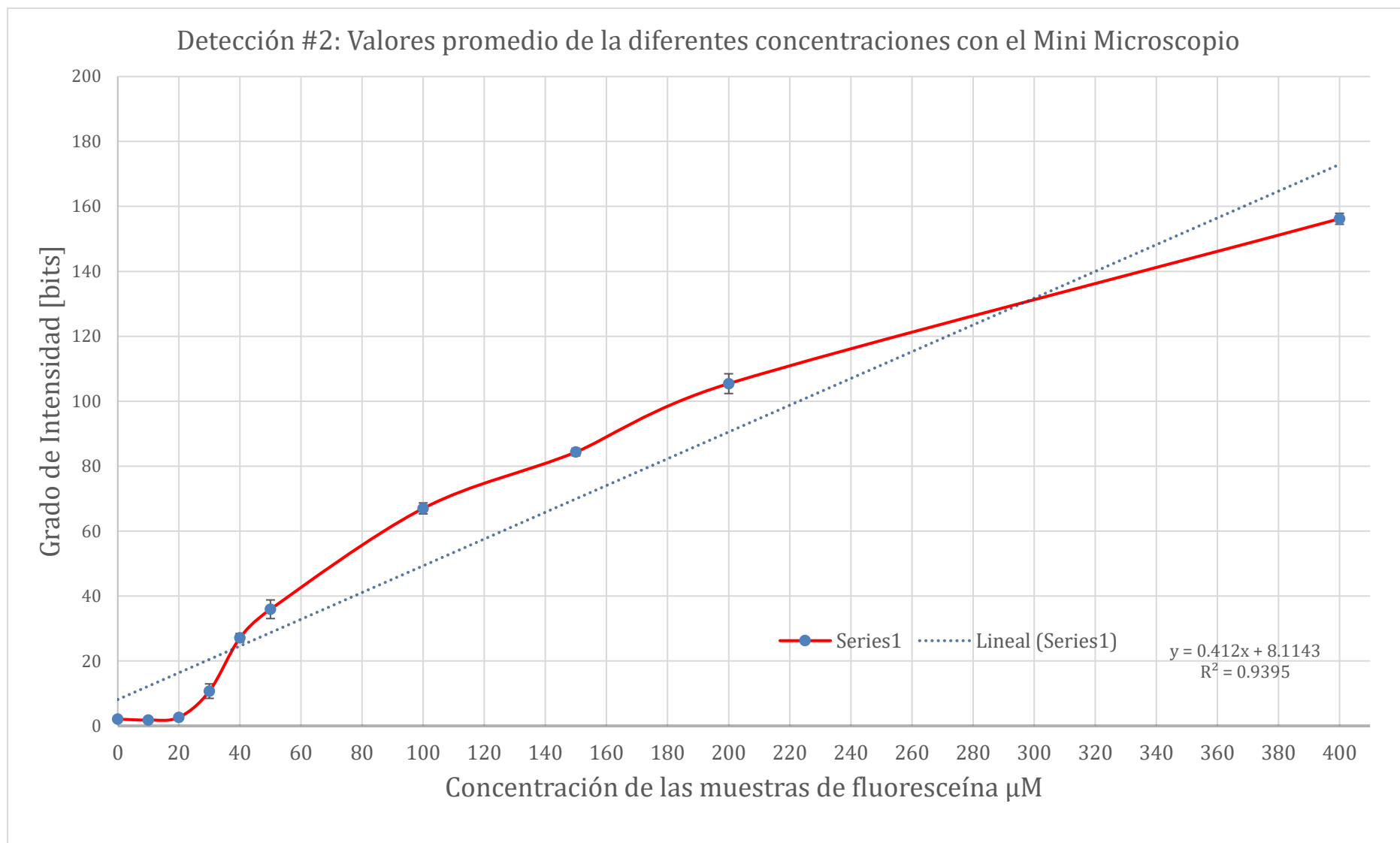


FIGURA 4-10. GRÁFICA QUE DEL COMPORTAMIENTO DE LOS VALORES PROMEDIO DE LAS IMÁGENES TOMADAS CON EL MINI MICROSCOPIO DE DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA A PH 8.0.

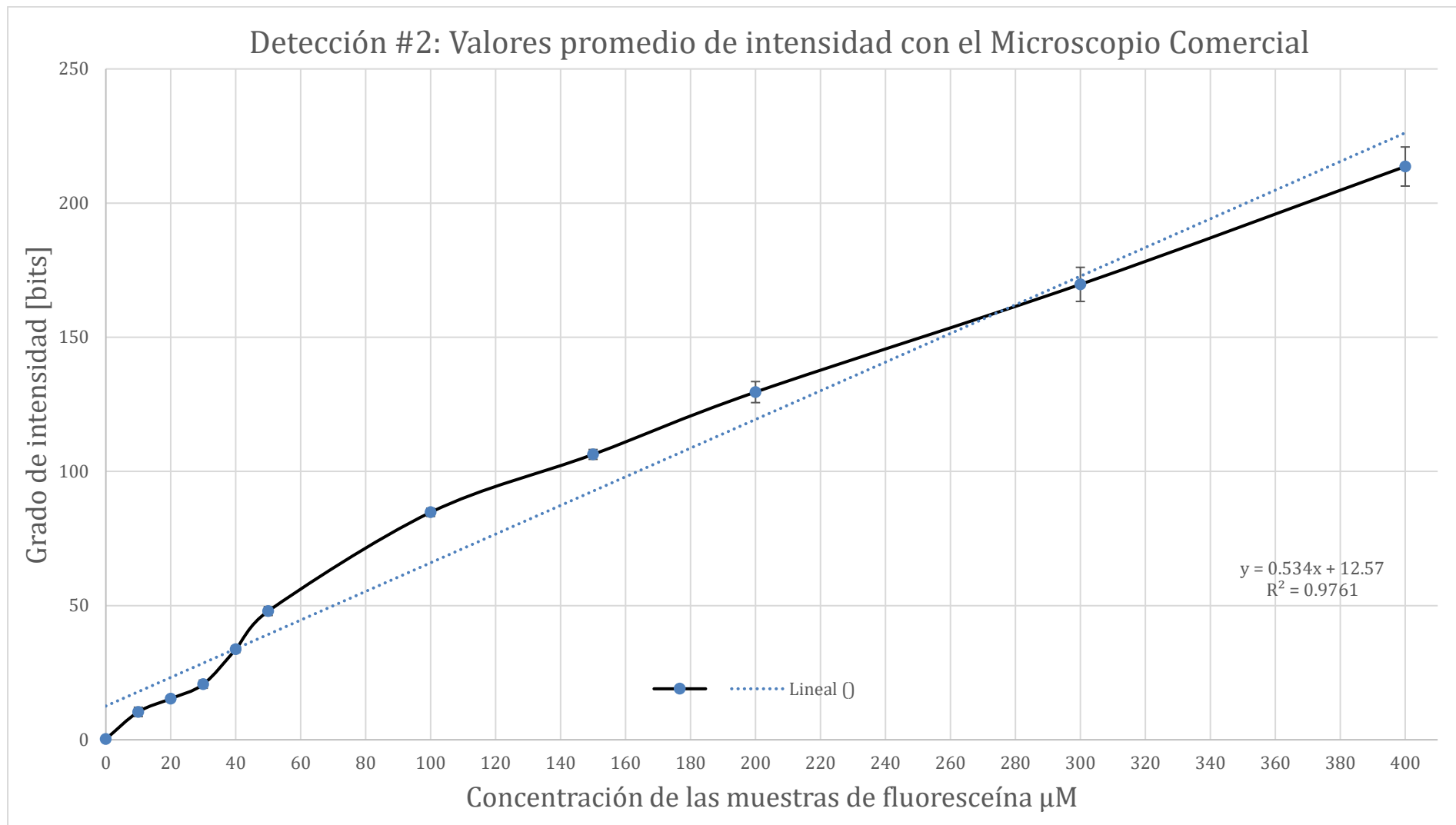


FIGURA 4-11. GRÁFICA QUE DEL COMPORTAMIENTO DE LOS VALORES PROMEDIO DE LAS IMÁGENES TOMADAS CON EL MICROSCOPIO TCM400 DE DETECCIÓN DE FLUORESCÉINA A PH 8.0.

4.2. Análisis de resultados

Es deseable que los sistemas de detección, en general, presenten un comportamiento lineal en cierto rango de mediciones. Aquí se busca determinar la linealidad de los experimentos nombrados Detección #1 y Detección #2, así como los valores de sensibilidad para cada caso.

Posteriormente compararemos otros apartados fuera de un carácter técnico pero que denotan gran diferencia entre ambos instrumentos.

4.2.1. Análisis de Detección #1

En la Figura 4-9 se presentó la gráfica del experimento Detección #1 con el mini microscopio donde resaltamos lo siguiente:

- La intensidad de las concentraciones más bajas (de 30 a 100 μM) tienen un comportamiento claramente lineal.
- Entre la concentración 100 μM y 200 μM existe un aumento en la pendiente
- El intervalo entre 200 μM y 500 μM muestra una disminución en la pendiente.
- En la gráfica se incluye la ecuación de tendencia lineal cuya pendiente corresponde a una sensibilidad de 0.5229 bits/ μM .

4.2.2. Análisis de Detección #2

Usando el mini microscopio

En la Figura 4-10 se presentó la gráfica del experimento Detección #2 con el mini microscopio propuesto, donde resaltamos lo siguiente:

- Las soluciones de concentraciones de 0 μM , 10 μM y 20 μM , muestran valores cercanos al 0 sin mucha distinción. Con la solución concentrada de 30 μM se presenta por primera vez un valor de intensidad alejado de 0. Esto permite asumir que el valor mínimo de detección de soluciones de fluoresceína para este modelo propuesto es de 30 μM .
- Entre las soluciones de concentración 30 μM y 50 μM se aprecia un comportamiento aproximadamente lineal con la mayor pendiente de toda la gráfica.
- A partir de la concentración de 50 μM hasta la concentración más alta, la pendiente de la gráfica sufre una disminución notable.
- En la gráfica se incluye la ecuación de tendencia lineal cuya pendiente corresponde a una sensibilidad de 0.412 bits/ μM .

Usando el microscopio comercial

En la Figura 4-11 se presentó la gráfica del experimento Detección #2 con el microscopio comercial TCM 400, donde resaltamos lo siguiente:

- La detección de emisión se comenzó desde el valor 10 μM , en 0 μM no existe medida alguna, como se espera ya que corresponde a solo buffer TRIS.

- A lo largo de la gráfica, el comportamiento de las mediciones (la detección) sufre 3 cambios de pendiente notorios.
- En el primer intervalo, de 0 μM a 10 μM , se presenta un pendiente muy pronunciada.
- En el intervalo siguiente, de 10 μM a 30 μM se nota una disminución en la pendiente. Posteriormente aumenta dentro de los valores de 30 μM hasta 50 μM .
- Finalmente se tiene una disminución de pendiente a partir de 50 μM y hasta el término de la gráfica.
- En la gráfica se incluye la ecuación de tendencia lineal cuya pendiente corresponde a una sensibilidad de 0.534 bits/ μM .

Análisis cualitativo de ambos

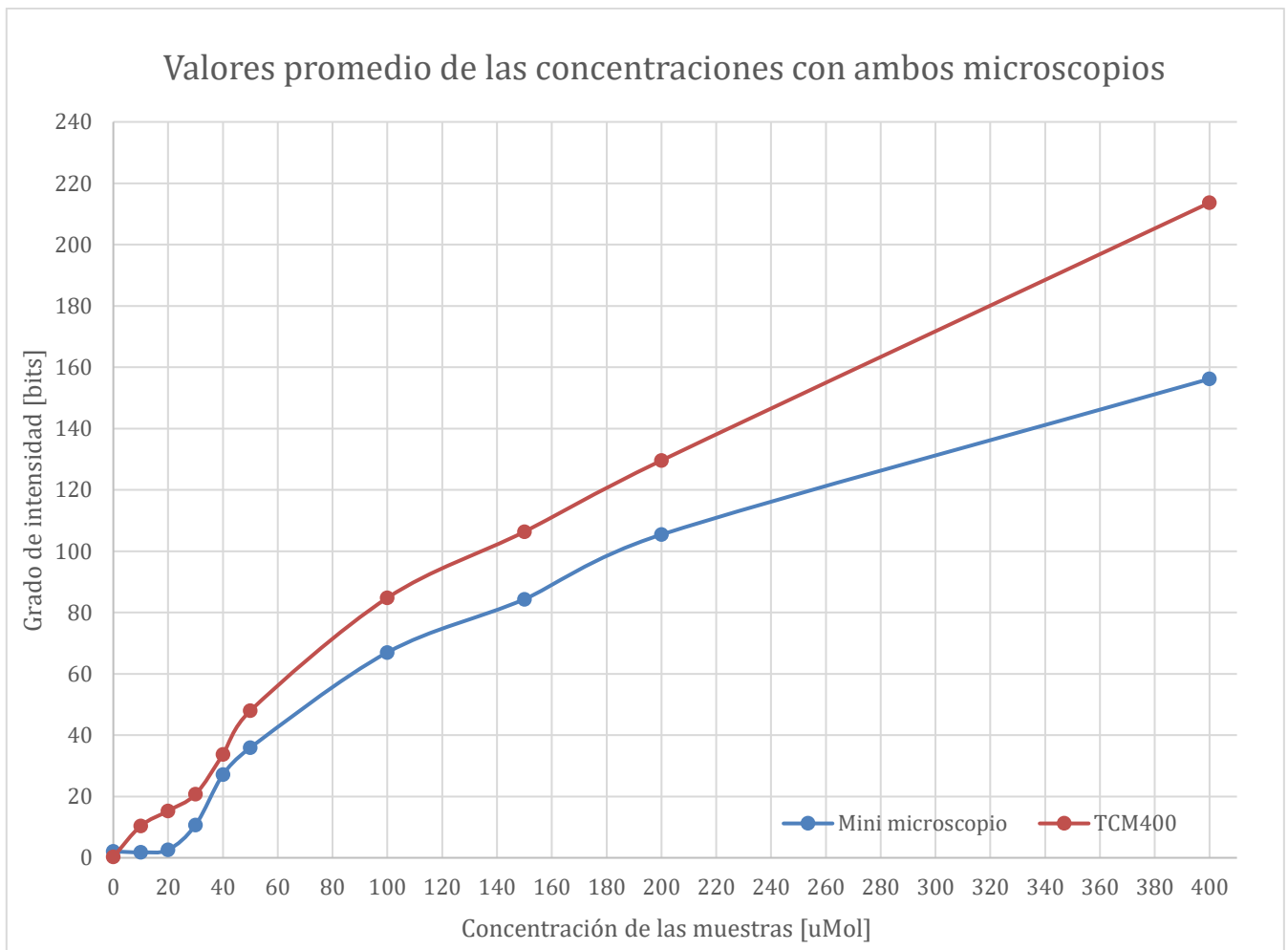


FIGURA 4-12. GRÁFICA DONDE SE INCLUYEN AMBAS CURVAS DE DETECCIÓN DE AMBOS INSTRUMENTOS PARA APRECIAR LA SIMILITUD DE SU COMPORTAMIENTO.

Teniéndolas juntas es claro que ambas muestran un comportamiento parecido a lo largo de las diferentes concentraciones, pero analizándolas mejor se observa lo siguiente:

- El límite inferior, que se considera en este trabajo como el valor mínimo de detección de fluorescencia que es capaz de detectar, para el caso del mini microscopio es el de concentración de 30 μM . Para el microscopio comercial se logró detectar la mínima concentración propuesta que fue de 10 μM .
- Es posible ver que estas graficas tiene un comportamiento cualitativo muy parecido, aunque tienen una diferencia: el valor de intensidad en bits para una misma concentración siempre son menores los valores del mini microscopio que los del TCM400.

4.2.3. Comparación cualitativa de resultados con estudio de espectrometría de fluorescencia

En el artículo [21], se reportó un experimento de espectrometría sobre soluciones de fluoresceína de diferentes concentraciones cuyos resultados se encuentra en la Figura 4-13 , donde podemos observar que se tiene un comportamiento lineal por intervalos y con un punto de saturación donde se vuelve constante la intensidad de fluorescencia.

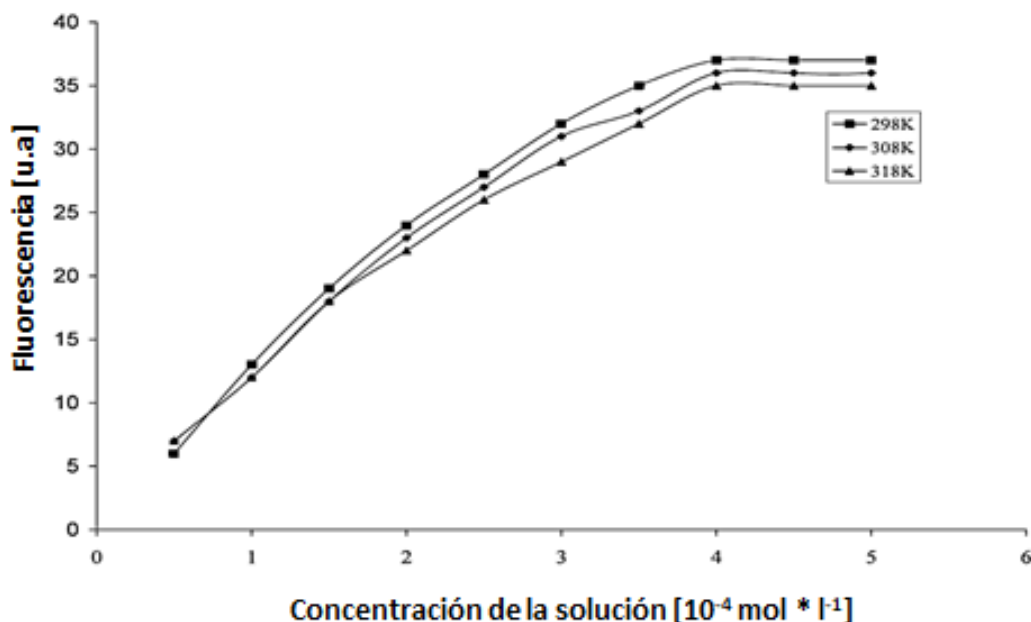


FIGURA 4-13. GRÁFICA REPRESENTATIVA DE INTENSIDAD DE LA FLUORESCÉINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y TEMPERATURA [21].

Sirviendo como comparación lo anterior, se puede apreciar que de los resultados obtenidos en la Detección #2 se tiene un comportamiento cualitativo parecido al del estudio de espectroscopia.

4.3. Otras comparaciones

4.3.1. Económica

La elaboración del mini microscopio no tuvo un precio elevado dado que la mayor parte de su construcción se realizó con herramientas del laboratorio y otros elementos cuyos costos se desglosan en la Tabla 4.4 .

TABLA 4-4. MATERIALES Y ELECTRÓNICOS UTILIZADOS PARA LA FABRICACIÓN DEL MINI MICROSCOPIO. * [22], ** [23].

Concepto	Cantidad	Precio (mxn)	Subtotal (mxn)
Cámara Web Logitech C270 **	1	\$ 450.0	\$ 450.0
LED RGB 3W *	1	\$ 65.0	\$ 65.0
Interruptores *	4	\$ 7.0	\$ 28.0
Resistencia 330 Ohm *	1	\$ 0.5	\$ 0.5
Resistencias potencia *	3	\$ 7.0	\$ 21.0
Potenciómetros *	3	\$ 10.0	\$ 30.0
LED blanco opáco *	1	\$ 1.0	\$ 1.0
Tabla fenólica (5x5 [cm]) *	1	\$ 10.0	\$ 10.0
Cable *	1	\$ 10.0	\$ 10.0
Husillo 1/4"	1	\$ 40.0	\$ 40.0
Husillo 3/16"	1	\$ 30.0	\$ 30.0
Tuercas p/tornillo 1/4"	24	\$ 1.00	\$ 24.0
Tuercas de seguridad p/tornillo 3/16"	6	\$ 2.0	\$ 12.0
TOTAL			\$ 721.5

Con ello tenemos un acumulado de \$721.50 pesos mexicanos que se gastaron para poder construirlo.

Las piezas diseñadas se construyeron con impresión 3D en el laboratorio. Sin embargo, para poder compararlos es necesario poner en contexto su coste aproximado mediante una investigación de los precios comerciales de algunos de los procesos de maquinado de piezas en impresoras 3Dd el proveedor *Grupo XDS* [26] tenemos los siguientes precios de las piezas diseñadas.

TABLA 4-5. RELACIÓN DE PRECIOS DE IMPRESIÓN POR PIEZA. *NO SE REALIZÓ COTIZACIÓN PORQUE LA PIEZA ES MUY PEQUEÑA.

Nombre de la Pieza	Costo MXN
Agarre lente 2	\$ 236.43
BaseRGBfijaMejorado	\$ 192.08
Chip inf Base	\$ 390.51
LedBlanco Base	\$ 282.80
Platina fija	\$ 340.36
Platina movil	\$ 268.50
RGBmovil z	\$ 376.00
Separador	\$ * -

Nombre de la Pieza	Costo MXN
Tapa RGB nueva 2	\$ 219.95
Tapa led blanco	\$ * -
Total	\$ 2,306.63

Finalmente, sumando el, el precio real del mini microscopio de fluorescencia es de: **\$3,028.13 mxn** más la mano de obra.

Por su parte, el costo del microscopio que se cuenta en el laboratorio, el TCM400 con el módulo para volverlo un microscopio de fluorescencia, es de: **\$5,320.00 USD**, equivalente a **\$105,698.8 pesos**, si se considera el tipo de cambio siguiente: 1 USD = 19.87 mxn a fecha de Noviembre de 2018. Para términos más ilustrativos, en porcentaje de costo, el costo del mini microscopio corresponde al siguiente porcentaje del precio del TCM 400.

$$\text{Costo de mini microscopio} = \frac{\$3,028.13 \times 100}{\$105,698.8} = 2.86 \%$$

4.3.2. Comparación de la calidad de las imágenes

Dentro de los Anexos K y L, donde se encuentran las imágenes utilizadas para el análisis de intensidad, es que podemos encontrar la gran diferencia de entre la calidad de imágenes que se puede obtener con estos dos distintos instrumentos. A pesar de que fue posible tener resultados favorables de detección de fluorescencia, la nitidez de las imágenes si es algo que no se pudo mejorar mucho por dos principales factores: La lente utilizada y el sensor de la cámara web.

La lente no fue hecha para este propósito específico aunque si proporciona resultados aproximados. Adicional a esto, la cámara web no tiene estándares de calidad altos y sí precio bajo, si se compara con una cámara especializada para microscopía. Con las imágenes siguientes podremos dar una idea de la diferencia entre ambos.

