



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES**

**Propiedades ópticas de estructuras complejas  
basadas en una bioplantilla.**

Tesis que presenta  
**Isaac Carrillo Acuña**

Para obtener el grado de  
**Maestro(a) en Nanociencias y Materiales**

Director de la Tesis:  
**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**

San Luis Potosí, S.L.P., octubre de 2021



## **Constancia de aprobación de la tesis**

La tesis “**Propiedades ópticas de estructuras complejas basadas en una bioplantilla**” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Isaac Carrillo Acuña** y aprobada el **29 de octubre de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**  
Director/Codirectores de la tesis

---

**Dr. J. Sergio Casas Flores**  
Miembro del Comité Tutorial

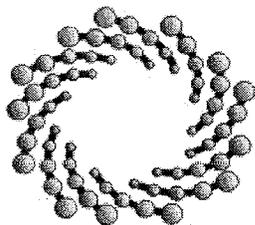
---

**Dr. Haret-Codratan Rosu Barbus**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Nanoestructuras I de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Braulio Gutiérrez Medina.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 074 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Nanociencias y Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de octubre del año 2021, se reunió a las 13:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

**Dr. Haret-Codratian Rosu Barbus**

**Presidente**

**IPICYT**

**Dr. J. Sergio Casas Flores**

**Secretario**

**IPICYT**

**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**

**Sinodal**

**IPICYT**

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES**

sustentó el C.

**Isaac Carrillo Acuña**

sobre la Tesis intitulada:

*Propiedades ópticas de estructuras complejas basadas en una bioplantilla*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**

El Jurado, después de deliberar, determinó

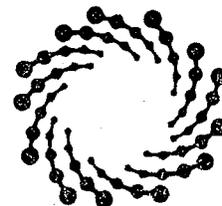
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 14:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes de octubre de 2021.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



**IPICYT**  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
INSTITUTO POTOSINO DE  
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Este trabajo es dedicado a mi familia, por su apoyo incondicional, sacrificio y gran ejemplo de tenacidad.

## Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento al **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica** por haberme permitido desarrollar su programa de maestría.

Agradezco a **CONACYT** por la beca otorgada.

Mi profunda gratitud a mi director de tesis, el **Dr. Braulio Gutiérrez Medina**, por admitirme en su laboratorio, guiarme durante el desarrollo de este proyecto, paciencia y su constante asesoría. A mi comité tutorial, el **Dr. J. Sergio Casas Flores** y el **Dr. Haret-Codratian Rosu Barbus**, por su invaluable tiempo para contribuir a esta tesis.

Por último, quiero agradecer a mis compañeros en el IPICYT, quienes me apoyaron durante mi estancia en el instituto y me brindaron su valiosa amistad.

## Abreviaturas

<b>PDA</b>	Agar Dextrosa Papa (del inglés <i>Potato Dextrose Agar</i> )
<b>PV</b>	Energía fotovoltaica (del inglés <i>Photovoltaics</i> )
<b>CS</b>	Celda solar
<b>SQ</b>	Límite Shockley – Queisser
<b>Eg</b>	Brecha de energía (del inglés <i>Energy gap</i> )
<b>PD</b>	Fotodetector de Silicio (del inglés <i>Photodetector</i> )
<b>c-Si</b>	Silicio cristalino
<b>pc-Si</b>	Silicio policristalino
<b>a-Si</b>	Silicio amorfo
<b>n-Si</b>	Nano Silicio
<b>PCE</b>	Eficiencia de conversión energética (del inglés <i>Power Conversion Efficiency</i> )
<b>IM</b>	Espacios intra – micelio
<b>ARC</b>	Estructuras antirreflejantes (del inglés <i>Anti Reflective Coatings</i> )
<b>LTS</b>	Estructuras de atrapamiento de luz (del inglés <i>Light Trapping Structures</i> )
$I_{sc}$	Corriente de corto circuito
$V_{oc}$	Voltaje de circuito abierto
<b>FF</b>	Factor de llenado
$P_{in}$	Energía de luz incidente
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NCs</b>	Nanocristales
<b>qdots</b>	Nanocristales semiconductores
<b>CNTs</b>	Nanotubos de carbono
<b>MO</b>	Microscopía óptica
<b>LMO-MTs</b>	Microtubo de óxido de litio y manganeso
<b>MTs</b>	Microtúbulos
<b>MAPs</b>	Proteínas asociadas a microtúbulos (del inglés <i>Microtubule-associated protein</i> )

## Resumen

La presente tesis se centra en la fabricación de un tipo de bioplantilla basado en la morfología de *Trichoderma atroviride*. La caracterización morfológica permitió determinar tres regiones de diferente densidad de hifas en tiempo de incubación de 36 h del modelo biológico, cuyos espacios intra - micelio corresponden a promedios de  $894 \pm 31 \mu\text{m}^2$ ,  $145 \pm 8 \mu\text{m}^2$  y  $38 \pm 4 \mu\text{m}^2$  para regiones de baja, media y alta densidad, respectivamente. Adicionalmente, se desarrolló un dispositivo que permitió caracterizar ópticamente la arquitectura obtenida, mediante el haz de un láser He - Ne ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) transmitido a través de la bioplantilla. Estos experimentos mostraron el efecto que tienen las diferentes áreas intra - micelio al interactuar con luz coherente, observándose una función de la intensidad luminosa con respecto al ángulo de proyección a través de los espaciamentos. La morfología compleja de la arquitectura obtenida sugiere un potencial uso en sistemas atrapadores de luz de acuerdo a la caracterización de transmisión óptica realizada, ofreciendo una alternativa a las propuestas de la literatura debido a su asequible desarrollo. Adicionalmente, los resultados de propiedades ópticas de transmisión fueron comparadas con un difusor óptico comercial y superficies Lambertianas.

**PALABRAS CLAVE:** Bioplantilla; Atrapamiento de luz; Morfología compleja; *Trichoderma atroviride*

## Abstract

This thesis focuses on the fabrication of a type of biotemplate based on the morphology of *Trichoderma atroviride*. The morphological characterization allowed to determine three regions of different density of hyphae in incubation time of 36 h of the biological model, whose intra-mycelial gaps correspond to means of  $894 \pm 31 \mu\text{m}^2$ ,  $145 \pm 8 \mu\text{m}^2$  and  $38 \pm 4 \mu\text{m}^2$  for regions of low, intermediate and high density, respectively. Additionally, a device was developed that allowed the optical characterization of the architecture obtained, using the beam of a He-Ne laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) transmitted through the biotemplate. These experiments showed the effect that the different intra-mycelial areas have when interacting with coherent light, observing a function of the light intensity with respect to the projection angle through the gaps. The complex morphology of the architecture obtained suggests a potential use in light trapping systems according to the optical transmission characterization carried out, offering an alternative to the proposals in the literature due to its affordable development. Additionally, the results of transmission optical properties were compared with a commercial optical diffuser and Lambertian surfaces.

**KEY WORDS:** Biotemplate; Light trapping; Complex morphology; *Trichoderma atroviride*

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Abreviaturas	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Interacción Luz - Materia	1
1.1.1. Mecanismos de interacción	1
1.2. Aprovechamiento de energía solar	2
1.2.1. La celda fotovoltaica	3
1.2.2. Esquemas para mejoras ópticas	5
1.3. Bioplantillas	8
1.4. Hongos filamentosos	11
1.4.1. <i>Trichoderma atroviride</i>	12
1.5. Justificación	14
1.6. Hipótesis	14
1.7. Objetivos y metas	14
1.7.1. Objetivo general	14
1.7.2. Objetivos específicos	14
1.7.3. Metas	15
<b>Capítulo 2. Manejo de <i>Trichoderma atroviride</i></b>	<b>16</b>
2.1. Motivación	16
2.2. Métodos experimentales	16
2.2.1. Crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	16

2.2.2. Experimento control (fotoconidiación)	17
2.2.3. Microscopía óptica	17
2.3. Resultados y discusión	17
2.3.1. Curva de crecimiento	17
2.3.2. Fotoconidiación	19
2.4. Conclusión	19
<b>Capítulo 3. Fabricación de bioplantilla</b>	<b>21</b>
3.1. Motivación	21
3.2. Métodos experimentales	21
3.2.1. Inoculado en papel celofán	21
3.2.2. Fijación y deshidratación de ejemplares	21
3.2.3. Recopilación y procesamiento de imágenes	23
3.3. Resultados y discusión	25
3.3.1. Complejidad de red	25
3.3.2. Espacios intra – micelio	26
3.4. Conclusión	28
<b>Capítulo 4. Propiedades de transmisión óptica de la bioplantilla</b>	<b>30</b>
4.1. Motivación	30
4.2. Métodos experimentales	30
4.2.1. Configuración de mesa óptica	30
4.2.1.1. Sistema de iluminación	30
4.2.1.2. Medición de intensidad luminosa	32
4.2.1.3. Perfil de irradiancia láser	33
4.3. Resultados y discusión	34
4.3.1. Índice de refracción	34
4.3.2. Diámetro de láser He - Ne	35
4.3.3. Patrón de moteado	36
4.3.4. Diseño y fabricación del detector	40
4.3.5. Curvas de intensidad en función del ángulo	41

4.3.6. Comparativas	47
4.4. Conclusión	49
<b>Capítulo 5. Conclusiones generales</b>	<b>51</b>
<b>Capítulo 6. Perspectivas</b>	<b>53</b>
<b>Referencias</b>	<b>70</b>

## **Anexos**

<b>Apéndice A1.</b> Preparación de medio PDA	55
<b>Apéndice A2.</b> Preparación de PBS	56
<b>Apéndice A3.</b> Preparación de PFA 4%	58
<b>Apéndice A4.</b> Ajustes exponenciales	59
<b>Apéndice A5.</b> Diseño de soportes	61
<b>Apéndice A6.</b> Automatización de detector	65
<b>Apéndice A7.</b> Posición de muestras con respecto a láser	67

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Para poder entender de manera adecuada el funcionamiento de una celda solar y las limitaciones de esta, primero necesitamos hacer una revisión de los aspectos fundamentales de la interacción entre luz y materia:

### 1.1 Interacción Luz – Materia

#### 1.1.1 Mecanismos de interacción

Cuando la luz incide sobre una configuración material, surge una combinación en diferentes proporciones de eventos ópticos como reflexión, refracción, dispersión y difracción (**Tabla 1**). Considerando que deseamos que la luz penetre la estructura y sea *aprisionada*, solo la refracción y difracción del haz en la red, es de utilidad (Fonash, 2014).

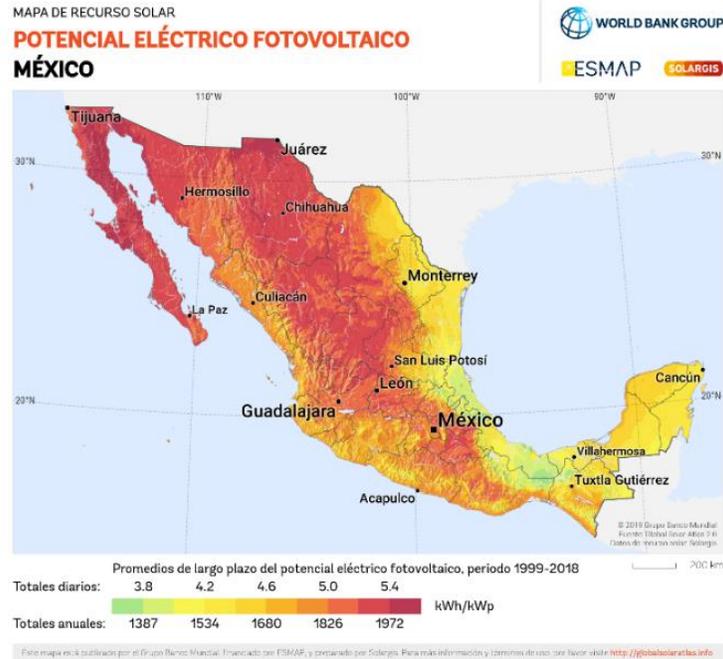
**Tabla 1.** Fenómenos ópticos presentes en el atrapamiento de luz (Fonash, 2014).

<b>Interferencia</b>	Fenómeno donde dos o más ondas electromagnéticas que existen en un punto de manera constructiva o destructiva se suman hasta cierto punto en ese punto.
<b>Difracción</b>	Resultado de la distorsión de ondas electromagnéticas al chocar con un objeto e interfiriendo de manera constructiva en direcciones específicas.
<b>Dispersión</b>	Fenómeno de separación de ondas electromagnéticas al ser absorbidas y emitidas por un objeto.
<b>Reflexión</b>	Resulta de una onda electromagnética que incide en una superficie, choca y es desviada con el mismo ángulo de incidencia. La reflexión que tiene lugar en una estructura lisa es denominada reflexión especular, mientras que, en una estructura rugosa es denominada reflexión difusa.
<b>Refracción</b>	Resulta del cambio de dirección y longitud de onda de una onda electromagnética al pasar de un medio de transmisión a otro diferente.

Estos eventos ópticos entran en juego mediante de las celdas solares, que permite la utilización de fotones a través de la energía solar.

## **1.2 Aprovechamiento de energía solar**

La energía fotovoltaica (PV) desempeña un papel importante para el abastecimiento de la demanda energética. El recurso de la radiación solar en México (**Figura 1**), permite que esta sea aprovechada. El concepto de generar energía eléctrica a partir de la luz solar apareció hace bastante tiempo. Sin embargo, la energía generada era mínima y deficiente para su uso práctico. El primer dispositivo con una eficiencia remarcable, de apenas 1%, fue construido por Fritts (1883). La contribución de Albert Einstein sobre el efecto fotovoltaico sobre una base cuántica (Einstein, 1905) fue necesario para el entendimiento del mecanismo fundamental de la energía fotovoltaica, pero no fue hasta la década de 1950 cuando los trabajos de los Laboratorios Bell, encabezados por Daryl Chapin, Calvin Fuller y Gerald Pearson quienes introdujeron una celda solar (CS) con una eficiencia superior al 5% (Chapin et al., 1954), permitieron una nueva era de desarrollo en el aprovechamiento de la energía solar. Durante la siguiente década, avances perceptibles fueron desarrollados, cuyos resultados establecieron un límite (Shockley – Queisser: SQ) de eficiencia superior no mayor a 32% (Shockley & Queisser, 1961). Por otra parte, límites como la brecha de energía ( $E_g$ ), factores geométricos y el proceso de recombinación, debieron ser considerados.



**Figura 1.** Potencial electro fotovoltaico en México (Solargis & The World Bank, 2017).

### 1.2.1 La celda fotovoltaica

Esta tecnología se suele clasificar dentro de tres generaciones distintas, dependiendo su orden de importancia y relevancia. La mayoría de las celdas solares basadas en obleas de Silicio cristalino (c-Si) dopadas con Boro (B) (Razykov et al., 2011) pertenecen a la primera generación. El espectro de eficiencia de esta clase excede el 25%. Sin embargo, esta generación se acerca a su máxima eficiencia teórica (Green, 2002b), sin cambios significativos aparentes.

La segunda generación, está orientada a la reducción de costos de producción. Esto último es alcanzado disminuyendo las temperaturas de los procesos de síntesis (Liu et al., 2010). Este grupo está constituido por CS de Si policristalino (*pc-Si*), de película delgada de *c-Si* y *pc-Si* (Michelle et al., 2001), y celdas solares de película delgada de Si amorfo (a-Si) (Carlson & Wronski, 1976) y nano Si (n-Si). La eficiencia típica varía desde 10-15%.

Una vez establecida una capacidad estándar, la segunda generación de CS podría ser reemplazada por alternativas de alta eficiencia; la tercera generación. El alto

desempeño de esta nueva generación, podría duplicar o triplicar los valores de eficiencia actual de 15-20% (Green, 2002b). Sin embargo, su costo de fabricación es incomparable con las CS actuales. Esta generación incluye CS en tándem (doble, triple o cuádruple unión: multi - unión) que mejoran la absorción del espectro solar (Dimroth et al., 2014; Hossain et al., 2016). Este grupo de CS pretende trabajar dentro de los límites de grosores cercanos a 300 nm y usando diferentes *arreglos de atrapamiento de luz* (Razykov et al., 2011). Las CS orgánicas, CS de punto cuántico y CS de perovskita forman parte de esta agrupación.

Simplificando, la primera y segunda generación de CS sujetan un límite (SQ) innegable no superior al 32% (Moriwaki et al., 2013; Powalla et al., 2013; Reinhard et al., 2012; Wallin et al., 2012), mientras que, las CS más avanzadas pueden vencer este límite (Dimroth et al., 2014; Hossain et al., 2016; Milichko et al., 2016), llegando a superar el 80% de eficiencia (De Vos, 1980; Martí & Araújo, 1996).

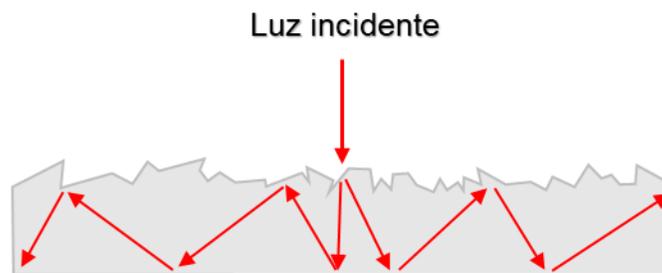
Asimismo, el desempeño de una CS puede ser descrito mediante su eficiencia de conversión energética (PCE) (Green, 1981). De acuerdo con secciones anteriores, el límite SQ especifica una PCE alrededor del 33% bajo condiciones estándar (Notarianni et al., 2014). Para determinar este parámetro, es necesario considerar los criterios de corriente de corto circuito ( $I_{SC}$ ), voltaje de circuito abierto ( $V_{OC}$ ) y el factor de llenado ( $FF$ ) que, sin la manipulación del espectro solar incidente en la CS, puede afectar el rendimiento de la misma. Una geometría óptica mejorada permite incrementar la longitud de recorrido óptico de la luz a través de, por ejemplo, ángulos de incidencia que permitan aprovechar los fotones que, de otro modo, escapan de la capa absorbente. Como resultado del recorrido total es suficiente para la absorción de la luz. No obstante, este método no es adecuado para CS de película delgada o su fabricación podría resultar muy costosa (Milichko et al., 2016).

Las pérdidas energéticas en una CS son debidas a: limitada absorción y pérdidas por emisión. Uno de los mecanismos de pérdida en CS es debido a que algunos fotones absorbidos tienen energía excesiva que es transformada en energía cinética, lo que resulta en el calentamiento de la estructura. Estas pérdidas son intrínsecas a la CS y no incluyen las pérdidas ópticas.

### 1.2.2 Esquemas para mejoras ópticas

Algunos enfoques para mejorar la eficiencia óptica de una CS, consideran revestimientos antirreflejantes (ARC) (Buencuerpo et al., 2015; Perl et al., 2014; Zanotto et al., 2010) y texturizado de superficies (Krč et al., 2003).

Por otra parte, algunos esquemas mitigan las pérdidas energéticas a través de estructuras de atrapamiento de luz (LTS) en la CS (**Figura 2**). El fenómeno de recolección de luz en un sistema material es caracterizado por el aprisionamiento de tantos fotones como sea posible a partir de una onda electromagnética, con el propósito de generar calor o portadores de carga (Fonash, 2014) los cuales pueden moverse por el sólido. La absorción de fotones dentro del material (e. g. un semiconductor) creará pares *electrón – hueco*, cuya carga polar puede ser recolectada por contactos selectivos (electrodos). Esta técnica lo logra a través de la mejora de la reflexión interna total y es especialmente efectiva en aumentar la recolección de corriente en CS de película delgada (P. Campbell et al., 1993). En este contexto, la dispersión producida al interior de la CS puede conseguirse con superficies texturizadas con estructuras geométricamente ordenadas, o convenientemente, con estructuras aleatorias.

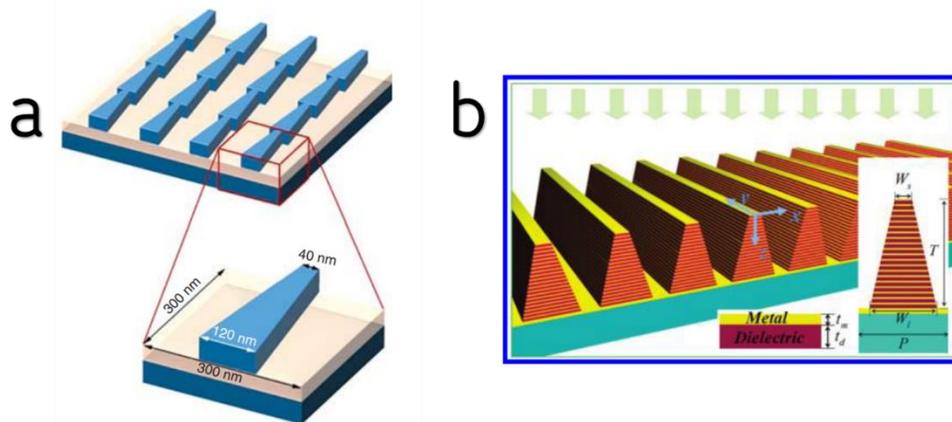


**Figura 2.** Representación esquemática de atrapamiento de luz con superficie texturizada aleatoriamente.

Análisis llevados a cabo por (Sai et al., 2007) muestra una de las varias geometrías que pueden tener los arreglos texturizados o irregulares. En este grupo estudiaron los efectos antirreflejantes y de atrapamiento de luz de un texturizado superficial de rejillas con un rango de periodos de separación desde 0.1 hasta 1  $\mu\text{m}$ , estableciendo

que, solo periodos superiores a  $0.5 \mu\text{m}$  son preferibles para el incremento de recorrido óptico dentro de c-Si debido a los órdenes de difracción más altos.

