

METODOLOGÍA EN LA SINCRONIZACIÓN ENTRE CAPTURA DE VIDEO Y APLICADOR MAGNÉTICO EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA DINÁMICA DE CADENAS DE MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN PRESENCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS OSCILANTES DE BAJA FRECUENCIA MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

Nicolás G. Mele^{a,b} y Gustavo A. Pasquevich^{a,b,c}

^a Instituto de Física La Plata, CONICET-UNLP, diagonal 113 entre 63 y 64 La Plata,

^b Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP 47 y 115, La Plata,

^c Facultad de Ingeniería de la UNLP 47 y 115, La Plata, mele@fisica.unlp.edu.ar,

Introducción

Actualmente las nanopartículas magnéticas (NPM) resultan de gran interés debido a sus aplicaciones en diversas áreas especializadas como la medicina, terapias oncológicas, biosensores, catálisis, agricultura y medio ambiente [1]. La dependencia de la respuesta de sistemas nanoestructurados ante estímulos magnéticos externos es un tema de estudio actual [2]. Una de las temáticas que se está abordando actualmente es el transporte y promoción de estímulos mecánicos aplicando campos magnéticos alternos sobre sistemas dotados de nanopartículas magnéticas. Por ejemplo, la promoción de movimiento en el interior de células tumorales como iniciadores de muerte celular por aumento de permeabilización de las membranas celulares [3].

La caracterización de la respuesta mecánica de agregados magnéticos ante campos de baja frecuencia es actualmente de interés. El estudio de estos movimientos mediante videos, o imágenes tomadas en forma consecutiva, en observaciones por microscopio óptico, permite extraer un importante grado de información. Algunos ejemplos de las caracterizaciones posibles son distribución de tamaños de agregados, tiempos característicos en formación de agregados, dependencia de la forma del agregado con intensidad de campos aplicados, o dependencia de orientación de agregados ante cambios en la orientación o magnitud del campo aplicado.

Una de las dificultades que se encuentra para realizar muchas de estas caracterizaciones es la sincronización entre la señal del campo aplicado y los frames recopilados. Principalmente si se pretende hacer estudios a frecuencias comparables con el número de cuadros por segundo (fps, del inglés *frames per second*) que puede captar el dispositivo de adquisición. En este sentido surgen varios conceptos relacionados a las cámaras y encoders de video que son relevantes y definen las capacidades y posibilidades de la metodología propuesta. En este trabajo discutiremos dos metodologías de sincronización.

Metodología e instrumental experimental

Con el objeto de lograr la observación y registro de microobjetos magnéticos y nanoestructurados, se registran secuencias de imágenes con una cámara de video mientras se aplica un campo magnético variable sobre el objeto que se desea perturbar.

Los objetos de estudio fueron agregados de micropartículas de sílice decoradas con nanopartículas de óxido de Fe (que se denominarán perlas magnéticas o PEM) [4]. Las mismas conforman microestructuras nanoestructuradas que por microscopía óptica aparentan esferas de 1.4 μm de diámetro. Las nanopartículas que las componen tienen

diámetros entre 10 y 15 nm, teniendo estructuras espinelas compatibles con magnetita o maghemita. El tamaño nanométrico de las nanopartículas las cataloga como superparamagnéticas, lo que se evidencia en el hecho de que la interacción entre los esferoides es nula en ausencia de campos. Pero en presencia de campos magnéticos las nanopartículas contribuyen al momento magnético de la perla, alcanzando su máximo de $4.91 \times 10^9 \mu_B$ (donde $\mu_B = 9.274 \times 10^{-24} \text{ Am}^2$) a campos suficientemente altos .

Estas partículas magnéticas, cuando tienen libertad de rotación y traslación, ante la presencia de un campo magnético se agrupan en cadenas alineadas con el mismo. Estas cadenas se pueden reorientar al cambiar la dirección del campo. Para promover el movimiento y poder observarlas por microscopía óptica las micropartículas se deben suspender en un medio de bajo roce, de manera que tengan libertad de movimiento para acomodarse ante la presencia de un campo magnético aplicado. En este trabajo se aseguró una libertad de rotación suspendiendo las perlas magnéticas en la interfaz de dos líquidos no miscibles: agua y cloroformo. Con este fin se coloca la suspensión acuosa de PEM sobre una delgada capa de cloroformo. Las partículas decantan sobre el cloroformo. Tanto este como el agua son incoloros y transparentes y por lo tanto no interfieren con la observación de microscopía óptica.

