

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS:

Desarrollo y evaluación de un Sistema de Control de Temperatura
adaptado a un Microscopio de Fluorescencia para el estudio *in*
vitro de oncósferas de *Taenia Solium*

PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN FÍSICA

ELABORADO POR:
LUIS DANIEL RUEDA RÁEZ

ASESOR:
DR. GERMAN COMINA BELLIDO

LIMA - PERU
2021

Agradecimientos

A mi madre Anamaría Ráez Guevara Vda de Rueda y a mi padre Luis Alberto Rueda Ruiz por su apoyo invaluable que me permitieron iniciar una Carrera en Ciencias.

A mi esposa Jaqueline Castro, por su apoyo y empuje para culminar esta tesis.

Al Dr. Manfred Horn de quien pude aprender bastante física gracias a las discusiones que hemos tenido y a su asesoría en algunos proyectos de física experimental.

Al Dr. Mirko Zimic por financiar esta tesis desarrollada en su laboratorio y al Dr. German Comina por su asesoría en la presente tesis.

Dedicatoria

A la memoria de mi muy querido Profesor Holger Gustavo Valqui Casas quien me introdujo en el maravilloso mundo de las ciencias como físico experimental, y de quien siempre recordare todas sus buenas enseñanzas.

Tabla de Contenidos

I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT	10
III. OBJETIVOS	11
IV. HIPOTESIS.....	14
V. INTRODUCTION	13
V.1 Antecedentes	13
V.1.1. Sistemas de Control de Temperatura Comerciales	13
V.1.2 Reportes del Desarrollo de Sistemas de Control de Temperatura de bajo costo Adaptados a Microscopios	15
V.2 La temperatura del Cuerpo Humano	16
VI. FUNDAMENTO TEÓRICO	17
VI.1 Algunos Aspectos Biológicos.....	17
VI.1.1 Teniasis / Cisticercosis.....	17
VI.1.2 Secreción de vesículas por la oncósfera de <i>T. solium</i>	19
VI.1.3 La Microscopía Óptica y la Biología Celular	20
VI.2. Microscopia Óptica	22
VI.2.1 El ojo humano	23
VI.2.2 El Microscopio Óptico	24
VI.2.3 Aberraciones	26
VI.2.4 Resolución	30

VI.3. Fluorescencia	32
VI.3.1. Fluoróforos	34
VI.3.2. Aminoácidos, Proteínas, Enzimas	36
VI.3.3. Péptidos fluorogénicos.....	37
VI.3.4. Microscopio de Fluorescencia	38
VI.3.5. Componentes ópticos del Microscopio de Fluorescencia ...	42
VI.3.5.1. Fuentes de Luz	42
VI.3.5.1.1 Lámpara de vapor de mercurio	43
VI.3.5.2. Cubos filtro	44
VI.4. Celda Peltier	47
VI.4.1. Efecto Seebeck y Efecto Peltier	47
VI.4.2. Celda Peltier	49
VI.5. Termografía	50
VI.5.1 Cámara termográfica Flir ONE.....	53
VI.5. Transferencia de calor	56
VI.6.1 Convección	57
VI.6.2 Radiación	58
VI.6.3 Conducción	58
VI.6.3.1 Ley de Fourier	59
VI.6.3.2 Conductividad térmica	61
VI.6.3.3 Conductividad a través de una pared	62
VI.6.3.4 Perfil de temperatura a través de n losas .	65

VI.6.3.5 Resistencia térmica	66
VII. MATERIALES Y METODOS	68
VII.1. Microscopios evaluado	68
VII.2. Las celdas Peltier	68
VII.3. Circuito de control de las celdas Peltier	68
VII.4. Adaptación de una fuente de poder para el circuito de control	71
VII.5 Montaje del sistema en el microscopio	71
VII.6. Flujo de calor en las celdas Peltier y la base del microscopio.....	72
VII.7. Estudio preliminar de oncósferas de <i>T. Solium</i>	75
VII.8. Preparación de la cámara porta muestra	76
VII.9. Simulación de la transferencia de calor en el sistema.....	76
VII.10. Observación de las oncósferas de <i>Taenia solium</i> a temperatura regulada	77
VIII.- RESULTADOS.....	78
VIII.1 La cámara porta muestra.....	78
VIII.2 Adaptación de fuente de poder para el Circuito de Control.....	78
VIII.3 Imágenes térmicas de la base del microscopio y del porta muestra a diferentes tiempos	79
VIII.4 Simulación de la transferencia de calor en el sistema.....	80
VIII.5 Datos registrados del circuito de control de temperatura	82
VIII.6 Relación entre las temperaturas de la base del microscopio y la del porta muestra.....	85

VIII.7 Estudio preliminar utilizando oncósferas de <i>Taenia solium</i>	86
VIII.8 . Imágenes de oncósferas de <i>Taenia Solium</i> incubadas con substrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC.....	87
IX.- DISCUSIÓN	90
X.- CONCLUSIONES	97
XI.- REFERENCIAS.....	98
XII.- ANEXOS	98

I.- RESUMEN

Actualmente los dispositivos comerciales de calentamiento de muestras biológicas para microscopios ópticos son muy costosos. La presente tesis describe el desarrollo y la caracterización de un sistema de calentamiento térmico, especialmente diseñado para acoplarlo a un microscopio de fluorescencia comercial Nikon Eclipse E-600, para el estudio *in-vitro* de oncósferas (huevos) de *Taenia solium*.

En la presente tesis, se utiliza un sistema térmico de un costo total aproximado de \$50 basado en celdas Peltier, las cuales se fijan a la base metálica del microscopio para calentarlo. Se utiliza también un circuito analógico simple de control basado en un sensor de temperatura LM335. También se realizó el procedimiento para obtener una solución de oncosferas *Taenia solium* fluorescentes. Se fabricó una cámara porta muestra para contener a las oncósferas de *Taenia solium* durante la observación. Se calibró el sistema electrónico monitoreando la muestra con una termocupla y una cámara de visión térmica.

El sistema desarrollado permitió obtener imágenes de las oncosferas de *Taenia solium in vitro* mientras se les mantenía a una temperatura alrededor de $34,5 \pm 0,7$ °C.

Ésta tesis permite que investigadores en bio-medicina pueden tener una herramienta práctica, reproducible en cualquier laboratorio, que les permita realizar investigaciones con muestras *in-vitro*, no solo de *Taenia solium*, sino, debido a las características de

estabilidad y practicidad de sistema desarrollado, pueda ser usado para la observación de otros tipos de muestra biológicas y pueda ser implementado en otros tipos de microscopio.

II.- ABSTRACT

Currently commercial biological sample heating devices for optical microscopes are very expensive. This thesis describes the development and characterization of a thermal heating system, specially designed to be coupled to a commercial Nikon Eclipse E-600 fluorescence microscope, for the in vitro study of oncospheres (eggs) of *Taenia solium*.

In the present thesis, a thermal system with an approximate total cost of \$ 50 based on Peltier cells is used, which are fixed to the metal base of the microscope to heat it. A simple analog control circuit based on an LM335 temperature sensor is also used. The procedure was also carried out to obtain a solution of fluorescent *Taenia solium* oncospheres. A sample holder chamber was fabricated to contain the oncospheres of *Taenia solium* during the observation. The electronic system was calibrated by monitoring the sample with a thermocouple and a thermal vision camera.

The developed system obtained images of the oncospheres of *Taenia solium* in vitro while maintaining a temperature around 34.5 ± 0.7 °C.

This thesis allows researchers in bio-medicine to have a practical tool, reproducible in any laboratory, that allows them to carry out research with in vitro samples, not only of *Taenia solium*, but, due to the characteristics of stability and practicality of the developed system, it can be used for the observation of other types of biological sample and can be implemented in other types of microscope.

III.- OBJETIVOS

II.1. Objetivo General.

Desarrollar un sistema de control de temperatura que permita el uso de un microscopio de fluorescencia para obtener imágenes in vitro de oncósferas de *Taenia solium*.

II.2 Objetivos Específicos.

- Desarrollo del sistema electrónico del control y potencia para celdas Peltier.
- Montaje de las celdas Peltier en un microscopio, caracterización térmica y calibración del sistema.
- Implementación del protocolo para la obtención de una solución de oncósferas de *Taenia solium*.
- Fabricación de porta muestras y colocación de las oncósferas de *Taenia solium*.
- Selección de filtros excitación y emisión y lentes de un microscopio de fluorescencia adecuados para la muestras y obtención de imágenes in vitro de oncósferas de *Taenia solium*.

IV.- HIPOTESIS

III.1. Hipótesis General.

Es posible desarrollar un sistema de control de temperatura de bajo costo adaptable a un microscopio óptico para estudiar muestras biológicas.

III.2. Hipótesis Específica.

- Es posible desarrollar un sistema electrónico del control y potencia para las fuente de poder de celdas Peltier.
- Es posible montar celdas Peltier en un microscopio para con ellas calentar la base del microscopio y calentar así las muestras biológicas a estudiar.
- Es posible fabricar un porta muestras donde las muestras líquidas no se evaporen en observaciones largas y se pueda utilizar para oncosferas de *Taenia solium*.

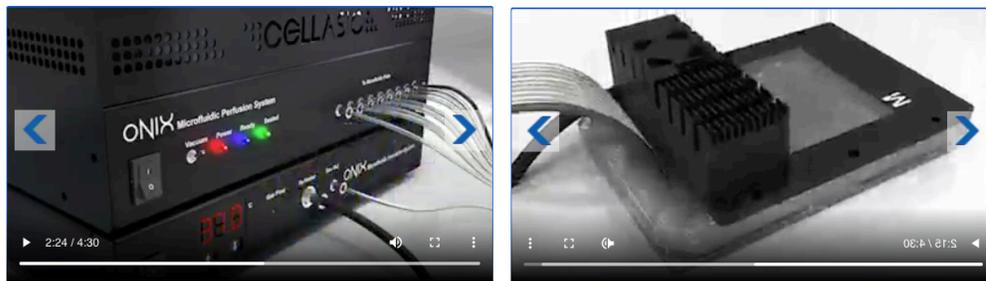
V. INTRODUCCIÓN

V.1 Antecedentes

V.1.1. Sistemas de Control de Temperatura Comerciales

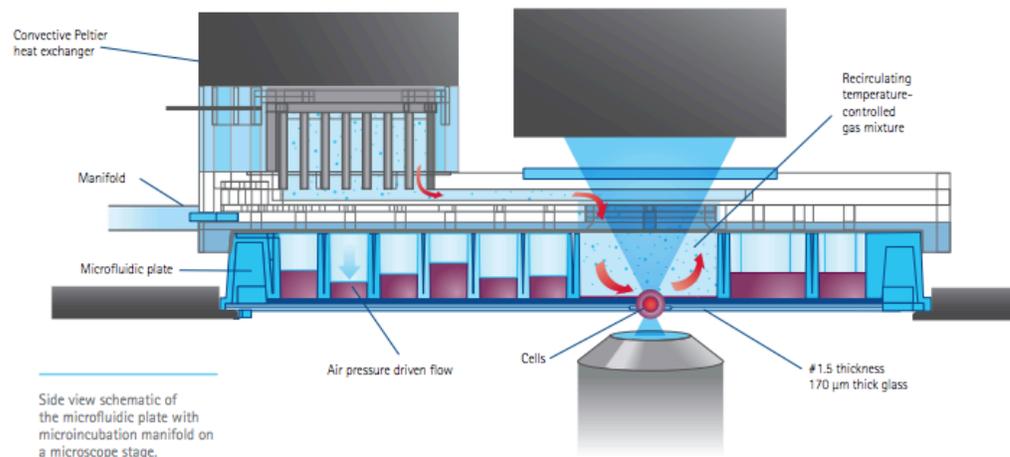
Actualmente existen en el mercado algunos sistemas de control de temperatura para muestras biológicas adaptados a microscopios. Un ejemplo es el sistema Millipore, M.

CellASIC™ ONIX (ver figura 1)



A

B



C

Figura 1. Sistema de control de temperatura Millipore, M. *CellASIC™ ONIX* **A.** Módulo de microfluidica y módulo de control de temperatura. **B.** Cámara del sistema adaptable al microscopio. **C.** Esquema y conductos dentro de la cámara del sistema Millipore, M. *CellASIC™ ONIX*. [1]

Los equipos comerciales como el sistema Millipore, M. *CellASIC™ ONIX* son muy costosos. Por separado, el módulo de control del sistema de microfluidica de este sistema cuesta 23 000\$, mientras que el sistema de control de temperatura 5000 \$. [1].

Otro instrumento comercial es el sistema “Cube & Box” de Life Imaging Services [2]. La figura 2 muestra este sistema el cual es un armazón de acrílico acoplado a una fuente de aire caliente. El “Cube” emite aire a temperatura controlada, calentando así el microscopio, el portamuestra y las muestras que vayan a estudiarse con el.



BOX
on a Leica DM IRBE



CUBE
precision air heater

Figura 2. Sistema Cube & Box de Life Imaging Services. [2]

V.1.2. Reportes del Desarrollo de Sistemas de Control de Temperatura de bajo costo Adaptados a Microscopios

Como presente línea arriba, los equipos comerciales de control de temperatura adaptables a microscopios ópticos son costosos. Debido a ello existen diversos reportes del desarrollo de sistemas de bajo costo de control de temperatura adaptados a microscopios. Un ejemplo de ello es el trabajo de Kulesa and Kasemeir-Kulesa [3]. Los autores utilizaron una caja de carton que rodea al microscopio. Se hace llegar aire caliente al interior de esta caja desde una incubadora, manteniendose la temperatura en su interior controlada debido al aire proveniente de la incubadora. El estudio reporta que la temperatura se mantiene controlada con fluctuaciones mínimas y ha sido probada y utilizada en estudios de embriones de pollos, ratones y peces cebrá.

También debo mencionar el trabajo de Yuji Matsukawa et al. [4] quienes fabricaron una base para un microscopio horizontal (los autores lo describen como un microscopio invertido rotado 90°) en el cual podían regular su temperatura utilizando un calentador de caucho de silicona, pudiendo también controlarla remotamente desde una PC o desde un teléfono smartphone.

Finalmente mencionare el trabajo de Andre Maia Chagas et al. [5] quienes desarrollaron una plataforma de código abierto a ser impresa en una impresora 3D que incluye un microscopio de fluorescencia y un sistema de control de temperatura de precisión.

Este trabajo de tesis presenta también una propuesta de sistema de control de temperatura de bajo costo adaptable a un microscopio de fluorescencia para evaluar muestras biológicas.

V.2 La temperatura del cuerpo humano

El cuerpo humano, y las células que lo conforman, se mantiene aproximadamente a una temperatura entre 36.1 y 37.2 °C. [6]. Por ello, las proteínas del cuerpo humano suelen tener una óptima actividad enzimática alrededor de esta temperatura. Los patógenos que infectan humanos han evolucionado para que su actividad infecciosa sea también óptima alrededor de 37°C. Por este motivo muchos de los estudios biológicos o bioquímicos de células o proteínas pueden dar resultados más similares a lo que ocurre dentro del hospedero humano si se le estudia a esta temperatura. De esta manera, la mejor manera de estudiar algún efecto biológico real en el laboratorio que afecte al humano sería manteniendo las células o proteínas bajo estudio usualmente dentro del rango de 36-37°C y realizar el experimento a dicha temperatura. [7-9].

VI. FUNDAMENTO TEÓRICO

VI.1 Algunos Aspectos Biológicos

VI.1.1 Teniasis / Cisticercosis

Teniasis /cisticercosis es una enfermedad causada por la infección con el cestode *Taenia solium*. Esta enfermedad es endémica en América Latina y en muchos países de Asia, Sub-Saharan de África y Oceanía y es responsable de una significativa cantidad de morbilidad y hospitalizaciones [10-12], la Organización Mundial de la Salud estima que mas de 2.5 millones de personas están infectadas con teniasis y cerca de 50 millones son infectadas con cisticercosis, con una mortalidad de 50,000 fallecidos cada año.

La complicación más seria de esta enfermedad es la infección del sistema nervioso central del humano por el estadio intermediario del parásito (el cisticerco), el cual causa la enfermedad clínica conocida como Neurocisticercosis (NCC) [13]. NCC es la enfermedad neurológica humana mas importante causada por un parasito en los países en vías de desarrollo, causa la mayoría de casos de epilepsia en comparación a otras enfermedades parasitarias. Además, NCC es la mayor causa común de epilepsia adquirida en el mundo [14].

Teniasis/cisticercosis es una enfermedad zoonótica con un ciclo de vida que comprende 2 hospederos : el humano y el cerdo. El cerdo constituye el hospedero intermediario natural Los humanos son los únicos hospederos definitivos conocidos del parasito adulto. La infección con el parasito adulto (*Teniasis*) ocurre por el consumo de cisticercos presentes en carne de chancho mal cocinada. En el sistema digestivo, los cisticercos

viables son estimulados para que evaginen liberando al escólex que se adhiere a la mucosa del intestino delgado a partir de la cual crece la tenia adulta, generando una Teniasis [11]. La tenia adulta vive en el intestino delgado de humano hospedero y secreta sus huevos (oncósferas) las cuales pueden ser secretadas vía las heces contaminando el medio ambiente. Si estas oncósferas son ingeridas por los cerdos, estas pueden llegar a diversas partes de su organismo como por ejemplo los músculos o el sistema nervioso. (esta vía de infección no esta actualmente bien entendida). Finalmente las oncósferas desarrollan los cisticercos dentro de los músculos del cerdo cerrando el ciclo de vida de la *T. solium* (ver Figura 3), produciendo la Cisticercosis.

Eventualmente, un humano podría ingerir oncósferas de *T. solium* produciendo cisticercosis humana.

Taenia solium es un parásito perteneciente al phylum Platyhelminthes, clase Cestoidea, subclase Eucestoidea, orden Cyclophyllidea y familia Taeniidae. Morfológicamente, la tenia adulta posee un scolex con una roseta y 4 ventosas con una doble corona de ganchos, los cuales le permiten al estadio adulto vivir en el intestino delgado adherido a su pared intestinal.

T. solium tiene 3 diferenciados estadios en su desarrollo: la taenia (el cestode), la oncosfera (huevo de la taenia), y el cisticerco (la larva). Los humanos son los únicos hospederos definitivos para el gusano adulto, ambos humanos y chanchos pueden actuar como hospederos intermediarios y desarrollar la larva o cisticerco.

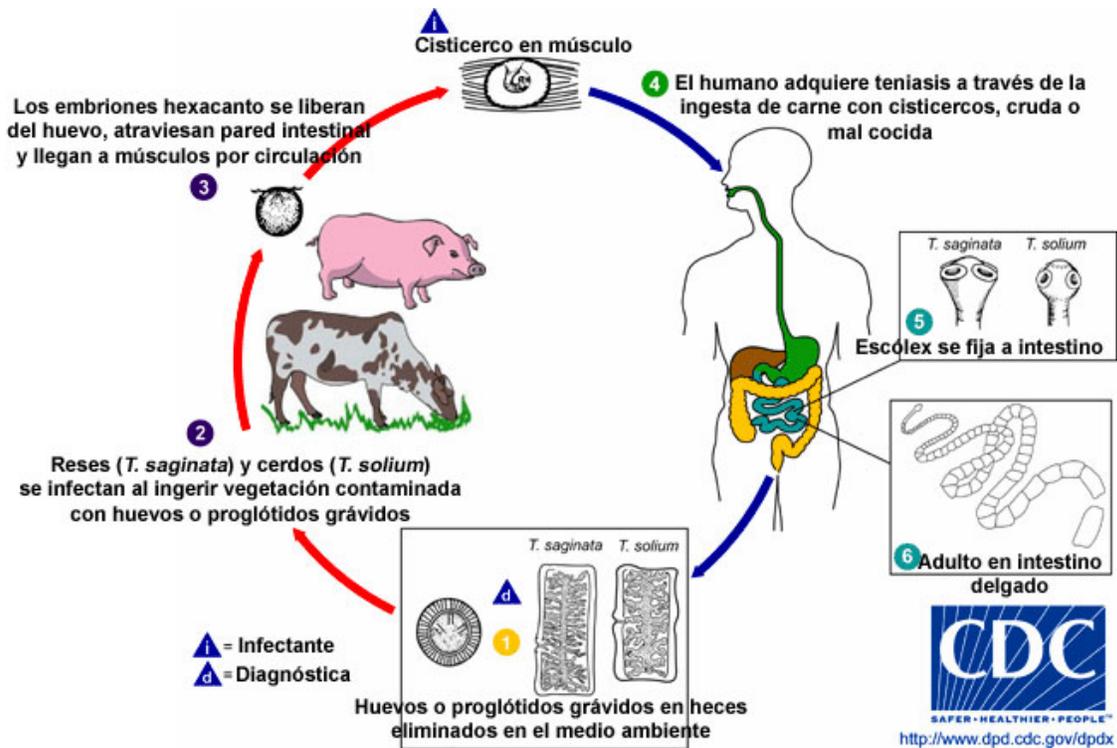


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Tomado de Garcia and Martinez, *Taenia Solium* Taeniasis/Cysticercosis [15]

VI.1.2 Secreción de vesículas por la oncosfera de *T. solium*

Las oncosferas de *T. Solium* son los huevos de la tenia adulta. Hace algunos años el grupo de Venastegui et al. [7] con el propósito de entender el proceso de infección de las oncosferas de *T. solium* y desarrollo del cisticerco, estuvo estudiando la adherencia de oncosferas a ciertas líneas celulares, observaron que cuando estas se mantienen a 37°C, secretan vesículas.