Por otra parte, aprovechando las propiedades de dispersión y concentración de luz (absorción de fotones), los dispositivos plasmónicos microestructurados han llamado la atención en la recolección eficiente de luz. Por ejemplo, algunos enfoques como (Aydin et al., 2011) proponen arreglos trapezoidales de plata desarrollados en escala submicrométrica (**Figura 3 a**). Estos arreglos muestran ser super absorbedores de banda ancha diseñados para recolectar más luz. Sin embargo, la generación de portadores de carga se ve opacada por el calentamiento (absorción de luz) en el dispositivo. Asimismo, (Cui et al., 2012), presentan absorbedores con una geometría parecida a dientes de una sierra (**Figura 3 b**). Esta geometría permite recolectar longitudes de onda más cortas en la parte superior de los dientes (de anchura menor), mientras que las partes inferiores de la construcción, atrapa las longitudes de onda más grandes (de anchura mayor), demostrando un arreglo de atrapamiento de frecuencias visibles. Ambos estudios demuestran la eficiencia de captura de luz con resonadores metálicos, sin embargo, los requerimientos para su compleja y elaborada fabricación los hace difíciles de producir masivamente, lo que implica una limitación en el campo de aplicaciones.



**Figura 3. a.** Representación esquemática de arreglo trapezoidal y celda unitaria (40 - 120 nm sobre 300 nm) (Aydin et al., 2011). **b.** Diagrama del absorbedor de película delgada de material anisotrópico en forma de diente de sierra. Figura tomada de (Cui et al., 2012).

En paralelo a las LTS ordenadas geoméricamente, algunas estructuras pueden reducir la reflexión en la superficie de una CS y aumentar la absorción al distribuir uniformemente en ángulo en el medio incidente y el sustrato. Estos esquemas son denominados dispersores Lambertianos (Buencuerpo, 2017). Estas propuestas, a longitudes de onda débilmente absorbidas, produce una distribución isotrópica de radiancia (potencia por unidad de área por unidad de ángulo sólido) en el sustrato. Esta distribución de luz varía en función de  $\cos \theta$  siguiendo la Ley de Lambert (Campbell et al., 1993) y mejora la longitud del camino óptico hasta  $4n^2$  en promedio, donde  $n$  representa el índice de refracción del medio absorbente (Schuster et al., 2014).

En el contexto del atrapamiento de luz Lambertiano, la investigación de (Green, 2002a) describe soluciones analíticas para estos esquemas, que son de uso en el cálculo de las propiedades de absorción y emisión de dispositivos semiconductores texturizados. A través de estas soluciones, se encuentran soluciones para el comportamiento de luz débil y fuertemente absorbida, mostrando que el promedio de longitud de camino a través del esquema se aproxima al doble de grosor del mismo. Por su parte, (Schuster et al., 2014) establece una figura de mérito para cuantificar la eficiencia de nanoestructuras para el atrapamiento de luz en celdas solares. Esta eficiencia utiliza la corriente de corto circuito para evaluar el desempeño dado por una arquitectura y es comparado con un dispersor Lambertiano ideal.

Formalmente, se espera que una arquitectura irregular de sólidos haga a estos más conductores que los sólidos cristalinos para la formación de excitones<sup>1</sup> y polarones<sup>2</sup>. Esto es debido a que el orden aleatorio tiende a limitar el movimiento de los portadores, haciendo la formación de excitones y polarones más fácil en estos materiales en contraste con los materiales cristalinos (Fonash, 2014).

---

<sup>1</sup> **Excitón:** Unidad resultante de la unión de un par electrón – hueco (Fonash, 2014).

<sup>2</sup> **Polarón:** El electrón y su nube de distorsión reticular. También puede verse como un portador atrapado en sí mismo, un portador atrapado en un pozo potencial creado por su propia distorsión de la red (Fonash, 2014).

Sin embargo, la ingeniería moderna no es la única alternativa para diseños de mejoras ópticas; la naturaleza promete oportunidades que pueden ser aprovechadas. El aprovechamiento de una construcción a partir de sistemas modelo biológicos puede ser una opción para atenuar estos efectos a través de una morfología compleja explotable.

### 1.3 Bioplantillas

En este presente capítulo, serán descritos algunos de los procedimientos y distintas alternativas que distintos autores han llevado a cabo usando *bloques de construcción* biológicos. En este contexto, los enfoques de fabricación de estructuras en las escalas micro y nano métricas a través de vías *bottom – up* resultan oportunos. La biotecnología, ofrece estructuras abundantes con morfologías simples o complejas que pueden ser explotadas por su arquitectura jerárquica para la síntesis y funcionalización de nanomateriales (**Tabla 2**).

<b>Tabla 2. Materiales inorgánicos micro y nano estructurados inspirados en bioplantillas <sup>3</sup></b>			
<b>Plantilla</b>	<b>Estructura</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencia</b>
DNA	Au NPs	Catálisis; Fotónica y Electrónica	(Li et al., 2003)
Proteínas	Nanocristales semiconductores (qdots)	Biología celular y animal; Nanoelectrónica	(Kalinin et al., 2006; Michalet, 2013)
Virus	Metales; Semiconductores y Nanotubos de carbono (CNTs)	Biosensores; Nanocircuitos; Sistemas de recolección de luz	(Govindaraju et al., 2008)
Bacterias	Micro y nano estructuras de TiO <sub>2</sub> ; SnO <sub>2</sub> ; ZrO <sub>2</sub>	Catálisis	(Jo, 2013; Vogel & Stark, 2012; Zhou et al., 2012)
Algas	Au y Ag NPs	Catálisis; Biosensores	(Govindaraju et al., 2008)

<sup>3</sup> **Bioplantilla:** En este proyecto, el concepto es entendido como un patrón biológico que sirve para fabricar otras piezas basadas en la arquitectura de esta.

Hongos	Microesferas de ZrO <sub>2</sub> ; LMO-MTs; Microalambres de Au; ZrP <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Catálisis; Baterías; Electrónica; Sensores	(Fan et al., 2011; Rehman et al., 2011; Sugunan et al., 2007; Tian et al., 2010; Yu et al., 2013)
Insectos	SiN <sub>x</sub> / SiO <sub>2</sub> ; Nanoestructuras de metales nobles	CS, PV	(Behjat et al., 2017; Juha Tommila*, Arto Aho, Antti Tukiainen, Ville Polojärvi, Joel Salmi, 2012)

La gran mayoría de la literatura reportan la agregación de materiales inorgánicos sobre biomoléculas (bio - mineralización<sup>4</sup>) tales como proteínas y DNA, u organismos como virus, bacterias, algas, hongos e insectos. Los procesos de reducción de metales nobles es hipotetizado por (Selvakumar et al., 2011) como que los grupos funcionales de la membrana celular participan como sitios activos para el anclaje de los iones metálicos. Asimismo, los modelos biológicos son preferibles como bloques básicos de construcción debido al bajo tiempo de producción de micro y nanoestructuras, condiciones de crecimiento accesibles, producción en masa y su resistencia a distintas condiciones ambientales. Como resultado, los motivos estructurales de microorganismos, que pueden desarrollarse rápidamente y a bajo costo, los convierte en objetivos para su uso en la síntesis dirigida de materiales.

Por su parte, mediante el uso de plantillas bacterianas (Zhou et al., 2012), se llevó a cabo la producción de estructuras (esferas y túbulos) huecos de óxido de titanio

---

<sup>4</sup> Precipitación de materiales inorgánicos empleando biosupramoléculas

vía sol – gel. El recubrimiento de los organismos es logrado mediante la absorción de moléculas metálicas desde la solución hacia la membrana funcional de la célula. Un posterior tratamiento térmico (700 °C) remueve las plantillas biológicas al ser calcinadas. Estudios posteriores demuestran propiedades de recolección de luz mejores que un diseño sólido de TiO<sub>2</sub>. Esto último atribuido a las cavidades que crean múltiples dispersiones de la luz. Las caracterizaciones determinan un ancho de entre 200 – 500 nm y una longitud de hasta 1 µm.

Asimismo, la revisión de (Soto & Ratna, 2010), señala que ha sido utilizado el bacteriófago M13 (en forma de bastón) para organizar péptidos específicos en la proteína de la cubierta principal de la membrana. Este régimen conjugado permite usar el fago como molde para crecer nanocristales (NCs) de sulfuro de zinc y cadmio.

De manera similar en hongos, en 2011 (Rehman et al., 2011) implementaron el uso de hifas en crecimiento de *Aspergillus niger* para el diseño de estructuras de nanoalambres. Ellos fabricaron estas estructuras mediante el recubrimiento de las hifas con nanopartículas de oro. El sistema híbrido del hongo y las NPs fue sometido a un tratamiento térmico de 550°C que terminó por revelar una estructura hueca debido a la remoción de materia orgánica. Los resultados mostraron un tamaño promedio de partícula de 20 – 24 nm y un recubrimiento (microalambres) de ~ 800 nm. Equivalentemente, en 2007, mediante de *A. niger*, (Sugunan et al., 2007) fabricaron microtubos elaborados con iones de oro que decoraban la superficie de los micelios fúngicos. Este grupo de trabajo formuló las estructuras a través de un sistema de NPs de oro funcionalizadas con oligonucleótidos<sup>5</sup> para su anclaje con la membrana celular del hongo filamentoso. Sus resultados exhibieron un ancho promedio de entre 1 – 2 micras y longitudes que superaban los milímetros. La consolidación de las dos entidades, fue sometida a un proceso de extracción de dióxido de carbono supercrítico para la liberación de los microtúbulos de oro. Por último, en 2010, (Tian et al., 2010), con ayuda de la arquitectura de levadura instantánea (Angel Yeast Co., Ltd) exploran la síntesis de fosfato de zirconio. La

---

<sup>5</sup> **Oligonucleótidos:** Polímeros cortos de ácido nucleico, con cincuenta pares de bases o menos.

unión de organismo – material fue sometida a un tratamiento térmico (hasta 700°C) para la liberación de la construcción mesoporosa. Los resultados de las estructuras bioinspiradas muestran actividad electrocatalítica para la reacción de reducción de oxígeno.

Debido a su excelente tolerancia a los metales y su capacidad de soportar la mineralización de estos, los hongos filamentosos son aplicantes atractivos para su uso como bioplantillas.

#### **1.4 Hongos filamentosos**

Los hongos son microorganismos eucariotas que incluyen mohos y levaduras, y en su mayoría, es observable un arreglo filamentosos por naturaleza (a excepción de las levaduras). Estos organismos pueden reproducirse ya sea de manera sexual (a través de procesos meióticos) o asexual (procesos mitóticos) mediante propágulos denominados esporas (Webster & Weber, 2007). El crecimiento de los hongos filamentosos se da mediante el surgimiento y desarrollo de hifas, las cuales constituyen el micelio (Leeder et al., 2011). En este contexto, el crecimiento de las hifas involucra interacciones entre síntesis y expansión de la membrana plasmática, conducidas por el citoesqueleto (Torralba & Heath, 2001).

La estructura del citoesqueleto celular evoca formas parecidas a túbulos, cuyos bloques de construcción son unidades que proporcionan rigidez a la célula e incluyen microfilamentos<sup>6</sup> de actina, microtúbulos<sup>7</sup> (MTs) y filamentos intermedios. Sin embargo, estos últimos componentes no han sido identificados en modelos fúngicos. Adicionalmente, las funciones de este andamio celular son determinadas, en parte, por las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) (Omlsted, 1986).

---

<sup>6</sup> La función de estas estructuras es llevar cabo la regulación de la extensión de la punta de la hifa (Heath, 1995). Constituyente formado por monómeros de actina G.

<sup>7</sup> Constituyente que funciona como caminos para el transporte de cargamentos moleculares como vesículas, vacuolas y núcleo celular (Webster & Weber, 2007).

Sin embargo, no se considera la participación de estas últimas en el desarrollo de este estudio.

A pesar de que es desafiante caracterizar estos microorganismos, una clasificación es posible mediante sus propiedades morfológicas, como diámetro promedio de la hifa, unidad de crecimiento hifal, longitud de la hifa, unidad de ramificación hifal, número total de puntas y número total de ramificaciones (Paul & Thomas, 1998).

#### **1.4.1 *Trichoderma atroviride***

Las especies de *Trichoderma* forman hifas septadas de color hialino. Un color verde, grisáceo o marrón se debe a los conidios, que cuentan con una membrana suave a distintivamente rugosa (Kubicek & Harman, 2002).

Para poder mantener una elongación y una alta ramificación, el hongo se desarrolla mediante conidiación. Las ramificaciones laterales generadas de ramas principales, generalmente forman un ángulo recto entre ellas. Las células conidióforos son típicamente estrechas y flexibles, con ramificaciones primarias que surgen en intervalos regulares (Kubicek & Harman, 2002).

Algunas especies del género *Trichoderma* han sido seleccionados como agentes de control biológico<sup>8</sup> como resultado de su producción de metabolitos que restringen el desarrollo de otros microorganismos (Mukherjee et al., 2012). Los mecanismos de biocontrol incluyen, pero no se limitan, al micoparasitismo, antibióticos y competencia por nutrientes, también induce respuestas de defensa sistémica en plantas (Harman et al., 2004). Adicionalmente, algunas investigaciones hacen uso del hongo como modelos fotomorfogénicos<sup>9</sup> consecuente a cortos pulsos de luz que activan la conidiación (Schmoll et al., 2010).

---

<sup>8</sup> **Agentes de control biológico:** Organismos vivos utilizados con el objetivo de controlar las poblaciones de otro organismo.

<sup>9</sup> **Fotomorfogénesis:** Capacidad de *T. atroviride* para conidiar tras la exposición a la luz.

Algunas propiedades morfológicas de *T. atroviride* (**Figura 4**) son listadas en **Tabla 3** (Bissett, 1992).



**Figura 4.** Microscopía óptica de campo claro procesada y binarizada digitalmente de *T. atroviride* con tiempo de incubación de 24 h a 28 °C. Las ramificaciones blancas corresponden a las hifas del microorganismo y la sección oscura al fondo. Barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

<b>Tabla 3. Propiedades morfológicas de <i>Trichoderma atroviride</i> (Bissett, 1992).</b>	
	<b>Unidad</b>
Longitud total de la hifa	12 - 60 $\mu\text{m}$ / septo
Diámetro promedio de la hifa	4 - 12 $\mu\text{m}$
Número total de puntas <sup>10</sup>	216 puntas
Número total de hifas <sup>10</sup>	796 hifas
Velocidad de crecimiento hifal <sup>11</sup>	0.072 $\pm$ 0.016 $\mu\text{m}$ / s

Así pues, el uso selectivo de nuestro sistema modelo *T. atroviride* demuestra una aplicabilidad de este como una plantilla biológica para la fabricación de micro – arreglos y ha llamado nuestra atención debido a la posibilidad de aprovechar su capacidad intrínseca de formar grandes estructuras ramificadas ordenadas dimensionalmente.

<sup>10</sup> Valores aplicables para un cultivo de *T. atroviride* con 43 h de incubación a 28°C.

<sup>11</sup> Promedio de velocidad de crecimiento. Información obtenida de (Orellana, 2019).

## **1.5 Justificación**

La producción práctica de sistemas biológicos complejos presenta una alternativa promisorio para el desarrollo de estructuras basadas en su morfología. La red compleja de *Trichoderma atroviride* genera la oportunidad de aprovechar su entreverada organización mediante su fijación permitiendo generar un mecanismo de atrapamiento de luz.

Paralelamente, se hace necesaria la evaluación de la eficiencia de atrapamiento de luz en las microestructuras desarrolladas, donde se examina la competencia y desempeño de estas arquitecturas bioinspiradas. En este contexto, la realización de este estudio espera mejorar el recorrido óptico efectivo de la luz al incidir sobre microestructuras basadas en el hongo filamentoso *T. atroviride*, aportando una alternativa práctica con una morfología óptima.

## **1.6 Hipótesis**

Las microestructuras basadas en la morfología compleja de la red filamentosa de *Trichoderma atroviride* presentan propiedades ópticas favorables para el atrapamiento de luz.

## **1.7 Objetivos y metas**

### **1.7.1 Objetivo general**

Desarrollar bioplantillas construidas a partir del hongo filamentoso *Trichoderma atroviride* y evaluar sus propiedades ópticas, para determinar su potencial como estructuras complejas para el atrapamiento de la luz.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

- I. Cultivar *Trichoderma atroviride* bajo condiciones óptimas y fijar el micelio libre de sustrato.

- II. Describir las características morfológicas de la bioplantilla y cuantificar sus propiedades de transmisión óptica (patrón de transmitancia).

### **1.7.3 Metas**

- I. Cultivo de *Trichoderma atroviride*.
- II. Fijación de micelio libre de sustrato.
- III. Caracterización de *T. atroviride* mediante microscopía óptica.
- IV. Construir un dispositivo para medir la transmitancia óptica de muestras por medio de iluminación láser.
- V. Realizar mediciones de transmisión óptica de la estructura compleja bio-inspirada.
- VI. Evaluar el potencial uso de la estructura desarrollada para fines de atrapamiento de luz.

## CAPÍTULO 2. MANEJO DE *Trichoderma atroviride*

### 2.1. Motivación

Basados en la arquitectura que *T. atroviride* ofrece, utilizamos este organismo como modelo biológico para la fabricación de nuestra bioplantilla. Una vez seleccionado el esquema de referencia es necesario familiarizarnos con su crecimiento a través de su cultivo. Para el correcto empleo del hongo, debemos asegurar las condiciones óptimas de crecimiento del mismo, así como observar su comportamiento. Esto se logra a través de la implementación de protocolos cultivo, por lo que nosotros establecimos un procedimiento basado en la revisión bibliográfica de estos microorganismos y que permitan obtenerlo con el crecimiento deseado.

### 2.2. Métodos experimentales

#### 2.2.1 Crecimiento de *Trichoderma atroviride*

El cultivo de *T. atroviride* tomó como referencia la NOM-111-SSA1-1994. Agar Dextrosa Papa (PDA acrónimo en inglés) fue preparado con base a las especificaciones del fabricante (**Apéndice A1**) y esterilizado a 125°C durante 20 min. El medio de cultivo fue vaciado en placas Petri estériles.

En un ambiente estéril, los conidios de la cepa de tipo silvestre *T. atroviride* fueron colectadas mediante un ligero frotis con la aguja de una Jeringa de Insulina estéril y se realizó una punción sobre la parte central las placas Petri con PDA. Los medios de cultivo inoculados, fueron incubados en oscuridad a 28°C y observaciones mediante microscopía óptica (MO) fueron realizadas cada 24 h durante 120 h. El tratamiento de las imágenes fue realizado mediante el software ImageJ.

### **2.2.2 Experimento control (fotoconidiación)**

Partiendo de cajas previamente inoculadas por punción con *T. atroviride*, se expusieron a luz ambiental durante 10 min, para inducir la fotoconidiación. La exposición y registros fueron tomados a partir de dos lotes:

- Lecturas cada 24 h de incubación en oscuridad a 28°C.
- Lecturas cada 48 h de incubación en oscuridad a 28°C

### **2.2.3 Microscopía óptica**

El crecimiento de *T. atroviride* fue monitoreado a través de un microscopio de campo claro. Las imágenes fueron recolectadas mediante una cámara digital *AmScope MU300* acoplada al microscopio de campo claro *AmScope T370B-3M*, cuya captura fue realizada a través del software propio de la marca. Los objetivos de 4x y 10x magnificaciones fueron empleados para la caracterización de microscopía óptica; la escala establecida para las imágenes fue de 0.635 *pixel*: 1  $\mu\text{m}$  y 1.647 *pixel*: 1  $\mu\text{m}$  para cada magnificación respectivamente.

## **2.3. Resultados y discusión**

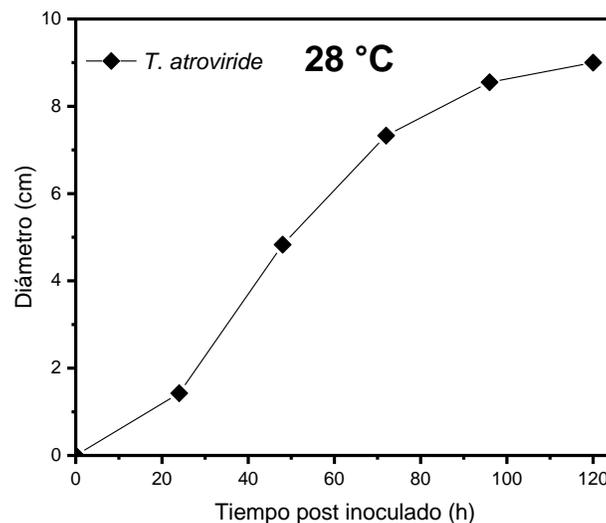
Con el fin de asegurar un dominio del modelo biológico, este fue sometido a un experimento control de crecimiento. Adicionalmente, un experimento de fotoconidiación fue realizado. El desarrollo de esto tratamiento permitió garantizar las buenas prácticas de laboratorio, y que las condiciones de crecimiento son las óptimas.

