

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Máster

Microscopio de bajo coste con capacidad de fluorescencia y espectroscopía Raman para la identificación de fitoplancton

(Low-cost microscope system with fluorescence and Raman
spectroscopy capabilities for phytoplankton identification)

Para acceder al Título de

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de la Luz

Autor: **María Gabriela Fernández Manteca**

Septiembre 2021



E.T.S. DE INGENIEROS INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LA LUZ
CALIFICACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Realizado por: **María Gabriela Fernández Manteca**
Directores del TFM: **Adolfo Cobo García y Luis Rodríguez Cobo**
Título: "Microscopio de bajo coste con capacidad de fluorescencia y espectroscopía Raman para la identificación de fitoplancton"
Title: "Low-cost microscope system with fluorescence and Raman spectroscopy capabilities for Phytoplankton identification"

Presentado a examen el día: **29 de septiembre de 2021**

para acceder al Título de

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de la Luz

Composición del tribunal:

Presidente: Olga M^a Conde Portilla
Secretario: Jesús Mirapeix Serrano
Vocal: M^a Dolores Ortiz Márquez

Este Tribunal ha resuelto otorgar la calificación de:

Fdo.: El Presidente

Fdo.: El Secretario

Fdo.: El Vocal

Fdo.: El Director del TFM

V^o B^o del Subdirector

Trabajo Fin de Máster N^o
(a asignar por Secretaría)

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Microscopio de bajo coste con capacidad de fluorescencia y espectroscopía Raman para la identificación de fitoplancton

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de la Luz

ETS de Ingenieros Industriales y de Telecomunicación
Grupo de Ingeniería Fotónica (GIF)

por *María Gabriela Fernández Manteca*

Resumen

El fitoplancton es el conjunto de seres vivos unicelulares de origen vegetal con capacidad de realizar la fotosíntesis que pueblan las aguas marinas y dulces de todo el planeta. Son una parte fundamental de estos ecosistemas por ser alimento primario y regular la concentración de oxígeno en el agua, fijando el CO₂ atmosférico. Los sucesos en los que el fitoplancton sufre un rápido aumento en su población se conocen como floraciones de algas. Una floración de algas nocivas (*harmful algal bloom*, HAB) ocurre cuando causa impactos negativos al producir toxinas naturales, originando consecuencias fatales tanto a otros organismos como al medio ambiente natural y con importantes repercusiones económicas, por ejemplo, para la industria de la acuicultura.

La detección de las HAB cuando los niveles de toxinas son alarmantes se produce con poca antelación, por lo que es de gran importancia el desarrollo de herramientas de detección y predicción tempranas. Las soluciones actuales que contribuyen a cubrir esta brecha suelen consistir en equipos de laboratorio costosos y de gran complejidad que requieren de profesionales altamente capacitados con una experiencia casi única en la identificación visual de especies dañinas. Por ello, es fundamental el desarrollo de métodos de identificación y cuantificación rentables, rápidos y fiables.

En este trabajo se lleva a cabo la construcción de un microscopio de bajo coste imprimible en 3D, basado en el proyecto OpenFlexure, desarrollado por investigadores de la Universidad de Bath. El objetivo es la mejora del diseño para permitir un análisis *in situ* del fitoplancton, incorporando un sistema de microfluídica y tres modalidades de microscopía: campo claro, fluorescencia y espectroscopía Raman. Además de la construcción del microscopio OpenFlexure, se han realizado propuestas de rediseño, que se han simulado, probado experimentalmente y validado tras compararlas con equipos de referencia de laboratorio.

Palabras clave – Microscopio, OpenFlexure, Fitoplancton, Floración de algas nocivas, Fluorescencia, Clorofila-a, Raman.

UNIVERSITY OF CANTABRIA

Low-cost microscope system with fluorescence and Raman spectroscopy capabilities for Phytoplankton identification

University Master's Degree in the Science and Engineering of Light

Superior Technical School of Industrial and Telecommunication Engineers

Photonics Engineering Group

by *María Gabriela Fernández Manteca*

Abstract

Phytoplankton is the set of unicellular living beings of plant origin with the capacity to carry out photosynthesis that populate marine and fresh waters all over the world. They are a fundamental part of these ecosystems because they are a primary food and because they regulate the concentration of oxygen in the water, fixing the atmospheric CO₂. Events in which phytoplankton rapidly increases in population are known as algal blooms. A harmful algal bloom (HAB) occurs when it causes a negative impact on the environment by producing natural toxins. This leads to fatal consequences both to other organisms and to the natural environment as well as significant economic repercussions, for example, in the field of aquaculture industry.

The detection of HABs when toxin levels are alarming occurs at short notice, so the development of early detection and prediction tools is of great importance. Current solutions that help to bridge this gap often consist of expensive and highly complex laboratory equipment requiring highly trained professionals with almost unique expertise in visual identification of harmful species. Therefore, the development of cost-effective, rapid and reliable identification and quantification methods is essential.

In this research work, a low-cost 3D-printed microscope is constructed based on the OpenFlexure project, developed by researchers at the University of Bath. The objective is to improve the design to allow in-situ analyses of phytoplankton, incorporating a microfluidic system and three microscopy modalities: brightfield, fluorescence and Raman spectroscopy. In addition to the construction of the OpenFlexure microscope, redesigned proposals have been made, which have been simulated, experimentally tested and validated against laboratory reference equipment.

Key words – Microscope, OpenFlexure, Phytoplankton, Harmful algal bloom, Fluorescence, Chlorophyll-a, Raman.

Agradecimientos

A Adolfo, por su confianza en mí y su capacidad para hacerme creer en mi trabajo. A Luis por su seguimiento y apoyo.

A Diego, por hacerme ver la importancia de desconectar.

A Vero y Pablo Roldán, que se merecen un verdadero monumento por su constante apoyo y asistencia, tanto anímica como formal. A todo el grupo del GIF que dedicaron parte de su tiempo en pasar por mi mesa y animarme, en especial a Olga, Javi, Arturo y Alba.

A Fidel Madrazo, de IDIVAL, y Agustín Monteoliva, de Ecohydros, que se han implicado personalmente para que este trabajo salga adelante.

A mis amigas y amigos, los Javis, Fátima, Teja, Rulo, Toraya, Inés, Diego Cruz y todos los demás, por interesarse por cómo estaba sobrellevando todo este proceso, por las mañanas de cafés y las tardes de CDs.

Por último, pero no menos importante, a mi familia, que han posibilitado mi formación sin que nunca me faltase de nada.

Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	III
Índice de tablas	VII
Acrónimos	VIII
1 Introducción	1
1.1 Contexto y motivación	1
1.2 Objetivos	4
1.3 Estructura del documento	4
2 Fundamentos teóricos	6
2.1 Principios y conceptos teóricos de microscopía	7
2.1.1 Camino óptico en un microscopio digital	7
2.1.2 Instrumentación básica	8
2.1.3 Conceptos clave en microscopía	11
2.2 Microscopía de fluorescencia	17
2.2.1 Principios de fluorescencia	18
2.2.2 Fluorescencia para la identificación de fitoplancton nocivo	20
2.3 Microscopía Raman	22
2.3.1 Espectroscopía Raman	22
2.3.2 Pre-procesado espectral	24
3 Setup del microscopio OpenFlexure	26
3.1 Materiales y construcción del microscopio	27
3.1.1 Base de impresión 3D	27
3.1.2 Módulo de iluminación	27
3.1.3 Módulo óptico de alta resolución	28
3.1.4 Ensamblaje de motores y electrónica	29
3.1.5 Configuración final del microscopio de campo claro	30
3.2 Modificaciones en el diseño original OFM	31
3.2.1 Cambios en el módulo de iluminación	31
3.2.2 Cambios en el módulo óptico	32

3.2.3	Adición de filtros	35
3.2.4	Módulo de espectroscopía Raman	37
3.3	Simulaciones realizadas con OpticStudio	39
4	Otros setup	42
4.1	Microscopio confocal NIKON A1R	42
4.2	Microscopio confocal Raman JASCO NRS-4500	44
4.3	Módulo de microfluídica	46
5	Resultados y análisis	48
5.1	Microscopía de campo claro	48
5.2	Microscopía de fluorescencia	51
5.2.1	Comparación entre los equipos de fluorescencia	51
5.2.2	Procesado de imágenes de fluorescencia	53
5.3	Espectroscopía Raman	56
5.3.1	Comparación entre los equipos de espectroscopía Raman	56
5.3.2	Espectroscopía Raman aplicada a muestras de fitoplancton	57
5.3.3	Pre-procesado espectral	59
5.3.4	Identificación de bandas Raman asociadas a fitoplancton	61
6	Conclusiones y líneas futuras	62
6.1	Conclusiones	62
6.2	Líneas futuras y mejoras del <i>setup</i> experimental	63
	Bibliografía	65

Índice de figuras

1 Introducción

- 1.1 Autofluorescencia roja de pigmentos fotosintéticos pertenecientes a varias especies de diatomeas: (a) *Fragilaria crotonensis*, (b) *Asterionella formosa* y (c) *Aulacoseira italica*. 3
- 1.2 Estructura general del documento. El código de colores indica el capítulo en el que se encuentra cada una de las partes. 5

2 Fundamentos teóricos

- 2.1 Configuración básica en un microscopio digital. 7
- 2.2 Espectro de emisión de un LED blanco originado por conversión de fósforos. 8
- 2.3 Tipos de filtros que permiten seleccionar determinadas longitudes de onda: (a) Paso largo, (b) Paso corto y (c) Paso banda. 10
- 2.4 Sensores digitales más utilizados en microscopía moderna: (a) CCD, (b) CMOS y (c) EMCCD. 10
- 2.5 Distancia de trabajo de un objetivo según su apertura numérica. 11
- 2.6 Dependencia de la profundidad de campo con la apertura numérica del objetivo. 13
- 2.7 Dos puntos separados por el límite de resolución de Rayleigh. 15
- 2.8 Superposición de la PSF y resolución de dos emisores puntuales a diferentes distancias radiales. 16
- 2.9 Diagrama de Jablonski para la fluorescencia. 19
- 2.10 Espectros de absorción y emisión de una determinada sustancia. Se muestra el espectro de absorbancia a una longitud de onda más corta (mayor energía) y el espectro de fluorescencia resultante de la luz emitida a una longitud de onda más larga (menor energía). 19
- 2.11 Fluorescencia de una muestra de alga utilizando luz de excitación azul fluorescente. Se observa en verde la luz monocromática de transmisión y en rojo la autofluorescencia de la clorofila. 20
- 2.12 Espectros de absorción y emisión de clorofila-a. 21
- 2.13 Diagrama de las transiciones de energía producidas en los procesos de dispersión Raman, Stokes y anti-Stockes, y de su espectro asociado. 23
- 2.14 Representación de un espectro Raman característico de un material (en magenta), un espectro Raman perturbado por diferentes señales de ruido (en cyan) y su línea base ligada a la señal de fluorescencia (en amarillo). 24

3 Setup del microscopio OpenFlexure

3.1	Piezas que conforman el cuerpo del microscopio OpenFlexure.	27
3.2	Piezas que conforman el módulo de iluminación del microscopio OpenFlexure.	28
3.3	Espectro de emisión del LED blanco utilizado para la iluminación en transmisión.	28
3.4	Elementos que conforman el módulo óptico de alta resolución.	28
3.5	Objetivo 40x DM-WJ003.	29
3.7	Descripción general del diseño del microscopio OpenFlexure en configuración de campo claro.	30
3.8	Anillo de iluminación LED utilizado para adquirir imágenes en configuración de epi-iluminación.	31
3.9	Espectros de transmisión en el rango UV de los materiales (a) polimetilmetacrilato (PMMA) y (b) sílice fundida.	32
3.10	Módulo de cámara HQ para Raspberry Pi.	33
3.11	Extracción del filtro IR del módulo de cámara v2.	33
3.12	Fluorescencia de una muestra de aceite visualizada a través del módulo de cámara (a) v2 con filtro IR y (b) v2 sin filtro IR, bajo las mismas condiciones de iluminación.	33
3.14	Portamuestras de calibración con diferentes escalas. Se ha utilizado la escala con divisiones de 10 μm	34
3.15	Vista de una de las reglas de calibración a través del microscopio utilizando un objetivo de 40x y sus correspondientes calibraciones teniendo en cuenta que el espacio entre líneas es de 10 μm . Las configuraciones estudiadas son: (a) cámara v2 con lente correctora, (b) cámara v2 sin lente correctora, (c) cámara HQ con lente correctora y (d) cámara HQ sin lente correctora.	35
3.18	Esquema de los componentes ópticos que conforman la sonda RamanProbe™.	37
3.19	Montaje experimental del módulo de espectroscopía Raman implementado al OFM con sus partes	38
3.20	Diseño óptico del tubo del microscopio OFM con lente correctora.	39
3.21	Diseño óptico del tubo del microscopio OFM sin lente correctora.	39
3.23	Diagrama de aberraciones de Seidel correspondiente al sistema con lente correctora.	40
3.24	Diagrama de aberraciones de Seidel correspondiente al sistema sin lente correctora.	41

4 Otros setup

4.1	Componentes de un microscopio confocal en configuración espectral.	43
4.2	Microscopio confocal NIKON A1R.	44
4.3	Esquema de los componentes ópticos que conforman el equipo NRS-4500	45
4.4	Equipo NRS-4500 JASCO con la compuerta cerrada (a) y abierta (b).	46
4.5	Esquema del módulo de microfluídica implementado.	46

4.6 Configuración experimental del sistema de microfluídica desarrollado. 47

5 Resultados y análisis

5.1 Imágenes de muestras de fitoplancton adquiridas con el microscopio OpenFlexure en configuración de transmisión utilizando diferentes objetivos, (a) 20x con lente correctora y módulo de cámara v2, (b) 10x con lente correctora y cámara v2, (c) 40x con lente correctora y cámara v2 y (d) 40x con lente correctora y cámara HQ. 49

5.2 Imágenes de muestras de fitoplancton adquiridas con el microscopio OpenFlexure en configuración de campo claro con un sistema de microfluídica. Ambas fotografías se han tomado utilizando un objetivo 40x, el módulo de cámara v2 y sin lente correctora. 50

5.3 Imágenes de fluorescencia de muestras de fitoplancton obtenidas con el microscopio OpenFlexure desarrollado en este trabajo. 51

5.4 Comparación entre imágenes obtenidas con el microscopio OpenFlexure en configuración de (a) campo claro y (b) fluorescencia. 52

5.5 Imágenes de fluorescencia de muestras de fitoplancton obtenidas con el equipo comercial Nikon A1R. 53

5.7 Resultado de una de las umbralizaciones realizadas mediante el procesado de imagen desarrollado con el objetivo de determinar el porcentaje de fitoplancton presente en la imagen. En (a) se muestra la imagen original, con los esqueletos del fitoplancton en color azul y la fluorescencia en rojo, y en (b) el resultado de la umbralización, en color verde, de las partes del esqueleto. 54

5.8 Presencia de fitoplancton relativa a la totalidad de cada una de las imágenes tomadas. 55

5.9 (a) Histograma 3D de la cuantificación de la fluorescencia sobre el porcentaje total de fitoplancton detectado por imagen, con escala de color indicando la distribución de sus intensidades. (b) *Boxplot* de la distribución de la fluorescencia detectada en cada una de las imágenes consideradas. 55

5.10 (a) Espectro Raman de una muestra de acetona obtenido experimentalmente mediante la sonda RamanProbe™. (b) Espectro Raman de acetona tomado como referencia. 56

5.11 Espectros Raman de una muestra de fitoplancton obtenidos experimentalmente utilizando (a) el módulo de espectroscopía Raman incorporado al OFM y (b) el equipo NRS-4500. 57

5.12 (a) Fitoplancton en gota seca a 100 aumentos visualizado con el equipo NRS-4500 JASCO. (b) Comparación de dos espectros Raman adquiridos sobre un mismo punto de la muestra. 58

5.13 Espectros Raman adquiridos en once puntos de la muestra de fitoplancton estudiada. 58

5.14 Espectros Raman de fitoplancton originales junto con sus correspondientes líneas base, obtenidas mediante el algoritmo ALS. 59

5.15 Espectros Raman de fitoplancton corregidos, obtenidos mediante la resta de las líneas base a los espectros originales.	60
5.16 Espectros Raman de fitoplancton normalizados y promediados.	60
5.17 Identificación de las tres bandas Raman más significativas atribuidas a la presencia de fitoplancton.	61

Índice de tablas

2 Fundamentos teóricos

2.1 Comparación de las longitudes de onda máximas de emisión por fluorescencia medidas por diferentes equipos comerciales al excitar con sus fuentes de iluminación más próximas al máximo de absorción esperado para cada grupo pigmentario.	22
---	----

3 Setup del microscopio OpenFlexure

3.1 Especificaciones del objetivo de microscopio DM-WJ003.	29
3.2 Especificaciones del módulo de cámara Raspberry Pi v2.	29
3.3 Especificaciones de las diferentes fuentes utilizadas experimentalmente.	31
3.4 Especificaciones de los diferentes objetivos utilizados experimentalmente.	32
3.5 Comparación entre las especificaciones de módulos de cámara v2 y HQ.	33
3.6 Especificaciones técnicas del láser MGL-H-532 de CNI Laser.	38
3.7 Especificaciones técnicas del espectrómetro Maya2000 Pro de Ocean Insight.	38

5 Resultados y análisis

5.1 Resolución de imagen y tamaño del campo de visión (FOV) según el módulo de cámara utilizado y la presencia o no de lente correctora.	49
5.2 Asignación de las tres bandas Raman más significativas de las muestras de fitoplancton a sus correspondientes vibraciones moleculares asociadas.	61

6 Conclusiones y líneas futuras

6.1 Presupuesto aproximado de la configuración más básica del microscopio OpenFlexure.	63
--	----

Acrónimos

HAB	Harmful Alga Bloom	PLA	PolyLactic Acid
OFM	OpenFlexure Microscope	PMMA	Polymethyl Methacrylate
LED	Light-Emitting Diode	RMS	Royal Microscopy Society
NA	Numerical Aperture	ARC	Anti-Reflective Coating
WD	Working Distance	RPi	Raspberry Pi
RF	RadioFrequency	GUI	Graphic User Interface
LP	Long-Pass	FWHM	Full Width at Half Maximum
SP	Short-Pass	VIS	Visible
BP	Band-Pass	UV	Ultraviolet
CCD	Charge-Coupled Device	IR	Infrared
CMOS	Complementary Metal-Oxide Semiconductor	HQ	High-Quality
EMCCD	Electron Multiplying Charge-Coupled Device	GIA	Geometric Image Analysis
RGB	Red, Green, Blue	PMT	Photomultiplier Tube
DOF	Depth Of Field	PFS	Perfect Focus System
FOV	Field Of View	BS	Beam Splitter
PSF	Point Spread Function	DM	Dichroic Mirror
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction	RI	Refractive Index
PFT	Phytoplankton Functional Types	OPD	Optical Path Difference
ALS	Alternating Least Square	ROC	Radius of Curvature
		SMF	Single-Mode Fiber

1

Introducción

1.1	Contexto y motivación	1
1.2	Objetivos	4
1.3	Estructura del documento	4

1.1. Contexto y motivación

El fitoplancton es el conjunto de seres vivos unicelulares de origen vegetal con capacidad de realizar la fotosíntesis que pueblan las aguas marinas y dulces en todo el planeta. Son una parte fundamental de estos ecosistemas al ser el alimento primario y, además, regulan la concentración de oxígeno en el agua y fijan el CO₂ atmosférico. Se calcula que absorben y convierten en materia orgánica entre el 30 y el 50 % del CO₂ generado por la combustión de combustibles fósiles. Los sucesos en los que el fitoplancton sufre un rápido aumento en su población se conocen como floraciones de algas. Una floración de algas nocivas (también conocido por sus siglas HAB, del inglés *harmful algal bloom*) ocurre cuando causa impactos negativos al producir toxinas naturales, originando daño a otros organismos. Estos eventos son conocidos coloquialmente como “mareas rojas”, ya que en algunos casos estos organismos tiñen el agua de ese color. También se habla de “mareas marrones” cuando la alta proliferación reduce drásticamente el oxígeno disuelto en agua, llevando a la muerte a estos organismos de forma masiva. Por lo tanto, las HAB constituyen una grave amenaza para la salud pública, provocando enormes pérdidas en la pesca y otros sectores productivos en todo el mundo.

El problema de las HAB está muy extendido en todos los mares del mundo y su tendencia va en aumento. Las mareas rojas causan daños económicos de gran alcance a las actividades extractivas y acuícolas. También representan un riesgo para la salud de los consumidores, ya que varias de estas especies son productoras de toxinas de diferentes tipos, que pueden acumularse en los tejidos de los productos de consumo relacionados con estas actividades. En

ambos casos se producen importantes pérdidas económicas, ya sea por el deterioro o muerte de los cultivos o por la imposibilidad de comercializarlos.

Un ejemplo claro es su efecto en la producción de mejillón para la industria española, segunda mayor productora del mundo, después de China y, particularmente, para Galicia, líder europeo en la producción y comercialización de mejillón alcanzando las 255.500 toneladas y 112 millones de euros en 2020 [1]. Las toxinas presentes en el agua causadas por las HAB pueden ralentizar la recolección y, si los mejillones alcanzan la maduración sexual, la calidad de la carne disminuye, por lo que el desarrollo masivo de especies de fitoplancton afecta drásticamente a la industria de las costas gallegas. Las mareas rojas también provocan daños a los organismos cultivados y afectan a la salud de los clientes. El grupo de fitoplancton que ha provocado los episodios más tóxicos a lo largo de los años es el grupo de los dinoflagelados, en el que destacan *Gymnodinium catenatum* y *Gonyaulax tamarensis* Lebour, ambos productores de la toxina paralizante, así como *Dinophysis acuta* Ehrefberg y *Dinophysis acuminata*, responsables de los trastornos gastrointestinales por ingesta de marisco.

No obstante, el fitoplancton clasificado como potencialmente dañino no pertenece a un solo grupo evolutivamente distinto. Los HAB abarcan la mayoría de las especies de algas, incluidas las eucariotas (dinoflagelados, radidofitos, diatomeas, euglenófitos, criptofitos, alptofitos y clorofitos) y procariotas microbianas (cianobacterias). Aproximadamente el 2% de todos los organismos de fitoplancton son tóxicos. El grupo de dinoflagelados es el que representa la mayoría (75%) de las especies vinculadas a eventos de HAB a nivel global. Los dinoflagelados son organismos eucariotas unicelulares microscópicos que se caracterizan por tener un tipo especializado de núcleo llamado *dinokaryon*. Estos microorganismos habitan en una amplia diversidad de ambientes acuáticos, tanto en agua dulce como marina, y en todas las latitudes, aunque la mayoría de especies son de ambientes marinos. Los factores que pueden desencadenar la aparición de HAB y la producción de toxinas son, entre otros: nutrientes, temperatura, salinidad, irradiancia y depredación. El conocimiento de HAB ha mejorado de manera crítica durante la última década, pero debido a su complejidad, los factores que causan estos eventos aún deben entenderse mejor.

En muchos casos, la clasificación tradicional de dinoflagelados basada en las características morfológicas no es suficiente. Por ello, es necesario desarrollar otras técnicas que permitan identificar aquellos organismos perjudiciales.

La identificación y medición de determinadas características del fitoplancton son tareas importantes para la gestión y la salud de las cuencas hidrográficas, así como para la acuicultura y la industria de los mariscos. El proceso estándar de oro utilizado para identificar y cuantificar las algas requiere profesionales altamente capacitados para observar manualmente las algas bajo un microscopio, lo que es una tarea tediosa y que requiere mucho tiempo [2,3]. En la práctica, el monitoreo cuantitativo de rutina del fitoplancton en el agua es costoso y desafiante, ya que requiere un equipo sofisticado y una experiencia casi única. Se necesitan métodos de identificación y cuantificación rentables, rápidos y fiables, por lo que es fundamental implementar técnicas de medición que faciliten esta tarea.

Uno de estos métodos que ayuda a identificar el fitoplancton es observar la fluorescencia, ya que los pigmentos fotosintéticos producidos por las células del fitoplancton (especialmente la clorofila-a) tienen la capacidad de autofluorescencia cuando se exponen a frecuencias de luz específicas (Figura 1.1). Las imágenes de fluorescencia permiten el reconocimiento automá-

tico basado en datos multispectrales que identifican la proporción de diferentes pigmentos fotosintéticos y dan una huella dactilar única de las algas [4, 5]. Estudios recientes muestran que los algoritmos de procesamiento de imágenes basados en la mejora de la fluorescencia pueden identificar y contar con precisión las células de algas con mayor sensibilidad que los métodos actuales sin la necesidad de equipos costosos [6]. La mayoría de los procedimientos de análisis de imágenes utilizan únicamente características morfológicas y su éxito se limita a un número de tres a seis especies [7].

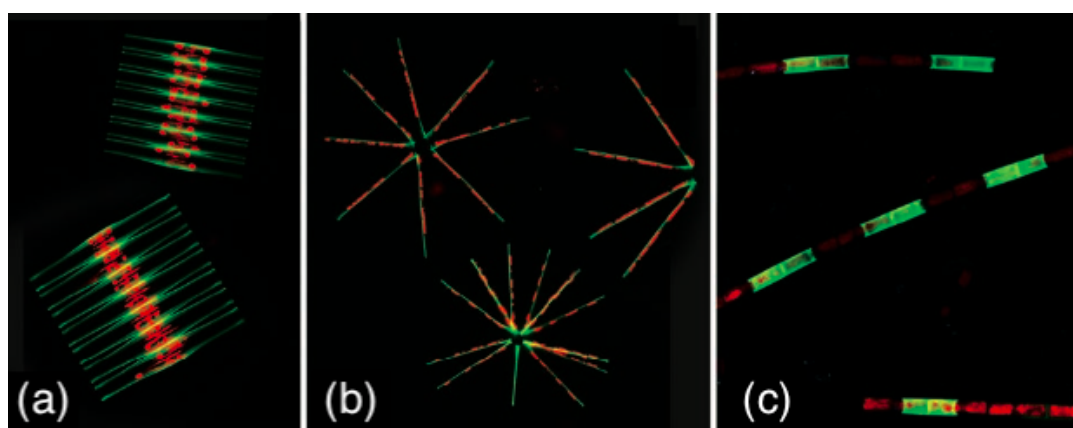


Figura 1.1. Autofluorescencia roja de pigmentos fotosintéticos pertenecientes a varias especies de diatomeas: (a) *Fragilaria crotonensis*, (b) *Asterionella formosa* y (c) *Aulacoseira italica*. [8]

La detección de una marea roja, de los niveles alarmantes de toxinas en el agua y los organismos se produce con poca antelación, por lo que se ha generado mucho interés en el desarrollo de herramientas de detección y predicción tempranas. Los métodos de observación y predicción utilizados en todo el mundo se centran en aplicaciones de área amplia [9]. Las observaciones del medio marino y los parámetros biológicos de la teledetección utilizando satélites y aviones son útiles. Por lo tanto, las tecnologías de medición *in situ* confiables y portátiles continúan siendo enfoques modernos para enfrentar el desafío de una detección temprana de las HAB.

La identificación y medición precisas del fitoplancton tiene impactos ambientales, económicos, sociales y de salud. Se necesitan métodos de muestreo, identificación y cuantificación rentables, rápidos y fiables [10]. Es importante desarrollar un dispositivo capaz de identificar determinados organismos *in situ*, ya que las diatomeas, cianobacterias y dinoflagelados podrían modificar sus características cuando se cultivan o se fijan.

Las soluciones actuales que contribuyen a cubrir esta brecha limitante suelen ser equipos de laboratorio costosos y de gran complejidad. En este trabajo se pretende hacer uso de tres modalidades microscópicas, campo claro, fluorescencia y espectroscopía Raman, para tratar de identificar las HAB. Se espera que la integración de estos tres tipos de análisis proporcione una herramienta poderosa para el análisis de fitoplancton en muestras complejas. Por ejemplo, estudios recientes demuestran que los algoritmos de procesamiento de imágenes que utilizan la mejora de la fluorescencia permiten una identificación y enumeración precisas de las células de las algas con mayor sensibilidad que los métodos actuales sin requerir de equipos costosos [6].

1.2. Objetivos

Una vez expuesta la motivación de este Trabajo Fin de Máster, se define el objetivo general como la construcción de un microscopio de bajo coste imprimible en 3D y basado en el diseño realizado por investigadores de la Universidad de Bath denominado OpenFlexure (OpenFlexure *Microscope*, OFM) [11] que permita realizar análisis *in situ* para la identificación de fitoplancton mediante un sistema de microfluídica.

Para llevar a cabo este objetivo, se definen los siguientes pasos intermedios:

- Construcción de un microscopio basado en OpenFlexure que permita obtener imágenes en transmisión y reflexión utilizando diversos elementos ópticos (objetivos, fuentes de iluminación, detectores, lentes, filtros...)
- Incorporación de módulos adicionales, como fuentes para la excitación de fluorescencia, un módulo que permita realizar espectroscopía Raman u otro para implementar un sistema de microfluídica.
- Diseño, simulación y optimización de los sistemas ópticos desarrollados.

1.3. Estructura del documento

En esta sección se detalla la estructura del documento, ofreciendo una breve descripción de cada uno de los seis capítulos que lo conforman.

- **Capítulo 1. Introducción**

El actual capítulo tiene por objetivo presentar el estado del arte de la problemática de las floraciones de algas nocivas, motivo por el que surge este trabajo, y que permite fijar los objetivos y clarificar la estructura de la memoria.

- **Capítulo 2. Fundamentos teóricos**

En el segundo capítulo se ofrece una introducción teórica de todos aquellos conceptos importantes que se van a tratar y donde se presentan los conceptos básicos para comprender el trabajo realizado.