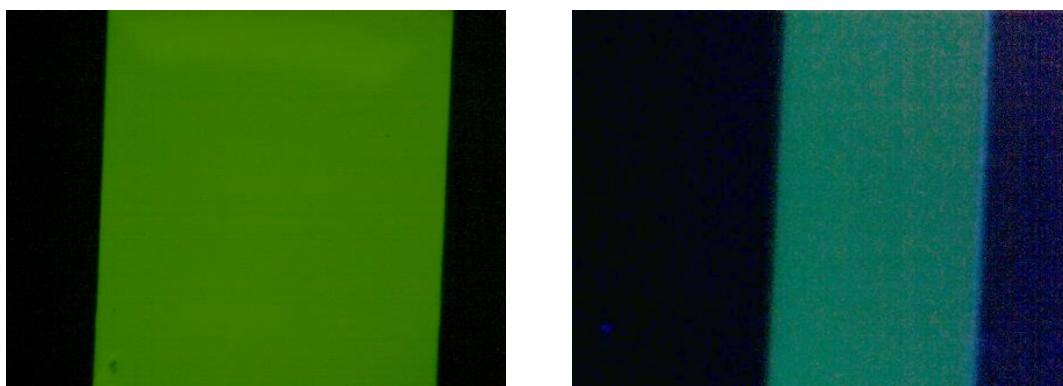


FIGURA 4-14. IMÁGENES DEL MICRO CANAL INYECTADO CON UNA SOLUCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE $100 \mu\text{M}$. IZQUIERDA IMAGEN DEL TCM400 Y DERECHA IMAGEN DEL MINI MICROSCOPIO.

Como puede notarse, la nitidez y definición en la imagen del TCM400 es superior al obtenido por el mini microscopio por el uso de su lente objetivo y los polarizadores que

incluyen espejos dicróicos capaces de filtrar luz de cierta longitud de onda (en este caso un paso alto donde filtra el color azul) dejando claramente los colores verdes y rojos posibles.

Con ello se demuestra que la calidad de las imágenes no es tema de competencia dado los materiales con los que se construye ni tiene un control fácil de la magnificación si se requiere cambios constantes durante un experimento.

4.3.3. Ventajas del mini microscopio

Este último apartado pretende mostrar los puntos fuertes para ambos microscopios y que dependerá de la necesidad o la viabilidad del experimento para el que se use, la decisión de elegir uno u otro.

Mini microscopio

Tiene la ventaja de que no requiere de un cuarto oscuro para realizar las pruebas (es suficiente con un pequeño compartimento cerrado), no requiere filtros físicos para realizar detecciones de fluorescencia, es de dimensiones físicas reducidas que permite su traslado a muchos sitios (alta portabilidad) y con alta conectividad con distintas computadoras (solo necesita el controlador de la cámara web. Adicional a ello, su construcción y mantenimiento es barato, así como sus piezas de repuesto y reproducibilidad a muy bajo costo.

TCM400 con módulo de Fluorescencia

Por su parte, este microscopio comercial tiene la ventaja de poder obtener resultados de gran calidad para diversos estudios de laboratorio, un buen manejo de las muestras (platina con movimiento en dos ejes), y lentes objetivos variados que permiten el intercambio fácil entre distintas magnificaciones que sean necesarias.

Como puede verse, todos los elementos antes descritos no son especialmente seleccionados en favor del mini microscopio, pero sí que se involucran todo lo necesario para su funcionamiento y con ello nos da un panorama general de donde puede y no utilizarse para realizar experimentos.

En este sentido, el mini microscopio tiene la virtud de poder utilizarse en muchos ámbitos que no son necesariamente un laboratorio especializado y que necesita de muy pocas cosas para poder funcionar. Sin embargo, no tiene la solidez ni las protecciones rigurosas de un microscopio comercial lo que lo limita a la observación de algunos tipos de experimentos.

Capítulo 5. Conclusiones

Se realizó el diseño eléctrico y mecánico necesarios para la construcción de un mini microscopio de fluorescencia bajo un esquema de bajo costo que representa un 3% aproximado del costo del microscopio comercial. Su realización se llevo a cabo ensamblando piezas fabricadas en impresora 3D, con componentes electrónicos para la iluminación y el uso de una cámara web, cuyo diseño completo brinda la posibilidad de ser altamente portable. Como característica especial del diseño realizado se tiene que se logra la detección de fluorescencia gracias a la incidencia de la luz de excitación ortogonal al camino óptico y una platina especial que trajo consigo el uso nulo de filtros físicos que encarecan o compliquen el diseño del mismo.

Una vez obtenido el producto final se caracterizó mediante la realización de dos rondas de detección de fluorescencia usando el mini microscopio y un microscopio comercial que permitiera la comparación cuantitativa de la intensidad de fluorescencia de las soluciones preparadas.

De estos experimentos se obtuvieron dos resultados importantes: Este microscopio tiene un límite en la capacidad de visualizar muestras de fluorescencia de baja concentración desde $30\text{ }\mu\text{M}$ y se caracterizó hasta $400\text{ }\mu\text{M}$. Es posible que para otras sustancias que tengan mayor intensidad de fluorescencia y en otros espectro difiera, pero existe un límite inferior que es difícil de superar en condiciones de bajo costo y que microscopios comerciales superan. El segundo es que la sensibilidad que presentó el mini microscopio, de $0.412\text{ bits}/\mu\text{M}$, es menor que el del microscopio comercial, que fue de $0.534\text{ bits}/\mu\text{M}$, pero no tan alejado como pudiera presentarse por ser de bajo costo.

Aunado al experimento, al momento de comparar de manera cualitativa con un estudio de espectroscopia de intensidad de fluorescencia, se confirma que los resultados son cualitativamente similares en cuanto el comportamiento de la detección de la intensidad con los dos microscopios. Por todo, este diseño tiene diversas aplicaciones como lo son: propósitos didácticos, de estudios básicos de fluorescencia en lugares remotos, entre otros. Con todo esto, finalmente se puede dar el propósito final de este diseño:

El uso de este mini microscopio de fluorescencia de bajo costo está dirigido a la realización de experimentos prácticos, in situ o que se lleven a cabo en lugares distantes donde no se tenga una fuente de alimentación continua y confiable. Los niveles de concentración del material fluorescente detectable deben ser equivalentes a una concentración de $30\text{ }\mu\text{M}$. Su uso como microscopio convencional no está limitado salvo a la nitidez que se pueda alcanzar con muestras pequeñas.

Trabajos a futuro.

Este concepto de mini microscopio tiene posibilidades de crecer aún más con trabajos posteriores y con miras a un laboratorio pequeño para el estudio de muestras de interés. Con eso en mente, las acciones a futuro que veo posibles son las siguientes:

1. Automatización del microscopio.- El uso de motores para el control de la distancia focal de la lente objetivo aunados de un programa para la obtención de la imagen más nítida en tiempo real sería una gran posibilidad de trabajo para liberar al usuario de su constante operación en miras de obtener imágenes más acercadas a las que se obtendría con un producto profesional.
2. Diseño reducido.- Aunque ya es candidato a ser un instrumento muy portable, si se requiriese integrar su uso con sistemas de bombeo, de adquisición de señales y otros instrumentos para operar un laboratorio completo, mientras más se reduzca la parte de adquisición de imágenes, mejor..
3. Diseño genérico.- Esto significa que el diseño no se haga dependiendo de un solo micro chip de cámara digital sino que pueda ser útil para varios modelos de chip con sensores CMOS o similar, dependiendo de con el que se cuente en su momento.

Anexos

El apartado de anexos comprende aquellas imágenes, planos, tablas, gráficas, procesos de construcción detallados y datos técnicos que no se colocaron dentro del cuerpo del documento pero que tienen referencia en estas hojas. El orden que aquí se lleva es, en primera instancia, con forme vayan apareciendo en el texto principal y posteriormente por el tipo de archivo que se coloca.

Anexo A. Detalles de construcción del Prototipo #1.

El uso de caimanes que sirven para sujetar los lentes y la muestra. Para lograr tener un movimiento vertical lo más lineal posible, recorté pequeños pedazos de cartón perforado donde pegué los caimanes y utilizando tuercas adheridas al mismo, se ensamblan a los espárragos. Para lograr una altura uniforme y con nulo desplazamiento del microscopio debido a su poco peso y constante manipulación, los chupones fueron colocados en los extremos de los husillos de estructura. La cámara web se instaló en la parte baja del chasis mediante presión entre un agujero y el micrófono, de manera que estuviese el sensor lo más pegado posible al cartón perforado.

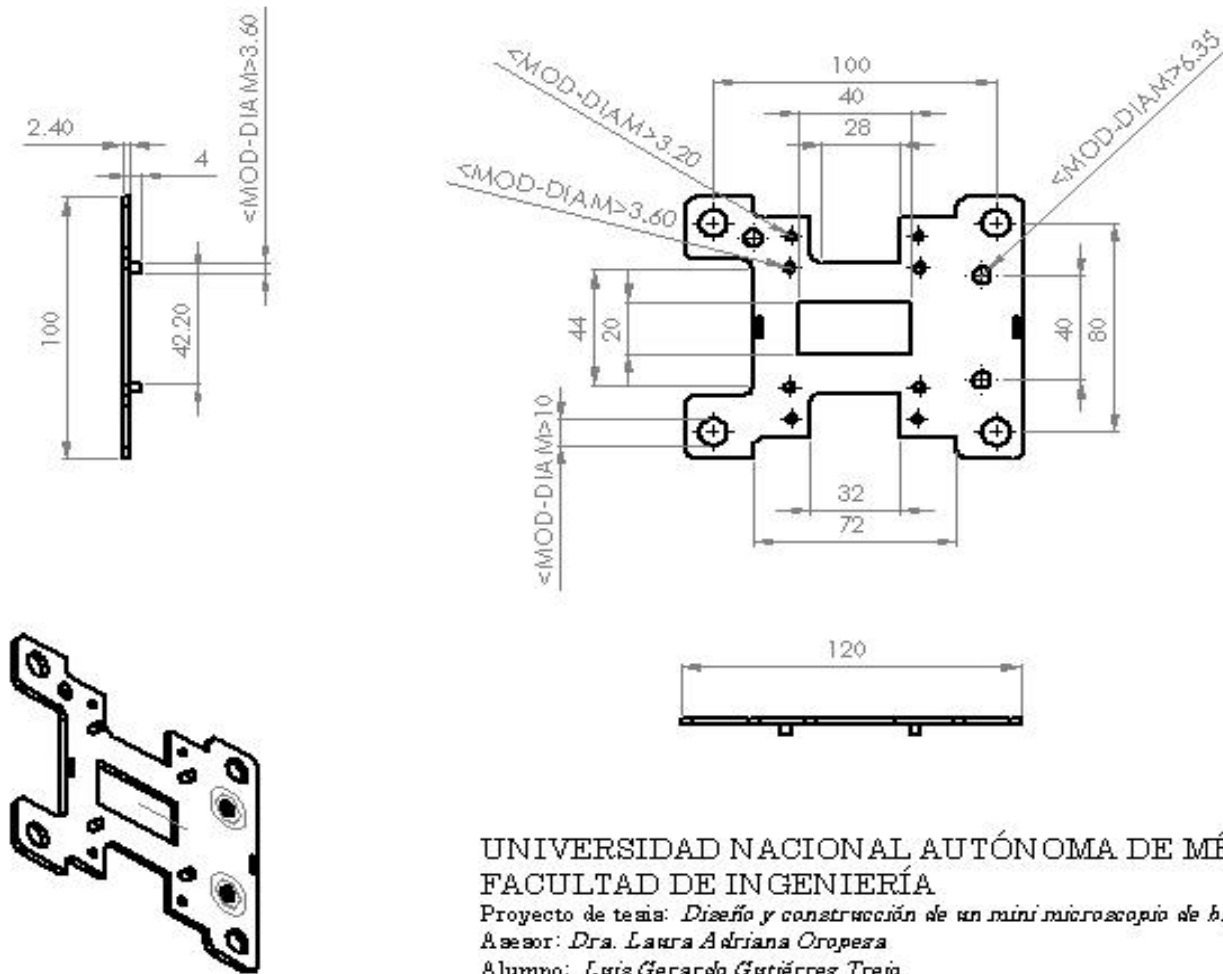
A su vez, para la iluminación utilicé un par de LEDs color blanco, unidos con cables hacia una tableta de pruebas con resistencias de valor 330 $[\Omega]$, un interruptor deslizable de 2 pasos para controlar el encendido de la iluminación y un cargador de celular de características: 5.7 [V] y 800 [mA], adaptado a la salida con *headers* macho para su fácil colocación.

Las diferentes lentes utilizadas para este primer prototipo y la verificación de la magnificación posible de muestras microscópicas eran colocadas en bases (recortes de perfocel a la medida), para intercambiarlos en el prototipo 1 de manera sencilla y realizar pruebas, como la mostrada en la Figura 0-1.



FIGURA 0-1. BASE DELENTE DE APUNTAOR LÁSER, EJEMPLO DE LOS FABRICADOS CON PROPÓSITOS DE PRUEBAS.

Anexo B. Planos de construcción del Prototipo #2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

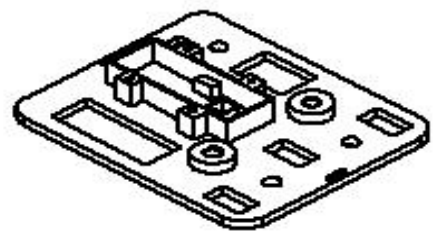
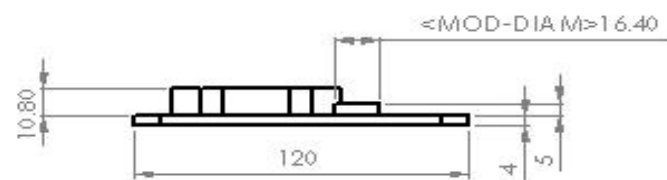
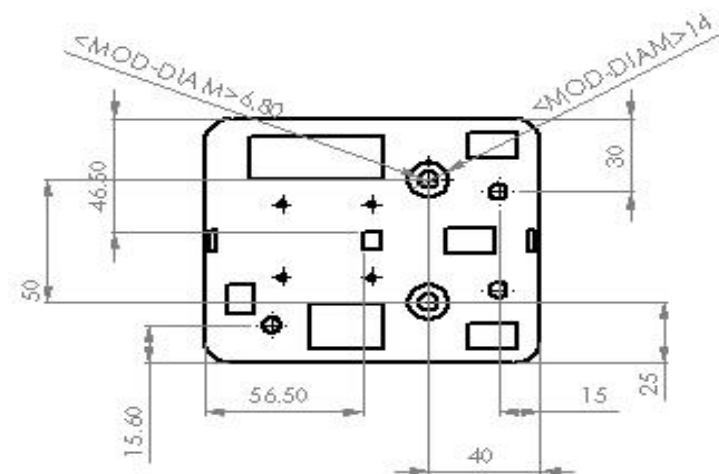
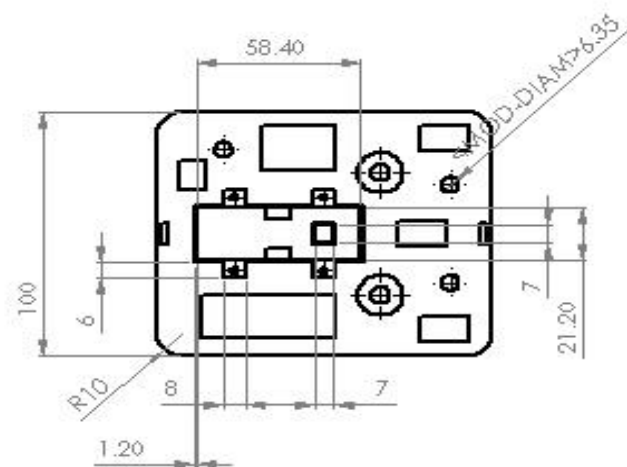
Aesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

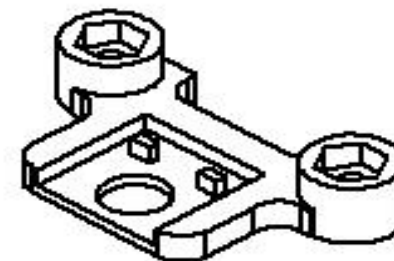
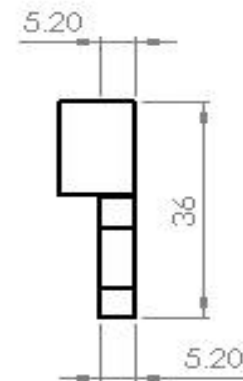
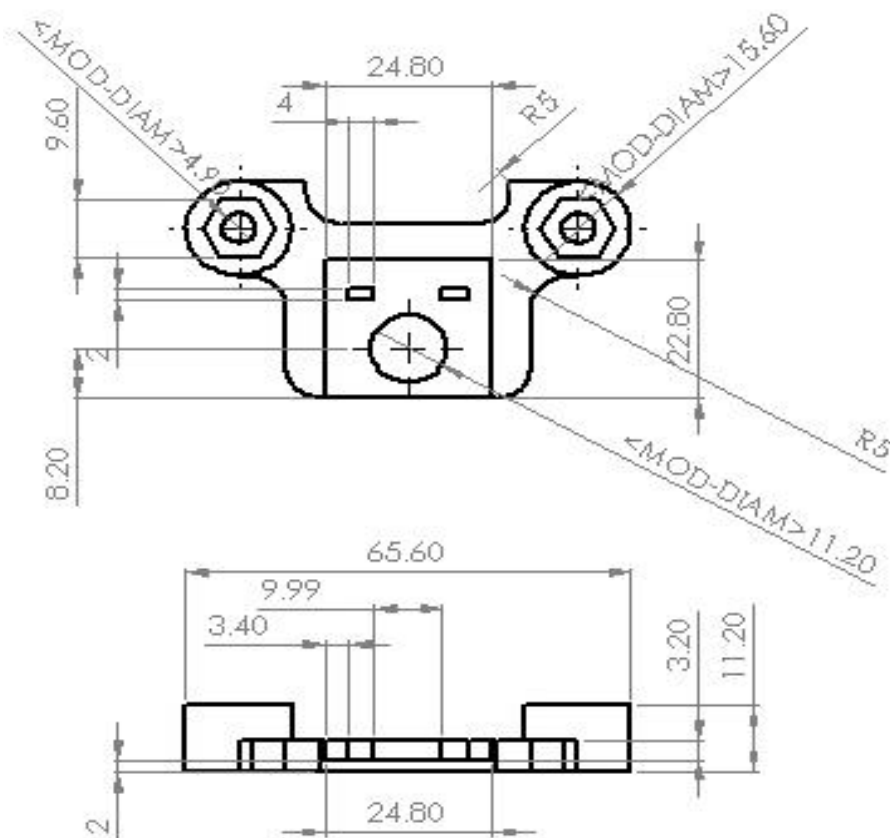
Nombre de pieza: *Inferior_base_micro*

Escala: 1:2

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE INGENIERÍA
 Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*
 Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*
 Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*
 Nombre de pieza: *Superior_Base*
 Escala: 1:2
 Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

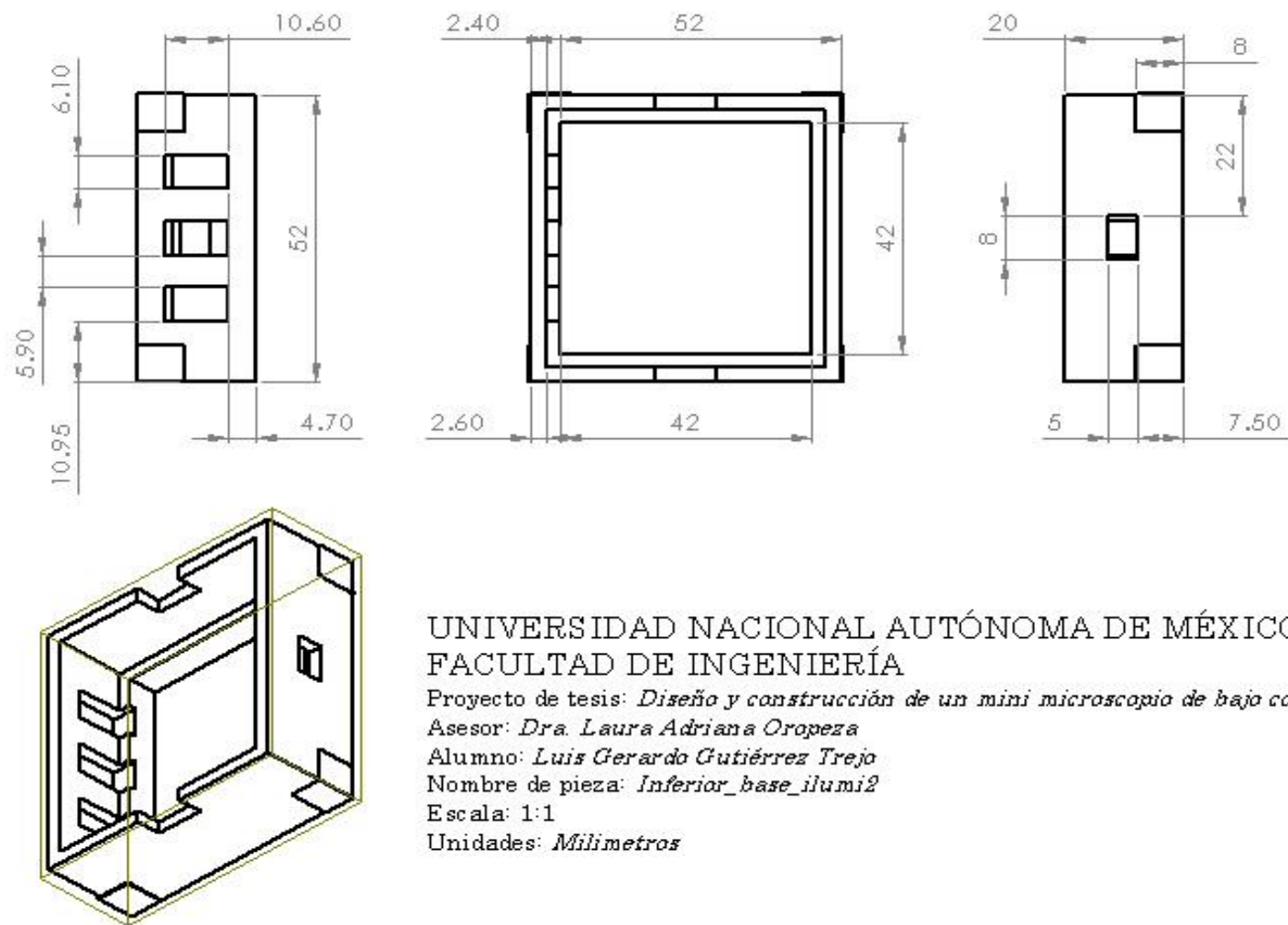
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Base_base_lente*

Escala: 1:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Inferior_base_ilumi2*