### **2.3.1 Curva de crecimiento**

Las lecturas de crecimiento de *T. atroviride* muestran a las 24 h un área de 1.6  $\text{cm}^2$  sobre la superficie del medio, con un diámetro de 1.43 cm. Una característica macroscópica es el crecimiento del hongo cuya morfología es semejante al algodón.

Asimismo, las características microscópicas, observadas mediante MO, revelan una morfología entreverada de las hifas cuya longitud es desigual entre sí. En contraste, el crecimiento a las 24 y 72 h muestra hifas alargadas y segmentadas. Las áreas ocupadas por el hongo, de estos tiempos de incubación, son de 18.3 cm<sup>2</sup> y 42.2 cm<sup>2</sup>, con diámetros de 4.8 y 7.3 cm respectivamente.

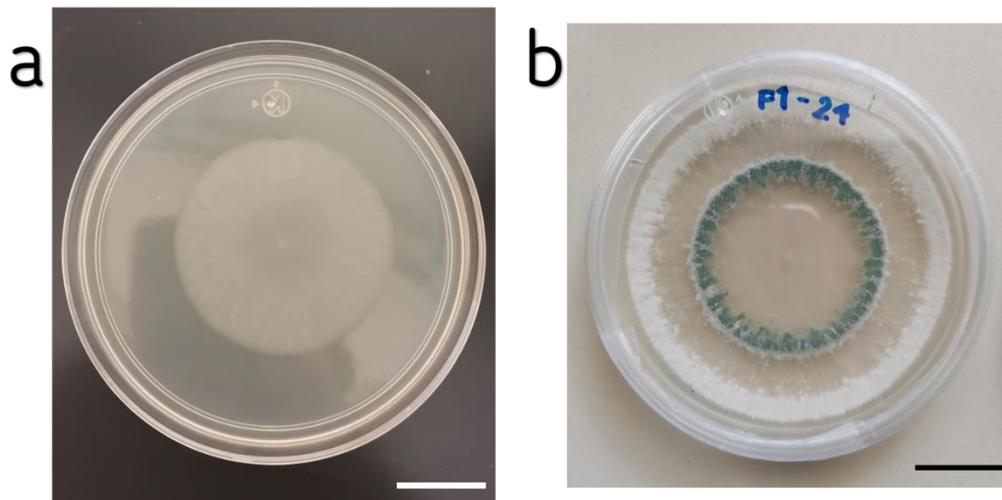
Por otra parte, las observaciones en MO de 96 h revelan una extensión persistente de las hifas, llegando a ocupar 44.8 cm<sup>2</sup> sobre el medio de cultivo con un diámetro de 7.5 cm. Alternativamente, la incubación durante 120 h muestra un área ocupada 63.6 cm<sup>2</sup> con un diámetro de crecimiento de 9 cm. Cuando el hongo alcanza las 120 h de incubación, es observado que el horizonte de conidiación alcanza el límite de la placa de Petri, delimitando la producción y el aprovechamiento experimental de los cultivos dentro de las primeras 96 h de incubación (**Figura 5**).



**Figura 5.** Curva de crecimiento de *T. atroviride* en medio de cultivo PDA incubado a 28°C durante 120 h en la oscuridad.

### 2.3.2 Fotoconidiación

Las lecturas de crecimiento de *T. atroviride* cada 24 h sometidas a luz ambiental durante 10 min muestran concordancia con la curva de crecimiento del hongo en la determinación de su diámetro (**Figura 6a**). Sin embargo, la interacción con la luz ambiental promueve la producción de esporas, generando un halo de color verde tras 96 h de incubación en oscuridad a 28°C con una exposición total de 30 min (**Figura 6b**).



**Figura 6.** a. Crecimiento de *T. atroviride* por 48h a 28°C en oscuridad. b. Ensayo de fotoconidiación en *T. atroviride* incubado en oscuridad a 28°C durante 96 h con 30 min de exposición total a luz ambiental. Primer anillo de conidiación (verde) corresponde a pulso de luz a las 48h de incubación. Barra de escala corresponde a 2 cm.

### 2.4. Conclusión

En este capítulo se presentó el desarrollo y manejo de *T. atroviride* bajo las mismas condiciones de cultivo y temperatura con distintos tiempos de incubación (24 h – 120 h) post inoculado. Además, confirmamos experimentalmente el correcto desarrollo del modelo biológico que fue validado con ensayos de crecimiento y fotoconidiación lo que, basado en estas observaciones, indica el crecimiento adecuado del hongo en las condiciones descritas.

Por otra parte, encontramos que tiempos de incubación de 24 h y 48 h no son óptimos debido al cúmulo de esporas transferido mediante la punción al medio, y la masificación del hongo, respectivamente. Basándonos en estas observaciones, nuestros experimentos para desarrollar las bioplantillas serán realizados a las 36 h de incubación a 28 °C en la oscuridad para evitar el surgimiento de conidiósporas.

## CAPÍTULO 3. FABRICACIÓN DE LA BIO - PLANTILLA

### 3.1. Motivación

Como ha sido discutido en el Capítulo 2, la ventana de oportunidad que nos propone *T. atroviride* en un tiempo de incubación de 36 h a 28 °C en la oscuridad condiciona la homogeneidad y manejo accesible de la muestra sin comprometer la arquitectura de ésta, por lo que necesitamos su implementación en una rutina para la manipulación *ex situ* del organismo. En este contexto, nosotros establecimos un procedimiento para producir y caracterizar la bioplantilla.

### 3.2. Métodos experimentales

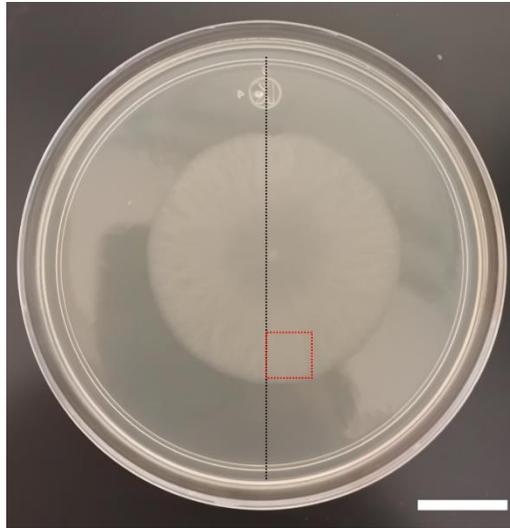
#### 3.2.1. Inoculado en papel celofán

Recortes circulares de papel celofán ( $\varnothing = 8$  cm) previamente lavados y esterilizados, fueron depositados en medio de cultivo PDA en condiciones asépticas. Con ayuda de pinzas de disección, las burbujas formadas entre el papel celofán y el medio PDA fueron removidas y se permitió la evaporación del agua excedente que acompañaba las láminas de celofán estériles. El inóculo de *Trichoderma atroviride* fue depositado en el centro del papel celofán siguiendo el protocolo de inoculación por punción, evitando la perforación de éste. El organismo fue incubado en oscuridad a 28°C durante 36h y removido del medio PDA para su manejo por separado.

#### 3.2.2. Fijación y deshidratación de ejemplares

El siguiente procedimiento es realizado bajo condiciones asépticas (**Apéndice A3**):

- I. Una vez que el celofán es removido del medio PDA, un área de 10 x 10 mm de micelio de 36 h de crecimiento (**Figura 7**), es recortada y fijada en 20 mL de PFA 4% durante 4 h. Lavados de PBS 1X (**Apéndice A2**) (3 x 15 min) son realizados en recipientes diferentes, y el papel celofán es desprendido de la película de micelio.



**Figura 7.** Crecimiento de *Trichoderma atroviride* sobre papel celofán. Perímetro punteado en rojo indica el área de recorte para remover la película de micelio tras ser lavada. Barra de escala corresponde a 2 cm.

- II. Lavados con series crecientes de alcohol etílico, fueron realizados para la deshidratación de las muestras:
  - Etanol 35%            1 x 15 min
  - Etanol 50%            1 x 15 min
  - Etanol 75%            1 x 15 min
  - Etanol 95%            2 x 15 min
  - Etanol 100%           2 x 15 min
- III. Finalmente, las muestras son sometidas a lavados de acetona (2 x 15 min) y transferidas a un portaobjetos y cubiertas con un cubreobjetos (**Figura 8**). Los ejemplares se dejaron secar toda la noche, sellados con barniz de uñas y fueron montados para su observación.



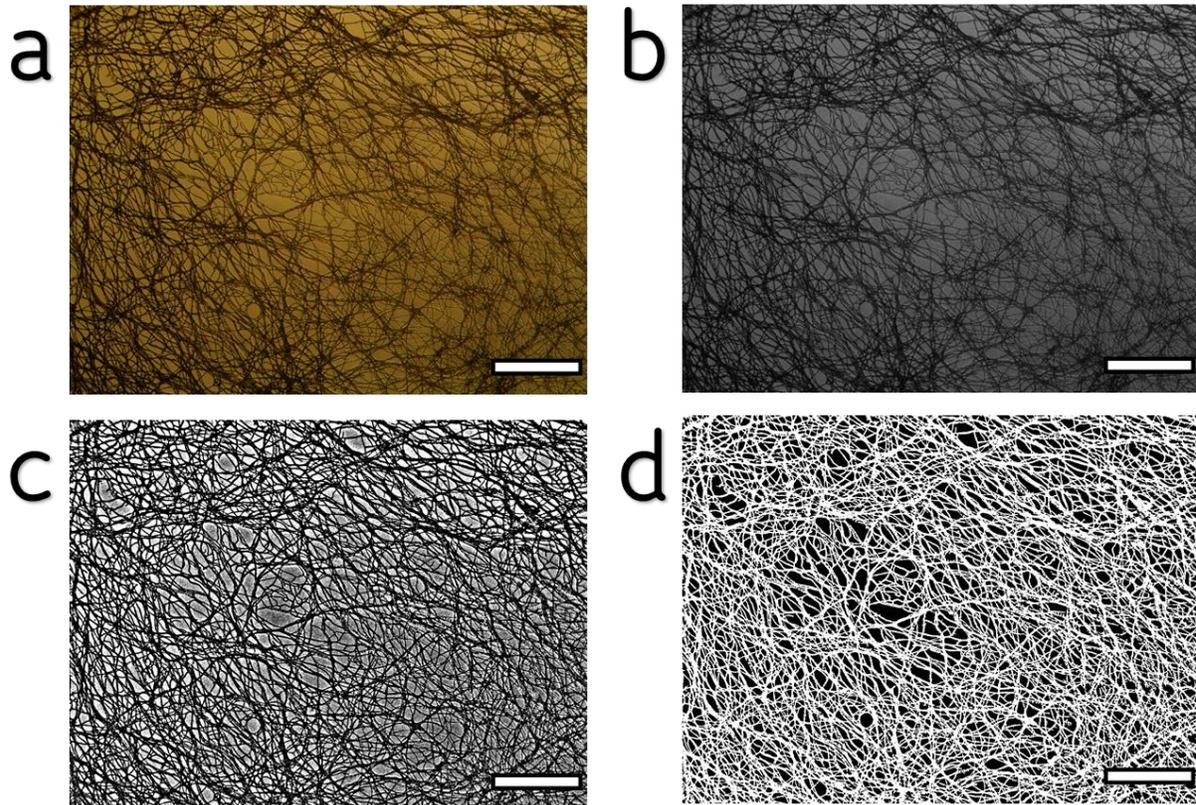
**Figura 8.** Bioplantilla sellada entre porta y cubreobjetos posterior a proceso de fijación y deshidratación. Barra de escala corresponde a 1 cm.

### 3.2.3. Recopilación y procesamiento de imágenes

Las imágenes fueron recolectadas con base al procedimiento descrito en la sección 2.2.3.

Con la finalidad de caracterizar los micelios se realizó un proceso de segmentación en las imágenes de las hifas observadas, efectuado a través de un procesamiento digital de las imágenes capturadas. Esto último fue realizado mediante el software *ImageJ*, cuyo tratamiento de las imágenes originales (**Figura 9a**) consistió en la conversión a formato de 8-bit (*Image > Type > 8-bit*), sin modificar la resolución de las figuras (**Figura 9b**). Posteriormente, se realizó un filtrado de estructuras grandes (corrección de sombreado) y estructuras pequeñas (suavizado) del tamaño de píxeles especificado (*Process > FFT > Bandpass Filter: Filter large structures down to: 35 pixels; Filter small structures up to: 1 pixels*) mediante el filtrado gaussiano en el espacio de Fourier (**Figura 9c**) para la obtención de una iluminación homogénea. Además, un ajuste de brillo y contraste (*Image > Adjust > Brightness & Contrast: 80 & 180*), así como una corrección gamma (*Process > Math > Gamma: 0.6*) fueron llevados a cabo. Por otra parte, la segmentación fue realizada para delimitar las áreas de los espacios intra – micelio (*Image > Adjust > Threshold: Auto*).

Finalmente, las hifas son refinadas a través del proceso de llenado de huecos automático (*Process > Binary > Fill holes*) (**Figura 9d**).

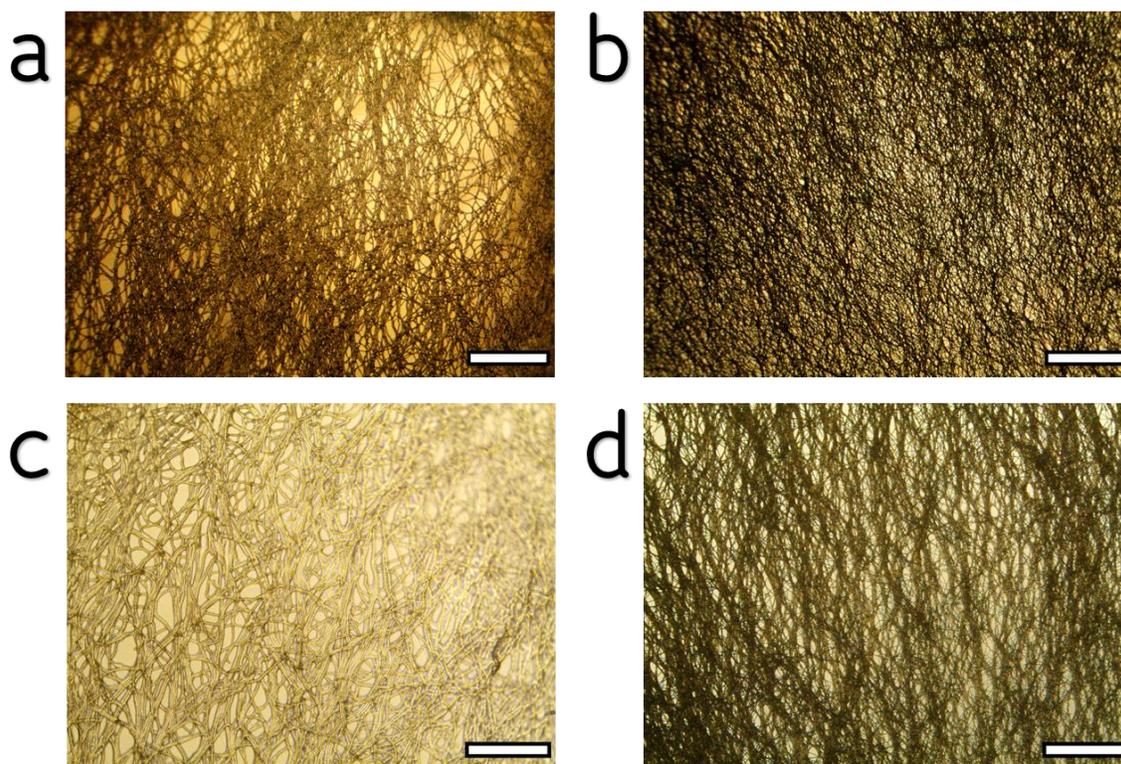


**Figura 9.** Procesamiento digital de microscopía óptica para la segmentación de espacios intra - micelio e hifas de *Trichoderma atroviride*. **a.** Microscopía óptica original de *Trichoderma atroviride*. **b.** Conversión de imagen a formato 8-bit. **c.** Procesamiento para uniformizar el fondo, ajuste de Brillo y Contraste y ajuste Gamma. **d.** Imagen final con hifas y espacios intra – micelios segmentados para su análisis. Barra de escala corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. Resultados y discusión

#### 3.3.1. Complejidad de red

La malla de hifas presentes en la bioplantilla generada es considerada como una red compleja. Esta característica es definida por el acumulado de múltiples elementos. En este caso, es relativo a la amplia cantidad y desarreglo de hifas presentes en la arquitectura del micelio de *T. atroviride* (**Figura 10 a-d**). Asimismo, se observó la conservación estructural de hifas tras ser sometidas al procedimiento de fijación (**Figura 10 b y d**), lo que mantiene la variable de aleatoriedad propia de este modelo biológico.

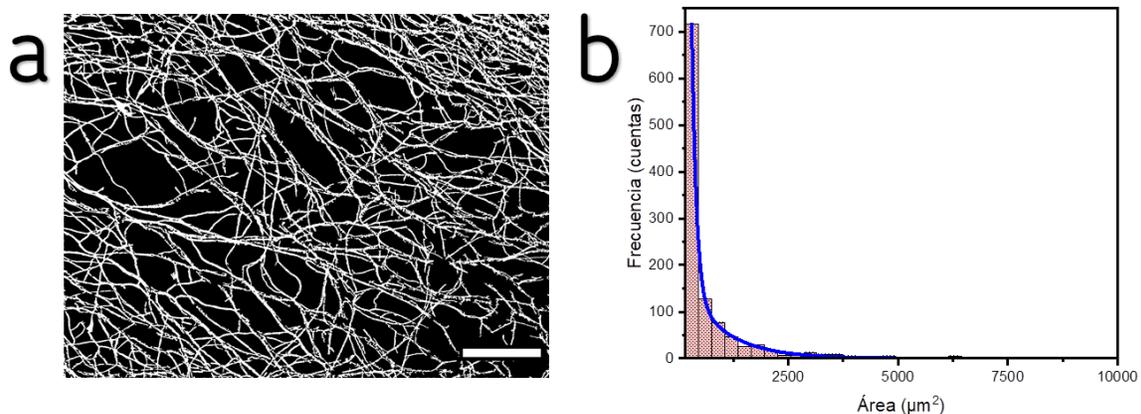


**Figura 10.** **a.** Microscopía óptica de *T. atroviride* con magnificación 4X previo a tratamiento de fijación. **b.** Película de micelio fijada con PFA 4% a una magnificación 4X. Barra de escala corresponde a 500  $\mu\text{m}$ . **c.** Microscopía óptica de *T. atroviride* con magnificación 10X previo a tratamiento de fijación. **d.** Película de micelio fijada con PFA 4% a una magnificación de 10X. Barra de escala corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2. Espacios intra – micelio

Posterior al procesamiento digital expuesto en **Capítulo 3.2.3**, la recolección de tamaños de áreas intra – micelio (IM) fue llevado a cabo (*Analyze > Analyze Particles > Size: 9  $\mu\text{m}^2$  - infinity*) mediante el programa referente. El valor de 9  $\mu\text{m}^2$  fue establecido con base a la distancia mínima que el objetivo 10X puede resolver, por lo que los valores menores a este no son de confianza y por lo tanto son descartados para todas las imágenes. La distribución de los espaciamentos se clasificó dentro de las tres regiones de densidad diferentes a simple vista: baja, intermedio y alta.

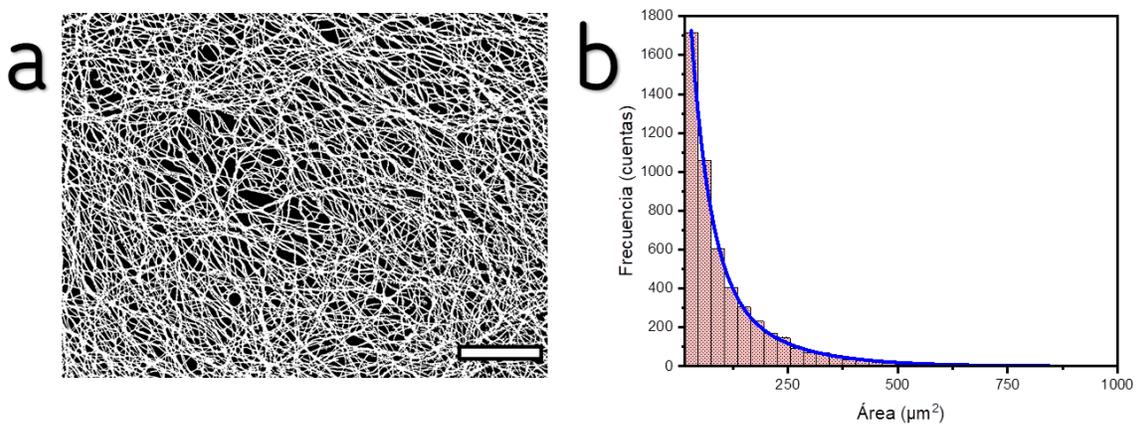
Las regiones de baja densidad de hifas son observadas en la **Figura 11 a**, sin embargo, carece de uniformidad en tamaños. Por otra parte, llevamos a cabo un ajuste exponencial a la distribución de áreas de espacios IM (**Figura 11 b**). Lo último nos permite determinar que el valor de las áreas promedio corresponde a  $894 \pm 31 \mu\text{m}^2$ . Estos valores son considerados representativos para estas regiones. Cabe mencionar que se trata de un ajuste exponencial doble y el promedio considerado fue el más próximo al promedio aritmético del total de áreas para esta región (**Apéndice A4**).