- **Capítulo 3. Setup, modificaciones y optimización del microscopio OpenFlexure**

El capítulo 3 comprende la elaboración del setup experimental utilizado en este trabajo. Primero, se muestra el OFM inicial sin haber realizado ninguna modificación y, posteriormente, se ofrece una descripción de los módulos añadidos y mejoras desarrolladas en este trabajo (fluorescencia, Raman, adición de filtros, implementación de anillos de iluminación...). Finalmente, se realiza una serie de simulaciones de la óptica del sistema utilizando el *software* de diseño óptico OpticStudio de Zemax.

- **Capítulo 4. Otros setup**

A parte de la configuración experimental desarrollada en este trabajo, se han utilizado otras para complementar y ayudar a clarificar los resultados del mismo. En este capítulo se describen los equipos utilizados para complementar al OFM. Concretamente, se ha utilizado el microscopio confocal NIKON A1R y el microscopio confocal Raman NRS-4500 JASCO. Además, en este capítulo también se muestra el setup de microfluídica implementado.

- **Capítulo 5. Resultados**

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos. En primer lugar, se muestran los resultados del montaje del OFM en transmisión. Posteriormente, se ofrece la caracterización de las fuentes utilizadas en el trabajo. Después, los resultados de los módulos adicionales implementados al OFM, fluorescencia y Raman y, finalmente, se muestran los resultados del post-procesado de datos, utilizando ImageJ y Matlab para el procesado de imágenes y Python para el procesado espectral.

- **Capítulo 6. Conclusiones y líneas futuras**

Como cierre del documento, en el capítulo 6 se describen las principales conclusiones extraídas del trabajo realizado, así como las líneas futuras y posibles mejoras del dispositivo experimental desarrollado con el fin de una posible continuación de esta línea de trabajo.

La [Figura 1.2](#) ofrece un esquema de la estructura general del trabajo realizado, donde se indican sus partes y la ubicación de las mismas dentro del documento.

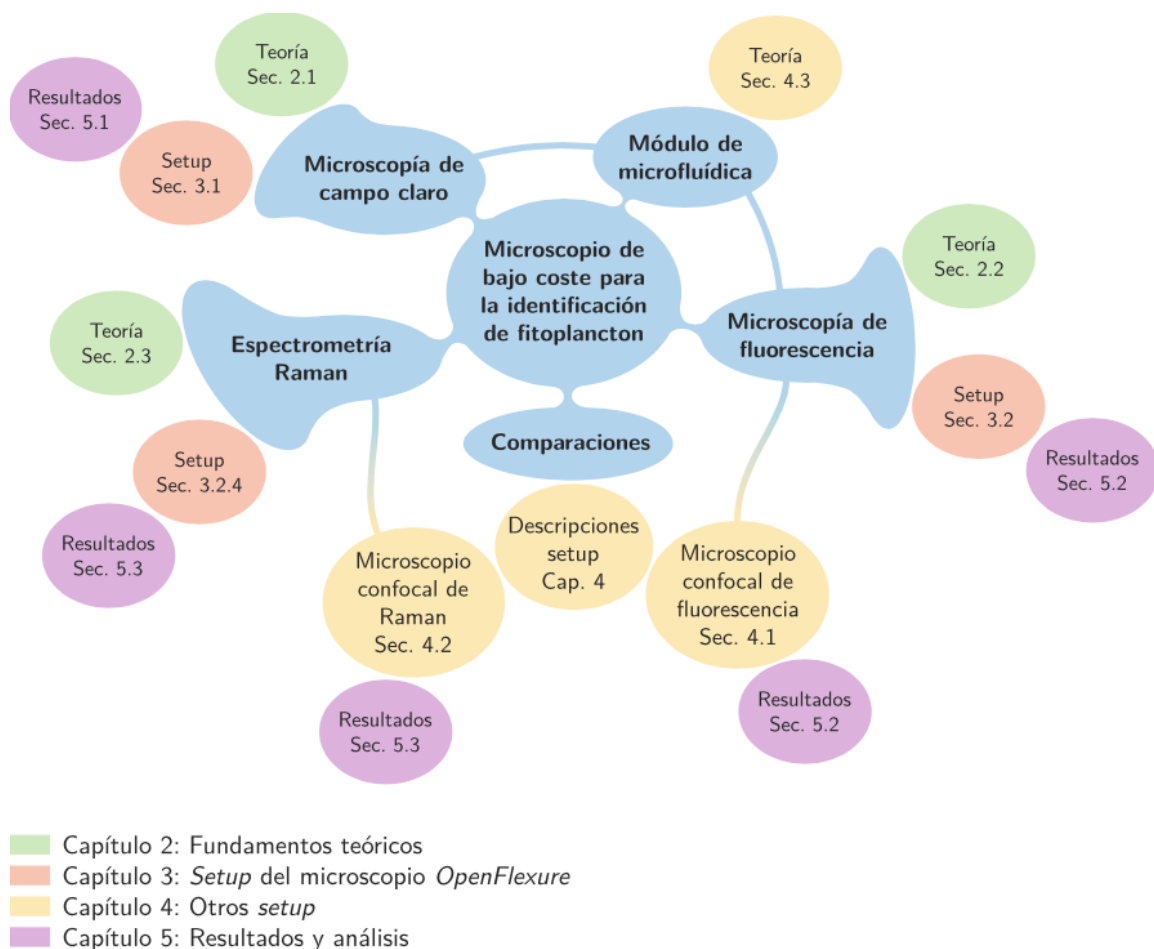


Figura 1.2. Estructura general del documento. El código de colores indica el capítulo en el que se encuentra cada una de las partes.

2

Fundamentos teóricos

2.1 Principios y conceptos teóricos de microscopía	7
2.1.1 Camino óptico en un microscopio digital	7
2.1.2 Instrumentación básica	8
2.1.3 Conceptos clave en microscopía	11
2.2 Microscopía de fluorescencia	17
2.2.1 Principios de fluorescencia	18
2.2.2 Fluorescencia para la identificación de fitoplancton nocivo	20
2.3 Microscopía Raman	22
2.3.1 Espectroscopía Raman	22
2.3.2 Pre-procesado espectral	24

La microscopía puede considerarse una técnica básica para el examen de fitoplancton y de muchas otras muestras relacionadas con las ciencias de la vida y la salud. En particular, la obtención de imágenes con microscopios ópticos de objetos tridimensionales de estructura compleja, con un cierto espesor y bajo contraste debido a la falta de color intrínseco, presentan una serie de desafíos para los tipos convencionales de iluminación. Esto también se aplica a la formación de imágenes de objetos con grandes diferencias en densidad, así como a los detalles de cambio de fase y absorción de luz.

Este capítulo ofrece una revisión de los fundamentos teóricos necesarios para comprender el trabajo realizado. Primeramente, en la [Sección 2.1](#) se describen los principios y conceptos ópticos básicos utilizados en microscopía. La [Sección 2.2](#) acomete la teoría relacionada con la microscopía de fluorescencia, distinguiendo por una parte entre los principios básicos y por otra su aplicación para la identificación de fitoplancton. Finalmente, en la [Sección 2.3](#) se abordan los principios de la microscopía y espectroscopía Raman, así como alguna de las consideraciones de pre-procesado espectral más importantes que se deben tener en cuenta para el correcto tratamiento de espectros Raman.

2.1. Principios y conceptos teóricos de microscopía

A continuación se describen los principios fundamentales de la microscopía. En esencia, un microscopio típico es un dispositivo diseñado para sostener diferentes lentes en las posiciones precisas para que la luz se pueda amplificar con precisión desde la muestra hasta llegar a un detector, que puede ser el ojo humano o un sensor. La resolución y el contraste en microscopía óptica se obtienen a través de una serie de estrategias ópticas. Esta sección analiza los conceptos básicos de la microscopía, incluyendo sus componentes (objetivos, iluminación, detectores, lentes, filtros...) y algunos conceptos importantes, como el aumento, la apertura numérica, la resolución, el brillo o el contraste, junto con otras consideraciones adicionales.

2.1.1. Camino óptico en un microscopio digital

Los microscopios modernos son instrumentos de precisión complejos. El microscopio tradicional es el óptico, en el que se utiliza luz visible para observar una muestra por medio del aumento de un sistema de lentes hasta llegar al ojo humano. No obstante, los avances de la tecnología han permitido mejoras en su construcción y en la actualidad destacan los microscopios digitales, que utilizan un sensor en lugar de un ocular y muestran las imágenes directamente en un monitor electrónico. En la [Figura 2.1](#) se muestra la configuración más básica en un microscopio digital. La luz, que se origina en la fuente de iluminación (1), es recogida y enfocada por una lente condensadora (2) sobre la muestra (3). Luego, la señal dispersada por la muestra atraviesa las lentes del objetivo (4) y la magnifica con cierto factor. Finalmente, la señal es recogida por un detector (5) para su posterior visualización (6).

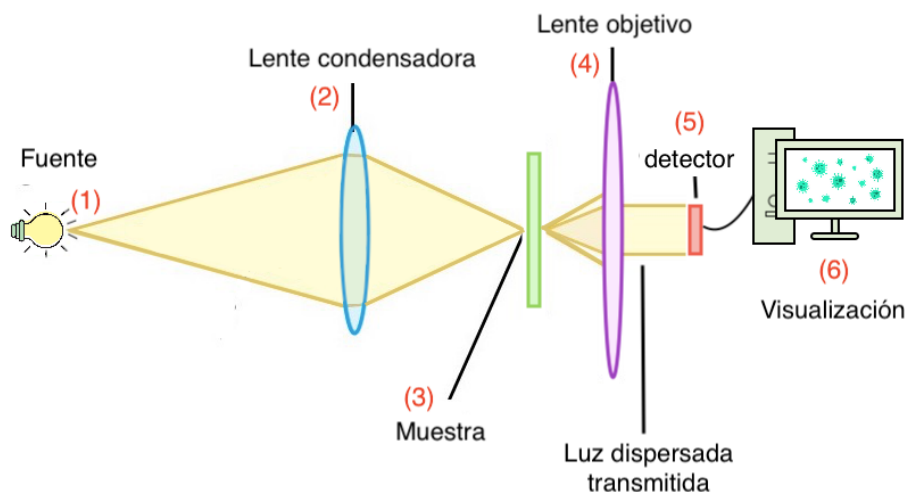


Figura 2.1. Configuración básica en un microscopio digital.

La distancia entre el plano focal posterior del objetivo y el plano de la imagen formada se denomina longitud del tubo y su valor suele estar estandarizado en 160 mm.

El microscopio convencional tiene dos configuraciones de iluminación: transiluminación y epi-iluminación. En transiluminación, la luz se transmite a través de la muestra y, por lo tanto, el contraste se crea en función de la absorción de luz correspondiente a cada píxel en la imagen final. Por otra parte, en la configuración de epi-iluminación la luz incidente se refleja en la muestra antes de llegar al detector y generar el contraste. [12]

2.1.2. Instrumentación básica

Cada tipo de microscopio consta de un conjunto de componentes imprescindibles. En biología, medicina y otras ciencias de la vida, los exámenes microscópicos de muestras semi-transparentes se realizan con luz transmitida. A continuación se describen los componentes esenciales de los microscopios digitales.

Fuente de iluminación

La fuente de iluminación es el primer elemento que conforma un microscopio, y su correcta utilización es crítica para obtener imágenes de alta calidad. Existe una variedad de fuentes, como lámparas halógenas, de arco, diodos emisores de luz (*light-emitting diode*, LED) o láseres, que pueden ser todas ellas utilizadas para realizar microscopía. Las fuentes más empleadas en la actualidad son los LED, ya que pueden ser lo suficientemente potentes como para competir con el resto de fuentes de iluminación y ofrecen multitud de ventajas: cada LED tiene un color único y presenta un espectro relativamente estrecho, pudiendo generar también bandas anchas al combinar múltiples diodos individuales. Además, poseen una vida útil de más de 10.000 horas de uso y son altamente eficientes energéticamente, lo que los hace económicos a largo plazo. En la [Figura 2.2](#) se presenta un espectro de luz típico de un LED blanco a 6000 K.

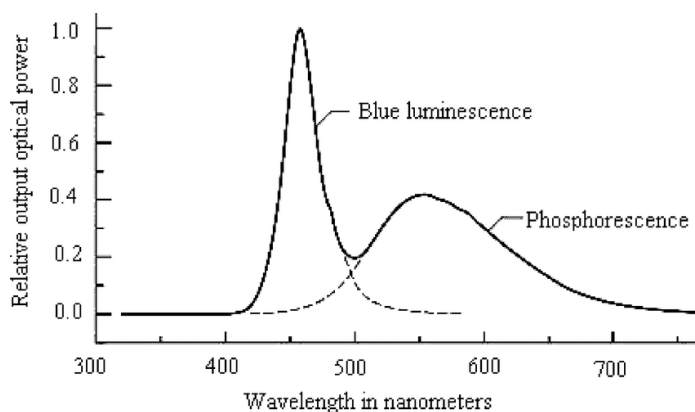


Figura 2.2. Espectro de emisión de un LED blanco originado por conversión de fósforos. [13]

En la [Figura 2.2](#) se muestra un ejemplo del espectro de iluminación de un LED blanco, que se consigue con un LED azul recubierto de fósforo, de forma que pueda absorber parte de la radiación azul emitida y generar un amplio grupo de emisiones dentro de todo el espectro visible. En función de la cantidad y el tipo de fósforo se pueden conseguir diferentes tipos de luz blanca, con luminosidades más frías o más cálidas.

Condensador

El condensador forma parte del sistema de iluminación junto con la fuente. Se trata de un elemento óptico utilizado para formar y modular la luz de iluminación y su función es reunir los frentes de onda procedentes de la fuente y concentrarlos en un cono de luz que ilumina la muestra con intensidad uniforme en todo el campo de visión. Además, también regula críticamente el contraste, por lo que su correcto posicionamiento y sus características son de gran utilidad para la observación a grandes aumentos.

Después de pasar a través de la muestra, la luz diverge en un cono invertido con el ángulo adecuado para llenar la lente frontal del objetivo. Resulta fundamental que el cono de luz del condensador se ajuste correctamente para optimizar la intensidad y el ángulo de la luz que ingresa a la lente frontal del objetivo, de forma que coincida con su apertura numérica. [14]

Objetivo

El objetivo es el primer elemento que encuentra la luz al pasar de la muestra al plano imagen. Está formado por un complejo conjunto de lentes múltiples que enfoca las ondas de luz originadas en la muestra para dar lugar a una imagen intermedia. Este elemento determina la calidad de la imagen, en particular, la resolución lateral y vertical, la pureza de los colores, el contraste, la distinción y la planitud del campo. Las categorías de calidad se definen por el grado de corrección con respecto a la aberración cromática (sistemas acromático, semiapocromático y apocromático) y la aberración esférica (lentes estándar frente a objetivos planos). Los parámetros básicos de cada objetivo son el factor de magnificación, la apertura numérica (*numerical aperture*, NA) y la distancia de trabajo (*working distance*, WD), que se describirán en la [Subsección 2.1.3](#).

Filtros

Los filtros de microscopía se emplean para modificar el paso de la luz en sistemas ópticos con fines de observación o de captura de alta calidad mediante un detector. Cada tipo de filtro cumple una determinada función para lograr diversas mejoras, como aumento de contraste, omisión de determinadas longitudes de onda o reducción de intensidad, entre otros [15]. Los tres tipos más utilizados son los filtros de absorción, de interferencia y acústicos.

Los filtros de absorción consisten en vidrio coloreado que absorbe selectivamente longitudes de onda de luz y transforma la energía en calor. Son relativamente económicos, estables y de larga duración en condiciones normales.

Los filtros basados en interferencia están formados por varias capas cuidadosamente diseñadas que transmiten selectivamente longitudes de onda basándose en efectos de interferencia entre las ondas incidente y reflejada en los límites de la capa, siguiendo el principio del interferómetro de Fabry-Perot.

Los filtros acústicos constan de un cristal birrefringente que, al enviar una señal de radiofrecuencia (RF) oscilante varía su índice de refracción y, por tanto, también las propiedades de difracción del cristal. El cambio de RF cambia la longitud de onda de la luz que se difracta, lo que permite un rápido ajuste de la longitud de onda. [16]

Otra posible clasificación para la selección de longitudes de onda, especialmente en microscopía de fluorescencia, son los filtros de excitación, de emisión y los divisores de haz.

Los filtros de excitación permiten el paso de longitudes de onda de luz concretas en el camino hacia la muestra, los filtros de emisión (o barrera) atenúan las longitudes de onda de excitación y permiten el paso de longitudes de onda específicas. Finalmente, los espejos dicróicos consisten en una pieza delgada de material recubierto (a menudo sílice fundida) colocado en un ángulo de 45° y diseñado para reflejar de manera eficiente las longitudes de onda de excitación, permitiendo la transmisión de las longitudes de onda de emisión con eficiencias de hasta el 95 %.

Estos filtros a su vez se pueden clasificar como paso largo (LP), si transmiten las longitudes de onda superiores a una concreta, de paso corto (SP), si hacen lo mismo pero por debajo y de paso banda (BP), si permiten el paso de un rango específico longitudes de onda. En la [Figura 2.3](#) se muestra un esquema de los filtros LP, SP y BP.

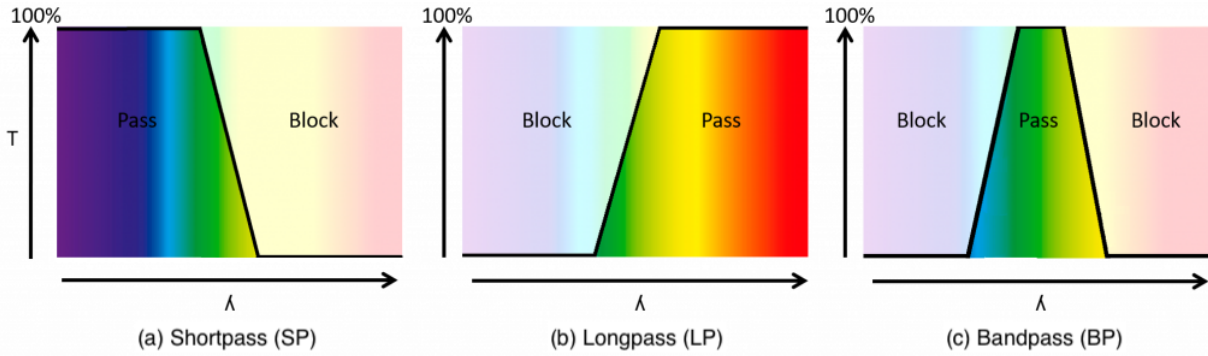


Figura 2.3. Tipos de filtros que permiten la selección determinadas longitudes de onda: (a) Paso largo, (b) Paso corto y (c) Paso banda. [16]

Detectores

Los detectores digitales más utilizados en microscopía moderna se dividen en tres tipos: CCD, CMOS y EMCCD. En todos los casos, una lente proyecta la señal luminosa sobre una matriz de píxeles, donde se produce la conversión analógica-digital que da lugar a la imagen digital. En la [Figura 2.4](#) se muestra un esquema de estos tres tipos de sensores.

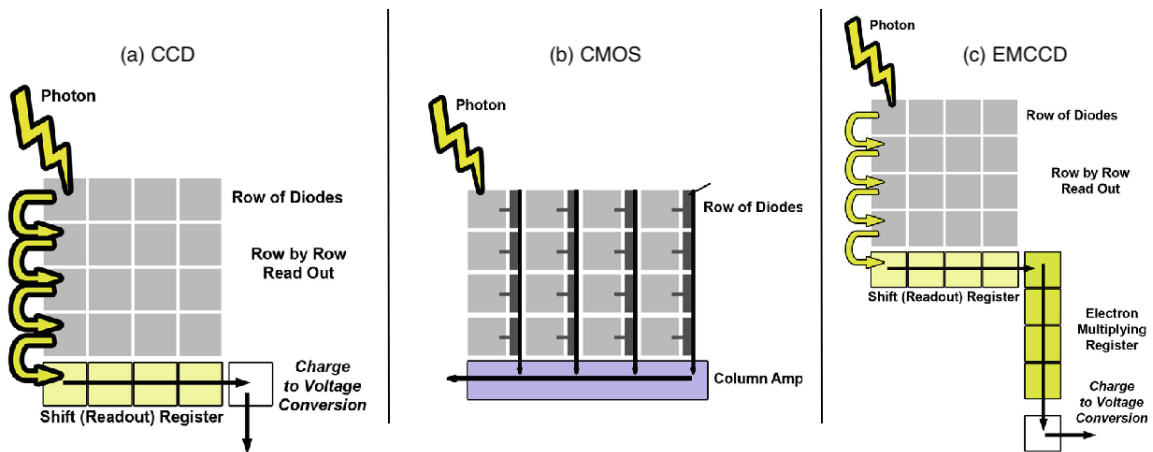


Figura 2.4. Sensores digitales más utilizados en microscopía moderna: (a) CCD, (b) CMOS y (c) EMCCD. [17]

Los sensores CCD (*charge-coupled device*) constan de una matriz de fotodiodos sensibles a la luz que convierte la luz en señales eléctricas. Cuando la luz incide sobre la fotocélula, se genera una corriente correlada linealmente con la cantidad de luz que recibe. Las fotocélulas recogen su carga proporcionalmente a la cantidad de luz incidente. Después de la exposición, las cargas se desplazan gradualmente de una celda a otra hasta que llegan al amplificador de salida, que las convierte fuera del sensor en una señal de voltaje.

Un sensor CMOS (*complementary metal-oxide semiconductor*) recoge las cargas generadas por la luz entrante, al igual que un sensor CCD, con la diferencia de que este dispositivo incorpora amplificadores, convertidores de señal analógica-digital y, a menudo, circuitos para un procesamiento adicional en el propio sensor.

Mientras que en un dispositivo CCD la carga se transfiere por filas, en los dispositivos CMOS se produce la conversión de carga en voltaje en cada uno de los píxeles. Por esta razón, los sensores CMOS son más rápidos porque los píxeles se leen en paralelo mientras que en los sensores CCD se leen secuencialmente. Además, los CMOS presentan un tamaño inferior y tienen un menor consumo de energía que los CCD, lo que se traduce en menor calentamiento del sistema. [18]

Un detector EMCCD (*electron multiplying charge-coupled device*) es similar a un CCD estándar, con la diferencia de que presenta un registro de ganancia adicional. Se utilizan a menudo para aplicaciones con poca luz, ya que permite aumentar la carga que llega en cada píxel conforme pasa por el registro de ganancia. [19]

Cabe destacar que los sensores de imagen registran la cantidad de luz de brillante a oscura sin información de color, por lo que se debe posicionar un filtro delante del sensor que permita la asignación de tonos de color a cada píxel. El método más habitual de registro de color es el filtro de colores primarios RGB (rojo, verde y azul) ya que, mezclados en diferentes combinaciones, pueden producir la mayoría de los colores visibles para el ojo humano.

2.1.3. Conceptos clave en microscopía

Apertura numérica

La apertura numérica (NA) es una medida de la aceptación angular de la luz entrante en un sistema microscópico, y depende de la construcción del objetivo, la distancia de trabajo y el coeficiente de refracción, n , del medio de inmersión: [20]

$$NA = n \sin(\alpha) \quad (2.1)$$

donde α es el ángulo máximo del cono de luz entrante.

Se define la distancia de trabajo (WD) de un objetivo como la distancia entre su lente frontal y la muestra. En la Figura 2.5 se muestra un esquema de la distancia de trabajo de un objetivo según su apertura numérica.

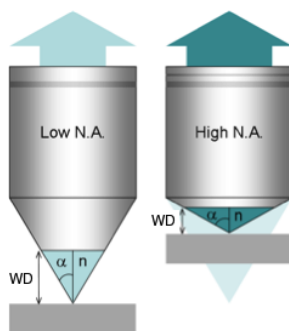


Figura 2.5. Distancia de trabajo de un objetivo según su apertura numérica. [21]

Magnificación

La magnificación se define como la relación entre el tamaño de un objeto en una imagen producida por un sistema óptico y su tamaño real, y se calcula como el producto de la magnificación producida por las lentes del objetivo por las del ocular.

Para un microscopio de luz estándar, la magnificación máxima es aproximadamente de 1.500x. Una vez que se alcanza el aumento máximo del dispositivo la imagen puede continuar ampliándose, pero no es posible observar detalles adicionales. Este fenómeno se conoce como aumento vacío [22] y es una consecuencia de la difracción de la luz incidente, que limita la resolución de las imágenes visualizadas. Por lo tanto, es importante combinar adecuadamente los aumentos del objetivo y del ocular para no superar dicho límite.

En los microscopios convencionales la imagen se observa a través de los oculares, y la magnificación en este caso se define como: [23]

$$M_{Toc} = M_{obj} \cdot q \cdot M_{oc} \quad (2.2)$$

Donde M_{Toc} es el aumento lateral total observado a través del ocular, M_{obj} y M_{oc} las magnificaciones del objetivo y ocular respectivamente y q el factor total del tubo, que se define como el aumento que introducen otras lentes que se encuentren en el camino óptico hasta llegar al ojo.

En el caso de que la imagen final se proyecte sobre un sensor electrónico, como una cámara digital, el aumento se define como: [23]

$$M_{Tsensor} = M_{obj} \cdot q \cdot M_{proy} \quad (2.3)$$

Con $M_{Tsensor}$ la magnificación del microscopio proyectada sobre el sensor y M_{proy} el aumento de la lente de proyección del tubo a la cámara.

Si la imagen obtenida por el sensor se observa a través de un monitor, el aumento total final, $M_{Tmonitor}$, también dependerá del tamaño de la imagen en el monitor y el tamaño del sensor, y se define como: [23]

$$M_{Tmonitor} = M_{Tsensor} \cdot Im_{sizeRatio} \quad (2.4)$$

Siendo $Im_{sizeRatio}$ la relación de tamaño de la imagen desde el sensor a la pantalla del monitor electrónico, habitualmente esta relación es 16:9.

Cabe destacar que para obtener la relación de tamaño de imagen en el monitor basta con multiplicar el número de píxeles del monitor en el ancho de la imagen por el tamaño del píxel.

$$Im_{sizeRatio} = \frac{Npx_{widthMonitor}}{Npx_{widthSensor}} \cdot px_{sizeRatio} \quad (2.5)$$

Con $px_{sizeRatio}$ la relación entre el tamaño de píxel del monitor y del sensor:

$$px_{sizeRatio} = \frac{px_{sizeMonitor}}{px_{sizeSensor}} \quad (2.6)$$

Profundidad de campo

La resolución axial se define mediante la profundidad de campo (*depth of field*, DOF), que está determinada por la distancia entre el plano más cercano enfocado hasta el más lejano, que también puede ser enfocado simultáneamente. Este parámetro depende de la apertura numérica, NA , índice de refracción del medio entre la muestra, n , y la longitud de onda de iluminación, λ , de la siguiente forma:

$$DOF = \frac{\lambda \sqrt{n^2 - NA^2}}{2 \cdot NA^2} \quad (2.7)$$

En la [Figura 2.6](#) se muestra un esquema de la dependencia de la profundidad de campo con la apertura numérica del objetivo.

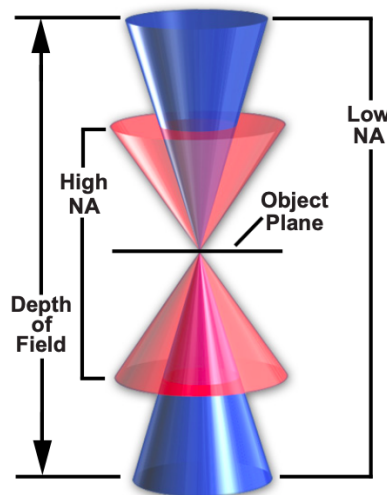


Figura 2.6. Dependencia de la profundidad de campo con la apertura numérica del objetivo. [24]

Campo de visión

El campo de visión (*field of view*, FOV) es la parte de la muestra que se reproduce en la imagen final. Por lo tanto, los detalles de un objeto solo se pueden observar si están presentes dentro del FOV. En microscopía digital, el FOV es rectangular debido a la forma del sensor que recolecta la imagen y el monitor que la muestra. Es importante tener en cuenta que la imagen creada por el sistema óptico sea lo suficientemente grande como para cubrir todo el sensor de imagen, ya que el FOV podría estar limitado por el sensor de imagen o la pantalla. En cualquier caso, se debe tener en cuenta el tamaño físico del área activa, dado por el número de píxeles activos en ancho y alto y el tamaño del píxel. [23]

Para calcular el FOV, el tamaño físico del área activa del sensor debe dividirse por el aumento total del microscopio $M_{Tsensor}$ o, para el monitor, $M_{Tmonitor}$. El menor de estos valores para cada ancho y alto define el FOV del microscopio digital. Es probable que tanto la anchura como la altura del FOV no estén necesariamente limitadas conjuntamente por el sensor de imagen o la pantalla. Por ejemplo, el sensor podría limitar el ancho, y el monitor la altura. En la [Ecuación 2.8](#) y [Ecuación 2.9](#) se recogen las expresiones para obtener el ancho y el alto del FOV observado por un sensor.

$$w = \frac{px_{size} \cdot Npx_{sensorWidth}}{M_{Tsensor}} \quad (2.8)$$

$$h = \frac{px_{size} \cdot Npx_{sensorHeight}}{M_{Tsensor}} \quad (2.9)$$

Con $M_{Tsensor}$ el aumento total desde la muestra hasta el sensor, $Npx_{sensorWidth}$ y $Npx_{sensorHeight}$ el número de píxeles en el ancho y alto y px_{size} el tamaño del píxel.