Escala: 1:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

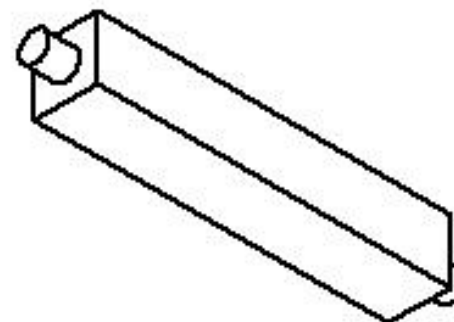
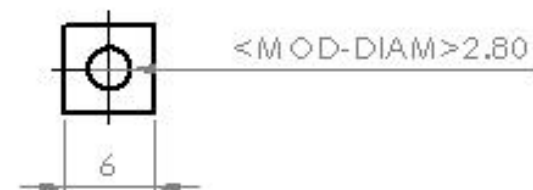
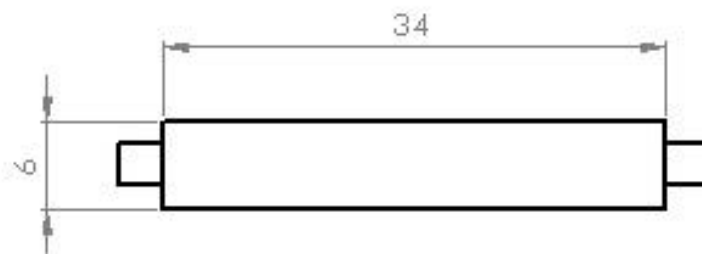
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Base_Lente_Iluminación*

Escala: 1:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

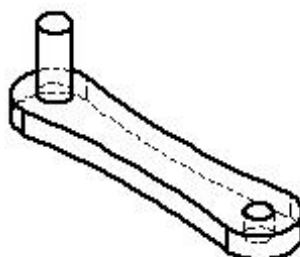
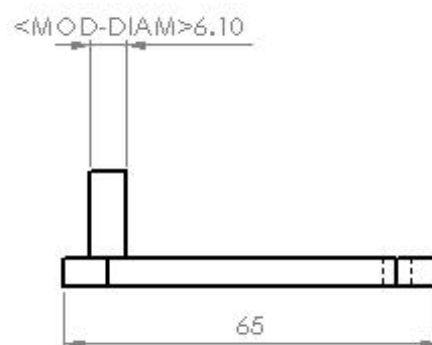
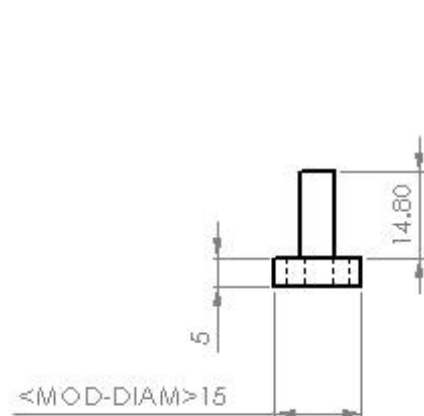
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Inferior_poste_base muestra2*

Escala: 2:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

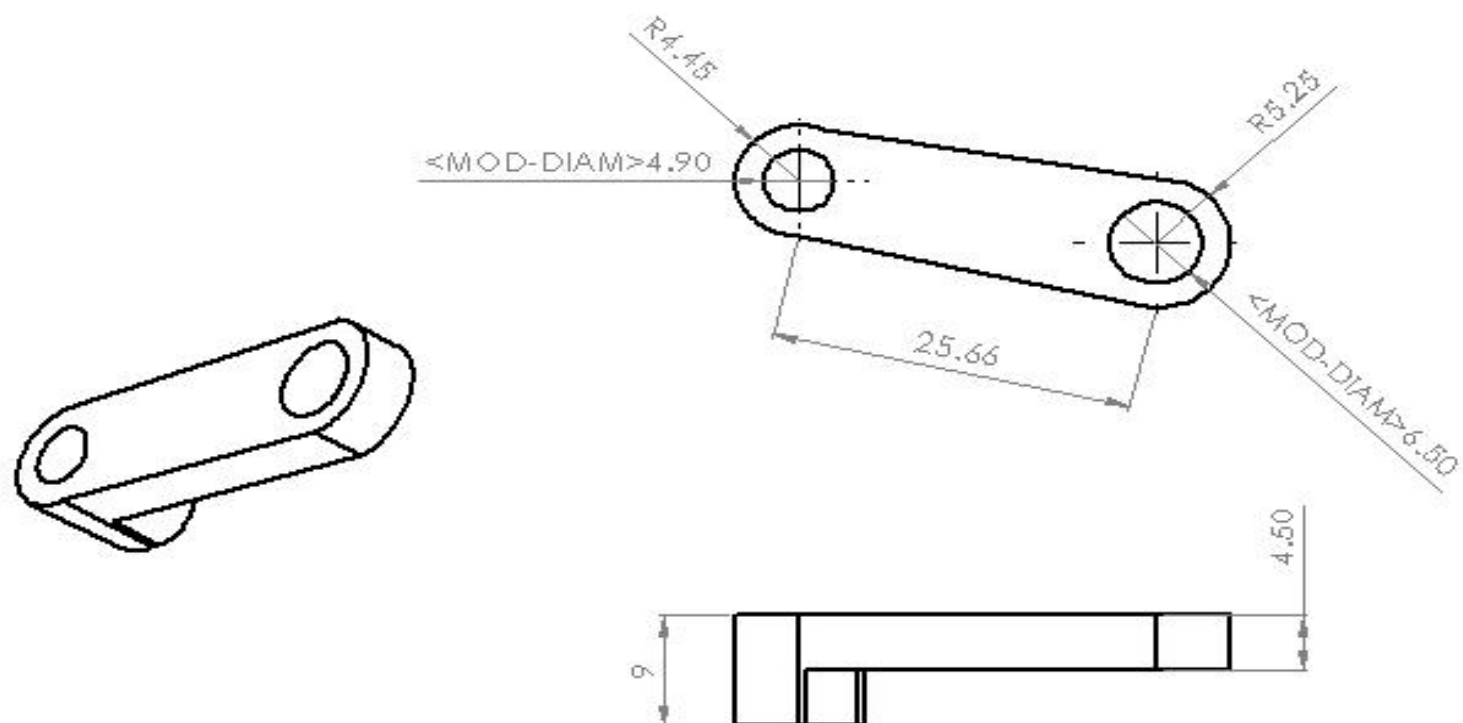
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Manija*

Escala: 1:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

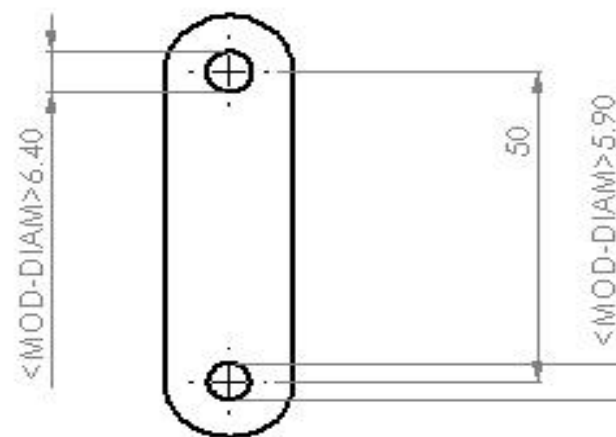
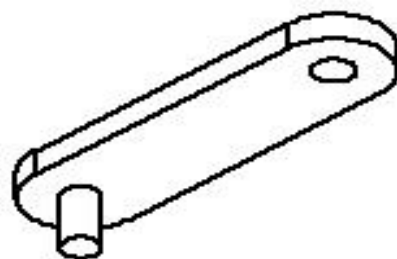
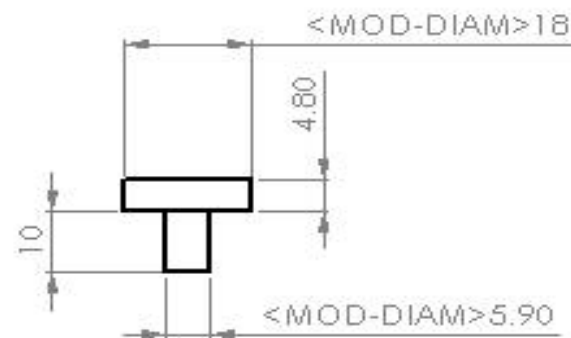
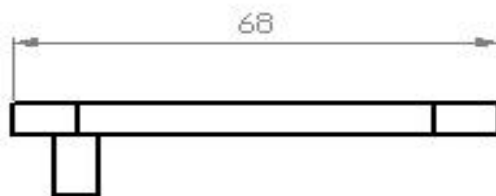
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Restringir*

Escala: 2:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

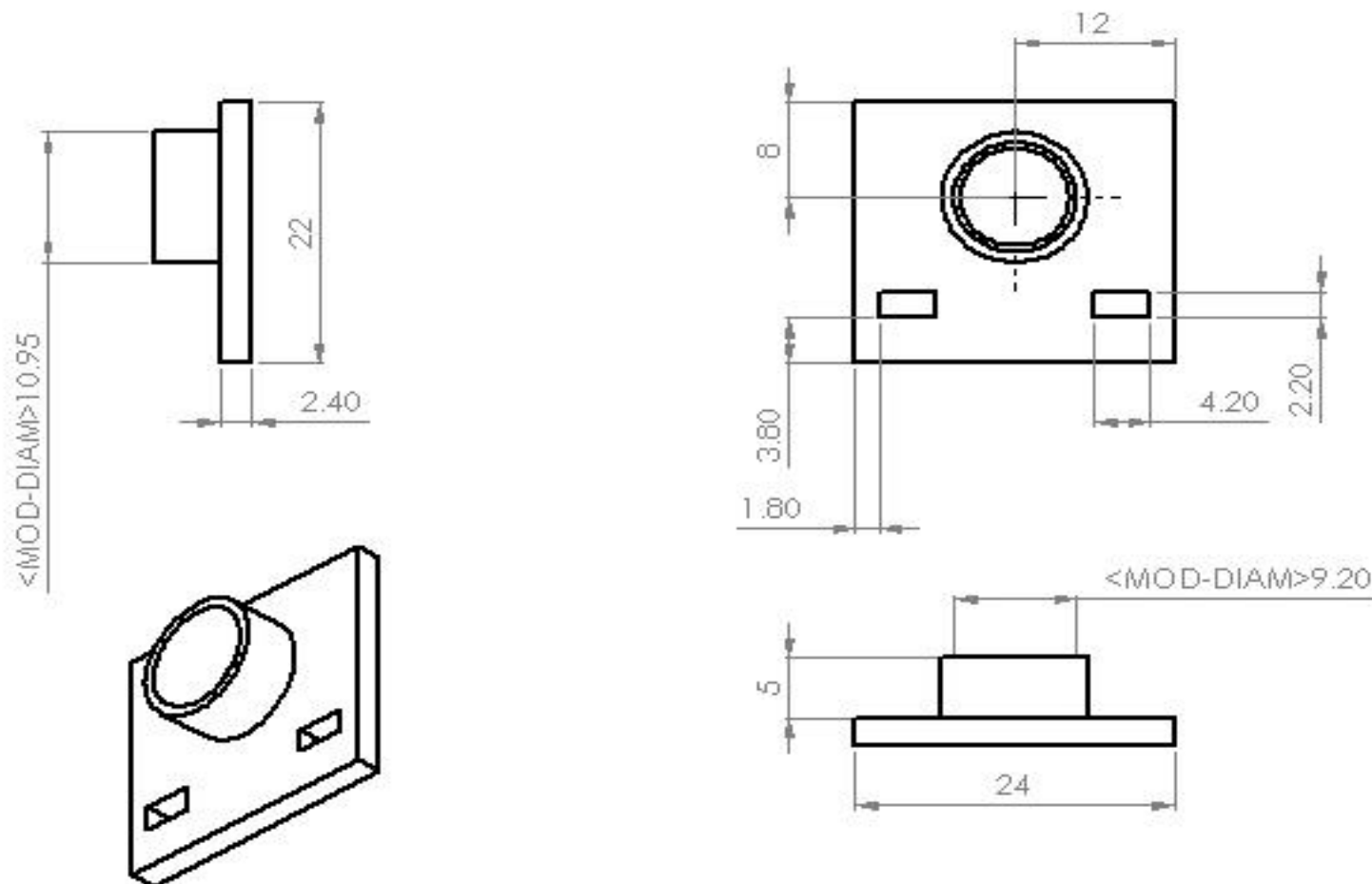
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Separador engranes*

Escala: 1:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

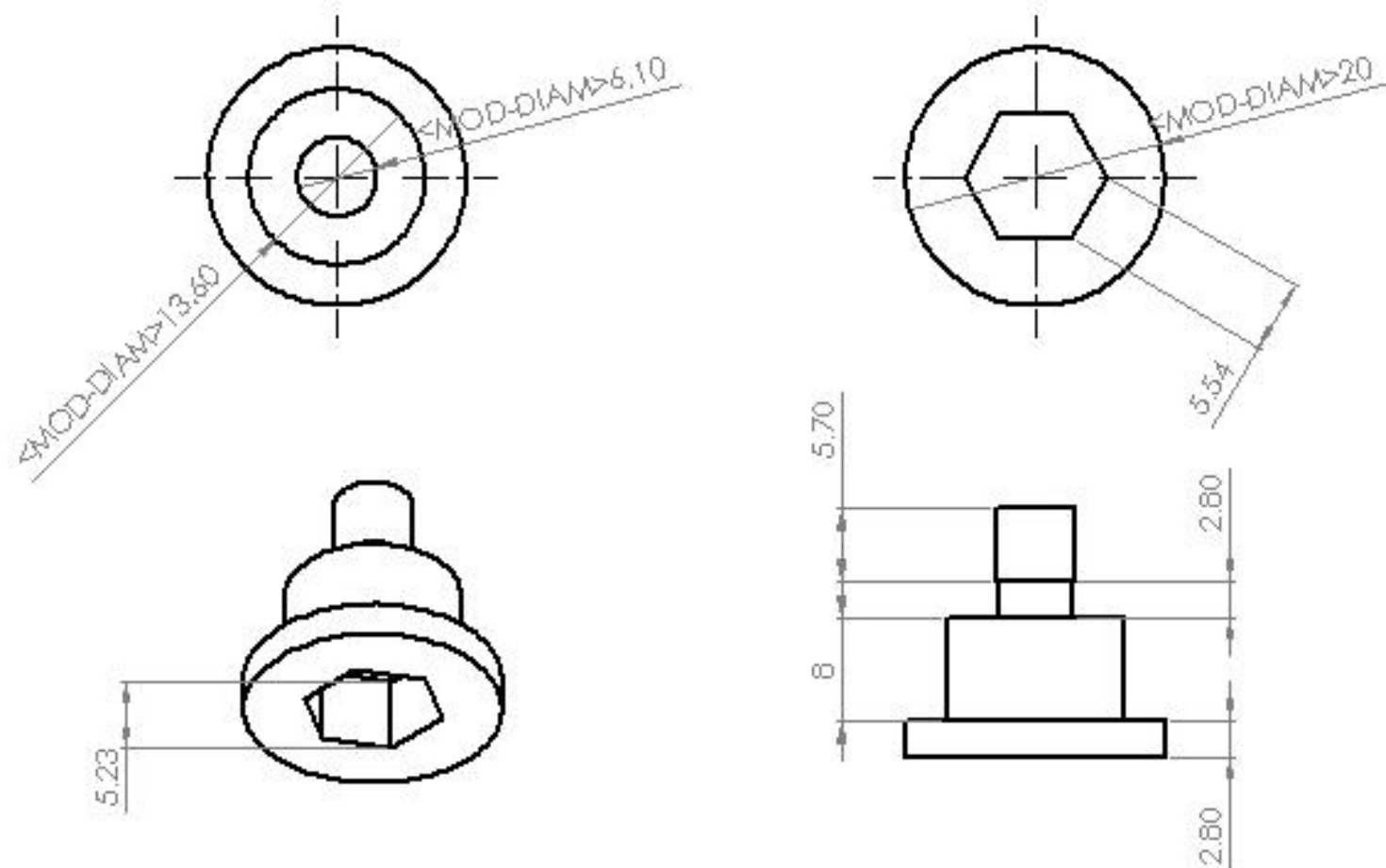
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Soporte_Lente_Webcam*

Escala: 2:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Sujeción_cople_arriba_Tor2*

Escala: 2:1

Unidades: *Milímetros*

Anexo C. Imágenes del prototipo 2 construido.

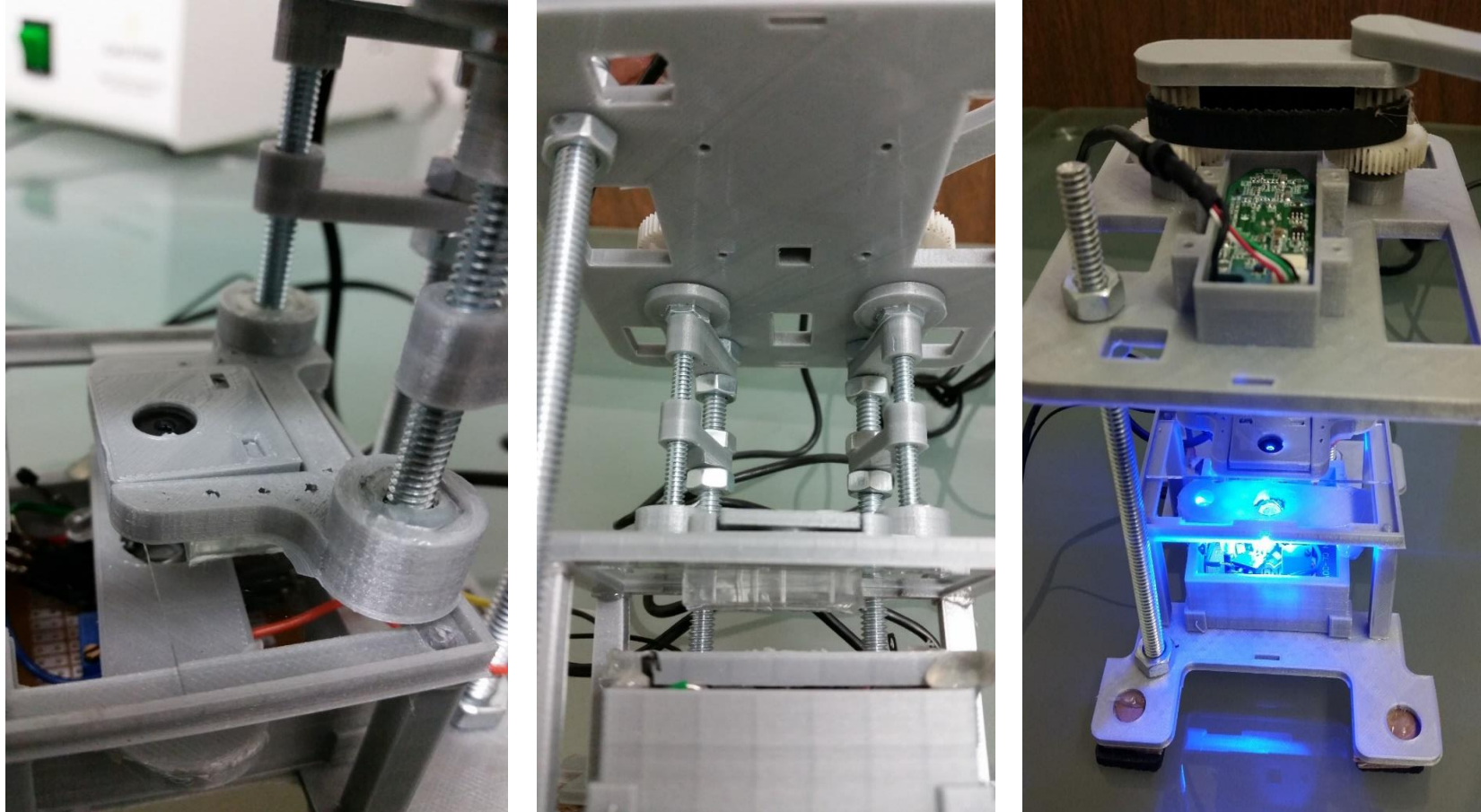


FIGURA 0-2. DE IZQUIERDA A DERECHA, LAS FOTOGRAFÍAS MUESTRAN PARTES IMPORTANTES DEL DISEÑO DEL PROTOTIPO : LA ETAPA ÓPTICA DONDE SE RESGUARDA LA LENTE, EL SISTEMA DE TRANSMISIÓN DE MOVIMIENTO QUE PERMITE EL AJUSTE DE LA DISTANCIA FOCAL Y EL ORIFICIO DONDE PARA LA LUZ AL SENSOR EN LA PARTE DE ARRIBA, Y UNA FOTOGRAFÍA CON PERSPECTIVA DONDE SE MUESTRAN LAS BASES, LA COLOCACIÓN DEL CHIP DE LA CÁMARA, LA PLATINA Y LA ILUMINACIÓN ENCENDIDA.

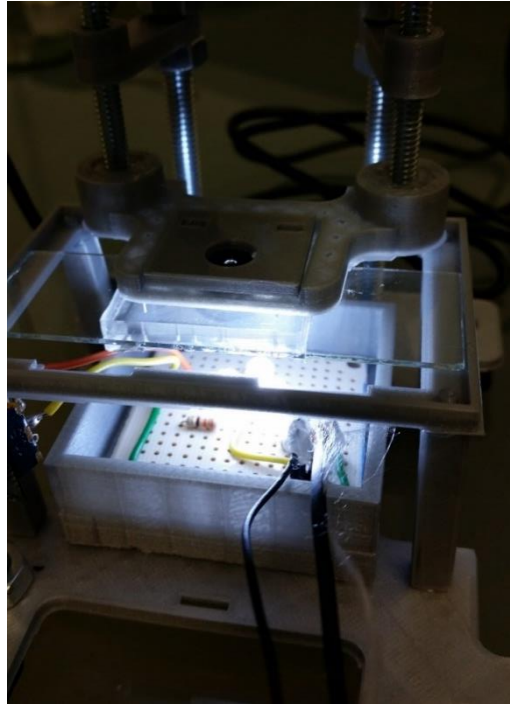


FIGURA 0-3. IMÁGENES DONDE SE MUESTRA, POR UN LADO, LA ILUMINACIÓN UBICADA EN LA BASE DEL MINI MICROSCOPIO IRRADIANDO LUZ BLANCA POR DEBAJO DE LA PLATINA CON UN CHIP DE MICRO FLUÍDICA, Y UNA FOTOGRAFÍA DEL INFERIOR DE LA PIEZA DE ESTRUCTURA SUPERIOR PARA HACER ÉNFASIS EN EL ORIFICIO DONDE PASA LA LUZ AL SENSOR PARA LA DETECCIÓN DE IMÁGENES MAGNIFICADAS.

