



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de Propiedades Físicas de  
Promastigotes y Amastigotes de *Leishmania*  
*braziliensis* en Cultivos *in vitro* Usando  
Ondas Acústicas Estacionarias y Microfluídica

Abelino Vargas Jiménez

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad Ciencias, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia (IBUN)  
Bogotá, Colombia  
2019

Caracterización de Propiedades  
Físicas de Promastigotes y  
Amastigotes de *Leishmania  
braziliensis* en Cultivos *in vitro*  
Usando Ondas Acústicas  
Estacionarias y Microfluídica

Abelino Vargas Jiménez

Tesis o trabajo de grado presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Biotecnología**

Director(a):

Ph.D María Marcela Camacho Navarro

Codirector(a):

Ph.D Iciar González Gómez

Línea de Investigación:

Biofísica y Acustofluídica

Grupo de Investigación:

Biofísica y biología de membranas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Ciencias, Instituto de Biotecnología (IBUN)

Bogotá, Colombia

2019

## Dedicado

*A mis padres Jeannette y Hernando por enseñarme que el trabajo duro y honesto tiene recompensa. Gracias por su amor incondicional.*

Y

*a Carolina por su comprensión y apoyo en todo momento. Gracias por querer envejecer conmigo.*

# Agradecimientos

Primero, a tres mujeres que admiro por su entrega, dedicación y amor a la ciencia, las cuales fueron la fuente de inspiración para el desarrollo de este trabajo:

Mi directora de tesis la Dra. María Marcela Camacho Navarro investigadora del grupo de Biofísica y Biología de Membranas y directora del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Por darme la oportunidad de conocerla como científica y persona trabajando bajo su cargo durante el desarrollo de este proyecto. En términos de los aportes realizados que son innumerables tanto a mi formación como investigador y persona, solo puedo decir gracias por todo lo enseñado durante estos años. En particular en este trabajo, resalto sus contribuciones teóricas y experimentales relacionadas con la biología de los parásitos, así como en el mantenimiento y manipulación de los cultivos *in vitro* de la diferentes cepas usadas.

Mi codirectora la Dra. Iciar González Gómez investigadora del Grupo de Resonadores Ultrasónicos para Cavitación y Micromanipulación en Madrid, España. Vicedirectora del Instituto de Tecnologías Físicas y de la Información (ITEFI) del CSIC, por su apoyo, entusiasmo y disposición en todo momento que permitió por sus asesorías teóricas afianzar en mi los conceptos físicos fundamentales de la manipulación celular con ultrasonidos y por sus sugerencias y consejos experimentales que posibilitaron el desarrollo y construcción de los dispositivos acústicos usados en este trabajo.

Mi esposa Carolina bióloga e investigadora egresada de la Universidad Nacional de Colombia, por entrenarme en el manejo de microscopios, en la preparación de soluciones y en la manipulación de cultivos celulares *in vitro*, en general por enseñarme a trabajar en el laboratorio. Al igual que por las discusiones teóricas en biología celular y técnicas de separación que permitieron la estandarización de los gradientes de Percoll.

Segundo, al Dr. Jose Daniel Muñoz Castaño profesor asociado al Departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia e Investigador del Grupo de Simulación de Sistemas Físicos por colaborar en el desarrollo de los códigos en C++ y facilitar los paquetes Vector.h y Random63.h que permitieron construir las simulaciones numéricas.

Tercero, a las instituciones que hicieron posible el avance, desarrollo y terminación del proyecto:

La Universidad Nacional de Colombia por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado en Biotecnología proporcionando los espacios de aprendizaje, así como, la infraestructura y equipos necesarios para el desarrollo del trabajo.



Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) y sus profesores e investigadores asociados por brindar espacios de discusión en sus seminarios y materias ofertadas que me ayudaron a fortalecer y desarrollar las competencias básicas de un investigador.

Al Instituto de Tecnologías Físicas y de la Información Leonardo Torres Quevedo (ITEFI) por facilitar sus espacios y laboratorios durante las pasantías de investigación.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS por permitir la primera pasantía de investigación en el laboratorio de la investigadora Iciar González del ITEFI en Julio de 2015 en Madrid, España, con su apoyo, a través del proyecto: *Sistemas de separación y clasificación celular en corto tiempo, con bajo costo y alta eficiencia: uso de levitación acústica y fuerzas hidrodinámicas*, número de contrato 222856933541, aprobado en la convocatoria 569 - 2012 Banco de Proyectos Elegibles de CTeI, Programa Nacional de Biotecnología. Y por su financiamiento, con recursos de este proyecto, para mi formación como investigador y la compra de materiales y equipos con los que se desarrollo en Colombia esta investigación.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por la financiación del proyecto: *Estudio de propiedades físicas de promastigotes y amastigotes de Leishmania en Cultivos en Capilares Microfluídicos Mediante Ultrasonidos*, referencia COOPA20348, aprobado en la convocatoria I-COOP+2018, que permitió con una estancia larga en el ITEFI concluir satisfactoriamente este trabajo de investigación.

Y por último, a las personas y compañeros del laboratorio Biofísica y Biología de Membranas que en alguna medida aportaron a este proyecto.

## Resumen

En este trabajo se usaron ondas acústicas estacionarias en el rango de los ultrasonidos generadas al interior de dispositivos microfluídicos, para manipular acústicamente parásitos de *Leishmania*. Esto se hizo con el propósito de identificar cambios en las propiedades físicas de promastigotes y amastigotes, los cuales pueden estar relacionados con alteraciones en el citoesqueleto del parásito causadas por modificaciones genéticas o por su adaptación a los diferentes ambientes durante su ciclo de vida. Para identificar si hay cambios se determinó la intensidad de la fuerza primaria de radiación acústica,  $\vec{F}_{pr}$ , que actuaba sobre diferentes cepas de *Leishmania*. Esto se logró al desarrollar un modelo físico en 3D mediante un análisis dinámico donde se establecieron las fuerzas que actuaban sobre los parásitos suspendidos en un líquido al interior de un dispositivo rectangular y sometidos a la acción de la  $\vec{F}_{pr}$ . Encontrando, que la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  en promastigotes es mayor que en amastigotes efecto que está relacionado con cambios significativos en el volumen, densidad y elasticidad del parásito dados por su adaptación a los distintos ambientes, diferencia que no fue tan evidente al comparar los resultados obtenidos con parásitos de las diferentes cepas en el mismo estadio, donde la variación en la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  esta asociada con cambios en el volumen de *Leishmania*.