Resolución

Hay tres características de diseño vitales del objetivo que establecen el límite de resolución final de un microscopio convencional: la longitud de onda de la luz utilizada para iluminar la muestra, la apertura angular del cono de luz capturado por el objetivo y el índice de refracción del medio que rodea la muestra. La resolución lateral de un microscopio óptico, r , se puede describir como la distancia mínima entre dos objetos puntuales para que se encuentren claramente resueltos. Según el criterio de Raileigh [25], en transmisión r se define como: [20]

$$r_{trans} = \frac{1.22\lambda}{NA} \quad (2.10)$$

y en epi-iluminación:

$$r_{epi} = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (2.11)$$

Según la Ecuación 2.10 y la Ecuación 2.11, cuanto menor sea la longitud de onda λ de iluminación y la NA del sistema, menor será la resolución lateral. Por lo tanto, para maximizar la resolución lateral, la longitud de onda debe ser lo más corta y la apertura numérica lo más alta posible. En circunstancias normales, la resolución lateral alcanzable con un microscopio óptico estándar se limita a aproximadamente $0.2 \mu\text{m}$. [22]

Además, si las imágenes formadas en el microscopio se visualizan mediante un sensor digital a través de un monitor influyen otros dos factores: el límite de resolución del sensor, RL_{sensor} y el límite de resolución del monitor, $RL_{monitor}$. [23, 26]

$$RL_{sensor} = \frac{500 \cdot M_{Tsensor}}{\text{sensor bin mode} \cdot PS_{sensor}} \quad (2.12)$$

$$RL_{monitor} = \frac{M_{Tmonitor}}{2 \cdot PS_{monitor}} \quad (2.13)$$

Donde $M_{Tsensor}$ y $M_{Tmonitor}$ son las magnificaciones totales adquiridas en el sensor y en el monitor respectivamente, PS_{sensor} y $PS_{monitor}$ son sus tamaños de píxel y el parámetro *sensor bin mode* se refiere al modo de agrupación de los píxeles en el sensor.

El límite de resolución del sensor y del monitor de visualización queda determinado mediante el teorema de Nyquist [27] para el procesamiento de señales digitales, y supone que se necesitan al menos dos píxeles para resolver un par de líneas. El espacio mínimo entre pares

de líneas en la muestra que puede resolver el sensor, r_{sensor} , y el monitor, $r_{monitor}$, se definen de la siguiente forma: [23, 26]

$$r_{sensor} = \frac{2 \cdot PS_{sensor}}{M_{Tsensor}} \quad (2.14)$$

$$r_{monitor} = \frac{2 \cdot PS_{monitor}}{M_{Tmonitor}} \quad (2.15)$$

Efectos de difracción e interferencia

Tal y como se ha indicado en el apartado anterior, la resolución lateral de un microscopio óptico limitado efectos de difracción, r , se puede describir como la distancia mínima entre dos objetos puntuales para que se encuentren claramente resueltos. En la [Figura 2.7](#) se muestra un esquema de dos puntos resueltos en el límite de resolución de Rayleigh.

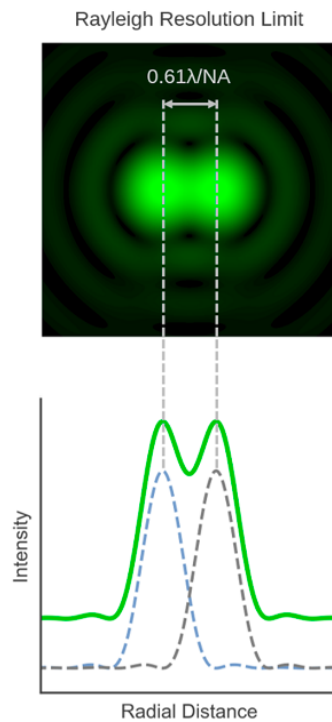


Figura 2.7. Dos puntos separados por el límite de resolución de Rayleigh. [28]

Cuando se forma una imagen en el plano enfocado de un microscopio óptico, cada punto de la muestra está representado por un patrón de difracción con extensión finita. Esto ocurre debido a que las ondas de luz emitidas desde una fuente puntual no son enfocadas por el objetivo en un punto infinitamente pequeño, sino que convergen juntas e interfieren cerca del plano de imagen, produciendo un patrón de difracción de Fraunhofer tridimensional. [29]

El patrón de difracción de un emisor puntual en el plano de la imagen de un microscopio se describe con la función de dispersión de punto (*point spread function*, PSF). Para un sistema de imágenes perfecto sin aberraciones, este patrón se conoce como disco de Airy, y se define como la unidad básica del patrón de difracción producida por el objetivo del microscopio.

Consiste en un círculo central brillante que contiene el 84 % de la intensidad de luz total con el resto distribuido en una serie de anillos concéntricos progresivamente menos intensos. El tamaño del disco de Airy viene dado por el parámetro r_{trans} de la Ecuación 2.10. [28]

Cuando las imágenes de dos objetos se superponen, sus PSF se combinan de forma aditiva y la PSF total resultante es lo que se observa en la imagen dada por el microscopio. Cuando los objetos están lo suficientemente separados, se produce una caída en la intensidad de la PSF total entre los objetos y se pueden distinguir como entidades diferentes, en este caso se dice que ambos objetos se encuentran resueltos (Figura 2.8a). De manera contraria, cuando no es posible distinguirlos se dice que no se encuentran resueltos (Figura 2.8b).

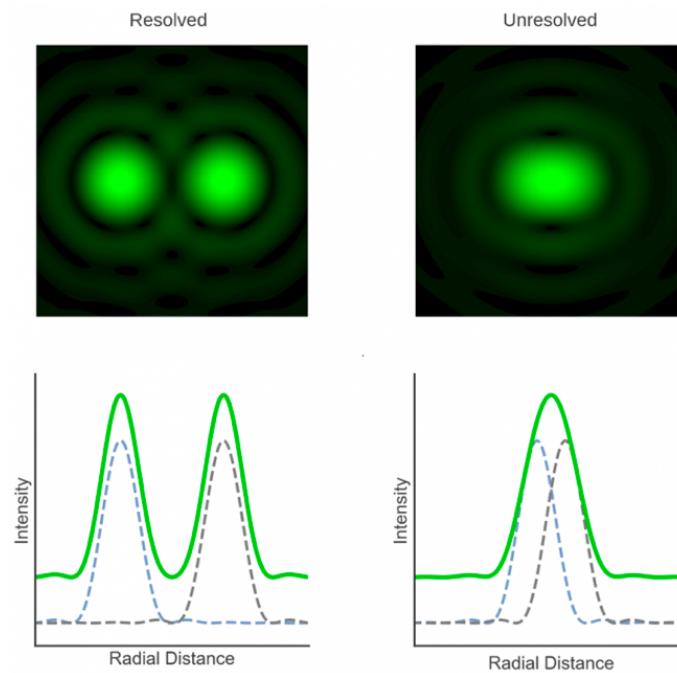


Figura 2.8. Superposición de la PSF y resolución de dos emisores puntuales a diferentes distancias radiales. [28]

Rayleigh eligió su criterio basándose en el sistema visual humano y para proporcionar suficiente contraste para que un observador distinga dos objetos separados en la imagen. Por lo tanto, el criterio de Rayleigh no es una ley física fundamental, sino una regla que se ha convertido en una de las definiciones más ubicuas de resolución microscópica.

Brillo

El brillo de iluminación en un microscopio, B , depende del cuadrado de la apertura numérica del condensador, NA , y su magnificación, M_{cond} :

$$B \approx \left(\frac{NA_{cond}}{M_{cond}} \right)^2 \quad (2.16)$$

El poder de captación de una imagen al atravesar el objetivo, F , está directamente relacionado con NA e inversamente con la magnificación objetivo, M_{obj} , de forma que en transmisión: [20]

$$F_{trans} \sim \frac{NA^2}{M_{obj}^2} \quad (2.17)$$

y en epi-iluminación:

$$F_{epi} \sim \frac{NA^4}{M_{obj}^2} \quad (2.18)$$

Por lo tanto, los objetivos de alta apertura numérica recolectan más luz y producen una imagen más brillante, corregida y altamente resuelta, ya que habitualmente se encuentran corregidos para minimizar posibles aberraciones.

Resulta esencial alcanzar un alto brillo de imagen para la adquisición de imágenes en fluorescencia, ya que, debido a la baja intensidad de emisión y a que depende en gran parte de las propiedades del fluoróforo, el microscopio debe estar optimizado al máximo para captar la mayor cantidad de luz posible.

Contraste

El contraste se define como el cambio relativo en la intensidad entre la luz recogida de un objeto y la iluminación de fondo. [12]

$$\text{contraste} = \frac{I_{obj} - I_{background}}{I_{background}} \quad (2.19)$$

La visibilidad requiere que el contraste de un objeto exceda un valor crítico, llamado umbral de contraste. El umbral de contraste de un objeto no es constante para todas las imágenes, varía con el brillo de la imagen. Con luz brillante, el umbral puede ser tan bajo como el 3%, mientras que con luz tenue el umbral podría superar el 200%. [12]

2.2. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una herramienta esencial en la investigación medioambiental y biomédica, utilizada para visualizar, analizar y estudiar moléculas, células, tejidos y organismos. Una de sus principales aplicaciones es permitir la cuantificación y localización de la distribución de proliferaciones de algas. Otras aplicaciones importantes incluyen su uso como mecanismo de lectura en ensayos bioquímicos como inmunoensayos o qPCR. Sin embargo, debido a su costo, capacitación, mantenimiento y fragilidad, los microscopios de fluorescencia convencionales permanecen fuera de su alcance en los países en desarrollo, en las áreas rurales y en lugares remotos [30, 31]. Por lo tanto, el acceso a microscopios de fluorescencia asequibles, lo que implica comprometer ciertas funcionalidades y resolución, puede facilitar su implementación en estos entornos y su uso en diagnósticos en monitoreo ambiental y telemedicina. Además, la producción de herramientas e instrumentación de laboratorio asequibles y fáciles de implementar facilitaría la investigación y conduciría a nuevos hallazgos en ciencias medioambientales, química y biomedicina [32, 33].

La asequibilidad y portabilidad en microscopía de fluorescencia se logra mediante la adaptación de elementos ópticos (lentes, objetivos, filtros, fuentes, espejos...) y piezas impresas en 3D. Existen prototipos de microscopios portátiles de bajo coste, como OpenFlexure, al que se le pueden realizar las modificaciones necesarias para obtener imágenes de fluorescencia.

2.2.1. Principios de fluorescencia

El fenómeno de fluorescencia pertenece al conjunto de procesos de luminiscencia en los que moléculas susceptibles emiten luz desde estados excitados electrónicamente creados por un mecanismo físico (por ejemplo, absorción de luz), mecánico o químico. La generación de luminiscencia a través de la excitación de una molécula por fotones de luz ultravioleta o visible se denomina fotoluminiscencia, y se divide formalmente en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, según la configuración electrónica del estado excitado y la vía de emisión. [34]

Cuando se ilumina un material fluorescente con luz de excitación de alta energía de una longitud de onda apropiada, se produce una emisión de luz con energía menor y longitud de onda más larga que la luz de excitación entrante. Este proceso ocurre después de un breve intervalo de tiempo, denominado tiempo de vida de la fluorescencia. El proceso de fosforescencia ocurre de una manera similar a la fluorescencia, pero con una vida en estado excitado mucho más larga.

Algunos materiales naturales pueden producir fluorescencia cuando entran en contacto con la luz de excitación apropiada, lo que se conoce como autofluorescencia [35]. Por ejemplo, la clorofila se caracteriza por tener autofluorescencia roja cuando se ilumina con luz de excitación azul. Otros materiales pueden teñirse con tintes fluorescentes especiales para generar imágenes basadas en la fluorescencia. En todos los casos, la luz fluorescente de baja energía solo se puede visualizar cuando la luz de excitación de alta energía es filtrada por un filtro de emisión.

Para explicar la física de este tipo de fenómenos se utilizan diagramas de Jablonski. En la [Figura 2.9](#) se muestra un ejemplo de diagrama de fluorescencia. Los estados electrónicos de energía se indican mediante líneas horizontales gruesas, y los subniveles vibratorios o rotacionales se representan con líneas horizontales más delgadas. Los electrones se encuentran habitualmente en el estado de energía más bajo, o fundamental (S0). Cuando un fotón (indicado por la línea azul que entra desde la izquierda) con la energía apropiada interactúa con una molécula, el fotón puede ser absorbido, provocando que un electrón salte a uno de los niveles de un estado excitado (S1 o S2 en el diagrama). Por tanto, no todos los fotones incidentes tienen la misma probabilidad de ser absorbidos. [36]

El mecanismo de fluorescencia se rige por tres eventos importantes, que ocurren en escalas de tiempo separadas por varios órdenes de magnitud (imagen). La excitación de una molécula susceptible por un fotón entrante ocurre en femtosegundos (10^{-15} segundos), mientras que la relajación vibratoria de los electrones desde el estado excitado (S1) al nivel de energía más bajo (S0), proceso denominado conversión interna, es mucho más lento y se puede medir en picosegundos (10^{-12} segundos). El proceso final, la emisión de un fotón de longitud de onda más larga y el retorno de la molécula al estado fundamental, ocurre en un período de tiempo relativamente largo de nanosegundos (10^{-9} segundos). Aunque toda la vida útil de la fluorescencia molecular, desde la excitación hasta la emisión, se mide en solo mil millonésimas de segundo, se trata de una manifestación de la interacción entre la luz y la materia. Debido

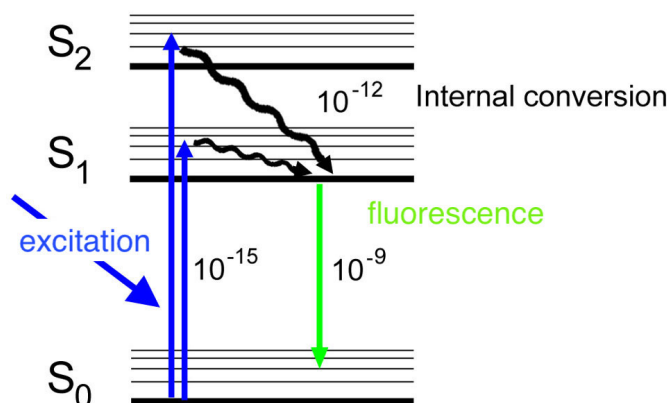


Figura 2.9. Diagrama de Jablonski para la fluorescencia. [36]

a los perfiles de emisión tremendamente sensibles, la resolución espacial y la alta especificidad de las investigaciones de fluorescencia, esta técnica se ha convertido en una herramienta de gran importancia en el campo de la genética y la biología celular, entre otros. [36]

La probabilidad de que un fotón sea absorbido varía con la longitud de onda (o energía). Incluso para los fotones que se absorben, existen otros procesos que compiten con la fluorescencia por la desexcitación de los electrones de los estados excitados. En la clorofila, por ejemplo, la energía de los electrones en estado excitado se usa para impulsar el motor químico de la fotosíntesis, y solo una pequeña fracción sale como la fluorescencia de color rojo oscuro que vemos en las plantas y las algas. El número de fotones fluorescentes en relación con el número absorbido se denomina eficiencia cuántica. Cuanto mayor sea la absorción y la eficiencia cuántica, más intensa será la emisión de fluorescencia. [36]

La mejor forma de documentar las propiedades de fluorescencia de una muestra en particular es medir los espectros de excitación y emisión. En la Figura 2.10 se muestra un ejemplo de espectro de fluorescencia.

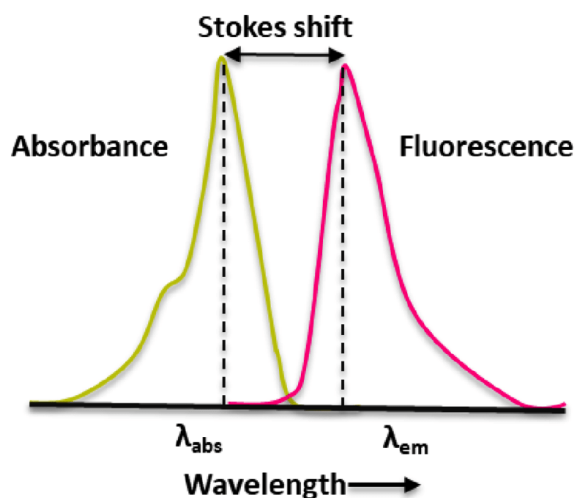


Figura 2.10. Espectros de absorción y emisión de una determinada sustancia. Se muestra el espectro de absorción a una longitud de onda más corta (mayor energía) y el espectro de fluorescencia resultante de la luz emitida a una longitud de onda más larga (menor energía). [37]

Los fluoróforos se describen, en parte, por dos longitudes de onda clave: la longitud de onda de excitación (E_x) y la longitud de onda de emisión (E_m), y la distancia entre estos dos valores se denomina desplazamiento de Stokes. Los fluoróforos con desplazamientos de Stokes más grandes presentan una mayor utilidad por sufrir menos interferencias. Aunque los valores E_x y E_m se utilizan para indicar longitudes de onda de máxima absorción y emisión, estas longitudes de onda no lo son todo, ya que existe un rango de longitudes de onda en el que un fluoróforo puede excitarse o emitir, por lo que las alturas y anchuras de los picos también son datos importantes a tener en cuenta.

Destacar que la microscopía de fluorescencia se puede combinar con modos de iluminación complementarios para que las estructuras fluorescentes se puedan revelar simultáneamente junto con su entorno no fluorescente, tal y como se muestra en la [Figura 2.11](#).

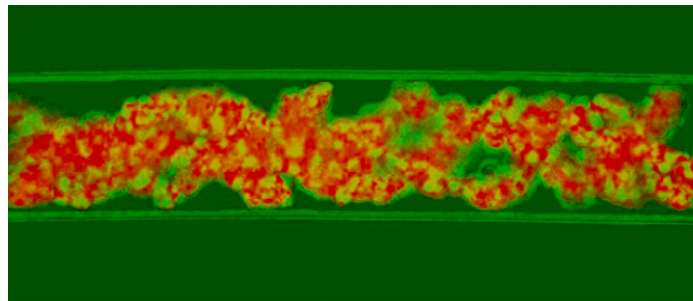


Figura 2.11. Fluorescencia de una muestra de algas utilizando luz de excitación azul fluorescente. Se observa en verde la luz monocromática de transmisión y en rojo la autofluorescencia de la clorofila. [38]

2.2.2. Fluorescencia para la identificación de fitoplancton nocivo

A la hora de identificar fitoplancton nocivo, no es necesario llegar al nivel de especie, sino que una clasificación a nivel de grupos funcionales puede ser suficiente. Los tipos funcionales de fitoplancton (*phytoplankton functional types*, PFT) son agrupaciones de diferentes especies de fitoplancton que presentan una funcionalidad ecológica en común, y no necesariamente relacionada con características fisiológicas [39]. Precisamente, una característica que varía entre diferentes grupos funcionales de fitoplancton es su fluorescencia.

Los PFT son de interés para la comunidad biogeoquímica debido a que mediante su estudio se puede extraer información relevante sobre el funcionamiento de los ecosistemas, pudiendo ser una de las causas del cambio climático. Existen diferentes enfoques para la detección de PFT. Los métodos directos explotan las firmas ópticas del fitoplancton que pueden ser detectadas por sensores en plataformas satelitales, por lo que se limitan a unos pocos grupos de fitoplancton que posean firmas ópticas distintas de otros constituyentes del agua de mar. Por otra parte, un ejemplo de método indirecto sería la medición de la concentración de clorofila-a (ch-a) para extraer conclusiones sobre otros parámetros relacionados. Estas concentraciones se pueden determinar mediante análisis procedentes de satélites que midan el color de las aguas remotamente o por medio de medidas tomadas in situ utilizando dispositivos comerciales. [40]

La disponibilidad de nutrientes, generalmente fósforo y nitrógeno, es uno de los principales factores que produce el crecimiento de fitoplancton. El florecimiento de estas poblaciones agotan los niveles de oxígeno disuelto, una de las causas principales de la mayoría de las muertes de los peces que habitan en estos ecosistemas. Los altos niveles de nitrógeno y fósforo pueden ser indicadores de contaminación de fuentes artificiales, como fugas del sistema séptico, plantas de tratamiento de aguas residuales o fertilizantes.

Dado que la clorofila-a es un pigmento fotosintético presente en todas las especies de fitoplancton, incluidos los organismos eucariotas (algas) y procariotas (cianobacterias), se puede utilizar como un indicador indirecto de los niveles de nutrientes y de la eutrofización en ecosistemas acuáticos. [41]

Una de las características clave de la clorofila es su fluorescencia. Los avances en las tecnologías para medir la fluorescencia de la chl-a ofrecen buenas perspectivas para las pruebas de toxicidad mediante bioensayos con especies de fitoplancton [42]. Los dispositivos de medida de fluorescencia in situ ofrecen una medición continua de las concentraciones de clorofila sin requerir de tratamiento previo ni un gran volumen de muestra; el método es simple, no destructivo, selectivo, sensible y rápido. Además, cabe destacar que la fluorescencia de la chl-a es débil, inestable y fácilmente influenciada por el medio ambiente. [43]

En la [Figura 2.12](#) se muestran conjuntamente los espectros de excitación y de emisión de la clorofila-a. Se observa que absorbe la luz con mayor intensidad en la región azul (360-440 nm) y presenta fluorescencia en la región roja (660-680 nm). Además, también absorbe ligeramente la luz a partir de 550 nm, hasta alcanzar otro máximo en la región roja (662 nm). Por lo tanto, para excitar se pueden utilizar diferentes fuentes de iluminación dentro de ese rango para estimular selectivamente el fotopigmento distintivo de las especies objetivo.

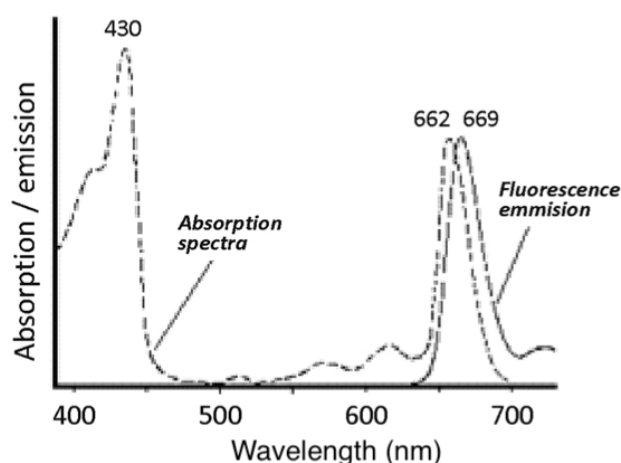


Figura 2.12. Espectros de absorción y emisión de clorofila-a. [44]

La [Tabla 2.1](#) (proporcionada por la empresa Ecohydros [45]) recoge una comparación de las longitudes de onda máximas de emisión por fluorescencia medidas por diferentes equipos comerciales al excitar con sus fuentes de iluminación más próximas al máximo de absorción esperado para cada grupo pigmentario. Cabe destacar que las muestras de fitoplancton que se van a tratar en este trabajo pertenecen al grupo pigmentario verde.

Grupo pigmentario	Asignación según rango de fluorescencia	Absorción (nm)	Excitación (nm)			Emisión (nm)		
			Fluoroprobe	MatrixFlu	Shin2017	Fluoroprobe	MatrixFlu	Shin2017
Greens	Chlorococcales	430	450	470	448	680	682	680
	Euglenophyceae							
	Ulothricales							
	Volvocales							
Cyanos (blue)	Nostocales	620	590 y 610	590	590	680	655 y 682	645
	Oscillatoriales							
	Chroococcales							
Chromos (brown)	Dinophyceae	525	525			680		
	Chrysophyceae							
	Bacillariophyceae							
Cryptos (red)	Cryptophyceae	570	570			680		

Tabla 2.1. Comparación de las longitudes de onda máximas de emisión por fluorescencia medidas por diferentes equipos comerciales al excitar con sus fuentes de iluminación más próximas al máximo de absorción esperado para cada grupo pigmentario.

2.3. Microscopía Raman

Otra técnica relacionada con la fluorescencia y que puede ofrecer información valiosa para la identificación de fitoplancton nocivo es la microscopía Raman, que combina la microscopía óptica convencional con la información química extraída de la espectroscopía Raman. En esta sección se abordan los principios básicos de la espectroscopía Raman, así como algunas de las consideraciones de pre-procesado espectral más importantes que se deben tener en cuenta para el correcto tratamiento de los espectros Raman.

2.3.1. Espectroscopía Raman

La espectroscopía se ocupa de medir e interpretar los espectros que surgen de la interacción de la radiación electromagnética con la materia, concretamente de la absorción, emisión o la dispersión de la radiación por los átomos o moléculas que componen un material. Se trata de uno de los métodos más utilizados a la hora de estudiar la composición química de cualquier muestra y se fundamenta en la identificación de las longitudes de onda procedentes de transiciones, generalmente electrónicas, entre dos estados de energía diferentes.

Particularmente, la espectroscopía Raman permite detectar la dispersión molecular producida cuando se incide con un haz de luz monocromático de alta intensidad. Se trata de una técnica no destructiva que requiere poca o ninguna preparación de la muestra, pudiendo encontrarse en fase sólida, líquida o gaseosa. Además, es extremadamente adaptable a diferentes configuraciones experimentales, desde instrumentos de mano compactos que permiten el análisis *in situ* hasta sistemas de laboratorio multietapas de alta resolución. [46]

Las vibraciones de un material están determinadas por su disposición específica de enlaces moleculares y simetrías, por lo que el patrón de líneas espectrales obtenido con espectroscopía Raman es suficiente para identificar y/o caracterizar el compuesto bajo estudio, ya que las transiciones a las que dichas líneas se corresponden son únicas de cada compuesto. [47].

En la [Figura 2.13](#) se muestra un diagrama de las transiciones de energía producidas en los procesos de dispersión Raman.

La espectroscopía Raman utiliza unidades de números de onda [cm^{-1}] para medir los

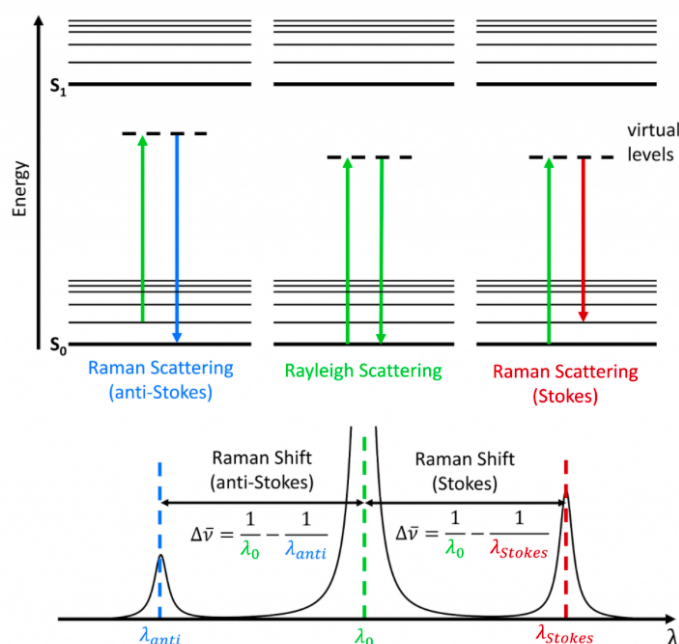


Figura 2.13. Diagrama de las transiciones de energía producidas en los procesos de dispersión Raman, Stokes y anti-Stokes, y de su espectro asociado. [48]

desplazamiento de energía de las bandas en relación con la línea láser incidente. Si la señal de dispersión Raman se encuentra en la longitud de onda λ_{Raman} [nm], el desplazamiento Raman está relacionado con la longitud de onda del láser de excitación λ_{laser} [nm] por: [49]

$$\text{Raman shift [cm}^{-1}] = 10^7 \cdot \left(\frac{1}{\lambda_{laser}} - \frac{1}{\lambda_{Raman}} \right) \quad (2.20)$$

Mediante la espectroscopía Raman se detectan los cambios de frecuencia de la luz dispersada inelásticamente de la muestra cuando un fotón de luz incidente incide con una molécula y produce un fotón disperso. El espectro Raman resultante de la interacción contiene varios componentes debido a las diferentes direcciones de dispersión de la luz. Las bandas espectrales producidas por la dispersión Raman corresponden a los diferentes modos vibratorios del material o molécula de muestra, y se distribuyen alrededor de una línea espectral en la longitud de onda del láser de excitación debido a la dispersión elástica de Rayleigh. [50]

Las líneas Raman con mayor energía que la línea láser (menor longitud de onda) se denominan líneas Anti-Stokes, donde la luz dispersa gana energía al interactuar con las vibraciones existentes en la muestra. Las líneas Raman con menor energía (mayor longitud de onda) se denominan líneas Stokes, y ocurren cuando la luz incidente pierde energía al excitar vibraciones moleculares. [50]

Por lo tanto, un espectro Raman permite determinar el cambio en la longitud de onda de la luz dispersada inelásticamente, que está relacionado con la composición química de las moléculas responsables de la dispersión, y la intensidad de las bandas Raman que lo componen, que es proporcional a la concentración del analito presente en la muestra.

2.3.2. Pre-procesado espectral

Debido a que solamente una pequeña fracción de los fotones es dispersada inelásticamente, es habitual que las señales Raman sean muy débiles y se encuentren enmascaradas por señales ruidosas. Por lo tanto, la calidad de un espectro Raman no depende exclusivamente de las bandas Raman y la intensidad de las mismas, sino que será de gran importancia suprimir aquellas señales que dificulten la lectura y la identificación de señales Raman. El objetivo de realizar pre-procesados espectrales es eliminar en la medida de lo posible estas componentes ruidosas que intervienen en la adquisición de los espectros.

En la [Figura 2.14](#) se muestra la comparación entre el espectro teórico de un material y el que se obtendría experimentalmente, perturbado por diferentes señales ruidosas.