Anexo D. Iluminación LED y Marcador fluorescente

Para lograr que el microscopio se comporte como un microscopio de fluorescencia, una fuente de luz con un amplio espectro de longitudes de onda resulta conveniente si se desea coincidir con el espectro de absorción del marcador fluorescente que se utilice. Dentro de las soluciones de bajo costo, un LED RGB (Red, Green y Blue de sus siglas en inglés), promete ser una gran solución debido a que ya sea utilizando sólo uno de sus tres colores o combinaciones de ellos, se logran una amplia gama de colores y lleva implícito un bajo consumo de energía eléctrica.

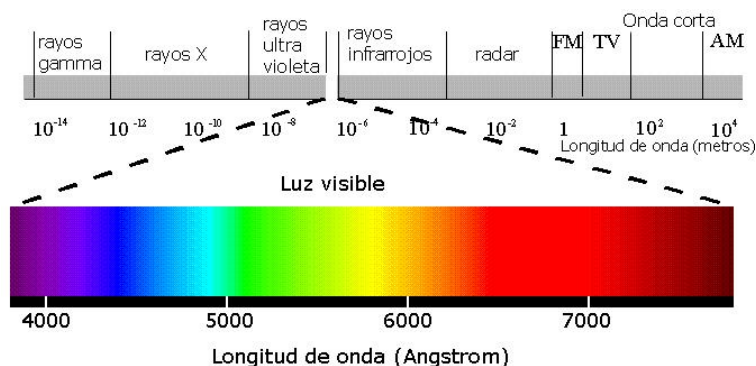


FIGURA 0-4. IMAGEN DEL ESPECTRO VISIBLE DE LA LUZ. UNA FUENTE DE AMPLIO ESPECTRO ABARCA EL RANGO COMPLETO DE LA LUZ VISIBLE [κ].

Dentro de este concepto de LED existen varios modelos que ofrecen solución y tomando solo los que consideré con una mejor relación costo beneficio, se expone en la sus datos técnicos.

TABLA 0-1. RESEÑA DE ALGUNOS MODELOS DE LED RGB DE DIFERENTES TIPOS.

Modelo	Longitudes de onda [nm]	Voltaje min. [V]	Voltaje max. [V]	Corriente [mA]	Precio [mxn]	Intensidad luminosa [lm]
YSL-R596CR3G4B5C	Rojo (620-625)	1.8	2.2	20	\$5.00	5.8
	Verde (515-520)	3.0	3.4	20		
	Azul (465-468)	3.0	3.4	20		
Kitronik Ltd – 5mm RGB Led	Rojo (635-650)	1.9	2.5	20	\$4.00	1.1
	Verde (520-525)	2.9	3.5	20		
	Azul (460-470)	2.9	3.5	20		
ST-1RGB14G30	Rojo (620-625)	2.0	2.4	350	\$50.00	50
	Verde (520-525)	3.0	3.4	350		
	Azul (460-475)	3.0	3.4	350		

Se puede apreciar que estos modelos tienen ligeras variaciones en los espectros de longitud de onda que tienen en las gamas azul, rojo y verde, pero sus principales diferencias son sus medidas, las corrientes de alimentación y su intensidad luminosa.

Ésta última cobra relevancia cuando se considera que el elemento fluorescente pueda tener una fuerte intensidad de emisión cuanto más intensa sea la iluminación externa debido a que aumenta la probabilidad de absorción de energía.

Los precedentes que harán de líneas de diseño para la etapa eléctrica de la iluminación son los que se toman en el capítulo anterior con la fuente de alimentación y el marcador fluorescente.

Con la finalidad de garantizar que la muestra de fluoresceína emita luz al excitarlas con el LED, se eligió el modelo cuyo espectro se asemeje más al espectro de absorción y que su luminosidad sea máxima. El modelo de LED que satisface lo anterior es el mostrado en la Tabla 0-2.

TABLA 0-2. EXTRACTO DE LOS DATOS ELÉCTRICOS DEL MODELO DE LED RGB SELECCIONADO.

Número de parte	Color	Corriente en adelanto [mA]	Potencia disipada [W]	Longitud de onda dominante	Pico de longitud de onda	Voltaje [V]	Flujo de iluminación [lm]	
ST-1RGB14G30	Rojo	400	0.8	620	630	2.00	40	Mínimo
				625	635	2.20	50	Promedio
				630	640	2.60	60	Máximo
	Verde	350	1.1	520	515	3.00	60	Mínimo
				525	520	3.30	70	Promedio
				530	525	3.80	80	Máximo
	Azul	350	1.1	460	458	3.00	15	Mínimo
				465	462	3.30	20	Promedio
				470	468	3.80	25	Máximo

Caracterización del LED RGB

El experimento que se montó para corroborar los espectros de longitud de onda de los diferentes colores del LED a utilizar, se realizó en colaboración con el Instituto de Investigación en Materiales de la Facultad de Física de la UNAM y con el apoyo del Dr. Amado Velázquez-Benites y Sandra Sánchez Escobar. Éste consta de tomar el registro de intensidad y espectro de longitud de onda producido por el LED mediante un espectrómetro, con las condiciones eléctricas propuestas de tal manera que se pueda corroborar su comportamiento y sustentar su uso en experimentos posteriores.

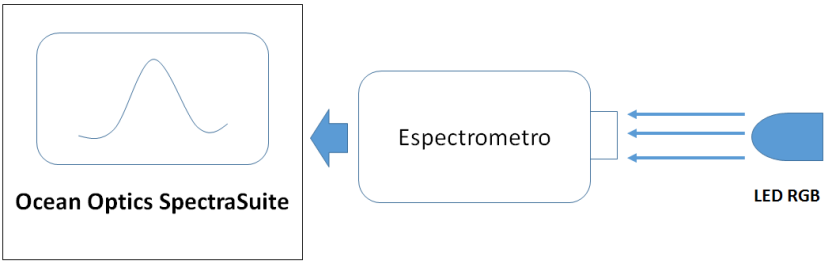


FIGURA 0-5. DIAGRAMA DEL EXPERIMENTO DE CORROBORACIÓN DE LA ILUMINACIÓN LED. SE TIENE LA INTENCIÓN DE CORROBORAR LOS DATOS DEL FABRICANTE RESPECTO AL ESPECTRO DE TRABAJO DE LOS COLORES DE LED.

Para ello se utilizó el espectrómetro Ocean Optics HR4000, con el programa Ocean Optics SpectraSuite y los parámetros de la, de tal manera que se pudiera obtener lecturas con el menor ruido posible y sin saturar el registro de las medidas. Físicamente el experimento se realizó como se muestra en la Figura 0-6.

TABLA 0-3. DATOS TÉCNICOS UTILIZADOS PARA EL PEQUEÑO EXPERIMENTO.

Distancia del LED al espectrómetro	15.5 [cm] (el motivo es para que la iluminación no saturara el sensor)
Tiempo de integración	1 [ms] (El valor mínimo posible que hace que el sensor tome muestras rápido y no se exponga mucho tiempo entre una medición y otra)

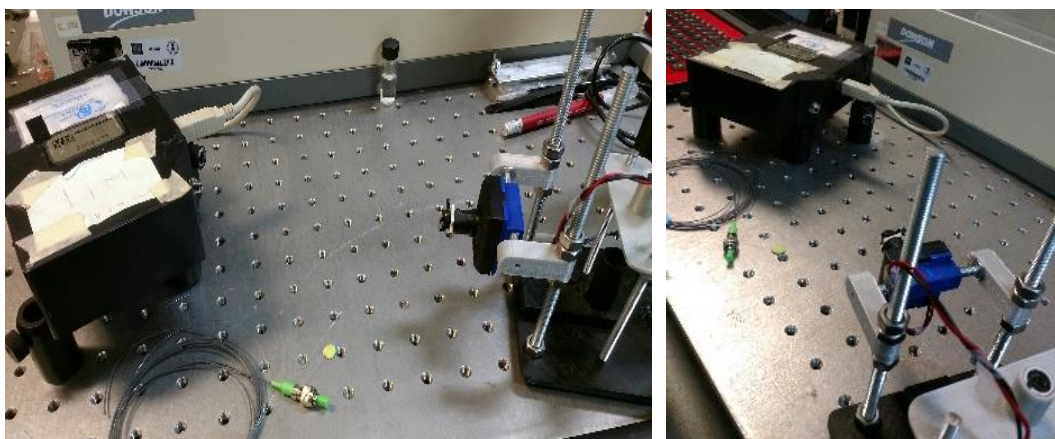
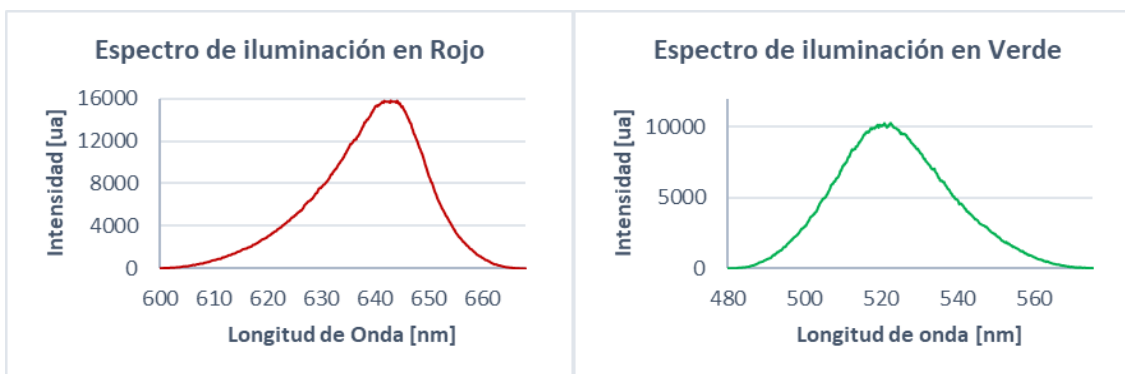


FIGURA 0-6. IMPLEMENTACIÓN FÍSICA DEL EXPERIMENTO.

Finalmente se obtuvo el registro de lo que el LED hace llegar al espectrómetro en tablas de datos que reportan longitud de onda [nm] e intensidad [valores arbitrarios], y con ello realizar gráficas representativas de los espectros del LED (Figura 0-7).



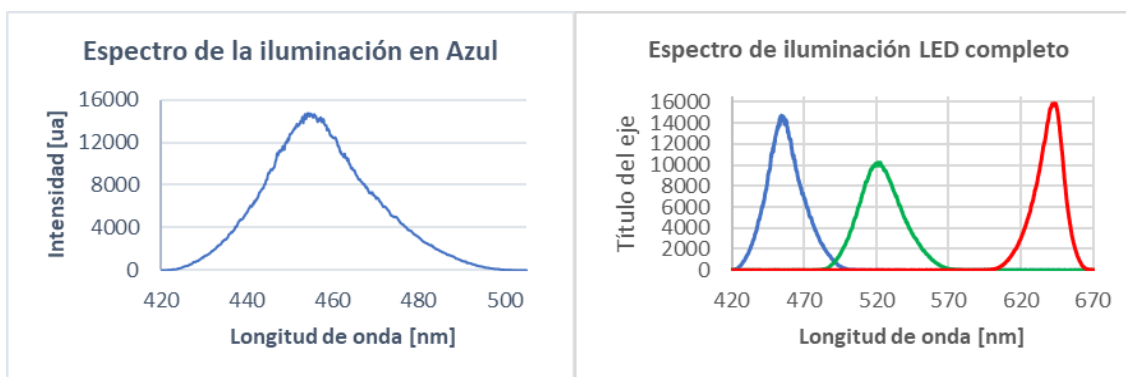


FIGURA 0-7. GRÁFICAS REALIZADAS EN PROGRAMA EXCEL DE LOS DATOS OBTENIDOS

TABLA 0-4. VALORES REPRESENTATIVOS DE LOS DIFERENTES ESPECTROS RESULTANTES DEL EXPERIMENTO.

Color	Valor de umbral inferior [nm]	Valor de umbral superior [nm]	Valor máximo de intensidad	
			[u.a.]	[nm]
Rojo	600	670	15863	642
Verde	480	575	10254	522
Azul	420	509	14722	454

Lo que se corrobora del experimento es que, si bien los espectros que se obtuvieron no son tan estrechos como lo plantea el fabricante, si tienen un comportamiento similar y que los traslapes presentados entre ellos son ligeros o nulos. Y más importante aún, el espectro de la iluminación azul abarca de manera satisfactoria el espectro de absorción de la fluoresceína, incluso para poder obtener su máximo punto de emisión.

Marcador fluorescente.

El marcador fluorescente que se utilizó para las pruebas de funcionamiento y experimento de validación del modelo construido fue la fluoresceína. La fluoresceína sódica es una sustancia ampliamente utilizada en la biología por su bio compatibilidad y fácil preparación para diversos experimentos y en los estudios con dispositivos *Lab on a Chip* de micro fluídica para aplicaciones de identificación o detección [15].

TABLA 0-5. INFORMACIÓN DETALLADA DE LA FLUORESCÉINA

Concepto	INFORMACIÓN
Fórmula Molecular	$C_{20}H_{10}Na_2O_5$
Masa Molar	376.27 g/Mol
Punto de Fusión	>300°
Valor de pH	8.3 (10 g/L, H ₂ O, 20°C)
Solubilidad	500 g/L 20°C



FIGURA 0-8. IMAGEN DE LA FÓRMULA QUÍMICA DE LA FLUORESCÉINA [L] E IMÁGENES DE LA SUSTANCIA EN ESTADO SÓLIDO Y EN SOLUCIÓN [M].

Este marcador tiene una característica en su espectro de absorción y emisión que se debe tomar en cuenta: su dependencia al pH. La variante que presenta este compuesto fluorescente con distintos niveles de potencial de Hidrógeno es que, conforme éste aumenta de 5 a 9, permite una mayor absorción de fotones, y a su vez el espectro se hace más estrecho. Por su parte el espectro de emisión tiene un comportamiento similar en cuanto al aumento de fotones emitidos, pero no así con lo estrecho del espectro. La Figura 0-9 demuestra lo que aquí se menciona [15].

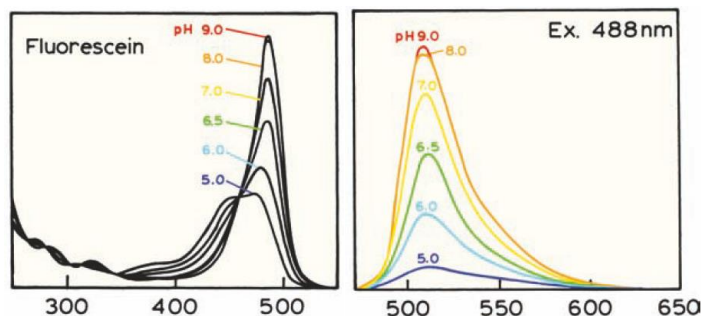


FIGURA 0-9. IMAGEN DONDE SE MUESTRAN DIFERENTES CURVAS DE ESPECTRO DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN DEPENDIENTES DEL pH DE LA SOLUCIÓN FLUORESCENTE [15].

Con apoyo de estas gráficas es posible asumir que el espectro de absorción de la fluoresceína está aproximadamente en el rango de 420 a 520 nanómetros, y que por su parte el de emisión está entre los 490 a 570 nanómetros.

Por otro lado, los valores máximos de ambos espectros que se tienen medidos por diversos fabricantes se encuentran en 492 [nm] (en espectro de absorción) y 520 [nm] (en espectro de emisión) [15]. Valores importantes a considerar al momento que se defina la fuente de iluminación.

Y, aunque no es un material que se caracterice por su bajo costo, su disponibilidad al momento de la realización de este proyecto se debe gracias a los esfuerzos de la Dra. Laura Oropeza en colaboración con el Dr. Luis Olguín, que facilitaron una cantidad pequeñas de este elemento para pruebas de concepto y validación. Con todo ello es que la selección de la sustancia fluorescente queda cerrada con el uso de la fluoresceína y que ayudará para la selección de la iluminación y, a su vez, de los diseños posteriores.

Anexo E. Hoja de especificaciones de LED RGB



Vollong Electronics Co., Limited

Part Number	Color	Test Forward Current(mA)	Power Dissipation(W)	Color Temperature(K)	Dominant Wavelength(nm)	Peak Wavelength(nm)	Forward Voltage(V)	LuminousFlux(lm)	
VL-H01RGB00301	Red	400	0.80		620	630	2.00	40	MIN
					625	635	2.20	50	AVG
					630	640	2.60	60	MAX
	Blue	350	1.10		520	515	3.00	60	MIN
					525	520	3.30	70	AVG
					530	525	3.80	80	MAX
	Green	350	1.10		460	458	3.00	15	MIN
					465	462	3.30	20	AVG
					470	468	3.80	25	MAX
Characteristics Parameter At Ta=25℃									
Parameter				Red /Yellow			Blue/Green		
Viewing Angle (°)				120			120		
Forward Current (mA)				400			350		
Peak Pulsed Forward Current (mA) 1/10s				800			800		
Color Rendering Index (Ra)									
Reverse Voltage (V)				≥5			≥5		
Reverse Current (uA)				≤10			≤10		
ESD Sensitivity (V)				3000			2500		
Storage Temperature (℃)				-40℃ to + 100℃			-40℃ to + 100℃		
Operating Temperature (℃)				-35℃ to + 50℃			-35℃ to + 50℃		
Lead Soldering Temperature (℃)				300 for 3.5 Seconds			300 for 3.5 Seconds		

a.

Anexo F. Construcción y prueba de filtros.

Para el desarrollo de un filtro paso altas investigué materiales sencillos y baratos que funcionaran como filtros para el espectro de color azul del LED. Se concentró solamente en el uso de una mica para ventanas o acrílicos que filtraba luz ultravioleta, con amplio uso en laboratorios donde se practica fotolitografía.



FIGURA 0-10. FOTOGRAFÍAS DE LA MICA PARA VENTANAS QUE FILTRA LA LUZ UV.

Para proceder a utilizar un filtro en el sistema del microscopio hay que remontarnos al diagrama de la Figura 2-20. El carácter de este filtro es de un filtro paso altas debido a que limita el paso de color azul tiene una longitud de onda menor ($465 - 500$ [nm]) a la del color verde o color de emisión de esta muestra ($510 - 590$ [nm]). Así, utilizando pequeños trozos de ella superpuestos se lograba tener un filtro de bajo costo que se tendría que poner a prueba.

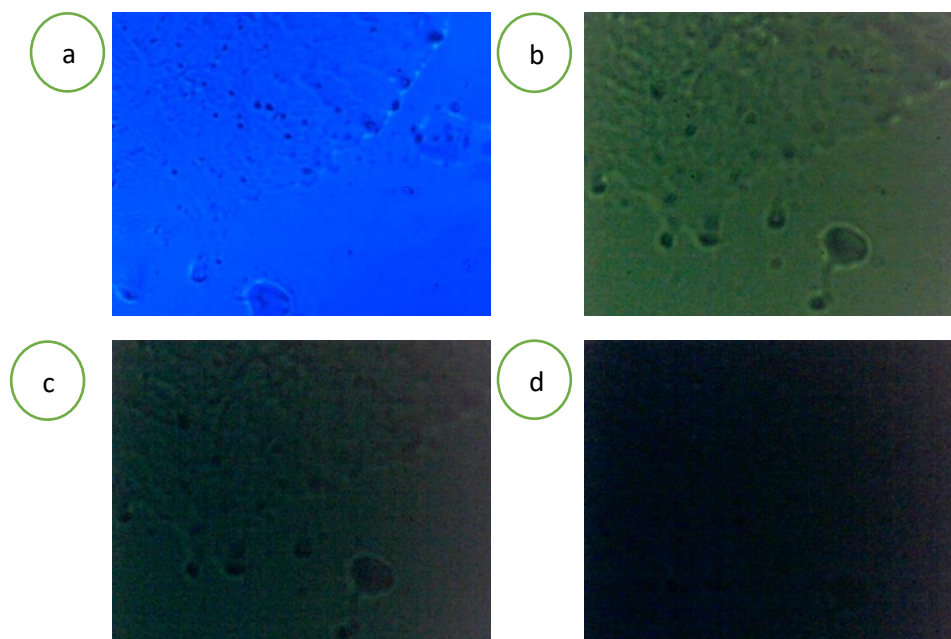


FIGURA 0-11. A) IMAGEN ORIGINAL SIN FILTRO COLOCADO. B) IMAGEN CON UN FILTRO DE DOS CAPAS SUPERPUESTAS. C) FILTRO CON 3 CAPAS SUPERPUESTAS Y D) FILTRO CON 4 CAPAS SUPERPUESTAS

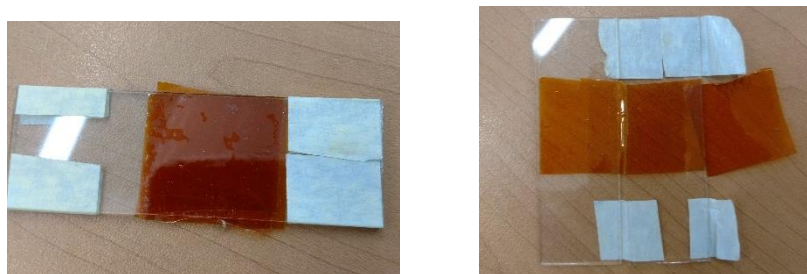


FIGURA 0-12. FOTOGRAFÍAS DEL FILTRO DE VARIAS CAPAS CREADO A PARTIR DE LA MICA DE FILTRO UV PARA VENTANAS.

Como se puede apreciar, la imagen ha podido ser filtrada en varias ocasiones y aun lograr apreciar detalles de la forma de la muestra (excepto en la última), pero aun así no se ha podido lograr una imagen de la muestra fluorescente parecido a la obtenido con un instrumento profesional.

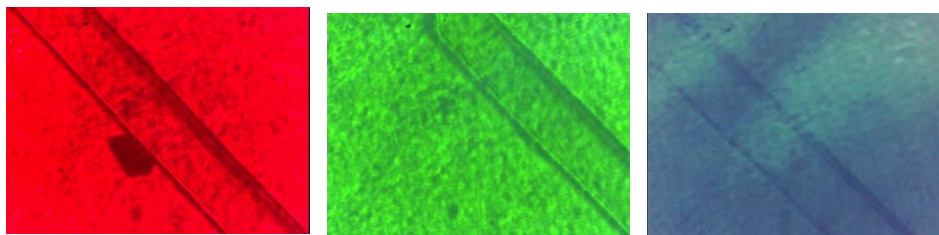


FIGURA 0-13. IMÁGENES DE UN MICRO CANAL ILUMINADO EN LAS TRES LONGITUDES DE ONDA DEL LED RGB Y UTILIZANDO EL FILTRO DE BAJO COSTO.