VI.1.3 La Microscopía Óptica y la Biología Celular

Una célula animal típica mide entre 10-20 μm de diámetro, lo cual es aproximadamente la quinta parte de la partícula mas pequeña visible por el ojo humano. Cuando buenos microscopios estuvieron disponibles, a comienzos del siglo 19 se descubrieron que los todos los tejidos de las plantas y de los animales eran agregados de células individuales. Este descubrimiento propuesta como la “doctrina celular” por Schleiden y Schwann en 1838 marco el nacimiento formal de la biología celular [16].

Las células animales no son solamente pequeñas, tampoco tienen color y son translucidas. Consecuentemente, el descubrimiento de su estructura interna dependió del desarrollo, en la última parte del siglo IXX, de una variedad de técnicas que ofrecían suficiente contraste para hacer dicha estructura visible. En la figura 4, cada diagrama muestra una imagen magnificada por un factor de 10 en una imaginaria progresión desde la imagen de un dedo, a través de las células de la piel, al ribosoma, hasta una agrupación de átomos que forman parte una de las muchas proteínas de nuestro cuerpo.

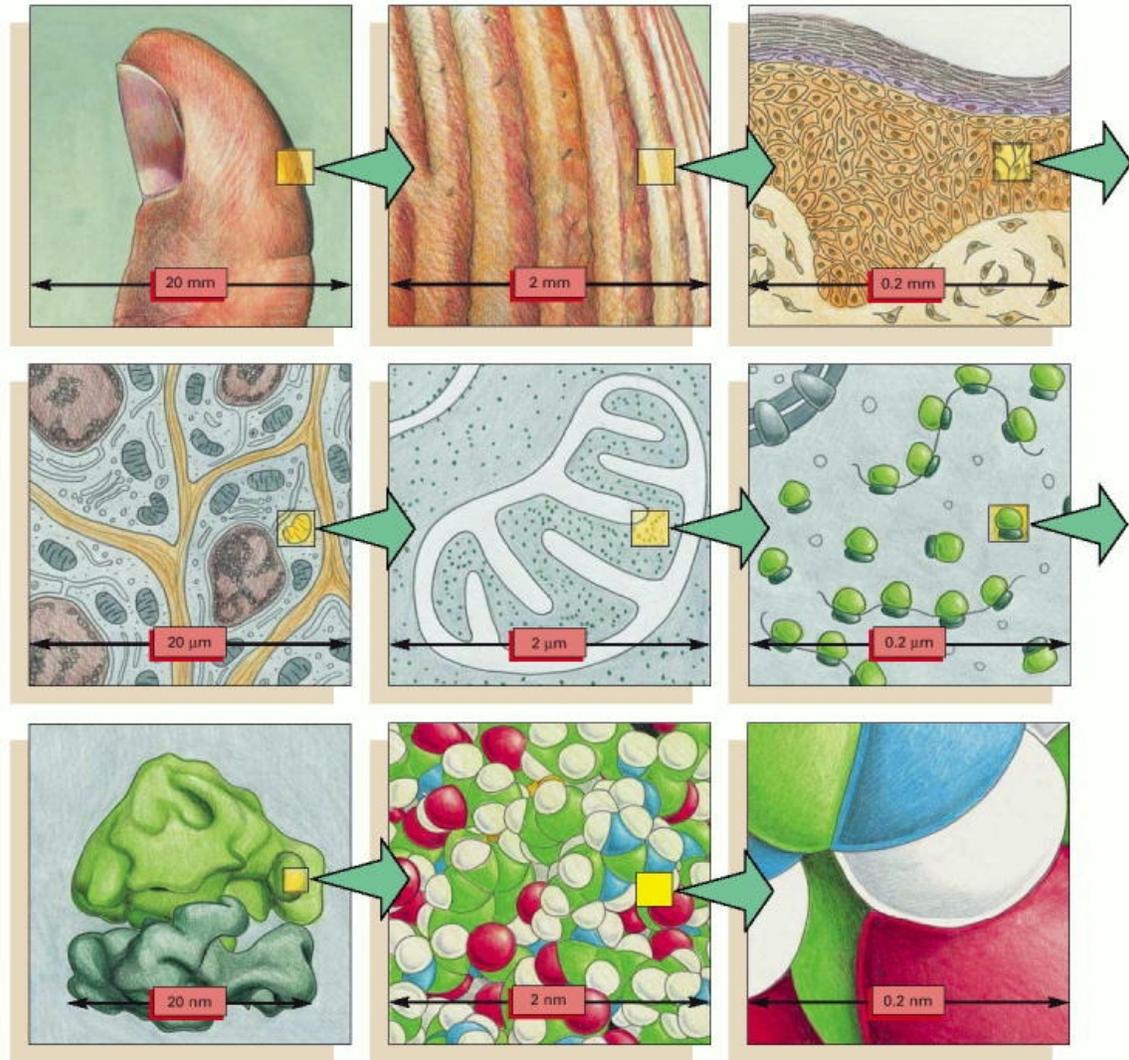


Figura 4. Escala entre células vivas y átomos. [16].

De manera general, los microscopios ópticos no pueden utilizar luz visible para observar los detalles de la estructura menores a su longitud de onda. Esta es una limitación fundamental de todos los microscopios. Por lo tanto, el límite de resolución de un microscopio de luz visible viene dado por la longitud de onda de la luz visible la cual se encuentra entre 400 nm y 700 nm. En términos prácticos, una bacteria o una mitocondria,

que miden aproximadamente entre 20 -0.5 μm , son generalmente los objetos más pequeños que pueden observarse en un microscopio óptico.

VI.2 Microscopía Óptica

Los microscopios son instrumentos designados para producir una magnificación visual de objetos pequeños.

Un microscopio debe ser capaz de: (1) producir una imagen magnificada de un espécimen, (2) en la que se puedan observar los detalles en la imagen, y (3) que sean visibles para el ojo humano o una cámara adaptada a este. Estas características se pueden obtener con instrumentos que no solamente utilizan múltiples lentes con objetivos y condensadores, sino también por instrumentos que utilizan una lente única.

El microscopio ilustrado en la figura 5 es un microscopio simple compuesto inventado por el británico Robert Hooke en la década de 1660. Este microscopio tiene una lente de objetivo cerca de la muestra y se enfoca girando el cuerpo del microscopio para acercar o alejar el objetivo de la muestra. Se inserta una lente ocular en la parte superior del microscopio y, en muchos casos, hay una "lente de campo" interna dentro del cilindro para aumentar el tamaño del campo de visión. El microscopio de la Figura 5 se ilumina a través de la lámpara de aceite y el depósito esférico lleno de agua. La luz de la lámpara se difunde cuando pasa a través del depósito y luego se enfoca en la muestra con una lente colocada en el depósito. Este primer microscopio sufría de aberraciones cromáticas (y esféricas), y todas las imágenes vistas con luz blanca contenían "halos" que eran de color azul o rojo.



Figura 5. Microscopio de Robert Hooke [17]

VI.2.1 El Ojo Humano

Nuestros ojos son capaces de distinguir el color en la porción visible del espectro de la luz: de violeta a azul a verde a amarillo a naranja a rojo; el ojo no puede percibir los rayos ultravioleta o infrarrojos. El ojo también es capaz de detectar diferencias de brillo o intensidad que van del negro al blanco y todos los tonos de gris intermedios. Por lo tanto, para que una imagen sea vista por el ojo, la imagen debe presentarse al ojo en colores del espectro visible y / o grados variables de intensidad de luz. Los receptores oculares de la retina que se utilizan para detectar el color son las células llamadas conos; las células para distinguir los niveles de intensidad, no en color, son las células llamadas bastones. Estas células están ubicadas en la retina en la parte posterior del interior del ojo. La parte frontal del ojo (ver Figura 6), incluido el iris, la córnea curva y el cristalino, son respectivamente los mecanismos para admitir la luz y enfocarla en la retina.

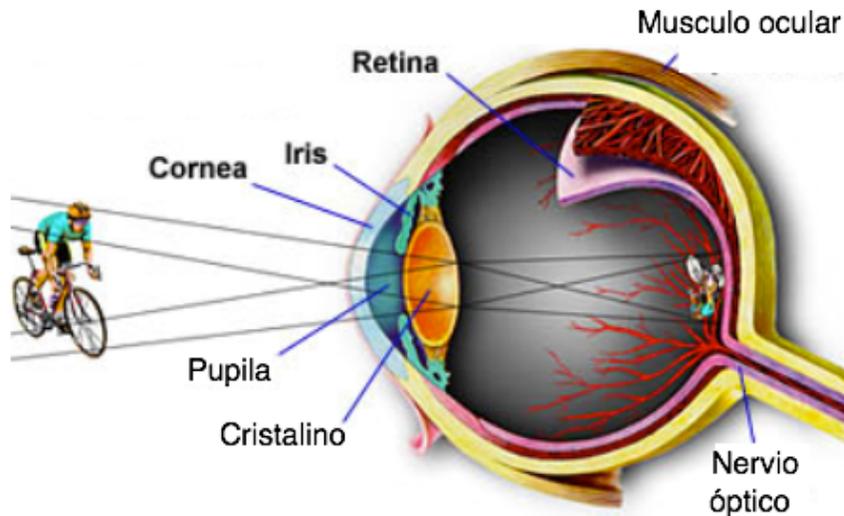
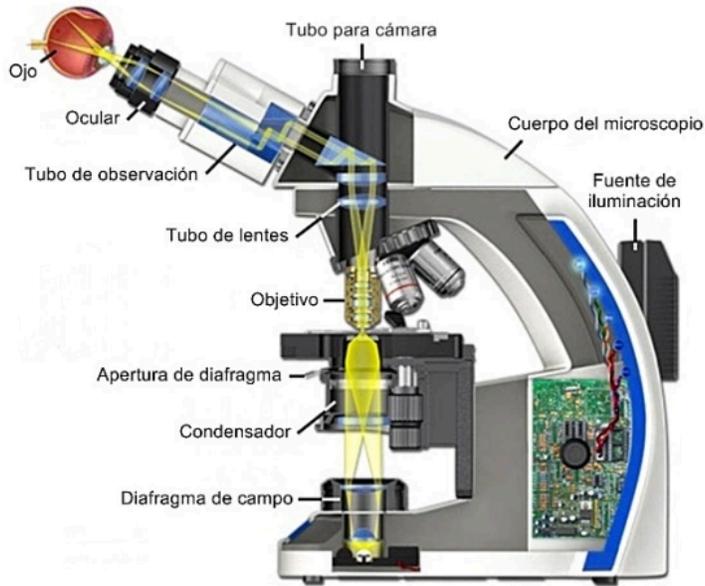


Figura 6. El ojo humano [17]

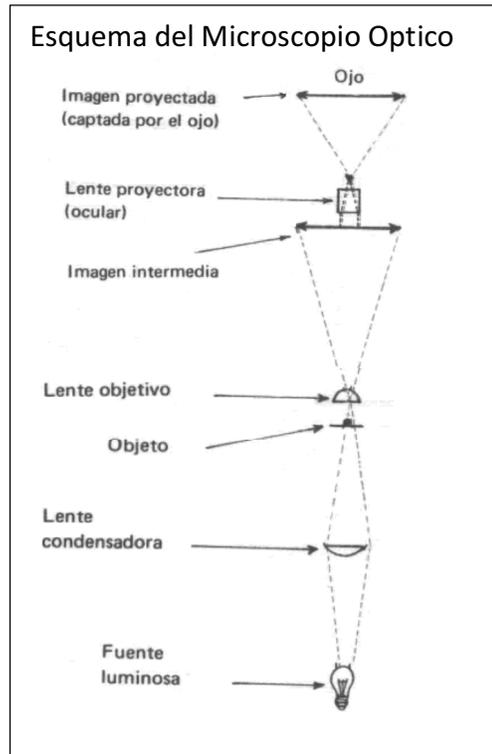
En el ojo humano, el cristalino es una lente biconvexa situada después del iris y delante del humos vitreo la cual permite enfocar los objetos a diferentes distancias en la retina. El cristalino forma una imagen invertida de los objetos que observamos, imagen que es detectada por las células conos y bastones, las cuales llevan la información de las imágenes al cerebro.

VI.2.2 El Microscopio Óptico

Las imágenes de la figura 7 ilustran el interior de un microscopio óptico y el esquema del mismo.



A



B

Figura 7. Esquema de un Microscopio Óptico [18]

En la figura 7 B podemos apreciar el esquema de un microscopio óptico. En la parte inferior tenemos una fuente de luz, posteriormente una lente condensadora cuya finalidad es concentrar la luz de la fuente para poder iluminar la muestra de manera uniforme generando un cono de luz que llega a la muestra. Usualmente las lentes condensadoras tienen un diafragma que ayuda a regular la cantidad de luz que llega a la muestra. Después de la muestra se tiene la lente objetivo que es donde se produce la mayor parte del aumento aportado por el microscopio. La imagen que se puede obtener después del microscopio es una imagen real. Posteriormente los rayos de luz atraviesan

el ocular la cual magnifica la imagen ampliada por la lente objetivo produciendo una imagen virtual que es observada por el usuario del microscopio. El aumento del microscopio viene dado por el producto del aumento del objetivo x aumento del ocular. Finalmente el cristalino del ojo va a enfocar la imagen virtual del ocular en la retina. (ver figura 8)

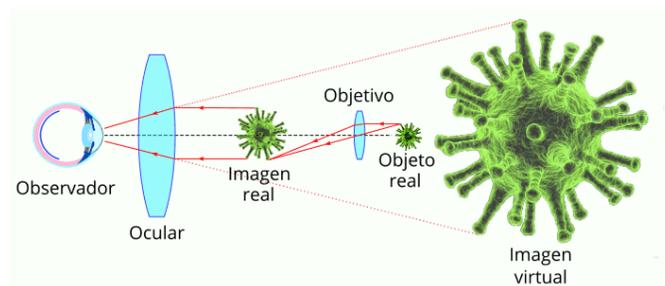


Figura 8. Formación de la imagen virtual por el ocular luego de la lente objetivo en un microscopio. [19]

La figura 7A muestra la estructura interna de un microscopio óptico. Adicionalmente a la lentes descritas en el esquema, los microscopio binoculares disponen de prismas los cuales separan el haz de luz proveniente del objetivo en dos haces hacia cada ocular.

VI.2.3 Aberraciones

Las lentes simples tienen superficies esféricas. Las lentes esféricas están asociadas o producen diversos problemas ópticos llamadas aberraciones, lo cual distorsiona la imagen de diversas maneras. Las principales de estas aberraciones son:

Aberraciones cromáticas,

Las aberraciones cromáticas ocurren debido a que el índice de refracción de las lentes depende de la longitud de onda de la luz visible. Un ejemplo de aberración cromática se aprecia en una foto de la figura 9.

Esta aberración puede reducirse colocando dos lentes juntas en una configuración conocida *doblete acromático* como se muestra en la figura 9 C.

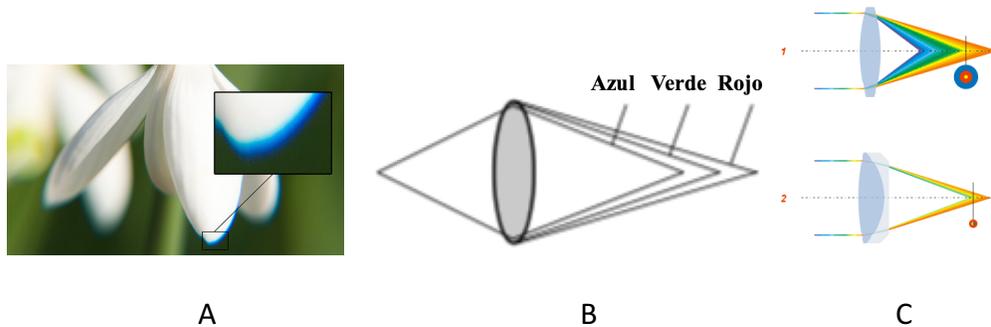


Figura 9. Aberraciones cromáticas, **A.** Fotografía mostrando la aberración cromática, **B.** Variación en el enfoque de distintas longitudes de onda por una lente debido a la aberración cromática, **C.** Ejemplo de corrección de la aberración cromática con una lente compuesta. [20, 21]

Aberraciones esféricas,

Las aberraciones esféricas (Figura 10A) se producen cuando los haces de luz que llegan próximos al eje óptico (rayos paraxiales) de una lente esférica o de un espejo esférico se concentran en un punto y los haces alejados del eje óptico se concentran en otro, a diferencia del caso donde todos los haces se enfocan en un punto, como sería el caso ideal. Este comportamiento es inevitable y se debe a la propia simetría esférica de las lentes o espejos.

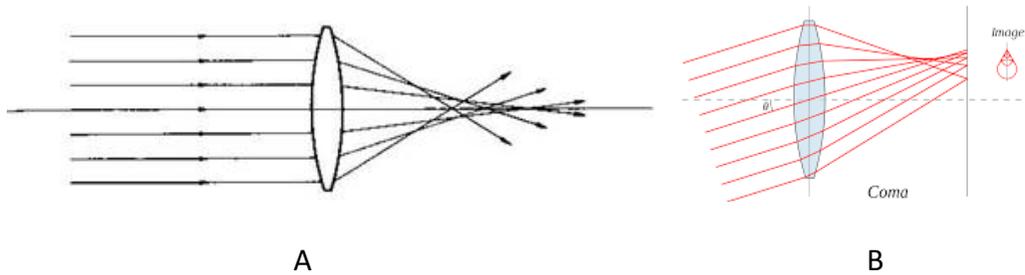


Figura 10. Ejemplos de aberración **A.** esférica y **B.** coma [21, 22]

La aberración esférica puede corregirse de distintas maneras como por ejemplo:

- (1) utilizando un diafragma que impida el paso de los rayos más alejados del eje óptico,
- (2) combinando lentes con efectos opuestos o
- (3) usando superficies parabólicas en lugar de esféricas

Coma,

Este tipo de aberración se parece a la aberración esférica, pero en este caso se produce cuando los haces de luz que llegan desde una fuente de luz no llegan como haces paralelos al eje óptico sino oblicuos (ver figura 10B)

Para corregir el coma se puede utilizar combinaciones de lentes o/y diafragmas.

Astigmatismo,

El astigmatismo es una aberración que se observa cuando la lente enfoca planos distintos (por ejemplo el plano vertical o el horizontal) a distintas distancias (figura 11) Ello se debe a que la lente presenta distintas curvaturas para distintos planos.

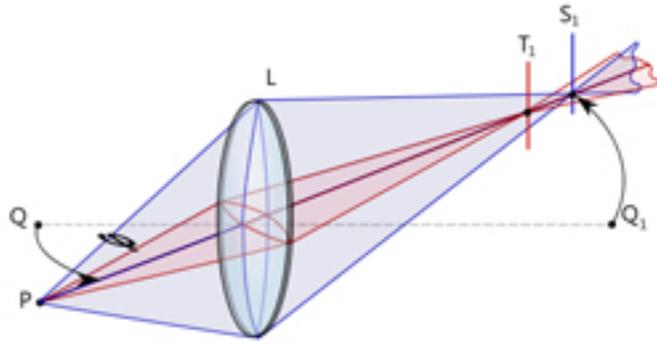


Figura 11. Ejemplo de astigmatismo [23]

Curvatura del campo,

La curvatura de campo es un tipo de aberración que se produce cuando un objeto plano proyecta una imagen curva (no plana). Ver figura 12.

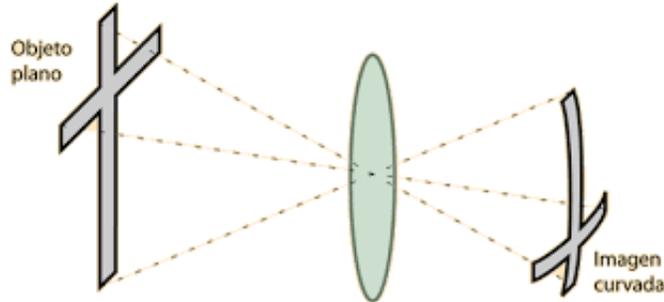


Figura 12. Ejemplo de la aberración curvatura de campo [24]

Distorsión,

Adicionalmente a las distorsiones producidas por las imperfecciones en las lentes, algunas distorsiones se producen a partir de la geometría de la lente. En las figuras siguientes se pueden ver las distorsiones de barril (distorsión positiva) y de cojín (distorsión negativa)

formadas en un gruesa lente de vidrio doble convexa (figura 13). Ellas son la razón de la limitación práctica en el aumento alcanzable por una lupa simple.



Figura 13. Ejemplo de distorsión positiva y negativa

Como se ha mencionado líneas arriba, las medidas correctivas en estos tipos de aberraciones incluye la utilización de mas de una lente (lentes compuestos), incorporación de lentes esféricas, y otros métodos. Los lentes objetivo están diseñados para corregir las aberraciones, pero nunca pueden removerlas completamente.

VI.2.4 Resolución

Para objetos puntuales luminosos (microscopia de fluorescencia, microscopia de campo oscuro) o para puntos no luminosos que son examinados por microscopia de campo brillante en luz transmitida donde la apertura numérica del condensador es mayor a la apertura numérica del objetivo, el poder de resolución del microscopio [12] está definido como:

$$d = 0.61 \lambda / AN \quad (\text{Eq. 1})$$

Donde d es la mínima distancia que se puede resolver en unidades de micras, y AN es la apertura numérica de la lente objetivo [12].

En el caso de un microscopio de campo brillante, donde NA del condensador $<$ NA objetivo)

$$d = 1.22 \lambda / (AN \text{ condensador} + AN \text{ objetivo}) \quad (\text{Eq. 2})$$

Estas ecuaciones describen el criterio de Rayleigh (figura 14) para la resolución de dos puntos de difracción muy cercanos. Por este criterio, dos objetos adyacentes se definen como bien resueltos si el punto central de difracción de uno de los puntos coincide con el primer mínimo de difracción del otro punto en el plano de la imagen.