Las componentes de ruido predominantes son el ruido *shot* y el ruido de fluorescencia. El primero se debe a la naturaleza aleatoria de la luz y se presenta en forma de pequeñas fluctuaciones alrededor del valor medio de la intensidad, mientras que la señal de fluorescencia es una emisión independiente de la dispersión Raman, que aparece como una línea de base que cambia lentamente y puede llegar a enmascarar las bandas Raman menos intensas [51].

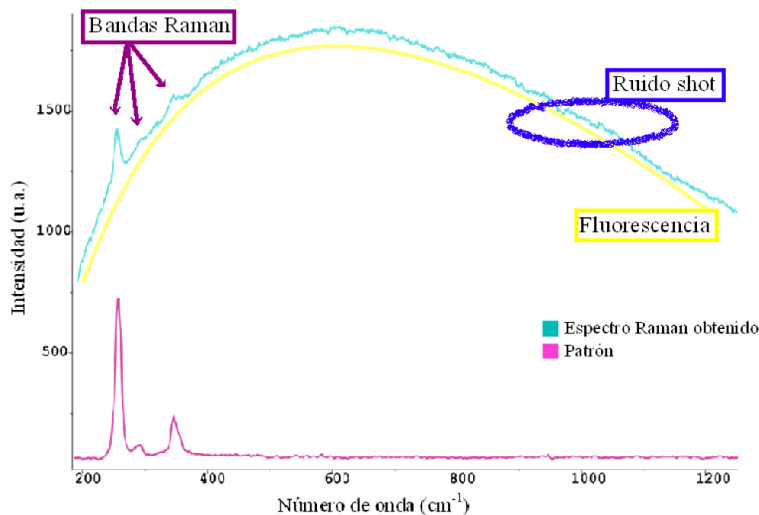


Figura 2.14. Representación de un espectro Raman característico de un material (en magenta), un espectro Raman perturbado por diferentes señales de ruido (en cyan) y su línea base ligada a la señal de fluorescencia (en amarillo). [51]

A parte del ruido *shot* y la fluorescencia, hay otras señales que siempre están presentes en los espectros y también afectan a la pérdida de calidad, pero en menor medida. Por ejemplo, el ruido asociado a la instrumentación y calibración del dispositivo, el asociado a la radiación de cuerpo negro, ya que el material se encuentra a una determinada temperatura, o el generado por fuentes externas, como luz solar o fuentes fluorescentes.

Existen multitud de técnicas automatizadas para eliminar las señales de fondo, lo más habitual es aplicar líneas de base. Uno de los métodos habituales de extracción de líneas de base es el de mínimos cuadrados asimétricos (ALS), basado en el suavizado de Whittaker [52].

La función a minimizar de un algoritmo de suavizado Whittaker está dada por [53]:

$$\vartheta(z) = (y - z)^T W_0 (y - z) + \lambda_s z^T D_s^T D_s z \quad (2.21)$$

Donde y es un vector $N \times 1$ dimensional de los datos espectrales medidos, z es la curva suavizada que se ajustará a los datos, W_0 es una matriz de pesos (típicamente $0 \leq w_{0,n} \leq 1$ para $n = 1, \dots, N$), D_s es un operador de segunda derivada y λ_s es una penalización sobre el término de suavizado (a mayor λ , mayor suavizado). Cuando existe algún dato que falta, su peso asociado $w_{0,n}$ se puede ajustar a 0. Una vez proporcionado W o λ_s , bien por defecto o a través del usuario, el valor correspondiente estimado de z está dado por [53]:

$$z = (W_0 + \lambda_s D_s^T D_s)^{-1} W_0 y \quad (2.22)$$

El algoritmo de mínimos cuadrados asimétricos (ALS), basado en el suavizado Whittaker, se define como un vector dado, $y = y_1, y_2, \dots, y_i$, con i observaciones de intensidades espectrales en distintas frecuencias, y la serie de suavizado $z = z_1, z_2, \dots, z_i$, siendo una representación de y . En este caso, la función de mínimos cuadrados a minimizar es:

$$F = \sum_i w_i (y_i - z_i)^2 + \lambda \sum_i (\delta^2 z_i)^2 \quad (2.23)$$

donde

$$\delta^2 z_i = (z_i - z_{i-1}) - (z_{i-1} - z_{i-2}) = z_i + 2z_{i-1} - z_{i-2}, \quad i \in [1, 2, 3, \dots, m], \quad (2.24)$$

y los pesos w de los residuos positivos y negativos de $(y - z)$ son los mismos que cuando se utiliza el suavizado Whittaker. Además, es necesario introducir el parámetro ρ para cuantificar la asimetría del algoritmo, con $w_i = \rho$ si $y_i > z_i$ y $w_i = 1 - \rho$ el resto de casos [54].

Una vez obtenida la línea de base, basta con restar sus valores a los del espectro original para obtener un nuevo espectro corregido, con las señales de ruido *shot* y de fluorescencia corregidas en mayor o menor medida en función de los parámetros fijados en la ecuación de suavizado descrita anteriormente.

3

Setup del microscopio OpenFlexure

3.1	Materiales y construcción del microscopio	27
3.1.1	Base de impresión 3D	27
3.1.2	Módulo de iluminación	27
3.1.3	Módulo óptico de alta resolución	28
3.1.4	Ensamblaje de motores y electrónica	29
3.1.5	Configuración final del microscopio de campo claro	30
3.2	Modificaciones en el diseño original OFM	31
3.2.1	Cambios en el módulo de iluminación	31
3.2.2	Cambios en el módulo óptico	32
3.2.3	Adición de filtros	35
3.2.4	Módulo de espectroscopía Raman	37
3.3	Simulaciones realizadas con OpticStudio	39

Si bien el [Capítulo 2](#) se puede considerar puramente teórico, el presente capítulo aborda las primeras contribuciones realizadas para la construcción del microscopio OpenFlexure. En primer lugar, la [Sección 3.1](#) detalla los elementos que componen la configuración más básica para las mediciones de campo claro, y en la [Sección 3.2](#) se describen las modificaciones efectuadas sobre el diseño inicial para mejorar la calidad de los resultados y permitir la visualización de imágenes de fluorescencia. Por su parte, la [Sección 3.3](#) ofrece simulaciones realizadas con el *software* de diseño óptico OpticStudio, de Zemax, para complementar y justificar algunas de las modificaciones implementadas al microscopio.

El objetivo principal es construir un microscopio de fluorescencia en miniatura de diseño simple [11], que contenga la menor cantidad de piezas posible, facilitando un ensamblaje rápido, y que, aunque sus piezas sean impresas en 3D, pueda ofrecer la precisión suficiente para enfocar objetos. Es importante destacar que no se pretende conseguir un microscopio de fluorescencia que presente la misma capacidad de iluminación y calidad de imagen que un microscopio comercial, sino que sea asequible para laboratorios de bajo presupuesto y ofrezca una calidad de imagen suficiente para llevar a cabo determinados análisis, como la detección temprana de fitoplancton.

3.1. Materiales y construcción del microscopio

La presente sección aborda las partes básicas del microscopio OpenFlexure en configuración de campo claro y su proceso de construcción. Su estructura se puede dividir en cuatro partes separadamente: la base de impresión 3D, los módulos óptico y de iluminación y, finalmente, el ensamble de los motores y de la electrónica.

3.1.1. Base de impresión 3D

Las piezas están fabricadas con plástico tipo PLA (ácido poliláctico) y su ensamblaje se realiza manualmente. La pieza principal contiene un actuador por cada uno de los tres ejes, que permiten el movimiento de la muestra en X e Y o enfocar mediante el desplazamiento en Z. Tres engranajes de plástico, uno por actuador, encajan en un tornillo, que tira hacia arriba de una tuerca de latón, y con ayuda de una banda elástica se consigue ejercer una presión contraria para mantener tensado el sistema, lo que permite el desplazamiento en Z con suavidad. Las piezas necesarias para la construcción de la base del microscopio se muestran en la [Figura 3.1](#).



Figura 3.1. Piezas que conforman el cuerpo del microscopio OpenFlexure.

3.1.2. Módulo de iluminación

La observación de campo claro se efectúa utilizando como fuente de iluminación un LED blanco, colocado en la parte central de la pieza 3D que se muestra en la [Figura 3.2](#). Adicionalmente, se utiliza una lente condensadora a fin de modular emisión del LED y concentrarla en un cono que ilumine la muestra uniformemente. Destacar que el LED se alimenta desde una fuente de alimentación de 5V. Su espectro de emisión se muestra en la [Figura 3.3](#).

Por otra parte, la lente condensadora utilizada para completar este módulo está fabricada en polimetilmetracrilato (PMMA), con diámetro $D=13\text{mm}$ y distancia focal $f=6\text{mm}$.

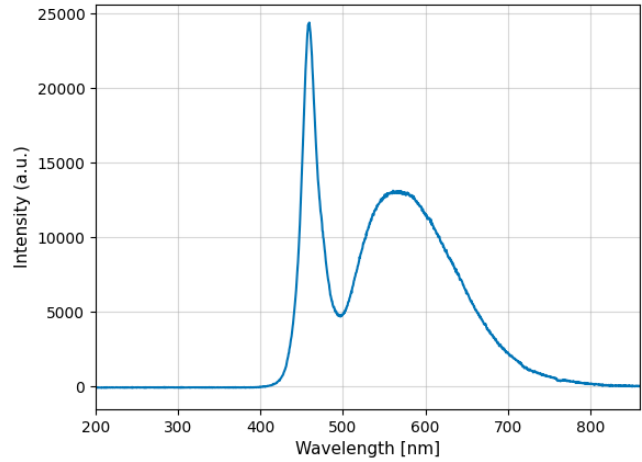


Figura 3.2. Piezas que conforman el módulo de **Figura 3.3.** Espectro de emisión del LED blanco iluminación del microscopio OpenFlexure. utilizado para la iluminación en transmisión.

Del espectro de emisión de la [Figura 2.2](#) se deduce que el LED blanco está formado por un LED azul (460 nm) recubierto de un fósforo que absorbe parte de la radiación azul emitida y genera un amplio rango de emisión en todo el espectro visible.

3.1.3. Módulo óptico de alta resolución

Para obtener imágenes con una cierta calidad se debe utilizar un sistema óptico más complejo, que simplemente la lente de una cámara web. El módulo óptico utiliza un objetivo de microscopio con rosca RMS (*Royal Microscopy Society*) junto con una lente correctora, situada sobre un sensor CMOS.

Las piezas necesarias para su construcción se muestran en la [Figura 3.4](#), que está compuesta por una pieza de plástico, con la rosca RMS en su parte superior para posicionar la lente objetivo, que alberga la lente correctora y un módulo de cámara Raspberry Pi v2, que contiene el sensor de imagen CMOS.

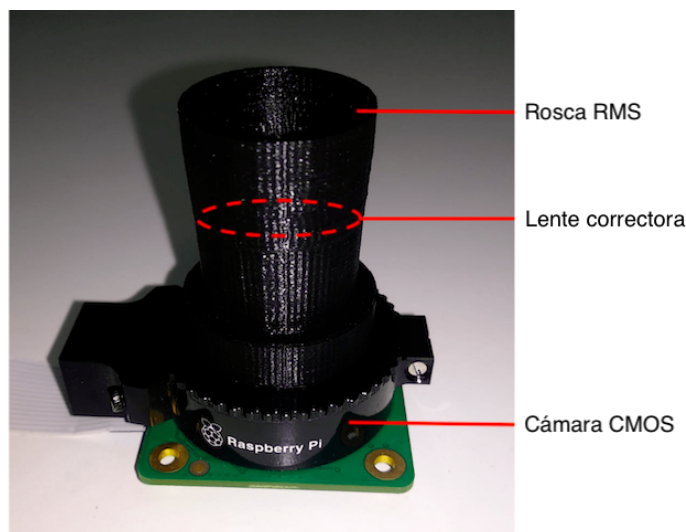


Figura 3.4. Elementos que conforman el módulo óptico de alta resolución.

El objetivo escogido está optimizado para trabajar con muestras biológicas. Se trata del modelo DM-WJ003, de tipo acromático, construido específicamente para corregir las aberraciones esférica y cromática.

Modelo	DM-WJ003
Aumento	40x
NA	0.65
EFL (mm)	4.6
WD (mm)	0.53
Rango óptico (nm)	400-700
Longitud (mm)	34.0



Tabla 3.1. Especificaciones del objetivo de microscopio DM-WJ003.

Figura 3.5. Objetivo 40x DM-WJ003.

En cuanto a la lente correctora, se trata del doblete acromático AC127-050-A, de Thorlabs, con distancia focal $f=50$ mm, diámetro $D=12.7$ mm y revestimiento antirreflectante (*Anti-Reflective Coating*, ARC) en el rango 400-700 nm.

Finalmente, en la [Tabla 3.2](#) se recogen las especificaciones más relevantes de módulo de cámara v2.

Módulo de cámara	v2
Tipo	CMOS
Tamaño (mm)	25 x 23 x 9
Resolución imagen (Mpx)	8
Sensor	Sony IMX219
Resolución sensor (px)	3280 x 2464
Área sensor (mm)	3.68 x 2.76 (4.6 diagonal)
Tamaño píxel (μm)	1.12 x 1.12

Tabla 3.2. Especificaciones del módulo de cámara Raspberry Pi v2.

3.1.4. Ensamblaje de motores y electrónica

El microscopio se puede motorizar para poder ejecutar tareas de forma automática. Esto se consigue por medio de los motores paso a paso en los ejes X, Y, Z y el firmware del controlador del motor utilizando el IDE de Arduino. [55]

Debido a su popularidad y bajo costo, se ha utilizado un ordenador de placa única, Raspberry Pi 3 modelo B+, para controlar algunos de los componentes del microscopio y una interfaz gráfica de usuario (*graphic user interface*, GUI) para adquirir imágenes y modificar diferentes parámetros, como el tiempo de exposición o la ganancia.

Un beneficio adicional de la plataforma Raspberry Pi es su gran cantidad de sensores y de accesorios enchufables disponibles en el mercado, que permiten mejorar las capacidades del microscopio y ayudar a desarrollar tareas automáticas.

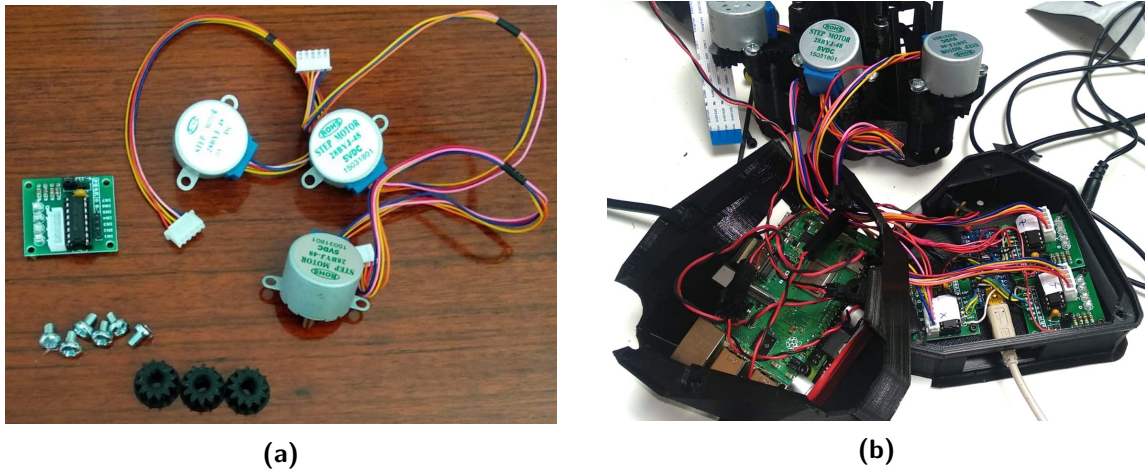


Figura 3.6. (a) Partes necesarias para realizar el ensamblaje de los motores. (b) Interior del módulo electrónico.

3.1.5. Configuración final del microscopio de campo claro

En la [Figura 3.7](#) se muestra el microscopio OpenFlexure construido, resultado de la unificación de todos los módulos descritos en las secciones anteriores.

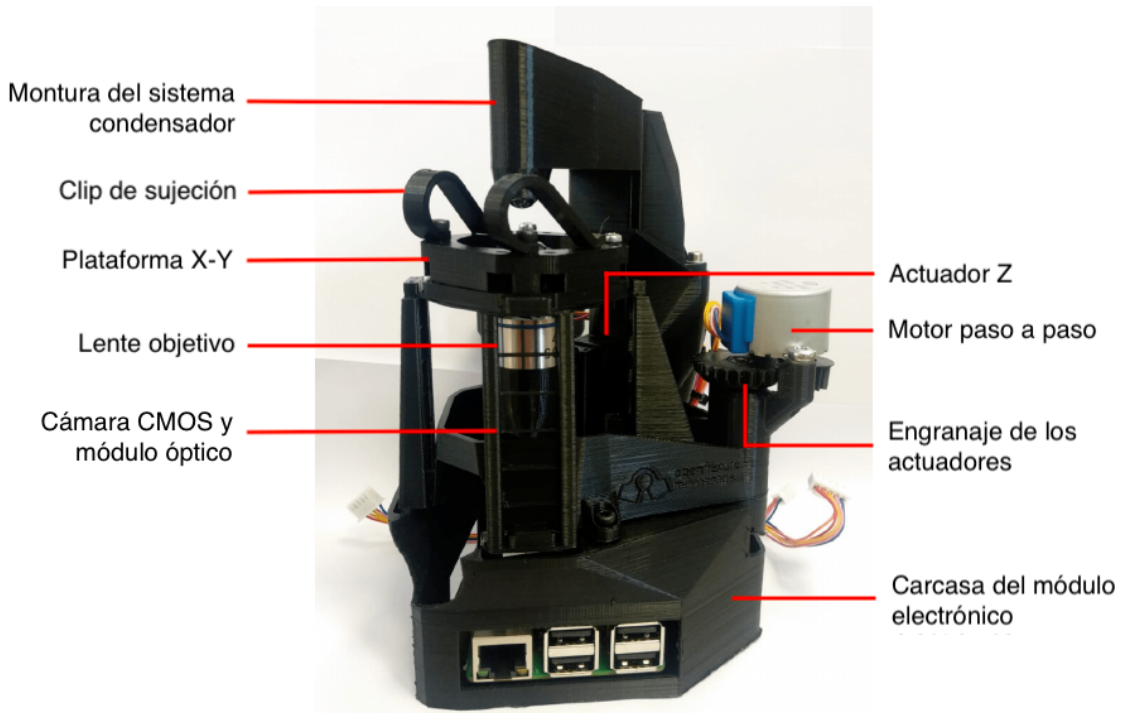


Figura 3.7. Descripción general del diseño del microscopio OpenFlexure en configuración de campo claro. La montura del condensador alberga un LED de iluminación y una lente de condensador de plástico, mientras que el módulo óptico se encuentra debajo de la plataforma X-Y, y contiene una lente de objetivo, una lente de tubo y una cámara. Todo el módulo óptico está conectado al actuador Z, lo que proporciona un enfoque variable. Tanto el módulo óptico como la plataforma X-Y están controlados por engranajes actuadores en la parte posterior del microscopio, accionados por motores paso a paso. Una carcasa de electrónica desmontable almacena piezas electrónicas, como los controladores de motor y la Raspberry Pi para lograr la automatización. [11]

3.2. Modificaciones en el diseño original OFM

El objetivo de esta sección es evaluar los elementos que conforman el microscopio construido en la [Sección 3.1](#) para conseguir un diseño optimizado, reduciendo costes y permitiendo la adquisición de imágenes de fluorescencia. Primero, se describen los cambios realizados en los módulos de iluminación y óptico, después se trata la adición de filtros de fluorescencia y, finalmente, se presenta el módulo desarrollado para poder realizar espectroscopía Raman.

3.2.1. Cambios en el módulo de iluminación

Cambios en la fuente de iluminación

Dado que se pretende hacer un estudio de la presencia de pigmentos fluorescentes en muestras de fitoplancton, que están asociados a la clorofila-a (ver [Figura 2.12](#)), se han caracterizado un conjunto de fuentes LED de diferentes potencias en el rango de emisión 373-459 nm para evaluar la respuesta de fluorescencia cuando se modifican las propiedades de la fuente de iluminación.

En primer lugar, se han diseñado nuevas piezas de impresión 3D que se adapten a las dimensiones de todos los LED. Debido a que se espera que los LED tradicionales de 20 mA no tengan la suficiente potencia como para producir emisiones de fluorescencia ideales, se han empleado tres LED de alta potencia, con longitudes de onda 373 nm, 405 nm y 449 nm, y con un regulador de potencia que permita controlar la excitación de la muestra.

Cabe destacar que también se han construido anillos de iluminación LED para adquirir imágenes en configuración de epi-iluminación, incidiendo por debajo de la muestra.

La [Tabla 3.3](#) recoge los resultados de las caracterizaciones de todas las fuentes utilizadas, y en la [Figura 3.8](#) se muestra uno de los anillos de iluminación LED construidos.

Fuente	λ (nm)	FWHM (nm)	I_F (mA)	V_F (V)	P (mW)
LED	398	12.4	20	3.4	37
LED	459	20.1	20	3.0	34
LED alta potencia	373	14.8	700	3.8	1360
LED alta potencia	405	17.0	500	3.4	930
LED alta potencia	449	17.8	350	3.0	600

Tabla 3.3. Especificaciones de las diferentes fuentes utilizadas experimentalmente.



Figura 3.8. Anillo de iluminación LED utilizado para adquirir imágenes en configuración de epi-iluminación.

Cambios en la lente condensadora

Debido a que la excitación de fluorescencia de la clorofila-a se encuentra en el rango UV y la lente condensadora de PMMA presenta una escasa transmisión en ese rango, tal y como se muestra en la [Figura 3.9a](#), es necesario reemplazar esta lente por otra que ofrezca mejores prestaciones en el UV y así poder obtener la mejor respuesta de fluorescencia posible.

Por este motivo, se ha sustituido la lente condensadora de PMMA por otra de sílice fundida, concretamente el modelo LA4647 de Thorlabs. Se trata de una lente plano-convexa con distancia focal $f=20.1$ mm y diámetro $D=12.7$ mm. La [Figura 3.9b](#) muestra el espectro de transmisión de la sílice fundida en el rango UV.

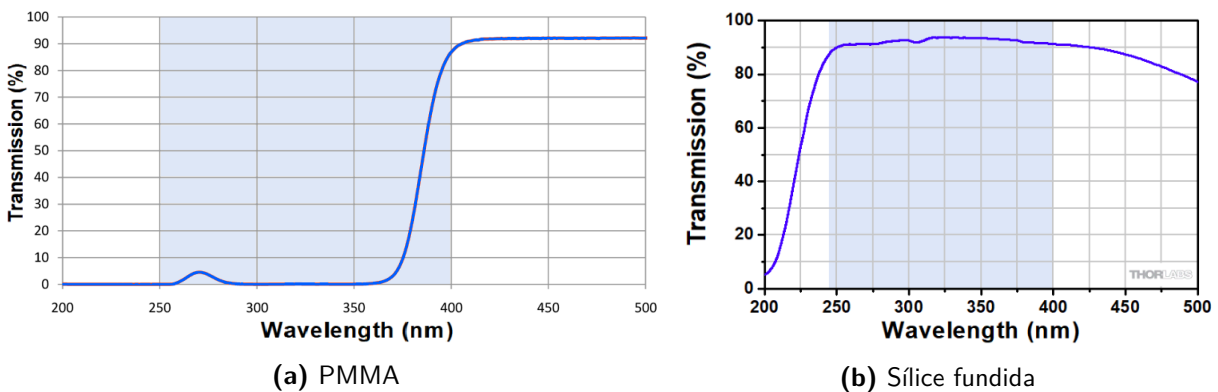


Figura 3.9. Espectros de transmisión en el rango UV de los materiales (a) polimetilmetacrilato (PMMA) [56] y (b) sílice fundida [57].

3.2.2. Cambios en el módulo óptico

Objetivos

En la [Tabla 3.4](#) se recogen las características principales de los objetivos que se han probado en el microscopio OFM para la adquisición de imágenes a diferentes aumentos.

M	Modelo	NA	EFL (mm)	WD (mm)	Rango óptimo (nm)	L (mm)
10x	LMU-10x-248 (Thorlabs)	0.25	19.8	14.5	UV (240-260)	40.0
10x	04OAS010 (Melles Griot)	0.25	16.9	6.8	VIS (400-700)	37.8
20x	-	0.40	8.4	1.7	VIS (400-700)	31.3
25x	04OAS014 (Melles Griot)	0.50	6.6	1.3	VIS (400-700)	45.0
40x	04OAS016 (Melles Griot)	0.65	4.6	0.47	IR (1300-1500)	45.0
40x	DM-WJ003	0.65	4.6	0.53	VIS (400-700)	34.0

Tabla 3.4. Especificaciones de los diferentes objetivos utilizados experimentalmente.

Módulo de cámara

Como modificación del detector CMOS, se ha añadido la posibilidad de incorporar otro módulo de cámara que ofrece mejores características, el modelo HQ (*High Quality*), para contrastar sus diferencias con respecto a la cámara v2. En la [Tabla 3.5](#) se recogen la comparación de las especificaciones técnicas de ambos módulos de cámara.

Módulo de cámara	v2	HQ
Tipo	CMOS	CMOS
Tamaño (mm)	25 x 23 x 9	38 x 38 x 18.4
Resolución imagen (Mpx)	8	12.3
Sensor	Sony IMX219	Sony IMX477
Resolución sensor (px)	3280 x 2464	4056 x 3040
Área sensor (mm)	3.68 x 2.76 (4.6 diagonal)	6.287 x 4.712 (7.9 diagonal)
Tamaño píxel (μm)	1.12 x 1.12	1.55 x 1.55

Tabla 3.5. Comparación entre las especificaciones de módulos de cámara v2 y HQ.

Es importante destacar que todas las cámaras RGB poseen un filtro infrarrojo para cortar el paso de las emisiones IR que puedan afectar a la calidad de los colores. Se ha observado que tanto la cámara v2 como la HQ presentan alteraciones en los tonos rojizos debido a la presencia de este filtro. Para demostrar este efecto, se ha extraído el filtro de ambos detectores, tal y como se muestra en la [Figura 3.11](#), y se han comparado las imágenes de la fluorescencia roja de una muestra de aceite con y sin filtro IR al incidir con uno de los LED de alta potencia de la [Tabla 3.3](#). El resultado se muestra en la [Figura 3.12](#).



Figura 3.10. Módulo de cámara HQ para Raspberry Pi.

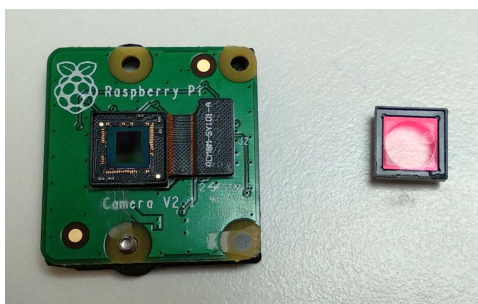


Figura 3.11. Extracción del filtro IR del módulo de cámara v2.

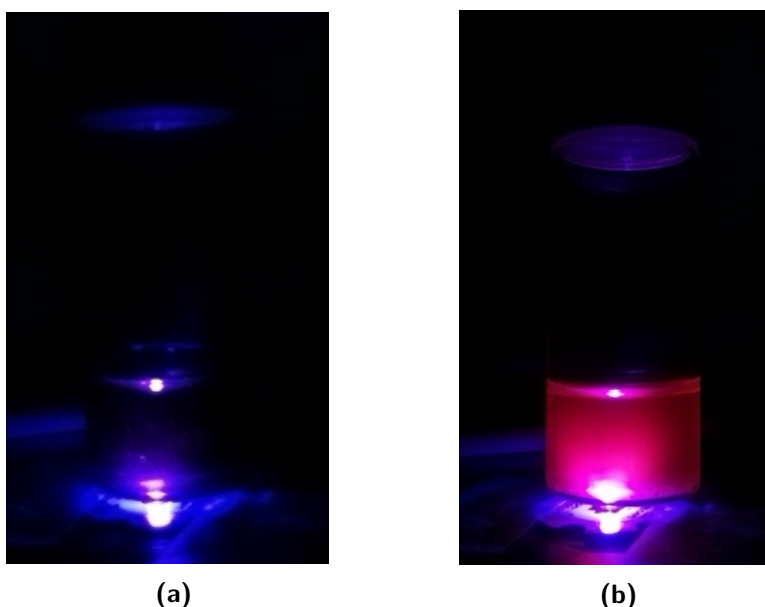


Figura 3.12. Fluorescencia de una muestra de aceite visualizada a través del módulo de cámara (a) v2 con filtro IR y (b) v2 sin filtro IR, bajo las mismas condiciones de iluminación.

Para confirmar esta pérdida de sensibilidad, se han caracterizado los filtros IR de los dos módulos de cámara, v2 y HQ. Ambos espectros de transmisión se muestran en la [Figura 3.13](#).