Para obtener estos resultados se midió primero la energía acústica en los dispositivos contruidos, hallando valores entre 7 a  $9\frac{J}{m^3}$ , y luego se determinaron las propiedades físicas de *Leishmania* tales como su tamaño, con un contador de partículas Coulter Beckman Z2 e imágenes de microscopia, densidad, medida usando gradientes de Percoll, y elasticidad, extraída indirectamente del modelo 3D. La medición de estas propiedades mecánicas permitió, al introducir sus valores en la simulación numérica, establecer la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  sobre las células. Adicionalmente, se halló con los registros de manipulación acústica que el factor de contraste acústico en los parásitos es positivo  $\phi > 0$ , puesto que al someter estas células a la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  se produjo un movimiento de conducción hacia zonas de equilibrio acústico, nodos de presión, donde se colectaron los parásitos durante la aplicación del campo. Posición que alcanzan más rápido los promastigotes que los amastigotes, según se determinó con la simulación computacional, en la cual, después de agregados los parásitos en sus dos estadios, estos rotan respecto al nodo.

**Palabras clave:** Parásitos de *Leishmania*, Fuerza Acústica, Dispositivo Microfluídico, Propiedades Físicas.

# Abstract

In this work acoustic standing waves were used in the ultrasonic range to manipulated *Leishmania* parasites. The aim of this manipulation was to identify changes in the physical properties of promastigotes and amastigotes, which can be related to the cytoskeleton alterations caused by genetic modifications or by parasite adaptation to different environments. 3D theoretical model was developed with a dynamical analysis to identify these changes in the parasites physical properties using the acoustic radiation force intensity determined for *Leishmania*. It was found that the force magnitude is greater in promastigotes than amastigotes, effect that can be related with simultaneous changes in the parasite volume, density and elasticity by its adaptation to the extracellular environments that affect the cytoskeleton. However, differences in the magnitude of the  $\vec{F}_{pr}$  are associated with the volume when transfected *Leishmania* parasites, at the same stage, are compared.

These results were obtained by measuring, first, the acoustic energy in the devices, where their values were defined between 7 and  $9 \frac{J}{m^3}$ , and, second, and second, were determined physical properties of *Leishmania* such as its shape, by means of particle counter Coulter Beckman Z2 and microscopy images, density, measured with Percoll gradients, and elasticity, extracted indirectly from the 3D model. The physical properties were introduced in numerical simulation for establish  $\vec{F}_{pr}$  magnitude in *Leishmania*. In addition, was found that the parasites have an acoustic contrast factor, positive,  $\phi > 0$ , because these cells move towards the pressure node during acoustic field application. Region where the promastigotes arrive first than the amastigotes to form aggregates that rotate with respect to the node.

**Keywords:** *Leishmania*, Acoustic Force, Microfluidic Device, Physical Properties.



# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>IV</b>
<b>Resumen</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de símbolos</b>	<b>XII</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>XVIII</b>
<b>Índice de Cuadros</b>	<b>XXI</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Fuerza de Radiación Acústica</b>	<b>6</b>
1.1. Ecuación De Onda En Un Líquido . . . . .	9
1.2. Ondas Estacionarias En Un Dispositivo Rectangular . . . . .	18
1.2.1. Solución Paredes Rígidas . . . . .	21
1.2.2. Solución Paredes Suaves en Dirección $x$ . . . . .	24
1.2.3. Frecuencias de Resonancia . . . . .	25
1.3. Campo Vectorial de Velocidades en el Dispositivo . . . . .	27
1.4. Fuerza de Primaria de Radiación Acústica . . . . .	32
1.4.1. Densidad de Energía Potencial $\langle E_P \rangle$ . . . . .	34
1.4.2. Densidad de Energía Cinética $\langle E_k \rangle$ . . . . .	37
1.4.3. $\vec{F}_{pr}$ en Dispositivos con Paredes Rígidas . . . . .	39
1.4.4. $\vec{F}_{pr}$ en Dispositivos con Paredes Suaves en $x$ . . . . .	50
<b>2. Movimiento en el Campo Acústico</b>	<b>54</b>
2.1. Fuerzas Sobre las Partículas o Parásitos . . . . .	55
2.1.1. Fuerza de Arrastre Viscoso $\vec{F}_d$ . . . . .	56
2.1.2. Fuerza de Flotación $\vec{F}_b$ . . . . .	57
2.1.3. Fuerza de Hertz $\vec{F}_{ij}$ . . . . .	58

2.2. Ecuación de Movimiento . . . . .	59
2.2.1. Solución de la Ecuación de Movimiento . . . . .	60
2.2.1.1. Algoritmo Forest-Ruth Optimizado . . . . .	61
2.3. Resultados . . . . .	62
2.3.1. Dispositivo con Paredes Rígidas . . . . .	64
2.3.1.1. Movimiento en tres dimensiones . . . . .	64
2.3.1.2. Análisis del movimiento de las partículas . . . . .	70
2.3.2. Dispositivo con Paredes Suaves . . . . .	74
2.3.2.1. Movimiento en tres dimensiones . . . . .	74
2.3.2.2. Análisis del movimiento de las partículas . . . . .	80
<b>3. Parásito de Leishmania y Campo Acústico</b> . . . . .	<b>84</b>
3.1. Caracterización de los Dispositivos Acústicos . . . . .	85
3.1.1. Frecuencia de resonancia en los dispositivos . . . . .	87
3.1.2. Medición de la Energía Acústica $E_{ac}$ y Amplitud de Presión . . . . .	88
3.1.2.1. $F_{pr_{max}}$ y tamaño de partícula . . . . .	94
3.1.2.2. $F_{pr_{max}}$ y densidad de la partícula . . . . .	96
3.1.2.3. $F_{pr_{max}}$ y elasticidad de la partícula . . . . .	97
3.1.2.4. Relación entre $\kappa$ y $\zeta$ . . . . .	100
3.2. Propiedades Mecánicas de <i>Leishmania</i> . . . . .	106
3.2.1. Modelo Biológico: Parásitos de <i>Leishmania</i> . . . . .	106
3.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> Parásitos de <i>Leishmania</i> . . . . .	111
3.2.3. Forma y Tamaño de los Parásitos . . . . .	112
3.2.4. Densidad . . . . .	124
3.2.4.1. Control . . . . .	129
3.2.4.2. Parásitos de la cepa E1 . . . . .	130
3.2.4.3. Parásitos de la cepa pSP . . . . .	131
3.2.4.4. Parásitos de la cepa WT T. . . . .	133
3.2.4.5. Parásitos de la cepa WT B. . . . .	134
3.2.5. Elasticidad . . . . .	135
3.3. Movimiento de <i>Leishmania</i> en el Campo Acústico . . . . .	136
<b>4. Conclusiones</b> . . . . .	<b>153</b>
4.1. Modelo Teórico y Simulación . . . . .	153
4.2. Experimental . . . . .	154
4.3. Medición de Propiedades Físicas en Parásitos de <i>Leishmania</i> . . . . .	154
4.4. $\vec{F}_{pr}$ y Parásitos de <i>Leishmania</i> . . . . .	155
4.5. Recomendaciones y Perspectivas . . . . .	155
<b>Apéndices</b> . . . . .	<b>156</b>