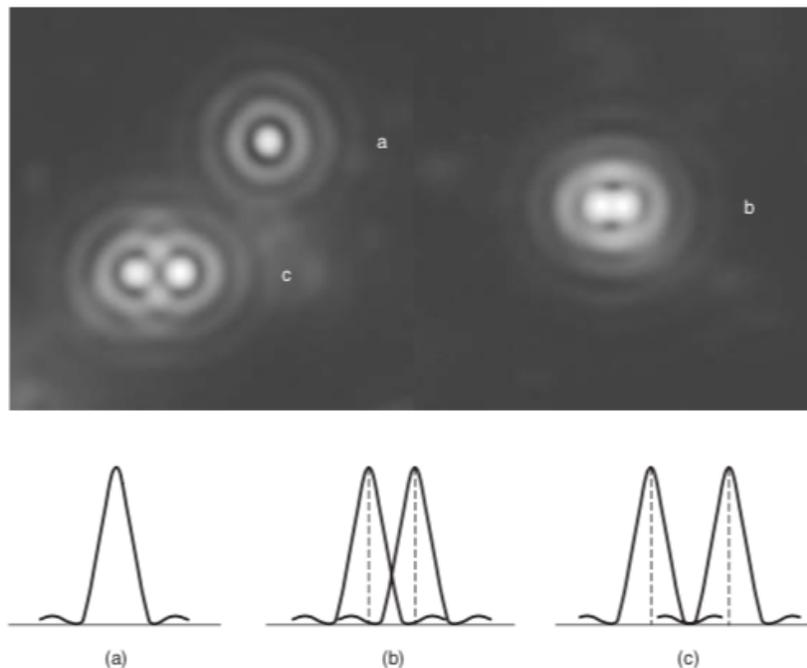


Figura 14. Criterio de Rayleigh de resolución espacial [25].

VI.3. Fluorescencia

La fluorescencia es la emisión de luz por una molécula o átomo que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética. Es una forma de luminiscencia.

De esta manera un electrón de la molécula es excitado al absorber la energía de un foton incidente (hf) realizando con ello la molécula una transición a un estado excitado. (ver figura 15). Posteriormente el sistema regresa a un estado inferior o regresa al estado fundamental con la emisión de espontánea de uno o más fotones. La radiación así emitida se denomina fluorescencia.

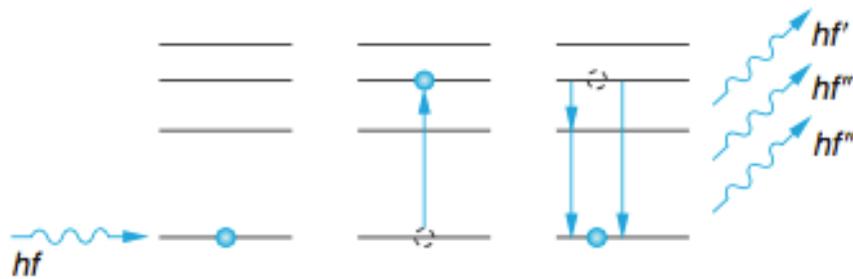


Figura 15. Excitación y emisión de fotones por fluorescencia [26]

Los materiales fluorescentes dejan de brillar casi inmediatamente cuando se detiene la fuente de radiación, a diferencia de los materiales fosforescentes, que continúan emitiendo luz durante algún tiempo después.

La fluorescencia tiene muchas aplicaciones prácticas, que incluyen mineralogía, gemología, medicina, sensores químicos (espectroscopia de fluorescencia), etiquetado fluorescente, tintes, detectores biológicos, detección de rayos cósmicos, pantallas fluorescentes al vacío y tubos de rayos catódicos.

El fenómeno de fluorescencia se conoce desde la mitad del siglo IXX. George Gabriel Stokes fue uno de los científicos que observó que el mineral *fluorspar* florece cuando le incide luz ultravioleta, el acuñó el nombre “fluorescencia”. Stokes observó que la luz de fluorescencia tiene una longitud de onda mayor que aquella de la luz de excitación.

La Figura 16 muestra una representación de la región de la luz visible de la radiación electromagnética, la cual cubre un rango de longitudes de onda desde aproximadamente 400nm hasta 700nm de longitud de onda de la radiación electromagnética. En los límites de esta región visible se encuentra la luz ultravioleta (aproximadamente menor a 400nm) y la luz infrarroja (aproximadamente mayor a 700nm)

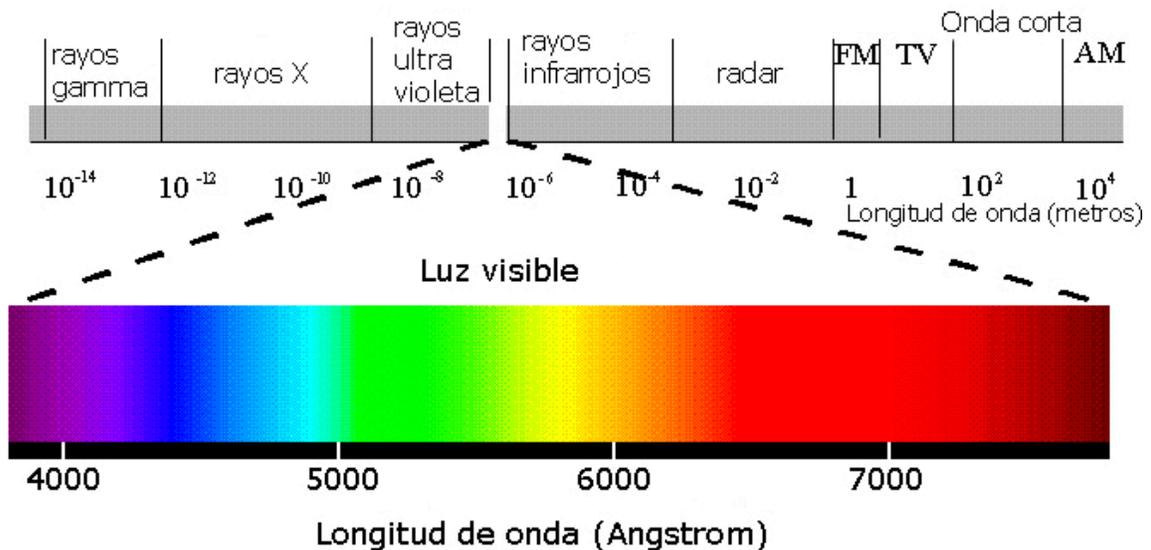


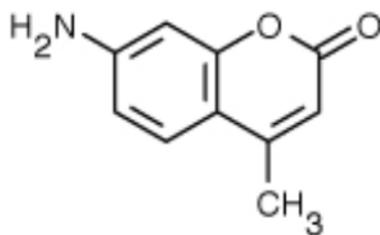
Figura 16. Espectro de la Luz Visible [27]

La microscopia de fluorescencia es un excelente método para estudiar materiales que

pueden florecer, los cuales pueden encontrarse puros o junto a otros compuestos haciendo una muestra compleja de estudio. Se puede estudiar estos compuestos en su forma natural (estudiando así su auto fluorescencia) o cuando son tratados con compuestos químicos que pueden darle fluorescencia. El microscopio de fluorescencia fue ideado en el siglo XX gracias a los científicos Köehler, Reichert, y Lehman. Sin embargo, el potencial de este instrumento fue observado varias décadas después.

VI.3.1. Fluoróforos

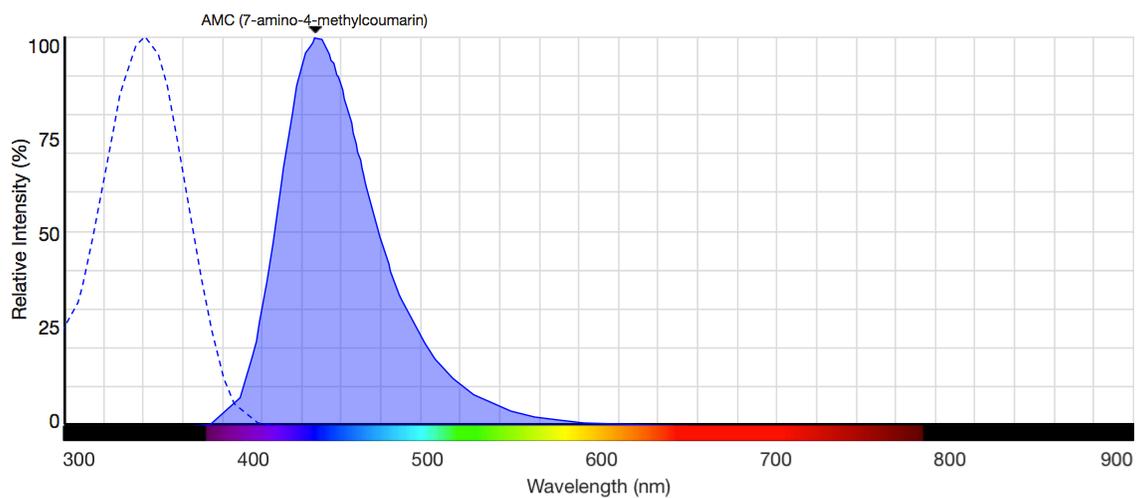
Fluoróforos son pigmentos que se unen a material orgánica. Estos fluorocromos son capaces de absorber y re-irradiar luz. Usualmente su union a una molecula blanco es altamente especifica y tienen un rendimiento significativo respecto a su razon de absorción/emisión, lo cual los hace muy valiosos en aplicaciones biológicas. La figura 17 A y B muestra la estructura (A) así como el espectro de excitación y emisión del fluorocromo 7-amino-4-methylcoumarin (AMC).



A

Fluoróforo	Excitación	Emisión	Filtro Nikon
Allphycocyanin (APC)	630	660	
AMC, AMCAS	345	445	DAPI (UV-2E/C), UV-2A
AMCA(7-Amino-4-methylcoumarin-3-acetic acide)	349	448	DAPI (UV-2E/C), UV-2A
AMCA-X	349	448	DAPI (UV-2E/C), UV-2A
7-AminoactinomycinD(7-AAD)	546	647	CY3 (G-2A), G-1A, TRITC (G-2E/C)

B



C

Figura 17. Fluorocromo AMC (7-amino-4- metilcumarina). **A.** Estructura, **B.** Filtro Nikon para fluorocromo AMC, **C.** Espectro de absorción y de emisión del fluocromo AMC [28].

VI.3.2. Aminoácidos, Proteínas, Enzimas

Las proteínas son polímeros formados por aminoácidos, donde cada residuo de aminoácido está unido a su vecino por específico enlace covalente. (El término residuo refleja la pérdida de elementos del agua cuando un aminoácido se une a otro).

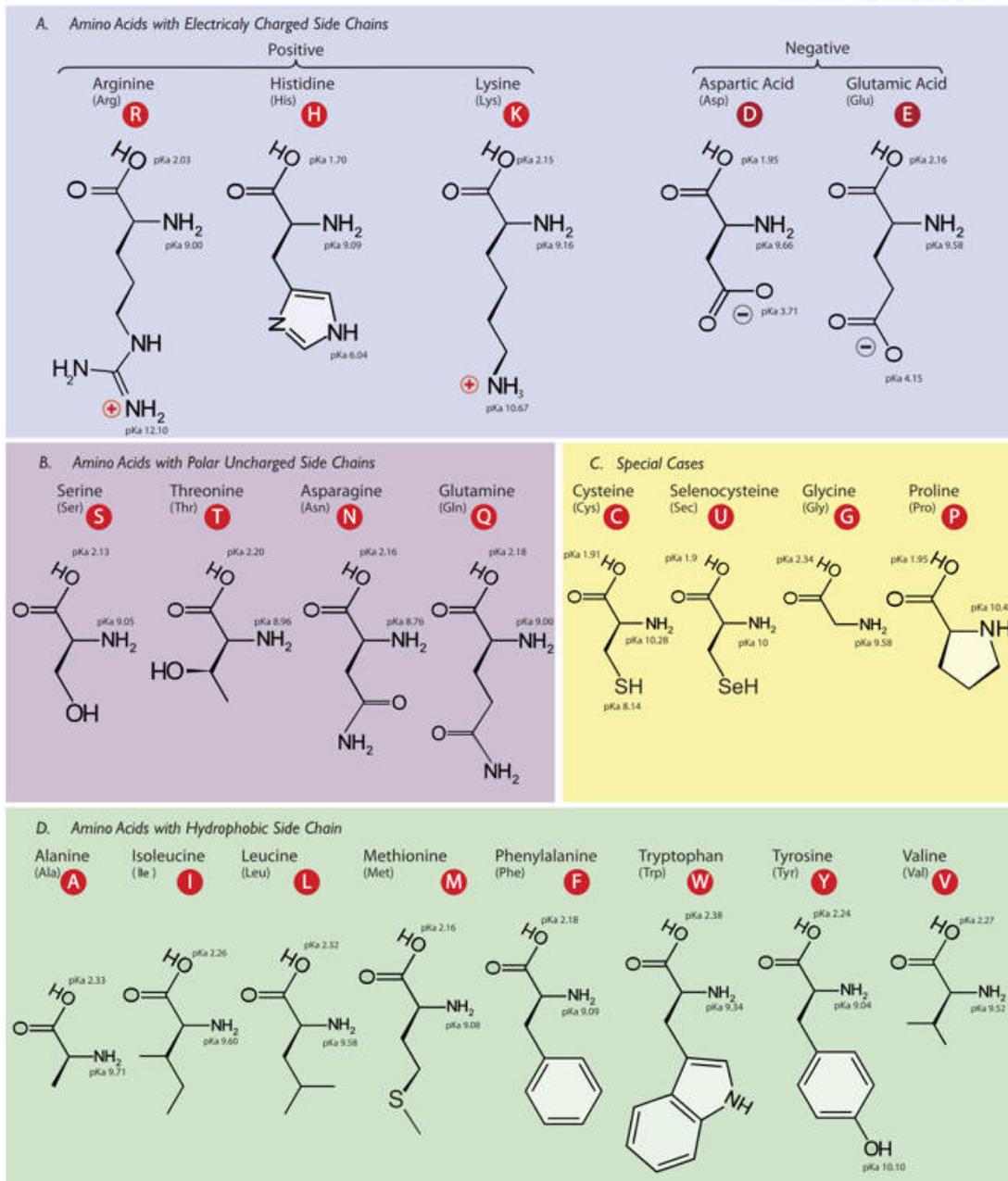


Figura 18. Clasificación de los aminoácidos [29]

Las enzimas son aquellas proteínas que tienen actividad enzimática. No todas las proteínas tienen actividad enzimática.

Las enzimas reciben su nombre dependiendo de su función enzimática. Por ejemplo existen aciltransferasas, proteasa, lipasas, .. etc , estas son, respectivamente, enzimas que catalizan la transferencia del grupo funcional acilo, que rompen enlaces peptídicos de las proteínas y que rompen enlaces de lípidos. Así, debido a diversas enzimas las proteínas pueden también romper sus enlaces o hidrolizarse hacia sus aminoácidos constituyentes.

VI.3.3 Péptidos fluorigénicos

Muchas proteasas rompen enlaces peptídicos en las proteínas ubicados entre residuos específicos, así se puede hablar de “substratos de las enzimas” (de las proteasas en este caso).

Cuando se conoce las secuencias de aminoácidos que una proteasa específica puede degradar, se puede conseguir comercialmente péptidos que contenga dicha secuencia específicas. Un péptido es una secuencia corta de aminoácidos. Diversos péptidos substratos de proteasas se pueden adquirir comercialmente, viniendo estos unidos a un fluoróforo. En estos sistemas, el fluoróforo aumenta considerablemente su fluorescencia cuando la proteasa degrada el péptido. Existen comercialmente diferentes péptidos

conteniendo secuencias substratos de diferentes proteasas unidos a fluoróforos, de tal manera de que uno puede evaluar diferentes substratos fluorogénicos con una proteasa desconocido para determinar el tipo de proteasa bajo estudio.

En esta tesis se ha utilizado el substrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC, cuya estructura se muestra en la figura 19. Los espectros de absorción y emisión del fluoróforo AMC se muestra líneas arriba en la figura 17C.

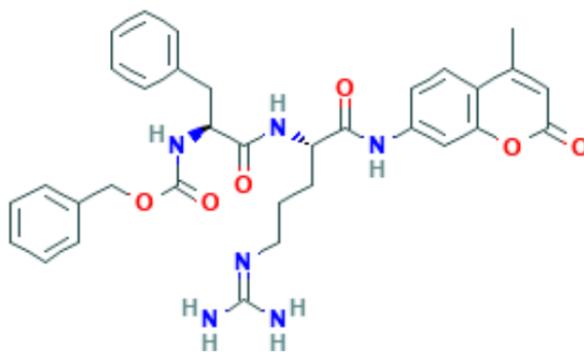


Figura 19. Estructura del substrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC [30]

VI.3.4 Microscopio de Fluorescencia

Un microscopio de fluorescencia busca irradiar una muestra a estudiar con una luz denominada de excitación. Por ello, los microscopios de fluorescencia disponen de filtros de luz adecuados sobre la luz que incide sobre la muestra, limitando así los rangos de longitudes de onda de la luz que inciden sobre la muestra bajo estudio. La luz que es transmitida por este primer filtro e incide sobre la muestra se denomina luz de excitación. El tipo de filtro a utilizar depende del compuesto fluorescente presente dentro de la

muestra bajo estudio. Al hacer incidir la luz de excitación sobre la muestra bajo estudio, el compuesto fluorescente generará una emisión de luz de fluorescencia. El microscopio de fluorescencia debe permitir separar la luz (usualmente de baja intensidad) de fluorescencia emitida por el compuesto fluorescente de la intensa luz de excitación, de tal manera de que solamente la luz emitida llegue al detector. Para obtener ello, los microscopios de fluorescencia utilizan un segundo filtros de luz en el camino óptico después de la muestra y antes de la lente objetivo.

Al utilizar este instrumento, se busca generalmente que la imagen resultante sea un área de fluorescencia brillante sobre un fondo negro con suficiente contraste para permitir su detección. Se considera de que mientras mas oscuro sea el fondo de la imagen obtenida mas eficiente es el microscopio de fluorescencia.

La Figura 20 presenta un esquema simple de la detección de fluorescencia de un compuesto utilizando una fuente de radiación UV y dos filtros de luz. Estos filtros aseguran la calidad de la imagen de la imagen de fluorescencia obtenida por un microscopio de fluorescencia.

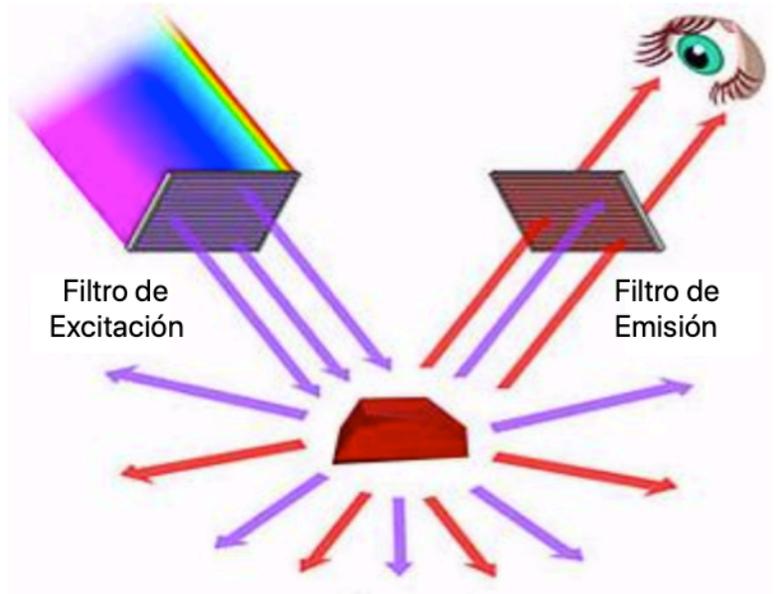


Figura 20. Observación de la fluorescencia de un compuesto utilizando una fuente de luz UV [31].

La microscopía de luz por reflexión es referida como de luz incidente, epi-iluminación o microscopía metalúrgica. Es también el método que se escoge para la fluorescencia. La muestra que se utiliza para ser visualizada con esta técnica suele ser opaca por lo que la luz no es capaz de pasar por este espécimen, por lo que la luz incide en la superficie y eventualmente retorna al microscopio objetivo por reflexión difusa o especular. Existen también microscopio de luz por transmisión, donde la luz atraviesa una muestra transparente a la luz dejando observar su forma y detalles.

La figura 21 muestra el esquema de un microscopio de fluorescencia, donde se muestra la posición de los filtros de excitación y de emisión, así como el espejo dicróico, las lentes y la posición de la muestra. La luz UV de la fuente de luz de este microscopio es la fuente de luz de excitación usual para el análisis de muestras con este microscopio.