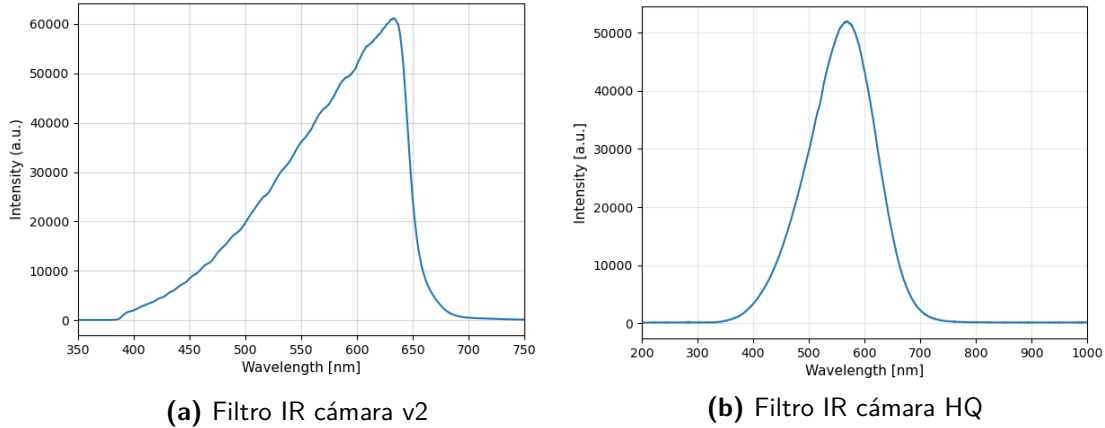


Figura 3.13. Espectros de transmisión de los filtros IR de los módulos de cámara (a) v2 y (b) HQ.

Por lo tanto, queda confirmado que se produce una fuerte pérdida de transmisión en el rango 600-700 nm debido a la presencia del filtro IR en ambas cámaras. Dado que la fluorescencia del fitoplancton se encuentra dentro de ese mismo rango, todas las imágenes extraídas del microscopio OFM se van a obtener habiendo quitado previamente el filtro IR.

Cambios en la lente correctora

En el cuerpo del objetivo ([Figura 3.5](#)) se especifica que la longitud del tubo está estandarizada, según la RMS, a 160 milímetros para microscopios de luz transmitida con corrección infinita. La función de la lente correctora es minimizar esta distancia para lograr un diseño más compacto.

En este apartado se evalúa el efecto de la lente correctora sobre la imagen final del sistema. Al tratarse de un doblete acromático, de alto coste en comparación al resto de elementos que componen el microscopio, se plantea la posibilidad de eliminar este elemento con el fin de abaratar costes. Para llevar a cabo esta tarea, se va a utilizar el portamuestras de calibración de la [Figura 3.14](#), concretamente la regla con divisiones de 10 μm .

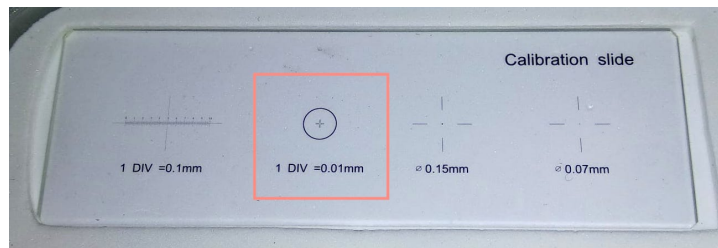


Figura 3.14. Portamuestras de calibración con diferentes escalas. Se ha utilizado la escala con divisiones de 10 μm .

En la [Figura 3.15](#) se muestran diferentes vistas de la regla de calibración a través del microscopio utilizando el objetivo de 40x DM-WJ003: módulo de cámara v2 con y sin lente correctora y lo mismo con la cámara HQ.

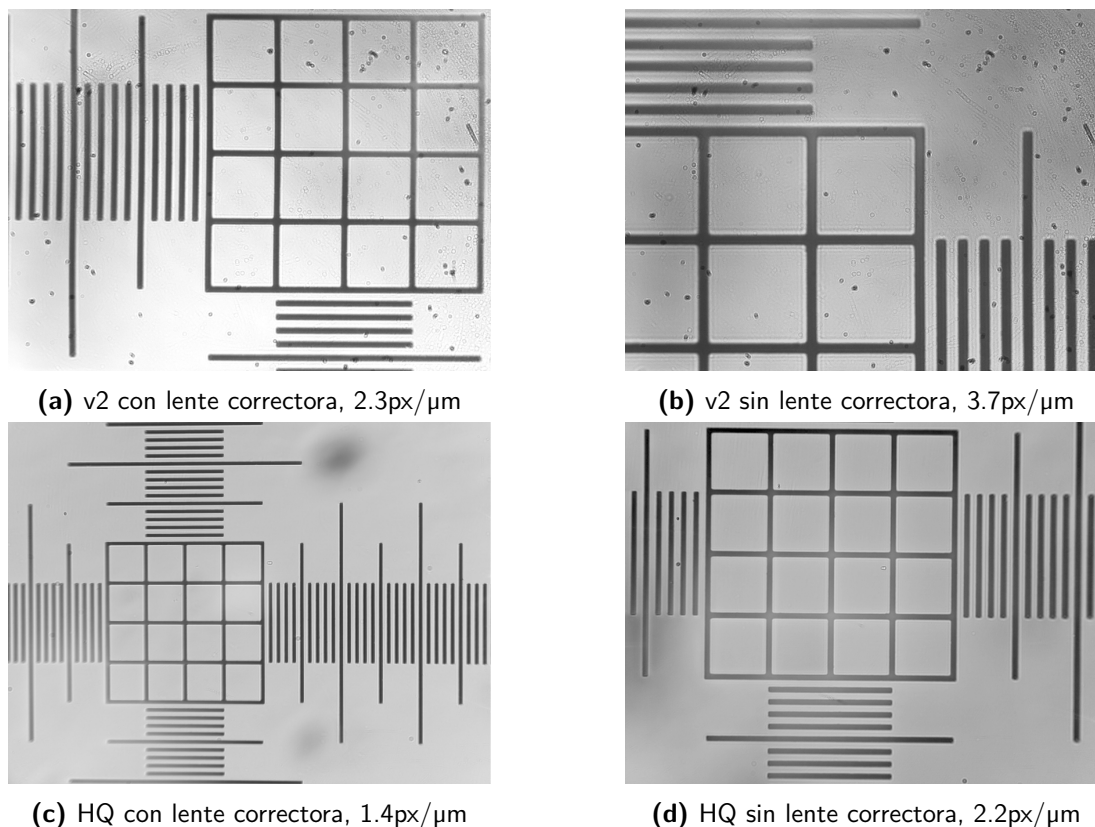


Figura 3.15. Vista de una de las reglas de calibración a través del microscopio utilizando un objetivo de 40x y sus correspondientes calibraciones teniendo en cuenta que el espacio entre líneas es de $10\ \mu\text{m}$. Las configuraciones estudiadas son: (a) cámara v2 con lente correctora, (b) cámara v2 sin lente correctora, (c) cámara HQ con lente correctora y (d) cámara HQ sin lente correctora.

En primer lugar, la [Figura 3.15](#) revela que no hay diferencias en cuanto a la calidad de imagen entre las cámaras a las dimensiones de imagen consideradas ($832 \times 624\ \text{px}$), lo que sí se aprecia es un efecto de magnificación, del calculada a partir de la calibración de la [Figura 3.15](#) ya que se observa a simple vista que las imágenes adquiridas con el módulo de cámara v2 presentan un mayor aumento.

En cuanto a la presencia de la lente correctora, al quitarla del sistema no se han observado variaciones significativas en resolución, solamente en el aumento, se puede observar a simple vista que las imágenes adquiridas al quitar la lente presentan un mayor aumento. A partir de la calibración de la [Figura 3.15](#) se ha determinado la magnificación que introduce la lente correctora al sistema, $M_{\text{proy}}=0.62$. Cabe destacar que ha sido posible lograr el enfoque mediante un ligero desplazamiento en Z, por lo que no sería necesario modificar las dimensiones de las piezas 3D para lograr la adquisición de imágenes.

Con todo esto, se ha llegado a la conclusión de que es posible quitar la lente correctora sin perder la calidad de las imágenes, lo cual supone reducir el coste total del microscopio y, por lo tanto, que sea más asequible para su utilización en lugares con recursos escasos.

3.2.3. Adición de filtros

La mayoría de los microscopios contienen cubos de detección de fluorescencia, formados por un filtro de excitación, un espejo dicróico y un filtro de emisión. No obstante, a parte de que dicha configuración tiene un elevado coste, para poder implementarla en el microscopio

OFM debería tener dimensiones muy pequeñas, lo cual aumentaría aún más su precio. Por lo tanto, la incorporación de filtros de fluorescencia en el microscopio ha consistido en el posicionamiento de dos filtros, de excitación y emisión, separadamente.

Inicialmente se ha pretendido evitar el filtro de excitación, ya que habitualmente se emplean para eliminar las longitudes de onda no deseadas en fuentes de iluminación más tradicionales, como lámparas de deuterio o de mercurio. No obstante, la caracterización de las fuentes LED de la [Tabla 3.3](#) ha evidenciado una ligera emisión residual dentro de la banda de fluorescencia del fitoplancton. En la [Figura 3.16](#) se muestra el espectro de emisión adquirido de la fuente LED de alta potencia, con máximo de emisión en $\lambda=373$ nm.

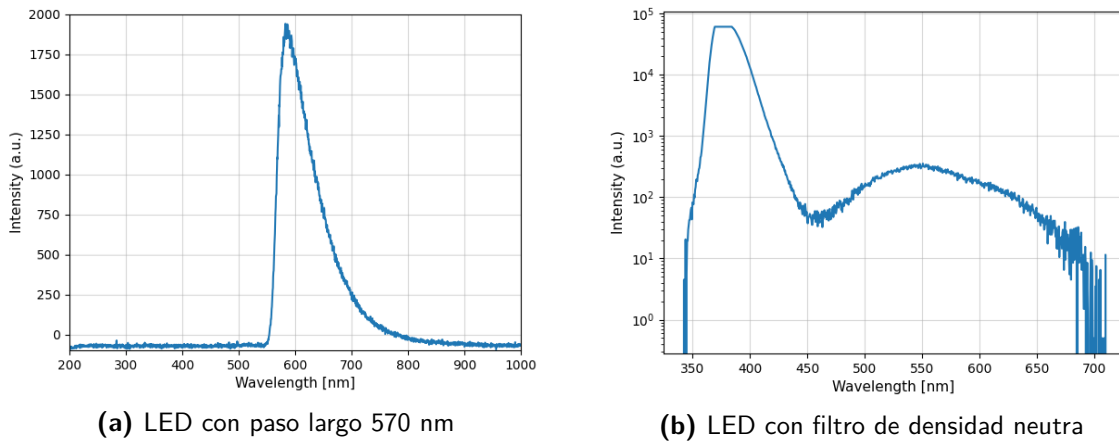


Figura 3.16. (a) Espectro de emisión de un LED de alta potencia, con máximo de emisión en $\lambda=373$ nm, al atravesar un filtro paso banda de 570 nm. (b) Espectro de emisión del mismo LED, en escala logarítmica, tras su paso por un filtro de densidad neutra.

Una vez demostrada la necesidad de emplear un filtro de excitación, se ha seleccionado un paso banda comercial y se ha posicionado entre la fuente de iluminación y la lente condensadora. Dicho filtro se ha caracterizado previamente a su utilización, el resultado se muestra en la [Figura 3.17a](#). La caracterización revela que las longitudes de onda transmitidas están comprendidas en el rango 325-475 nm.

Por otra parte, se ha situado un filtro de emisión paso largo justo antes de la cámara CMOS, el modelo FGL570 de Thorlabs, que restringe la transmisión de longitudes de onda por debajo de 570 nm. En la [Figura 3.17b](#) se muestra su espectro de transmisión.

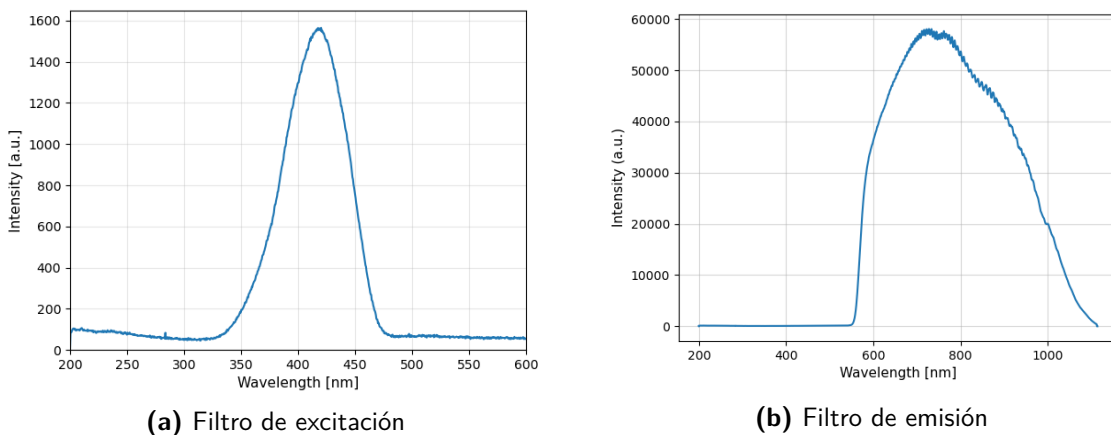


Figura 3.17. Espectros de transmisión de los filtros utilizados para la (a) excitación y (b) emisión de fluorescencia.

3.2.4. Módulo de espectroscopía Raman

Añadir la posibilidad de obtener espectros Raman de las muestras bajo observación permitiría extraer información molecular relevante, que podría ayudar a distinguir las variedades de fitoplancton y otros tipos de muestra.

Se ha implementado un módulo de espectroscopía Raman a la configuración original del microscopio OFM, utilizando una sonda Raman *RamanProbe™ RPS532/12-5* de *InPhotonics*, diseñada para la excitación de las muestras a 532 nm. En su interior consta de una eficiente microóptica de filtrado y dirección, con $NA = 0.22$, optimizada para el filtrado completo de la línea láser y la eliminación de contribuciones espectrales del cuarzo de las fibras ópticas. Con todo, se consigue que la distancia de trabajo sea de 10 mm.

La sonda está acoplada a una fuente de excitación láser y a un espectrómetro a través de dos fibras ópticas, de 105 μm y de 200 μm respectivamente, para poder realizar mediciones remotas. La separación de las dos vías, excitación y emisión, se consigue mediante un *beam-splitter*. Este mecanismo de recolección permite obtener información en el rango espectral 250-3900 cm^{-1} (Stokes), dependiendo de los límites del espectrómetro utilizado.

En la [Figura 3.18](#) se muestra un esquema de la óptica interna de la sonda *RamanProbe™*.

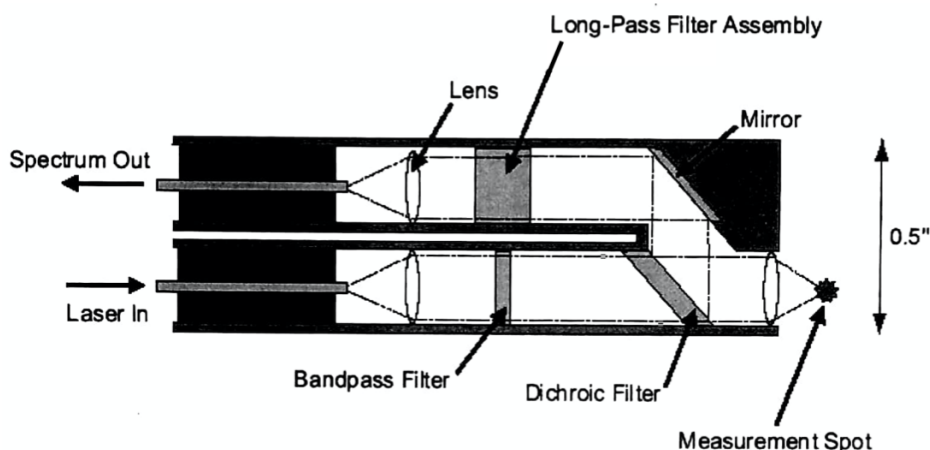


Figura 3.18. Esquema de los componentes ópticos que conforman la sonda *RamanProbe™*.

Cabe destacar la importancia de utilizar filtros paso banda, dichroicos y paso largo para separar las vías de excitación y emisión. La geometría de la sonda permite un fácil alineamiento y proporciona un rendimiento óptico debido a la superposición total de las señales procedentes de las dos vías.

Como fuente de excitación se ha utilizado el láser de estado sólido MGL-H-532 de CNI Laser, con emisión en 532 nm. En la [Tabla 3.6](#) se muestran sus especificaciones generales. Para la detección se ha empleado el espectrómetro de alta sensibilidad Maya2000 Pro de Ocean Insight. En la [Tabla 3.7](#) se indican sus características principales.

Cabe destacar que el rango espectral que abarca el espectrómetro es demasiado amplio. Se espera que las bandas Raman Stokes se encuentren en 150-3900 cm^{-1} , que según la [Ecuación 2.20](#) equivale a 536-700 nm. Por lo tanto, la resolución que ofrece el Maya2000 Pro será notablemente inferior a la que podría ofrecer otro con un rango espectral más reducido, lo que podría explicar pérdidas de información como solapamientos entre las bandas Raman.

Especificaciones láser MGL-H-532	
Longitud de onda (nm)	532 ± 1
Potencia de salida (mW)	>500
Modo transversal	TEM ₀₀
Modo de operación	CW
Estabilidad de potencia (rms)	<10 %
Tiempo de calentamiento (minutos)	<10
Divergencia del haz (mrad)	<2.0
Diámetro del haz (mm)	3.0 (aprox)
Temperatura de operación (°C)	10 - 35

Tabla 3.6. Especificaciones técnicas del láser MGL-H-532 de CNI Laser.

Especificaciones Maya2000 Pro	
Rango espectral (nm)	200 - 1100
Relación señal-ruido	450:1
Rango dinámico	15000:1
Tiempo de integración (ms)	7.2 - 5
Temperatura de operación (°C)	0 - 50

Tabla 3.7. Especificaciones técnicas del espectrómetro Maya2000 Pro de Ocean Insight.

En la [Figura 3.19](#) se muestra el montaje experimental del módulo de espectroscopía implementado al OFM. Cabe destacar que además de los elementos mencionados anteriormente, se utiliza también un colimador a la entrada de la fibra óptica de excitación y un sistema de refrigeración para reducir el ruido espectral del espectrómetro.

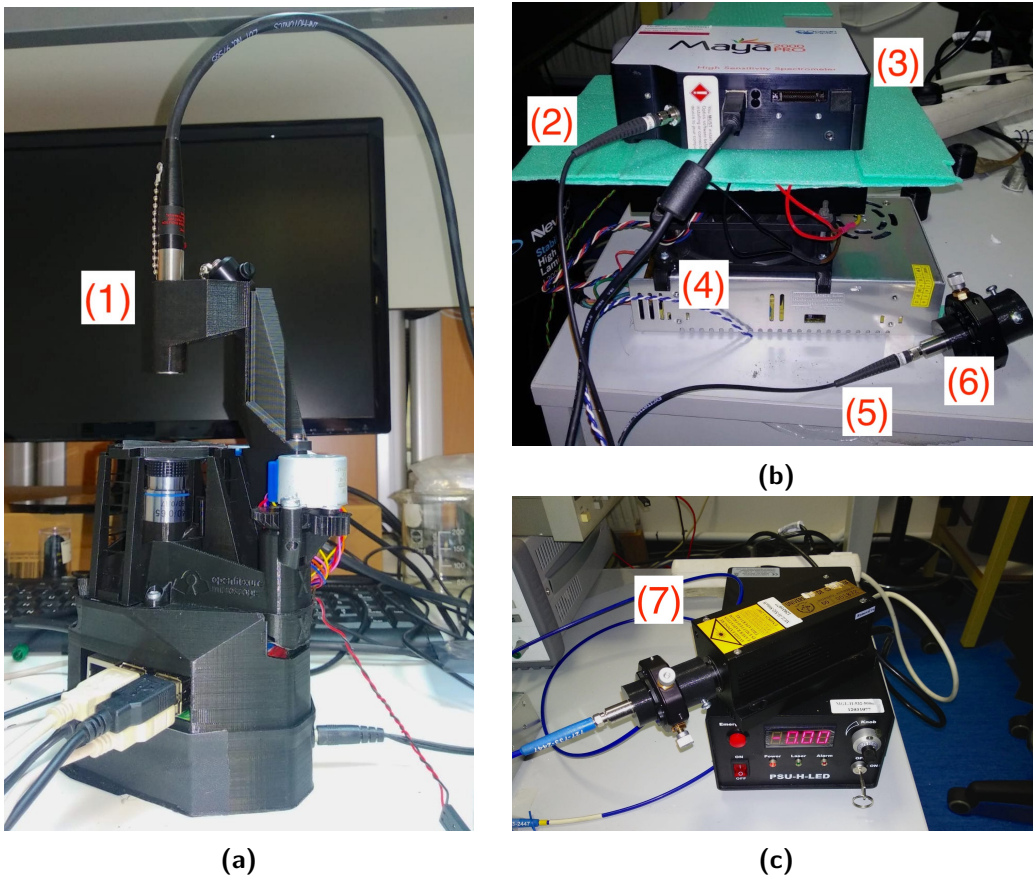


Figura 3.19. Montaje experimental del módulo de espectroscopía Raman implementado al OFM con sus partes: (1) cabeza de la sonda incorporada al microscopio mediante una pieza impresa en 3D, (2) fibra óptica de recolección, (3) espectrómetro Maya2000 Pro, (4) sistema de refrigeración, (5) fibra óptica de excitación, (6) colimador, (7) láser MGL-H-532.

3.3. Simulaciones realizadas con OpticStudio

A continuación, se efectúan una serie de simulaciones del sistema óptico del microscopio OFM, utilizando el *software* OpticStudio de Zemax, para comparar el efecto de quitar la lente correctora con los resultados obtenidos experimentalmente en la [Sección 3.2](#). El interés principal de quitar la lente correctora del sistema es que se trata de uno de los elementos que más encarecen el valor del microscopio. Con esta sección se pretende justificar que:

1. Quitar la lente correctora no implica modificar la longitud del tubo.
2. De acuerdo con la [Figura 3.15](#), eliminar la lente supone un aumento mayor en la imagen.
3. Las aberraciones del sistema al retirar la lente son similares y apenas afectan a la calidad de la imagen.

En primer lugar, se han simulado los elementos ópticos que conforman el tubo del microscopio, es decir, el objetivo, la lente correctora y el plano del detector. Debido a que se desconoce la óptica interna del objetivo empleado experimentalmente (modelo DM-WJ003), se ha utilizado el diseño de otro objetivo con las mismas características: $40\times$ $NA=0.65$, $WD=0.56$, $EFL=4.58$ [58]. La lente correctora es la misma que la utilizada experimentalmente, el doblete acromático AC127-050-A de Thorlabs.

En las [Figuras 3.20](#) y [3.21](#) se muestran los esquemas de los sistemas ópticos con y sin la lente correctora. Primero, se ha simulado el diseño de la [Figura 3.20](#), manteniendo las distancias reales objetivo-lente correctora y lente correctora-plano del detector y buscando la focalización en el plano imagen al variar la distancia plano de la muestra-objetivo (distancia de trabajo). El mismo procedimiento se ha realizado en la [Figura 3.21](#), conservando en este caso la distancia real entre el objetivo y el plano del detector.

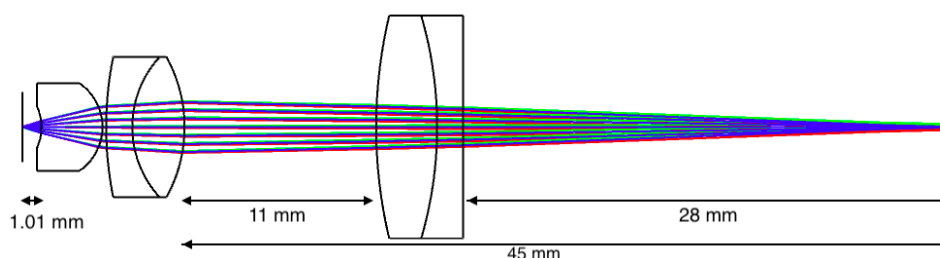


Figura 3.20. Diseño óptico del tubo del microscopio OFM con lente correctora.

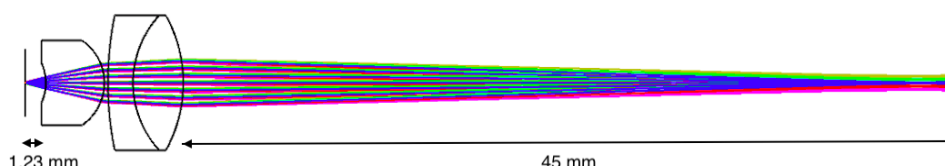


Figura 3.21. Diseño óptico del tubo del microscopio OFM sin lente correctora.

Los diseños de las [Figuras 3.20](#) y [3.21](#) revelan que la diferencia entre sus distancias de trabajo es de apenas 0.2 mm. Por lo tanto, queda demostrado que quitar la lente correctora no implica modificar la longitud del tubo del microscopio, ya que la distancia necesaria para volver a lograr el enfoque se conseguiría con un ligero desplazamiento en Z.

Con el fin de evidenciar el aumento que introduce la lente correctora, se ha utilizado la herramienta de análisis de imágenes geométricas (*Geometric Image Analysis, GIA*), que genera un gráfico de la sección transversal de la intensidad resultante de una fuente extensa en el plano imagen. Posicionando una abertura en el plano objeto es posible evaluar el viñeteo que experimenta la luz en el plano imagen. En la [Figura 3.22](#) se muestra el GIA al situar en el plano objeto una abertura con un patrón en forma de "F" con y sin lente correctora.

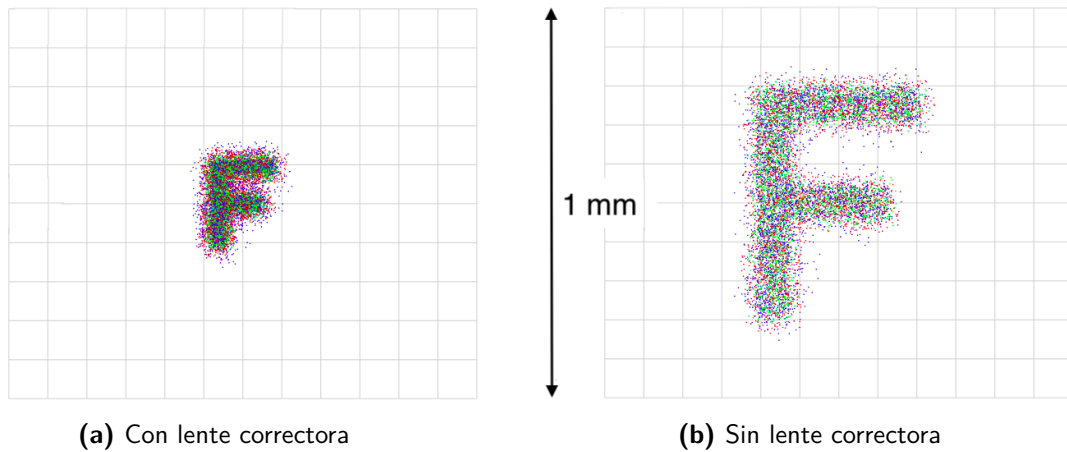


Figura 3.22. Análisis de imágenes geométricas de los diseños ópticos simulados, (a) con lente correctora y (b) sin lente correctora, al colocar en el plano objeto una abertura con forma de "F" .

Finalmente, las [Figuras 3.23](#) y [3.24](#) muestran los diagramas de aberraciones de Seidel de los dos sistemas simulados, con y sin lente respectivamente.

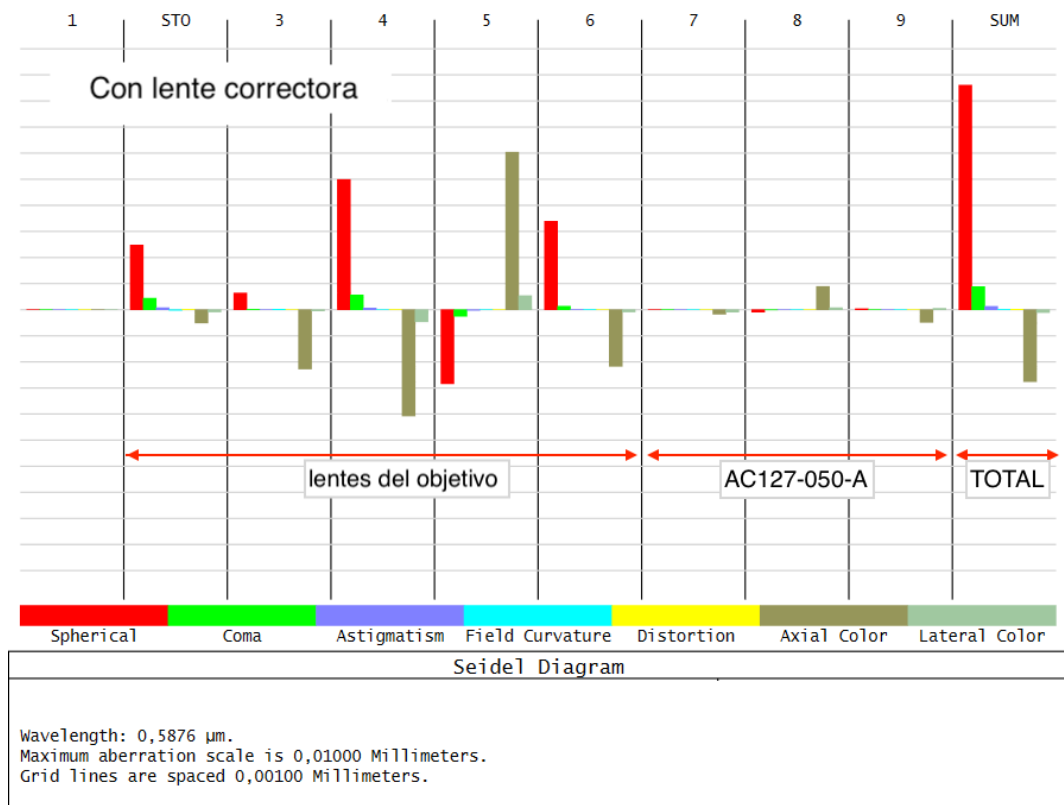


Figura 3.23. Diagrama de aberraciones de Seidel correspondiente al sistema con lente correctora.