En la Figura 0-13 es posible apreciar como el filtro de bajo costo funciona solo al momento de usar luz azul (derecha) y en los demás no presenta alteración alguna. Lamentablemente agrega un efecto de textura no deseado, pero es intrínseco del material (no está diseñado para aplicaciones de microscopía). En pro de corroborar la hipótesis se hizo ahora uso de un filtro paso altas más específico de la Edmund Optics Barrington cuyas características son filtrar la luz debajo de los 550 [nm] con un diámetro de 25 [mm] como se muestra en la figura.



FIGURA 0-14. IMAGEN DEL FILTRO PEDIDO EN PRÉSTAMO.

Y el resultado que se obtiene de su uso es el siguiente:

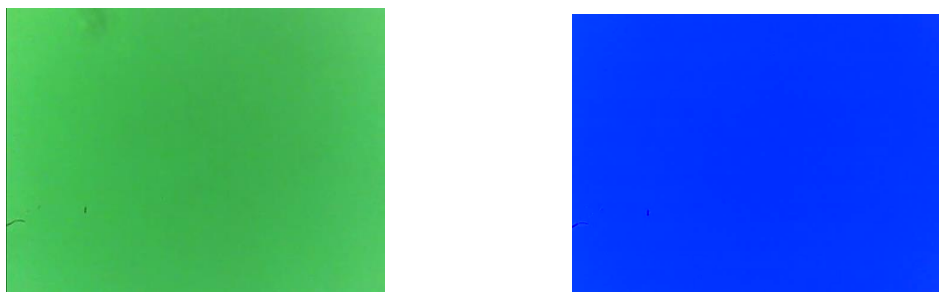
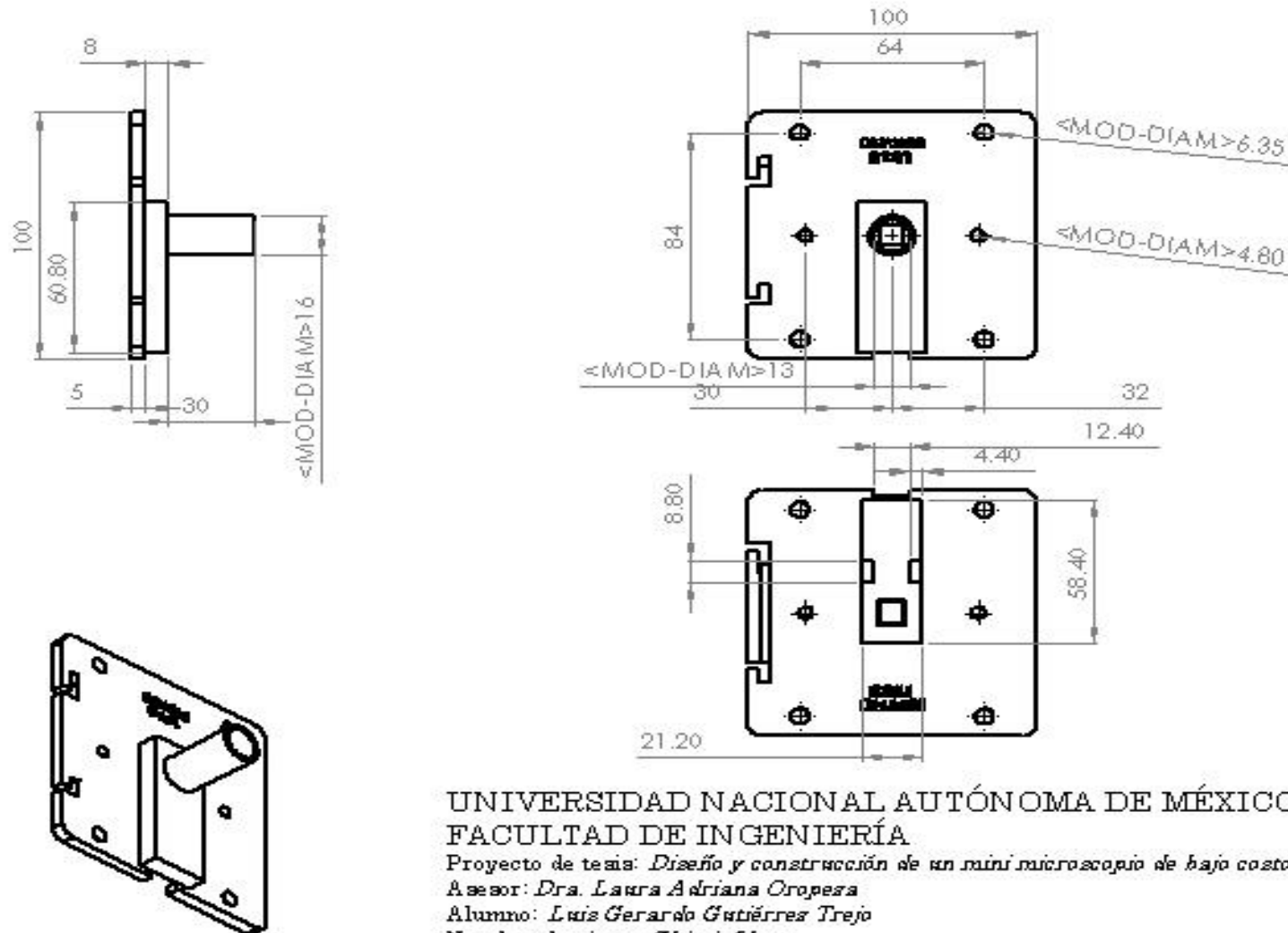


FIGURA 0-15. IMÁGENES DE UNA SOLUCIÓN ACUOSA SIN MARCADOR FLUORESCENTE. IZQUIERDA IMAGEN CON USO DE FILTRO ESPECIAL EDMUND OPTICS, DERECHA IMAGEN SIN FILTRO.

Estas últimas imágenes nos muestran lo más interesante de esta hipótesis: aun sin un marcador fluorescente la imagen resultante después de un filtro paso altas es una imagen con coloración verde a longitud de onda desconocida. Y en la imagen sin filtro se puede ver que todo es azul. Esto significa que nuestro espectro de luz azul es demasiado amplio que tiene una componente en Verde tal que corresponde al de la imagen con filtro y que se corrobora en las gráficas del LED antes obtenidas.

Anexo G. Planos de construcción del diseño final



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

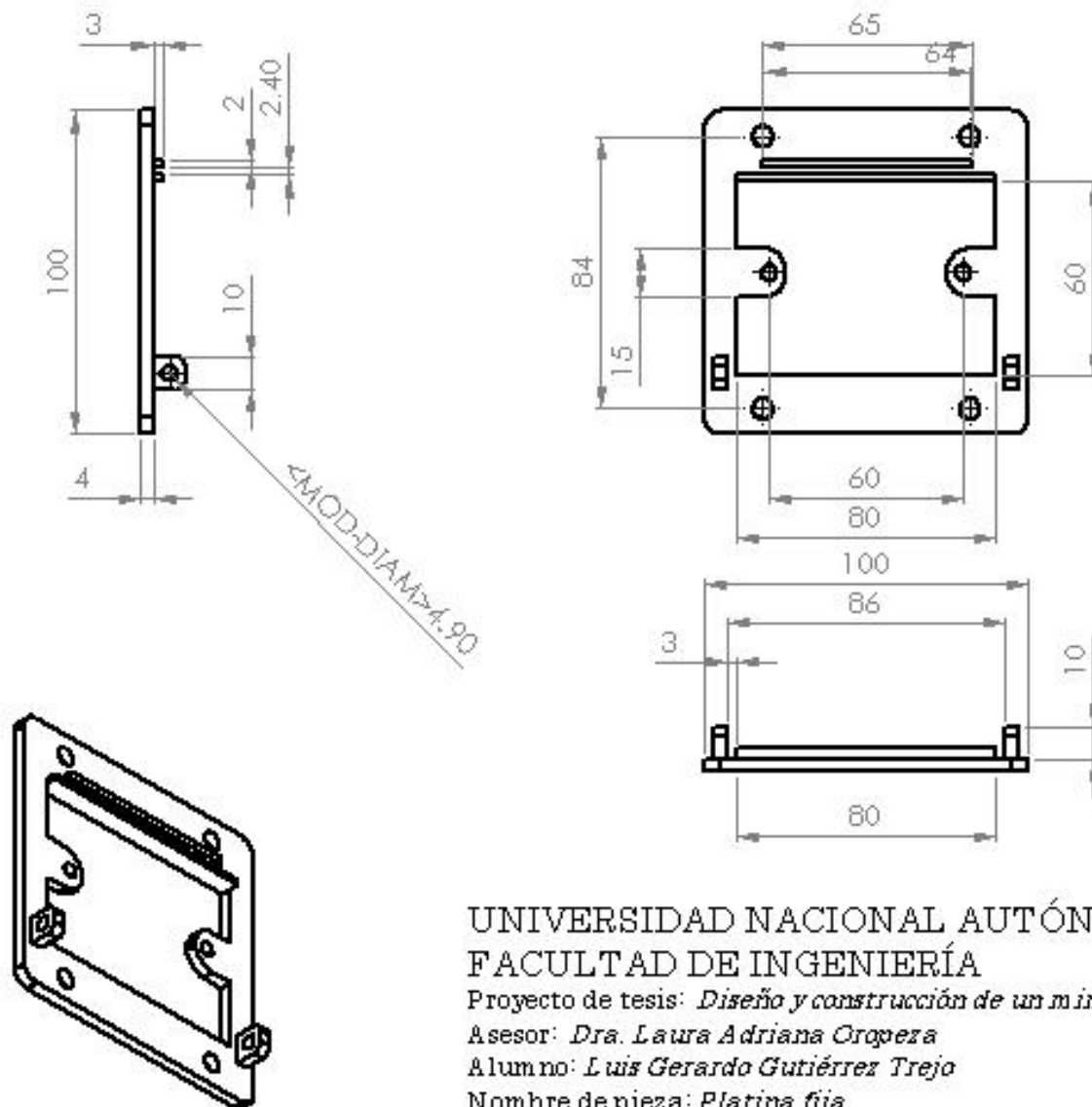
Aesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Chip inf base*

Escala: 1:2

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

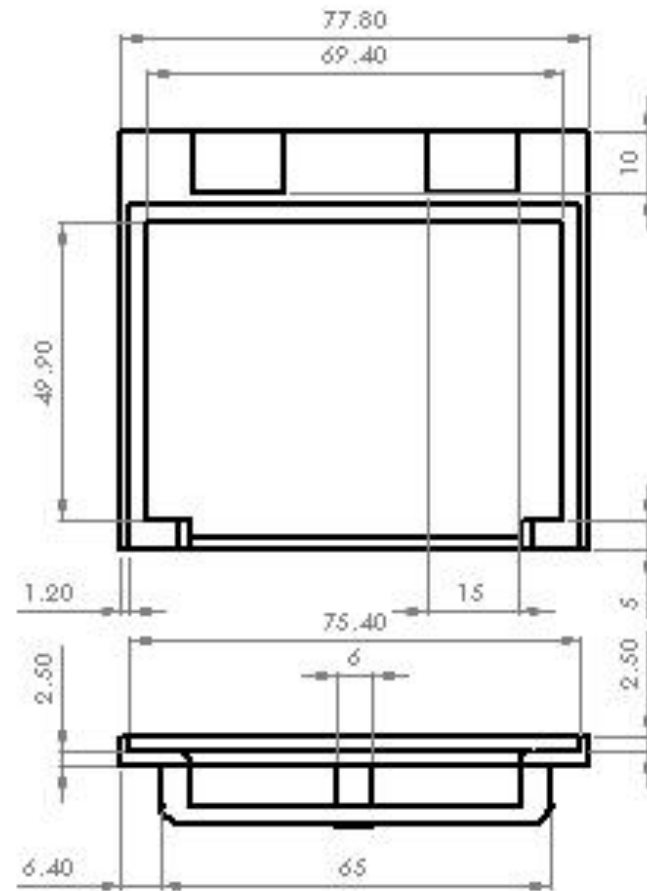
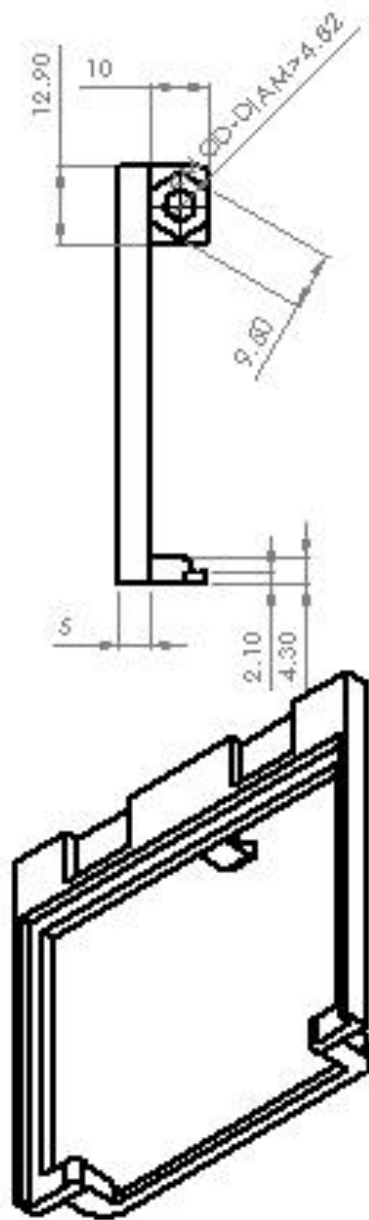
Asesor: *Dra. Laura Adriana Cropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

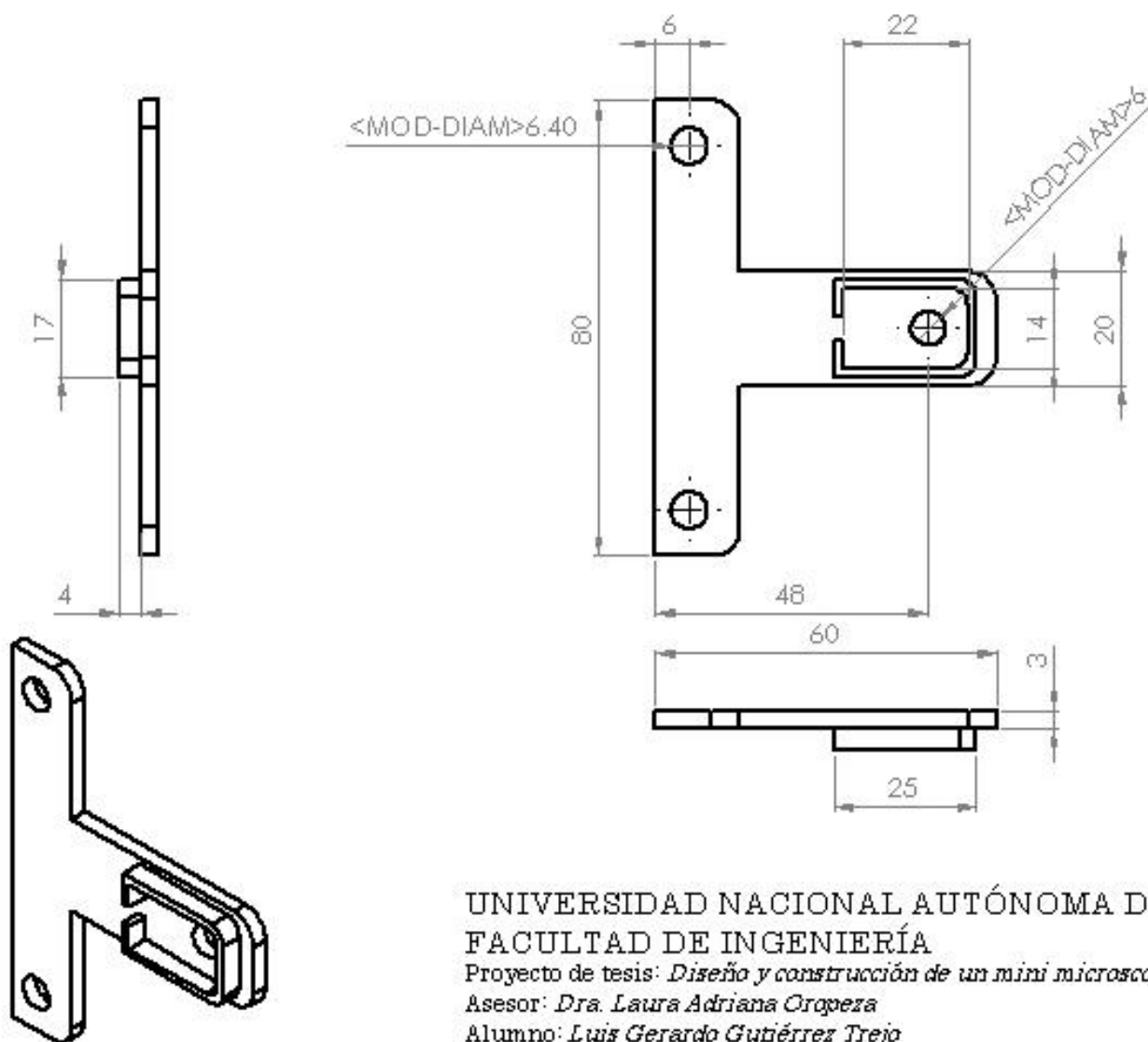
Nombre de pieza: *Platina fija*

Escala: 1:2

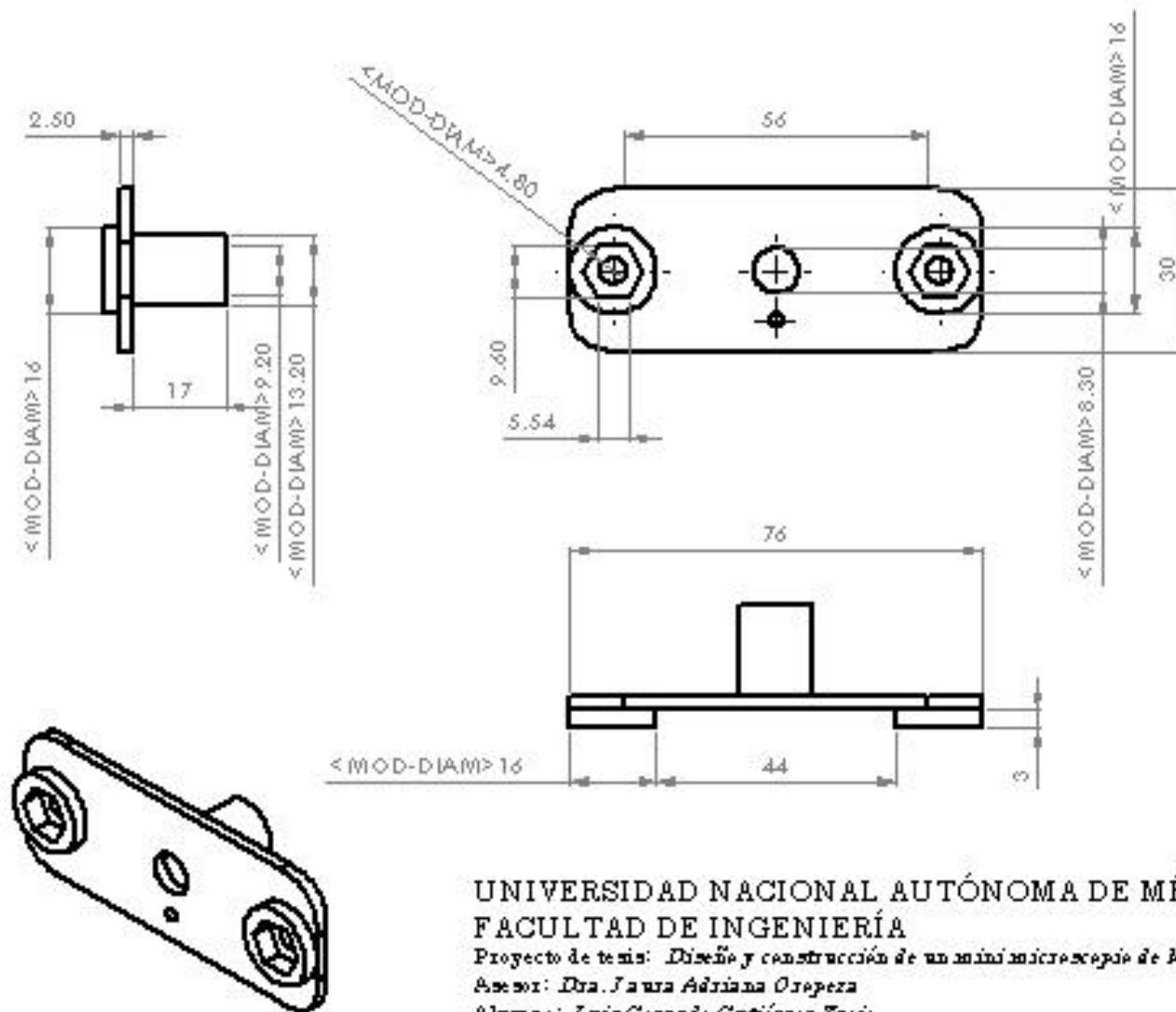
Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE INGENIERÍA
 Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*
 Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*
 Alumno: *Juan Gerardo Gutiérrez Trejo*
 Nombre de pieza: *Platina móvil*
 Escala: 1:1
 Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE INGENIERÍA
 Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*
 Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*
 Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*
 Nombre de pieza: LED Blanco Base
 Escala: 1:1
 Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