**Figura 11. a.** Imagen de microscopía óptica (magnificación 10X) procesada digitalmente de región con espacios intra - micelio con baja densidad de hifas. Las ramificaciones blancas representan hifas de *T. atroviride* y regiones oscuras representan el fondo. Barra de escala corresponde a 200  $\mu\text{m}$ . **b.**

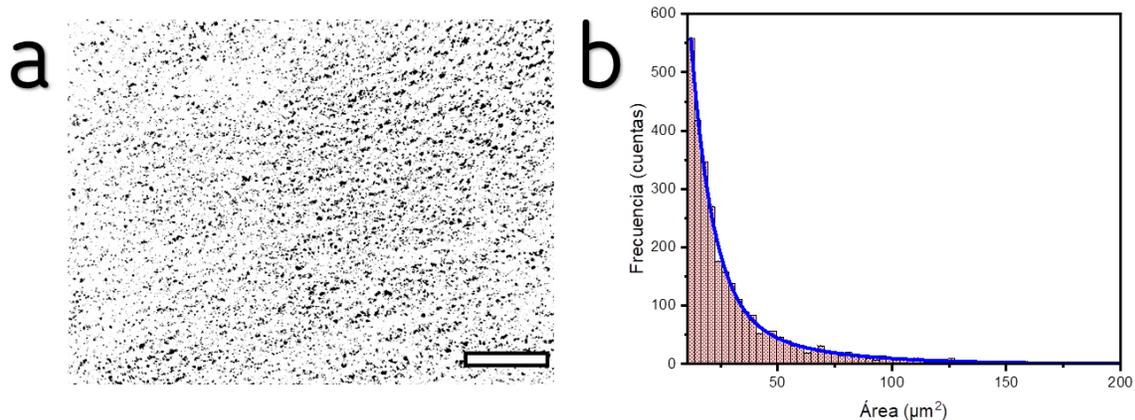
Histograma de frecuencias en áreas en la región de baja densidad. Barras corresponden a intervalos de  $300 \mu\text{m}^2$  y línea azul representa un ajuste exponencial.

De manera similar a la región descrita anteriormente, la intermedia densidad de hifas (**Figura 12 a**) tiene áreas promedio de  $145 \pm 8 \mu\text{m}^2$  obtenidas a través del ajuste exponencial a su distribución (**Figura 12 b**). Asimismo, consideramos el valor reportado como representativo para esta región, ya que es el más próximo al promedio aritmético para las áreas de esta densidad de hifas (**Apéndice A4**).



**Figura 12. a.** Imagen de microscopía óptica (magnificación 10X) procesada digitalmente de región con espacios intra - micelio con intermedia densidad de hifas. Las ramificaciones blancas representan hifas de *T. atroviride* y regiones oscuras representan el fondo. Barra de escala corresponde a  $200 \mu\text{m}$ . **b.** Histograma de frecuencias en áreas en la región de intermedia densidad. Barras corresponden a intervalos de  $30 \mu\text{m}^2$  y línea azul representa un ajuste exponencial.

Finalmente, regiones con mayor densidad de hifas son presentadas en la **Figura 13 a**. Las áreas promedio de estas regiones son representadas por valores de  $38 \pm 4 \mu\text{m}^2$  obtenidas mediante el ajuste exponencial (**Figura 13 b**) y son considerados como los valores representativos de esta sección. Además, a diferencia de las regiones de baja e intermedia densidad de hifas, la distribución de las ramificaciones, y por tanto sus espaciamentos IM, es mayormente uniforme.



**Figura 13. a.** Imagen de microscopía óptica (magnificación 10X) procesada digitalmente de región con espacios intra - micelio con alta densidad de hifas. Las ramificaciones blancas representan hifas de *T. atroviride* y regiones oscuras representan el fondo. Barra de escala corresponde a 200 μm. **b.** Histograma de frecuencias en áreas en la región de alta densidad. Barras corresponden a intervalos de 3 μm<sup>2</sup> y línea azul representa un ajuste exponencial.

Sistemáticamente, se resumen las áreas representativas de cada región de distinta densidad en la **Tabla 4**.

<b>Tabla 4. Estadística de áreas de espacios intra - micelio</b>		
<b>Densidad de micelio</b>	<b>Promedio de área (μm<sup>2</sup>)</b>	<b>Error</b>
Baja	894	31
Intermedia	145	8
Alta	38	4

### 3.4. Conclusión

Una bioplantilla, basada en estructuras de *T. atroviride* fue generada a través de un proceso de fijación preservando la integridad estructural del modelo biológico. Además, la complejidad de la bioplantilla se justifica con la cantidad y ramificación aleatoria de hifas que la constituyen. Por otra parte, tres regiones de densidad particulares son reconocidas y medidas sistemáticamente: baja, intermedia y alta

densidad, cuyas áreas promedio de espacios intra - micelio son representados por  $894 \pm 31 \mu\text{m}^2$ ,  $145 \pm 8 \mu\text{m}^2$  y  $38 \pm 4 \mu\text{m}^2$  respectivamente.

Adicionalmente, observamos que las menores densidades de hifas son generadas por espaciamentos entre el medio de cultivo y papel celofán. sin embargo, es posible mejorar la homogeneidad bidimensional de hifas a través de la eliminación de volúmenes de aire entre los elementos mencionados.

## CAPÍTULO 4. PROPIEDADES DE TRANSMISIÓN ÓPTICA DE LA BIOPLANTILLA

### 4.1. Motivación

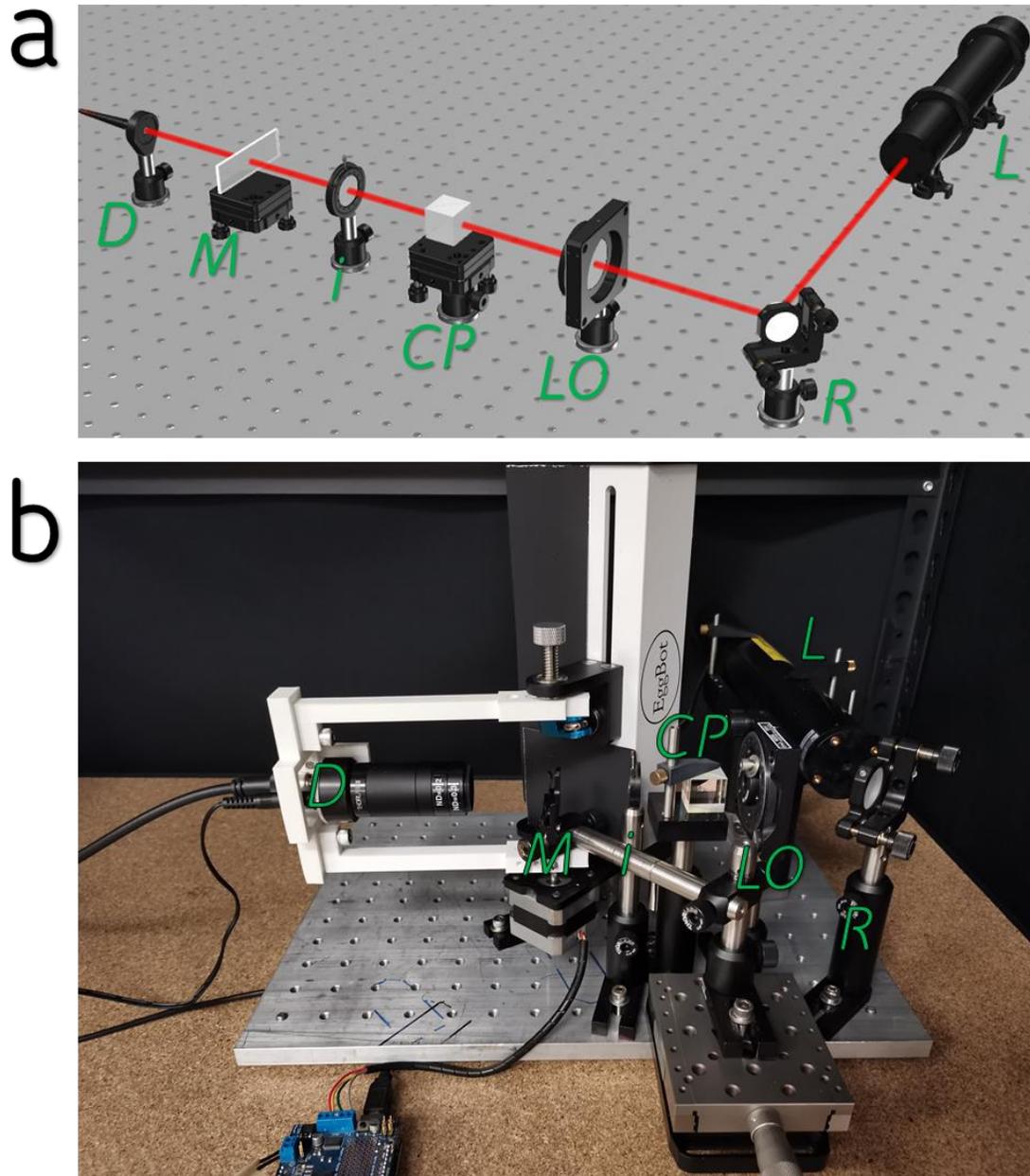
El estudio de las propiedades ópticas de distintos esquemas de diseños ópticos mejorados en relación, no solo a CS, es esencial, así como la comparativa entre ellos. En este contexto, el análisis de la interacción entre la luz y la bioplantilla que fabricamos en Capítulo 3 permite caracterizar ópticamente nuestra arquitectura. Sin embargo, en nuestro laboratorio no contamos actualmente con un equipo comercial que permita realizar dicho estudio, por lo que es necesario diseñar, construir y probar un sistema de medición de intensidad luminosa como función del ángulo de esparcimiento.

### 4.2. Métodos experimentales

#### 4.2.1. Configuración de mesa óptica

##### 4.2.1.1. Sistema de iluminación

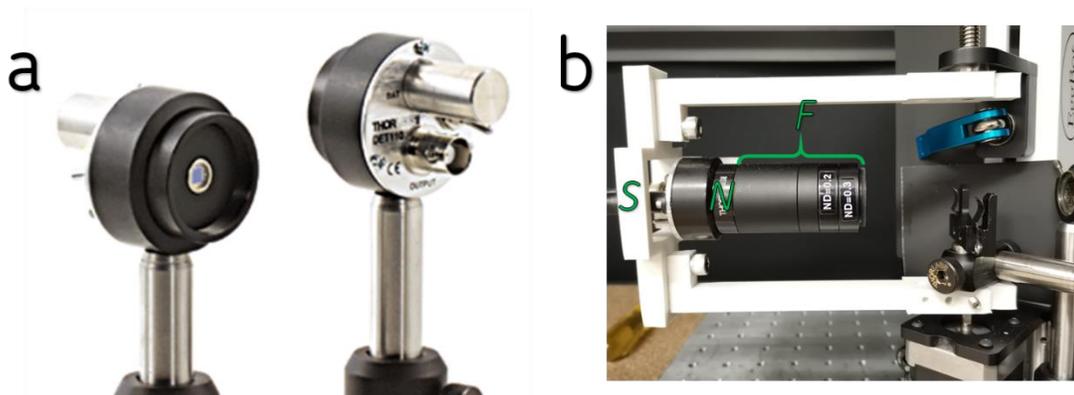
Las películas de micelio son sometidas a condiciones de iluminación mediante un láser de He – Ne ( $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ ) de perfil gaussiano *Thorlabs HNL150RB* montado en una mesa óptica (**Figura 14 a-b**). Esta iluminación fue utilizada por conveniencia y, además, debido a que su longitud de onda se encuentre en el rango del espectro visible, lo que facilita su alineación. Por otra parte, las condiciones de iluminación ambiental son reducidas para evitar artefactos no deseados. Una pantalla de proyección fue instalada a 40 cm de la interacción láser – muestra.



**Figura 14.** Mesa óptica con láser He - Ne montado para la medición de la intensidad como función de ángulo de proyección **a.** Representación esquemática de la mesa óptica, donde **L:** Láser He – Ne. **R:** Reflector. **LO:** Lámina de onda. **CP:** cubo polarizador. **i:** iris. **M:** muestra y, por debajo, motor NEMA-17. **D:** Foto detector montado en soporte. **b.** Vista frontal de mesa óptica. Dirección de giro en sentido horario.

#### 4.2.1.2. Medición de intensidad luminosa

Las mediciones de intensidad como función del ángulo de proyección en el eje horizontal de las muestras, fueron realizadas con un Fotodetector (PD) de Silicio *Thorlabs DET110* (**Figura 15a**) con un filtro de interferencia que solo permite el paso de longitudes de onda alrededor de  $633 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ . Adicionalmente, se colocaron dos filtros de densidad óptica neutra para atenuar la intensidad luminosa. Este componente fue montado sobre un motor a pasos *NEMA-17* con resolución angular de 200 pasos por revolución y un eje independiente, mediante un soporte impreso en 3D elaborado de ácido poli láctico (PLA) desarrollado en el software *SolidWorks* (**Apéndice A5**). Las lecturas de voltaje fueron adquiridas mediante un multímetro y procesadas mediante un software de análisis de datos y gráficos (*Origin* versión 2018). Vale la pena resaltar que, las mediciones por encima de 9 V saturan el detector utilizado, por lo que dichas lecturas son omitidas de nuestros análisis.



**Figura 15.** Sistema de foto detección del láser a través de películas de micelio. **a.** Fotodetector *Thorlabs DET110* **b.** Fotodetector para la medición del láser a través de las películas de micelio. **F:** Filtros de interferencia ( $633 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ ). **N:** Filtro de densidad óptica neutra. **S:** Soporte impreso en 3D elaborado de PLA.

El motor a pasos fue dirigido a través del controlador *Adfruit Motor Shield V2* para una placa *Shield*, conectado a una placa *Arduino UNO SMD* (**Apéndice A7**). El dispositivo fue conectado a una computadora mediante puertos USB permitiendo a un programa (**Figura 16**), desarrollado en *LabView*, controlar el motor a pasos. El

desplazamiento de pasos utilizado fue 115 equivalente a  $207^\circ$ , de los cuales: 15 corresponden a mediciones anteriores a la muestra (luz esparcida en reflexión) y 100 a la proyección posterior a la muestra (luz esparcida en transmisión).

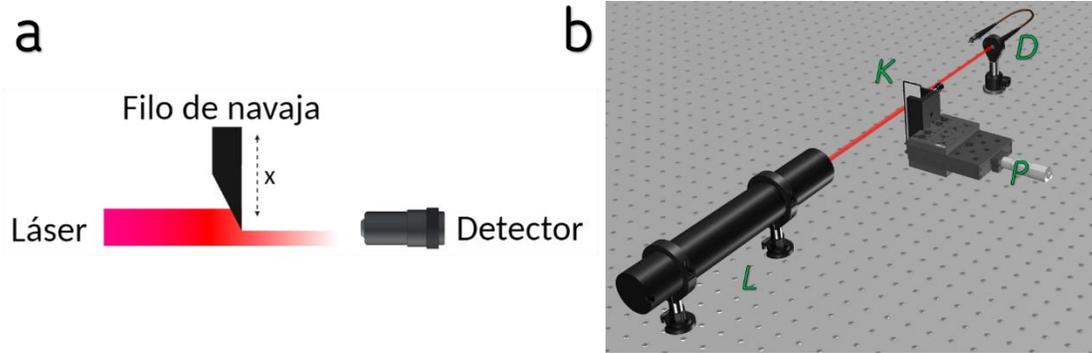


**Figura 16.** Software para el control del motor a pasos NEMA 17 programado a través de *LabVIEW*.

#### 4.2.1.3. Perfil de irradiancia láser

La perfilación del Láser He – Ne fue realizada a través del Método *Knife Edge* (**Figura 17a**).

Una navaja fue montada en un soporte sobre una platina de desplazamiento lineal *Newport UMR8.25* (**Figura 17b**). Se aseguró que el filo de la navaja bloqueara el láser por completo y desplazamientos de  $50 \mu\text{m}$  fueron llevados a cabo en la dirección X. Las lecturas fueron registradas por el fotodetector (*Thorlabs DET110*) y analizadas a través de *Origin 2018*.

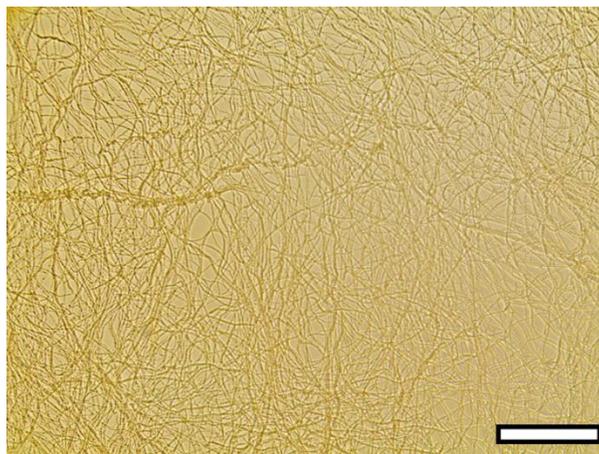


**Figura 17.** a. Principio básico del método Knife Edge. b. Representación esquemática de la configuración para el método Knife Edge, donde: **L**: Láser. **P**: Platina de desplazamiento Newport UMR8.25. **K**: Navaja. **D**: Detector.

### 4.3. Resultados y discusión

#### 4.3.1. Índice refracción

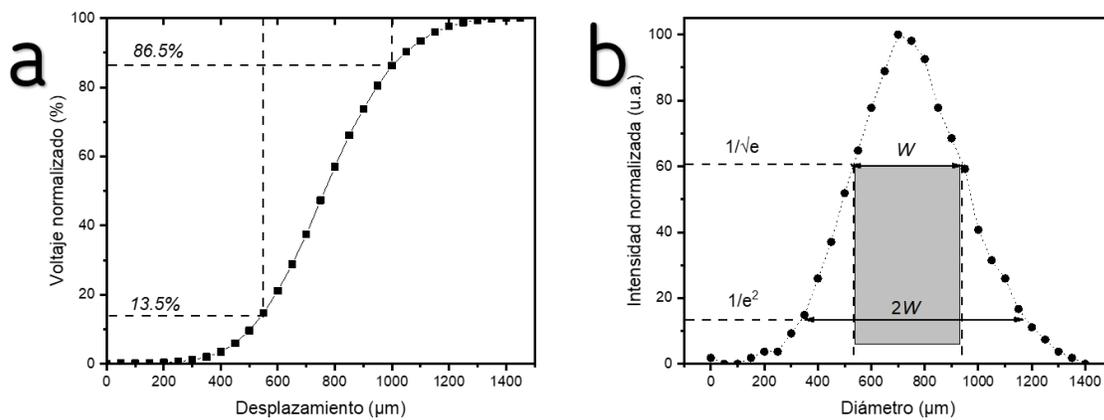
Finalizado el tratamiento de fijación y deshidratación, llevamos a cabo una primera caracterización de la bioplantilla fabricada a través de microscopía óptica. En la **Figura 18** se observan las hifas inmersas en acetona, último medio al que fue sometida la bioplantilla, y exhiben un bajo contraste con respecto a este medio. Esta observación sugiere que el índice de refracción de las hifas es similar al de la acetona, es decir, 1.3.



**Figura 18.** Microscopía óptica (magnificación 10X) de *Trichoderma atroviride* en solución con acetona durante proceso de deshidratación. Barra de escala corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2. Diámetro de láser He – Ne

La interacción entre la luz y la bioplantilla ocupó un lugar importante en el estudio de esta, por ello, conocer el área de interacción entre ambos sustenta la medición del diámetro del láser que utilizamos. Los resultados del análisis de los datos experimentales para el láser He – Ne son presentados en **Figura 19 a**. A través de las mediciones realizadas, una curva con función sigmoïdal es obtenida. Dos casos son observados: el primero, cuando la intensidad tiene un valor mínimo, es decir, la navaja cubre por completo la irradiancia del láser. Un segundo caso aparece cuando el láser no es cubierto, y éste alcanza su valor máximo.