Se trabajó en un microscopio óptico invertido Leica DM IL LED. El microscopio cuenta con objetivos x10, x20 y x40. Se adaptó la platina del microscopio para poder acercar bobinas en conformación cercana a la de Helmholtz e imanes permanentes.

En este trabajo se utilizaron dos cámaras diferentes, una Nikon D3100 (que denotaremos C1) [5] y una Moticam S6 (que denotaremos C2) [6]. La primera es una cámara digital reflex (SDLR) orientada a la fotografía mientras que la segunda es una cámara digital para microscopía. Ambas cámaras son útiles para el presente estudio aunque presentan ciertas diferencias y limitaciones.

El campo magnético total aplicado sobre las PEM se conformó como una superposición de un campo constante (mediante imanes permanentes) y un campo alterno, generado a partir del par de bobinas ya mencionadas. Este último se produjo a partir de una onda sinusoidal, como referencia de un amplificador de corriente. El campo total resulta de la forma:

$$\mathbf{H}(t) = H_C \hat{\mathbf{i}} + H_A \text{sen}(\omega t) \hat{\mathbf{j}}$$

donde $\hat{\mathbf{i}}$ y $\hat{\mathbf{j}}$ indican direcciones ortogonales pero paralelas al plano de la interface entre líquidos donde se encuentran las partículas, coincidente con el plano focal del objetivo del microscopio; $\omega = 2\pi f$, donde f es la frecuencia del campo alterno (número de períodos por segundo). El máximo campo conseguido con los imanes permanentes es de 64 kA/m, y la máxima amplitud de campo alterno alcanzado con el generador de corriente es de 3.3 kA/m.

El campo alterno se generó mediante un amplificador de corriente manejado por referencia externa y un generador de onda arbitraria (Tektronix AFG 3022B) de dos canales para conformar esa referencia. Las señales de sincronización se generaron con un auricular de botón y con un LED 5 mm de luz blanca (en serie con una resistencia de 400 Ohm). En ambos casos conectados directamente al generador de señales.

Resultados

Al aplicar un campo magnético con orientación variante sobre un conjunto de micropartículas magnéticas con libertad de movimiento, estas serán forzadas a seguir la dirección del campo. Para poder estudiar la respuesta de estos sistemas ante los cambios de orientación del campo aplicado hay que poder conocer la relación entre el tiempo propio

de la señal excitadora y el tiempo propio de la cámara de adquisición. O sea, hay que poder sincronizar la excitación con la captura de video.

La capacidad de registro del movimiento y la metodología de sincronización dependen fuertemente de las características de la cámara, especialmente de los módulos de disparo, conectividad y existencia o no de canal de audio. En la tabla 1 se presentan las principales características de estas dos cámaras.

	C1	C2
Tipo de cámara	Cámara Reflex Digital	Cámara digital para microscopio
Sensor	CMOS	sCMOS
Tamaño del sensor (diagonal)	27.76 mm	8.92 mm
Pixel size	5 um x 5 um	2.4 um x 2.4 um
Modo de escaneo	Progresivo o entrelazado	Progresivo
Modo de disparo	Rolling shutter ^a	Rolling shutter
fps	24 fps / 30 fps	<= 60 fps
Tiempo de exposición	100% ^{ab}	?
Tipo de tasa de fotogramas	Constante (CFR)	Variable (VFR) ^a
Codecs	H.264	H.264
Conectividad	USB 2.0	USB 3.1
Memoria interna	64 Gb máximo	--
Micrófono	Integrado	No

Tabla 1: Lista de características relevantes de las dos cámaras utilizadas en este proyecto, denominadas aquí C1 y C2. Los datos de las cámaras se obtuvieron de las especificaciones en los sitios web oficiales de ambos fabricantes [5] y [6] respectivamente. a) Las descripciones marcadas con "a" no fueron obtenidas de las especificaciones sino por observación directa con el aparato en el marco de este trabajo. b) El tiempo de exposición se calculó como el tiempo neto que al menos una parte del sensor está activo.

La cámara C2 está diseñada para acoplarse a un microscopio óptico y viene con un software de manejo que permite la configuración, observación en vivo y captura de fotos y videos desde una computadora. Por otro lado, la cámara reflex C1 también se puede controlar desde una computadora, pero tiene un control limitado en comparación con la C2. En particular, el modo "en vivo" solo se puede controlar desde la cámara misma, lo que significa que cualquier ajuste que se necesite hacer basado en la observación en vivo debe realizarse directamente desde la cámara y no desde la computadora [7].