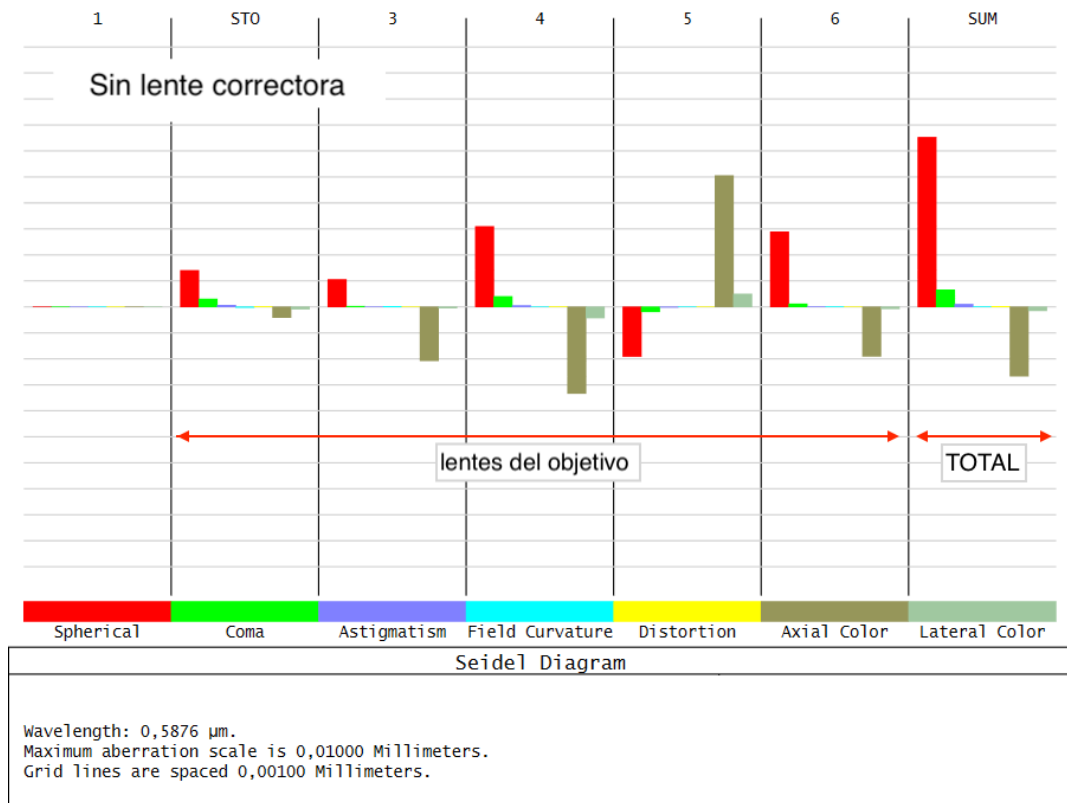


Figura 3.24. Diagrama de aberraciones de Seidel correspondiente al sistema sin lente correctora.

Los tipos básicos de aberraciones debidos a la geometría de lentes o espejos y que son aplicables a los sistemas que se ocupan de la luz monocromática se conocen como aberraciones de Seidel, e incluyen las aberraciones esférica, coma, astigmatismo, curvatura de campo, distorsión y cromática [59]. Los análisis de coeficientes de Seidel se emplean para evaluar la contribución de cada superficie a la suma de las aberraciones totales de un sistema óptico.

Para el caso de las simulaciones realizadas, se deduce a partir de las Figuras 3.23 y 3.24 que la aberración predominante es la esférica, y aumenta al incluir la lente correctora, ya que este elemento añade al sistema tres superficies de este tipo al tratarse de un doblete acromático. No obstante, y a pesar de que existen ligeras diferencias entre las aberraciones de dos configuraciones, teniendo en cuenta la escala del diagrama se puede considerar que al quitar la lente las aberraciones se mantienen iguales.

Por lo tanto, se ha demostrado que eliminar la lente correctora del tubo no implicaría modificar su longitud para lograr el enfoque, que se obtendrían imágenes con mayor aumento y que no supondría un incremento significativo de las aberraciones en el plano del detector.

4

Otros setup

4.1	Microscopio confocal NIKON A1R	42
4.2	Microscopio confocal Raman JASCO NRS-4500	44
4.3	Módulo de microfluídica	46

A continuación, se aborda la exposición del setup empleado para complementar y contrastar los resultados obtenidos en el [Capítulo 5](#), utilizando el setup experimental del [Capítulo 3](#). La [Sección 4.1](#) describe el funcionamiento del microscopio confocal NIKON A1R. Por su parte, la [Sección 4.2](#) detalla la configuración y los elementos que componen el equipo de espectroscopía Raman NRS-4500 JASCO y, finalmente, la [Sección 4.3](#) presenta el sistema de microfluídica implementado para la toma de medidas *in situ* con el microscopio OFM.

4.1. Microscopio confocal NIKON A1R

Se ha utilizado un microscopio confocal NIKON A1R, que permite la adquisición de imágenes de fluorescencia en 2D o 3D. A diferencia de los microscopios de fluorescencia convencionales, genera imágenes solamente con la luz fluorescente emitida en el plano focal y elimina la fluorescencia desenfocada fuera del plano.

Debido a que solo es posible iluminar un punto de la muestra, es necesario efectuar barridos sobre secciones concretas de la misma. El modo de escaneo más común es el galvanométrico, que realiza barridos en el plano horizontal utilizando uno o más espejos oscilantes. Además, este dispositivo permite también escanear en modo resonante, utilizando una onda sinusoidal de alta frecuencia que oscila a una velocidad constante de 7.8 kHz, de forma que reduce la tensión en los motores y les permite funcionar a velocidades mucho más altas de lo habitual. Con esta configuración es posible alcanzar velocidades de hasta 720 fps y campos de visión de 25 mm [60]. Cabe destacar que además de barrer en el plano horizontal también es posible hacer lo mismo en planos verticales contiguos y formar imágenes en tres dimensiones, uno de los atractivos de este tipo de microscopía.

Se trata de un microscopio invertido que combina cuatro líneas láser (405 nm, 488 nm, 561 nm y 640 nm) y cuatro fotomultiplicadores (*photomultiplier tube*, PMT), cuya función es amplificar el efecto fotoeléctrico al inducir la emisión de electrones secundarios y poder detectar la señal procedente de cada una de las líneas por separado. Además, cuenta con una unidad detectora espectral que permite la excitación simultánea con los cuatro láseres y separar 32 canales de los espectros fluorescentes, lo que da la posibilidad de desmezclar en tiempo real los perfiles de emisión estrechamente superpuestos de múltiples fluoróforos, así como la eliminación de autofluorescencias no deseadas. Se encuentran disponibles tres resoluciones espectrales o anchos de canal (2.5, 6 y 10 nm), que cubren hasta 320 nm de espectro en cada escaneo.

La confocalidad se logra mediante un *pinhole* de tamaño variable, que limita por completo la luz entrante eliminando la fluorescencia desenfocada y permitiendo la reconstrucción 3D de las imágenes. El diámetro del orificio de este equipo puede variar de 12 a 256 μm . Además, cuenta con un "sistema de enfoque perfecto" (*perfect focus system*, PFS), que corrige las desviaciones de enfoque causadas por cambios de temperatura o alteraciones mecánicas.

El haz láser pasa por el camino óptico de la [Figura 4.1](#) hasta alcanzar la muestra y la excita. A continuación, toda la luz emitida por fluorescencia es recogida de nuevo por la lente del objetivo y es devuelta al camino óptico. Debido a que la fluorescencia experimenta corrimiento hacia el rojo, es posible redirigir esas longitudes de onda, separándolas de la de excitación, mediante un espejo dicróico y conducir las hacia los dispositivos de detección. Después, la señal de fluorescencia pasa a través de un *pinhole* con un determinado diámetro para eliminar parte de la luz parásita, se inserta en un filtro paso banda y posteriormente se dirige a una controladora, donde interactúa con el detector, que en este caso se trata de un espectrómetro, hasta que finalmente la señal es convertida en imagen mediante un detector EMCCD para que posteriormente pueda ser visualizada y procesada en un PC.

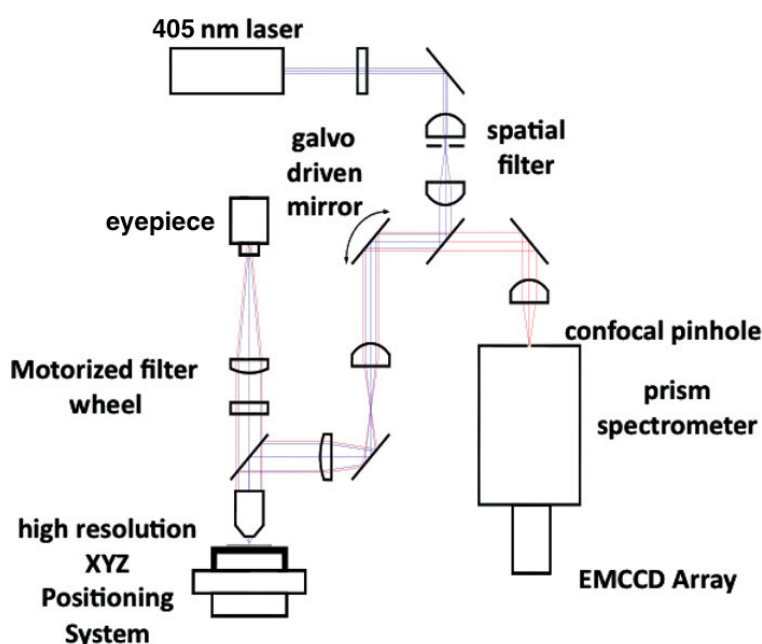


Figura 4.1. Componentes de un microscopio confocal en configuración espectral. [61]



Figura 4.2. Microscopio confocal NIKON A1R.

4.2. Microscopio confocal Raman JASCO NRS-4500

Se ha utilizado un microscopio Raman NRS-4500 de la casa comercial JASCO [47]. Este dispositivo también cuenta con una configuración confocal que permite realizar medidas a lo largo del volumen de las muestras. La Figura 4.3 muestra un esquema de los elementos ópticos que lo conforman.

En primer lugar, cabe destacar que el equipo consta de una unidad principal de espectrometría conectada a un PC y que el láser disponible utiliza la línea de excitación en 532nm, con una potencia de 20 mW para obtener tanto la componente Stokes como la Anti-Stokes de las dispersiones Raman generadas.

Los dispositivos láser están diseñados para generar luz polarizada plana en una sola longitud de onda. Sin embargo, no son perfectos y pueden estar presentes otras longitudes de onda adicionales. La pureza de la longitud de onda del láser de excitación puede mejorarse mediante el empleo de filtros paso banda. El equipo NRS-4500 posee un filtro óptico paso banda de excitación, que elimina las emisiones diferentes a 532 nm, y un filtro óptico (atenuador) para aminorar la salida del láser, evitar daños en las muestras y permitir la visualización del *spot* del láser junto con la muestra. La selección de la atenuación se puede hacer desde el 100 % de la transmisión hasta el 0.0001 %. También cuenta con un obturador para bloquear por completo la emisión del láser, utilizado para evitar la irradiación innecesaria de la muestra, cuando la puerta del equipo se encuentra abierta o para tomar mediciones de fondo.

A continuación, el haz láser pasa a través de las lentes del objetivo e ilumina la muestra después de ser dividido por primera vez por un divisor de haz (*beam splitter*, BS) situado en la parte superior del revólver de objetivos. Después, la señal de dispersión Raman procedente de la muestra es recogida de nuevo por el objetivo y por el divisor de haz. Las relaciones de reflexión y transmisión del BS son de 30 % y 70 % respectivamente, y sería posible utilizar

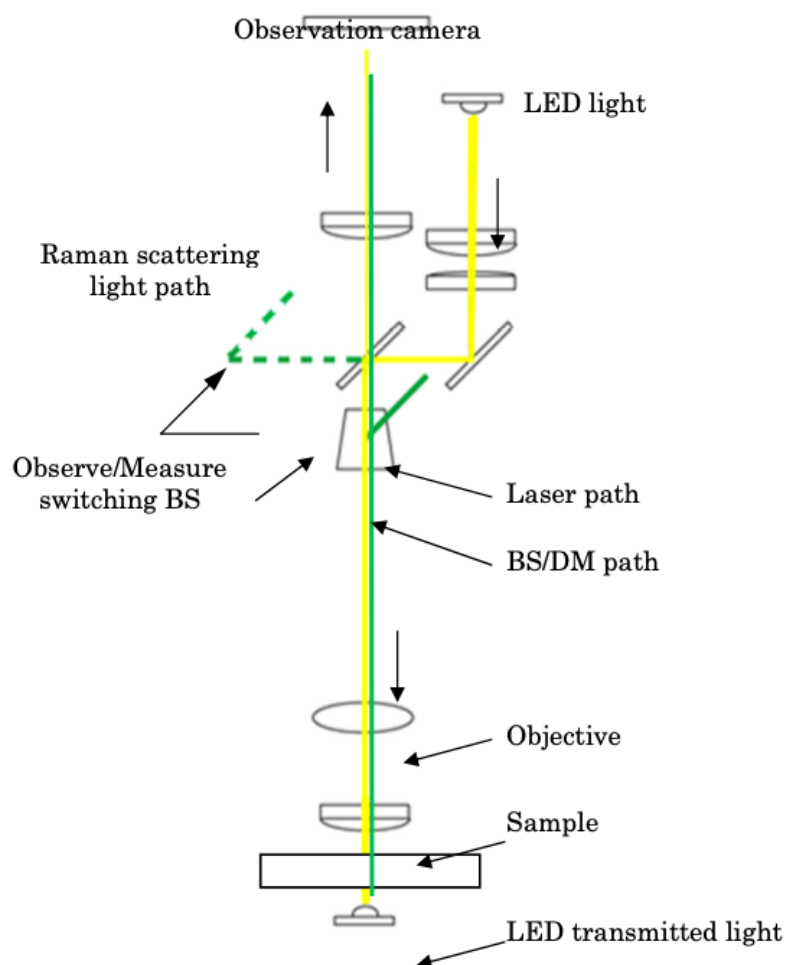


Figura 4.3. Esquema de los componentes ópticos que conforman el equipo NRS-4500 JASCO [47].

también un espejo dicróico (*dichroic mirror*, DM) en lugar del BS para reflejar una longitud de onda específica mientras se transmiten otras.

Una vez separada la trayectoria de la señal Raman de la del láser, es enviada a un monocromador para generar la imagen confocal sobre una red de difracción y rechazar toda señal que no focalice en su plano. El equipo consta de redes de difracción de aperturas de 17, 34 y 100 μm . De esta forma, es posible aumentar la resolución espacial seleccionando una red de difracción más estrecha. Sin embargo, esto reduciría la intensidad de la luz dispersada y generaría un espectro más débil.

Finalmente, la señal se introduce en un espectrómetro, es captada por un detector EMCCD de alta resolución y enviada al PC para su posterior procesamiento. Cabe destacar que para reducir el ruido de oscuridad del detector y adquirir espectros con una alta relación señal-ruido se emplea un sistema de refrigeración con el que se alcanzan temperaturas próximas a -70°C .

Por otra parte, la iluminación utilizada para la observación directa de las muestras es emitida por un LED que sigue la misma trayectoria óptica que el haz láser, permitiendo así la visualización simultánea con el *spot* del láser. También sería posible iluminar en configuración de transmisión utilizando la otra fuente de iluminación LED disponible, que se encuentra en la parte inferior de la muestra.



Figura 4.4. Equipo *NRS-4500 JASCO* con la compuerta cerrada (a) y abierta (b).

4.3. Módulo de microfluídica

El campo de la microfluídica implica el uso de dispositivos microestructurados, permitiendo estudiar el comportamiento de fluidos a su paso por canales con dimensiones de microescala. Se considera que se trata de microfluídica si el tamaño del canal se encuentra en el rango 100 nm - 500 μm .

La Figura 4.5 muestra la configuración empleada para tomar mediciones *in situ* mediante un sistema de microfluídica. Se utiliza una jeringuilla de 10 mL y un motor paso a paso que permite desplazar un volumen mínimo de líquido de 1 μL .

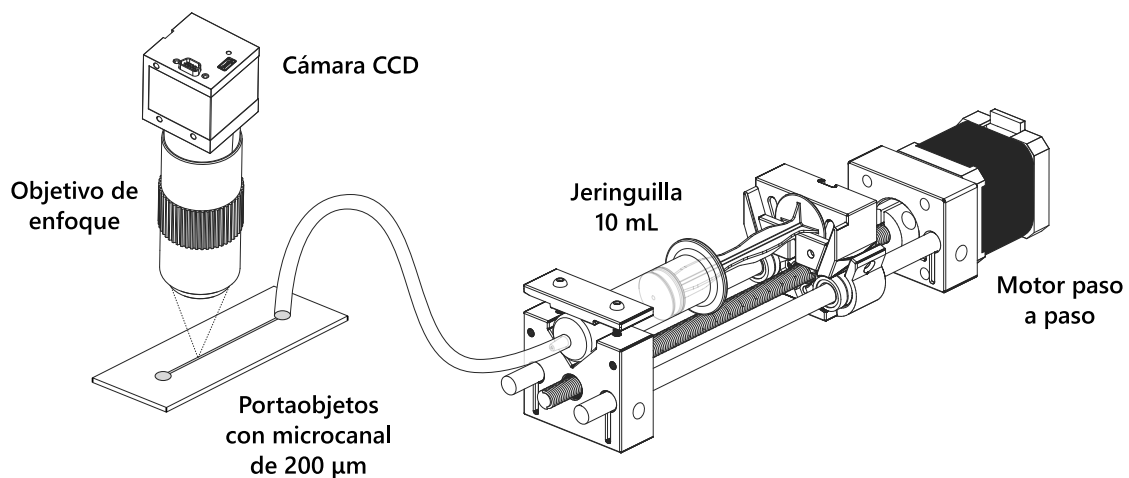


Figura 4.5. Esquema del módulo de microfluídica desarrollado. [62]

El portaobjetos está fabricado con un polímero para obtener la máxima calidad óptica posible. Consta de un microcanal de 200 μm de alto, un volumen de 62.5 μL y está específicamente diseñado para observar organismos tanto vivos como fijados, preferiblemente a través de un microscopio invertido, ya que en la parte inferior tiene un cubreobjetos que presenta birrefringencias y autofluorescencias extremadamente bajas.

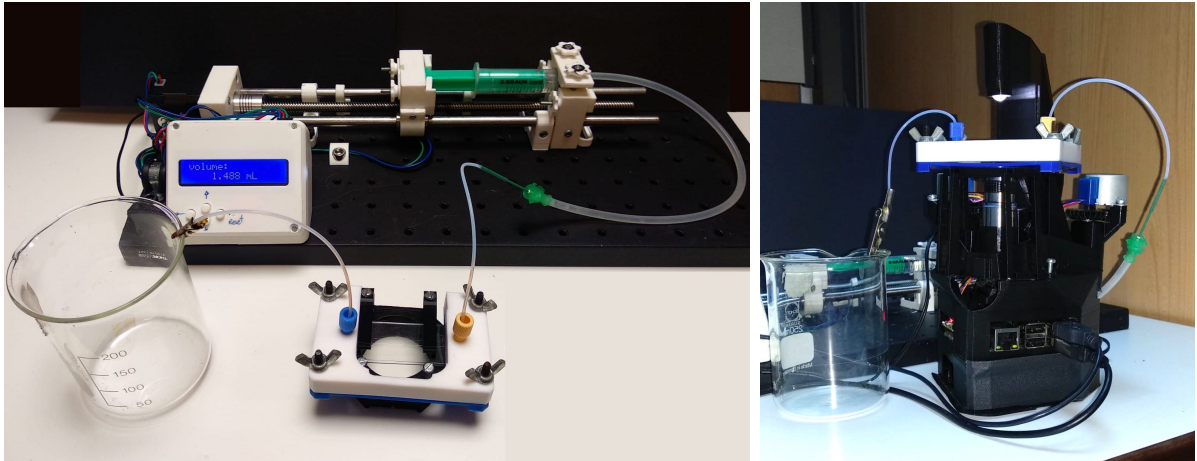


Figura 4.6. Configuración experimental del sistema de microfluídica desarrollado.

5

Resultados y análisis

5.1	Microscopía de campo claro	48
5.2	Microscopía de fluorescencia	51
5.2.1	Comparación entre los equipos de fluorescencia	51
5.2.2	Procesado de imágenes de fluorescencia	53
5.3	Espectroscopía Raman	56
5.3.1	Comparación entre los equipos de espectroscopía Raman	56
5.3.2	Espectroscopía Raman aplicada a muestras de fitoplancton	57
5.3.3	Pre-procesado espectral	59
5.3.4	Identificación de bandas Raman asociadas a fitoplancton	61

Este capítulo contiene los resultados extraídos de los equipos experimentales descritos en los [Capítulos 3 y 4](#). La [Sección 5.1](#) comprende la adquisición de imágenes utilizando el OFM en modalidad de campo claro. Por su parte, la [Sección 5.2](#) ofrece los resultados de microscopía de fluorescencia, donde primero se comparan las imágenes obtenidas con el OFM y con el equipo comercial Nikon A1R y, posteriormente, se muestra el análisis realizado para determinar parámetros indicadores de la presencia de fitoplancton en las muestras estudiadas. Finalmente, la [Sección 5.3](#) engloba la adquisición, análisis e interpretación de espectros Raman, utilizando el módulo Raman del microscopio OFM y el equipo NRS-4500 JASCO.

5.1. Microscopía de campo claro

En esta sección se recogen los resultados obtenidos con el microscopio OFM en configuración de campo claro, cuya descripción se detalla en el [Sección 3.1](#). Las muestras a estudiar han sido proporcionadas por la empresa Ecohydros [45], se trata de muestras de fitoplancton extraídas del embalse de El Val, Zaragoza.

Se han utilizado las calibraciones de la [Figura 3.15](#) para agregar la escala a las imágenes de microscopía que se muestran en este capítulo. La [Tabla 5.1](#) evidencia cómo la resolución espacial de la imagen y el tamaño del campo de visión (FOV), determinado a partir de las [Ecuaciones 2.8](#) y [2.9](#), se ven afectados según qué módulo de cámara se utilice y si se incluye o no la lente correctora en el sistema.

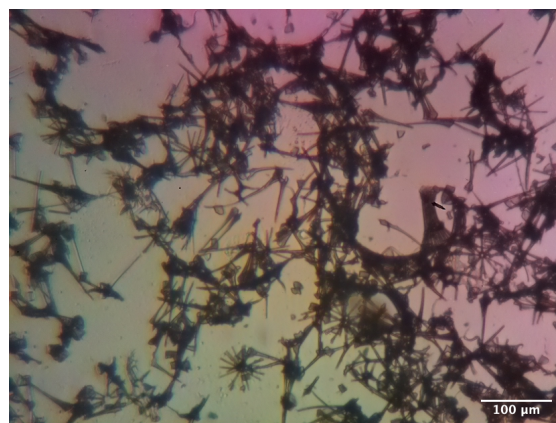
Objetivo	Módulo de cámara	Lente correctora	Resolución (px/ μm)	FOV (mm^2)
40x	v2	Si	2.4	0.0165
	v2	No	3.7	0.0063
	HQ	Si	1.36	0.0475
	HQ	No	2.2	0.0288

Tabla 5.1. Resolución de imagen y tamaño del campo de visión (FOV) según el módulo de cámara utilizado y la presencia o no de lente correctora.

En la [Figura 5.1](#) se recogen cuatro imágenes adquiridas con el microscopio OpenFlexure en configuración de transmisión haciendo uso de diferentes objetivos de la [Tabla 3.4](#).



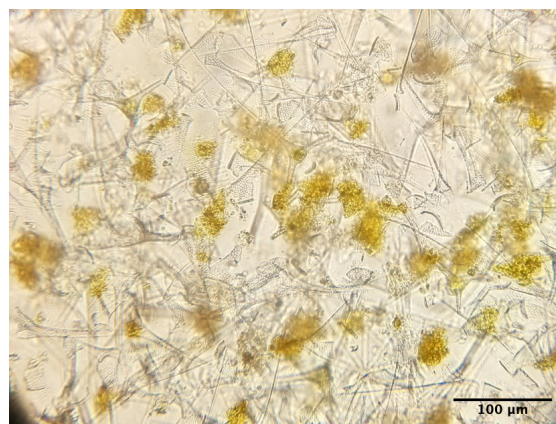
(a) 20x con lente correctora y cámara v2



(b) 10x con lente correctora y cámara v2



(c) 40x con lente correctora y cámara v2



(d) 40x con lente correctora y cámara HQ

Figura 5.1. Imágenes de muestras de fitoplancton adquiridas con el microscopio OpenFlexure en configuración de transmisión utilizando diferentes objetivos, (a) 20x con lente correctora y módulo de cámara v2, (b) 10x con lente correctora y cámara v2, (c) 40x con lente correctora y cámara v2 y (d) 40x con lente correctora y cámara HQ.

Las imágenes representadas en la [Figura 5.1](#) revelan que hay una especie de fitoplancton predominante en las muestras, la denominada *Ceratium furca*, un tipo de dinoflagelado. A partir de las escalas de las imágenes, se ha estimado que tienen aproximadamente 100 μm de largo y 30 μm de ancho.

Resulta llamativo el contraste entre las [Figuras 5.1a](#) y [5.1b](#) con respecto a las [Figuras 5.1c](#) y [5.1d](#). Esto es debido a que se encuentran fijadas en lugol para mantener la forma y el tamaño original de sus células muertas. El empleo de fijadores es de gran utilidad, ya que el fitoplancton se fragmenta durante su conservación durante varios días en un recipiente cerrado, y al adquirir las imágenes se visualizan separadamente el esqueleto y la clorofila, como se aprecia en la [Figura 5.1c](#). No obstante, se espera que el empleo de fijadores suponga un ocultamiento de la fluorescencia, por lo que en la próxima sección se utilizarán muestras sin fijar, ya que se pretende realizar un análisis de la fluorescencia presente en las imágenes.

Otra característica que destaca a simple vista es el fondo de las imágenes. Las variaciones de color e imperfecciones en el fondo están asociadas a un incorrecto ajuste del balance de blancos. Esta característica es una configuración de la cámara que se utiliza para controlar la captura de los colores para diferentes tipos de luz. En este caso, al tratarse de imágenes en transmisión, el fondo debería ser perfectamente blanco. Por lo tanto, se deduce que un adecuado balance de blancos es esencial para la adquisición de imágenes de alta calidad.

Otro factor que afecta críticamente a la calidad de las imágenes es la entrada de polvo en el sensor de la cámara. En la [Figura 5.1c](#) se observan puntos negros distribuidos por toda la imagen que se deben a suciedad acumulada sobre el detector CMOS, ya que está expuesto directamente debido a que la pieza de plástico de la base del OFM presenta zonas abiertas, por donde se prevee la entrada del polvo.

Finalmente, en la [Figura 5.2](#) se muestran dos imágenes de campo claro adquiridas utilizando el módulo de microfluídica de la [Sección 4.3](#), que emplea una jeringuilla de 10 mL y un motor paso a paso para realizar desplazamientos de volúmenes de 1 μL como mínimo. El portaobjetos está fabricado con un polímero para obtener la máxima calidad óptica posible y consta de un microcanal de 200 μm de alto, específicamente diseñado para observar organismos, tanto vivos como fijados.

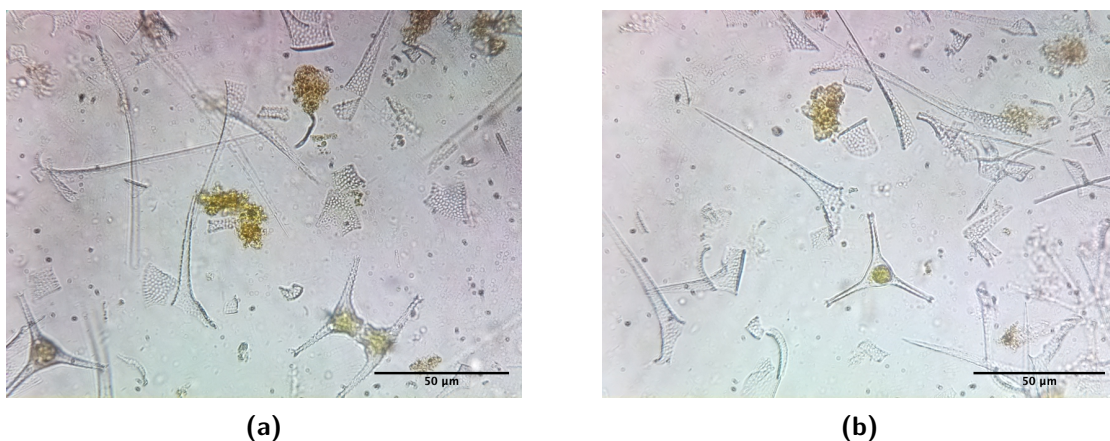


Figura 5.2. Imágenes de muestras de fitoplancton adquiridas con el microscopio OpenFlexure en configuración de campo claro con un sistema de microfluídica. Ambas fotografías se han tomado utilizando un objetivo 40x, el módulo de cámara v2 y sin lente correctora.

En vista del resultado, queda comprobada la eficacia del módulo de microfluídica desarrollado en este trabajo, ya que permite alcanzar sin dificultad el enfoque sobre la superficie de la muestra a medida que recorre el microcanal del portaobjetos.

Una vez evaluados los principales efectos que limitan la calidad de las imágenes en transmisión, en la [Sección 5.2](#) se obtienen las imágenes en configuración de fluorescencia.