---

<b>A. Dinámica de Fluidos</b>	<b>156</b>
<b>B. Teoría de Perturbaciones</b>	<b>170</b>
<b>C. Análisis Dimensional y Orden de Magnitud</b>	<b>173</b>
<b>D. El contador Coulter</b>	<b>179</b>
<b>E. Errores de Medida</b>	<b>182</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>186</b>

# Lista de símbolos

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$p$	Campo escalar de presión	$\frac{\text{N}}{\text{m}^2}$	Ec.(1-5)
$\vec{v}$	Campo vectorial de velocidad	$\frac{\text{m}}{\text{s}}$	Ec.(1-5)
$\vec{r}$	Vector de posición fija en el espacio	m	$\vec{r} = \vec{r}_x + \vec{r}_y + \vec{r}_z$
$t$	Tiempo	s	
$p_o$	Campo de presión inicial	$\frac{\text{N}}{\text{m}^2}$	Constante
$\vec{v}_o$	Campo de velocidad inicial	$\frac{\text{m}}{\text{s}}$	Cero
$p_1$	Campo de presión perturbado	$\frac{\text{N}}{\text{m}^2}$	Ec.(1-18), (1-88), (1-91)
$\vec{v}_1$	Campo de velocidad perturbado	$\frac{\text{m}}{\text{s}}$	Ec.(1-19), (1-111), (1-112)
$f$	frecuencia	Hz	$f = \frac{\omega}{2\pi}$
$c_o, c_f$	Rapidez del sonido en el líquido	$\frac{\text{m}}{\text{s}}$	Cuadro2-1
$c_p$	Rapidez del sonido en la partícula	$\frac{\text{m}}{\text{s}}$	Cuadro2-1
$i$	Número imaginario	1	$i = (-1)^{1/2}$
$k$	Magnitud número de onda	$\frac{\text{rad}}{\text{m}}$	Ec.(1-49), (1-94)
$k_o$	Parte real número de onda	$\frac{\text{rad}}{\text{m}}$	$k_o = \frac{\omega}{c_o}$
$\vec{k}$	Vector de onda	$\frac{\text{rad}}{\text{m}}$	$\vec{k} = \vec{k}_x + \vec{k}_y + \vec{k}_z$
$\ell_x$	Largo del dispositivo rectangular	m	Figura1-1
$\ell_y$	Ancho del dispositivo rectangular	m	Figura1-1
$\ell_z$	Alto del dispositivo rectangular	m	Figura1-1



Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$k_x$	Componente $x$ vector de onda	$\frac{\text{rad}}{\text{m}}$	Ec.(1-85)
$k_y$	Componente $y$ vector de onda	$\frac{\text{rad}}{\text{m}}$	Ec.(1-85)
$k_z$	Componente $z$ vector de onda	$\frac{\text{rad}}{\text{m}}$	Ec.(1-85)
$p_a$	Amplitud máxima de presión	$\frac{\text{N}}{\text{m}^2}$	Ec.(3-4)
$p_x$	Campo de presiones en $x$	$\frac{\text{N}}{\text{m}^2}$	Ec.(1-81), (1-89)
$p_y$	Campo de presiones en $y$	$\frac{\text{N}}{\text{m}^2}$	Ec.(1-81)
$p_z$	Campo de presiones en $z$	$\frac{\text{N}}{\text{m}^2}$	Ec.(1-81)
$n_x$	Modo de vibración en $x$	1	$n_x = 1,2,3\dots$
$n_y$	Modo de vibración en $y$	1	$n_y = 1,2,3\dots$
$n_z$	Modo de vibración en $z$	1	$n_z = 1,2,3\dots$
$f_{n_x, n_y, n_z}$	Frecuencia de resonancia	Hz	Ec.(1-98)
$\hat{i}$	Vector unitario en $x$	1	
$\hat{j}$	Vector unitario en $y$	1	
$\hat{k}$	Vector unitario en $z$	1	
$x$	Posición $x$ de la partícula	m	
$y$	Posición $y$ de la partícula	m	
$z$	Posición $z$ de la partícula	m	
$\vec{F}_{pr}$	Fuerza primaria de Radiación Acústica	N	Ec.(1-205)(1-214)
$U_{ac}$	Potencial acústico	N.m	Ec.(1-214)
$T$	Periodo de la onda	s	$T = \frac{1}{f}$
$\langle E_P \rangle$	Densidad de energía potencial promedio	$\frac{\text{J}}{\text{m}^3}$	Ec.(1-131)
$\langle E_k \rangle$	Densidad de energía cinética promedio	$\frac{\text{J}}{\text{m}^3}$	Ec.(1-132)
$f_1$	Coficiente monopolar	1	Ec.(1-134)
$f_2$	Coficiente dipolar	1	Ec.(1-134)
$V$	Volumen de la partícula	$\text{m}^3$	$V = \frac{4}{3}\pi r_o^3$
$U_o$	Potencial acústico máximo	N.m	Ec.(1-167)
$E_{ac}$	Densidad Máxima de energía acústica	$\frac{\text{J}}{\text{m}^3}$	Ec.(1-168)
$\vec{r}(t)$	Vector posición de la partícula	m	$\vec{r}(t) = x(t) + y(t) + z(t)$
$\vec{u}$	Vector velocidad de la partícula	$\frac{\text{m}}{\text{s}}$	$\vec{u} = \frac{d\vec{r}(t)}{dt}$