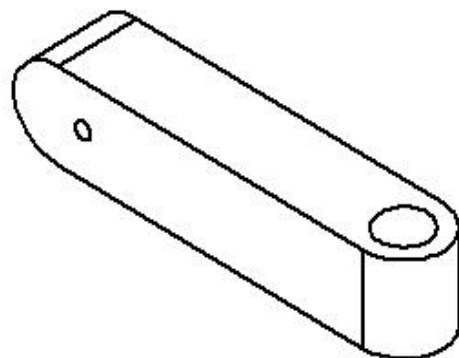
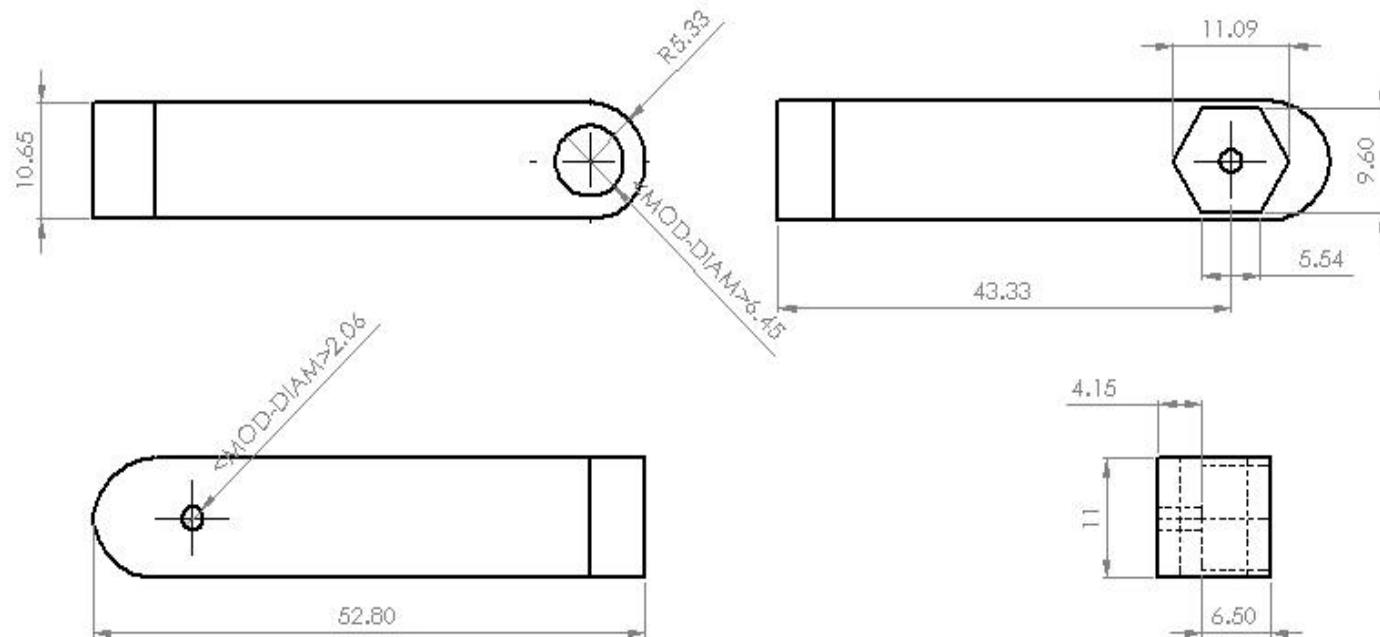
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *José Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *Agarre lente*

Escala: 2:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

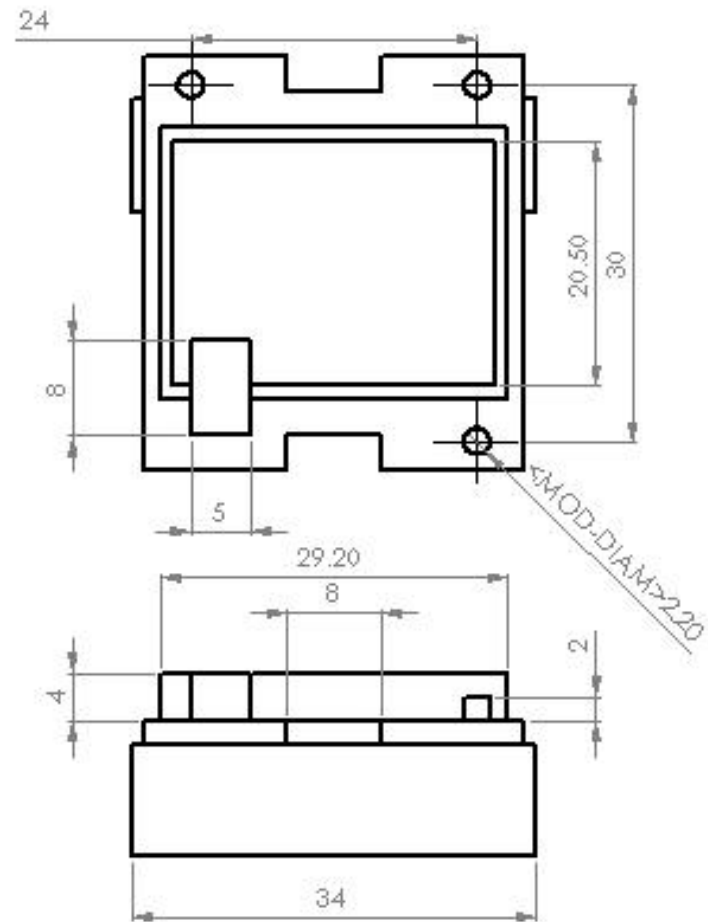
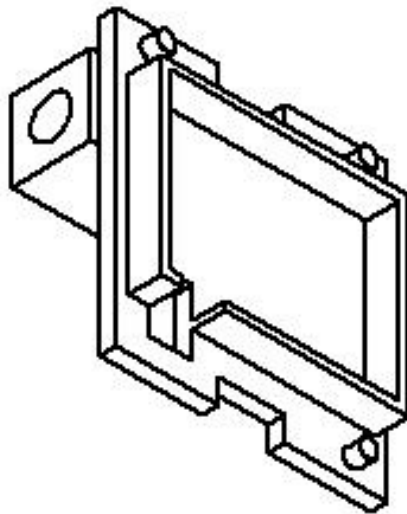
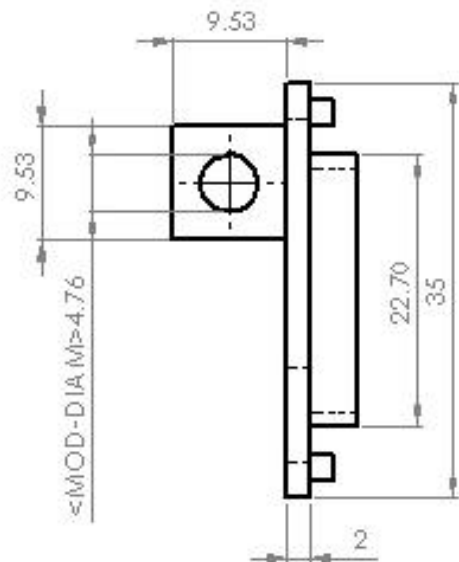
Asesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *RGBmovilz*

Escala: 2:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

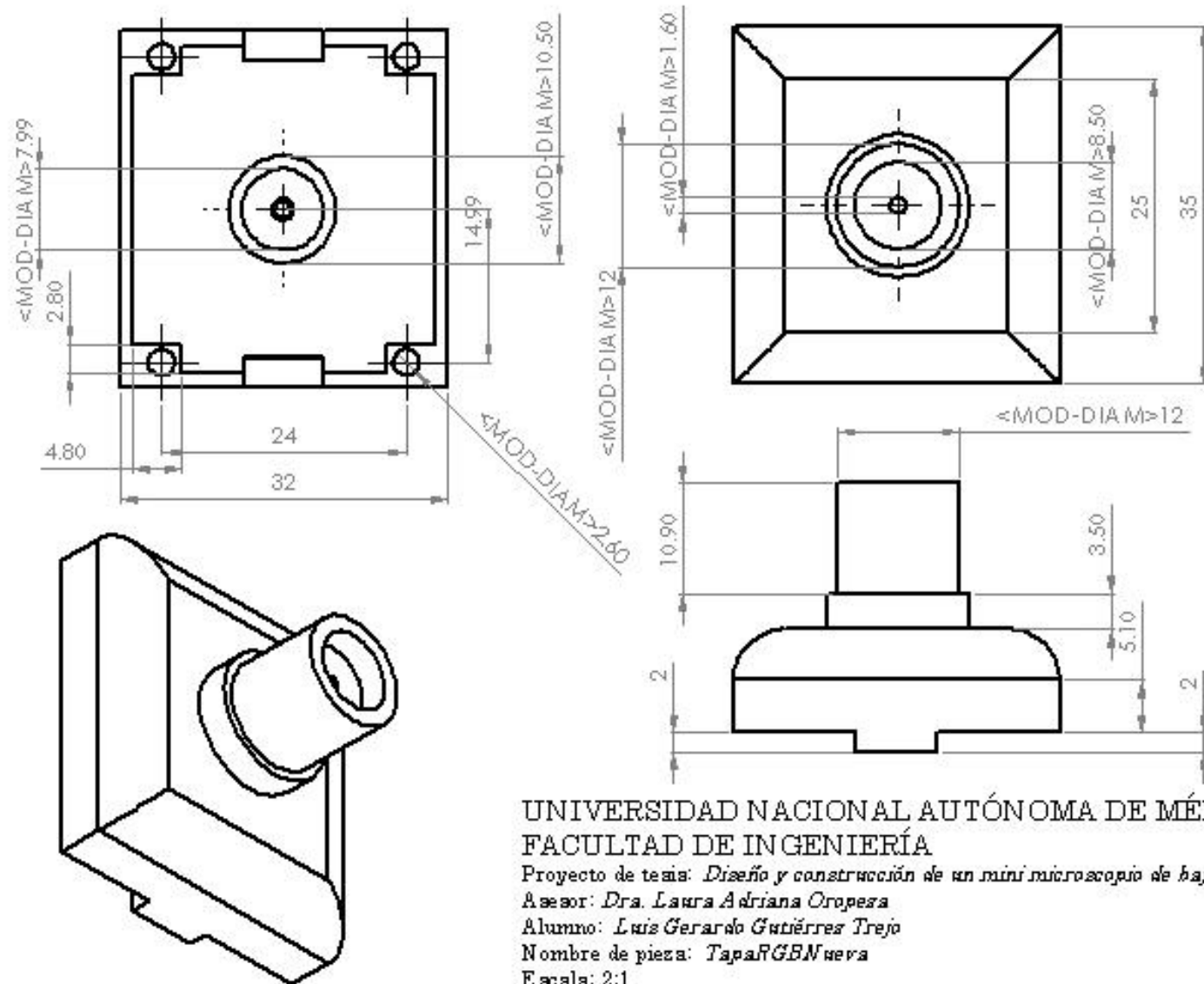
Aesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *BaseRGBfija*

Escala: 2:1

Unidades: *Milímetros*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA

Proyecto de tesis: *Diseño y construcción de un mini microscopio de bajo costo*

Aesor: *Dra. Laura Adriana Oropeza*

Alumno: *Luis Gerardo Gutiérrez Trejo*

Nombre de pieza: *TapaRGBNueva*

Escala: 2:1

Unidades: *Milímetros*

Anexo H. Imágenes del diseño final construido

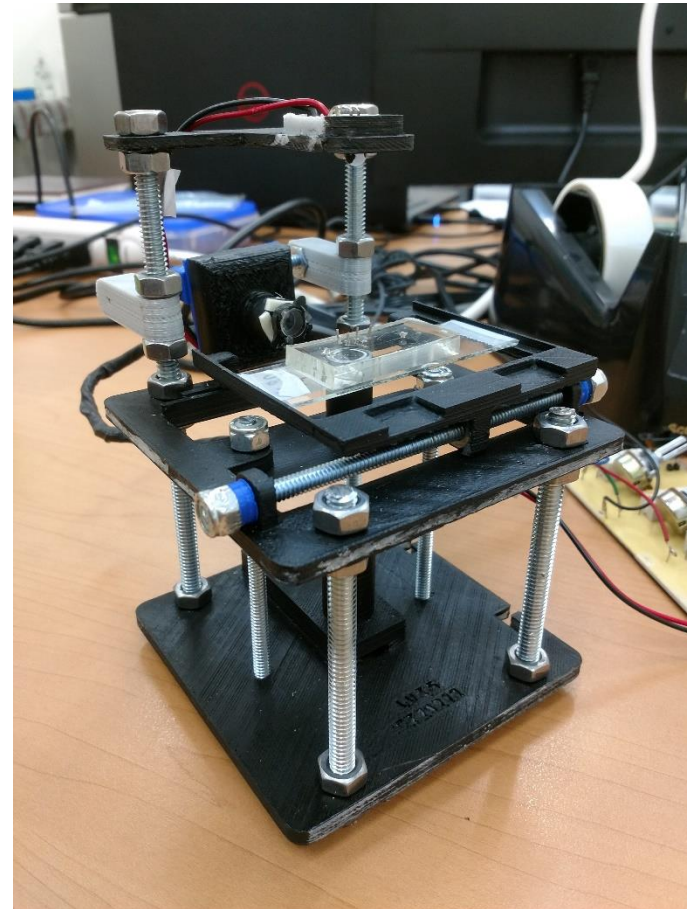
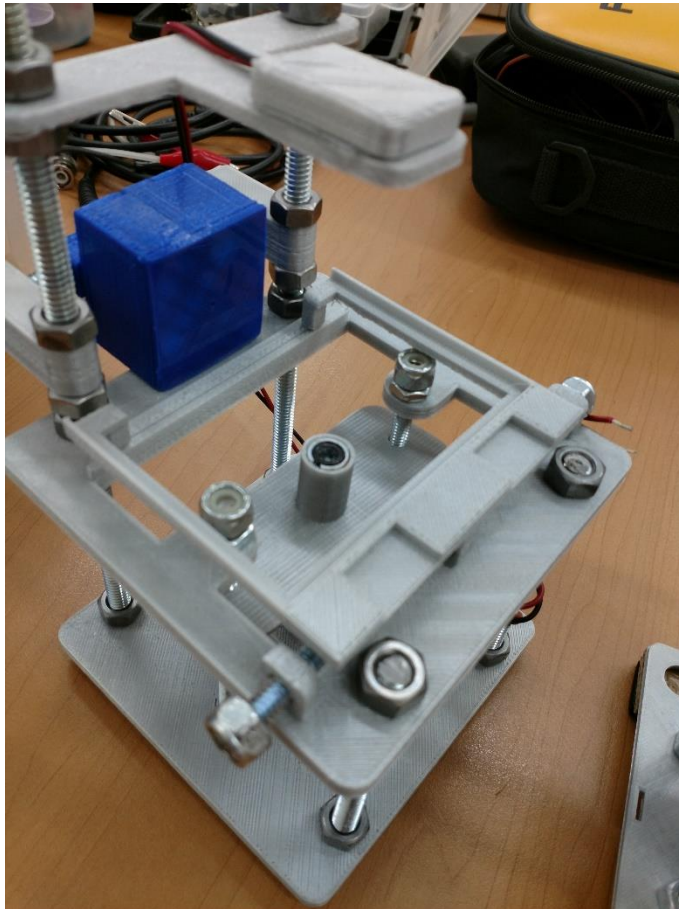


FIGURA 0-16. FOTOGRAFÍAS DEL DISEÑO FINAL CONSTRUIDO EN DOS ETAPAS: LA PRIMERA SIN EL USO DE UNA CAPA DE COLOR NEGRO Y OTRA CON ESTA CAPA. LA FINALIDAD DE ESTE RECUBRIMIENTO DE COLOR ES EVITAR QUE LA LUZ RESIDUAL DE LA FUENTE DE LUZ DE EXCITACIÓN DEL MINI MICROSCOPIO INCIDA SOBRE EL SENSOR DE LA CÁMARA WEB, MODIFICANDO LOS RESULTADOS QUE SE PUEDAN OBTENER.

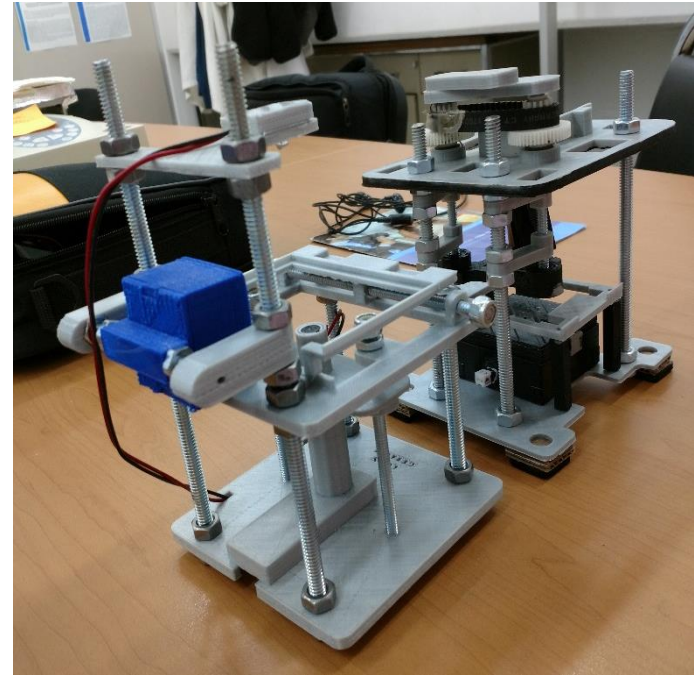
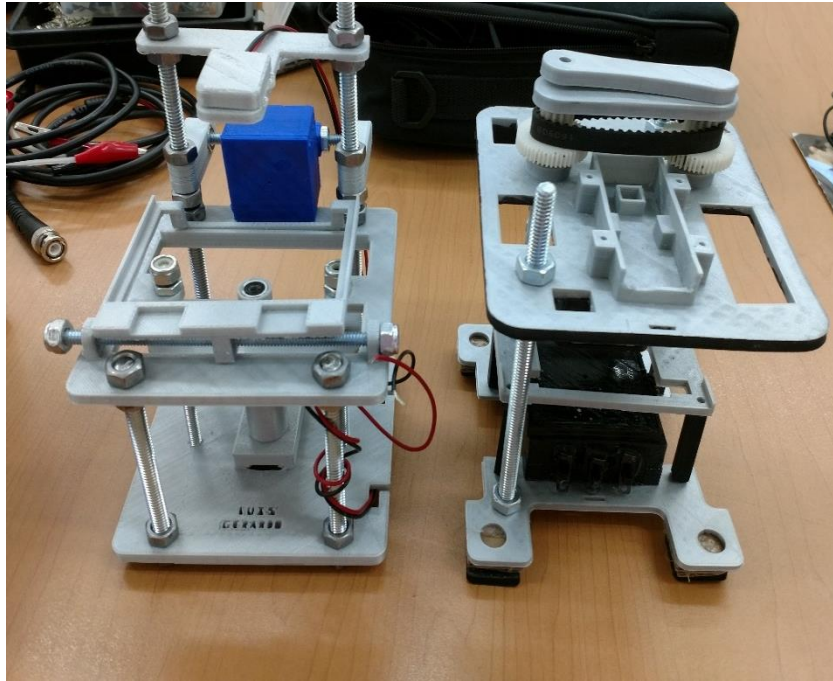


FIGURA 0-17. EN ESTAS IMÁGENES SE OBSERVA LA COMPARATIVA DE LOS MODELOS CONSTRUIDOS MEDIANTE MANUFACTURA ADITIVA. LAS DIMENSIONES SIGUEN SIENDO REDUCIDAS HACIENDO AMBOS PORTABLES, PERO LA DISPOSICIÓN DE LA PLATINA EN EL MODELO FINAL PERMITE UN MAYOR ACCESO A LA MUESTRA SI SE REQUIERE TENER ADITAMENTOS EXTRA EN EL EXPERIMENTO. ADEMÁS, SE PUEDE VER QUE LO COMPONEN MENOS PIEZAS Y QUE ESTÉTICAMENTE ES MÁS LIMPIO Y FÁCIL DE MANIPULAR.

Anexo I. Imágenes del experimento de validación con el microscopio comercial TCM 400 y el mini microscopio.

Realización del experimento.

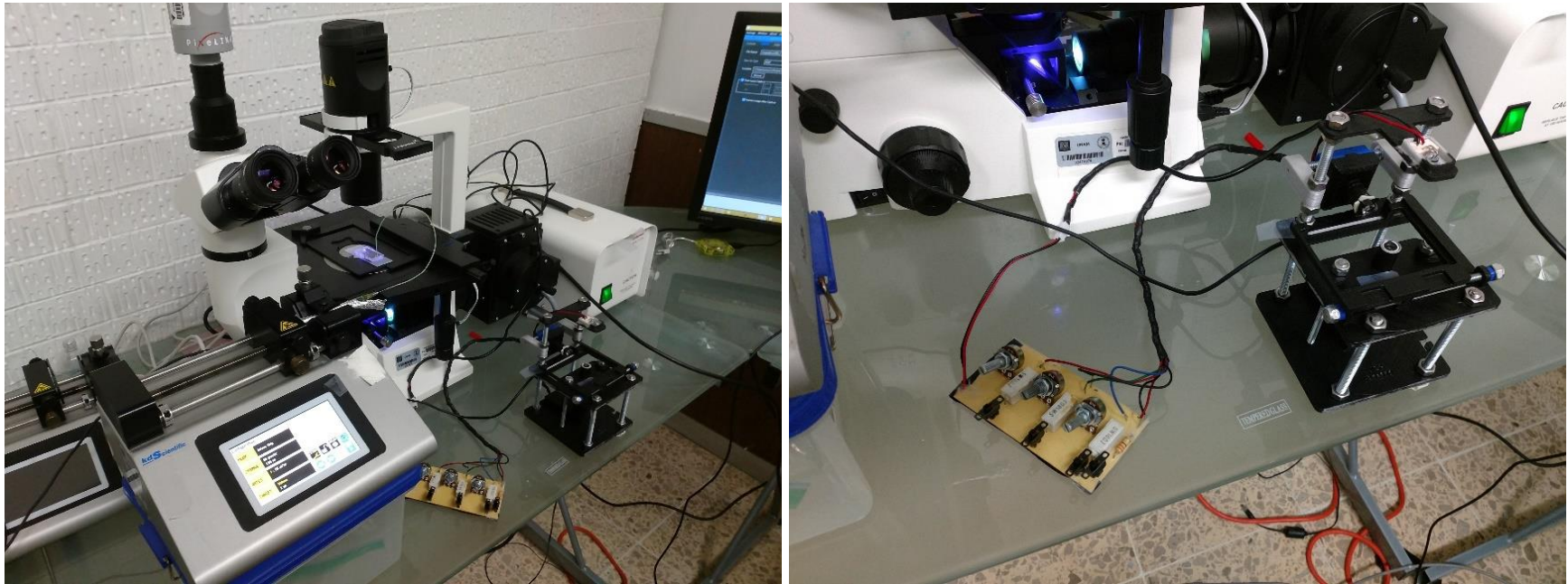


FIGURA 0-18. ESTAS FOTOGRAFÍAS MUESTRAN LOS INSTRUMENTOS UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN. EN ÉSTAS SE PUEDE APRECIAR QUE SE UTILIZA UNA BOMBA DE INYECCIÓN/RETRACCIÓN COMO SE MENCIONA EN EL CAPÍTULO 4, JUNTO CON EL MICROSCOPIO TCM 400 CON SU MÓDULO DE FLUORESCENCIA Y EL MINI MICROSCOPIO DISEÑADO. ASÍ MISMO SE PUEDE APRECIAR LA DISPOSICIÓN DE LOS ELEMENTOS PARA PODER COLOCAR DE MANERA PRONTA LA MUESTRA EN UN MICROSCOPIO U OTRO PARA EVITAR BLANQUEAMIENTO DE LA FLUORESCÉINÁ.