El tiempo de exposición es un parámetro importante que determina el intervalo de tiempo que se captura en cada fotograma [8]. Aunque este parámetro no suele especificarse con precisión en los archivos de vídeo, es posible determinarlo mediante diferentes ensayos [9]. En ausencia de esta información, el tiempo de duración del fotograma (1/fps) se puede utilizar como una estimación.

Las determinaciones que se realizan a partir de los fotogramas, como lo es la orientación de las cadenas, corresponden a ese intervalo de tiempo que se encuentra acotado a la duración de un fotograma. Por lo tanto es necesario que la precisión en la determinación de los pulsos de sincronización sea menor o igual el tiempo de exposición. Aquí se evalúan dos métodos para la generación de estos pulsos de sincronización, uno mediante un evento sonoro y otro mediante un evento lumínico. El primero solo puede utilizarse en cámaras con la capacidad de registrar audios sincronizados con el vídeo. El segundo en cualquier cámara pero con la dificultad de que interfiere con lo que se desea observar.

Para ambos casos se utilizó el generador de onda de dos canales, con la posibilidad de conformar ondas sincronizadas. Con una de las señales se alimentó el generador de corriente que generaba el campo magnético variable y con la otra la señal de sincronización. La referencia para el generador de corriente fue una onda sinusoidal, mientras que la de la onda de referencia fueron generalmente ondas cuadradas o tipo pulso rectangular. La metodología de sincronización por audio se realizó sobre la cámara C1, que dispone de un micrófono, y la de sincronización por señal lumínica con la cámara para microscopio, C2.

Para la sincronización por audio se utilizó una onda cuadrada $\pm 5V$ para alimentar un auricular de oído, el que generaba un pico de sonido cada vez que cambiaba la polaridad de la señal, esto es cada vez que el campo magnético tenía un cruce por cero. El auricular se colocó junto a la entrada de audio de la cámara y fue captado por la misma y guardado en el canal de audio del vídeo generado.

Una vez captado el video, en un post análisis, la señal de audio se extrajo del archivo, así como los fotogramas individuales. La base de tiempo de estos últimos y la de la señal de audio es la misma y se encuentra en los metadatos del archivo original. La señal de audio se analizó buscando aquellas intensidades por encima de un umbral. Estos instantes son reconocidos como cruces por cero de la señal de campo en el eje de tiempos propio del video. Se debe tomar especial cuidado en seleccionar la primera ocurrencia por encima del umbral entre los varios sobrepicos debido a reverberaciones en la señal de audio, para evitar falsas determinaciones. De esta búsqueda se obtuvo un conjunto secuencial de instantes $\{\tau_0, \tau_1, \dots, \tau_n\}$ correspondientes a los cruces por cero de la componente alterna del campo, $H_A \sin(\omega t + \varphi)$, donde φ es la fase que tiene la señal excitadora respecto al origen de tiempo de la propia cámara. La relación entre los instantes determinados y el índice de secuencialidad, $\tau_i = \frac{i}{2f} - \frac{\varphi}{2\pi f}$ permiten inferir el parámetro φ necesario para la sincronización. En la figura 1 se muestra un esquema del arreglo experimental y un ejemplo de un conjunto de fotogramas con la respectiva onda de audio marcando los cruces por cero de la componente alterna del campo.

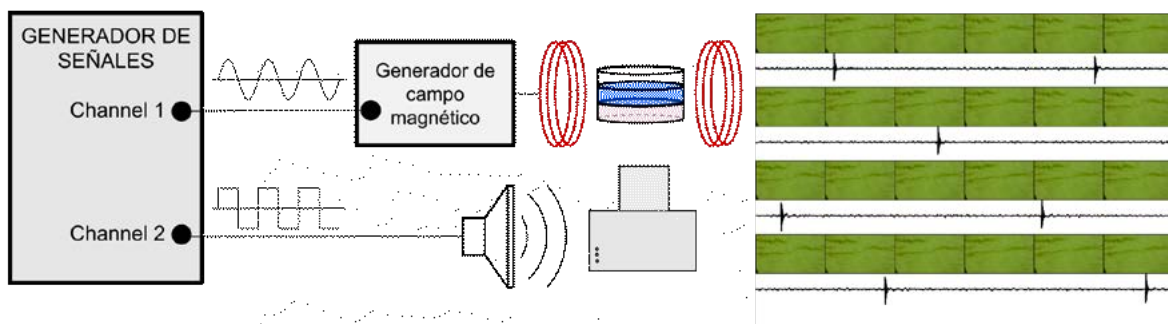


Figura 1: esquema de arreglo experimental para la sincronización por audio. Ejemplo de una toma con la cámara C1 de agregados magnéticos ante la presencia de un campo constante más uno alterno, con una frecuencia de oscilación de 3 Hz. En el ejemplo se muestran una secuencia de fotogramas y la señal de audio, donde se observan los picos (los cuales ocurren cada vez que la componente alterna cambia de signo). Los imanes permanentes para generar el campo constante no están graficados.