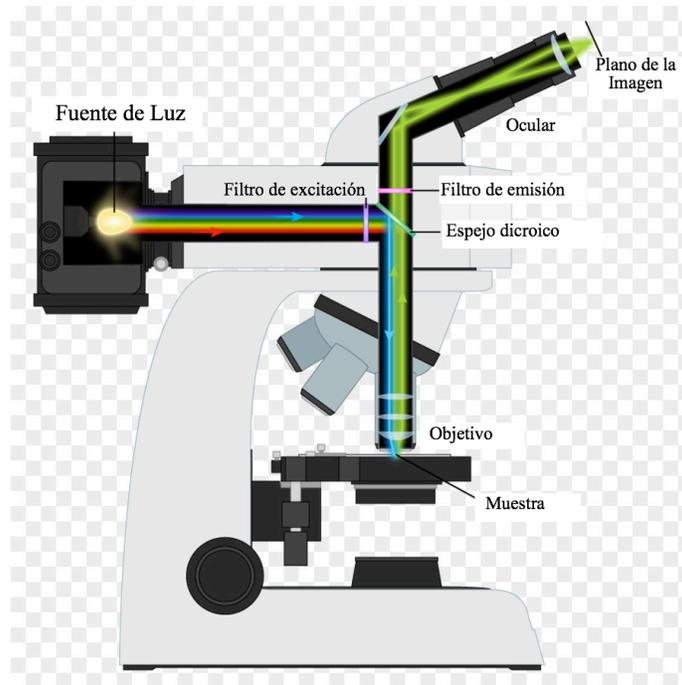


Figura 21 . Microscopio de fluorescencia [32]

En este instrumento, la longitud de onda que se utilizará para excitar los fluoróforos de la muestra es filtrada por el filtro de excitación el cual es reflejado en el espejo dicróico y llega a la muestra. En la muestra esta luz excita los fluoróforos, los cuales emitirán por fluorescencia otra longitud de onda de luz de menor energía. Esta luz emitida atraviesa el espejo dicróico y es filtrada por el filtro de emisión, para luego llegar a la lente objetivo y formar la imagen de la muestra.

El espejo dicróico mencionado es usualmente un “*beam splitter*” que tiene una superficie semi-reflectora, que permite la separación del haz incidente sobre la muestra y deja pasar al haz emitido por la muestra. Usualmente este “*beam splitter*” está acoplado con los filtros de excitación y de emisión, los cuales son adecuados a la longitud de onda de

excitación y emisión del fluoróforo con el que se va a trabajar, haciendo las eficiente la toma de imágenes.

En esta tesis se ha utilizado un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse con un cubo filtro Nikon UV-2E/C cuyas características se muestran en la figura 22 . Los espectros de longitudes de onda de excitación y emisión con que permite trabajar este filtro se muestra a continuación:

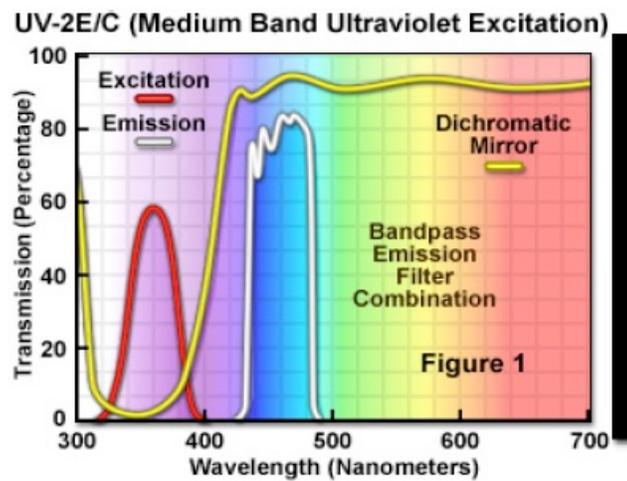


Figura 22. Características del filtro Nikon UV-2E/C para microscopios de fluorescencia [33]

VI.3.5 Componentes ópticos del Microscopio de Fluorescencia

VI.3.5.1. Fuente de Luz

Como fuente de luz UV para obtener las imágenes se suele utilizar lámparas de mercurio o lámparas de Xenon, las cuales suelen ser conectadas a una fuente de poder de voltaje DC. El microscopio con el que se desarrollo esta tesis utilizo una lámpara de mercurio.

VI.3.5.1.1. Lámpara de vapor de mercurio.-

Una lámpara de vapor de mercurio es una lámpara de descarga de gas que utiliza un arco eléctrico a través del mercurio vaporizado para producir luz. La descarga del arco generalmente se limita a un pequeño tubo de arco de cuarzo fundido montado dentro de un bulbo de vidrio de borosilicato más grande. El bulbo exterior puede ser transparente o estar revestido con fósforo; en cualquier caso, la bombilla exterior proporciona aislamiento térmico, protección contra la radiación ultravioleta que produce la luz y un montaje conveniente para el tubo de arco de cuarzo fundido.

Las lámparas de mercurio transparente producen luz blanca y adicionalmente tienen las líneas espectrales del mercurio.

La figura 23 muestra el espectro de emisión visible de una lámpara de mercurio :

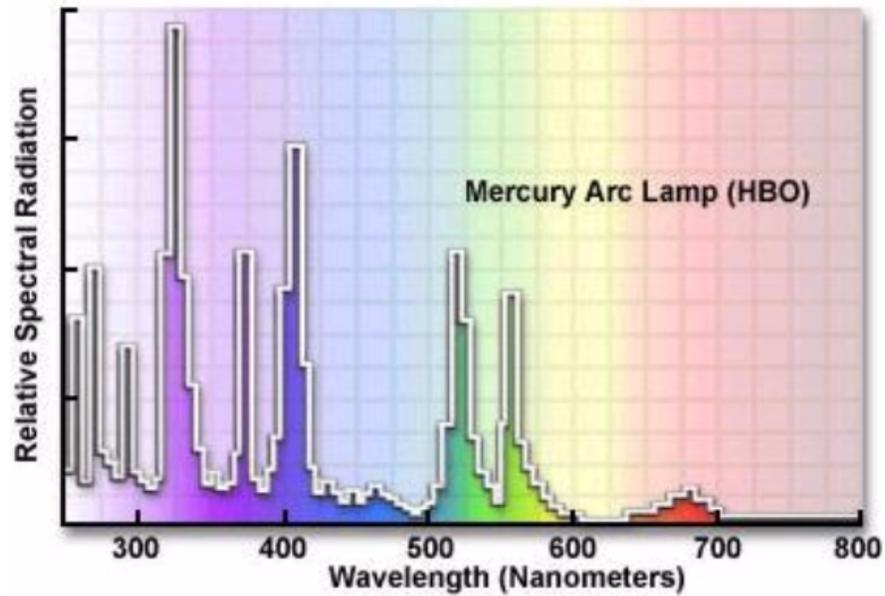


Figura 23. Espectro de emisión de una lámpara de mercurio [31].

VI.3.5.2. Cubos filtro

Básicamente, existen tres categorías de filtros: (1) filtros de excitación, (2) filtros de barrera y (3) divisores de haz dicromáticos (espejos dicróicos) que generalmente se combinan para producir un cubo de filtro similar al que se ilustra en la siguiente figura:

Filtros de excitación.- Los filtros de excitación permiten que solo las longitudes de onda seleccionadas de la luz que ilumina la muestra pasen hacia esta.

Filtros de barrera.- Los filtros de barrera son filtros que están diseñados para suprimir o bloquear (absorber) las longitudes de onda de excitación y permitir que solo determinadas longitudes de onda de emisión pasen hacia el ojo u otro detector.

Mejorando así la calidad de la imagen obtenida finalmente con la luz de emisión de la muestra.

Divisores de haz dicromáticos.- Los divisores de haz dicromáticos (espejos dicróicos) son filtros especializados que están diseñados para reflejar de manera eficiente las longitudes de onda de excitación y las longitudes de onda de emisión que pasan por el filtro. Se utilizan en iluminadores de fluorescencia de luz reflejada y se colocan en la trayectoria de la luz después del filtro excitador pero antes del filtro de barrera. Los divisores de haz dicromáticos están orientados en un ángulo de 45 grados con la luz que pasa a través del filtro de excitación y en un ángulo de 45 grados con el filtro de barrera como se ilustra en la figura 24. Las curvas del filtro (su espectro de emisión) muestran usualmente el porcentaje de transmisión versus las longitudes de onda de la luz.

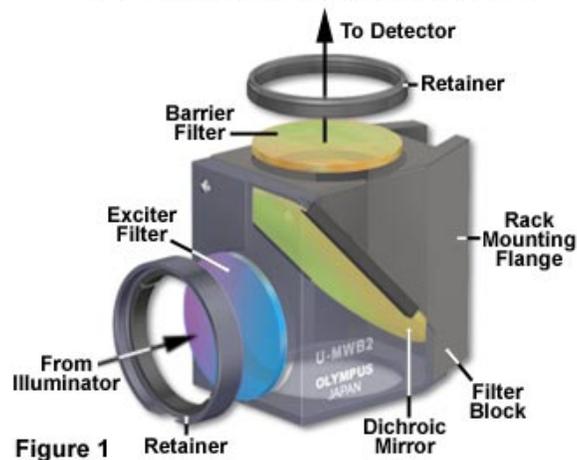


Figura 24. Cubo de filtro de fluorescencia [34]

Estos filtros están diseñados para pasar o rechazar longitudes de onda de luz con gran selectividad y alta transmisión. La mayoría de los filtros excitadores actuales son del tipo de interferencia; algunos filtros de barrera también son, para necesidades especiales, del tipo de interferencia. Los divisores de haz dicromáticos son filtros de interferencia especializados. En algunos casos, los filtros que dejan pasar bajas longitudes de onda (SP, del inglés short pass) y los que dejan pasar largas longitudes de onda (LP, del inglés long pass) se combinan para estrechar la banda de longitudes de onda que atraviesan dicha combinación. (ver figura 25). Estos filtros están diseñados para pasar o rechazar longitudes de onda de luz con gran selectividad y alta transmisión. La mayoría de los filtros de excitación actuales son del tipo de interferencia; algunos filtros de barrera también son, para necesidades especiales, del tipo de interferencia. Los divisores de haz dicromáticos son filtros de interferencia especializados. A veces, los filtros SP y los LP se combinan para estrechar la banda de longitudes de onda que atraviesan dicha combinación.

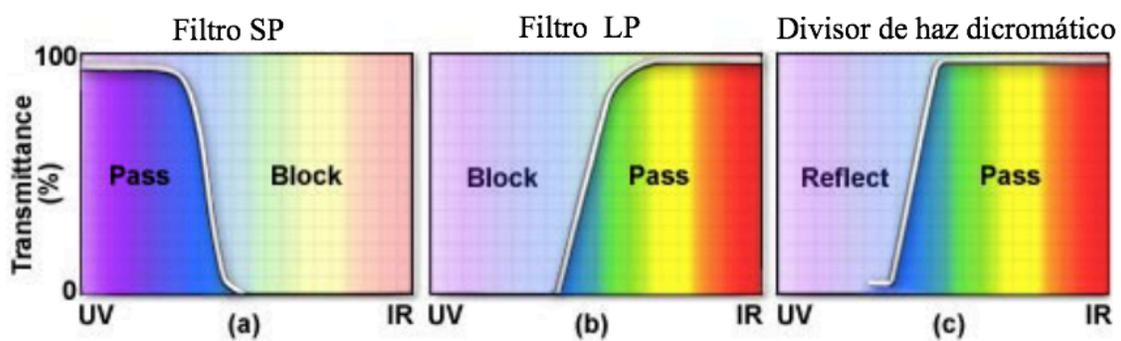


Figura 25. Transmitancia de los Filtros de Fluorescencia. **A.** Filtros SP, **B.** Filtros LP, **C.** Divisor de haz dicromático. [34]

VI.4 Celda Peltier

VI.4.1. Efecto Seebeck y Efecto Peltier

Durante los inicios del siglo XIX, Thomas Seebeck y Jean Peltier,- descubrieron el fenómeno que es la base actual para la industria termoeléctrica actual. Seebeck encontró que si se coloca un gradiente de temperatura a través de dos uniones de dos conductores distintos, fluirá una corriente. Por otro lado, Peltier aprendió que haciendo circular corriente a través de dos conductores eléctricos distintos se genera calor el cual puede ser emitidos o absorbido por la unión de los materiales. Estos fenómenos se conocen como efecto Seebeck y efecto Peltier, respectivamente.

Efecto Seebeck.- En el efecto Seebeck se observa que en un circuito formado por dos conductores homogéneos A y B, con sus dos uniones a diferente temperatura (T y $T_2 = T + \Delta T$) como se muestra en la figura 26 B, aparece una corriente eléctrica J . Por otro lado, si este circuito esta abierto , como se muestra en la figura 26A, aparecerá una fuerza termoelectromotriz (ftem) E_{AB} que depende de los metales utilizados en la unión y de la diferencia de temperatura (ΔT) entre ambas uniones.

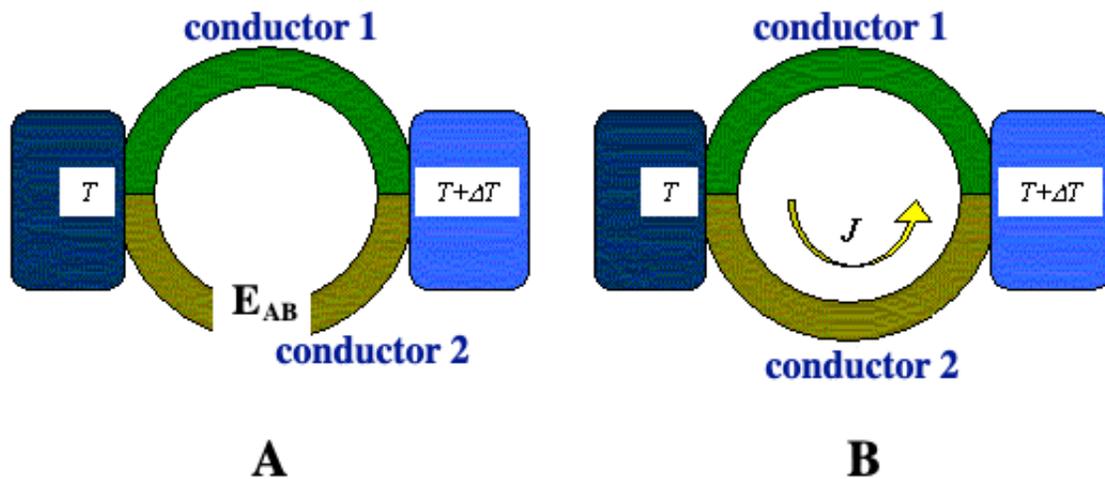


Figura 26. Efecto Seebeck [35]

La relación entre la fem, E_{AB} y la diferencia de temperaturas entre las uniones, ΔT , define el coeficiente de Seebeck, α_{AB} [36]:

$$\alpha_{AB} = \frac{dE_{AB}}{dT} = \alpha_A - \alpha_B \quad (\text{Eq 3})$$

Donde α_A y α_B , son las potencias termoeléctricas absolutas de los metales A y B respectivamente y son características de cada uno de ellos. α_{AB} depende realmente de la temperatura T (ver figura 26).

Efecto Peltier.- En el efecto Peltier consiste en el enfriamiento o calentamiento de una de las uniones entre dos conductores distintos debido al paso de por ella una corriente eléctrica, lo cual depende de ambos conductores y de la temperatura inicial de la unión.

La potencia calorífica intercambiada en la unión entre A y B es [37] :

$$\dot{Q}_P = \pm \pi_{AB} J = \pm J T (\alpha_B - \alpha_A) \quad (\text{Eq 4})$$

Donde π_{AB} se denomina coeficiente Peltier, Y se define como el calor intercambiado entre las uniones A y B por unidad de tiempo y de corriente que circula a través de la misma.

π_{AB} viene descrito por la siguiente ecuación:

$$\pi_{AB} \equiv \frac{\dot{Q}_P}{\int_S J \cdot dS} = T (\alpha_B - \alpha_A) \quad (\text{Eq 5})$$

Donde J es el flujo de corriente, S es la superficie, T es la temperatura absoluta y α_{AB} y α_{AB} son las potencias termoeléctricas absolutas de los materiales A y B respectivamente.

VI.4.2. Celda Peltier

Actualmente, la industria puede producir módulos termoeléctricos o módulos Peltier capaces de calentar o enfriar su superficie en función de la corriente que circule por ellos.

Muchos de estos sistemas pueden generar corriente útil a partir de fuentes de calor.

Las aplicaciones de estos módulos Peltier son incontables, se han utilizado por ejemplo en equipos médicos [38, 39], sensores [40], circuitos integrados de enfriamiento [41], aplicaciones en automóviles y aplicaciones militares.

Como se describió líneas arriba, la termoelectricidad fue descubierta por Seebeck en el siglo XIX. Las investigaciones modernas en termoelectricidad (TE) se iniciaron con la

observación de Ioffe [42] sobre que semiconductores dopados eran los mejores termoeléctricos.

Un módulo Peltier está compuesto principalmente de dos materiales semiconductores, uno denominado tipo P y otro tipo N, unidos entre sí por una lámina conductora, usualmente de cobre. Dependiendo de la polaridad del voltaje de alimentación una de las caras de la celda Peltier se calienta y la otra se enfría.

VI.5. Termografía

Radiación térmica.- La radiación térmica es emitida por todos los objetos cuya temperatura se encuentra sobre el cero absoluto medido en Kelvin (-273.15°C).

En general un objeto caliente (lo que significa que no está en el cero absoluto) va a distribuir su emisión sobre un rango de longitudes de onda en un espectro continuo, lo cual se conoce como *Radiación de cuerpo negro* (figura 27)

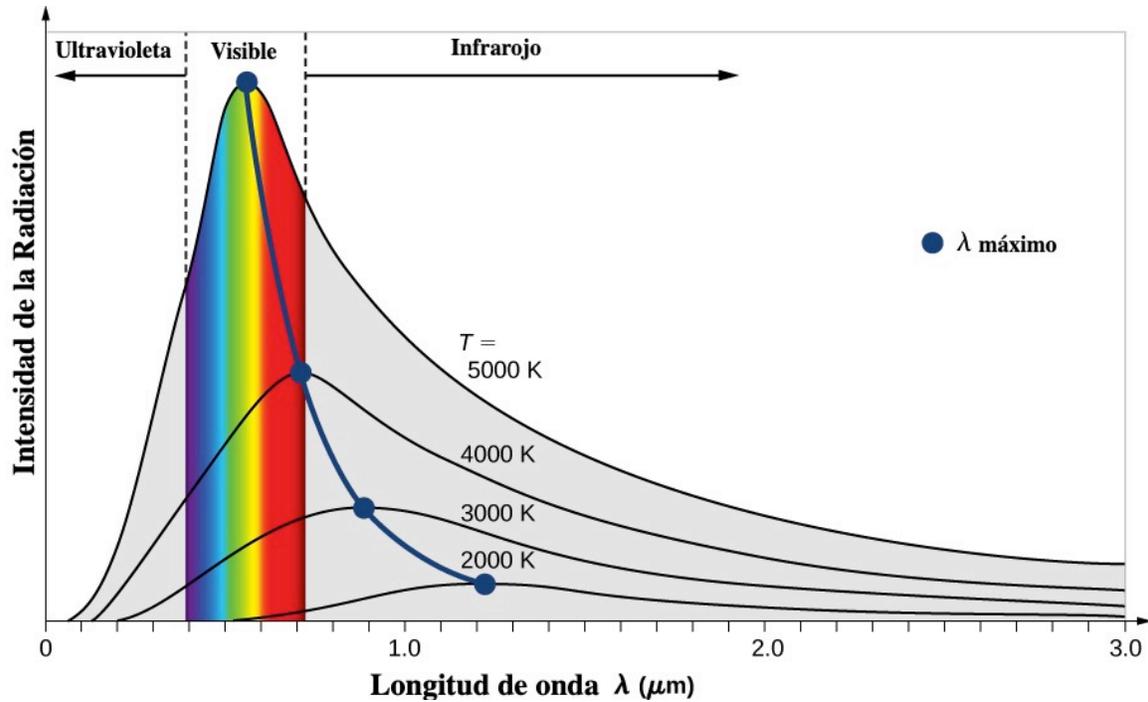


Figura 27. Intensidad de la radiación de cuerpo negro versus la longitud de onda de la radiación emitida [43]

Imágenes infrarrojas térmicas.-

Los detectores de radiación infrarroja térmica pueden ser divididos en 2 clases: detectores cuánticos y detectores térmicos. En un detector cuántico interactúa directamente con el material detector para cambiar la energía de un electrón, mientras que en un detector térmico, la radiación es detectada como resultado de un cambio en las propiedades eléctricas del material debido de un cambio de temperatura. Para esta tesis nos centraremos en los detectores térmicos.

Detectores térmicos.-

Los detectores térmicos ofrecen un muy amplio rango espectral a costa de una menor sensibilidad y mayor tiempo de respuesta. Los tres principales detectores térmicos son: bolómetro termistor, termocuplas y dispositivo piroeléctricos.

El **bolómetro termistor** es un equipo simple que consiste, en esencia de un material (usualmente carbono, germanio o una mistura de óxidos de metales) cuya resistencia varia con la temperatura. Una termocupla utiliza el efecto Seebeck (descrito líneas arriba) para tener una señal eléctrica en función de su temperatura. Un **dispositivo piroeléctrico** es un cristal que redistribuye sus cargas internas en función a su temperatura, produciendo una distribución de cargas en la superficie del cristal lo cual resulta en una diferencia de potencial que puede ser amplificada y detectada.

Imágenes termográficas

En una imagen de termografía se representan por colores o escalas de grises las diferentes temperaturas de un campo de detección dentro de un rango. La siguiente figura muestra un ejemplo de una imagen termográfica. A partir de esta imagen se puede estimar la temperatura en función al color de una imagen. Se puede observar un ejemplo en la figura 28.



Figura 28. Imagen por termografía [44].

VI.5.1. Cámara termográfica Flir ONE

Existen comercialmente diversos modelos de cámaras termográficas, siendo muchos de estos adaptables a celulares móviles como por ejemplo la cámara FLIR ONE, de la marca FLIR, que es la cámara que se ha utilizado en este estudio.