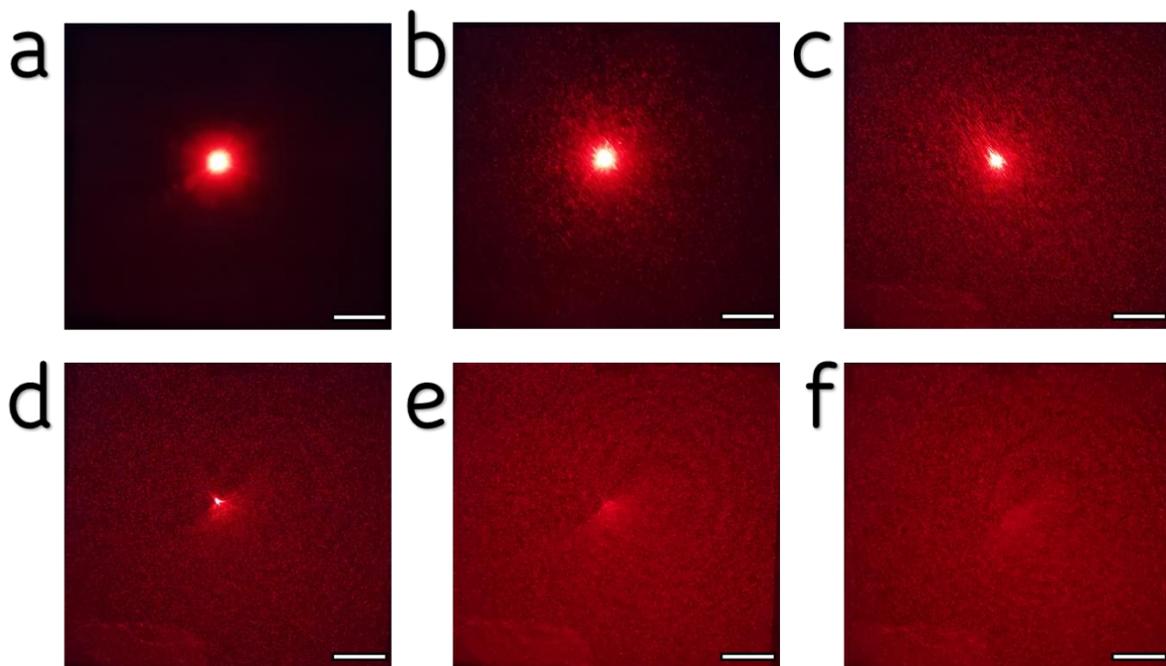


**Figura 19. a.** Señales medidas a través del método Knife Edge. **b.** Perfilación de la mancha del láser.

Con base a los 30 puntos experimentales recolectados, la sección media  $\omega$  puede ser determinada a 418.1 μm. Con respecto a los puntos  $\frac{1}{e^2}$  (**Figura 19 b**) de la curva Gaussiana, el diámetro es determinado a 836.2 μm cuya área corresponde a 0.54 μm<sup>2</sup>.

### 4.3.3. Patrón de moteado

Conocer la influencia que la bioplantilla genera sobre una fuente de luz coherente, nos brinda información cualitativa de la complejidad de nuestro esquema. Para ello, planteamos la observación del comportamiento del láser He – Ne en cinco áreas distintas de la bioplantilla, separadas 500  $\mu\text{m}$  una de la otra (**Figura 20 a-f**). A través de la introducción del láser a la estructura mencionada, el área de interacción proyecta una mayor dispersión del láser cuando alcanza regiones de mayor densidad de hifas, con respecto a regiones libres de las estructuras fúngicas.

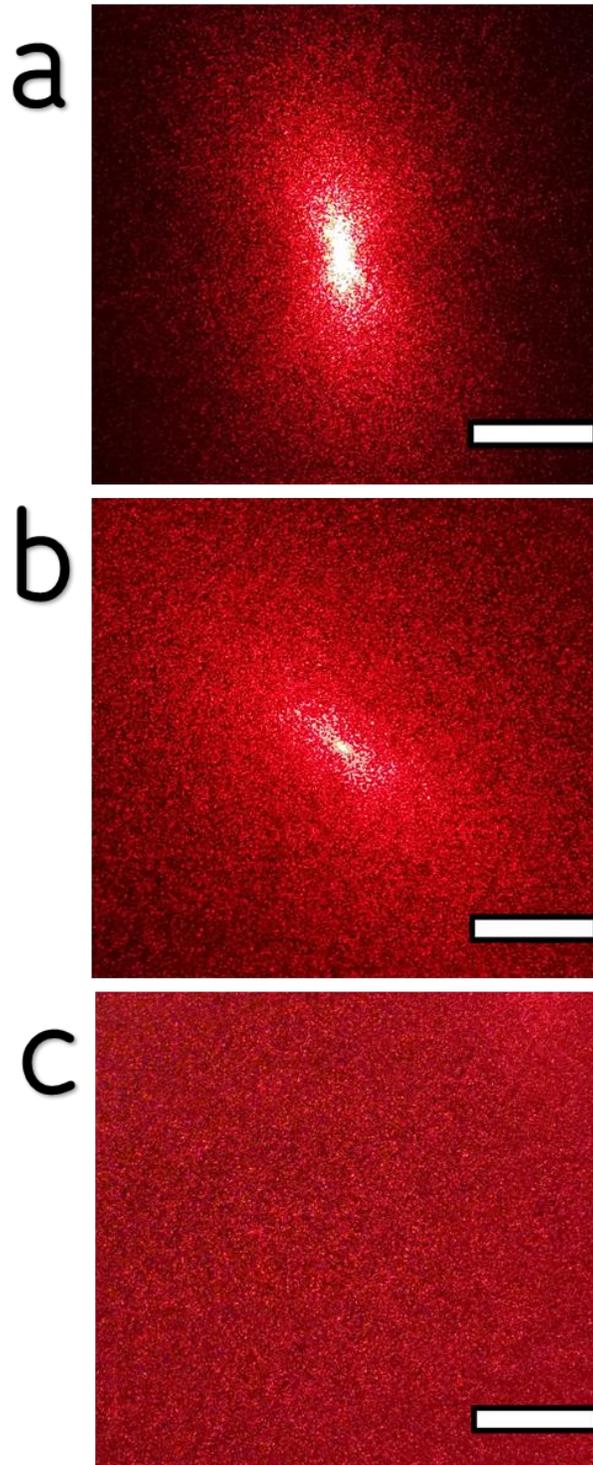


**Figura 20.** Desplazamiento de láser a través de la bioplantilla sobre pantalla de proyección a 0.4 m distante de la muestra. **a.** Patrón control generado por láser He - Ne (632.8 nm). Patrón de moteado generado con bioplantilla por desplazamiento lineal de 500  $\mu\text{m}$  (**b**), 1000  $\mu\text{m}$  (**c**), 1500  $\mu\text{m}$  (**d**), 2000  $\mu\text{m}$  (**e**), 3000  $\mu\text{m}$  (**f**) respecto al láser. Barra de escala corresponde a 10 cm.

Cuando áreas de 0.54 mm<sup>2</sup> de películas de micelio (**Apéndice A7**) interactúan con el láser He – Ne, patrones de moteado<sup>12</sup> característico son distinguibles en una pantalla de proyección (**Figura 21 a – c**). Por efecto de interferencia, puntos brillantes y oscuros son provocados. Estos últimos son generados por la interferencia destructiva, donde las ondas del láser incidentes se encuentran desplazadas una con respecto a otra, debido a la diferencia en tamaño y forma de los espacios intra – micelio, actuando como una rendija. En contraste, cada punto brillante es resultante de la interferencia constructiva del láser que atraviesa la película de micelio, donde las ondas se encuentran en fase y las amplitudes de estas son sumadas. En general, la distribución de la intensidad luminosa depende de parámetros como el diámetro del láser, longitud de onda ( $\lambda$ ), índice refracción de las hifas ( $n$ ) y el grosor de las hifas en la película de micelio.

---

<sup>12</sup> **Patrón de moteado:** Motivo resultante de la interferencia de ondas de la misma frecuencia, que tienen diferente fase y amplitud. Su intensidad varía aleatoriamente, dependiendo de la suma de amplitudes de las ondas.



**Figura 21.** Patrones de moteado generados por láser He – Ne ( $\lambda = 632.8$  nm) sobre pantalla de proyección a 0.4 m distante de las muestras. Patrón de moteado generado por regiones con espacios intra – micelios con área promedio de  $894 \pm 31 \mu\text{m}^2$  (a).  $145 \pm 8 \mu\text{m}^2$  (b) y  $38 \pm 4 \mu\text{m}^2$  (c). Barra de escala corresponde a 5 cm.

Muestras con la menor densidad proyectan patrones con un punto o mancha central alargado a los extremos de la pantalla de proyección (**Figura 21 c**). En contraste, y siguiendo la conducta descrita anteriormente, ejemplares con la mayor densidad de hifas componen un patrón de moteado con una iluminación mayormente homogénea (**Figura 21 c**). Por otra parte, una intermedia densidad también fue observada en distintas muestras y su patrón característico (**Figura 21 b**) es un comportamiento semejante a una baja densidad de hifas, sin embargo, la mancha central es considerablemente menor debido a efectos de interferencia de IM menores.

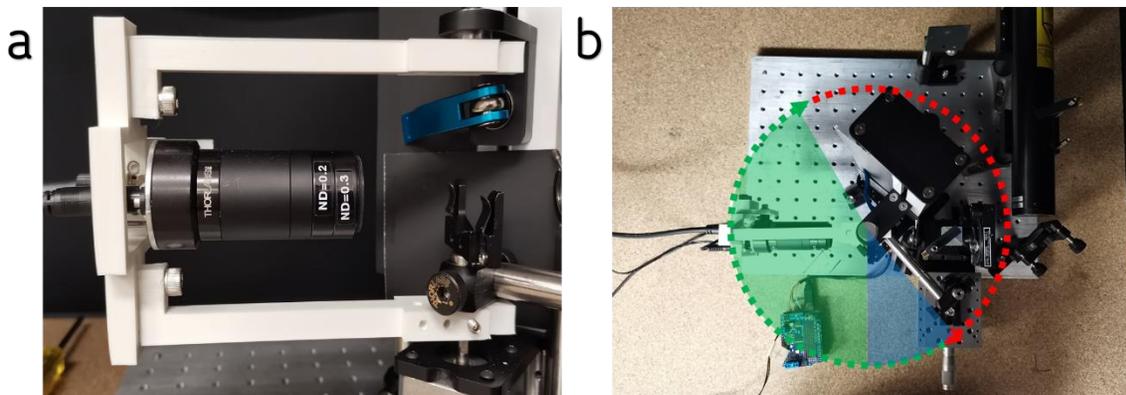
Asimismo, la dirección de crecimiento radial de las hifas genera patrones de moteado diferentes a simple vista. El alargamiento y tamaño de los patrones proyectados, observados en **Figura 21**, son registrados cuando la muestra es desplazada horizontalmente, por lo que este factor sugiere que la película de micelio es heterogénea en diferentes puntos donde interactúa con el láser y provoca patrones anisotrópicos.

Equivalentemente, la densidad del micelio que define los IM juega un rol de importancia y una conducta es observada: cuanta mayor densidad de hifas, menor IM y, por tanto, un patrón mayormente homogéneo es generado.

A partir de la naturaleza de las interacciones observadas, los patrones de transmisión son caracterizados mediante los arreglos descritos que generan, intensidad luminosa y comparativa de estos con sistemas semejantes. Aunado a la intensidad luminosa, es importante conocer su distribución con respecto a los ángulos de proyección, al interior de los patrones. Para ello, se construyó un detector ya que en el laboratorio no se cuenta con un equipo comercial para este estudio.

#### 4.3.4. Diseño y fabricación del detector

Para el detector *Thorlabs DET110* utilizado, fueron requeridas piezas para su soporte y desplazamiento alrededor de nuestra bioplantilla. Las piezas impresas en 3D proporcionan un soporte rígido para el fotodetector (**Figura 22 a**), lo que permite una medición estable una vez que el motor realiza el avance definido en el software controlador. Sin embargo, el rango de rotación del detector limita la recolección de voltajes más allá de 115 pasos (**Figura 22 b**). Pese a esta restricción, los componentes de transmitancia generados pueden ser cuantificados en su mayoría (84%) para su posterior análisis. En contraste, los constituyentes de reflectancia observados cuando la muestra se encuentra perpendicular a la normal del láser, está restringido a 15 pasos, no obstante, la tendencia de su comportamiento no debe ser despreciada. En este contexto, la definición de ángulos positivos, es decir de transmitancia, son observados en el área sombreada en verde de **Figura 22 b**. Asimismo, los ángulos negativos se muestran en el área sombreada azul de la misma figura.



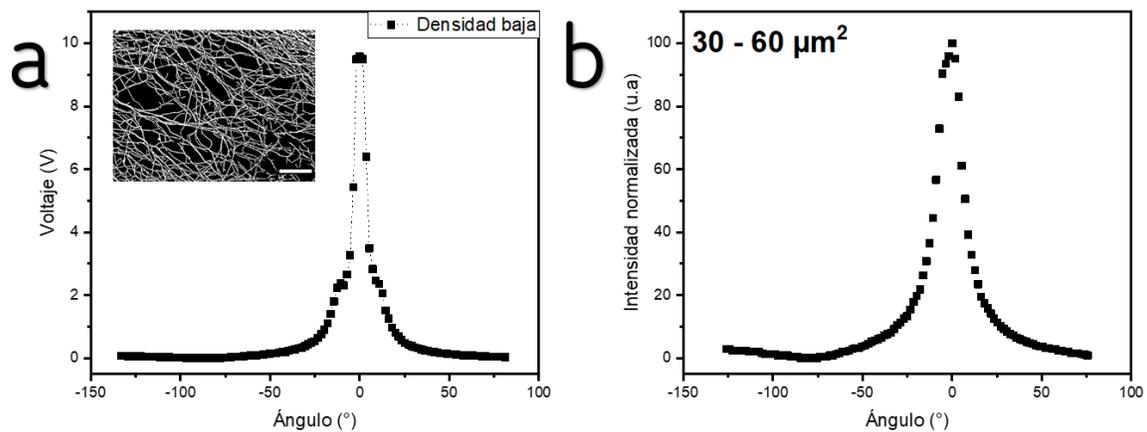
**Figura 22. a.** Vista frontal de soporte desarrollado en SolidWorks e impreso con filamento PLA para la montura y rotación de foto detector. **b.** Vista superior de configuración de mesa óptica. Línea verde punteada representa el rango de rotación que desempeña el motor. Línea roja punteada representa el rango de rotación limitado debido a los postes de montura. Áreas verde y azul corresponden a ángulos positivos y negativos, respectivamente.

Una vez que el sistema de detección fue montado, es posible caracterizar la distribución de intensidad como función del ángulo de proyección, lo que representa un aspecto fundamental para nuestro esquema óptico fabricado.

#### **4.3.5. Curvas de intensidad en función del ángulo**

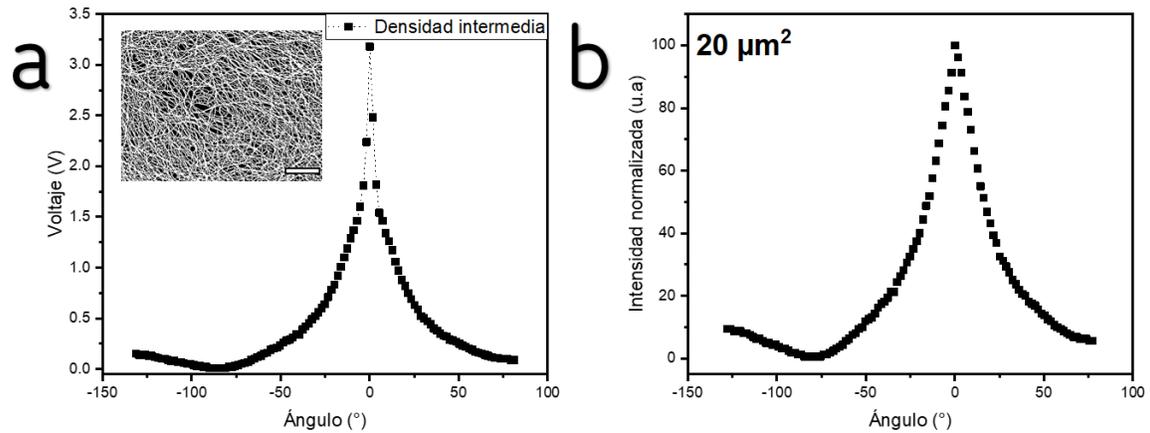
Mediciones de voltaje como función del ángulo de proyección del láser a través de las muestras, fueron medidos en el eje horizontal. Los resultados son presentados en esta sección.

Se estudió el comportamiento de la intensidad luminosa generada en tres tipos de muestras distintas, diferenciándolas desde baja densidad hasta una alta densidad, pasando por una intermedia. En la **Figura 23 a** se observa el comportamiento del voltaje a través de una baja densidad espacial de hifas, cuyo pico máximo corresponde al punto central más brillante en la pantalla de proyección (**Figura 22 a**) que no sufre desviación, es decir, el orden 0 de difracción. El láser es transmitido en su mayoría por la muestra, no observándose componentes de reflexión anterior a la posición de la muestra (región correspondiente de  $-129.6^\circ$  a  $-90^\circ$ ). Una vez que el detector se encuentra perpendicular la muestra, las mediciones de transmisión son consideradas, sin embargo, es descartable su comportamiento hasta alcanzar un desplazamiento angular de  $-25^\circ$ , donde tiene lugar la detección del incremento de intensidad. Asimismo, la **Figura 23 b** muestra la intensidad luminosa normalizada del comportamiento descrito; es decir, solamente es exhibido el comportamiento de esparcimiento de luz asociado a esta región de hifas. Este procedimiento fue realizado para encontrar el ancho asociado a la distribución luminosa de la región de las tres densidades definidas.



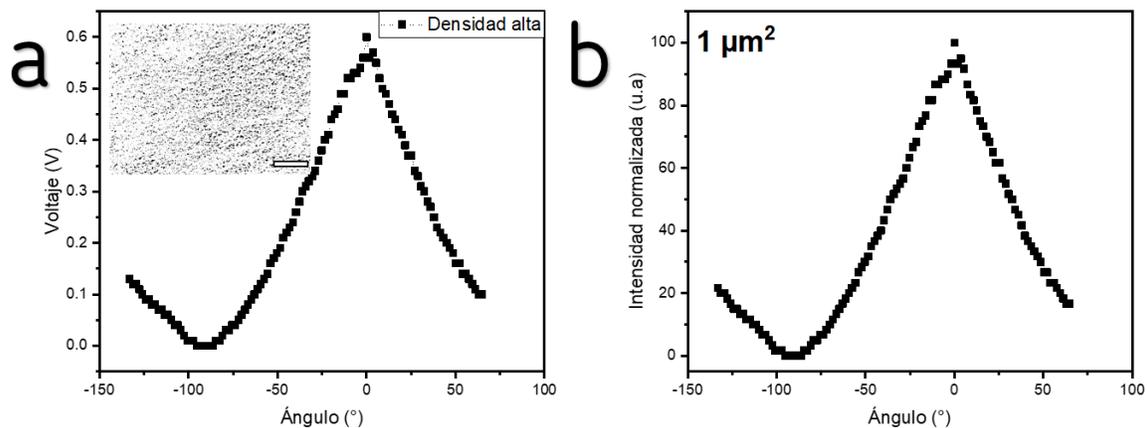
**Figura 23. a.** Voltaje como función del ángulo de proyección medido con un fotodetector en eje horizontal de muestras con baja densidad de hifas. En microscopía óptica, los espacios intra - micelio corresponden a  $894 \pm 31 \mu\text{m}^2$  en área. Barra de escala corresponde a  $200 \mu\text{m}$ . **b.** Valores de la gráfica (a) de intensidad luminosa normalizada con región restringida hasta 2.5 V.

Por otra parte, en una intermedia densidad, es visible un componente de reflexión de la luz incidente en los pasos angulares anteriores a la muestra (**Figura 24 a**), correspondientes de  $-129.6^\circ$  a  $-90^\circ$ . Además, un ensanchamiento del perfil gaussiano del láser es notable en las regiones angulares de transmisión. Las mediciones de voltaje, con respecto a una baja densidad de hifas fue reducida considerablemente, sin embargo, un pico máximo es remarcable en la región angular paralela a la dirección original del láser. Por otra parte, la **Figura 24 b** muestra la intensidad luminosa normalizada del esparcimiento del láser asociado a esta región de hifas.



**Figura 24. a.** Voltaje como función del ángulo de proyección medido con un fotodetector en eje horizontal de muestras con intermedia densidad de hifas. En microscopía óptica, los espacios intra-micelio corresponden a  $145 \pm 8 \mu\text{m}^2$  en área. Barra de escala corresponde a  $200 \mu\text{m}$ . **b.** Valores de la gráfica (a) de intensidad luminosa normalizada con región restringida hasta 1.6 V

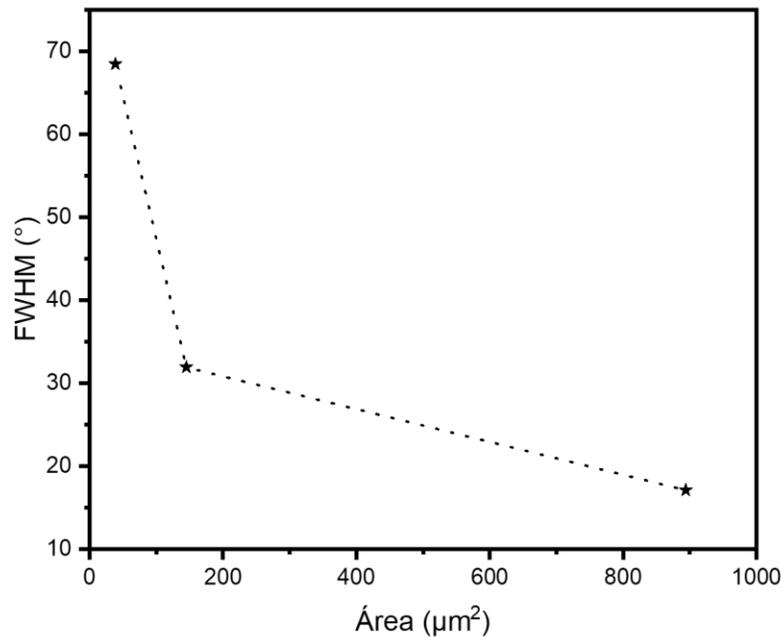
Las mediciones realizadas en muestras de alta densidad de hifas, exhiben un comportamiento de voltaje menor con respecto a sus dos contrapartes que incluye, semejante a una intermedia densidad, disminución de voltaje máximo detectado transmitido sobre los IM, ampliación del perfil gaussiano del láser utilizado y una componente de reflexión extendido en el desplazamiento angular de  $-90^\circ$  (**Figura 25**).