Con la señal lumínica se procedió de la siguiente manera. Se utilizó un LED blanco para emitir un pulso de luz. El LED se colocó junto a la suspensión que se deseaba caracterizar. El tiempo de encendido del LED debe ser mayor que $1/fps$ para asegurar que se evidencie y no se pierda, dado que la calidad de la sincronización se basa en no perder

pulsos para tal efecto. En este caso, a diferencia de la metodología con audio, elegimos emitir los pulso cada un número definido (N_D) de periodos de campo. Inician ante un cruce por cero de la señal de referencia del campo alterno y vuelve a repetirse N_D periodo después ante el siguiente inicio de periodo. La elección de emitir solo en ciertos ciclos es para asegurar que haya ciclos completos sin una perturbación lumínica que puede afectar el análisis de las variables que se quiere cuantificar. A posteriori de la toma del video se separó en todos sus fotogramas y se analizó la intensidad de luz promedio de cada uno de ellos. Un análisis de intensidad promedio de los píxeles por fotograma permitió determinar aquellos fotogramas, $\{n_{L,0}, n_{L,1}, \dots, n_{L,n}\}$, en los que se evidenciaba el encendido del LED. La señal de sincronización ocurrió durante el periodo de tiempo correspondiente al fotograma. Asignamos a cada encendido el instante medio del fotograma, es decir si el fotograma $n_{L,i}$ se encuentra entre los instantes t_i y t_{i+1} , se indica que el LED encendió en $\tau_i = (t_i + t_{i+1})/2 \pm (t_{i+1} - t_i)/2$. A partir de estos valores, y considerando que ocurren secuencialmente (i.e $i=1,2,3\dots$), es posible determinar el desfase del campo (respecto al instante 0 del eje de tiempo del video) a partir de la siguiente expresión, $\tau_i = \frac{i N_D}{f} - \frac{\phi}{2\pi f}$. En la figura 2 se muestra un esquema del arreglo experimental para realizar la observación. Se muestra también un fragmento de video separado en fotogramas donde se puede observar el encendido del LED en tres de esos fotogramas, indicando que el led fue encendido durante el primero de ellos. En este caso el campo oscilaba a 0.8Hz, el pulso de LED se configuró para durar 0.12 segundos, y se emitía un pulso cada 5 periodos de oscilación del campo alterno.

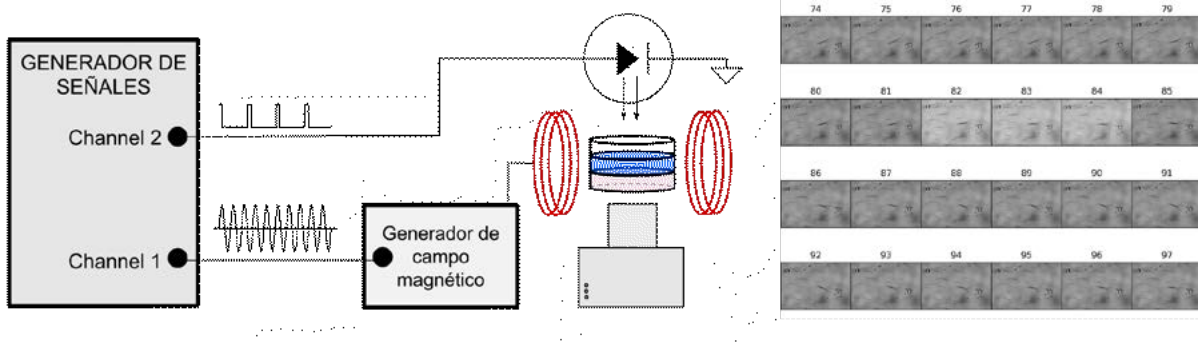


Figura 2: esquema de arreglo experimental para la sincronización por emisión de luz. Ejemplo de una toma con la cámara C2 de agregados magnéticos ante la presencia de un campo constante más uno alterno con una frecuencia de oscilación de 0.8 Hz. En el ejemplo se muestran una secuencia de fotogramas, donde se observa el encendido del LED en el frame 82 indicando que el campo magnético realizó un inicio de periodo. El pulso de sincronización se encuentra N_D períodos separado del previo y del que prosigue (en el caso particular del video mostrado aquí, $N_D = 5$). Los imanes permanentes para generar el campo DC no están graficados.