5.2. Microscopía de fluorescencia

En esta sección se aborda el tratamiento de imágenes de fluorescencia de las muestras de fitoplancton sin fijación, utilizadas en la sección anterior. En la [Subsección 5.2.1](#) se comparan las imágenes obtenidas con el OFM y con el equipo confocal de fluorescencia Nikon A1R y en la [Subsección 5.2.2](#) se describe el procesado de imagen realizado para determinar parámetros indicadores referidos a la presencia de fitoplancton en las muestras estudiadas.

5.2.1. Comparación entre los equipos de fluorescencia

Microscopio OpenFlexure

En la [Figura 5.3](#) se muestran dos de las imágenes obtenidas con el OFM en configuración de fluorescencia. Concretamente, se ha empleado la fuente LED de alta potencia con máximo de emisión en $\lambda=373$ nm, el módulo de cámara v2 y la lente correctora.

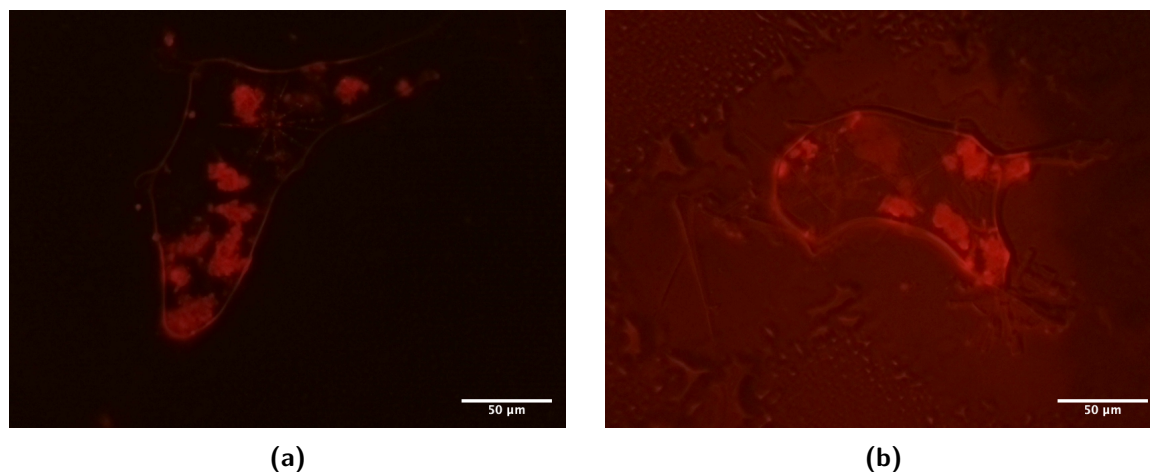


Figura 5.3. Imágenes de fluorescencia de muestras de fitoplancton obtenidas con el microscopio OpenFlexure desarrollado en este trabajo.

Observando las dos imágenes de la [Figura 5.3](#) se evidencia una diferencia en sus señales de ruido de fondo. Si bien la [Figura 5.3a](#) apenas presenta señal roja a parte de las zonas donde hay clorofila, la [Figura 5.3b](#) tiene esta señal de fondo distribuida por toda la imagen. Esto es debido a la presencia de iluminación ambiente en el laboratorio. Dado que el microscopio no tiene un recubrimiento y el detector CMOS está expuesto a la luz ambiente, la presencia de iluminación de fondo, aunque sea mínima, afecta a la calidad de las imágenes de fluorescencia.

No obstante, y a pesar de este problema, las imágenes de fluorescencia adquiridas presentan la suficiente calidad para poder diferenciar claramente la fluorescencia en muestras de fitoplancton, por lo que las modificaciones realizadas al diseño original OFM han permitido obtener los resultados deseados.

Otro objetivo que se espera alcanzar con las modificaciones implementadas al microscopio OFM, es la adquisición de imágenes simultáneas en configuración de campo claro y fluorescencia. En la [Figura 5.4](#) se muestra uno de los pares de imágenes adquiridos.

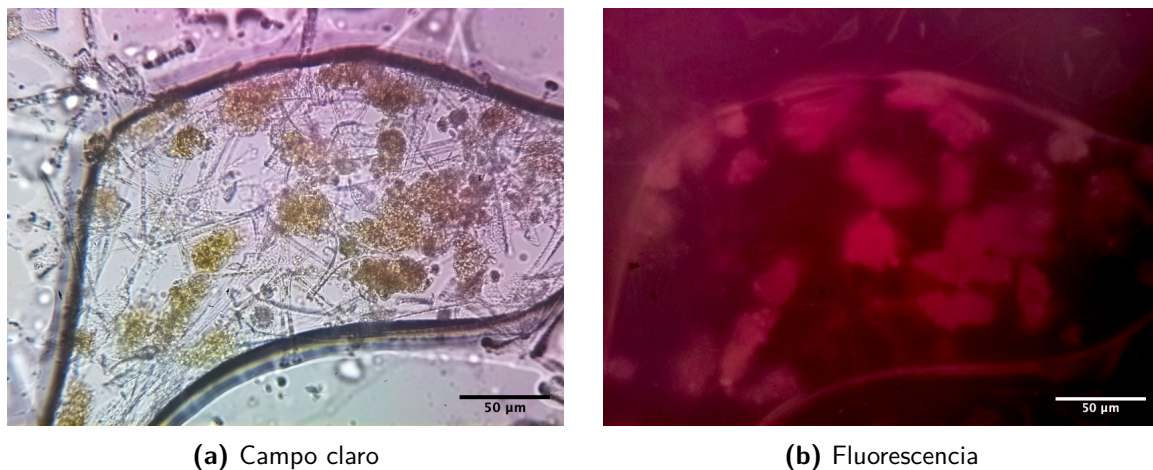


Figura 5.4. Comparación entre imágenes obtenidas con el microscopio OpenFlexure en configuración de (a) campo claro y (b) fluorescencia.

A pesar de que las imágenes de la [Figura 5.4](#) permiten verificar que la fluorescencia observada pertenece a las zonas de clorofila presentes en la muestra de fitoplancton, se han dado numerosos problemas al intentar adquirir imágenes de la misma región de la muestra, ya que los filtros se encuentran en zonas poco accesibles del microscopio y al quitarlos se solía perder la zona de enfoque. Este problema podría solventarse ampliando las dimensiones del microscopio e implementando un sistema de cambio de filtros automático, ya que la extracción manual en un sistema tan compacto es complicada.

Una vez comprobada la capacidad del OFM para la adquisición de imágenes de fluorescencia, en el siguiente apartado se van a obtener las mismas imágenes con el equipo comercial de referencia Nikon A1R.

Microscopio confocal de fluorescencia Nikon A1R

En primer lugar, se especifican los parámetros fijados para la adquisición de todas las imágenes de fluorescencia que se muestran en esta sección.

- Longitud de onda láser: 405 nm
- Potencia láser: 20 mW
- Objetivo: 40x (NA = 1.3, inmersión)
- Tipo de barrido: Galvanométrico

- Diámetro *pinhole*: 45.2 μm
- Espesor de la sección óptica: 0.9 μm
- Resolución óptica: 0.09 μm
- Filtro de excitación: (427 ± 10) nm
- Filtro de emisión: (639 ± 25) nm

En la [Figura 5.5](#) se muestran dos imágenes de fluorescencia adquiridas con el equipo Nikon A1R.

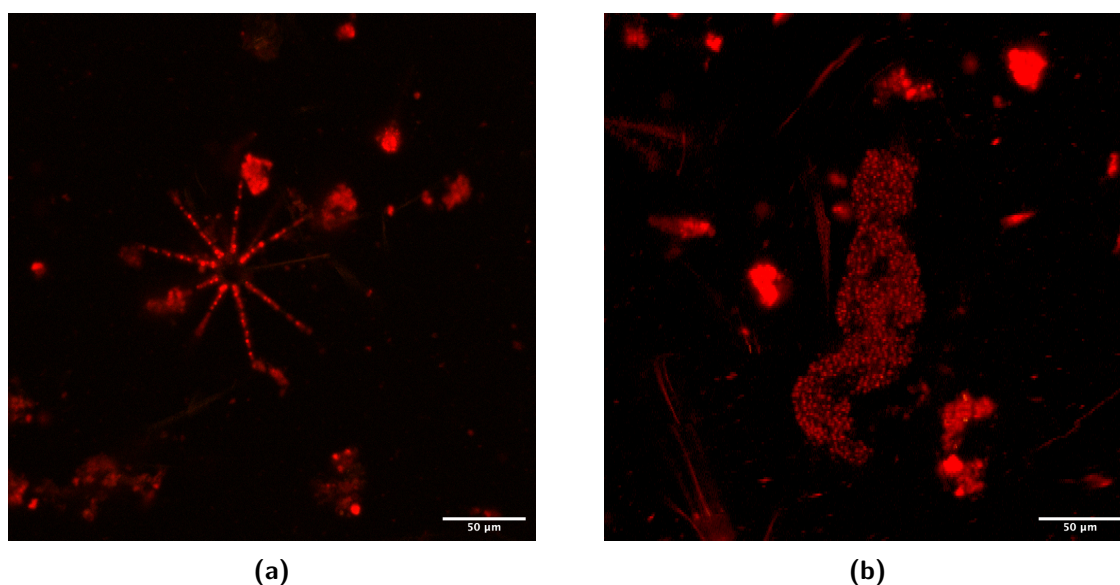


Figura 5.5. Imágenes de fluorescencia de muestras de fitoplancton obtenidas con el equipo comercial Nikon A1R.

Dado que las imágenes de la [Figura 5.5](#) presentan una mayor calidad que las adquiridas con el microscopio OFM, en la [Subsección 5.2.2](#), donde se detalla el procesamiento de imágenes de fluorescencia, se van a utilizar imágenes obtenidas con este equipo.

5.2.2. Procesado de imágenes de fluorescencia

El objetivo del procesado desarrollado en esta sección es calcular, para una imagen dada, el porcentaje de fitoplancton presente y, de esa cantidad, estimar cuánto es fluorescente para ayudar a cuantificar la población existente en un determinado volumen de líquido y determinar de qué tipo se podría tratar por las características de la fluorescencia emitida.

En primer lugar, se han adquirido 20 imágenes de fluorescencia utilizando el microscopio confocal Nikon A1R y se han separado los canales rojos, debidos a la fluorescencia, y azules, al esqueleto del fitoplancton, en dos imágenes diferentes. Cabe destacar que los tonos azulados son debidos a emisiones no filtradas del láser de excitación. En la [Figura 5.6](#) se muestra dicha separación para una de las imágenes consideradas en el procesado.

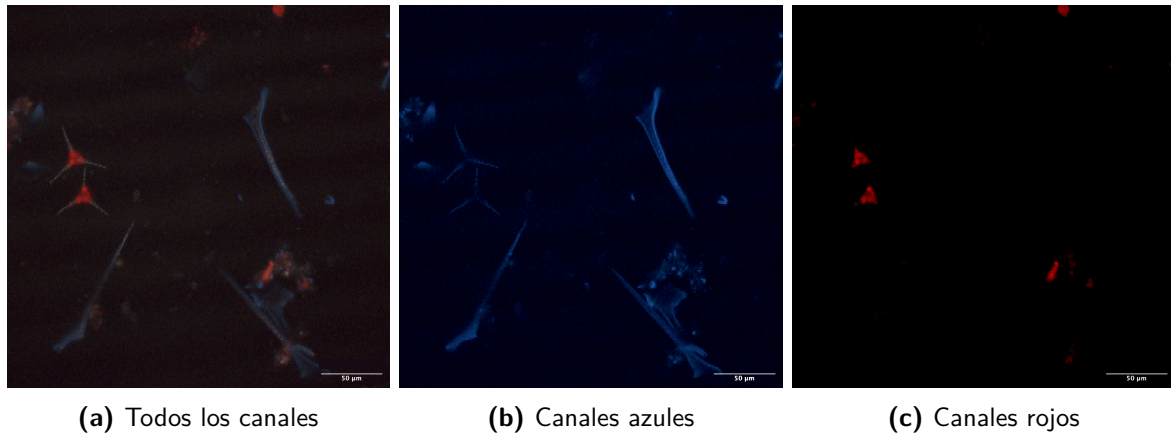


Figura 5.6. Separación en canales de una de las imágenes adquiridas con el equipo de fluorescencia Nikon A1R.

Se ha elaborado un *script* de Matlab con el objetivo de cuantificar de forma automática, por una parte la presencia de fitoplancton en las imágenes, a partir de las imágenes de los canales azules, y por otra la proporción de fluorescencia y su distribución, mediante los canales rojos. Para ello, se han aplicado criterios de umbralización, correcciones de ruido mediante filtros de mediana y una binarización para obtener imágenes de alto contraste de los canales azul y rojo que permitan cuantificar el número de píxeles de cada color con respecto al total.

En la [Figura 5.7](#) se muestra el resultado de una de las umbralizaciones realizadas mediante el procesamiento de imagen desarrollado.

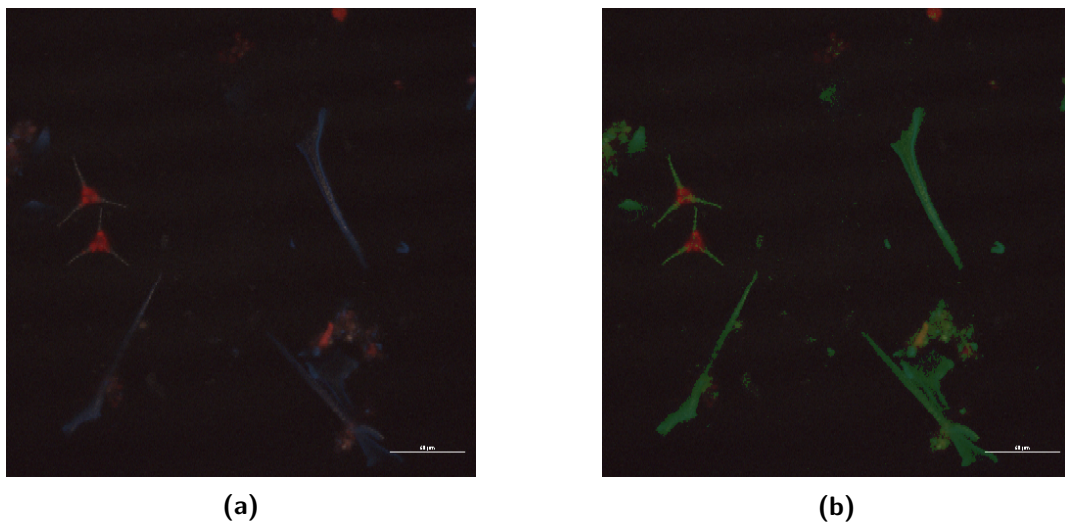


Figura 5.7. Resultado de una de las umbralizaciones realizadas mediante el procesamiento de imagen desarrollado con el objetivo de determinar el porcentaje de fitoplancton presente en la imagen. En (a) se muestra la imagen original, con los esqueletos del fitoplancton en color azul y la fluorescencia en rojo, y en (b) el resultado de la umbralización, en color verde, de las partes del esqueleto.

En la [Figura 5.8](#) se muestra una gráfica de la presencia de fitoplancton en cada una de las 20 imágenes adquiridas experimentalmente.

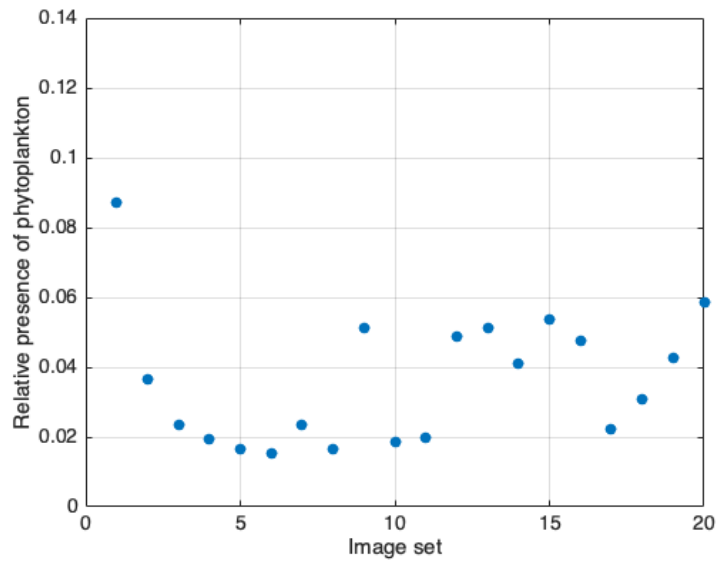


Figura 5.8. Presencia de fitoplancton relativa a la totalidad de cada una de las imágenes tomadas.

De la [Figura 5.8](#) se deduce que, para el caso de la muestra estudiada, la presencia de fitoplancton ocupa, de media, el 5% de la imagen total.

Finalmente, en la [Figura 5.9](#) se muestran conjuntamente un histograma y un *boxplot* de la distribución de la fluorescencia de cada imagen considerada.

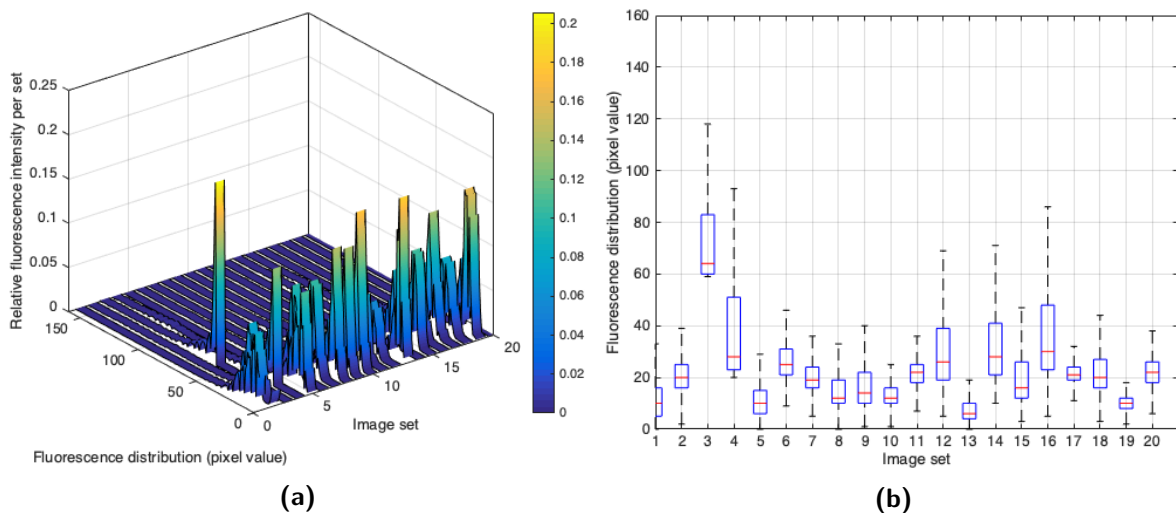


Figura 5.9. (a) Histograma 3D de la cuantificación de la fluorescencia sobre el porcentaje total de fitoplancton detectado por imagen, con escala de color indicando la distribución de sus intensidades. (b) *Boxplot* de la distribución de la fluorescencia detectada en cada una de las imágenes consideradas.

Una vez adquiridos los parámetros indicadores de la presencia y capacidad de fluorescencia del fitoplancton para un conjunto de imágenes, se espera que este procedimiento se pueda reproducir sobre las imágenes adquiridas con el OFM y permita la detección temprana de las HAB de forma instantánea y automática tras la fijación de valores umbrales de control por parte de un experto.

5.3. Espectroscopía Raman

Esta sección ofrece los resultados de la espectroscopía Raman realizada experimentalmente. Primero, se compara la calidad de los espectros adquiridos mediante los dos equipos comerciales contemplados en este trabajo. Después, se obtienen varios espectros sobre una muestra de fitoplancton y se les aplica un método de pre-procesado espectral para, finalmente, poder identificar las bandas Raman asociadas a vibraciones moleculares presentes en el fitoplancton.

5.3.1. Comparación entre los equipos de espectroscopía Raman

En primer lugar, se ha utilizado una muestra de acetona (C_3H_6O) para adquirir espectros Raman con la sonda RamanProbeTM, implementada en el OFM mediante el módulo de la Subsección 3.2.4. El motivo por el cual se han tomado medidas sobre acetona es que sus bandas Raman son bien conocidas [63] y permiten evaluar la calidad de los resultados que pueden obtenerse con la sonda. En la Figura 5.10 se muestra uno de los espectros adquiridos experimentalmente junto con el espectro tomado como referencia.

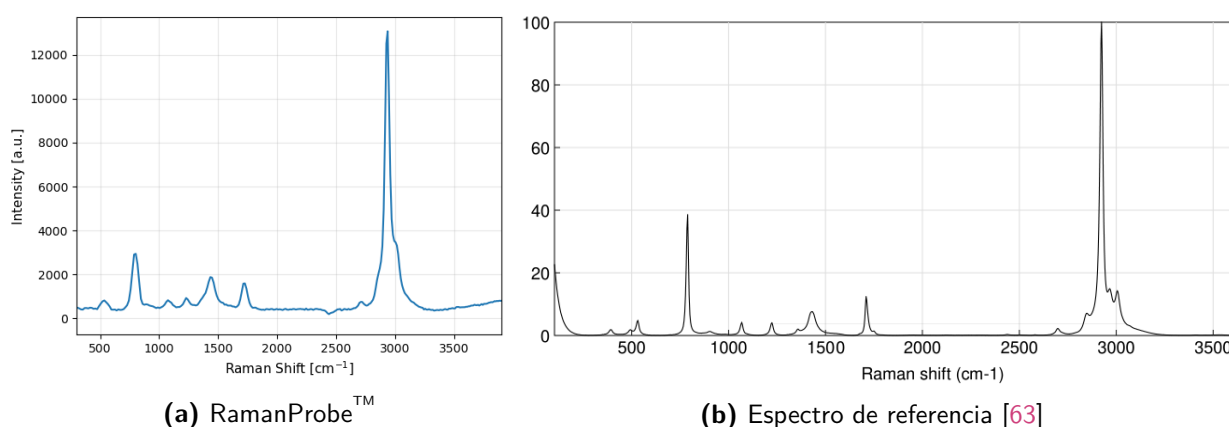


Figura 5.10. (a) Espectro Raman de una muestra de acetona obtenido experimentalmente mediante la sonda RamanProbeTM. (b) Espectro Raman de acetona tomado como referencia [63].

Las bandas Raman del espectro de la Figura 5.10a concuerdan con las presentes en la Figura 5.10b, por lo que se ha demostrado que el *setup* del módulo de espectroscopía Raman (Figura 3.19) permite obtener espectros con resolución suficiente para poder realizar comparaciones con espectros obtenidos con el equipo comercial de referencia, NRS-4500, a pesar de que el espectrómetro disponible en el laboratorio era de baja resolución. Para ello, se van a usar las mismas muestras de fitoplancton que en las secciones anteriores, procedentes del embalse de El Val, Zaragoza.

En la Figura 5.11 se muestran dos espectros de muestras de fitoplancton adquiridos con los dos equipos disponibles. Se observa a simple vista que el espectro obtenido utilizando el módulo de espectroscopía Raman del OFM presenta escasa resolución en comparación al equipo NRS-4500. Además, la mayoría de los espectros adquiridos con la sonda presentaron bandas Raman poco distinguibles entre el ruido *shot* y de fluorescencia. Por este motivo, el análisis y pre-procesado Raman sobre las muestras de fitoplancton se va a realizar utilizando solamente el microscopio confocal Raman NRS-4500.

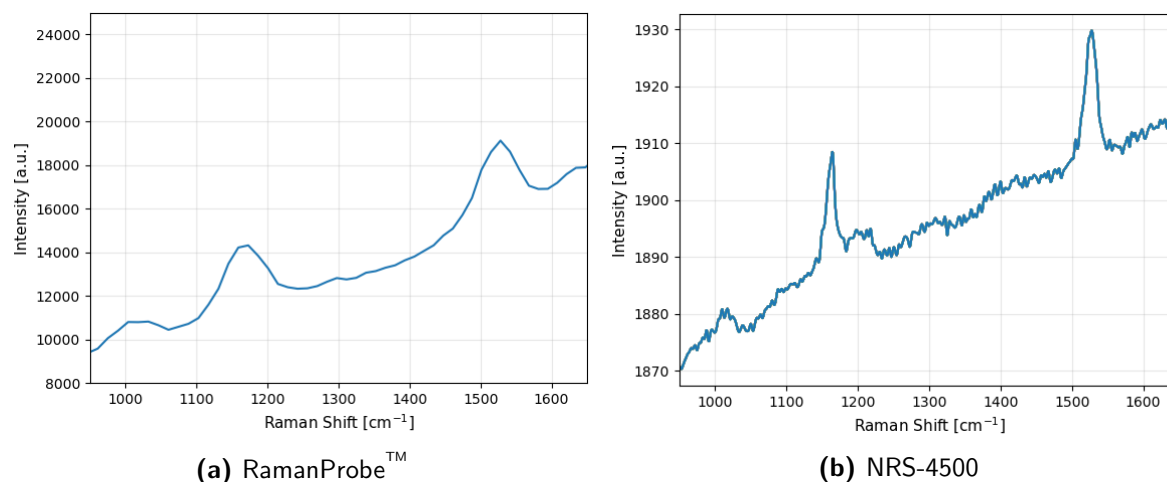


Figura 5.11. Espectros Raman de una muestra de fitoplancton obtenidos experimentalmente utilizando (a) el módulo de espectroscopía Raman incorporado al OFM y (b) el equipo NRS-4500.

5.3.2. Espectroscopía Raman aplicada a muestras de fitoplancton

Para la adquisición de los espectros de las muestras de fitoplancton se ha utilizado como sustrato un portaobjetos envuelto en aluminio con el fin de eliminar la señal de fluorescencia de dicho sustrato, ya que sus bandas Raman se encuentran fuera del rango de longitudes de onda de interés ($800 - 1600 \text{ cm}^{-1}$). Previamente al depósito de las muestras sobre el aluminio, este se limpió con etanol 70 % con el fin de eliminar posibles impurezas. Se depositaron gotas de $8 \mu\text{L}$ de muestra sobre el portamuestras y se dejaron secar durante media hora. Los parámetros fijados para todas las medidas fueron los siguientes:

- Longitud de onda láser: 532 nm
- Potencia láser: 4.5 mW
- Objetivo: 100x (NA = 0.9)
- Tiempo de exposición: 1 segundo
- Acumulaciones: 150
- Red de difracción: 900 líneas/mm
- Apertura: $17 \mu\text{m}$

Como se ha indicado en el [Capítulo 4](#), el equipo NRS-4500 JASCO permite capturar imágenes microscópicas y al mismo tiempo visualizar el enfoque del haz láser previo a la adquisición de espectros, siendo así posible focalizar el *spot* con una elevada precisión.

En la [Figura 5.12a](#) se presenta una imagen de la muestra a 100 aumentos y en la [Figura 5.12a](#) se representan dos espectros Raman adquiridos sobre el mismo punto de la muestra, uno de ellos con el *spot* láser perfectamente enfocado y el otro con el *spot* ligeramente fuera de foco para evidenciar la importancia del correcto enfoque del haz láser sobre la muestra.

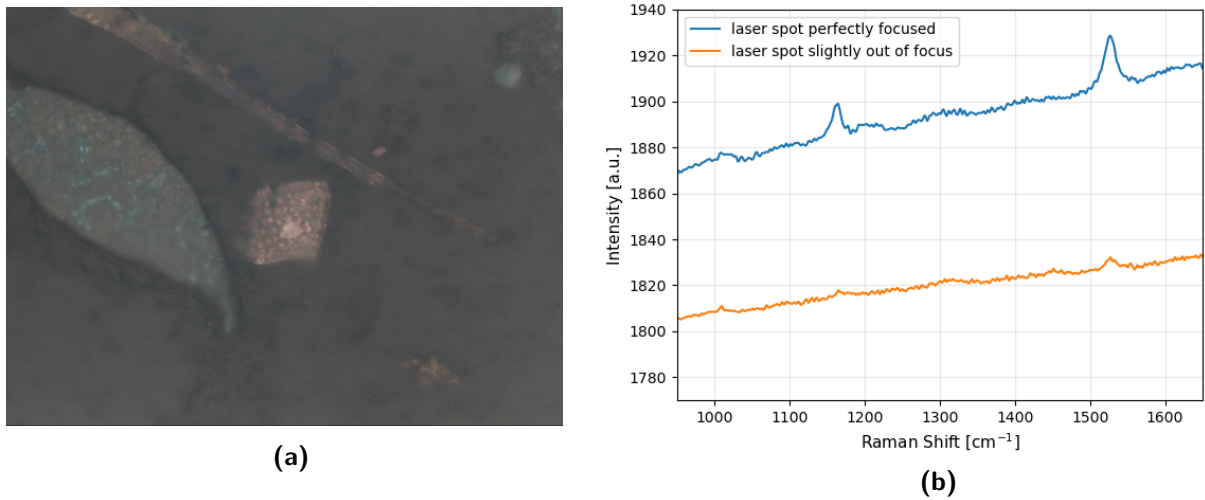


Figura 5.12. (a) Fitoplancton en gota seca a 100 aumentos visualizado con el equipo NRS-4500 JASCO. (b) Comparación de dos espectros Raman adquiridos sobre un mismo punto de la muestra, en azul corresponde a una medida realizada con el *spot* láser perfectamente enfocado y en naranja con el *spot* ligeramente fuera de foco.

Adquisición de espectros Raman

En una primera inspección y a simple vista, se observa que todos los espectros tienen la forma general de la [Figura 5.13](#), donde se representan once medidas efectuadas sobre la muestra de fitoplancton en gota seca.