**Figura 25. a.** Voltaje como función del ángulo de proyección medido con un fotodetector en el eje horizontal de las muestras con alta densidad de hifas. En microscopía óptica, el espacio intra – micelio corresponde a  $38 \pm 4 \mu\text{m}^2$  en área. Barra de escala corresponde a  $200 \mu\text{m}$ . **b.** Valores de la gráfica (a) de intensidad luminosa normalizada con región restringida hasta 0.6 V

Sistemáticamente, la anchura a media altura (FWHM) de la intensidad luminosa, que generan las tres regiones de distinta densidad, se muestra en **Figura 26**. La estimación de estos valores corresponde a  $17^\circ$ ,  $32^\circ$  y  $68^\circ$  para regiones de baja, intermedia y alta densidad, respectivamente. Este procedimiento fue evaluado manualmente al trazar la media altura con respecto al mayor valor de la intensidad luminosa normalizada de cada región. Cabe mencionar que el comportamiento considerado solamente corresponde al componente de transmitancia y a los valores

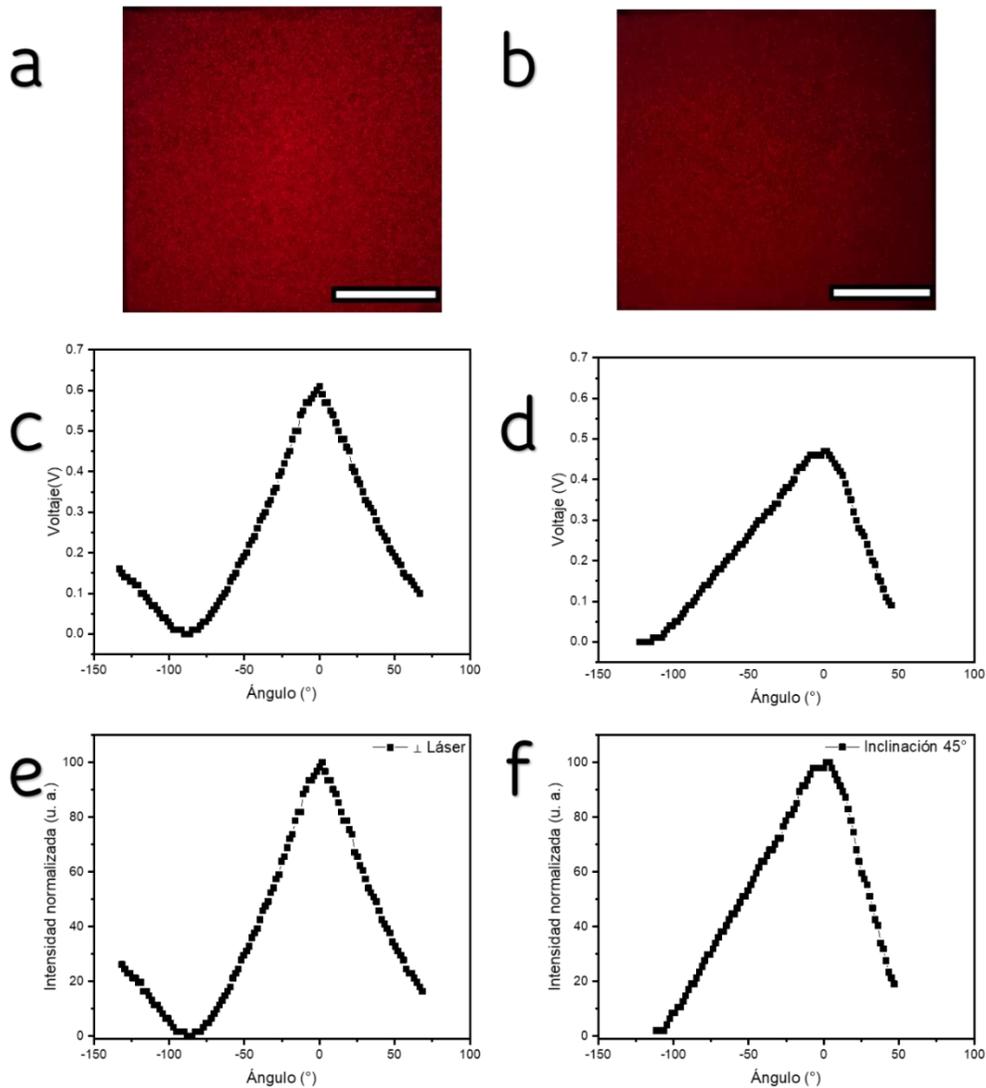
menores de 2.5 V, 1.6 V y 0.6 V para las regiones de baja, intermedia y alta densidad respectivamente.



**Figura 26.** Evaluación manual de anchura a media altura de curvas de intensidad normalizada de 3 regiones de diferente densidad. FWHM estimados a 17°, 32° y 68° para regiones de baja, intermedia y alta densidad, respectivamente.

Adicionalmente, mediciones con variación de 45° en el ángulo incidente del haz láser He – Ne sobre la muestra (en un mismo punto) fueron realizadas. Un comportamiento simétrico de intensidad en función del ángulo en las regiones tanto de reflexión como de transmisión es observado mientras el láser atraviesa regiones de alta densidad de hifas perpendiculares a éste (**Figura 27 c**). En contraste, en **Figura 27 d** es observado que el componente de transmisión es influenciado, provocando un desbalance en este segmento, sugiriendo un comportamiento similar en el componente de reflexión, no medido debido a la obstrucción del detector y el porta muestras. Asimismo, la detección de transmisión de luz, previa a los -90°, es distinguida. Además, una reducción en el voltaje detectado es notable durante esta

inclinación (**Figura 27 e**), cayendo en un 23% con respecto a la muestra perpendicular a la muestra perpendicular al láser (**Figura 27 f**). Este comportamiento apoya la idea de que las hifas actúan como una rendija al interactuar con una fuente de luz coherente, exhibiendo una mayor dispersión, y por tanto una menor detección en la normal al láser cuando la distancia (aparente) entre hifas es reducida (inclinación a 45°).



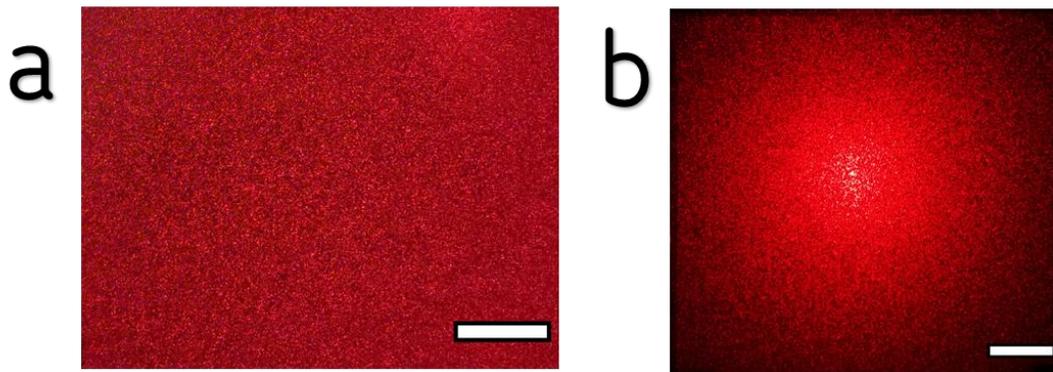
**Figura 27.** **a.** Patrón de moteado generado por muestra con alta densidad de hifas, perpendicular al láser. **b.** Patrón de moteado generado por muestra con alta densidad de hifas, con inclinación a 45° con respecto a la normal del láser. Barra de escala corresponde a 5 cm. Voltaje como función del ángulo de proyección de muestra con alta densidad de hifas perpendicular al láser (**c**), con inclinación

de 45° (d). e. Intensidad luminosa normalizada de la gráfica (c). f. Intensidad luminosa normalizada de la gráfica (d).

#### 4.3.6. Comparativas

Las características ópticas de transmisión que genera la biopantilla desarrollada, permite compararla con dos esquemas ópticos: difusores ópticos<sup>13</sup> y superficies Lambertianas<sup>14</sup>.

Los primeros, son componentes que generan una distribución uniforme de una fuente de luz coherente y, por tanto, pierde la característica forma de haz eliminando el punto brillante central (**Figura 28 b**). Este comportamiento es debido a la rugosidad de las superficies involucradas como resultado de un tratamiento de esmerilado. De esta forma, al comparar nuestro esquema de alta densidad hifal con un control (difusor óptico comercial *Thorlabs DG05-1500*), cumple con la característica fundamental de dispersión del haz incidente en el componente de transmitancia. Sin embargo, cuando el láser es transmitido a través de nuestra película de micelio, es observada una mayor uniformidad en la pantalla de proyección con respecto al difusor óptico (**Figura 28 a**).



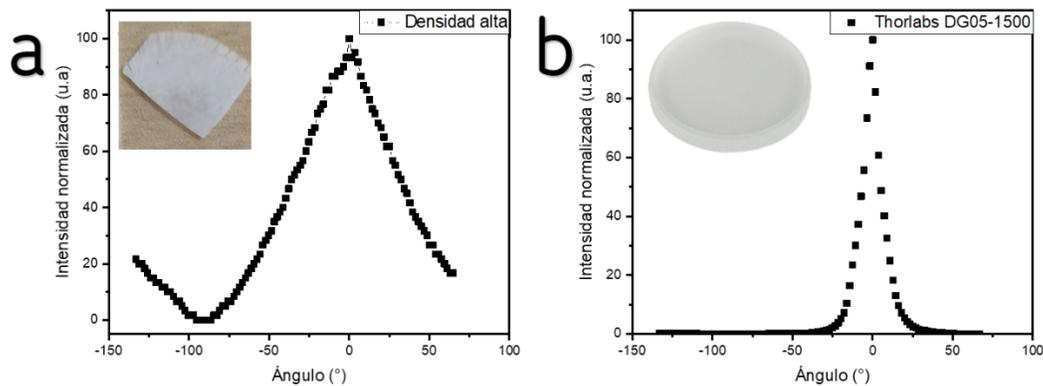
**Figura 28.** Comparativa de patrones inducidos por el haz láser He - Ne a través de dos esquemas ópticos a. patrón generado por la biopantilla con alta densidad de hifas con áreas promedio de

<sup>13</sup> Dispositivos que dispersan la luz, reduciendo su coherencia espacial

<sup>14</sup> Superficie que refleja o transmite por igual la luz en todas direcciones. Sigue la ley de coseno.

espacios intra – micelio de  $38 \pm 4 \mu\text{m}^2$  **b.** patrón generado por difusor óptico Thorlabs DG05-1500. Barra de escala corresponde a 5 cm.

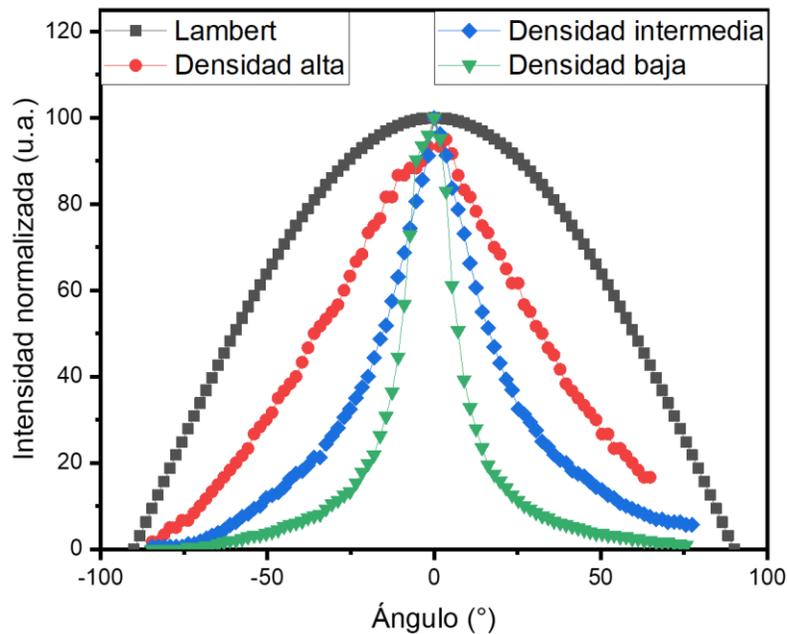
Esto es verificado con su curva de intensidad en función del ángulo de proyección (**Figura 29 a-b**), donde una mayor anchura a media altura es reconocida con respecto al difusor comercial, correspondiente a  $68^\circ$  y  $12^\circ$ , respectivamente. Cabe mencionar, que un esmerilado más fino (como el difusor utilizado en esta comparativa) produce un patrón de difusión pequeño, mientras que un esmerilado más grueso (e.g. *Thorlabs DG05-120*) produciría un patrón más grande.



**Figura 29. a.** Voltaje como función del ángulo de proyección de muestra con alta densidad de hifas. **b.** Intensidad luminosa normalizada de difusor óptico *Thorlabs DG05-1500*.

Por otra parte, las superficies Lambertianas son aquellas cuya intensidad varía de acuerdo a la Ley de Lambert ( $I_\alpha = I_0 \cos \alpha$ ; donde  $I_\alpha$  es la intensidad según el ángulo de observación,  $I_0$  es la intensidad según la normal y  $\alpha$  es el ángulo de incidencia). El resplandor de estas superficies es independiente del ángulo desde el que se mira, es decir, irradian la luz isotrópicamente. Contrastando con nuestra bioplantilla generada, regiones específicas de esta, no cumplen esta característica fundamental (**Figura 30**) debido a ligeras variaciones de homogeneidad de hifas. Sin embargo, a través de la interacción entre regiones conglomeradas de hifas y el haz láser, el comportamiento de dispersión puede asemejarse a una superficie Lambertiana

ideal. Esto último sugiere que una mayor densidad de hifas y/o elementos participantes podría hacer comparable a este límite. Adicionalmente, la anchura a media altura de la bioplantilla representa un 57% de la anchura ideal en la densidad más alta.



**Figura 30.** Comparativa de Ley de Lambert (**negro**) con Intensidad luminosa normalizada de bioplantilla con alta densidad de hifas (**rojo**), intermedia densidad (**azul**) y baja densidad de hifas (**verde**).

Como es observado, los resultados de las propiedades ópticas de transmisión muestran una desviación del comportamiento ideal.

#### 4.4. Conclusión

En este capítulo, resultados cualitativos y cuantitativos, es decir, el patrón de transmisión y su intensidad en función del ángulo incidente respectivamente, son presentados. En conclusión, nuestros resultados indican que la coherencia espacial

del haz láser He – Ne (633 nm) empleado como luz incidente, es disminuida al atravesar regiones de alta densidad de hifas, sugiriendo que el recorrido óptico es favorecido.

Las redes fabricadas a partir de la morfología de *T. atroviride* generan componentes de reflexión y transmisión, siendo este último observado en el patrón de moteado. Asimismo, una tendencia es observada: áreas por debajo de  $10 \mu\text{m}^2$  generan dispersión óptica más homogénea con respecto a espaciamentos entre hifas mayores a  $30 \mu\text{m}^2$ . El esparcimiento de la luz láser incidente a través de la bioplantilla puede ser explicada debido a la diferencia de índices de refracción entre las hifas ( $\sim 1.3$ ) y el aire. Además, los resultados de mediciones ópticas muestran que una mayor densidad hifal es más cercana a un comportamiento Lambertiano respecto a sus contrapartes no aglomeradas. La razón para esto es debida a la mayor cantidad de ramificaciones que interactúan con el haz láser, dispersando su transmisión. Esto sugiere que una densidad de hifas aún mayor, con una homogeneidad inherente, podría generar patrones isotrópicos en intensidad, por lo que un margen de mejora es recomendado.

De la misma manera, factores como la inclinación, diámetro del haz láser, longitud de onda, grosor de las hifas y de la película lustran una influencia en el comportamiento del patrón de moteado, así como la detección de intensidad luminosa en los ángulos de proyección a través de la bioplantilla.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES

En esta tesis se planteó el uso de *T. atroviride* como modelo biológico para la elaboración de una bioplantilla. Además, sus propiedades ópticas fueron estudiadas.

En el Capítulo 2, se estudió el crecimiento de *T. atroviride* y se comparó su manejo ideal contra un experimento control de fotoconidiación. Con base en las mediciones experimentales, se consiguió un mejor crecimiento del modelo biológico a las 36h de incubación post inoculación, indicado por una menor producción de conidios.

Basados en las observaciones previas, el desarrollo de una bioplantilla es conseguido en el Capítulo 3 mediante la conservación estructural *ex situ* del hongo filamentoso. Una complejidad a esta arquitectura es atribuida al amplio número de ramificaciones y dirección aleatoria de crecimiento. A través de mediciones experimentales con microscopía óptica de campo claro, tres regiones de densidad de hifas son definidas: baja, intermedia y alta, con espaciamentos IM de áreas promedio de  $894 \pm 31 \mu\text{m}^2$ ,  $145 \pm 8 \mu\text{m}^2$  y  $38 \pm 4 \mu\text{m}^2$ , respectivamente. Asimismo, la buena adhesión del papel celofán y el medio de cultivo, garantiza un crecimiento de uniforme a lo largo del sustrato extraíble.

En el capítulo 4, las propiedades ópticas de transmisión de la bioplantilla desarrollada, son estudiadas con ayuda de la automatización de la recolección de las métricas necesarias. Un soporte diseñado para el acoplamiento del foto detector, es desarrollado y su recorrido rotacional es completado mediante un software programado.

A través de la evaluación cualitativa y cuantitativa del comportamiento óptico del novedoso esquema, hemos aprendido los beneficios que podría presentar. Primero, la disminución de coherencia espacial de una fuente puntual de luz es aumentada mientras mayor sea la densidad de hifas. Segundo, el comportamiento de dispersión de luz es comparable con modelos de difusión óptica comerciales, así como una tendencia hacia (más no cercana) una superficie Lambertiana ideal es observada.

Por último, factores referentes a la bioplantilla, como el grosor de hifas y en consecuencia de la película, así como su inclinación o rotación con respecto a la fuente de luz, ilustran una influencia en el comportamiento cualitativo del patrón de moteado, teniendo un efecto cuantitativo reconocido en las curvas de intensidad como función del ángulo de dispersión.

En este trabajo se han establecido parámetros iniciales para la consideración de *T. atroviride* como bioplantilla y su posible empleo en el campo de celdas solares. En el contexto de atrapamiento de luz, al ser observados las componentes de reflexión y transmisión, la primera sugiere que podría dirigir los fotones reflejados directamente a la capa activa para su aprovechamiento, mientras que los transmitidos, con ayuda de un reflector, podría aumentar el recorrido óptico de los fotones dentro de la celda hasta en un factor  $4n^2$ , donde  $n$  corresponde al índice de refracción (P. R. Campbell & Green, 1986). De esta manera, el aprisionamiento de fotones podría proponerse a través del aprovechamiento de ángulos de incidencia mayores al ángulo crítico del sustrato, permitiendo una reflexión interna total, aumentando la probabilidad de absorción.

## CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS

En el contexto de las celdas solares, las LTS proveen hasta un 30% (Tommila et al., 2012) de mejora en eficiencia con grosores ampliamente reportados en la escala nanométrica (Govindaraju et al., 2008; Jo, 2013; Kalinin et al., 2006; Li et al., 2003; Zhou et al., 2012), sin embargo, en el entorno de las microestructuras sigue habiendo un margen de oportunidad. La bioplantilla desarrollada, en una escala micrométrica, contribuye con propiedades ópticas de transmisión que sugieren un comportamiento similar a las nanoestructuras, que no deben ser despreciadas. Por ello es recomendado asociar el esquema planteado a una celda solar, de manera que, una evaluación comparativa entre los desempeños de las diferentes arquitecturas reportadas, basadas en estructuras biológicas (e. g. (Han et al., 2013; Juha Tommila et al., 2012) o *diatomeas*), con respecto al nuestro, puede orientar su función. En este contexto, mediciones de corriente generada son propuestas. Asimismo, a través de una esfera integradora, se realiza el análisis las propiedades de flujo luminoso de estas estructuras, por lo que el potencial desarrollo de este dispositivo y la posterior caracterización de la bioplantilla, son planteados.

Por otra parte, la característica de atrapamiento de luz de la bioplantilla, podría ser evaluada a través de la eficiencia de conversión energética, al ser asociada a una celda solar. De esta manera, mantener la estructura embebida en la celda solar, con ayuda de un reflector, podría permitir el aprovechamiento de ángulos críticos que provoquen una reflexión interna total. Por lo tanto, puede ser una ventana de oportunidad para este esquema en el contexto de celdas solares, por lo que su estudio queda abierto para su mejora.

Además, el estudio de las propiedades ópticas de transmisión de la bioplantilla basada en *T. atroviride*, revela cualidades análogas a los difusores ópticos comerciales (Bank, 1987) cuya aplicación potencial, propia de la bioplantilla, resalta en la atenuación de altos niveles de potencia óptica cuando la disminución de estos a través de la absorción no es muy práctica.