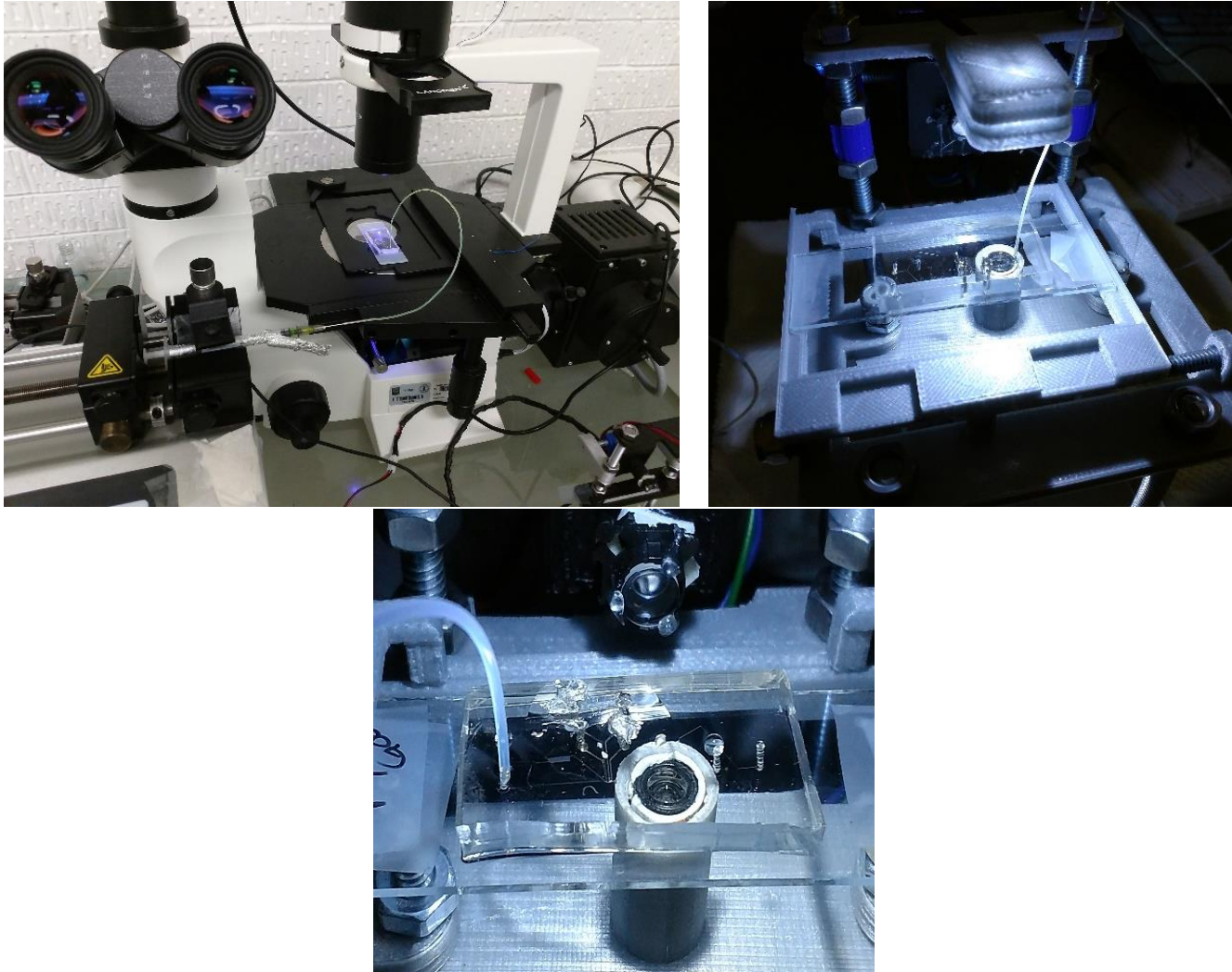
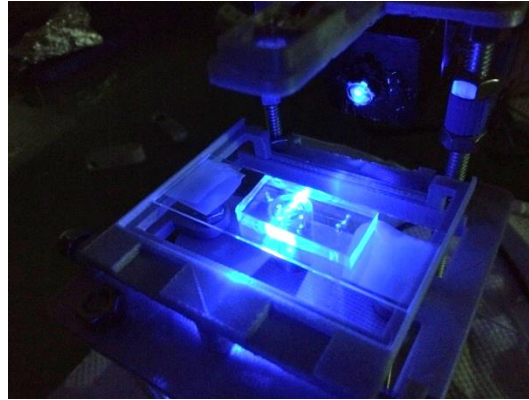


FIGURA 0-19. PARA REALIZAR LOS EXPERIMENTOS ES NECESARIO COLOCAR EL CHIP DE MICRO FLUÍDICA EN LA PLATINA DE LOS MICROSCOPIOS Y ÉSTAS IMÁGENES NOS MUESTRAN CÓMO ES QUE FUE LLEVADO A CABO EN AMBOS. ÉSTE CHIP ESTA EMBEBIDO EN UN PORTAOBJETOS CONVENCIONAL Y PARA AMBOS CASOS, EL CHIP TIENE INSERTADA YA LA MANGUERA DE INYECCIÓN DE FLUORESCÉINA.



Microscopio TCM 400



Mini Microscopio

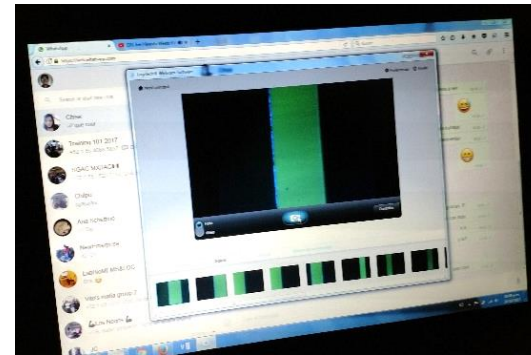
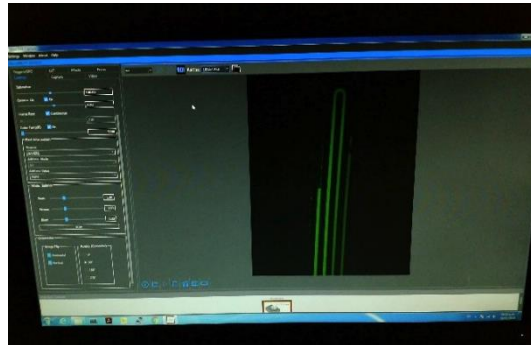
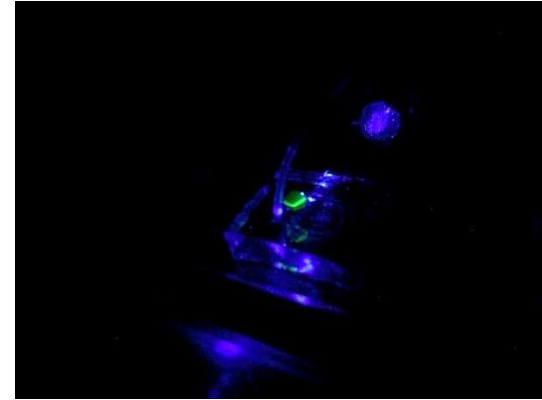


FIGURA 0-20. FINALMENTE SE EXPONEN LAS FOTOGRAFÍAS DONDE SE APRECIA QUE, DURANTE EL EXPERIMENTO, LA DETECCIÓN DE MATERIAL FLUORESCENTE ES POSIBLE CON AMBOS MICROSCOPIOS EN SUS ORDENADORES Y PROGRAMAS PARTICULARES. LA IMAGEN APARTADA SIRVE COMO EJEMPLO DE QUE LA VISUALIZACIÓN DE LA FLUORESCÉINA EMITIENDO LUZ ES POSIBLE AUN SIN EL USO DE LAS CÁMARAS QUE LO DETECTAN.

Microscopio de fluorescencia TCM 400

A continuación, se anexan la información más relevante del mismo y una imagen.



FIGURA 0-21. IMAGEN DEL MICROSCOPIO INVERTIDO DE FLUORESCENCIA [H].

Nombre	Características
Tipo	Óptico invertido
Sistema óptico	Corrección infinita y recubrimiento anti hongos
Lentes objetivos	Serie LW infinity corregido, verdadero color, corrección acromática y larga distancia de trabajo. Con tres magnificaciones: 4x, 10x y 20x.
Lentes oculares	Amplia visión de 10x/22mm.
Platina móvil	160mmx240mm
Condensador	De larga distancia de trabajo con apertura numérica 3.0 con deslizador de contraste de fase.
Iluminación integrada	Bulbo de halógeno con control de intensidad. 6V-30W con vida de 500 horas
Iluminación adicional de fluorescencia	Desmontable fuente de iluminación de lámpara de mercurio de 50W
Bloques de excitación	Excitación azul: • Espectro de excitación: 450-480nm • Barrera 515nm • Dicroico: 500nm Excitación verde: • Espectro de excitación: 510-550nm • Barrera 590nm • Dicroico: 570nm
Alimentación	110-220 V

TABLA 0-6. CARACTERÍSTICAS MÁS RELEVANTES DEL MICROSCOPIO TCM 400 [I].

Adicional a lo anterior es posible la integración de algunos otros aditamentos que facilitan la obtención y almacenamiento de imágenes provenientes del microscopio como la siguiente cámara web y el software de marca Pixelink.



Specifications

Interface	USB 3.0
Sensor Model	Sony IMX255
Color Space	Color
Resolution (MP)	4096 x 2160 (9.0 MP)
Bit Depth	12-bit, 8-bit
Pixel Pitch (µm)	3.45µm
Optical Format	1"
Sensor Diagonal	16.1 mm
Lens Mount	C-Mount
Frame Rate (FPS at Full Resolution)	45
Sensor Type	CMOS

FIGURA 0-22. IMAGEN DE LA CÁMARA DIGITAL CON MONTURA PARA EL MICROSCOPIO TCM 400 Y SUS DATOS [J].

Anexo J. Uso de las herramientas ROI y Multimeasure.

Usando un ejemplo con imágenes demostraré su uso con imágenes de canales llenos con fluoresceína. Primero es necesario acceder al asistente cuya primera ventana será como la siguiente imagen.

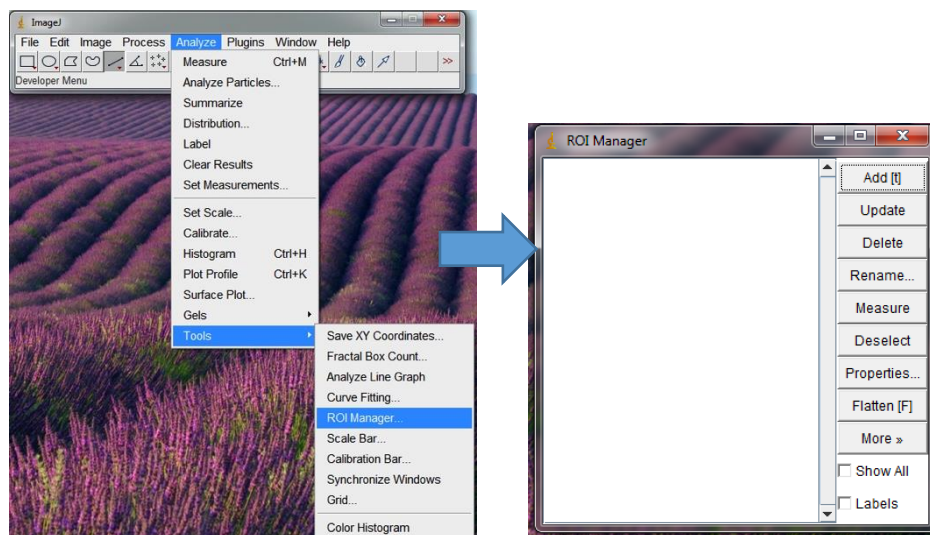


FIGURA 0-23. IMÁGENES DEL ÁRBOL DE COMANDOS HASTA LLEGAR A ROI MANAGER DENTRO DE LA SECCIÓN DE ANALYSE Y DE LA VENTANA DEL ROI MANAGER QUE EMERGE DESPUÉS DE SELECCIONADA LA OPCIÓN.

Una vez contando con la imagen a utilizar dentro de ImageJ, se puede incluir regiones de interés sobre la foto de muchas maneras mientras que el asistente va guardando cada una de ellas con diferentes nombres dependiendo su posición dentro de la misma. La forma más sistemática de hacerlo es utilizando la opción de *more* → *Specify...* y con ello surge una nueva ventana con la que permite controlar los siguientes aspectos: la forma del contorno (rectangular u ovalado), el alto y ancho del contorno y su posición dentro de la imagen dado por las coordenadas X y Y.

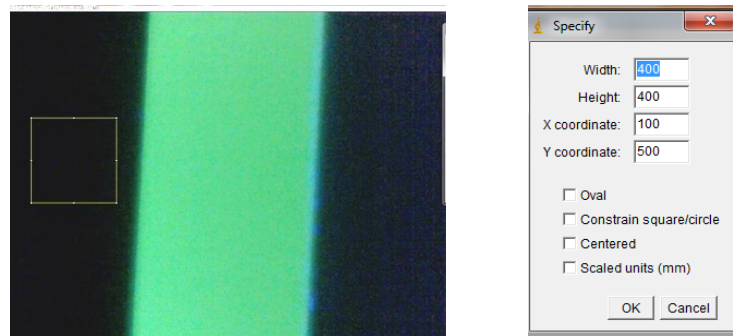


FIGURA 0-24. IMÁGENES DE LA IMAGEN 351 TOMADA CON EL MINI MICROSCOPIO Y LA COLOCACIÓN DE UN ÁREA O REGIÓN DE INTERÉS CON EL COMANDO SPECIFY.

Si este proceso se repite dentro de la imagen para la creación de varias zonas de interés, se tiene una cadena de regiones que posteriormente se puedan analizar. En la Figura 0-25 se ve un ejemplo de esta cadena y la inclusión del comando *multimeasure*.

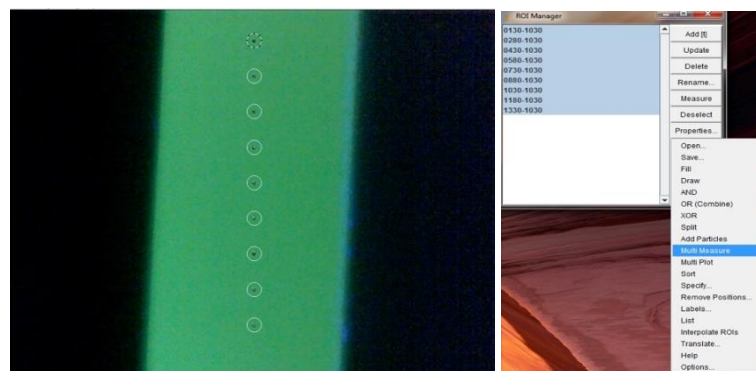


FIGURA 0-25. IMÁGENES DEL USO DE UNA CADENA DE REGIONES DE INTERÉS. (IZQUIERDA) IMAGEN 351 TOMADA CON EL MINI MICROSCOPIO CON 9 CONTORNOS DE INTERÉS EQUIDISTANTES. (CENTRO) LISTA DE REGIONES DE INTERÉS EN LA VENTANA DEL ASISTENTE. (DERECHA) MUESTRA DE LA OPCIÓN PARA REALIZAR MEDIDAS SIMULTÁNEAS DENTRO DEL ASISTENTE.

Multi measure o el comando de varias medidas nos da la opción de realizar el análisis simultáneo del número que queramos de regiones de interés previamente colocadas en la imagen según las opciones antes establecidas de medida.

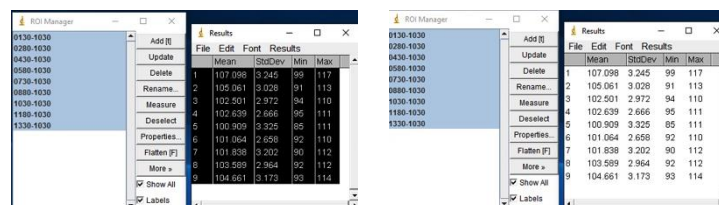


FIGURA 0-26. IMÁGENES DE LOS RESULTADOS QUE ARROJA EL ASISTENTE. CUANDO SE SELECCIONAN LOS DATOS CON EL CURSOR, ES POSIBLE COPIARLOS Y PEGARLOS EN CUALQUIER PROGRAMA QUE ACEPTE TEXTO Y NÚMEROS.

Los valores que se obtienen en la ventana de resultados de ImageJ pueden copiarse a un procesador de datos como Excel y manipularlos o guardarlos como información de cada experimento.

Anexo K. Imágene y tablas del primer análisis de concentraciones.

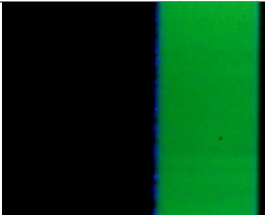
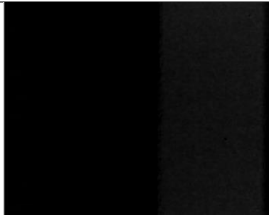
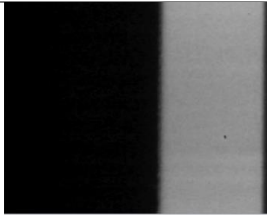
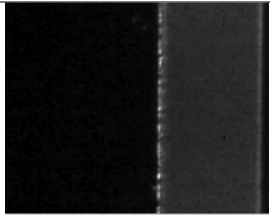
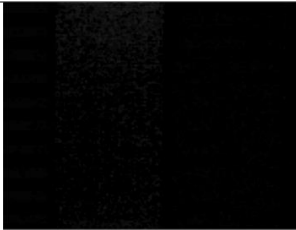
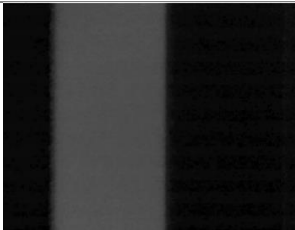
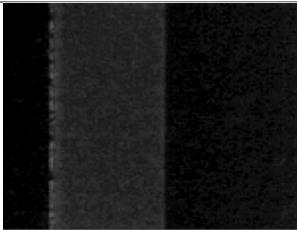
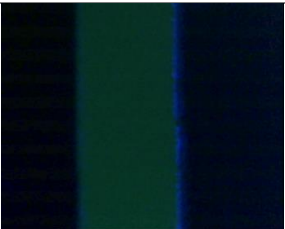
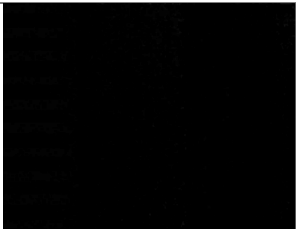
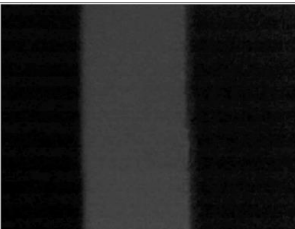
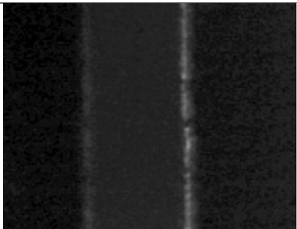
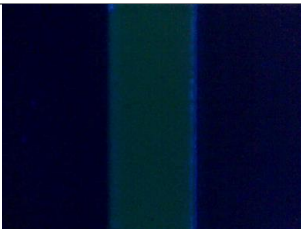
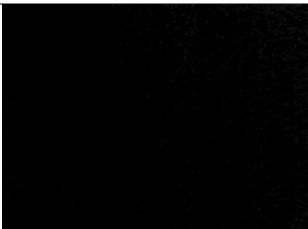
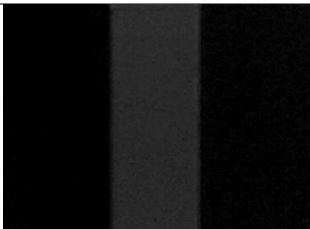
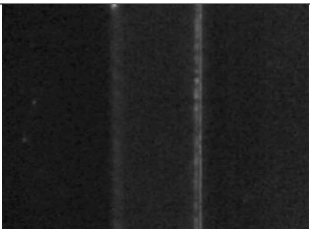
Concentración μM	Imagen original	Canal rojo	Canal verde	Canal azul
200				
100				
50				
40				
30				

TABLA 0-7-9. LISTA DE VALORES DE INTENSIDAD OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE LAS 8 REGIONES DE INTERÉS.

Concentración 200				
	Mean	StdDev	Min	Max
1	150.929	1.953	144	158
2	150.318	1.925	143	156
3	150.085	1.956	143	158
4	150.786	1.463	147	155
5	151.033	1.714	144	156
6	152.129	2.043	146	164
7	152.018	1.628	145	157
8	153.351	1.803	147	160
PROMEDIO	151.331			

Concentración 100				
	Mean	Dev stdr	Min	Max
1	53.381	1.593	49	57
2	54.936	1.707	50	60
3	54.572	1.799	50	59
4	53.872	1.536	50	59
5	52.415	1.315	49	57
6	53.565	1.85	46	57
7	53.797	1.651	49	57
8	54.835	1.47	50	59
9	54.914	1.543	50	58
10	57.896	1.677	53	64
PROMEDIO	54.4183	1.464		

Concentración 50				
	Promedio	Dev stdr	Min	Max
1	28.778	1.344	25	32
2	24.392	1.12	21	27
3	24.204	1.017	21	27
4	24.959	1.013	22	29
5	24.717	1.013	22	27
6	25.676	1.461	22	30
7	24.922	1.157	22	28
8	25.597	1.175	23	28
9	27.422	1.265	24	31
10	27.834	1.28	25	31
PROMEDIO	25.8501	1.593		

TABLA 0.10. LISTA CON LOS VALORES PROMEDIO DE INTENSIDAD INCLUIDOS EN LAS TABLAS ANTERIORES

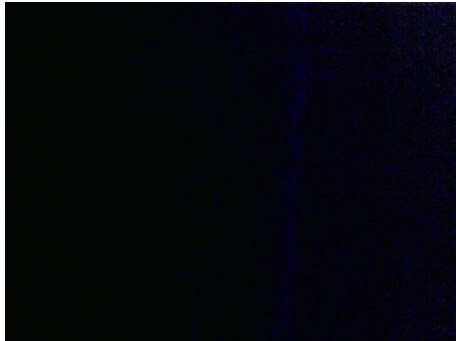
Concentración 40					Concentración 30				
	Mean	Dev stdr	Min	Max		Promedio	Dev stdr	Min	Max
1	20.121	2.367	14	25	1	15.832	1.514	12	23
2	18.29	1.619	13	22	2	15.202	1.409	11	20
3	20.978	1.717	16	25	3	14.451	1.144	10	19
4	18.317	1.218	14	21	4	14.083	1.337	9	18
5	19.593	1.112	17	23	5	13.352	1.241	7	18
6	19.459	1.166	17	23	6	14.419	1.169	11	17
7	19.906	1.26	16	23	7	13.444	1.471	9	17
8	20.779	1.182	18	24	8	13.91	1.196	10	18
9	20.774	1.29	17	25	9	13.549	1.085	8	17
10	21.056	1.3	18	25	10	14.269	1.88	5	18
PROMEDIO	19.927	1.025			PROMEDIO	14.2511	0.786		

Concentración	Valor promedio
500	254.2528
200	164.3008
100	54.4183
50	25.8501
40	19.9273
30	14.2511

Anexo L. Imágenes y tablas del segundo análisis de concentración de fluoresceína.