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$C_d$	Coeficiente de arrastre	1	Ec.(2-2)
$A$	Área	$m^2$	Ec.(2-2)
$Re$	Número de Reynolds	1	$Re = \frac{\bar{v}D\rho_o}{\eta}$
$\bar{v}$	Rapidez media del flujo $Q$	$\frac{m}{s}$	$\bar{v} = \frac{Q}{A}$
$D$	Diámetro hidráulico	m	
$\vec{F}_d$	Fuerza de arrastre	N	Ec.(2-3)
$\vec{\omega}$	Peso partícula	N	Ec.(2-4)
$\vec{E}$	Empuje	N	Ec.(2-5)
$\vec{g}$	Vector aceleración gravitacional	$\frac{m}{s^2}$	$\vec{g} = -9,8\hat{k}$
$\vec{F}_b$	Fuerza de flotación	N	Ec.(2-8)
$\vec{F}_{ij}$	Fuerza de Hertz	N	Ec.(2-9)
$K'$	Parámetro de rigidez	$\frac{N}{m^{3/2}}$	Ec.(2-10)
$N$	Número de partículas	1	
$Y$	Módulo de Young	$\frac{N}{m^2}$	Cuadro2-1
$\vec{a}$	Aceleración de la partícula	$\frac{m}{s^2}$	$\vec{a} = \frac{d\vec{u}(t)}{dt}$
$m_p$	Masa de la partícula	kg	$m_p = \rho_p V$
$\vec{F}_N$	Fuerza neta	N	$\vec{F}_N = \sum \vec{f}$
$h$	Paso de tiempo	s	$h = \Delta t$
$y(t)$	Posición $y$ de la partícula	m	Ec.(2-23)
$u_p$	Rapidez de la partícula en $y$	$\frac{m}{s}$	Ec.(2-24)
$f_o$	Frecuencia fundamental	Hz	Ec.(3-2)
$F_{pr_{max}}$	Fuerza acústica máxima	N	Ec.(3-9), (3-10), (3-12)
$c_c$	Velocidad del sonido en la célula	$\frac{m}{s}$	$c_c = \kappa c_f$
$K$	Compresibilidad célula	$Pa^{-1}$	Ec.(3-31)
$V_p$	Volumen promastigotes	$m^3$	Ec.(3-35)
$D$	Diámetro transversal promastigotes	m	Ec.(3-35)
$l$	Largo cuerpo del promastigote	m	Ec.(3-35)
$V_{med}$	Volumen medio	$m^3$	Ec.(3-36)
$V_{total}$	Volumen total de solución	$m^3$	$V_{total} = V_{med} + V_{SIP}$

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$V_{SIP}$	Volumen Solución Isotónica de Percoll	$m^3$	Ec.(3-37)
$R$	Coefficiente de correlación	1	

## Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\eta$	Viscosidad Dinámica	Pa.m	Cuadro2-1
$\xi$	Razón entre viscosidades	1	Ec.(A-67)
$\rho$	Campo escalar de densidad	$\frac{kg}{m^3}$	Ec.(1-4)
$\rho_o, \rho_f$	Densidad inicial del fluido	$\frac{kg}{m^3}$	Cuadro2-1
$\rho_p$	Densidad inicial de la partícula	$\frac{kg}{m^3}$	Cuadro2-1
$\rho_1$	Campo de densidad perturbado	$\frac{kg}{m^3}$	Ec.(1-17)
$\omega$	Frecuencia angular	$\frac{rad}{s}$	$\omega = 2\pi f$
$\gamma$	Factor de amortiguamiento acústico	1	Ec.(1-42)
$\lambda$	Longitud de onda	m	Ec.(1-96)
$\phi_1$	Potencial escalar	$\frac{m^2}{s}$	Ec.(1-113), (1-114)
$\beta_f$	Módulo de elasticidad volumétrico del líquido	Pa	$\beta_f = \rho_o c_o^2$
$\kappa$	Razón entre velocidades del sonido	1	Ec.(1-135)
$\zeta$	Densidad relativa	1	Ec.(1-135)
$\phi$	Factor de contraste acústico	1	Ec.(1-202)
$\phi'$	Constante adimensional	1	Ec.(1-204)
$\delta$	Penetración relativa	m	Figura(2-1)b
$\nu$	Coefficiente de Poisson	1	Cuadro2-1
$\sigma$	Constante Forest-Ruth optimizado	1	Ec.(2-22)
$\varsigma$	Constante Forest-Ruth optimizado	1	Ec.(2-22)
$\chi$	Constante Forest-Ruth optimizado	1	Ec.(2-22)
$\rho_c$	Densidad celular	$\frac{kg}{m^3}$	

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\beta$	Módulo volumétrico célula	Pa	Ec.(3-30)
$\rho_{des}$	Densidad deseada gradientes	$\frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$	Figura(3-25)a
$\rho(y)$	Densidad en función de $y$	$\frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$	$\rho(y) = my + b$

## Subíndices

Subíndice	Término
o	Inicial o fundamental
1	Perturbado o monopolar
2	Dipolar
p	Partícula
$x$	Dirección $x$
$y$	Dirección $y$
$z$	Dirección $z$
pr	Fuerza acústica primaria
ac	Acústico
P	Potencial
$k$	Cinético o $k=i,j$
d	Arrastre
b	Boyante
$i$	i-esima
$j$	j-esima
N	Neta
c	Célula
f	Fluido
pa	Parásito
med	Medio

---

**Subíndice    Término**


---

SIP	Solución Isotónica Percoll
des	Deseada
max	Máxima

## Superíndices

**Superíndice    Término**


---

2	Cuadrado
*	Complejo conjugado
<i>n</i>	Exponente no lineal

## Abreviaturas

**Abreviatura    Término**


---

S.D.	Desviación Estándar
3D	Tres Dimensiones
1D	Una Dimensión
LV	Leishmaniasis visceral
LC	Leishmaniasis cutanea
WT	Tipo Silvestre
LbCLC-A	Gen LbrM01 V2.0210
LbCLC-B	Gen LbrM32 V2.3670
LbCLC-C	Gen LbrM33 V2.1260
LbCLC-D	LbrM04 V2.1010
SFB	Suero Fetal Bobino
SIP	Solución Isotónica Percoll

# Índice de figuras

1-1. Geometría del Dispositivo Acústico. . . . .	18
1-2. Campos de presión en el dispositivo rectangular con paredes rígidas. . . . .	22
1-3. Campo de presión en un dispositivo con paredes suaves. . . . .	24
1-4. Modos de vibración de la cavidad resonante . . . . .	26
1-5. Fuerza acústica sobre una partícula esférica. . . . .	32
2-1. Fuerzas que actúan sobre las partícula en el dispositivo rectangular. . . . .	55
2-2. Comparación solución numérica y analítica en una dimensión. . . . .	63
2-3. Dinámica de partículas dispositivo cúbico rígido ( $n_x = n_y = n_z = 1$ ). . . . .	65
2-4. Dinámica de partículas dispositivo rectangular rígido ( $n_x = 2, n_y = n_z = 1$ ). . . . .	66
2-5. Dinámica de partículas dispositivo rectangular rígido ( $n_x = 3, n_y = n_z = 1$ ). . . . .	67
2-6. Efecto del flujo en la formación de agregados. . . . .	69
2-7. Agregados en un dispositivo con $\ell_x = 4mm$ para paredes rígidas. . . . .	70
2-8. Trayectorias de partículas de $15\mu m$ para paredes rígidas. . . . .	71
2-9. Gráficas posición-tiempo condición de paredes rígidas. . . . .	72
2-10. Rapidez de la partícula Vs posición en condiciones de paredes rígidas. . . . .	73
2-11. Dinámica de partículas dispositivo cúbico paredes suaves ( $n_x = n_y = n_z = 1$ ). . . . .	75
2-12. Dinámica de partículas dispositivo rectangular suave ( $n_x = 2, n_y = n_z = 1$ ). . . . .	76
2-13. Dinámica de partículas dispositivo rectangular suave ( $n_x = 3, n_y = n_z = 1$ ). . . . .	77
2-14. Agregado tipo cadena de perlas en dispositivo con paredes suaves. . . . .	79
2-15. Trayectorias de partículas de $15\mu m$ para paredes suaves. . . . .	80
2-16. Gráficas posición-tiempo condición de paredes suaves. . . . .	81
2-17. Rapidez de la partícula Vs posición en condiciones de paredes suaves. . . . .	82
3-1. Resonadores acústicos contruidos. . . . .	86
3-2. Resonancia en los dispositivos experimentales. . . . .	88
3-3. Trayectoria experimental partícula de $4,5\mu m$ . . . . .	89
3-4. Medición de la $E_{ac}$ para la $\vec{F}_{pr}$ unidimensional. . . . .	90
3-5. Ajuste gráfica $y$ en función de $t$ para $\vec{F}_{pr}$ unidimensional. . . . .	91