Las características de la cámara FLIR ONE, descritas en la página de la empresa FLIR [45], se detallan a continuación:

Tabla 1. DESCRIPCION GENERAL

Temperatura no operativa	De -20 a 60 °C
Rango dinámico de escena	De -2' a 120 °C
Medidor puntual	OFF/°C/°F. Resolución 0,1°C/0.1 °F
Peso	34,5 g
Dimensiones (Al. x An. x Pr.)	34 x 67 x 14 mm
Teléfono	iOS

Tabla 2. APLICACION

Distancia MSX ajustable	de 0,3 m al infinito
Modos de captura	Video, imagen fija, lapso de tiempo
Formato de archivo	Imágenes fijas - jpeg radiométrico Video - MPEF-4 (formato de archivo: MOV(iOS), MP4(Android))
Paleta	Gris (blanco caliente), más caliente, más frío, hierro, arco iris, contraste, ártico, lava y rueda gris (blanco caliente), más caliente, más frío, hierro, arco iris, contraste, ártico, lava y rueda
Visualización/captura de video e imagen fija	Guardado como 1440 x 1080

Tabla 3. GENERACION DE IMAGENES Y OPTICA

Enfoque	Fijo de 15 cm al infinito
Frecuencia de imagen	8,7 Hz
HFOV/VFOV	50 ^a +-1 ^o / 38 ^o +- 1 ^o
Obturador	o
Resolución térmica	80 x 60

Sensor térmico	Tamaño de pixel 17 um, de 8 a 14 um de rango espectral
Resolución visual	1440 x 1080

Tabla 4. MEDIOAMBIENTAL Y APROBACIONES

Ajustes de emisividad	Mate: 95%, semimate: 80%, semibrillante: 60%, brillante: 30%. La temperatura de fondo reflejada es de 22 °C.
Golpes	caída desde 1,5m
Temperatura operativa	De 0 a 35 °C, carga de batería 0 a 30 °C

Tabla5. RADIOMETRIA

Sensibilidad térmica (MRDT)	150 mK
-----------------------------	--------

Tabla 6. RENDIMIENTO

Precisión	+3°C o +5°C, porcentaje típico de la diferencia entre la temperatura ambiente y de la escena. se aplica 60 segundos tras el inicio cuando la unidad está entre 15 y 35 °C y la escena está entre 5 y 120 °C
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

VI.6. Transferencia de Calor

La transferencia de calor es el proceso del movimiento de energía debido a una diferencia de temperatura. La transferencia de energía que tiene lugar únicamente debido a una diferencia de temperatura se llama **flujo de calor o transferencia de calor**, y la energía transferida de esta manera se llama **calor**.

Normalmente, la pérdida de calor es proporcional a un gradiente de temperatura. La transferencia de calor se puede lograr por conducción, convección o radiación.

Usamos el símbolo Q para la cantidad de calor. Cuando se asocia con un cambio de temperatura infinitesimal dT , lo llamamos dQ . Se encuentra que la cantidad de calor Q requerida para aumentar la temperatura de una masa m de cierto material de T_1 a T_2 es aproximadamente proporcional al cambio de temperatura $\Delta T = T_2 - T_1$. También es proporcional a la masa m del material. Cuando calienta agua para hacer té, necesita el doble de calor para dos tazas que para una si el cambio de temperatura es el mismo. La cantidad de calor necesaria también depende de la naturaleza del material; elevar la temperatura de 1 kilogramo de agua en 1°C requiere 4190 J de calor, pero solo se necesitan 910 J para elevar la temperatura de 1 kilogramo de aluminio en 1°C .

$$Q = mc \Delta T \quad (\text{Eq. 6})$$

c es el calor específico del material.

Los tres mecanismos de transferencia de calor son: conducción, convección y radiación. La conducción ocurre dentro de un cuerpo o entre dos cuerpos en contacto. La convección depende del movimiento de la masa de una región del espacio a otra. La radiación es la transferencia de calor por radiación electromagnética, como la luz solar, sin necesidad de que haya materia presente en el espacio entre los cuerpos.

VI.6.1 Convección

La convección es la transferencia de calor por movimiento de masa de un fluido de una región del espacio a otra. Algunos ejemplos de transferencia de calor por convección incluyen los sistemas de calefacción doméstica de aire caliente y agua caliente, el sistema de enfriamiento de un motor de automóvil y el flujo de sangre en el cuerpo. Si el fluido circula por un soplador o una bomba, el proceso se denomina convección forzada; si el flujo es causado por diferencias de densidad debido a la expansión térmica, como el aire caliente que sube, el proceso se llama convección natural o convección libre (Figura 29).



Figura 29. Transferencia de calor por convección.[26]

VI.6.2. Radiación

La radiación es la transferencia de calor por ondas electromagnéticas como la luz visible, infrarroja y radiación ultravioleta. Ejemplos de radiación son la irradiación del sol y el calor de una parrilla de carbón o las brasas encendidas en una chimenea. La mayor parte del calor de estos cuerpos muy calientes no llega a las personas cercanas por conducción o convección en el aire intermedio, sino por radiación. Esta transferencia de calor ocurriría incluso si no hubiera nada más que vacío entre usted y la fuente de calor.

Cada cuerpo, incluso a temperaturas ordinarias, emite energía en forma de radiación electromagnética. Alrededor de 20° C, casi toda la energía es transportada por ondas infrarrojas con longitudes de onda mucho más largas que las de la luz visible. A medida que aumenta la temperatura, las longitudes de onda cambian a valores más cortos.

La corriente de calor $H = dQ / dt$ debida a la radiación de una superficie A con emisividad e a temperatura absoluta T se puede expresar como :

$$H = A e \sigma T^4 \quad (\text{Eq. 7})$$

VI.6.3 Conducción

Si se sostiene un extremo de una varilla de cobre y coloca el otro extremo en una llama, el extremo que está sosteniendo se calienta cada vez más, aunque no esté en contacto directo con la llama. El calor llega al extremo más frío por conducción a través del material.

A nivel atómico, los átomos de las regiones más calientes tienen más energía cinética en promedio, que sus vecinos más fríos. Empujan a sus vecinos, dándoles algo de su energía. Los vecinos empujan a sus vecinos y así sucesivamente a través del material. Los átomos mismos no se mueven de una región de material a otra, pero sí su energía.

La mayoría de los metales también utilizan otro mecanismo más eficaz para conducir el calor. Dentro del metal, algunos electrones pueden dejar sus átomos originales y deambular por la red cristalina. Estos electrones "libres" pueden transportar energía rápidamente desde las regiones más calientes a las más frías del metal, por lo que los metales son generalmente buenos conductores de calor. La presencia de electrones "libres" también hace que la mayoría de los metales sean buenos conductores eléctricos.

La transferencia de calor ocurre sólo entre regiones que se encuentran a diferentes temperaturas, y la dirección del flujo de calor es siempre de mayor a menor temperatura.

VI.6.3.1 Ley de Fourier

La transferencia de calor por conducción esta gobernada por la Ley de Fourier, la cual nos dice que el flujo de energía (razón de transferencia de energía por unidad de area) es proporcional al gradiente de temperatura.

$$q' \propto \frac{\Delta T}{\Delta x}$$

(Eq. 8)

Donde: $q' = dQ/dt$ es el flujo de calor; ΔT es la diferencia de temperatura en kelvin y x es la dirección en que hay el gradiente de temperatura, que es la dirección de la transferencia de calor. Esta ecuación se puede escribir como:

La figura 30 muestra la transferencia de calor de una región caliente a otra región de menor temperatura a través de la sección de Area A y espesor L. Cuando se transfiere una cantidad de calor dQ a través de dicha área en un tiempo dt, la tasa de flujo de calor es dQ/dt. Esta es la tasa de corriente de calor, denotada por H ($H = dQ / dt$). En el sistema de la imagen XX, la corriente de calor es proporcional al área de la sección transversal A, a la diferencia de temperatura ($T_2 - T_1$) y es inversamente proporcional a la longitud del área A. Introduciendo una constante de proporcionalidad k llamada conductividad térmica del material, tenemos:

$$H = \frac{dQ}{dt} = kA \frac{(T_2 - T_1)}{L} \quad (Eq. 9)$$

Donde k es la conductividad térmica del material; \dot{q} es el calor transferido y A es el área de la sección transversal.

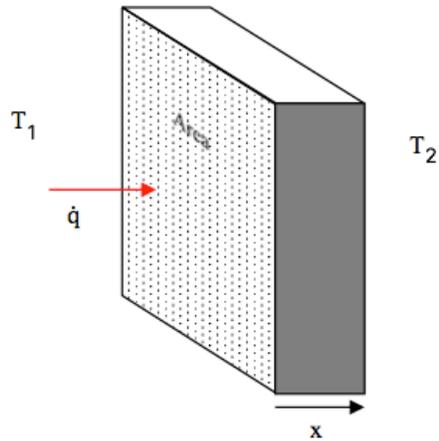


Figura 30. Sección a través de la cual se da la transferencia de calor. [46]

En el desarrollo de la ecuación anterior se han hecho las siguientes asunciones: (1) T_2 está a la misma temperatura en toda el área A ; (2) Se utiliza un área perpendicular a la dirección de la transferencia de calor; (3) x es en la dirección de la región de menor a mayor temperatura (dirección del gradiente de temperatura).

VI.6.3.2 Conductividad térmica

La constante, k , es la conductividad térmica del material a través del cual se transfiere el calor. La conductividad térmica es la propiedad de un material para conducir el calor. Materiales con buena capacidad de transferencia de calor son por ejemplo los metales tienen una conductividad alta, mientras que los que por ejemplo los gases tienen un k baja (ver tabla N° 7)

TABLA 7. CONDUCTIVIDAD TÉRMICA	
Material	Conductividad térmica (W / (m K))
Aire	0.025
Madera	0.04 - 0.4
Alcoholes y aceites	0.1 - 0.21
Polipropileno	0.25
Aceite mineral	0.138
Caucho	0.16
Cemento Portland	0.29
Agua	0.6
Grasa térmica	0.7 - 3
Vidrio	1.1
Concreto, piedra	1.7
acero inoxidable	12.11- 45
Plomo	35.3
Aluminio	237 (puro) / 120 - 180 (aleaciones)
Oro	318
Cobre	401

Los buenos conductores tienen alta conductividad térmica, por ejemplo el cobre. Los malos conductores, es decir, buenos aislantes, tienen baja conductividad térmica, por ejemplo el asbesto.

VI.6.3.3 Conducción a través de una losa

Caso 1: Conducción a través de una sola losa

Consideramos la transferencia de calor a través de una sola losa como la de la figura XX

anterior. Siendo $\dot{q} = dQ/dt$ por la ley de Fourier:

$$\dot{q} = -k \cdot A \frac{dT}{dx} \quad (Eq. 10)$$

Integrando esta ecuación se tiene:

$$\dot{q} = \frac{kA(T_h - T_c)}{L} \quad (Eq. 11)$$

Caso 2: Conducción a través de dos losas

Consideramos la transferencia de calor a través de dos losas como en la figura 31, donde T_h es la mayor temperatura a un lado de la primera losa; T_1 es la temperatura al extremo de la primera losa; T_c es la menor temperatura al extremo de la segunda losa; \dot{q} es el flujo de calor; A es área perpendicular al flujo; L_1 y L_2 son las longitudes de las losas 1 y 2 respectivamente; x es la dirección del flujo de calor; k_1 y k_2 son las conductividad térmicas de las losas 1 y 2.

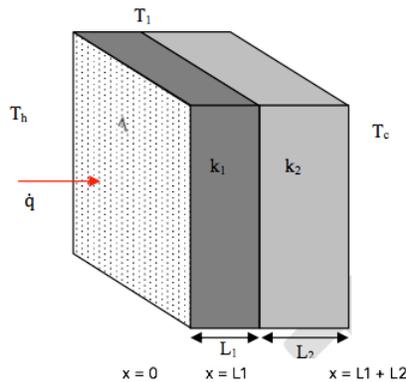


Figura 31 Transferencia de calor a través de 2 losas. [46]

Se puede demostrar que en la transferencia de calor a través de 2 losas se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{\dot{q}}{A} = \frac{T_h - T_c}{\left(\frac{L_1}{k_1} + \frac{L_2}{k_2}\right)} \quad (Eq. 12)$$

Caso 3: Conducción a través de n - losas

Consideramos la transferencia de calor a través de multiples losas como en la figura 32.

Donde T_h es la temperatura en el extremo de la enésima losa (de mayor temperatura); T_i es la temperatura en el final de la i-esima losa; T_c es la temperatura al inicio de la primera losa; \dot{q} es el flujo de calor; A es área perpendicular al flujo; L_i es la longitud de la i-esima losa; x es la dirección de la transferencia de calor; k_i es la conductividad térmica de la i-esima losa; n es el número de losas.

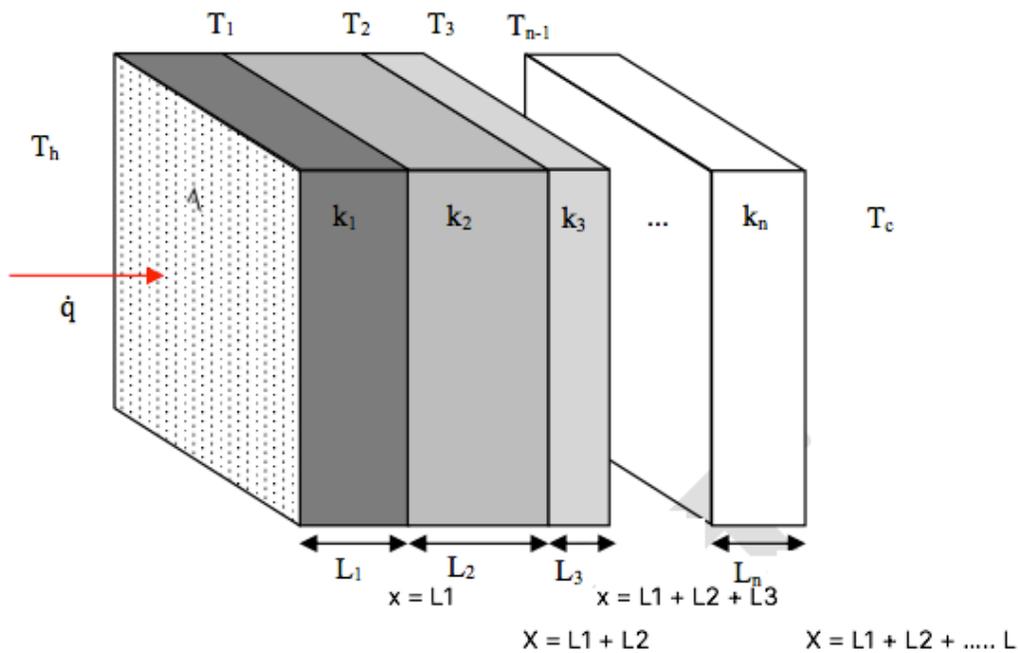


Figura 32. Transferencia de calor a través de multiples losas. [46]

Se puede demostrar que el flujo de calor viene dado por la siguiente ecuación:

$$\dot{q} = \frac{\Delta T}{\sum_{i=1}^n \frac{L_i}{k_i A}} \quad (Eq. 13)$$

VI.6.3.4 Perfil de temperatura a través de n losas

A través de una losa tenemos:

$$\dot{q} = \frac{kA(T_h - T_c)}{L} \quad (\text{Eq. 14})$$

De aquí rápidamente se demuestra que : $T_c = -\frac{\dot{q}}{kA} L + T_h$

Como L es el espesor de la losa, la gráfica T_c vs x es una recta. Si el material es un aislante, k es pequeño, y la pendiente de la recta es alta (ver figura 33). Esta ecuación es solamente aplicable considerando una constante k constante.

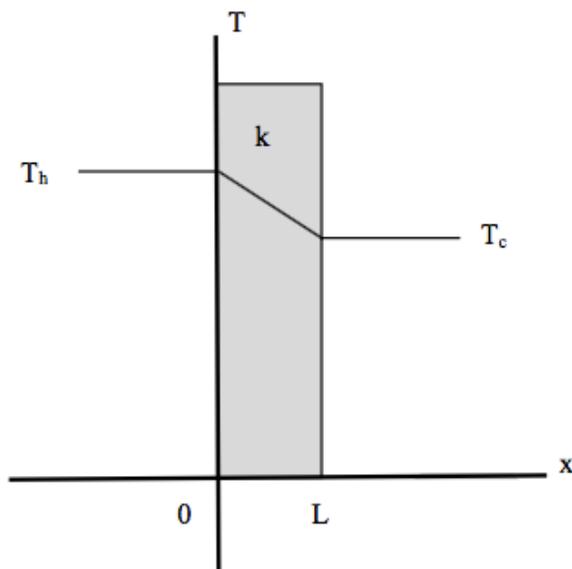


Figura 33. Variación de la temperatura a lo largo de la dirección de transferencia de calor para una losa. [46]

De la misma manera, esto se puede ampliar para n losas en serie. El perfil de temperatura en cada losa es lineal (siempre que k sea constante), con una pendiente lineal diferente según el valor de k. Así la dependencia de la temperatura es como muestra la figura 34:

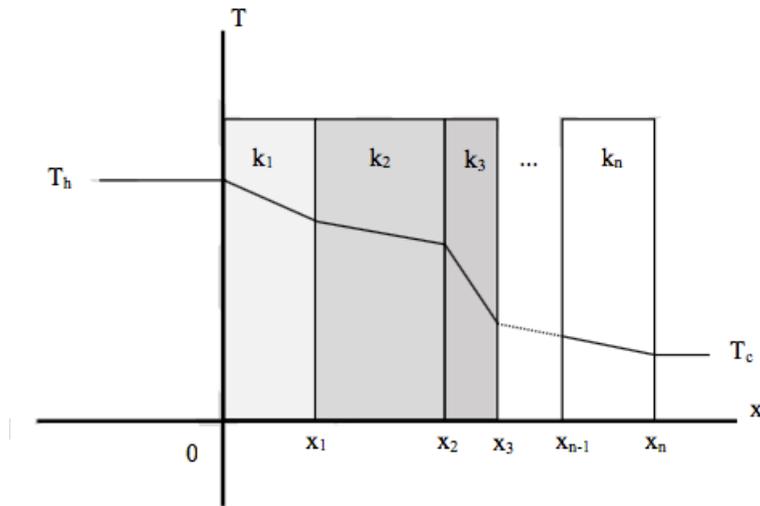


Figura 34 Variación de la temperatura a lo largo de la dirección de transferencia de calor para n-losa. [46]

VI.6.3.5 Resistencia térmica

El flujo de calor puede expresarse también como:

$$\dot{q} = \frac{\Delta T}{R} \quad (Eq. 15)$$

Donde R se define como la resistencia térmica.

Para múltiples losas en serie, la resistencia térmica se demuestra que es:

$$R = \sum_{i=1}^n \frac{L_i}{k_i A} \quad (Eq. 16)$$

Considerando la transferencia de calor a través del sistema donde hay configuración de las losas paralelas como se muestra en la figura 35:

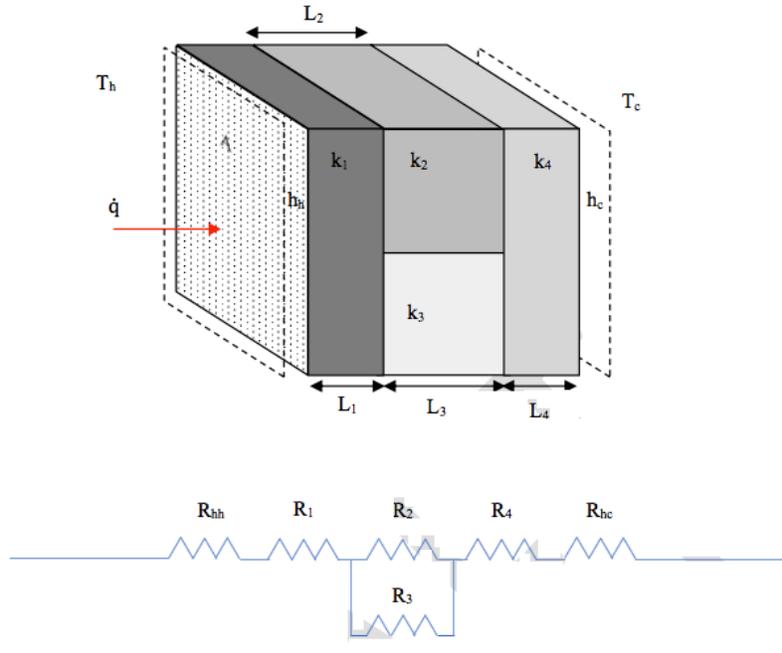


Figura 35. Circuito de resistencias térmicas

La resistencia a través de la sección paralela puede escribirse como:

$$R_{2/3} = \left(\frac{1}{R_2} + \frac{1}{R_3} \right)^{-1}$$

$$R_{2/3} = \left(\frac{k_2 A}{L_2} + \frac{k_3 A}{L_3} \right)^{-1} \quad (Eq. 17)$$

De tal manera de que el flujo de calor es:

$$\dot{q} = \frac{\Delta T}{\frac{1}{h_{hh} A} + \frac{L_1}{k_1 A} + \left(\frac{k_2 A}{L_2} + \frac{k_3 A}{L_3} \right)^{-1} + \frac{L_4}{k_4 A} + \frac{1}{h_{hc} A}} \quad (Eq. 18)$$

VII. MATERIALES Y METODOS

VII.1. Microscopios evaluado

Para este estudio se evaluó el sistema desarrollado en un microscopio óptico convencional, Microscopio Olympus BX41, así como en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse, el cual dispone de un filtro UV y permite que sobre la muestra llegue una haz de luz de excitación alrededor de 349 nm apropiado para el fluoróforo y recoge una luz de emisión alrededor de 448 nm. Este filtro es justamente adecuado para trabajar con el substrato AMC que se utiliza en este estudio para estudiar oncósferas de *Taenia solium*.