- **Mini microscopio**

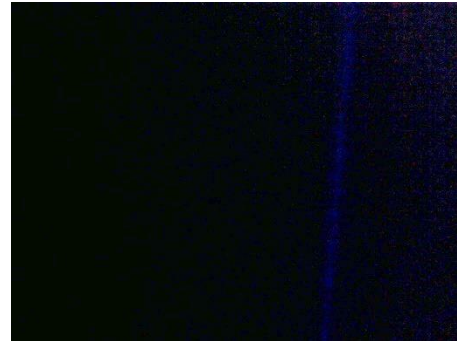
Concentración 0 μM



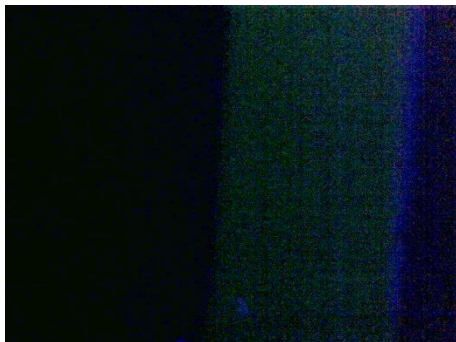
Concentración 10 μM



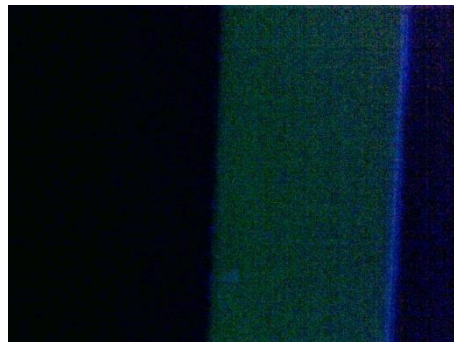
Concentración 20 μM



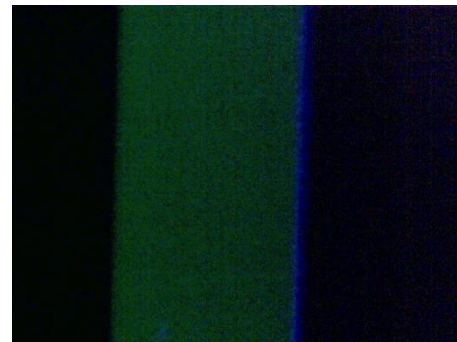
Concentración 30 μM



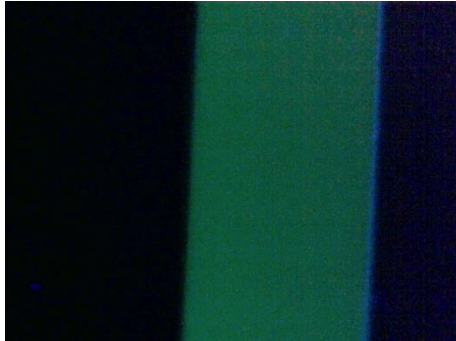
Concentración 40 μM



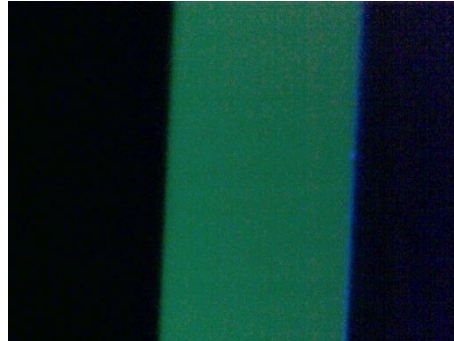
Concentración 50 μM



Concentración 100 μM



Concentración 150 μM



Concentración 200 μM



Concentración 400 μM

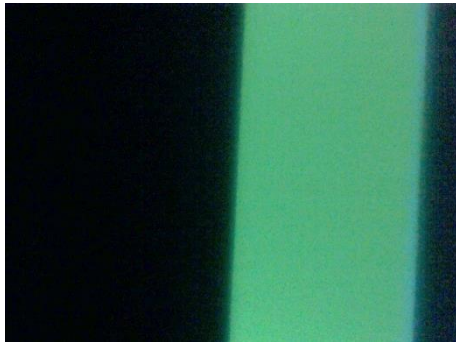


TABLA 0.11-21. RELACIÓN DE TABLAS DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES UTILIZADAS CON EL MINI MICROSCOPIO.

BUFFER				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	1.693	0.914	0	4
2	1.646	0.84	0	5
3	1.928	0.797	0	3
4	2.097	0.745	0	4
5	2.177	0.688	0	3
6	2.293	0.57	0	4
7	2.566	0.496	2	3
8	2.484	0.721	0	3
9	1.792	0.871	0	3
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
2.0751		0.315953036		

CONCENTRACION 10 (177)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	2.527	2.103	0	13
2	1.86	1.559	0	9
3	1.653	1.233	0	7
4	1.842	0.944	0	5
5	1.567	1.005	0	6
6	1.97	0.713	0	5
7	1.77	0.949	0	4
8	1.389	1.09	0	7
9	1.702	0.739	0	4
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
1.8088		0.301368156		

CONCENTRACION 20 (189)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	2.982	1.48	0	12
2	2.24	0.887	0	5
3	2.326	0.744	0	4
4	2.904	0.936	0	11
5	2.662	0.707	0	5
6	2.195	0.862	0	5
7	2.844	0.598	1	6
8	2.676	0.519	0	3
9	2.782	0.469	0	3
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
2.6234		0.279756684		

CONCENTRACION 30 (215)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	15.013	5.232	2	35
2	12.879	4.037	2	28
3	13.117	4.455	2	31
4	9.715	3.196	2	21
5	10.213	3.903	0	31
6	9	3.201	2	25
7	9.316	3.78	0	23
8	8.739	3.371	1	25
9	8.338	3.28	1	27
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
10.7033		2.22683667		

CONCENTRACION 40 (222)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	29.431	6.921	11	50
2	25.904	5.416	10	45
3	28.947	6.06	14	55
4	27.275	5.333	13	47
5	26.612	6.158	14	47
6	27.888	5.941	8	46
7	25.03	4.783	13	39
8	26.324	5.894	11	45
9	26.734	6.226	9	43
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
27.1272		1.340790047		

CONCENTRACION 50 (231)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	40.768	6.047	22	57
2	39.275	6.073	18	54
3	36.17	5.853	19	52
4	38.529	4.008	28	50
5	35.495	6.03	15	51
6	32.983	6.498	15	51
7	34.775	5.571	19	52
8	33.277	6.365	15	50
9	31.998	6.656	17	54
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
35.9188		2.869642852		

CONCENTRACION 100 (252)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	67.637	4.505	53	82
2	67.771	4.272	56	83
3	67.191	4.779	51	85
4	65.755	4.132	51	80
5	64.534	4.553	52	81
6	65.455	4.059	52	77
7	67.086	3.748	56	81
8	68.116	3.523	58	82
9	69.337	4.47	53	82
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
66.9868		1.405061125		

CONCENTRACION 150 (279)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	86.787	5.209	70	103
2	84.552	4.793	71	103
3	83.178	4.004	68	95
4	83.621	4.03	73	98
5	83.248	4.472	69	98
6	83.162	4.139	71	99
7	83.992	3.29	74	94
8	85.076	3.853	75	102
9	85.398	3.997	76	99
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
84.3348		1.167239616		

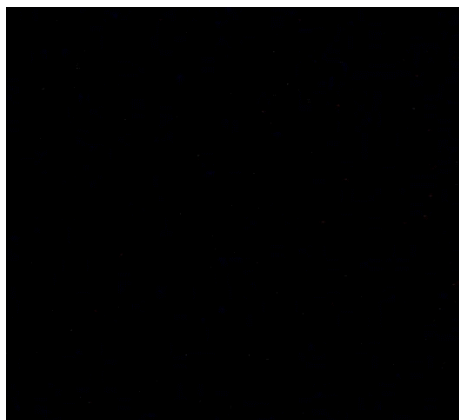
CONCENTRACION 200 (299)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	109.711	5.625	89	126
2	106.043	4.804	93	121
3	103.695	4.644	90	117
4	103.782	4.776	91	120
5	102.51	4.481	90	119
6	102.607	4.516	87	115
7	102.343	5.366	85	118
8	107.016	5.047	94	124
9	110.953	5.638	89	128
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
105.4066		3.045364091		

CONCENTRACION 400 (355)				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	156.635	2.339	147	166
2	155.68	2.28	148	164
3	154.179	2.443	147	161
4	154.461	2.289	148	161
5	155.135	2.383	147	162
6	155.34	2.383	145	162
7	156.163	2.831	148	165
8	158.627	2.695	150	168
9	159.436	3.057	150	170
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
156.184		1.693225128		

Valores promedios globales	
Concentración	Valor promedio
400	156.184
200	105.406
150	84.335
100	66.987
50	35.918
40	27.127
30	10.703
20	2.623
10	1.808
0	2.0751

- TCM 400

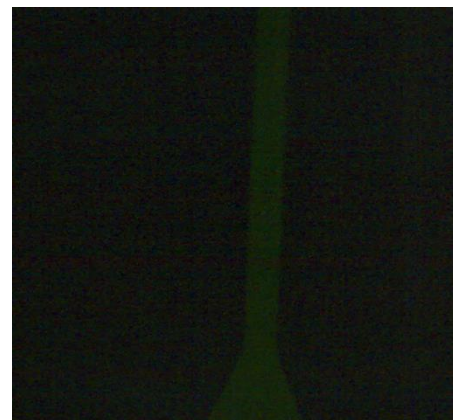
Concentración 0 μM



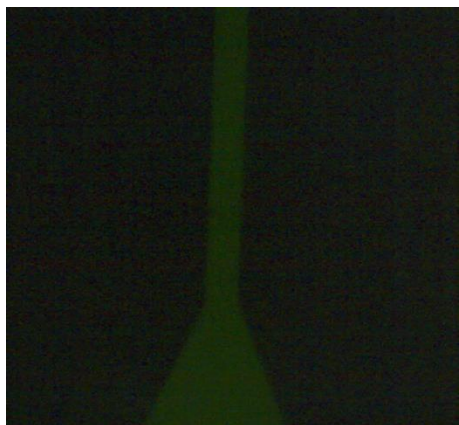
Concentración 10 μM



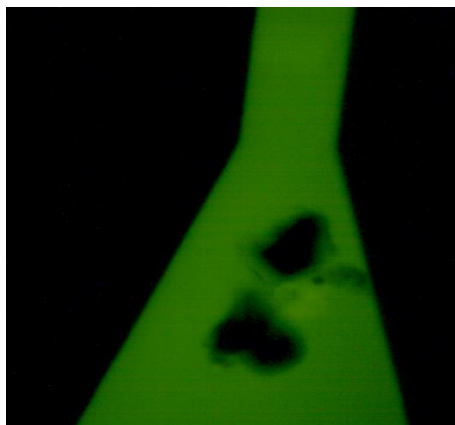
Concentración 20 μM



Concentración 30 μM



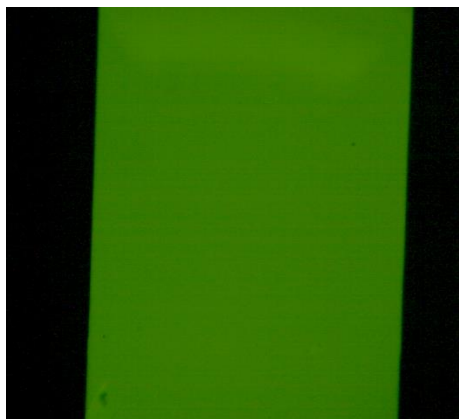
Concentración 40 μM



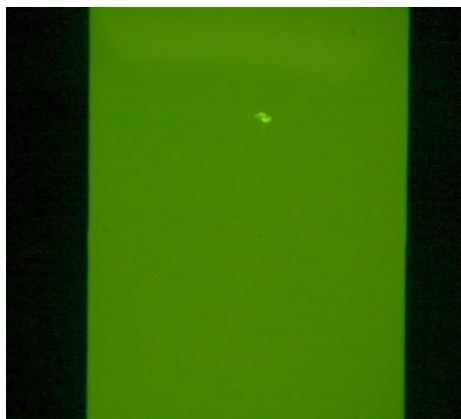
Concentración 50 μM



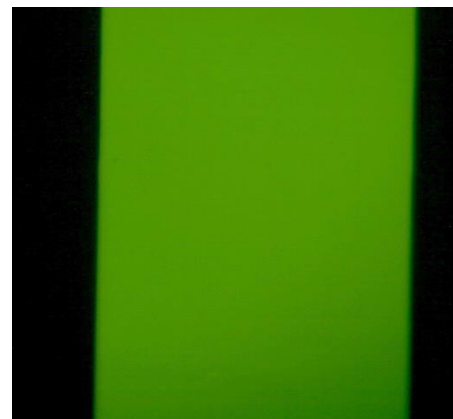
Concentración 100 μM



Concentración 150 μM



Concentración 200 μM



Concentración 300 μM



Concentración 400 μM



TABLA 0.11-21. RELACIÓN DE TABLAS DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES UTILIZADAS CON EL TCM 400.

VACÍO				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	0.203	0.454	0	3
2	0.222	0.487	0	2
3	0.388	1.263	0	29
4	0.323	0.845	0	14
5	0.3	0.946	0	20
6	0.297	0.614	0	4
7	0.295	0.519	0	3
8	0.244	0.505	0	3
9	0.307	0.575	0	4
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
0.286555556		0.05630078		

CONCENTRACION 10				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	9.236	3.512	0	25
2	11.344	3.134	0	23
3	10.654	4.331	0	87
4	12.182	3.936	0	67
5	8.512	4.292	0	69
6	9.245	3.856	0	23
7	11.846	3.065	0	25
8	12.648	3.296	0	29
9	7.894	3.144	0	25
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
10.39566		0.609983766		

CONCENTRACION 20				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	14.303	3.412	0	29
2	14.817	3.304	0	31
3	14.948	3.361	0	28
4	16.108	3.248	5	29
5	15.465	3.723	6	77
6	15.948	2.868	5	30
7	15.402	3.921	1	73
8	14.672	4.02	0	30
9	16.247	2.942	1	32
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
15.32333333		0.684460737		

CONCENTRACION 30				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	17.434	2.957	4	28
2	19.42	2.974	9	32
3	20.402	3.123	10	30
4	21.464	2.868	10	30
5	20.803	3.046	4	39
6	21.112	3.053	4	32
7	21.825	2.824	9	35
8	21.701	2.735	3	30
9	22.309	3.256	13	74
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
20.71888889		1.500470963		

CONCENTRACION 40				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	34.92	2.179	26	44
2	34.362	2.519	25	49
3	32.464	2.32	23	42
4	32.125	2.71	22	79
5	34.607	2.592	23	78
6	35.1	2.447	24	73
7	34.682	2.577	24	73
8	33.334	2.441	25	68
9	32.008	2.435	21	64
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
33.73355556		1.258402967		

CONCENTRACION 50				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	51.704	2.239	42	73
2	49.636	2.555	36	60
3	46.931	2.257	37	56
4	47.332	2.344	37	59
5	47.24	2.251	37	59
6	47	2.266	40	74
7	47.402	2.178	40	56
8	47.227	2.186	37	55
9	47.221	2.634	37	100
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
47.96588889		1.62458452		

CONCENTRACION 100					CONCENTRACION 150					CONCENTRACION 200				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max	Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max	Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	88.459	2.187	79	108	1	110.902	2.138	103	129	1	131.492	1.785	123	153
2	85.11	2.158	76	94	2	105.512	2.436	98	114	2	132.784	1.585	126	139
3	82.866	1.883	74	90	3	104.493	1.742	96	112	3	132.644	1.659	127	140
4	84.314	1.828	77	91	4	106.185	1.711	99	112	4	132.491	1.671	126	143
5	84.498	1.761	75	93	5	106.655	1.899	99	115	5	131.264	1.78	125	138
6	83.994	1.945	76	103	6	106.251	1.881	100	125	6	130.31	1.696	124	140
7	84.488	1.849	77	92	7	106.137	1.832	98	113	7	128.655	1.677	120	142
8	84.566	1.904	77	93	8	105.379	1.883	98	113	8	125.176	1.829	119	139
9	84.695	2.072	78	128	9	105.6	2.01	99	143	9	121.358	1.801	115	128
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR			PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR			PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
84.77666667		1.514925658			106.346		1.821812765			129.5748889		3.921160907		

CONCENTRACION 300				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	179.792	1.759	174	189
2	175.832	2.489	168	190
3	178.978	1.905	172	186
4	178.323	1.845	172	184
5	175.992	1.777	170	182
6	174.719	1.724	167	193
7	165.498	2.315	158	174
8	154.828	1.816	147	174
9	143.445	2.52	134	152
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
169.7118889		12.71231621		

CONCENTRACION 400				
Evento	Mean	Dev. Stdr	Min	Max
1	222.712	1.636	216	233
2	223.598	1.706	217	233
3	225.114	1.748	218	234
4	221.27	1.947	213	229
5	221.906	1.671	214	229
6	218.118	1.952	212	237
7	209.437	1.802	203	217
8	198.356	2.266	190	210
9	182.239	2.33	175	194
PROMEDIO		DESVIACIÓN ESTANDAR		
213.6388889		14.56451346		

CONCENTRACIÓN	PROMEDIO
0	0.287
10	10.3956
20	15.323
30	20.719
40	33.734
50	47.966
100	84.777
150	106.346
200	129.575
300	169.712
400	213.639

Bibliografía

- [1] Eugene Hecht, *Óptica*, 3ra Edición, USA, Ed. Pearson, 2003.
- [2] Raúl Ruvalcaba Morales, “Desarrollo de un microscopio confocal para la obtención de imágenes en 3D de dispositivos desarrollados con microlitografía”, Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería UNAM, Ciudad de México, 2009.
- [3] Theodore George Rochow and Eugene G.R., *Introduction to microscopy by means of light, electrons, X rays or acoustics*, 2da Edición, USA, Plenum Press, 1979.
- [4] “Microscopia”, César E. Montalvo Arenas, UNAM, agosto 2010.
- [5] A. Sampedro & J.R. de los Toyos & A. Martínez-Nistal, *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*, España, Universidad de Oviedo, 1995.
- [6] Daniel Malacara, *Óptica básica*, 3ra Edición, México, Fondo de Cultura Económica, 2015.
- [7] Bruno Rossi, *Fundamentos de óptica*, 1ra edición en español , España, Ed. Reverté, 2003.
- [8] Gerard J. Tortora & Berdell R. Funke & Christine L. Case, *Introducción a la microbiología*, Novena Edición, Argentina, Ed. Medica Panamericana, 2007.
- [9] Jeff W Lichtman y José-Angel Conchell, “Flourescence Microscopy”, *Nature Methods*, vol. 2, No. 12, pp. 909-919, Noviembre 2005.
- [10] Belén Reija Otero, *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes*, 1ra Edición, España, Universidad de Santiago de Compostela, 2007.
- [11] *Microscopio de Fluorescencia*, Universidad de Alicante, 2010.
- [12] *FluoSpheres[®] Fluorescent microspheres for trace studies*, Molecular Probes, Estados Unidos de America, March 2003.
- [13] Gea Oswah Fatah Parikesit & Marten Darmawan & Amir Faisal, “Quantitative low-cost webcam-based microscopy”, *Optical Engineering*, Vol 49 (11), 113205 (1-9), November 2010.
- [14] Ali Khademhosseini, “A cost-effective fluorescence mini-microscope for biomedical applications”, *Lab on a Chip*, Vol 15, No. 18, pp. 3613-3808, septiembre 2015.
- [15] Joseph R. Lakowicz, *Principle of Fluorescence Spectroscopy*, Ed. Springer, 3ra Edición, 2006.
- [16] Erick Omar Morales Domínguez, “Diseño y construcción de un separador de microgotas fluorescentes en chip”, Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería UNAM, Ciudad de México, Enero 2018
- [17] <https://ultimaker.com/en/products/ultimaker-2-plus> (Consulta Abril 2018)
- [18] <https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/> (Consulta Abril 2018)
- [19] <https://es.wikipedia.org/wiki/Tris> (Consulta Julio 2018)
- [20] <https://www.globescientific.com/media/PDF/Library%20PDF/Diamond-UserGuide.pdf> (Consulta Julio 2018)

- [21] U.S. Mote & S.L. Bhattar & S.R. Patil & G.B. Kolekar, "Interaction of Fluorescein with felodipine: A spectrofluorometric and thermodynamic study", Springer Science + business Media, Vol. 38, pp. 619-628, 2009.
- [22] <http://kinetroni.com/index.php> (Consulta Junio de 2018)
- [23] https://www.amazon.com.mx/ref=nav_logo (Consulta Junio de 2018)
- [24] <http://www.themakerz.com/impresion-3d> (Consulta Junio de 2018)
- [25] <http://www.impresora3dmexico.com.mx/precios-por-impresion-3D.php> (Consulta Junio de 2018)
- [26] <https://grupoxds.3dprintingmms.com/app#/product/details/?ids=5162306770042880&flow=1> (Consulta Junio de 2018)

Enlaces web

- [a] <http://fisica.laguia2000.com/general/refraccion-y-reflexion>. (Consulta Mayo 2018)
- [b] http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/monoweb/capitulo6_5.htm (Consulta Mayo 2018)
- [c] http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/monoweb/capitulo6_5.htm (Consulta Mayo 2018)
- [d] <http://www.steren.com.mx/resistencia-de-alambre-de-2-watts-al-10-de-tolerancia.html> (Consulta Junio 2018)
- [e] <https://www.kdscientific.com/legato-210-210p-syringe-pump.html> (Consulta Julio 2018)
- [f] <https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/> (Consulta Julio 2018)
- [g] <https://www.kdscientific.com/legato-210-210p-syringe-pump.html> (Consulta Julio 2018)
- [h] <http://www.laboamerica.com/products/life-materials-sciences/tcm-400#downloads> (Consulta Agosto 2018)
- [i] <https://www.microscopeinternational.com/product/labomed-tcm400-phase-inverted-fluorescence-microscope/> (Consulta Agosto 2018)
- [j] <http://pixelink.com/product/m9c-pro-sony-imx255> (Consulta Agosto 2018)
- [k] http://www.dcb.unam.mx/cerafin/bancorec/ejenlinea/3_espectros_planck.pdf (Consulta Julio 2018)
- [l] <http://www.fotoseimagenes.net/fluoresceina> (Consulta Agosto 2018)
- [m] <https://es.wikipedia.org/wiki/Fluoresce%C3%ADna> (Consulta Abril 2018)