De la misma forma, la comparativa con el comportamiento Lambertiano permite elucidar usos mayormente limitados en aplicaciones ópticas, en lugar de consumibles cotidianos. En referencia a esto, la bioplantilla podría ser utilizada como un blanco de calibración. Asimismo, continuar con la caracterización *ex situ* de *T. atroviride* a través de sus propiedades ópticas podría posibilitar la monitorización de crecimiento *in situ* en biorreactores mediante el uso de metrología óptica (Kiviharju et al., 2008; Zeng & Li, 2015), aplicación no limitada a este modelo biológico.

Por otra parte, la estructura fúngica rígida obtenida sin necesidad de métodos rigurosos, posibilita aprovechar su andamiaje para la fabricación de microestructuras basadas en recubrimientos metálicos, lo que presenta una ventana de oportunidad con respecto a microcircuitos y sensores basados en esta matriz.

### Preparación de medio PDA

Este protocolo describe la preparación de 1 L de medio de cultivo Agar Dextrosa Papa (PDA):

1. Agregar 39 g de polvo PDA comercializado por Sigma Aldrich en 1 litro de agua destilada con pH  $5.6 \pm 0.2$ .
2. Agitar hasta disolver completamente.
3. Esterilizar medio de cultivo mediante auto clavado a  $125^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos.
4. Dispensar asépticamente en cajas Petri. Dejar enfriar y evitar mantener vapor de agua dentro de las cajas.

### Aplicaciones:

Cultivo de cepa de *T. atroviride*.

### Almacenamiento

Reservar alejado de fuentes de calor. El medio puede ser disuelto en microondas a 60 W en periodos de 10 segundos durante 30 segundos totales. Uso sugerido de placas de hasta 1 semana conservado en áreas limpias. No utilizar si presenta señales de contaminación y deterioro.

### Referencias

NOM-111-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

### Preparación de PBS

Este protocolo describe la preparación de 1 L de Tampón Fosfato Salino (PBS) para una concentración final de 1X o 10X:

Tabla A2. Componentes requeridos para la preparación de PBS

Reactivo	Cantidad (g) para 1X	Concentración 1X	Cantidad (g) para 10X	Concentración 10X
NaCl	8	137 mM	80	1.37 M
KCl	0.2	2.7 mM	2	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44	10 mM	14.4	100 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	1.8 mM	2.4	18 mM

1. Preparar 750 mL de agua destilada (pH 7.4 ± 0.2) en un recipiente adecuado
2. Agregar reactivos correspondientes para concentración final deseada:
  - Agregar NaCl
  - Agregar KCl
  - Agregar Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - Agregar KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
3. Disolver sales con agitador magnético.
4. Ajustar pH si es necesario.
5. Aforar a 1 L de agua destilada.
6. Esterilizar mediante auto clavado a 125°C durante 20 minutos.

### Aplicaciones:

- Diluyente para Para - Formaldehído
- Tampón de lavado para películas de micelio obtenidas

### Almacenamiento

Reservar alejado de fuentes de calor y temperatura ambiente. Almacenamiento en refrigerador podría llevar a la formación de cristales en concentración 10X.

## **Referencias**

Labeling Golgi with Fluorescent Ceramides; Brad Chazotte; Cold Spring Harb Protoc; 2012; doi:10.1101/pdb.prot070599.

### Preparación de PFA 4%

Este protocolo describe la preparación de 0.5 L de solución de Para – Formaldehído 4%. Medidas adecuadas para su manejo deben ser consideradas:

1. Preparar 400 mL de PBS concentración 1X.
2. Agregar 20 g de Para – Formaldehído en polvo a PBS 1X.
3. Agitar hasta disolver a 60°C en Campana de Extracción de Humos. NO HERVIR.
4. Enfriar a temperatura ambiente y filtrar partículas no disueltas.
5. Aforar volumen a 500 mL con PBS 1X.

### Aplicaciones:

- Solución fijadora para preservar integridad mecánica de películas de micelio.

### Almacenamiento

Reservar a temperatura ambiente para uso de 1 a 2 semanas. Se mantuvo en refrigeración a 4°C en alícuotas para el desarrollo del proyecto.

### Referencias

Labeling Golgi with Fluorescent Ceramides; Brad Chazotte; Cold Spring Harb Protoc; 2012; doi:10.1101/pdb.prot070599.

Michael J. Dykstra and Laura E. Reuss. (2003). Making Dilutions. En Biological Electron Microscopy (74-75). North Carolina: Springer Science.

Ajustes exponenciales

Para determinar el mejor ajuste al comportamiento de los valores de área obtenidos en las regiones de baja, intermedia y alta densidad, se realizaron los ajustes en dos modelos exponenciales en *origin 2018*: *ExpDec1* y *ExpDec2* (Figura A4).

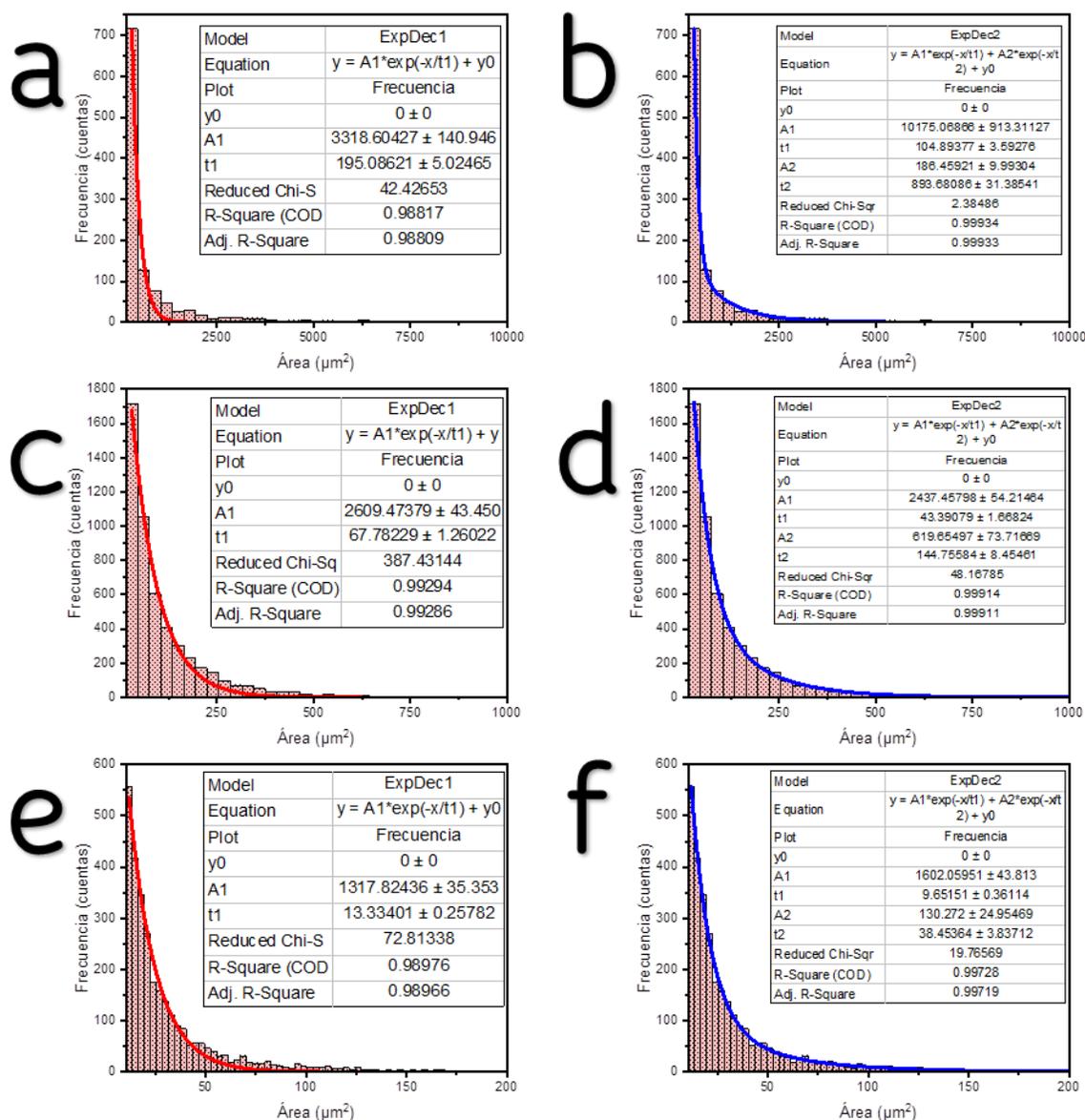
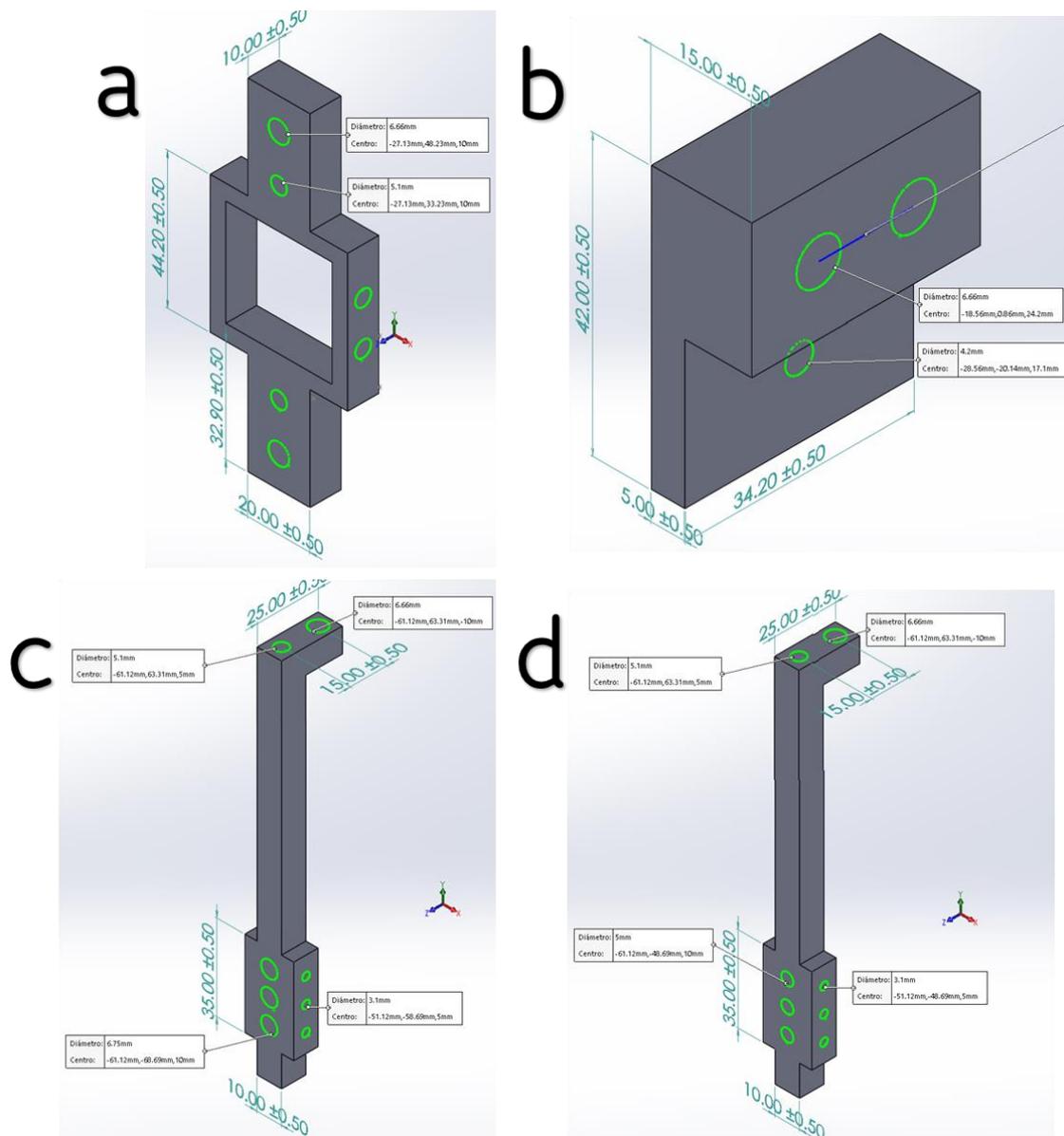


Figura A4. Ajuste exponencial individual para región de baja (a), intermedia (c) y alta (e) densidad. Ajuste exponencial doble para baja (b), intermedia (d) y alta (f) densidad.

Con base a el coeficiente de determinación del ajuste exponencial doble, determinamos que estos son más adecuados a nuestros datos con respecto al modelo individual. Asimismo, consideramos las constantes de decaimiento exponencial ( $t_2$ ), con tres cifras significativas, como promedio representativo de baja, intermedia y alta densidad, ya que son los más aproximados a sus promedios aritméticos de  $728.4 \mu\text{m}^2$ ,  $99.51 \mu\text{m}^2$  y  $30.79 \mu\text{m}^2$  respectivamente.

### Diseño de soportes

Las piezas para el soporte del fotodetector ThorLabs DET110 fueron diseñadas a través de SolidWorks y el diseño asistido por computadora (CAD) es mostrado en **Figura A5. a-d**. Los archivos tanto *.prt* como *.stl* se encuentran en la liga de acceso (ver fin del apéndice).



**Figura A5.** Diseño CAD de soporte para fotodetector **a.** Elemento con orificio para acceso a cables del fotodetector. **b.** Pieza unión para fotodetector y pieza **a.** **c y d.** Barras para el anclaje para ejes de rotación y con pieza **a.** Los modelos no están a escala.

El diseño consta de 4 elementos: la primera pieza cuya ranura central permite introducir los cables de señal y corriente del fotodetector (**A5. a**), una pieza que facilita el acoplamiento del fotodetector al primer elemento (**A5. b**) y dos barras en forma de L (**A5. c y d**) cuya unión (con **a** y **b**) proporcionan un anclaje a un eje de rotación independiente y al eje del motor NEMA-17.

Los elementos del soporte cuentan con orificios diseñados a medida para el uso de tornillos con rosca Whitworth con paso normal y las denominaciones utilizadas fueron W 1/4 con 20 hilos por pulgada y W 5/32 con 32 hilos por pulgada. Para la realización de los roscados, se utilizaron machuelos de las medidas necesarias. Asimismo, los orificios para estos fueron en forma de cilindro en las ubicaciones deseadas sobre las piezas impresas. Los diámetros establecidos, de acuerdo a tablas de referencia, fueron de 5.1 mm y 3.1 mm para diámetros roscados de 6.35 mm y 3.969 mm respectivamente. Cabe mencionar que, para unir dos elementos con rosca W 1/4, solo uno de ellos debe contar con roscado, mientras que su contraparte cuenta con un orificio sin roscado con diámetro de 6.66 mm.

Por otra parte, los orificios de anclaje en las barras L, fueron diseñados para establecer al fotodetector a 11 cm, 12 cm y 13 cm distante de la muestra. El diámetro para el orificio del eje independiente es de 5 mm (barra superior), mientras que de 6.75 mm para el caso del eje del motor NEMA-17 (barra inferior). Una vez insertadas los ejes a las piezas, son fijados con opresores W 5/32 con 20 hilos por pulgada.

El soporte en conjunto fue elaborado a través de impresión 3D con filamento de ácido poli láctico (PLA) con diámetro de 1.75 mm en la impresora Dremel DigiLab 3D20. Vale la pena notar que, la extensión del archivo proporcionado por SolidWorks corresponde a *.prt* o *.sldprt*, sin embargo, la impresora solamente reconoce archivos con extensión *.stl*. Para superar esta limitante, basta con llevar el archivo *.prt* o *.sldprt* al programa Dremel DigiLab 3D Slicer y guardarlo con extensión *.stl*. A través de este programa, también puede seleccionarse el porcentaje de densidad de la pieza a imprimir. La densidad establecida para las piezas fue de 100 % y un *perfilado de alta calidad*, que corresponde a capas de filamento de 0.1 mm.

#### **Aplicaciones:**

- Montaje de fotodetector ThorLabs DET110 y motor NEMA-17

## **Almacenamiento**

Al ser un material termosensible, es recomendado mantenerlo fuera de fuentes de calor.

## **Referencias**

Patricio Ruiz. (2016). Tabla de tipos de roscas. Marzo, 2021, de TOSUGA Sitio web: <https://www.patricioruiz.es/wp-content/uploads/2016/07/Tabla-de-tipos-de-roscas.pdf>

## **Liga de descarga:**

<https://mega.nz/file/wQhCkQ5R#m5sps09Aeqi3dzzCTdNpY3ZozfSPDVaZO-BSWqUmPoQ>

## Automatización de detector

La regulación automática de rotación del motor NEMA-17, que soporta al fotodetector, fue generada mediante el programa elaborado en LabView, y cargado a un Arduino UNO, y es mostrado en **Figura A6**. Su funcionamiento y modificación es explicado en este capítulo. Asimismo, el programa puede ser encontrado en la liga de descarga.



**Figura A6.** Interfaz del programa para la rotación del motor NEMA-17.

A través de la pestaña desplegable *Puerto serial* es solicitada la selección del puerto USB al que Arduino fue conectado al ordenador. Análogamente, en la pestaña *Tipo de paso* puede seleccionarse entre *Single step* (utilizado en todas las mediciones experimentales) y *Micro step*, que definen la resolución de rotación del motor.

Por otra parte, el programa fue diseñado para ordenar al motor un conjunto de 3 operaciones: el primero corresponde a una rotación (un paso), seguido de una espera de 2s para la estabilización del soporte y, por último, la recolección de mediciones durante 5s. El ciclo entre cada paso es repetido por el total de pasos establecidos. En este contexto, el tiempo de medición transcurrido es observado en

la ventaja *Tiempo transcurrido de captura* y la cantidad de pasos ejecutados es mostrada en la ventana *Pasos transcurridos*.

El programa es capaz de recolectar automáticamente las mediciones de voltaje medidas por el fotodetector cuando este es conectado al Arduino. Sin embargo, un voltaje máximo admitido de 5V por este último, limita esta capacidad si no es reducida la señal de entrada con ayuda de un reductor de voltaje. Por esta razón, las mediciones fueron realizadas manualmente con un multímetro por triplicado.

Cuando el programa es ejecutado, es solicitado al usuario el directorio donde será guardado el archivo *.txt* o *.csv* con las mediciones “automáticas”. Una vez establecido esto último, comienza rotación del motor a partir de la ubicación que se le establezca a la flecha este. El punto inicial debe definirlo el usuario de acuerdo a sus requerimientos. Cabe mencionar que la modificación del recorrido en pasos, es posible a través la edición del diagrama (incluido en liga de acceso) en las pestañas de Pasos transcurridos y Emisor de retroceso, donde ambas cantidades deben ser consistentes.

#### **Aplicaciones:**

- Automatización de rotación del motor NEMA-17 que soporta a fotodetector ThorLabs DET110.

#### **Requerimientos del sistema:**

Software *LabVIEW 2020* o anterior previamente instalado

Espacio en disco de 120 KB.

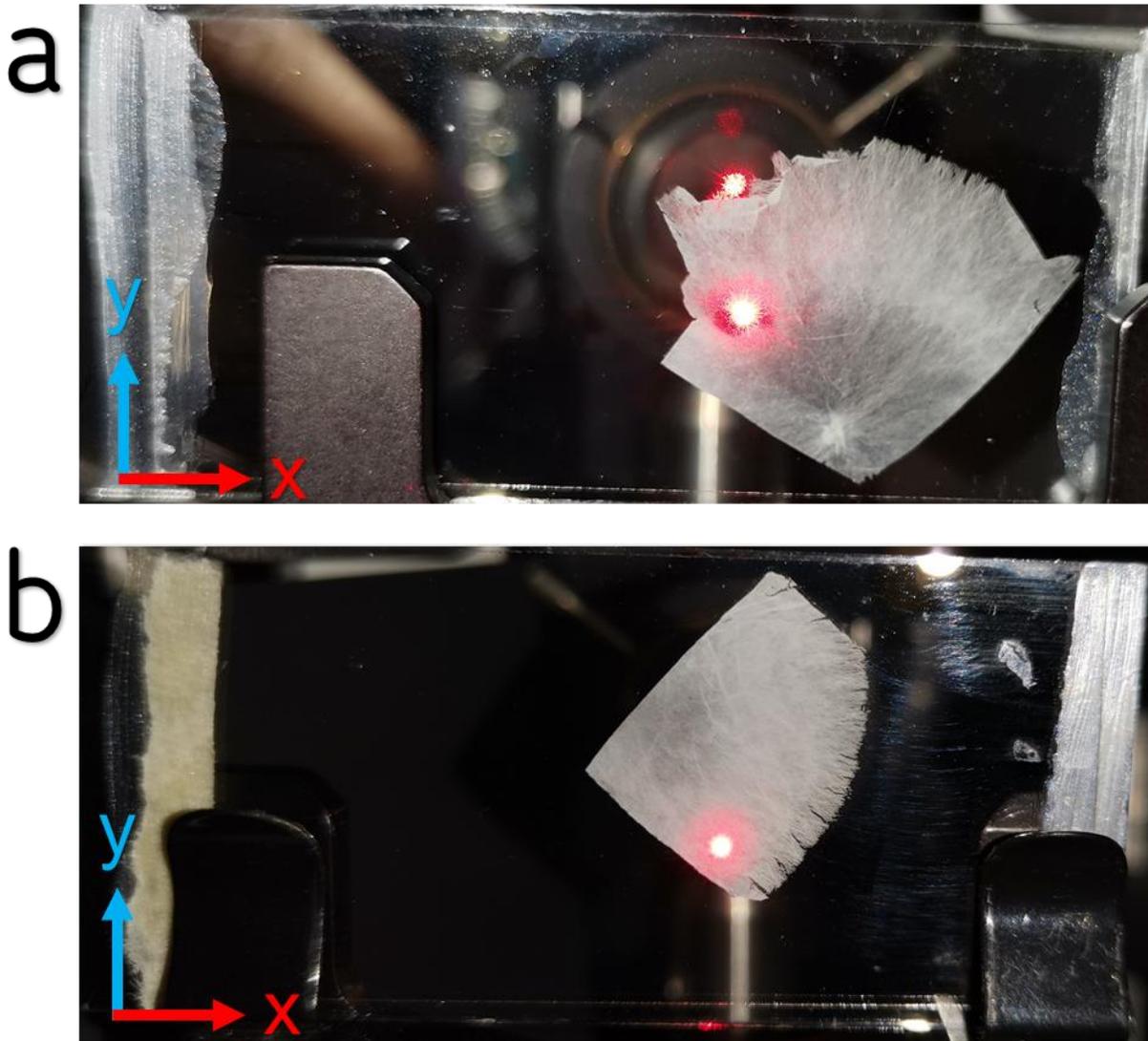
#### **Liga de descarga:**

<https://mega.nz/file/5BoSXLSA#uJci-Y-ploxP845Ha3homkVYjamiQkzYkPdwfACCIDQ>

### Posición de muestras con respecto al haz láser

Debido a que los patrones de moteado y sus curvas de intensidad como función del ángulo de transmisión son dependientes de la ubicación de interacción láser – muestra, los ajustes en posición son conservados en este capítulo. Mediante la fabricación de la bioplantilla, un total de diez muestras fueron obtenidas, sin embargo, siete son consideradas para el desarrollo y discusión de Capítulo 3 y Capítulo 4.