Discusión

Las dos metodologías abordadas permitieron una correcta sincronización entre fotogramas y campo aplicado. Aún habiendo alcanzado una sincronización exitosa, encontramos virtudes y desventajas en ambas cámaras, que son importante señalar, para tener en cuenta al momento de adquirir equipos con mayores prestaciones. La cámara C1 no puede ser manejada en modo video desde una computadora, condicionando a la operación de la cámara, usando los controles que son parte del propio dispositivo,

promoviendo movimientos indeseados en el microscopio y el objeto de estudio que es extremadamente sensible a las vibraciones. Mientras que la cámara C2 no puede ser sincronizada por señal que no sea a través de la propia imagen. Además tiene una tasa de captura de frames variable que depende de muchos factores externos que incluyen la iluminación, la conectividad y la eficiencia y capacidad de la computadora que la maneja. Por otro lado, la tasa de frames variable implica mayores cuidados en el post análisis.

Señalamos también que ambas cámaras funcionan con el modo de captura “rolling shutter”, que refiere a una cámara con menos exigencias temporales. Como alternativa superadora es la metodología “global shutter”, la que devuelve un fotograma en el cual todos los píxeles representan por igual los instantes sucedidos. Sin embargo la captura en modo rolling shutter permite aumentar la precisión en la determinación del evento de sincronización utilizando la capacidad de distinguir el encendido del pulso lumínico dentro de las filas de píxeles del propio fotograma (caso no analizado en este documento).

Conclusiones

Fue posible realizar estudios de respuesta hasta 3 Hz a partir de registros de video habiendo sincronizado el tiempo de la cámara y de la señal alterna de referencia del campo excitador. Se comprobó que el canal de audio disponible en algunas cámaras es un método eficiente para lograr la sincronización. Ante la ausencia de ese canal se puede usar una señal lumínica. Finalmente se encontró que hay ciertas características de funcionamiento de las cámaras que son relevantes a los fines de la sincronización y en particular el uso en observación de sistemas sensibles a las vibraciones. Algunos factores importantes son: máximo valor posible de fps, tipo de lectura del CMOS (Rolling Shutter o global shutter), tasa de captura de fotogramas constante (CFR) o variable (VFR), tiempo de exposición, autonomía y manejo externo de la cámara.

Referencias

- [1] Ali, Arbab, Tufail Shah, Rehmat Ullah, Pingfan Zhou, Manlin Guo, Muhammad Ovais, Zhiqiang Tan, and Yu Kui Rui. 2021. “Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications.” *Frontiers in Chemistry* 9 (July): 1–25.
- [2] Suwa, Masayori, Akira Uotani, and Satoshi Tsukahara. 2020. “Magnetic and Viscous Modes for Physical Rotation of Magnetic Nanoparticles in Liquid under Oscillating Magnetic Field.” *Applied Physics Letters* 116 (26). AIP Publishing LLC.
- [3] Naud, Cécile, Caroline Thébault, Marie Carrière, Yanxia Hou, Robert Morel, François Berger, Bernard Diény, and Hélène Joisten. 2020. “Cancer Treatment by Magneto-Mechanical Effect of Particles, a Review.” *Nanoscale Advances* 2 (9): 3632–55.
- [4] Natalia Capriotti, Leslie C. Amorós Morales, ..., C. Rodríguez Torres, “Silica-coated magnetic particles for efficient RNA extraction for SARS-CoV-2 detection”, enviado a Heliyon.
- [5] Hoja de especificaciones de la cámara Nikon D3100, página web oficial, <https://imaging.nikon.com/lineup/dslr/d3100/spec.htm>, consultado el 7 de marzo de 2023.
- [6] Hoja de especificaciones de la cámara Moticam S6, página web oficial, https://www.motic.com/As_Moticam_USBexport/product_862.html, consultado el 7 de marzo de 2023.
- [7] Nikon Corporation. (2010). Nikon D3100 user's manual. Tokyo, Japan: Nikon Corporation.
- [8] Pincus, S., & Ascher, R. (2012). *The Filmmaker's Handbook: A Comprehensive Guide for the Digital Age*. First printing (fourth edition), December 2012. Plume.
- [9] Simon, Gyula, Gergely Vakulya, and Márk Rátosi. 2022. “The Way to Modern Shutter Speed Measurement Methods: A Historical Overview.” *Sensors* 22 (5).