3-6. Medición de la $E_{ac}$ para la $\vec{F}_{pr}$ tridimensional. . . . .	92
3-7. Ajuste gráficas de $y$ en función de $t$ para la $\vec{F}_{pr}$ tridimensional. . . . .	93
3-8. Gráfica de la $\vec{F}_{pr}$ en función del ancho del dispositivo. . . . .	94
3-9. Gráfica de $\vec{F}_{pr}$ en $y$ como función del tamaño de partícula. . . . .	95
3-10. Gráfica de la $\vec{F}_{pr}$ en dirección $y$ como función de $\zeta$ . . . . .	97
3-11. Gráfica de $\vec{F}_{pr}$ en $y$ como función del factor $\kappa$ . . . . .	100
3-12. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> . . . . .	107
3-13. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>Leishmania tropica</i> WT. . . . .	108
3-14. Medición de diámetro, área, volumen en promastigotes . . . . .	112
3-15. Medición de diámetro, área, volumen de amastigotes. . . . .	113
3-16. Gráfica de a) diámetro, b) área y c) volumen de promastigotes. . . . .	114
3-17. Gráfica de a) diámetro, b) área y c) volumen para amastigotes. . . . .	115
3-18. Efecto del medio de cultivo en la forma de promastigotes. . . . .	116
3-19. Forma de los parásitos cepa C1. . . . .	118
3-20. Forma de los parásitos cepa C3. . . . .	119
3-21. Forma de los parásitos cepa E1. . . . .	120
3-22. Forma de los parásitos cepa pSP. . . . .	121
3-23. WT T. . . . .	122
3-24. Forma de los parásitos cepa WT B. . . . .	123
3-25. Gradiente de densidad amastigotes <i>L. amazonensis</i> . . . . .	126
3-26. Ajuste lineal tabla 3-13. . . . .	128
3-27. Gradientes de densidad partículas marcadoras. . . . .	129
3-28. Gradiente control de partículas de Látex. . . . .	130
3-29. Gradiente de densidad cepa E1. . . . .	131
3-30. Gradiente de densidad cepa pSP. . . . .	132
3-31. Gradiente de densidad <i>L. trópica</i> silvestre. . . . .	133
3-32. Gradiente de densidad <i>L. braziliensis</i> silvestre. . . . .	134
3-33. Trayectoria experimental dispositivo 2. . . . .	136
3-34. Medición $E_{ac}$ en el dispositivo 2. . . . .	137
3-35. Ajuste trayectorias teórica y experimental en el dispositivo 2. . . . .	138
3-36. Promastigotes cepa Full <i>tropica</i> expuestos al campo acústico. . . . .	139
3-37. Promastigotes cepa E1 expuestos al campo acústico. . . . .	140
3-38. Promastigotes cepa pSP expuestos al campo acústico. . . . .	140
3-39. Promastigotes cepa WT <i>tropica</i> expuestos al campo acústico. . . . .	141
3-40. Promastigotes cepa WT <i>braziliensis</i> expuestos al campo acústico. . . . .	141
3-41. Agregado de partículas de $5\mu m$ en el dispositivo 1. . . . .	142
3-42. Rotación del agregado con promastigotes en el plano $(y, z)$ . . . . .	143
3-43. Movimiento de roseta en el campo acústico. . . . .	143
3-44. Amastigotes cepa E1 expuestos al campo acústico. . . . .	144
3-45. Amastigotes cepa pSP expuestos al campo acústico. . . . .	145

---

<b>3-46.</b> Amastigotes cepa WT <i>trópica</i> expuestos al campo acústico. . . . .	145
<b>3-47.</b> Amastigotes cepa WT <i>braziliensis</i> expuestos al campo acústico. . . . .	146
<b>3-48.</b> Estructura formada por partículas de látex en el nodo. . . . .	146
<b>3-49.</b> Magnitud de la $\vec{F}_{pr}$ en $y$ sobre promastigotes de <i>Leishmania</i> . . . . .	147
<b>3-50.</b> Posición $y$ de promastigotes como función del tiempo. . . . .	148
<b>3-51.</b> Magnitud de la $\vec{F}_{pr}$ en $y$ sobre amastigotes de <i>Leishmania</i> . . . . .	149
<b>3-52.</b> Posición $y$ de amastigotes como función del tiempo. . . . .	150
<b>A-1.</b> Volumen fijo atravesado por un flujo. . . . .	157
<b>D-1.</b> Contador de partículas Coulter Z2. . . . .	179
<b>D-2.</b> Principio básico Coulter. . . . .	180
<b>D-3.</b> Diámetro partículas de $3\mu m$ . . . . .	181
<b>E-1.</b> Calibración de microscopios. . . . .	183
<b>E-2.</b> Volumen de promastigote. . . . .	184