VII.2. Las celda Peltier

Las primeras pruebas se hicieron con un microscopio óptico convencional, Olympus BX41, en cuya base se instalaron 2 celdas Peltier (Tellurex CZ1). Cada una de las celdas Peltier fueron conectadas independientemente a una fuente de poder, suministrándoles a cada uno 1.5 Amperios de corriente contante. Posteriormente, también se evaluó el sistema con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse.

VII.3 Circuito de Control de las Celdas Peltier

Las figuras 38 y 51, muestran las 2 celdas Peltier instaladas en la base del Microscopio Olympus BX41y del Microscopio Nikon Eclipse, así como dos sensores instalados a ambos lados de la cámara porta muestra. Los cuales son: (1) un sensor de temperatura LM 335, en la imagen ubicado a la izquierda de la cámara porta muestra que es parta del sistema

de control de temperatura, y (2) una termocupla, en la imagen ubicada a la derecha de la cámara porta muestra. El primero está conectado a un circuito para monitorear la temperatura de la cámara y controlar con ello el encendido y apagado de las fuentes de poder de las celdas Peltier, mientras que la termocupla proporciona una medida en paralelo directa de la temperatura al centro de la base del microscopio en todo momento.

Se diseñó y construyó un sistema de control de temperatura utilizando circuitos integrados como un OPAM 741, un circuito comparador TL081 y un relay que controlan las fuentes de poder de 2 celdas Peltier y mantienen el sistema a una temperatura regulada.

El sensor LM 335 se conectó a un circuito amplificador de señal que utiliza un amplificador operacional, OPAM 741 como se muestra en la Figura 36-A cuya salida fue conectada a un circuito comparador con histéresis como se muestra en la Figura 36-B.

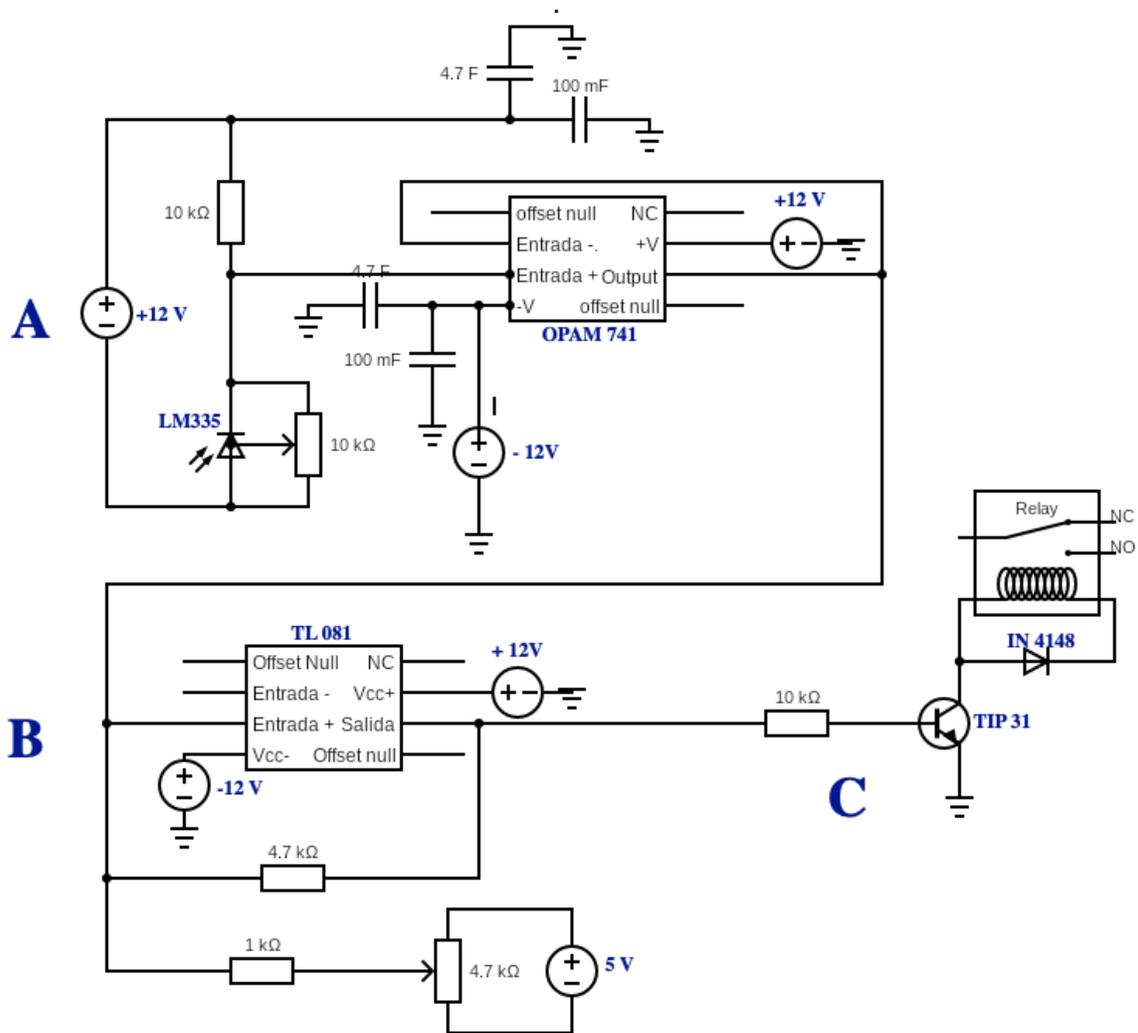


Figura 36. Diagrama de circuitos de: **A.** Circuito Amplificador , **B.** Circuito Comparador, y **C.** Relay

Todo el circuito de control del sistema se colocó en una placa como se muestra en la figura

37. Este circuito de control incluye:

- (1) sensor de temperatura LM335,
- (2) circuito amplificador de señal del sensor LM335,
- (3) circuito comparador con histéresis,

(4) circuito de transistor / relay para controlar las fuentes de poder.

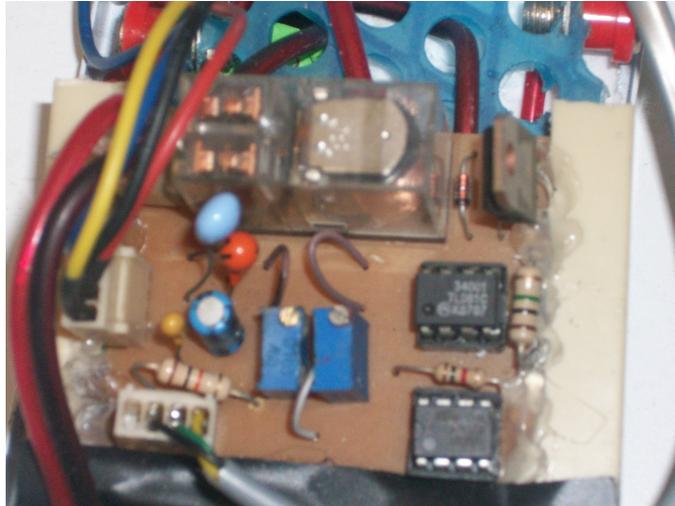


Figura 37. Circuito del sistema de control de temperatura

VII.4 Adaptación de una fuente de poder para el Circuito de Control

El circuito de control utiliza los voltajes de alimentación estándares: +12V, -12V, +5V. Para comodidad, se adaptó una fuente de poder ATX de PC para utilizarla como fuente de poder en el laboratorio. La información / indicaciones para realizarlo es de libre acceso en internet [24].

VII.5. Montaje del Sistema en el microscopio

Inicialmente se montó el sistema en un Microscopio Olympus BX41. La siguiente figura muestra los sensores de temperatura y las celdas Peltier montadas en la base del microscopio:

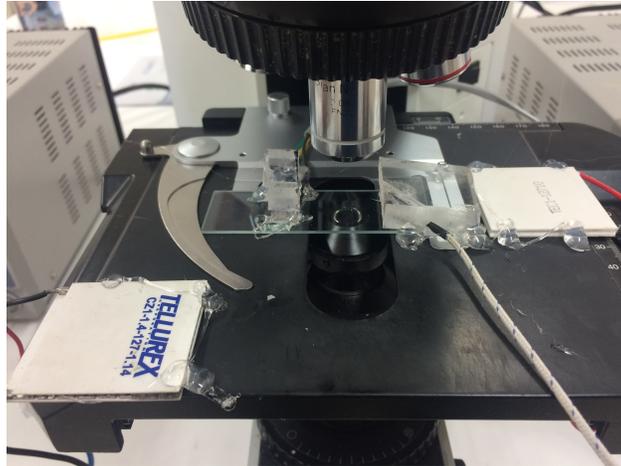


Figura 38. Sistema de control de temperatura acoplado en Microscopio Olympus BX41.

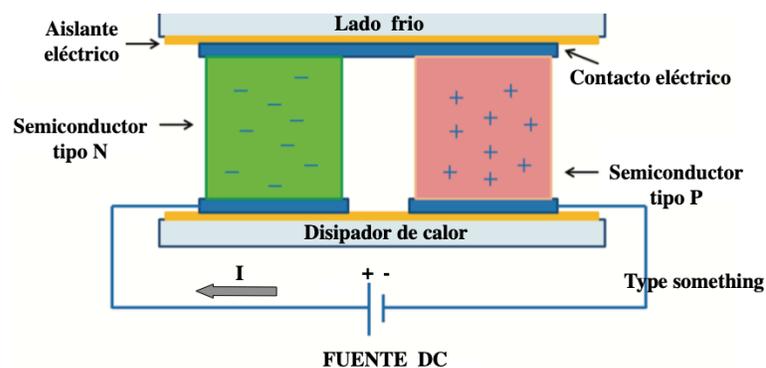
VII.6 Flujo de calor en las celdas Peltier y la base del microscopio

Según el esquema de la figura 39A, cuando se aplica un voltaje entre los extremos de este arreglo de semiconductores tipo N y P unidos por placas conductoras, de tal manera de que el lado correspondiente al semiconductor tipo N se aplica la polaridad positiva y al lado del semiconductor tipo P se aplica la polaridad negativa en el esquema, de tal manera de que en el esquema (figura 39A) la parte inferior se calienta y la superior se enfría.

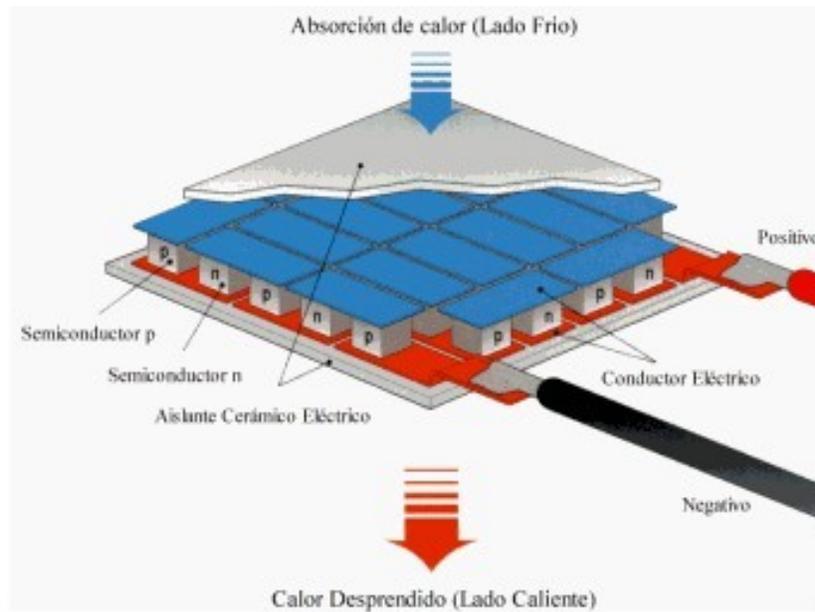
Como muestra la figura 39B, las celdas Peltier utilizadas son arreglos de semiconductores tipo N y P unidos por placas conductoras, de tal manera de que si al lado correspondiente al semiconductor tipo N se aplica la polaridad positiva y al lado del semiconductor tipo P se aplica la polaridad negativa (figura 39A) la parte inferior de la celda Peltier se calienta y la superior se enfría.

En el semiconductor tipo N, los electrones que llevan carga negativa se mueven en dirección opuesta al flujo de corriente transportando calor de la cara fría del módulo hacia la cara caliente, mientras que en el semiconductor tipo P, los huecos que se mueven en la dirección del flujo de corriente también transportan calor de la cara fría a la cara caliente del módulo. En el módulo Peltier (figura 39B) los semiconductores tipo N y P, están emparejados en parejas PN, para proveer un flujo de corriente continua donde todos los elementos contribuyen a la formación del gradiente de temperatura entre las caras del módulo.

Así también, cuando la polaridad del voltaje de alimentación se invierte, es decir se aplica (según la figura 39) al extremo con el semiconductor tipo N la polaridad negativa y al extremo con el semiconductor tipo P la polaridad positiva, se invierte el gradiente de temperatura, la parte inferior del módulo se enfría y parte la superior se calienta.



A



B

Figura 39. Módulo Peltier. **A.** Esquema interno de un módulo Peltier. [47] y **B.** Diagrama interno de un módulo Peltier [48]

En este estudio, la cara caliente de la celda Peltier fue colocada hacia la base del microscopio, de tal manera de que al encender la fuente de alimentación de las celdas se calentaba la base del microscopio y este a su vez calentaba la cámara porta muestra junto con la muestra a evaluar. La figura 43 muestra los instantes cuando se están calentando la base del microscopio junto con la cámara porta muestra. Se pudo notar en dicha imagen térmica que la cámara porta muestra está algunos grados por debajo de la base del microscopio. Mas adelante en esta tesis mostrare la medición de esta diferencia de temperaturas, la cual está entre 3 - 4 ° centígrados.

VII.7 Estudio preliminar de oncósferas de *Taenia solium*

Activación de Oncósferas. Las oncósferas o huevos de la *Taenia solium* utilizadas en este estudio fueron brindadas por la Dra. Manuela Verastegui del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Estas fueron activadas según el protocolo descrito por Verastegui et al. (Verastegui M, Infect Immun. 2007). Durante el paso final de activación las oncósferas se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Durante este tiempo se conectó el sistema de control de temperatura en el microscopio Nikon Eclipse para estabilizar su temperatura alrededor de 38°C. Así como también se utilizó un equipo *hot plate*, para mantener a 37°C constante la cámara porta muestra en que se colocaría la muestra con las oncósferas, mientras calienta el microscopio.

Péptidos Fluorogénicos. Se trabajó con soluciones stock 5 mM del péptido fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC (MP Biomedicals) en dimetil-sulfóxido (DMSO). Aproximadamente 30 min antes de finalizar la activación de las oncósferas, una alícuota (5 µL) de esta solución fue incubada a 37 °C.

Obtención de la muestra final. Luego de haber transcurrido los 60 minutos de la incubación final del protocolo de activación de oncósferas, se mezcló rápidamente 2 µL de la solución con las oncósferas activadas con 2 µL de la solución stock del substrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC 5 mM.

VII.8 Preparación de la cámara porta muestra

Inmediatamente después de preparar la mezcla del substrato fluorogénico con la solución con oncósferas activadas, se tomó 2 μL de este mix, se depositó en la lámina porta objeto y se cubrió inmediatamente con la lámina cubre objeto. Rápidamente, los bordes de la lámina cubre objeto se sellaron con grasa de vacío, que es aquella que se utiliza para sellar los bordes en los pocitos en placas donde se crecen cristales de proteínas.

VI.9 Simulación de la transferencia de calor en el sistema

Se utilizó el programa COMSOL Multiphysics para realizar las simulaciones de la transferencia de calor entre la lamina porta objetos, cubre objetos y muestra, la base del microscopio y las celdas Peltier.

En una primera simulación se simuló la transferencia de calor de la celda peltier hacia la lámina porta muestra como se indica en la figura 40.

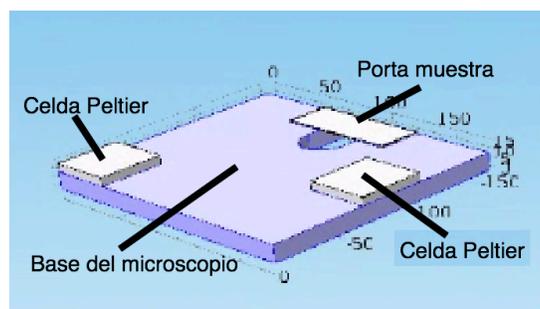


Figura 40. Disposición del sistema para simular la transferencia de calor.

También se simuló la transferencia de calor de la lamina porta muestra hacia la muestra (considerada agua) y luego hacia la lámina cubre objeto (ver sección de resultados)

II.10 Observación de las oncósferas de *Taenia solium* a temperatura regulada

Los pasos finales para iniciar la observación fueron:

- * Luego de sellar la cámara con la muestra de oncósferas, esta se colocó en la base del microscopio de fluorescencia el cual se encontraba a 37°C.
- * Se utilizó una webcam adaptada a uno de los oculares del microscopio para observar las imágenes de las oncósferas en el microscopio de fluorescencia cuyo medio contenía el substrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC.

VIII.- RESULTADOS

VIII.1 La Cámara porta muestra

La cámara porta muestra consta de una lamina de vidrio porta objetos sobre la que se coloca la muestra biológica, en nuestro caso solución conteniendo huevos de *Taenia solium*, la cual se cubrió con una lamina cobre objetos. Como se observa en la Figura 41, los bordes de la lamina cobre objeto fueron selladas con grasa de cámara de vacío con la finalidad de mantener la humedad en la cámara durante todo el período de estudio y evitar que las muestras se evaporen.

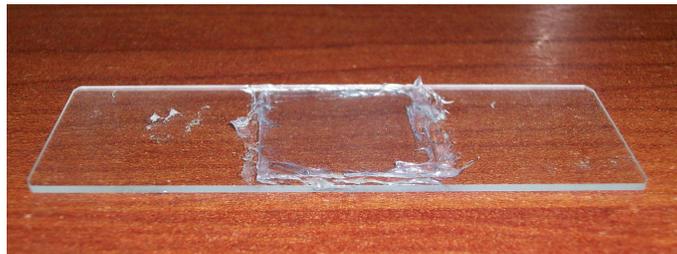


Figura 41. Cámara porta muestra.

VIII.2 Adaptación de una fuente de poder para el Circuito de Control

Se obtuvo una fuente de poder cacera con voltajes de salida: +5V, -5V, +12V, -12V, +3,4V.

La siguiente figura muestra la fuente ATX adaptada como fuente de laboratorio cacera que se utilizó como fuente de alimentación para el circuito de control de temperatura.

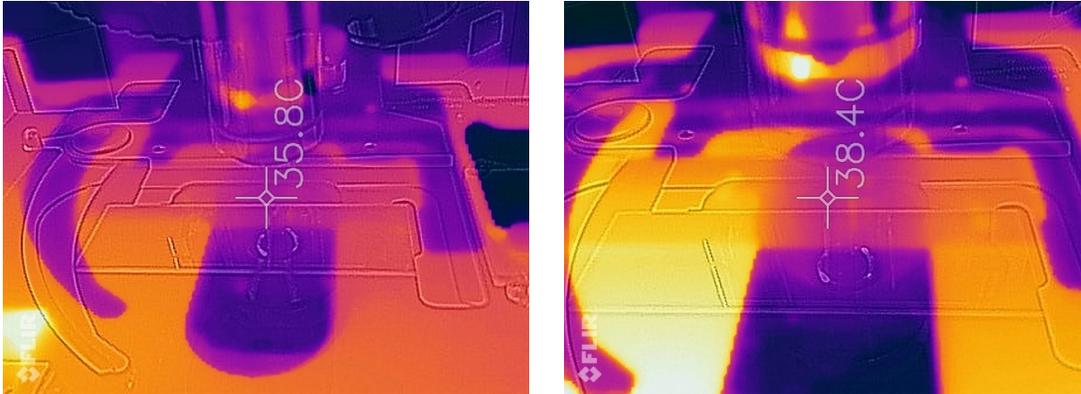


Figura 42. Fuente de poder ATX adaptada para alimentar el circuito electrónico de control del sistema de control de temperatura.

VIII.3. Imágenes Térmicas de la base del microscopio y del porta muestra a diferentes tiempos

Mientras estaba en funcionamiento el sistema de control de temperatura que regula la temperatura de la cámara porta muestra, se utilizó una cámara térmica FLIR One para evaluar la distribución de temperaturas en: (1) la base del microscopio y (2) la cámara porta muestra instalada en el mismo.

El monitoreo de la distribución de temperaturas en la base del microscopio y la cámara porta muestra instalada en el mismo mientras funcionaba el sistema de regulación de temperatura mostró homogeneidad en la temperatura de los mismos durante los ciclos de calentamiento/enfriamiento, lo cual se puede observar en la Figura 43A, y 43B obtenidas a diferentes tiempos asociadas a dos valores distintos de temperaturas de la cámara porta muestra como se observa en la figura indicada.



A

B

Figura 43. Distribución homogénea de temperaturas en la base del microscopio en los instantes en que la cámara porta muestra se encuentra a: **A.** 35.8 °C y **B.** 38.4 °C.

VIII.4. Simulación térmica de la transferencia de calor en el sistema

Se hicieron dos simulaciones, la primera de ellas sobre la transferencia de calor desde el Peltier hacia la lámina porta muestra a través de la base del microscopio, según se muestra en la figura 44. Se fijó la temperatura en las placas Peltier en 90°C y la temperatura de la lámina porta muestra en 37°C, esta última debido a que es la temperatura en que se apaga el sistema y se empieza a enfriar.

Aquí el calor fluye del extremo caliente del Peltier hacia la base del microscopio de aluminio hasta la lámina porta muestra de vidrio. El patrón final de temperaturas en el sistema se puede apreciar en la figura 44.