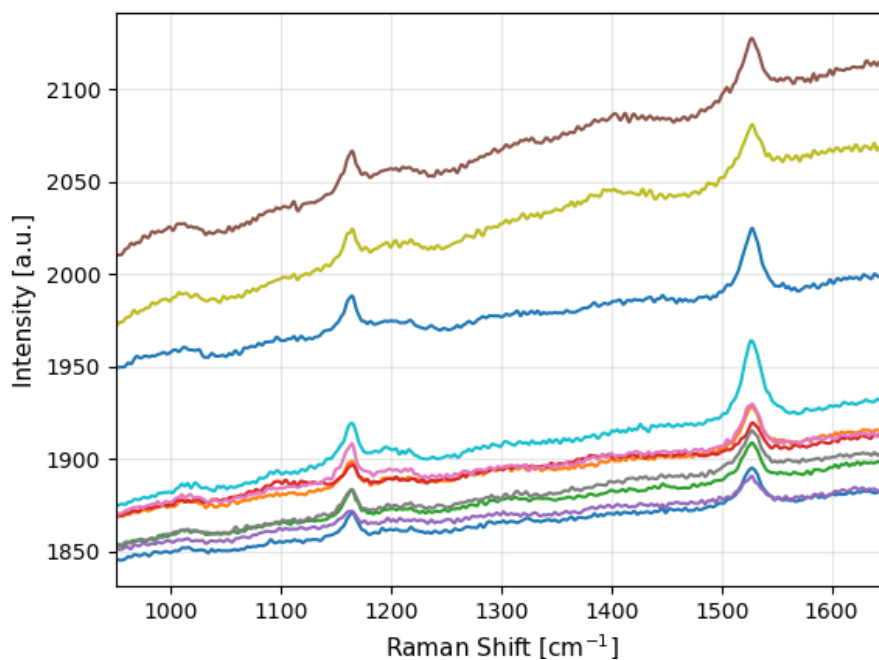


Figura 5.13. Espectros Raman adquiridos en once puntos de la muestra de fitoplancton estudiada.

Una vez recogidos los espectros de la [Figura 5.13](#), el siguiente paso es aplicar un procedimiento de pre-procesado espectral con el fin de mejorar la calidad de los mismos.

5.3.3. Pre-procesado espectral

Se ha desarrollado un código de pre-procesado espectral en Python para eliminar señales ruidosas y artefactos ajenos a las muestras de la forma más eficaz posible. Dicho procedimiento se divide en tres partes:

1. Obtención de líneas base
2. Corrección de espectros
3. Promediado y normalización

Para obtener las líneas base de cada espectro se ha aplicado el algoritmo ALS, descrito en [Subsección 2.3.2](#). La clase ha sido obtenida de [\[64\]](#), modificando los parámetros de forma manual y buscando aquellos que se ajustan a la forma general de cada espectro, con las condiciones de que la línea de base resultante no se introduzca en exceso en los picos y que sus valores de intensidad queden siempre por debajo del espectro original. Con estas dos condiciones, se obtienen líneas base como las que se muestran en la [Figura 5.14](#), introduciendo como parámetro de asimetría $p = 0.0005$ y como parámetro de suavizado $\lambda = 10^3$.

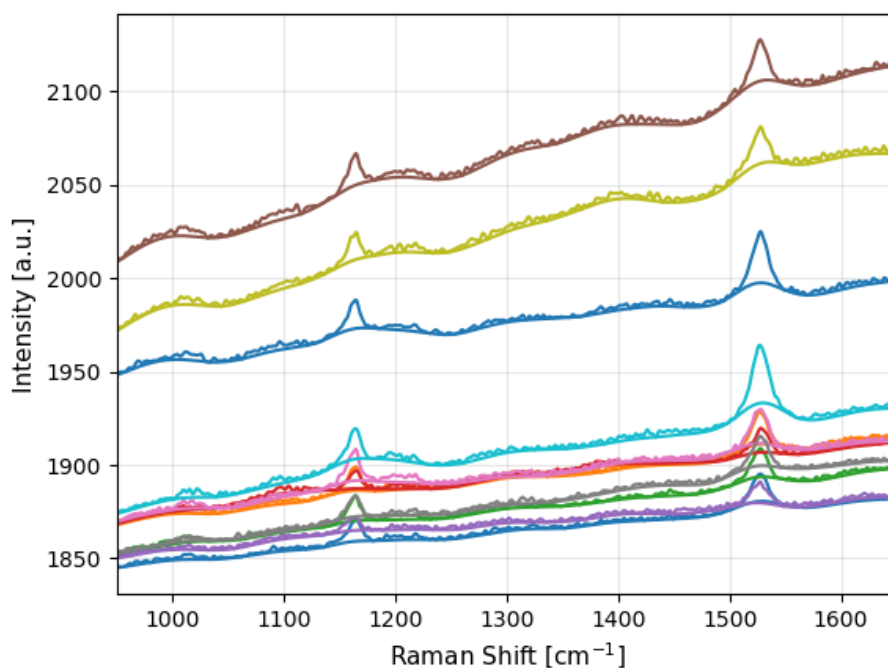


Figura 5.14. Espectros Raman de fitoplancton originales junto con sus correspondientes líneas base, obtenidas mediante el algoritmo ALS [\[64\]](#).

La corrección de los espectros se ha realizado restando las líneas base a los espectros originales. El resultado se muestra en la [Figura 5.15](#).

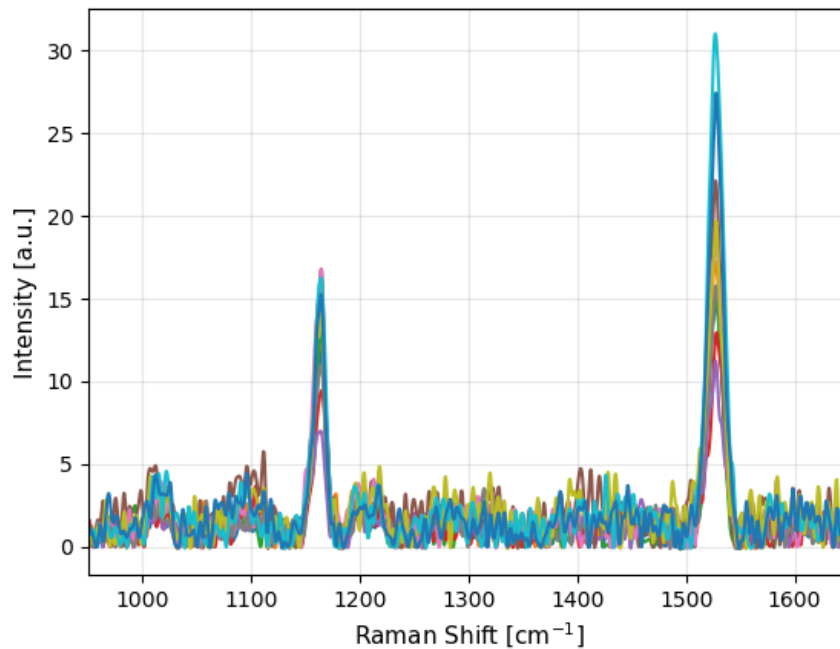


Figura 5.15. Espectros Raman de fitoplancton corregidos, obtenidos mediante la resta de las líneas base a los espectros originales.

Se han normalizado todos los espectros de la [Figura 5.15](#) dividiendo cada una de las intensidades entre su valor máximo, ya que la intensidad de los picos depende solamente de la cantidad de analito en cada punto de enfoque. Una vez normalizados, se ha realizado el promedio de los once espectros, el resultado se muestra en la [Figura 5.16](#).

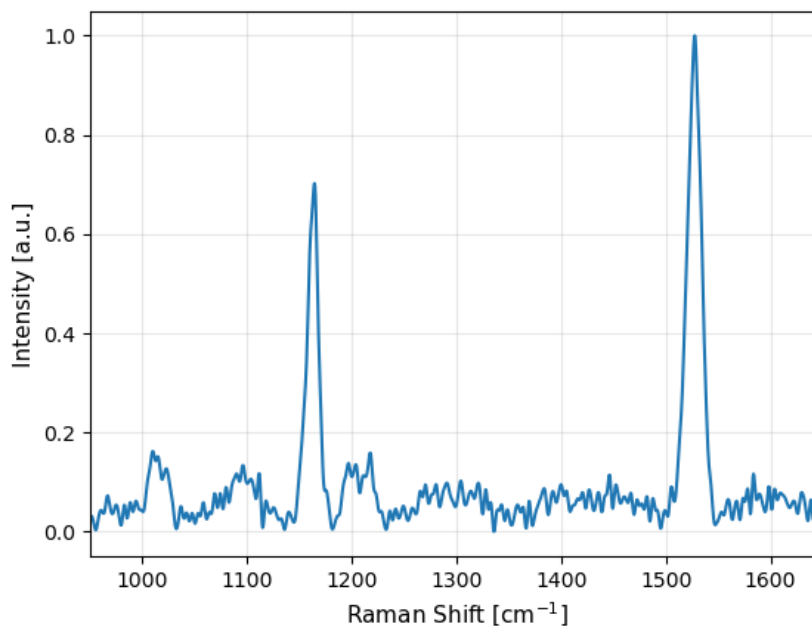
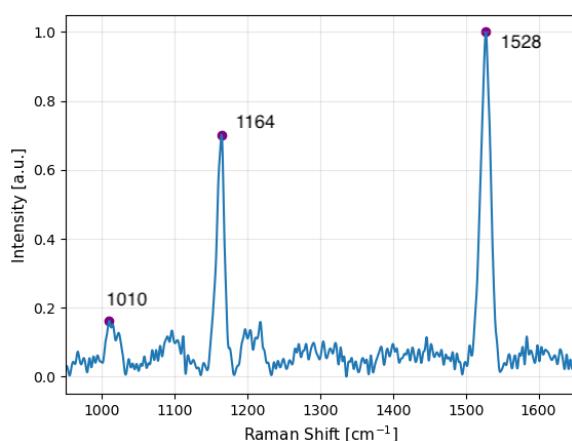


Figura 5.16. Espectros Raman de fitoplancton normalizados y promediados.

5.3.4. Identificación de bandas Raman asociadas a fitoplancton

Una vez finalizado el pre-procesado espectral, se han seleccionado las 3 bandas Raman más significativas de la [Figura 5.16](#). En la [Figura 5.17](#) se muestra el resultado junto con la correspondiente asignación de las bandas, recogidas en la [Tabla 5.2](#).

Además de la clorofila, existe otro grupo pigmentario fotosintético presente en la composición del fitoplancton, los carotenoides. En concreto, los β -carotenos generan bandas Raman en tres regiones debido a diferentes vibraciones moleculares. Las bandas ν_1 , debidas a vibraciones entre enlaces C-CH₃, aparecen en el rango 1000-1020 cm⁻¹. Las bandas ν_2 , debidas a vibraciones entre enlaces C-C, en 1150-1170 cm⁻¹ y las ν_3 , por vibraciones C=C, entre 1500-1550 cm⁻¹. Los picos identificados coinciden con las bandas más significativas de cada rango, concretamente en 1010, 1164 y 1528 cm⁻¹ [65].



Raman shift (cm ⁻¹)	Vibración molecular
1010	β -caroteno ν_3 (C-CH ₃)
1164	β -caroteno ν_2 (C-C)
1528	β -caroteno ν_1 (C=C)

Tabla 5.2. Asignación de las tres bandas Raman más significativas de las muestras de fitoplancton a sus correspondientes vibraciones moleculares asociadas. [65]

Figura 5.17. Identificación de las tres bandas Raman más significativas atribuidas a la presencia de fitoplancton.

6

Conclusiones y líneas futuras

6.1 Conclusiones	62
6.2 Líneas futuras y mejoras del <i>setup</i> experimental	63

En este último capítulo se resumen las principales conclusiones extraídas del trabajo realizado y, además, se ofrecen posibles vías futuras y mejoras del microscopio OpenFlexure desarrollado con el fin de continuar perfeccionando el diseño, adquirir imágenes de mayor calidad y automatizar las tareas de detección de fitoplancton.

6.1 Conclusiones

Con todo, se han logrado alcanzar todos los objetivos expuestos en el [Capítulo 1](#). Primero, se ha conseguido construir un microscopio de bajo coste, basado en OpenFlexure, con el que se han podido obtener imágenes en configuración de campo claro utilizando diversos elementos ópticos y electrónicos. Una vez construido, se le han incorporado nuevos elementos, como fuentes con diferentes longitudes de onda de emisión o filtros, para lograr la adquisición de imágenes de fluorescencia, y módulos adicionales. Concretamente, se ha implementado un módulo de espectroscopía Raman y un sistema de microfluídica para la toma de medidas *in situ*. También se ha evaluado la posibilidad de eliminar elementos que elevan el coste, como es el caso de la lente correctora del tubo del microscopio, y se ha demostrado que no conllevaría graves consecuencias en cuanto a la calidad de las imágenes.

Cabe destacar el aspecto económico del microscopio OpenFlexure en su configuración más básica, es decir, para la adquisición de imágenes en campo claro. En la [Tabla 6.1](#) se recoge el presupuesto aproximado, el cual evidencia que tiene un coste total cercano a 172€. Es importante tener en cuenta que el coste se vería reducido en un 30 % si se eliminase la lente correctora del tubo del microscopio.

Material	Precio (€)
Plástico PLA + piezas de montaje	10
Raspberry Pi 3 Model B+	40
Módulo cámara v2	25
3x motores + placas	15
Lente AC127-050-A	50
Lente condensadora PMMA	5
Objetivo RMS 40x	24
LED blanco + resistencia	3
TOTAL	172€

Tabla 6.1. Presupuesto aproximado de la configuración más básica del microscopio OpenFlexure.

Además, se ha comparado la efectividad del microscopio desarrollado con equipos de referencia de laboratorio, en concreto con el microscopio confocal de espectroscopía Raman NRS-4500 JASCO y el microscopio confocal de fluorescencia Nikon A1R.

Destacar también que para obtener los resultados mostrados en el [Capítulo 5](#) se han aplicado conocimientos de *softwares* como Opticstudio, ImageJ, Python o Matlab.

En definitiva, y a pesar de que los resultados obtenidos con el OFM no han sido tan buenos como los que se han obtenido con los equipos de referencia, presentan la suficiente calidad para poder realizar técnicas de análisis y automatización de tareas de detección. Entre los factores que han afectado críticamente a la calidad de las imágenes adquiridas, destaca el ajuste de blancos del detector, la entrada de polvo en los componentes del OFM o el ruido de iluminación ambiente. No obstante, y a pesar de estas complicaciones, se han conseguido extraer los resultados deseados mediante las modificaciones realizadas al diseño original OFM.

6.2 Líneas futuras y mejoras del *setup* experimental

Una vez expuestas las conclusiones del trabajo realizado, se proponen las siguientes líneas futuras y mejoras del *setup* experimental.

En primer lugar, y en base a los resultados obtenidos en este trabajo, surge la necesidad de rediseñar o reemplazar algunas de las piezas 3D del diseño original OFM. Por ejemplo, debido a que el microscopio está fabricado en plástico PLA, las roscas de los tornillos se desgastan con el tiempo y, por lo tanto, disminuye progresivamente la capacidad de enfoque con precisión. Otro ejemplo son los engranajes de plástico que transmiten el movimiento de los motores paso a paso, ya que el plástico no encaja perfectamente y eso conlleva también pérdidas de precisión para desplazar la plataforma donde se encuentra la muestra.

Para evitar problemas derivados de la entrada de polvo e iluminación de fondo en el sistema, sería necesario fabricar una cubierta que protegiese los elementos del microscopio. También sería necesario recubrir los sensores CMOS con películas transparentes debido a su exposición directa a agentes externos y a la dificultad que supone su limpieza.

Otro asunto pendiente ha sido el obtener imágenes de campo claro en configuración de epi-iluminación. A pesar de implementar los anillos de iluminación LED de la [Figura 3.8](#), no se lograron adquirir imágenes que permitiesen identificar la presencia de fitoplancton ni su fluorescencia.

Es importante desarrollar una configuración que permita adquirir imágenes de campo claro y fluorescencia simultáneamente. En este trabajo han surgido numerosos problemas al tratar de adquirir imágenes de la misma región de una muestra, ya que los filtros se encuentran en zonas poco accesibles del microscopio y al quitarlos se solía perder la zona de enfoque. Este problema podría solventarse ampliando las dimensiones del microscopio e implementando un sistema de cambio de filtros automático, ya que la extracción manual en un sistema tan compacto es complicada.

Por otra parte, queda pendiente como trabajo futuro aplicar el procesado de imagen realizado en la [Subsección 5.2.2](#) sobre imágenes adquiridas con el OFM y demostrar que efectivamente permitiría la detección temprana de HAB de forma instantánea y automática tras la fijación de valores umbrales de control por parte de un experto.

Finalmente, sería necesario mejorar el *setup* experimental de espectroscopía Raman de la [Subsección 3.2.4](#) para adquirir espectros con mayor resolución, ya que en la mayoría de los casos el ruido *shot* y de fluorescencia impedía la visualización de las bandas Raman. El primer paso sería utilizar un espectrómetro con mayor resolución.

Bibliografía

- [1] Datos de producción acuicultural. *Gobierno de España*, https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/datos_produccion/datos_produccion.aspx. Última visita: 28/08/21.
- [2] Jason Deglint, Chao Jin, Angela Chao, and Alexander Wong. The feasibility of automated identification of six algae types using feed-forward neural networks and fluorescence-based spectral-morphological features. *IEEE Access*, PP:1–1, 12 2018.
- [3] M. Lauffer, F. Genty, S. Margueron, and J. L. Collette. Morphological recognition with the addition of multi-band fluorescence excitation of chlorophylls of phytoplankton. *Photosynthetica*, 55(3):434–442, 2017.
- [4] Schulze Katja, Diana Grohme, Ulrich Tillich, and Marcus Frohme. A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and imagej. 08 2016.
- [5] Belén Estébanez, Julio Gutiérrez, Jara Vassallo-Saco, Antonio Tazón, and Juan Vassallo-Sanz. The use of the fluorescence to the study of the water quality. *Radioengineering*, 17, 06 2008.
- [6] Chao Jin, Maria Mesquita, Jason Deglint, Monica Emelko, and Alexander Wong. Quantification of cyanobacterial cells via a novel imaging-driven technique with an integrated fluorescence signature. *Scientific Reports*, 8, 06 2018.
- [7] Burkhard Hense, Peter Gais, Uta Jutting, Hagen Scherb, and Karsten Rodenacker. Use of fluorescence information for automated phytoplankton investigation by image analysis. *Journal of Plankton Research*, 30, 02 2008.
- [8] Vrba J. Nedoma J. Seda J. Simek K. Komárková K Kopáček J. Sorf M. Kubecka J. Matena J. Ríha M. Peterka J. Cech M. Vasek M. Znachor P., Hejzlar J. *Brief history of long-term ecological research into aquatic ecosystems and their catchments in the Czech Republic. Part I: Manmade reservoirs*. 01 2016.
- [9] Elahe Zohdi and Madjid Abbaspour. Harmful algal blooms (red tide): A review of causes, impacts and approaches to monitoring and prediction. *International journal of Environmental Science and Technology*, 16, 03 2019.
- [10] Mark Nienaber and Miriam Kannan. *A Guide to Cyanobacteria: Identification and Impact*. 06 2018.
- [11] Joel Collins, Joe Knapper, Julian Stirling, Joram Mduda, Catherine Mkindi, Valeriana Mayagaya, Grace Mwakajinga, Paul Nyakyi, Valerian Sanga, Dave Carbery, Leah White, Sara Dale, Zhen Jieh Lim, Jeremy Baumberg, Pietro Cicuta, Samuel McDermott, Boyko Vodenicharski, and Richard Bowman. Robotic microscopy for everyone: the OpenFlexure Microscope, 12 2019.

- [12] *Light*, chapter 2, pages 29–54. John Wiley and Sons, Ltd, 2019.
- [13] Adoniya Sebitosi and P. Pillay. New technologies for rural lighting in developing countries: White leds. *Energy Conversion, IEEE Transactions on*, 22:674 – 679, 10 2007.
- [14] Rudi Rottenfusser, Tadjia Dragoo, and Michael Davidson. Condenser Light Cones and Numerical Aperture. *Zeiss Microcopy*, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/basics/condenserlightcones/indexflash.html>. Última visita: 25/08/21.
- [15] Vijay Kalyani and Varsha Sharma. Different types of optical filters and their realistic application. *Journal of Management Engineering and Information Technology*, 3, 06 2016.
- [16] Filters. *Teledyne Photometrics*, <https://www.photometrics.com/learn/microscopy-basics/filters-3>. Última visita: 07/08/2021.
- [17] W. Gray Jerome. *Confocal Digital Image Capture*, pages 155–186. Springer International Publishing, Cham, 2018.
- [18] D. Litwiller. CCD vs. CMOS: facts and fiction. *Photonics Spectra*, 35:154–158, 01 2001.
- [19] Robert Youker. *Detectors for Super-Resolution and Single-Molecule Fluorescence Microscopies*. 03 2018.
- [20] G.A. Ascoli, J. Bezhanskaya, and Vassiliy Tsytsarev. Microscopy. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, pages 16–20, 01 2014.
- [21] Imaging. *BioEmergences*, <http://bioemergences.iscpif.fr/bioemergences/imaging.php>. Última visita: 11/08/21.
- [22] Anja Schué. Beware of “Empty” Magnification. *Leica Microsystems*, <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/beware-of-empty-magnification>. Última visita: 20/08/21.
- [23] James A. DeRose and Michael Doppler. Guidelines for understanding magnification in the modern digital microscope era. *Microscopy Today*, 26(4), 2018.
- [24] I. Kreslo, M Cozzi, Antonio Ereditato, M Hess, J Knuesel, Imad Laktineh, Marcello Messina, U Moser, C. Pistillo, K Pretzl, L Scotto, G Sirri, H.-U Schutz, and Valeri Tioukov. High-speed analysis of nuclear emulsion films with the use of dry objective lenses. *Journal of Instrumentation*, 3, 04 2008.
- [25] Christoph Cremer and Barry Masters. Resolution enhancement techniques in microscopy. *The European Physical Journal H*, 38, 04 2013.
- [26] C. Hoyer. Microscopes with digital imaging displays. *International Organization for Standardization (ISO)*, 2016.

- [27] Pina Colarusso, Linda H. Kidder, Ira W. Levin, and E. Neil Lewis. Raman and Infra-red Microspectroscopy. In John C. Lindon, editor, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, pages 1945–1954. Elsevier, Oxford, 1999.
- [28] The Rayleigh criterion for microscope resolution. *Edinburgh Instruments*, <https://www.edinst.com/ko/blog/the-rayleigh-criterion-for-microscope-resolution/>. Última visita: 17/08/21.
- [29] G Graham. Studies of Fraunhofer diffraction patterns. *Physics Education*, 7:352, 08 2002.
- [30] Samuel Schaefer, Stephen A. Boehm, and Kenneth J. Chau. Automated, portable, low-cost bright-field and fluorescence microscope with autofocus and autoscanning capabilities. *Appl. Opt.*, 51(14):2581–2588, May 2012.
- [31] Andrew R. Miller, Gregory L. Davis, Z. Maria Oden, Mohamad Reza Razavi, Abolfazl Fateh, Morteza Ghazanfari, Farid Abdolrahimi, Shahin Poorazar, Fatemeh Sakhaie, Randall J. Olsen, Ahmad Reza Bahrmand, Mark C. Pierce, Edward A. Graviss, and Rebecca Richards-Kortum. Portable, battery-operated, low-cost, bright field and fluorescence microscope. *PLOS ONE*, 5(8):1–3, 08 2010.
- [32] Gregory Bishop, Jennifer Satterwhite-Warden, Karteek Kadimisetty, and James Rusling. 3d-printed bioanalytical devices. *Nanotechnology*, 27:284002, 06 2016.
- [33] Mark Symes, Philip Kitson, Jun Yan, Craig Richmond, Geoffrey Cooper, Richard Bowman, Turlif ., and Leroy Cronin. Integrated 3d-printed reactionware for chemical synthesis and analysis. *Nature chemistry*, 4:349–54, 04 2012.
- [34] Rudi Rottenfusser, Wilson Erin, and Davidson Michael. Introduction to Fluorescence Microscopy. *Zeiss Microscopy*, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html>. Última visita: 06/08/21.
- [35] Anna Croce. Autofluorescence review. *European journal of histochemistry: EJH*, 58:2461, 12 2014.
- [36] Physics of fluorescence, the Jablonski diagram. *CCG, International Ocean Colour Coordinating Group*, <https://ioccg.org/group/pft/>. Última visita: 25/07/2021.
- [37] Wafa Mazi. Near-infrared fluorescent probes for sensitive determination of lysosomal and mitochondrial pH in live cells. 01 2019.
- [38] Gabriel Cristobal, Saúl Blanco, and Gloria Bueno. *Modern Trends in Diatom Identification Fundamentals and Applications: Fundamentals and Applications*. 01 2020.
- [39] Phytoplankton functional types. *NIGHTSEA, bringing fluorescence to light*, <https://nightsea.com/articles/jablonski-diagram-for-fluorescence/>. Última visita: 22/07/21.
- [40] Tiffany Moisan, Shubha Sathyendranath, and Heather Bouman. *Ocean Color Remote Sensing of Phytoplankton Functional Types*. 03 2012.

- [41] Informe de la evolución y estado actual del mar menor en relación al proceso de eutrofización y sus causas. *Instituto Español de Oceanografía (IEO)*, 2015, 07 2020.
- [42] Katia Buonasera, Maya Lambreva, Giuseppina Rea, Eleftherios Touloupakis, and Maria Giardi. Technological applications of chlorophyll a fluorescence for the assessment of environmental pollutants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401:1139–51, 06 2011.
- [43] Lihua Zeng and Daoliang Li. Development of in situ sensors for chlorophyll concentration measurement. *Journal of Sensors*, 2015:1–16, 04 2015.
- [44] Barbara Poniedzialek, Halina Falfushynska, and Piotr Rzymiski. Flow cytometry as a valuable tool to study cyanobacteria: A mini-review. *Limnological Review*, 17:89–95, 06 2017.
- [45] Ecohydros. *Ecología avanzada del agua*, <https://ecohydros.es>. Última visita: 02/09/21.
- [46] Matthew Baker, Shawn Hussain, Lila Lovergne, Valérie Untereiner, Caryn Hughes, R.A. Lukaszewski, Gerard Thieffin, and Ganesh Sockalingum. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: A critical review. *Chemical Society reviews*, 45, 11 2015.
- [47] JASCO. Raman NRS-4500. <https://www.jasco-spain.com/productos/espectroscop%C3%ADa/raman>. Última visita: 27/06/2021.
- [48] What is Raman spectroscopy? *Edinburgh Instruments*, <https://www.edinst.com/blog/what-is-raman-spectroscopy/>. Última visita: 03/07/2021.
- [49] Introduction to Raman Spectroscopy. <https://www.princetoninstruments.com/wp-content/uploads/2020/08/Introduction-to-Raman-spectroscopy.pdf>. Última visita: 25/06/2021.
- [50] Paul Rostron and Dina Gerber. Raman Spectroscopy, a review. *International Journal of Engineering and Technical Research*, 6:50–64, 09 2016.
- [51] M José Tosina Munoz. Diseño de un filtro morfológico para la reducción de fluorescencia en espectros Raman. *Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Telecomunicaciones de Barcelona. Universidad Politécnica de Catalunya*, 2016.
- [52] P. Eilers. A perfect smoother. *Analytical chemistry*, 75 14:3631–6, 2003.
- [53] Neal Gallagher. Whittaker smoother, 09 2018.
- [54] Shixuan He, Wei Zhang, Lijuan Liu, Yu Huang, Jiming He, Wanyi Xie, Peng Wu, and Chunlei Du. Baseline correction for Raman spectra using an improved asymmetric least squares method. *Anal. Methods*, 6:4402–4407, 2014.
- [55] OpenFlexure Motor Controller. *github*, https://github.com/rwb27/openflexure_nano_motor_controller. Última visita: 13/09/2021.
- [56] C. Joram. Transmission curves of plexiglass (PMMA) and optical grease. 2009.

- [57] UV fused silica: Plano-Convex Lenses. *Thorlabs*, <https://www.thorlabs.com/catalogpages/V21/667.PDF>. Última visita: 06/09/2021.
- [58] Microscopes and objectives. <https://www.lens-designs.com/microscopes>. Última visita: 16/09/2021.
- [59] Antonin Miks and Novák Jirí. Third-order aberration coefficients of a thick lens. *Applied optics*, 51:7883–6, 11 2012.
- [60] Confocal Microscopes. *NIKON*, <https://www.microscope.healthcare.nikon.com/products/confocal-microscopes>. Última visita: 29/08/2021.
- [61] M. Cristina Pedroso, Michael B. Sinclair, Howland D.T. Jones, and David M. Haaland. Hyperspectral confocal fluorescence microscope: A new look into the cell. *Microscopy Today*, 18(5), 2010.
- [62] Pablo Roldán-Varona, R. A. Perez-Herrera, Luis Rodriguez-Cobo, Luis Reyes-González, Manuel Lopez-Amo, and José López-Higuera. Liquid level sensor based on dynamic fabry perot interferometers in processed capillary fiber. *Scientific Reports*, 11, 02 2021.
- [63] Raman Spectrum of Acetone. *PublicSpectra*, <https://publicspectra.com/Raman/Acetone>. Última visita: 22/09/2021.
- [64] C. J. Carey. Asymmetric Least Squares. *github*, <https://gist.github.com/perimosocordiae/efabc30c4b2c9afd8a83>. Última visita: 25/06/2021.
- [65] Yaicha Winters, Tim Lowenstein, and Michael Timofeeff. Identification of carotenoids in ancient salt from death valley, saline valley, and searles lake, california, using laser Raman spectroscopy. *Astrobiology*, 13:1065–1080, 11 2013.