# Índice de cuadros

2-1. Parámetros físicos. . . . .	62
3-1. $\vec{F}_{pr}$ máxima en $y$ para diferentes tamaños de partícula . . . . .	95
3-2. $\vec{F}_{pr}$ máxima en $y$ para diferentes densidades. . . . .	96
3-3. $\vec{F}_{pr}$ máxima en $y$ para $\kappa$ entre 1,0 a 2,0. . . . .	98
3-4. $\vec{F}_{pr}$ máxima en $y$ para $\kappa$ entre 1,00 a 1,10. . . . .	99
3-5. Valores de $\rho_c$ , $K$ y $c_c$ en algunas poblaciones celulares. . . . .	99
3-6. Valores de $c_c$ y $K$ en poblaciones celulares determinados con (3-33). . . . .	104
3-7. Valores de $\rho_c$ , $K$ y $c_c$ en HNC. . . . .	105
3-8. Valores de $\rho_c$ , $K$ y $c_c$ en HNC calculadas con (3-34) . . . . .	106
3-9. Tamaño promastigotes de <i>Leishmania</i> . . . . .	114
3-10. Tamaño amastigotes de <i>Leishmania</i> . . . . .	115
3-11. Volumen estimado promastigotes de <i>Leishmania</i> . . . . .	124
3-12. Densidad y volumen de soluciones en gradientes. . . . .	126
3-13. Distancias en gradiente de Percoll. . . . .	127
3-14. Elasticidad promastigotes de las diferentes cepas de <i>Leishmania</i> . . . . .	135
3-15. Elasticidad amastigotes de las diferentes cepas de <i>Leishmania</i> . . . . .	135



# Introducción

Con los adelantos en los últimos 50 años de chips microelectrónicos se han generado herramientas de construcción totalmente nuevas dentro de la micro y nanofabricación (Barnkob & Bruss, 2009) que han permitido, en las áreas de biología celular, biofísica y biotecnología, el desarrollo de técnicas experimentales para medir propiedades mecánicas de células adherentes, como elasticidad celular, al determinar por contacto su módulo de Young (Zhang *et al.*, 2012). Esto se logra aplicando fuerzas directamente sobre las células con alto grado de precisión, en órdenes de magnitud pequeños, de micro a pico Newtons. Entre estas técnicas se encuentran: microscopia de fuerza atómica, pinzas ópticas y absorción por micropipeta (Lim *et al.*, 2006). Además, estos avances han permitido el desarrollo de métodos de manipulación y caracterización celular que usan campos acústicos estacionarios al interior de un microcanal (Hartono *et al.*, 2011; Laurell *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2018), que no requiere de contacto directo sobre las células, lo cual, puede ser útil al determinar compresibilidad y módulo de elasticidad volumétrico en el caso de células móviles.

En particular, el uso de campos acústicos ultrasónicos acoplados a dispositivos microfluidicos<sup>1</sup> o sistemas lab-on-a-chip<sup>2</sup> han permitido el desarrollo de un nuevo campo de investigación conocido como acustofluídica donde se estudia teórica y experimentalmente las fuerzas mecánicas que se generan al exponer una población celular a un campo acústico en estos dispositivos. Fuerzas que están asociadas con la densidad, el tamaño y la compresibilidad de las células, lo cual hace atractivo la implementación de estos campos en la separación, la manipulación o la caracterización celular porque a diferencia de otros métodos como el ensamble magnético en el cual se requiere etiquetar las células con sondas magnéticas y la dielectroforesis en la que normalmente se usa un medio especial (no conductor) el cual carece de nutrientes esenciales imponiendo diferencias de osmolaridad, que afectan adversamente el crecimiento y la fisiología celular. En el caso de campos acústicos ultrasónicos, al actuar

---

<sup>1</sup> Dispositivos de separación o manipulación Campo-Flujo que tienen más de una dimensión de tamaño micrométrico.

<sup>2</sup> Término que se refiere a montajes de laboratorio con microcanales, por debajo de la escala milimétrica o menor. (Barnkob & Bruss, 2009).

sobre la muestra fuerzas mecánicas que están asociadas a propiedades físicas relacionadas con su masa, no se requiere de un marcaje específico y de un medio particular para separar o manipular la muestra (Guo *et al.* , 2015; Wu *et al.* , 2019). Además, estos campos permiten controlar células para investigar interacciones célula-célula, célula-entorno y estudiar su comportamiento individual, por ejemplo, la respuesta neuronal a estímulos mecánicos de organismos como *C. elegans* (Ding *et al.* , 2012; Guo *et al.* , 2015). Y por otro lado, estas técnicas emplean frecuencias ultrasónicas del orden de  $MHz$ , en las cuales el impacto en viabilidad, función y expresión génica celulares se presume bajo para intensidades bajas/medias ( $< 1W/cm^2$ ), valores que están en el orden de los empleados comúnmente en el diagnóstico por imágenes ultrasónicas (Li *et al.* , 2015; Wiklund, 2012).

En cuanto a la caracterización de las propiedades mecánicas de células en años recientes se ha desarrollado un método de medición indirecto de la compresibilidad celular el cual consiste en determinar la densidad de energía acústica  $E_{ac}$  en el dispositivo a partir del ajuste de las trayectorias experimental y teórica seguidas por partículas con propiedades físicas conocidas cuando son expuestas a un campo acústico estacionario al interior del microcanal. Factor que posteriormente es usado para calcular la compresibilidad celular al tomar esta propiedad como parámetro de ajuste entre la trayectoria experimental y teórica de las células. Usando dicha metodología Hartono *et al.* (2011) midió la compresibilidad de diferentes poblaciones celulares, encontrando, al ajustar las trayectorias, que la compresibilidad de células de cáncer mama  $MCF - 7$  es mayor que en células de mama normales  $MCF - 12A$ , evidenciando con este resultado que las células de cáncer son más deformables que las normales, hecho que puede ser explicado por la reducción de microfilamentos de F-actina, pérdida de microtúbulos y cambios en la disposición de filamentos intermedios en las  $MCF - 7$ , lo que genera en estas células un citoesqueleto más débil y suave (Hartono *et al.* , 2011).

Más recientemente, Wang *et al.* (2018) usando esta misma técnica combinada con la manipulación de células mediante alineamiento por multi-frecuencia<sup>3</sup>, midieron la compresibilidad en células de cáncer de cabeza y cuello (HNC) con diferente potencial metastásico. Hallando que las líneas celulares  $M4e$  y  $37B$  con mayor potencial tienen una compresibilidad más alta que la obtenida en células de las líneas  $Tu686$  y  $686LN$  cuyo potencial metastásico es más bajo, lo cual implica que estas últimas tienen menor posibilidad de migrar hacia otros tejidos siendo menos invasivas (Wang *et al.* , 2018).