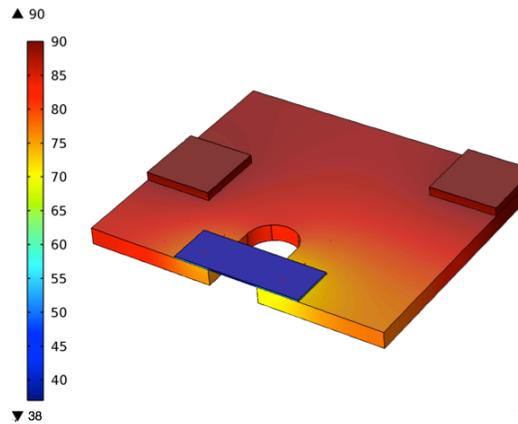


Figura 44. Distribución final de temperaturas en el sistema cuando la temperatura de la lámina porta muestra en 37°C.

En la figura 45 se puede apreciar la transferencia de calos entre la base del microscopio y un costado de la lámina porta muestra.

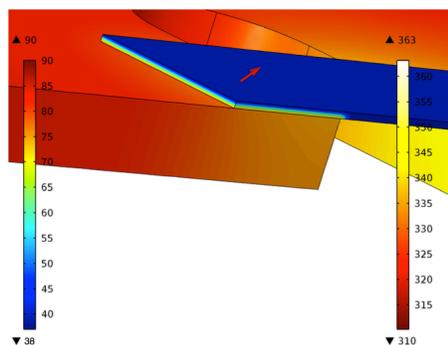


Figura 45. Transferencia de calor entre la base del microscopio y la lámina porta muestra.

También se realizó la simulación de la transferencia de calor entre la lámina porta muestra, la muestra (considerada como agua) y la lámina cubre objeto. La figura 46 presenta esta simulación. Aquí la lámina cubre objeto se desplazó 0,1 mm a un costado para poder ver la temperatura de la muestra bajo ella. En esta simulación, la temperatura

de la lámina porta muestra se fijo en 38 °C y se estimo la temperatura de la lámina cubre objeto, la cual se observa que es de aproximadamente 35,8 °C y la de la muestra alrededor de 37 °C.

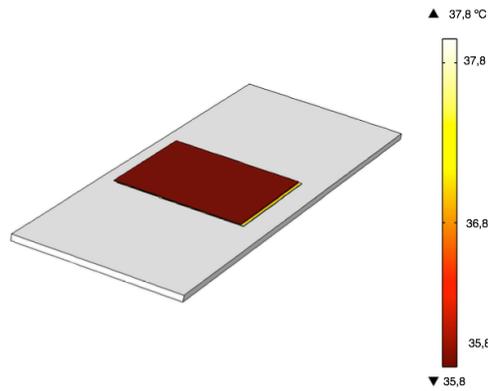


Figura 46. Esquema de simulado de transferencia de calor

VIII.5. Datos registrados del Circuito de Control de temperatura

La operatividad del sistema de control de temperatura se realizó monitoreando durante varios ciclos de funcionamiento del sistema (calentamiento/enfriamiento) los siguientes valores:

- Voltaje de salida del circuito amplificador de señal
- Voltaje de salida del circuito comparador
- Voltaje en los extremos del relay que controla las fuentes de poder del sistema
- Temperatura de la base del microscopio medido por la termocupla.

En este estudio, el rango de temperaturas analizadas en la base del osciló entre 35 °C y 39 °C, siendo la variación de la señal amplificada del sensor de temperatura LM335 en el tercer decimal. Para poder observar esta variación la grafica 47, muestra la señal medida

de salida del amplificador en el tiempo de medición superpuesta con solamente su señal AC amplificada un factor de 1000, denominada en la grafica como Oscilación del Amplificador x 1000..

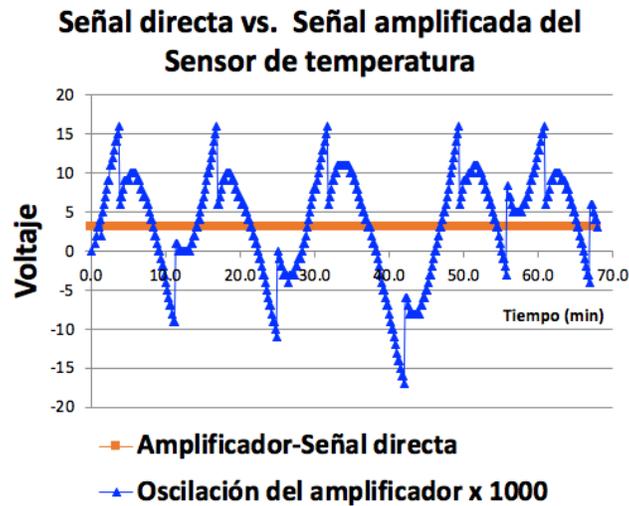


Figura 47. Oscilación del voltaje de salida del amplificador durante varios ciclos de funcionamiento del sistema de regulación de temperatura.

Se observó también que el voltaje de salida del amplificador oscila periódicamente con el mismo periodo que la variación en el voltaje de salida del circuito comparador.

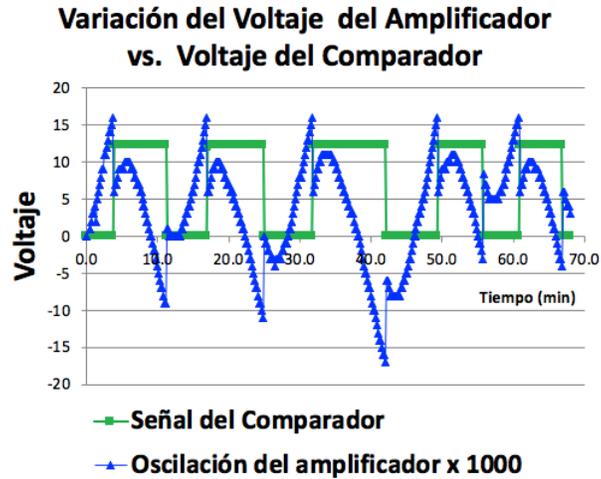


Figura 48. Variación de la señal de voltaje del amplificador versus la señal de voltaje en el relay durante varios ciclos de funcionamiento del sistema de control de temperatura. Se observó que la temperatura de la base del microscopio oscila también en el tiempo con el mismo periodo que la señal en el circuito comparador, teniendo un valor de $37,3 \pm 1,5$ °C durante 5 ciclos de calentamiento/enfriamiento.

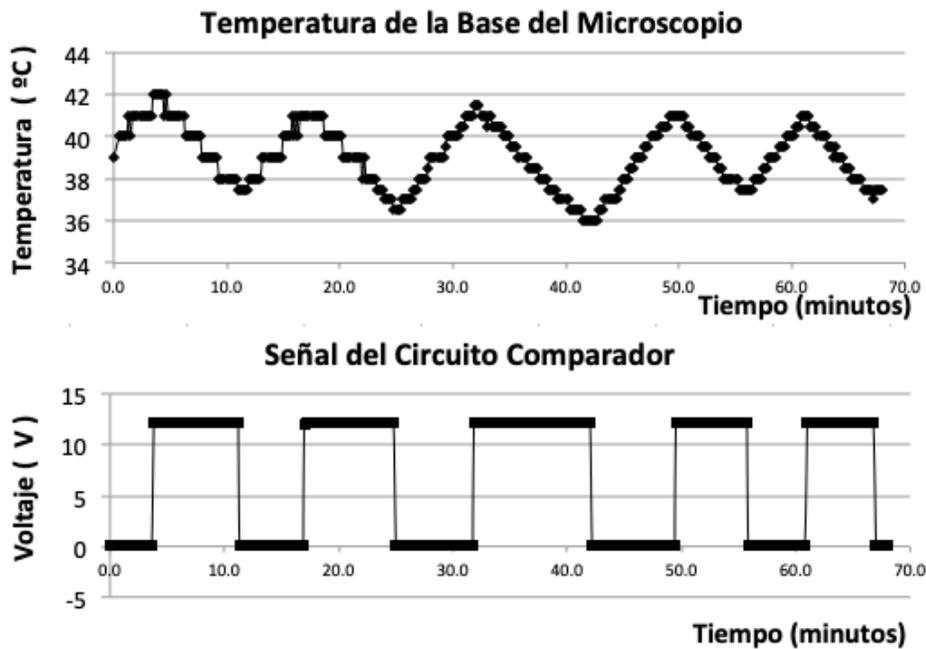


Figura 49. Relación entre la temperatura en la base del microscopio y el voltaje de salida del circuito comparador.

VIII.6 Relación entre las temperaturas de la base del microscopio y la del porta muestra

En paralelo al sensor de temperatura del sistema de calentamiento, se midió la temperatura en la base del microscopio con una termocupla y en el centro de la cámara porta muestra con una cámara térmica mientras funciona el sistema de regulación de temperatura, se pudo observar que la temperatura de la base del microscopio siempre es mayor y que ambas están relacionadas por la siguiente ecuación (ver figura 50):

$$t_{\text{Base Microscopio}} = 2,02 \times t_{\text{porta muestra}} - 32,3 \quad (\text{Eq 6})$$

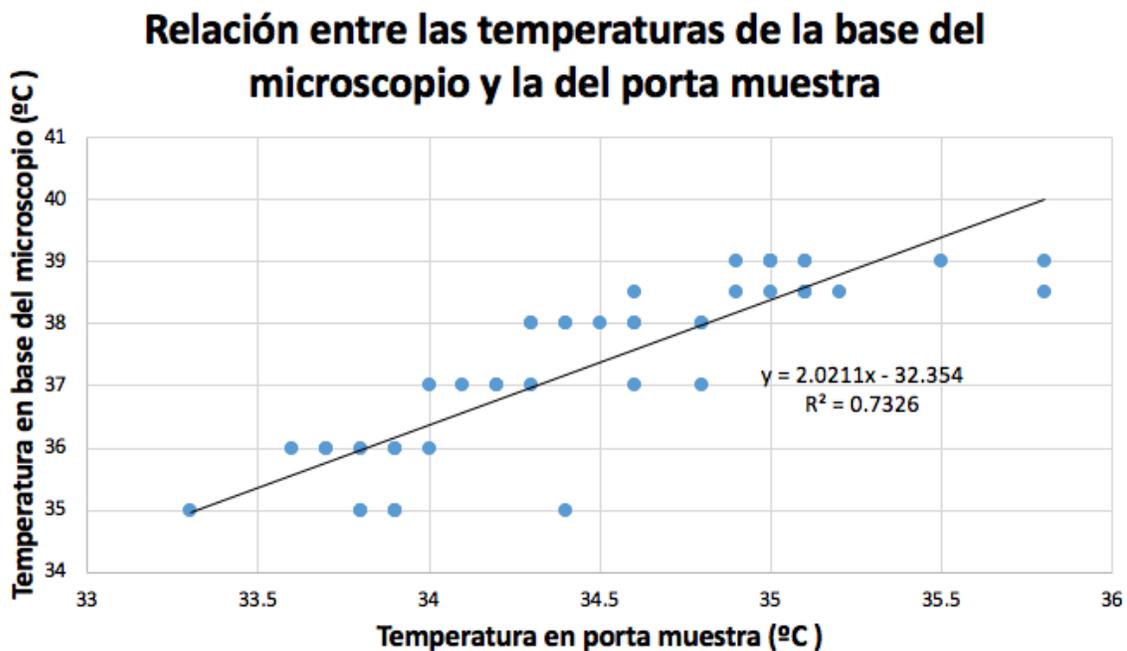


Figura 50. Relación de la temperatura en la base del microscopio y la temperatura del centro de la cámara porta muestra.

Utilizando los valores de la temperatura medidos en la base del microscopio tenemos que es: $37,3 \pm 1,5$ siendo la temperatura en el porta muestra $34,5 \pm 0,6$ °C.

VIII.7. Estudio preliminar utilizando oncósferas de *Taenia solium*

Para poder estudiar proteasas en oncósferas de *Taenia solium*, se instaló el sistema de regulación de temperatura en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse (figura 51) y se calibro el sistema para que se encienda y apague a los mismos valores de temperatura que en el microscopio Olympus BX41. Posteriormente, se obtuvieron las imágenes preliminares de una solución de oncósferas activadas de *Taenia solium* conteniendo substratos fluorogénicos específicos para proteasas de las familia tripsina y catepsina.

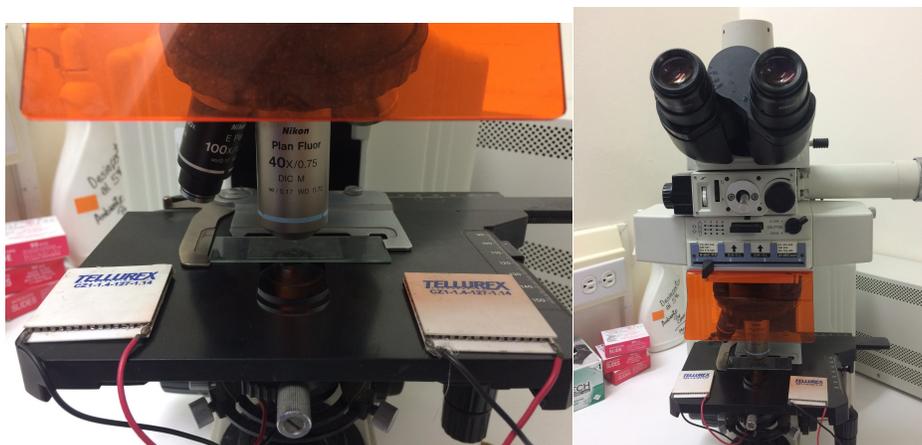


Figura 51. Sistema de control de temperatura montado en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse.

VIII.8. Imágenes de oncósferas de Taenia Solium incubadas con substrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC

La mezcla de oncósferas con substrato fluorogénico Z-phe-arg-AMC fue colocada en una cámara porta muestra e insertada en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse, el cual utilizaba un cubo filtro Nikon UV 2E/C, el cual permite la incidencia sobre la muestra de longitudes de onda UV apropiadas para excitar el fluoróforo AMC unido al substrato fluorogénico utilizado, filtrando también la luz de emisión del mismo.

La siguiente figura muestra dos grupos de imágenes obtenidas con el microscopio Nikon Eclipse de dos oncósferas, las imágenes de la izquierda con fondo negro fueron iluminadas con luz visible, ahí se puede observar algunos detalles de las mismas, como son los ganchos de las oncósferas. Las imágenes de la derecha fueron obtenidas iluminándolas con luz UV y utilizando el filtro UV 2E/C.

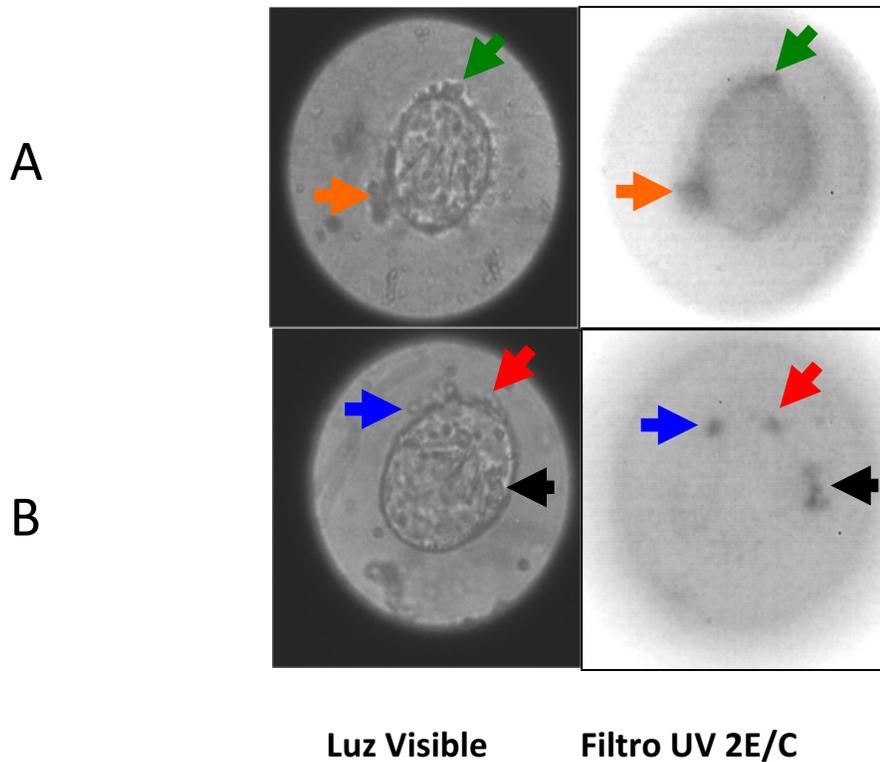


Figura 52. Visualización de dos oncósferas de *Taenia solium* (A y B) en solución conteniendo substrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC.

La figura 52 muestra dos imágenes de cada una de dos oncósferas de *Taenia solium* (A y B) luego de mantener las oncósferas por aproximadamente 30 minutos alrededor de 38°C. Las imágenes obtenidas con el filtro UV 2E/C identifican la presencia de actividad proteolítica en las oncósferas las cuales se presentan como puntos de mayor oscuros. La imagen original mostraba zonas de color azul muy intensa (emisión del fluoróforo AMC en 445 nm), la cual fue convertida a una escala de grises.

Las imágenes tomadas con el filtro UV 2E/C. muestra regiones de actividad proteolítica asociada a regiones que parecen estar dentro de la oncósfera (oncósfera B, flecha negra),

así como en la superficie de la misma en zonas mas localizadas (oncósfera B, flecha azul y roja) y en otros casos en regiones un poco mayores (oncósfera A, flecha verde y naranja)

IX.- DISCUSION

Esta tesis buscó desarrollar un sistema económico de control de temperatura para estudiar muestras biológicas a temperatura controlada. Debido a que las muestras biológicas siempre están en una solución líquida, se diseñó una cámara porta que evite el evaporamiento de las soluciones que permita periodos de monitoreo de las muestras de algunas horas. Así, la cámara porta muestra consistió de una lámina portaobjeto que contenía la muestra a evaluar (huevos de *Taenia solium*) cubierta de una lámina cubre objeto. Los bordes de esta lámina cubre objeto fueron sellados con grasa para evitar que la muestra se evapore. Esta cámara permitió que las muestras de biológicas utilizadas (oncósferas de *Taenia solium*) no se sequen en el tiempo de monitoreo, siendo el periodo de tiempo continuo de utilización máxima realizada de 2 horas.

En la construcción del sistema de control de temperatura se utilizaron circuitos integrados básicos para el armado del circuito de control de temperatura, como lo son un OPAM 741 y un comparador TL 081, acoplados a un Relay que es quien controla finalmente las fuentes de poder de las celdas Peltier que calienta la base del microscopio mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento. El circuito comparador dispone de dos resistencias de precisión que permite calibrar la temperatura de encendido y apagado de las fuentes de poder de las celdas Peltier, regulando finalmente con ello la temperatura de la muestra a estudiar. De esta manera es posible utilizar este sistema de control de temperatura para mantener las muestras a cualquier valor de temperatura de las usuales que se utilizan en laboratorios de investigación donde se trabajen con muestras biológicas (proteínas,

células, ADN,... etc). Las mediciones que la cámara porta muestra utilizada en este estudio se mantuvo aproximadamente en el rango $34,5 \pm 0,6$ °C.

En la figura 47 podemos observar que el voltaje de salida del amplificador de señales (OPAM 741) esta alrededor de 3 voltios (curva naranja). En dicha figura, la curva azul muestra la oscilación AC de esta señal la cual se muestra amplificada en la figura por un factor de 1000.

La figura 48 se compara la señal AC amplificada (x1000) con la señal de salida del circuito comparador. El tiempo 0 min de esta grafica se inicia cuando el sistema se empieza a calentar. Se puede notar repetidamente en estos datos que siempre que la señal amplificada del sensor de temperatura llega a 3,056V se produce un salto en el comparador de 0,09 V a 12,24V, debido a que este el valor de referencia del circuito comparador. En dicho instante se polariza el relay y se desconecta la alimentación de las fuentes de poder de las celdas Peltier, enfriándose de este modo la base del microscopio y con ello el porta muestra. Aquí, notamos que cuando la señal del OPAM 741 baja hasta valores que fueron entre entre 3,044 y 3,025 nuevamente hay un cambio en la señal del circuito comparador de 12,24 V a 0,009V, lo cual se depolariza el relay encendiendo así las fuentes de poder de las celdas Peltier, volviendo a calentar el sistema. Estas oscilaciones en el voltaje de salida del OPAM 741 para iniciar el calentamiento del sistema se puede haber debido a que el laboratorio donde se realizaron las pruebas dispone de aire acondicionado el cual se encontraba cerca del microscopio. Ello puede haber generado que en algunos casos el sistema se haya enfriado un poco mas o un poco menos

dependiendo si el aire acondicionado estaba activado o no. Esto se puede notar en la misma figura 48, donde se nota que los periodos de los ciclos de calentamiento y enfriamiento no eran constantes. Inclusive se puede notar que hay un ciclo de medición de la temperatura en la base del microscopio (medida por el sensor de temperatura LM 335) donde su temperatura disminuyó mucho más que en los otros ciclos (nótese que la variación es mínima puesto que la grafica 37 muestra la señal AC del sensor de temperatura amplificada x 1000). Durante estas pruebas a propósito no se apago el aire acondicionado puesto que serian las condiciones reales bajo las cuales se están evaluando el sistema de control de temperatura.