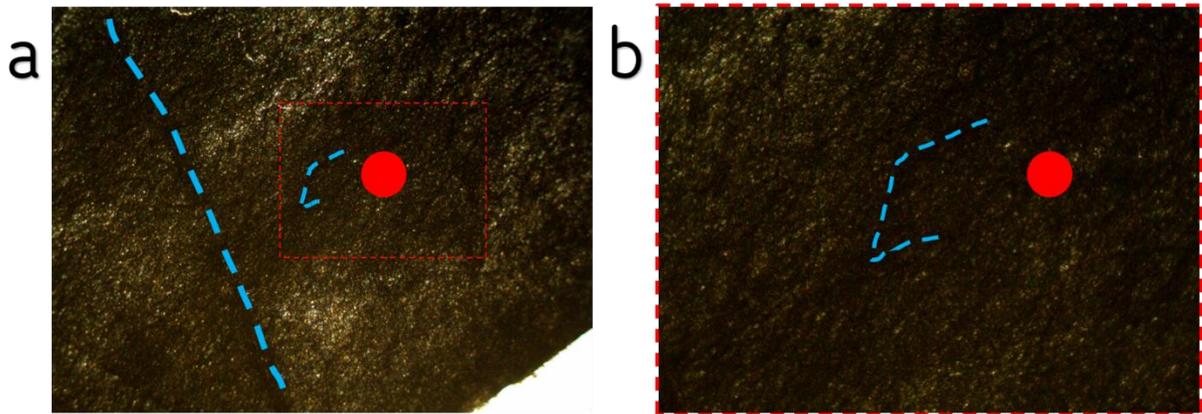
La baja densidad de hifas es considerada a partir de la muestra 9 donde son encontradas regiones de menor crecimiento debido a los volúmenes de aire entre el papel celofán y el medio PDA. El haz láser es incidido en estas regiones, y las posiciones son observadas en **Figura A7. a**. Por otra parte, las regiones de mediana densidad de hifas son consideradas para las muestras 4 y la posición de su ubicación se muestra en **Tabla A7**. Finalmente, la muestra 7 corresponde a la de mayor densidad y se presenta en **Figura A7. c**. Las coordenadas en X y Y (largo y ancho, respectivamente) de interacción son encontradas en **Tabla A7**. Las siete muestras mencionadas fueron empleadas para la determinación de distribución de tamaños.



**Figura A7.** a. Posición de incidencia del Láser He - Ne sobre muestra 9. b. Posición de incidencia del Láser He - Ne sobre muestra 4. c. Posición de incidencia del Láser He - Ne sobre muestra 7.

<b>Tabla A8. Coordenadas de interacción entre Láser He - Ne y muestras</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Coordenada en X (mm)</b>	<b>Coordenada en Y (mm)</b>
4	60.1	10.9
7	53.2	9.6
9	65.0	9.9

Además, la muestra 7 fue empleada para la observar la influencia en el tamaño aparente de los espacios intra – micelio cuando es inclinada a  $45^\circ$  con respecto al láser y es comparado con su contraparte a  $90^\circ$ . Ambas inclinaciones mantienen un punto de pivote, mostrado en **Figura A7. d** y **e** que fue determinado a través de observaciones macroscópicas y microscopía óptica, encontrando una referencia para su posición.



**Figura A7.** Punto pivote donde incide el haz del Láser He - Ne. **a.** Microscopía óptica con objetivo 4x. Líneas punteadas azules representan referencias observables macroscópicamente. **b.** Microscopía óptica con objetivo 10X. Línea punteada azul representa una referencia observable macroscópicamente.

#### **Aplicaciones:**

- Conservación de posiciones utilizadas para futuros análisis

## BIBLIOGRAFÍA

- Aydin, K., Ferry, V. E., Briggs, R. M., & Atwater, H. A. (2011). Broadband polarization-independent resonant light absorption using ultrathin plasmonic super absorbers. *Nature Communications*, 2(1), 517. <https://doi.org/10.1038/ncomms1528>
- Bank, S. I. (1987). *Optical Tables and*. 3, 8228.
- Behjat, A., Nourolahi, H., & Bolorizadeh, M. A. (2017). Fabrication of Organic Solar Cells with Branched Cauliflower-Like Nano Structures as a Back Electrode Replicated from a Natural Template of Cicada Wing Patterns. *International Journal of Optics and Photonics*, 11(1), 39–48. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijop.11.1.39>
- Bissett, J. (1992). *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany*, 70(3), 639–641. <https://doi.org/10.1139/b92-082>
- Buencuerpo Fariña, J. (2017). *Light harvesting using photonic crystals for photovoltaic applications*.
- Buencuerpo, J., Llorens, J. M., Dotor, M. L., & Ripalda, J. M. (2015). Broadband antireflective nano-cones for tandem solar cells. *Optics Express*, 23(7), A322. <https://doi.org/10.1364/oe.23.00a322>
- Campbell, P. R., & Green, M. A. (1986). On “Intensity Enhancement in Textured Optical Sheets for Solar Cells.” *IEEE Transactions on Electron Devices*, 33(11), 1834–1835. <https://doi.org/10.1109/T-ED.1986.22753>
- Campbell, P., Wenham, S. R., & Green, M. A. (1993). Light trapping and reflection control in solar cells using tilted crystallographic surface textures. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 31(2), 133–153. [https://doi.org/10.1016/0927-0248\(93\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0927-0248(93)90046-6)
- Carlson, D. E., & Wronski, C. R. (1976). Amorphous silicon solar cell. *Applied Physics Letters*, 28(11), 671–673. <https://doi.org/10.1063/1.88617>

- Chapin, D. M., Fuller, C. S., & Pearson, G. L. (1954). A new silicon p-n junction photocell for converting solar radiation into electrical power [3]. *Journal of Applied Physics*, 25(5), 676–677. <https://doi.org/10.1063/1.1721711>
- Cui, Y., Hung Fung, K., Xu, J., Ma, H., Jin, Y., He, S., & Fango, N. X. (2012). Ultrabroadband Light Absorption by a Sawtooth Anisotropic Metamaterial Slab. *Nano Letters*, November, 1443–1447. <https://doi.org/10.1021/nl204118h>
- De Vos, A. (1980). Detailed balance limit of the efficiency of tandem solar cells. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 13(5), 839–846. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/13/5/018>
- Dimroth, F., Grave, M., Beutel, P., Fiedeler, U., Karcher, C., Tibbits, T., Oliva, E., Siefer, G., Schachtner, M., Wekkeli, A., Bett, A. W., Krause, R., Piccin, M., Blanc, N., Drazek, C., Guiot, E., Ghyselen, B., Salvetat, T., Tazin, A., ... Schwarzburg, K. (2014). Waferbonded four-junction GaInP/GaAs//GaInAsP/GaInAs concentrator. *Prog. Photovolt: Res. Appl*, 22, 277–282. <https://doi.org/DOI: 10.1002/pip.2475>
- Einstein, A. (1905). Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Annalen Der Physik*, 322(6), 132–148. <https://doi.org/10.1002/andp.19053220607>
- Fan, X., Song, X., Yang, X., & Hou, L. (2011). Facile fabrication of ZrO<sub>2</sub> hollow porous microspheres with yeast as bio-templates. *Materials Research Bulletin*, 46(8), 1315–1319. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.03.024>
- Fonash, S. J. (2014). *Introduction to Light Trapping in Solar Cell and Photo-detector Devices* (Vol. 11, Issue 3). [https://books.google.com.mx/books?id=MS5VAQAAQBAJ&dq=Light+trapping+is+the+capturing+of+as+many+photons+as+possible+from+an+impinging+electro-magnetic+\(E-M\)+wave+with+the+objective+of+generating+heat+or+charge+carriers,+excitons,+or+both+%5B1%5D.+For+our+](https://books.google.com.mx/books?id=MS5VAQAAQBAJ&dq=Light+trapping+is+the+capturing+of+as+many+photons+as+possible+from+an+impinging+electro-magnetic+(E-M)+wave+with+the+objective+of+generating+heat+or+charge+carriers,+excitons,+or+both+%5B1%5D.+For+our+)
- Fritts, C. E. (1883). *O. E Pritt8-New Form of Selenium Oell. XXVII(156)*, 465–472.

- Govindaraju, K., Basha, S. K., Kumar, V. G., & Singaravelu, G. (2008). Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (*Spirulina platensis*) Geitler. *Journal of Materials Science*, *43*(15), 5115–5122. <https://doi.org/10.1007/s10853-008-2745-4>
- Green, M. A. (1981). Solar cell fill factors: General graph and empirical expressions. *Solid State Electronics*, *24*(8), 788–789. [https://doi.org/10.1016/0038-1101\(81\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0038-1101(81)90062-9)
- Green, M. A. (2002a). Lambertian light trapping in textured solar cells and light-emitting diodes: Analytical solutions. *Progress in Photovoltaics: Research and Applications*, *10*(4), 235–241. <https://doi.org/10.1002/pip.404>
- Green, M. A. (2002b). Third generation photovoltaics: Solar cells for 2020 and beyond. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, *14*(1–2), 65–70. [https://doi.org/10.1016/S1386-9477\(02\)00361-2](https://doi.org/10.1016/S1386-9477(02)00361-2)
- Han, Z., Niu, S., Zhang, L., Liu, Z., & Ren, L. (2013). Light Trapping Effect in Wing Scales of Butterfly *Papilio peranthus* and Its Simulations. *Journal of Bionic Engineering*, *10*(2), 162–169. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(13\)60211-5](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(13)60211-5)
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(1), 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hossain, M. J., Tiwari, B., & Bhattacharya, I. (2016). Novel high efficiency quadruple junction solar cell with current matching and quantum efficiency simulations. *Solar Energy*, *139*(December), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2016.09.031>
- Jo, W. (2013). *Biologically Inspired Flagella-Templated Silica Nanotubes*. June.
- Juha Tommila\*, Arto Aho, Antti Tukiainen, Ville Polojärvi, Joel Salmi, T. N. and M. G. (2012). Moth-eye antireflection coating fabricated by nanoimprint lithography on 1eV dilute nitride solar cell. *Ieee Trans Fuzzy Syst*, *20*(6), 1114–1129. <https://doi.org/10.1002/pip>

- Kalinin, S. V., Jesse, S., Liu, W., & Balandin, A. A. (2006). Evidence for possible flexoelectricity in tobacco mosaic viruses used as nanotemplates. *Applied Physics Letters*, *88*(15), 2004–2007. <https://doi.org/10.1063/1.2194008>
- Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., & Eerikäinen, T. (2008). Biomass measurement online: The performance of in situ measurements and software sensors. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *35*(7), 657–665. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0346-5>
- Krč, J., Smole, F., & Topič, M. (2003). Potential of Light Trapping in Microcrystalline Silicon Solar Cells with Textured Substrates. *Progress in Photovoltaics: Research and Applications*, *11*(7), 429–436. <https://doi.org/10.1002/pip.506>
- Kubicek, C. P., & Harman, G. E. (2002). *Trichoderma & Gliocladium* (C. P. Kubicek & G. E. Harman (eds.)).
- Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J., & Glass, N. L. (2011). The social network: Deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(6), 440–451. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2580>
- Li, Z., Chung, S. W., Nam, J. M., Ginger, D. S., & Mirkin, C. A. (2003). Living templates for the hierarchical assembly of gold nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*, *42*(20), 2306–2309. <https://doi.org/10.1002/anie.200351231>
- Liu, W., Mitzi, D. B., Yuan, M., Kellock, A. J., Jay Chey, S., & Gunawan, O. (2010). 12% Efficiency  $\text{CuIn}(\text{Se,S})_2$  photovoltaic device prepared using a hydrazine solution process. *Chemistry of Materials*, *22*(3), 1010–1014. <https://doi.org/10.1021/cm901950q>
- Martí, A., & Araújo, G. L. (1996). Limiting efficiencies for photovoltaic energy conversion in multigap systems. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, *43*(2), 203–222. [https://doi.org/10.1016/0927-0248\(96\)00015-3](https://doi.org/10.1016/0927-0248(96)00015-3)
- Michalet, X. (2013). *Quantum Dots for Live Cells*, *538*(2005), 538–545.

<https://doi.org/10.1126/science.1104274>

Michelle, J. M. C., Kylie, R. C., Klaus, J. W., & Andrew, W. B. (2001). A review of thin-film crystalline silicon for solar cell applications. Part 1: Native substrates. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 68(2), 135–171.

[https://doi.org/10.1016/S0927-0248\(00\)00242-7](https://doi.org/10.1016/S0927-0248(00)00242-7)

Milichko, V. A., Shalin, A. S., Mukhin, I. S., Kovrov, A. E., Krasilin, A. A., Vinogradov, A. V, Belov, P. A., & Simovski, C. R. (2016). Solar photovoltaics: current state and trends. *Physics-Uspekhi*, 59(8), 727–772.

<https://doi.org/10.3367/ufne.2016.02.037703>

Moriwaki, K., Nomoto, M., Yuuya, S., Murakami, N., Ohgoh, T., Yamane, K., Ishizuka, S., & Niki, S. (2013). Monolithically integrated flexible Cu(In,Ga)Se<sub>2</sub> solar cells and submodules using newly developed structure metal foil substrate with a dielectric layer. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 112, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2013.01.016>

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma* - A genomic perspective. *Microbiology*, 158(1), 35–45.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>

Notarianni, M., Vernon, K., Chou, A., Aljada, M., Liu, J., & Motta, N. (2014).

Plasmonic effect of gold nanoparticles in organic solar cells. *Solar Energy*, 106, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2013.09.026>

Omlsted, J. (1986). *MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS*. 421–457.

Orellana, G. S. (2019). *Growth of Trichoderma atroviride and importance of the nano-motor Kinesin-1 in its development*. 1–103.

Paul, G. C., & Thomas, C. R. (1998). Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 60, 1–59. <https://doi.org/10.1007/bfb0102278>

Perl, E. E., McMahon, W. E., Bowers, J. E., & Friedman, D. J. (2014). Design of antireflective nanostructures and optical coatings for next-generation

- multijunction photovoltaic devices. *Optics Express*, 22(S5), A1243.  
<https://doi.org/10.1364/oe.22.0a1243>
- Perl, E. E., McMahon, W. E., Farrell, R. M., Denbaars, S. P., Speck, J. S., & Bowers, J. E. (2014). Surface structured optical coatings with near-perfect broadband and wide-angle antireflective properties. *Nano Letters*, 14(10), 5960–5964. <https://doi.org/10.1021/nl502977f>
- Powalla, M., Jackson, P., Witte, W., Hariskos, D., Paetel, S., Tschamber, C., & Wischmann, W. (2013). High-efficiency Cu(In,Ga)Se<sub>2</sub> cells and modules. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 119, 51–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.solmat.2013.05.002>
- Razykov, T. M., Ferekides, C. S., Morel, D., Stefanakos, E., Ullal, H. S., & Upadhyaya, H. M. (2011). Solar photovoltaic electricity: Current status and future prospects. *Solar Energy*, 85(8), 1580–1608.  
<https://doi.org/10.1016/j.solener.2010.12.002>
- Rehman, A., Majeed, M. I., Ihsan, A., Hussain, S. Z., Saif-Ur-Rehman, Ghauri, M. A., Khalid, Z. M., & Hussain, I. (2011). Living fungal hyphae-templated porous gold microwires using nanoparticles as building blocks. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(12), 6747–6754. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0581-y>
- Reinhard, P., Chirilă, A., Blösch, P., Pianezzi, F., Nishiwaki, S., Buechelers, S., & Tiwari, A. N. (2012). Review of progress toward 20% efficiency flexible CIGS solar cells and manufacturing issues of solar modules. *Conference Record of the IEEE Photovoltaic Specialists Conference, PART 2*, 1–9.  
<https://doi.org/10.1109/pvsc-vol2.2012.6656789>
- Sai, H., Kanamori, Y., Arafune, K., Ohshita, O., & Yamahuchi, M. (2007). Light Trapping Effect of Submicron Surface Textures in Crystalline Si Solar Cells. *Prog. Photovolt: Res. Appl*, 15, 415–423. <https://doi.org/10.1002/pip.754>
- Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, E. U., & Herrera-Estrella, A. (2010). Trichoderma in the light of day - Physiology and development. *Fungal Genetics and Biology*,

47(11), 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.010>

Schuster, C. S., Bozzola, A., Andreani, L. C., & Krauss, T. F. (2014). How to assess light trapping structures versus a Lambertian Scatterer for solar cells? *Optics Express*, 22(S2), A542. <https://doi.org/10.1364/oe.22.00a542>

Selvakumar, R., Arul Jothi, N., Jayavignesh, V., Karthikaiselvi, K., Antony, G. I., Sharmila, P. R., Kavitha, S., & Swaminathan, K. (2011). As(V) removal using carbonized yeast cells containing silver nanoparticles. *Water Research*, 45(2), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.034>

Shockley, W., & Queisser, H. J. (1961). Detailed balance limit of efficiency of p-n junction solar cells. *Journal of Applied Physics*, 32(3), 510–519. <https://doi.org/10.1063/1.1736034>

Solargis, & The World Bank. (2017). *Photovoltaic Electricity Potential Togo*. SOLARGIS. <https://solargis.com/maps-and-gis-data/overview>

Soto, C. M., & Ratna, B. R. (2010). Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(4), 426–438. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.07.004>

Sugunan, A., Melin, P., Schnürer, J., Hilborn, J. G., & Dutta, J. (2007). Nutrition-driven assembly of colloidal nanoparticles: Growing fungi assemble gold nanoparticles as microwires. *Advanced Materials*, 19(1), 77–81. <https://doi.org/10.1002/adma.200600911>

Tian, X., He, W., Cui, J., Zhang, X., Zhou, W., Yan, S., Sun, X., Han, X., Han, S., & Yue, Y. (2010). Mesoporous zirconium phosphate from yeast biotemplate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 343(1), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.11.037>

Torralba, S., & Heath, I. B. (2001). Cytoskeletal and Ca<sup>2+</sup> regulation of hyphal tip growth and initiation. *Current Topics in Developmental Biology*, 51, 135–187. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(01\)51005-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(01)51005-4)

Vogel, R., & Stark, H. (2012). Motor-driven bacterial flagella and buckling

instabilities. *European Physical Journal E*, 35(2).  
<https://doi.org/10.1140/epje/i2012-12015-0>

Wallin, E., Malm, U., Jarmar, T., Lundberg, O., Edoff, M., & Stolt, L. (2012). World-record Cu(In,Ga)Se<sub>2</sub>-based thin-film sub-module with 17.4% efficiency Erik. *Prog. Photovolt: Res. Appl.* <https://doi.org/DOI: 10.1002/pip.2246>

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi* (Third Edit).

Yu, Q., Sasaki, K., & Hirajima, T. (2013). Bio-templated synthesis of lithium manganese oxide microtubes and their application in Li<sup>+</sup> recovery. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 38–47.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.027>

Zanotto, S., Liscidini, M., & Andreani, C. (2010). Light trapping regimes in thin-film silicon solar cells with a photonic pattern. *Optical Society of America*, 18(5), 4260–4274. <https://doi.org/10.1364/pv.2010.ptub1>

Zeng, L., & Li, D. (2015). Development of in situ sensors for chlorophyll concentration measurement. *Journal of Sensors*, 2015.  
<https://doi.org/10.1155/2015/903509>

Zhou, H., Fan, T., Ding, J., Zhang, D., & Guo, Q. (2012). Bacteria-directed construction of hollow TiO<sub>2</sub> micro/nanostructures with enhanced photocatalytic hydrogen evolution activity. *Optics Express*, 20(S2), A340.  
<https://doi.org/10.1364/oe.20.00a340>