Conocer las propiedades mecánicas de las células y cómo éstas cambian por interacciones físicas de la célula con su entorno, aporta información para entender, por un lado, porqué

---

<sup>3</sup> Método que permite controlar la posición de las partículas o células en el dispositivo al usar la frecuencia del segundo armónico en una dirección específica para inicialmente alinear las poblaciones y posteriormente, al estar ya ubicadas en la misma posición, determinar su trayectoria experimental al hacer vibrar el dispositivo en la dirección seleccionada con su frecuencia fundamental (Wang *et al.* , 2018).

cambios de forma y estructura celulares producen respuestas biológicas y bioquímicas que afectan procesos biológicos tales como crecimiento, diferenciación, motilidad y apoptosis celular (Lim *et al.* , 2006). Y por otro, cómo los cambios en estas propiedades se encuentran asociados con el desarrollo de ciertas enfermedades humanas tales como malaria, anemia falciforme y cáncer, entre otras, conocimiento que es de interés ya que estas patologías pueden ser causadas o catalizadas por un comportamiento mecánico irregular en la célula (Rodríguez *et al.* , 2013). Por ejemplo, en la infección de eritrocitos por *Plasmodium falciparum*, Suresh *et al.* (2005) evidenciaron que el módulo de elasticidad de los glóbulos rojos en el estado final de la infección, fase esquizonte, aumenta hasta diez veces comparado con los valores entre  $3 - 8 \mu N/m$  medidos en eritrocitos sanos, cambios que comprometen su elasticidad, dando lugar a deterioro en el flujo de sangre, lo cual, conlleva, en el paciente, a un estado de coma y eventualmente la muerte (Lim *et al.* , 2006). Es importante resaltar que este aumento en la elasticidad de los eritrocitos se atribuye a cambios estructurales y moleculares generados en la membrana celular durante el desarrollo del parásito al interior de la célula (Lim *et al.* , 2006).

Puesto que el grupo de Biofísica y Biología de Membranas de la Universidad Nacional de Colombia ha centrado su interés en dos grandes líneas de trabajo, por un lado se ha dedicado a entender la fisiología de *Leishmania* para identificar blancos terapéuticos contra la enfermedad, lo que ha llevado al estudio de cepas clonadas de *Leishmania* generadas a partir del silenciamiento de cuatro genes, los cuales según lo encontrado en la caracterización funcional de estas cepas, están asociados con la adaptación de parásito a los diferentes ambientes durante su ciclo de vida (Camacho & Lozano, 2015; Garcia, 2016; Lozano, 2012; Parada, 2014; Quintero, 2014; Zapata, 2016). Y por otro lado, se ha concentrado en estudiar y comprender la técnica de campo-flujo SPLITT, en la que se emplean dispositivos microfluidicos junto a campos de fuerza para realizar procesos de separación, permitiendo en el grupo llevar a cabo enriquecimientos de diferentes poblaciones celulares tales como folículos tiroideos (Spinel *et al.* , 2007), macrófagos infectados con *Leishmania* (Hoyos *et al.* , 2009), eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum* (Velasco, 2008), células de cultivo primario obtenidas de nervio ciático de ratón (Vargas, 2013) y vacuolas parasitóforas de *Leishmania amazonensis* (Navarrete, 2013).

La experiencia adquirida por el grupo en el estudio *in vitro* de *Leishmania* y en el uso dispositivos microfluidicos en separación, permitió en este trabajo, con la colaboración del grupo de investigación de Resonadores Ultrasónicos para Cavitación y Micromanipulación del Instituto de Tecnologías Físicas y de la Información (ITEFI) del CSIC, desarrollar un modelo físico tridimensional y usar experimentalmente ondas acústicas estacionarias en el rango de los ultrasonidos para caracterizar físicamente y estudiar el movimiento de parásitos de *Leishmania* de diferentes cepas expuestos a este tipo de campos.

El propósito de medir estas propiedades físicas en parásitos, empleando dispositivo micro-

fluídicos acoplados a campos acústicos, es relacionar a futuro los posibles cambios de propiedades macroscópicas del parásito como volumen, densidad y elasticidad con modificaciones físicas o químicas en las proteínas de alguno de los elementos que conforman el citoesqueleto del parásito. Información que en el caso de *Leishmania* ayudaría a entender cuales son los mecanismos utilizados por el parásito para adaptarse a los diferentes ambientes durante su ciclo de vida, lo que permitiría en trabajos posteriores, asociar dichos cambios con el desarrollo y evolución de las patologías relacionadas a esta infección. Entonces, para el desarrollo del presente trabajo se busco dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación:

**¿Es posible usar ultrasonidos como herramienta tecnológica que permita medir cambios en las propiedades físicas del parásito durante su ciclo de vida?**

Para responder esta pregunta, se tuvo en cuenta, como se describirá en los Capítulos 1 y 2, que la  $\vec{F}_{pr}$  generada al exponer los parásitos a un campo acústico estacionario, depende del volumen, densidad y elasticidad de estos, por lo tanto para dar solución a esta pregunta se plantearon los siguientes objetivos:

## Objetivos

1. Determinar experimentalmente propiedades físicas de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* relacionadas con la acción del campo acústico.
2. Establecer un modelo físico que describa el movimiento de los parásitos sometidos a un campo acústico de una onda estacionaria.
3. Obtener registros experimentales de manipulación acústica de promastigotes y amastigotes de *Leishmania*.

Para describir como se cumplieron estos objetivos el presente documento se encuentra dividido en tres partes: en la primera parte, Capítulo 1, se describe la base teórica de la fuerza primaria de radiación acústica  $\vec{F}_{pr}$ , fuerza que experimentan los parásitos al ser expuestos al campo acústico en el interior del dispositivo construido. Además, en este mismo capítulo, se determinan las expresiones teóricas de la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones. En la segunda parte, Capítulo 2, con las expresiones teóricas para la  $\vec{F}_{pr}$  definidas en el Capítulo 1 se propone un modelo físico que permite, con la solución de las ecuaciones de movimiento de las poblaciones expuestas al campo acústico en el interior de un dispositivo rectangular, estudiar por primera vez el movimiento en tres dimensiones de partículas o células solas o en grupo de  $N$  individuos, esto se logró gracias al desarrollo de un código en C++ en el que se incorporo el algoritmo Forest-Ruth optimizado usado frecuentemente en simulaciones de dinámica molecular. Para terminar, en el Capítulo 3, se presentan los resultados obtenidos al medir propiedades físicas de parásitos de *Leishmania* que afectan la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  tales como su volumen, densidad y compresibilidad, en particular la compresibilidad se determino mediante una expresión que fue definida usando el modelo físico 3D propuesto en el Capítulo

2 y los dispositivos acústicos construidos. Adicionalmente, al final de este Capítulo, se presentan y exponen registros experimentales de la manipulación de los parásitos con el campo acústico, los cuales fueron contrastados con los resultados encontrados con la simulación computacional.

## Fuerza de Radiación Acústica

Al exponer una suspensión de partículas o células a una onda estacionaria ultrasónica al interior de un dispositivo microfluídico, éstas experimentan dos fuerzas de carácter mecánico asociadas con el campo de presión generado al interior del dispositivo. La primera es una fuerza conocida como fuerza primaria de radiación acústica  $\vec{F}_{pr}$  y la segunda es llamada fuerza de radiación acústica secundaria  $\vec{F}_{sec}$  (Doinikov, 2003) (Vargas *et al.*, 2016).