La figura 49 compara la temperatura de la base del microscopio medida por una termocupla (ubicada al centro en una ubicación simétrica de la base del microscopio) con la señal de salida del circuito comparador (la cual cambiaba con la señal del sensor de temperatura LM335 del sistema). En esta figura se puede apreciar claramente que durante el tercer ciclo en que estuvieron apagadas las celdas Peltier (durante 10,2 minutos) fue cuando mas bajo la temperatura de la base del microscopio llegando hasta cerca de 36°C.

Durante el periodo de evaluación del sistema, los ciclos de enfriamiento del sistema duraron 7.5, 7.7, 10.2, 6.3 y 6 minutos, durando en promedio 7.5 ± 1.7 minutos. Los ciclos de calentamiento duraron 3.8, 5.7, 6.8, 7.5 y 5.2, durando en promedio 5.8 ± 1.4 minutos. Nótese que a pesar que los ciclos de calentamiento duraban un menor tiempo

que los de enfriamiento, estos últimos eran bastante rápidos debido al aire acondicionado del laboratorio.

La figura 50 presenta la relación entre la temperatura en la base del microscopio medida con una termocupla vs la temperatura en el porta muestra medida con una cámara térmica. De aquí se encontró que la temperatura en el porta muestra siempre es inferior a la temperatura en la base del microscopio y que están relacionadas por la ecuación 6. Debido a que el porta muestra contiene la muestra a ser observada por el microscopio y analizada, esta en contacto con la base del microscopio solo por los extremos. Así, la parte central del porta muestra esta en contacto con el aire. Debido a lo descrito anteriormente, y al echo de que la cámara porta muestra no es un buen conductor de calor por ser de vidrio, el flujo de calor desde la base del microscopio hacia la parte central del porta muestra es menor que en la zonas de los extremos donde está en contacto con la base del microscopio.

El sistema desarrollado en esta tesis puede ser adaptado, aunque no exclusivamente, a cualquier tipo de microscopio óptico. Para otros tipos de instrumentos que necesiten este sistema se tendría que verificar que la base del porta muestra este en contacto con una región metálica de alta la conductividad térmica que transfiera el calor hacia la cámara porta muestra, así como la masa de la misma base de metal.

En el circuito desarrollado en esta tesis, la salida del circuito comparador TL081 suministraba muy baja corriente para poder hacer funcionar un relay 220V/10Amax, debido a ello que se le acopló un transistor que suministra la corriente necesaria para que pueda funcionar nuestro circuito. El circuito final pudo controlar muy bien dos fuentes de poder, cada una para una de las 2 celdas Peltier con que se trabajaron.

Según las imágenes de termografía de la base del microscopio este no mostró marcados gradientes de temperatura durante su calentamiento, debido a que dicha base era de metal, lo cual es un muy buen conductor térmico en contraste con la cámara porta muestra que estaba siempre a una menor temperatura debido, como ya se menciona a que era de vidrio y no estaba totalmente en contacto con la base del microscopio.

En las simulaciones de la transferencia de calor en el sistema descrito en esta tesis se observó el patrón de calor en la base del microscopio y lámina porta objeto cuando la temperatura en dicha lámina llegaba a 38°C. Como resultado de esta simulación, en la figura 44 se puede apreciar que debido a que las posiciones de los Peltier en la base del microscopio no son simétricas respecto de la lámina porta muestra, hay una distribución de calor en la base del microscopio no simétrica en ella. Esto era inevitable, puesto que el microscopio tiene un brazo de metal que agarra la lámina porta objeto que evitaba colocar el Peltier en una posición mas simétrica en la base. En la figura 45 se puede apreciar la transferencia de calor de la base de aluminio del microscopio hacia la lámina

porta objeto, se observa una reducción del calor en la región de la base cercana a la lámina portaobjeto.

En una segunda simulación, se simuló la lámina porta objeto con una región de agua rectangular sobre la misma y sobre ella otro vidrio que es la lámina cubre objeto. En la figura 46 se puede apreciar el resultado final de la simulación, donde la lámina cubre objeto se movió a un costado 0,1 mm para poder nosotros observar la temperatura de la muestra bajo ella. Se puede apreciar que la lámina porta objeto está a 37,8°C, la muestra alrededor de 37°C y la lámina cubre objeto cercana a 35,8°C en la simulación. Se puede notar aquí en la simulación que la temperatura en la parte superior de la lámina cubre objeto es menor a la de la lámina porta objeto, la cual se consideró a la temperatura de la base del microscopio para efectos de la simulación. Esto en concordancia a los resultados encontrados en esta tesis experimentalmente aun cuando en los resultados experimentales muestran una diferencia de temperaturas mayor, del orden de 4°C, mientras que en la simulación se encuentra una diferencia de 2°C. En ello debe haber afectado el hecho que cuando el sistema llega a 38°C se apaga, habiendo aun un flujo de calor desde la base del microscopio hacia la muestra, así como el hecho de que los Peltier no están colocados de forma simétrica en el microscopio.

El sistema de control de temperatura presentado en esta tesis y adaptado a un microscopio de fluorescencia es muy económico, tiene un costo aproximado de \$50 incluyendo las 2 celdas Peltier

Las imágenes mostradas en la figura 52, de oncósferas activadas de *Taenia solium* incubadas con el substrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC, específico para dos tipos de familias de proteasas, Tripsina y Catepsina, muestra regiones de mayor fluorescencia (indicadas con flechas en la imagen). Debido a la especificidad de estos péptidos fluorogénicos, estas regiones se consideran contienen proteasas, faltando aun por definir si se tratan de proteasas de la familia Tripsina o Catepsina, para lo cual se debe aun repetir estas mediciones añadiendo en la solución, en experimentos distintos, inhibidores específicos de ambas familias de proteasas como lo son Quimiostatin, inhibidor de las proteasas de la familia Trypsina, y E64, inhibidor de la familia de proteasas Catepsina. Al comparar ambos experimentos se podrá aclarar el tipo de familia, Tripsina o Catepsina, a la que pertenece las proteasas identificadas en las oncósferas en este estudio.

Al comparar las imágenes de oncósferas iluminadas con luz visible y UV se puede observar que algunas de las zonas asociadas a proteasas se encuentran dentro de la oncósfera, mientras que otras se encuentran en la superficie de la misma, este resultado sugiere que las proteasas o están en algún compartimiento interno permanente de las oncósferas o que son secretadas mediante vesículas, como propone nuestro grupo de investigación.

X.- CONCLUSIONES

El desarrollo de esta tesis demuestra que es posible utilizar celdas Peltier para desarrollar un sistema de regulación de temperatura para estudiar muestras biológicas (en este caso, específicamente huevos de *Taenia solium*) en un microscopio óptico convencional o para un microscopio de fluorescencia.

Se siguió el protocolo de Verastegui et al [7] para obtener una solución que contenía huevos de *Taenia solium* adecuados para su observación por fluorescencia, esta muestra fue analizada utilizando la cámara porta muestra cuyo diseño es propuesto en esta tesis y evita la evaporación de la muestra pudiéndose obtener imágenes *in vitro de los* huevos de *Taenia solium* incubados con substratos fluorogénicos.

El sistema desarrollado en este trabajo de tesis puede ser adaptado a diferentes instrumentos (no necesariamente microscopios) donde se desee estudiar muestras biológicas a temperatura controlada.

XI.- REFERENCIAS

1. Millipore, M. *CellASIC™ ONIX* [cited 2019 21 Marzo 2019].
2. Services, L.I. 10 Enero 2021]; Available from: <https://www.lis.ch/thebox.html>.
3. Kulesa, P.M.K.-K., Jennifer C. , *Construction of a Heated Incubation Chamber around a Microscope Stage for Time-Lapse Imaging*. Cold Spring Harbor Protocols, 2007.
4. Matsukawa, Y.I., Yuki; Umemura, Kazuo *Fabrication of Microscope Stage for Vertical Observation with Temperature Control Function*. Engineering, 2019.
5. Chagas, A.M.P.-G., Lucia L; Arrenberg, Aristides B; Baden, Tom *The €100 lab: A 3D-printable open-source platform for fluorescence microscopy, optogenetics, and accurate temperature control during behaviour of zebrafish, Drosophila, and Caenorhabditis elegans*. Plos Biology, 2017. **15**(7).
6. Dakappa, P.H. and C. Mahabala, *Analysis of Long-Term Temperature Variations in the Human Body*. Crit Rev Biomed Eng, 2015. **43**(5-6): p. 385-99.
7. Verastegui, M., et al., *Taenia solium oncosphere adhesion to intestinal epithelial and Chinese hamster ovary cells in vitro*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5158-66.
8. Zimic, M.J., et al., *Comparison of the peptidase activity in the oncospheres excretory/secretory products of Taenia solium and Taenia saginata*. J. Parasitol, 2007. **93**: p. (in press).
9. Verastegui, M., et al., *Experimental infection model for Taenia solium cysticercosis in swine*. Cysticercosis Working Group in Peru. Vet Parasitol, 2000. **94**(1-2): p. 33-44.
10. Garcia, H.H., et al., *Taenia solium cysticercosis*. Lancet, 2003. **362**(9383): p. 547-56.
11. Garcia, H.H., et al., *Hyperendemic human and porcine Taenia solium infection in Peru*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **68**(3): p. 268-75.
12. Bern, C., et al., *Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(5): p. 1203-9.
13. Zbigniew, S., *Taenia solium cysticercosis*, in *Taenia solium: Basic Biology and Transmission*, G. Singh and S. Prabhakaran, Editors. 2002, CAB International. p. 1-13.
14. Garcia, H.H., et al., *Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG)*. Lancet, 1993. **341**(8839): p. 197-200.
15. Garcia, H.H.G., Armando E; Tsang, Victor C W ; Gilman, Robert H; for the Cysticercosis Working Group in Peru, *Neurocysticercosis: some of the essentials*. Practical Neurology, 2006. **6**: p. 288-297.
16. Alberts, B.J., Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; and Walter, Peter, *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition ed. 2002.
17. Abramowitz, M.D., Michael W. , *The Microscopy*.
18. Histoptica. 7 Enero 2021]; Available from: <https://histoptica.wordpress.com/apuntes-de-optica/microscopios-2/caracteristicas-de-los-microscopios/tipos-de-microscopio/>.
19. Microscopio, M. 10 Enero 2021]; Available from: <https://www.mundomicroscopio.com/ocular/>.

20. Foto24. 7 Enero 2021]; Available from: <https://blog.foto24.com/aberraciones-cromaticas/>
21. Wikipedia. 7 Enero 2021]; Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Aberraci%C3%B3n_crom%C3%A1tica#/media/Archivo:Lens_chromatic_aberration.png.
22. Hernandez, G. 7 Enero 2021]; Available from: <https://gabrielhernandez.webcindario.com/AberracionEsferica.html>.
23. Aragonesa, P.e. 7 Enero 2021]; Available from: http://educativa.catedu.es/44700165/aula/archivos/repositorio/3000/3239/html/15_aberraciones_pticas.html.
24. University, G.S. *Hyperphysics*. 7 Enero 2021]; Available from: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/geoopt/aber3.html>.
25. Murphy, D.B., *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Editorial John Wiley & Sons.
26. Tipler, P.L., Ralph, *Modern Physics*. 6th ed. 2012.
27. Tiloom. 7 Enero 2021]; Available from: <https://www.tiloom.com/luz-artificial-i-diferencias-entre-las-fuentes-de-luz/>.
28. Fisher, T. 7 Enero 2021]; Available from: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?SID=srch-svtool&UID=191ph7>.
29. Nelsom, D.L.C., Michael, *Lehninger: Principios de Biochemistry*. 5th ed. 2007.
30. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID=125187.
31. Mortimer Abramowitz, M.W.D., *Microscopy*.
32. Freepng. 7 Enero 2021]; Available from: <https://www.freepng.es/png-pwc8dgl/>.
33. Nikon. *Microscopy*. 7 Enero 2021]; Available from: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/nikon-fluorescence-filter-sets/ultraviolet-excitation-filter-sets/ultraviolet-excitation-uv-2e-c-bandpass-emission>.
34. Expressions, M. *Optical Microscopy Primer*. 7 Enero 2021]; Available from: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/filters.html>.
35. Navarra, G.d.I.e.e.t.-U.d. *Termoelectricidad*. 7 Enero 2021]; Available from: [http://www.unavarra.es/ets02/Introduccion%20a%20TE\(c\).htm](http://www.unavarra.es/ets02/Introduccion%20a%20TE(c).htm).
36. Rowe, D., *CRC Handbook of Thermoelectrics*. 1995.
37. Gayé, J.B., *Formalismo y los métodos de la Termodinámica*. Vol. 1. 1997.
38. Smith, B.P.D.M.N.H.G.A.E.P.J., *Drag Reduction Methodologies for Circulation Control Applications*, in *50th AIAA Aerospace Sciences Meeting including the New Horizons Forum and Aerospace Exposition 2012*: Nashville, Tennessee.
39. Mantle, P.J., *Air cushion craft development*. 1980: U.S. Govt. Print. Off.
40. Reba, I., *Applications of the Coanda Effect*. Scientific American, 1966: p. pp. 84-92.
41. Byron W. Patterson, G.M.A.I., Emily D. Pertl, and James E. Smith, *Delay in Flow Separation for Circulation Controlled Cylinders*, in *ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (IMECE)*. 2010.
42. Ioffe, A.F., *Semiconductor thermoelements, and Thermoelectric cooling*. 1957.

43. Fisicoquímica. *La radiación de cuerpo negro*. 7 Enero 2021]; Available from: <http://www.quimicafisica.com/radiacion-cuerpo-negro-hipotesis-planck.html>.
44. Infratec. *Thermography*. 7 Enero 2021]; Available from: <https://www.infratec.eu/thermography/industries-applications/medicine/>.
45. ONE, F. 7 Enero 2021]; Available from: <https://www.flir.com.mx/products/flir-one-gen-3/>
46. Harding, K.G. *Heat transfer introduction*. 2018.
47. Lizárraga, W.B. *INSTRUMENTACIÓN PARA EL CONTROL DE PROCESOS INDUSTRIALES - Efecto Peltier*. 2001.
48. Cetronic. *PELTIER CELL TEC1-12710HTS - Datasheet*. 7 Enero 2021]; Available from: <https://www.cetronic.es/sqlcommerce/disenos/plantilla1/seccion/producto/DetalleProducto.jsp?idIdioma=1&idTienda=93&codProducto=740294011&cPath=255>.
24. <https://www.electronics-tutorials.ws/blog/convert-atx-psu-to-bench-supply.html>

accedida el 29 de Octubre de 2019.

XII.- ANEXOS

XII.1 Simulación de la Transferencia de Calor

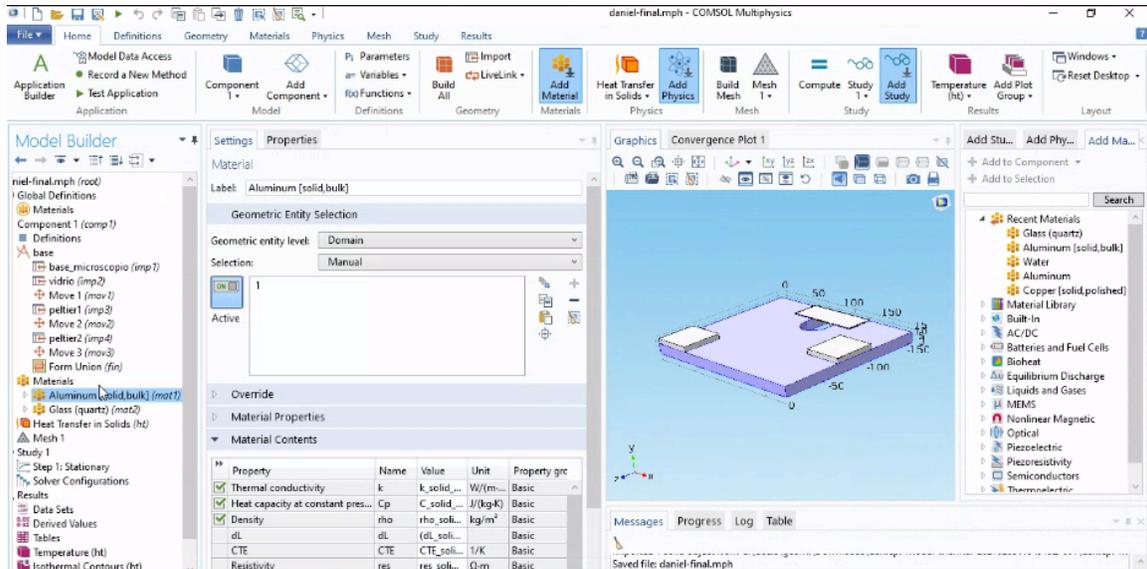
Para esta tesis se utilizó el software COMSOL Multiphysics para simular la transferencia de calor en el sistema compuesto por la base del microscopio, celdas Peltier y cámara porta muestra. El software COMSOL multiphysics tiene en su base de datos registrado diversos tipos de materiales, así al hacer el diseño se puede indicar que tipo de material es, lo cual define diversas propiedades físicas del material como por ejemplo su conductividades térmicas.

Se realizaron 2 simulaciones. La primera simulación siendo la transferencia de calor desde las celdas Peltier hasta la lámina porta muestra, y la segunda simulación sobre la transferencia de calor desde la lámina porta muestra hasta la lámina cubre objeto. Ambas láminas y el medio líquido en su interior conforman la cámara porta muestra.

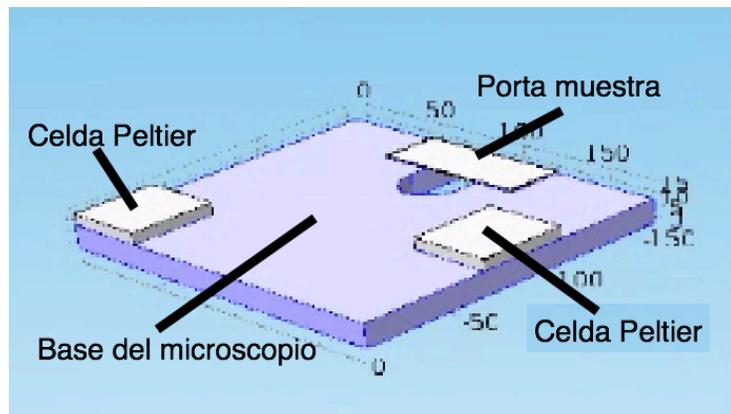
XII.1.1 Sistema: Celdas Peltiers-Base del Microscopio-lámina porta muestra

Para la primera simulación, se seleccionó la opción transferencia de calor en solidos y fluidos y se diseño la geometría del sistema a simular, compuesto por: (1) la base del microscopio (plancha metálica de aluminio de 20cm x 15cm x1cm), (2) Dos celdas Peltier de 4cmx4cm (representados en esta simulación por placas de aluminio las cuales tendrán

una temperatura fija) y una lámina porta muestra de 7cm x 2,5cmx0.1cm, de vidrio, dispuestas como se ve en la figura 53A y 53B.



A



B

Figura 53. Diseño de la estructura para la primera simulación. A. Diseño del sistema utilizando COMSOL, B. Estructuras simulada

Para esta simulación se fijo la temperatura de las celdas Peltier en 90 °C y la temperatura de la lámina porta muestra en 38°C. Luego se continuó con la opción “*compute*” y se inició la simulación. El resultado de la simulación nos da la distribución de temperaturas en el sistema en un momento dado de tiempo, donde se tiene fijas las temperaturas indicadas. El software permitía hacer una simulación para observar la transferencia de calor en el tiempo, pero dicha opción era muy pesada para mi computadora, por lo que finalmente obvié este tipo de simulación. La distribución final de temperaturas del sistema se puede apreciar en la figura 44.

Se pudo apreciar al hacer un zoom en la figura de la simulación la transferencia de calor entre la base del microscopio y los costados de la lámina porta muestra, como se aprecia en la figura 45, donde se puede apreciar que la zona de contacto entre ambas estructuras esta justamente a una temperatura intermedia entre 38 y 90°C, aproximadamente 70°C según la imagen 45.

En la figura 45 se puede apreciar la transferencia de calos entre la base del microscopio y un costado de la lámina porta muestra.

XII.1.2 Sistema: Base del Microscopio-lámina porta muestra-Agua-lámina cobre objeto

Se seleccionó también la opción transferencia de calor en solidos y fluidos en el software y se diseño la geometría del segundo sistema a simular. Aquí simulamos la diferencia de

temperaturas encontradas entre la lámina porta objeto que esta a la misma temperatura que la base del microscopio y la lámina cubre objeto. El sistema diseñado para esta simulación fue: (1) lámina porta objeto de vidrio de 7cmx25,cmx0,1cm, (2) agua (simulada con dimensiones de 2,5x2,5cmx0,1cm) y (4) lámina cubre objeto de vidrio de 2,5cmx2,5cmx01cm. Aquí la sección de agua representa el medio liquido que contiene las muestras biológicas, el cual contiene principalmente agua, sales y las oncósferas de *Taenia solium*, en los experimentos realizados en esta tesis.

Esta simulación de transferencia de calor se realizo de manera muy similar a la descrita anteriormente en la sección XII.1.1 de esta tesis.

La figura 46 presenta la distribución de temperatura final de esta simulación. Con la finalidad de poder observar mejor esta distribución de temperaturas, en el diseño se desplazo la lámina superior (lámina cubre objeto) 0,1 mm a un costado. Así, es posible observar la temperatura de la muestra de agua bajo ella. En esta simulación, la temperatura de la lámina inferior (porta muestra) se fijo en 38 °C debido a que esta en contacto con la base del microscopio y tendría su misma temperatura. y se estimo la temperatura de la lámina cubre objeto. La figura 46 muestra el resultado de esta simulación, notándose que la temperatura final de la lámina cubre objeto fue de 35,8 °C y la de la muestra de agua de alrededor de 37 °C.