La  $\vec{F}_{pr}$  es una fuerza hidrodinámica que actúa sobre partículas individuales, la cual es generada por la interacción entre la onda incidente y la onda de dispersión producida por cada partícula en suspensión; esta fuerza es estable en el tiempo y su magnitud depende linealmente de la frecuencia. Al actuar sobre una partícula la  $\vec{F}_{pr}$  induce en ésta un movimiento resultante de conducción hacia zonas de equilibrio acústico, nodos o antinodos de la onda estacionaria, zona donde permanece la partícula durante la aplicación del campo acústico (Gor'kov, 1962) (Doinikov, 2003). Por otro lado, las  $\vec{F}_{sec}$  son fuerzas entre partículas que se establecen por la interacción de las ondas dispersadas por cada partícula (Coakley *et al.*, 2000). Una característica de la  $\vec{F}_{sec}$  es que cuando las partículas se ubican en las zonas de equilibrio acústico esta fuerza puede ser atractiva o repulsiva, lo cual, ocurre si la línea que une los centros de dos partículas es paralela a la dirección de propagación de la onda incidente, fuerza repulsiva, o si ésta es perpendicular a la dirección de propagación, fuerza atractiva (Doinikov, 2003) (Laurell *et al.*, 2007).

La magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$ , al igual que la  $\vec{F}_{sec}$ , depende de propiedades físicas de las partículas y el fluido tales como densidad, compresibilidad y tamaño de partícula, sin embargo, a diferencia de  $\vec{F}_{pr}$  la magnitud de  $\vec{F}_{sec}$  tiene una relación inversa con la distancia de separación entre partículas (Weiser *et al.*, 1984), lo cual implica que para  $10\mu m$  la magnitud de la  $\vec{F}_{sec}$  es aproximadamente tres órdenes menor que la de  $\vec{F}_{pr}$ , hecho que fue evidenciado por Haar & Wyard (1978) quienes establecieron, al exponer glóbulos rojos a una onda acústica estacionaria de  $3MHz$  con una potencia de  $1W/cm^2$ , que estas células en suspensión experi-



mentaban una  $\vec{F}_{pr}$  cuya magnitud era igual a  $2 \times 10^{-12}N$ , mientras que, dos glóbulos rojos en contacto o separados una distancia de  $10\mu m$  generaban entre ellos una  $\vec{F}_{sec}$  con magnitud de  $2 \times 10^{-9}N$  y  $2 \times 10^{-14}$ , respectivamente.

Aunque desde hace tiempo se conoce de la existencia de estas fuerzas, como se evidencia en el trabajo desarrollado por Kundt en tubos de resonancia, en el cual se observó el efecto de la  $\vec{F}_{pr}$  sobre el movimiento de partículas de polvo (Barmatz & Collas, 1985) y en los estudios hechos por C. A. Bjerkness y su hijo quienes fueron los primeros en investigar experimental y teóricamente la  $\vec{F}_{sec}$  entre burbujas de gas, conocida como fuerza de Bjerkness o en los desarrollos teóricos realizados por W. König quien determinó una expresión analítica para la  $\vec{F}_{sec}$  entre dos esferas rígidas en un fluido (Doinikov, 2003). En las últimas décadas ha resurgido el interés sobre estas fuerzas, en particular por la  $\vec{F}_{pr}$ , debido a su aplicación en: (i) métodos de separación celular los cuales usan diferencias de tamaño, densidad y compresibilidad, para enriquecer acústicamente diferentes poblaciones celulares, por ejemplo, células tumorales circulantes presentes a bajas concentraciones en sangre periférica (Li *et al.* , 2015) e (ii) caracterización celular al determinar por la aplicación de  $F_{pr}$  propiedades físicas de las células como compresibilidad (Hartono *et al.* , 2011; Wang *et al.* , 2018).

La base teórica de la  $\vec{F}_{pr}$  fue inicialmente desarrollada por King (1934) quien, despreciando los efectos disipativos asociados al líquido, calculó la  $\vec{F}_{pr}$  sobre partículas esféricas rígidas expuestas a ondas planas viajeras y estacionarias bajo la condición  $\frac{r_o}{\lambda} \ll 1$ , donde la longitud de la onda  $\lambda$  es mucho mayor que el radio de la partícula  $r_o$ . Sin embargo, y a pesar de que la teoría de King explicaba el por qué partículas rígidas dispersas en el medio se agrupaban cerca de los nodos o antinodos de la onda estacionaria, ésta no era adecuada si la compresibilidad de la partícula era comparable o mucho mayor que la del líquido (Doinikov, 2003). Por lo tanto, Yosioka & Kawaaima (1955) usando las ecuaciones para un fluido compresible ideal y asumiendo  $\frac{r_o}{\lambda} \ll 1$  encontraron las expresiones teóricas de la  $\vec{F}_{pr}$  para partículas compresibles, como gotas de líquido y burbujas, sometidas a la acción de los campos generados por ondas planas viajeras y estacionarias (Doinikov, 2003).

Usando una aproximación diferente Gor'kov (1962) generalizó los resultados encontrados por King (1934) y Yosioka & Kawaaima (1955), al derivar una expresión útil del potencial acústico  $U_{ac}$  con la cual se calcula la  $\vec{F}_{pr}$  que actúa sobre una partícula esférica suspendida en un fluido ideal, bajo la condición  $\frac{r_o}{\lambda} \ll 1$  (Barmatz & Collas, 1985). El método desarrollado por Gor'kov (1962) se basa en la teoría lineal de dispersión donde el potencial del campo vectorial de velocidad es escrito como la suma de un potencial asociado a la onda incidente más otro potencial relacionado con la onda dispersada (Barmatz & Collas, 1985), lo que permite definir el  $U_{ac}$  en términos de los coeficientes lineales de dispersión  $f_1$  y  $f_2$  relacionados con las propiedades físicas de la partícula y el medio, por lo tanto, estos coeficientes dependen del tipo de partícula.

Si bien los desarrollos teóricos mencionados anteriormente predecían correctamente la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  para el caso de ondas estacionarias, éstos no mostraban relación con los resultados experimentales asociados a la  $\vec{F}_{pr}$  en ondas viajeras, discrepancia que fue asociada con los efectos disipativos despreciados por King (1934) y Yosioka & Kawaaima (1955) en sus cálculos (Doinikov, 2003). Entonces, para estudiar la relación entre la  $\vec{F}_{pr}$  y los fenómenos de disipación de la energía Doinikov (1997a) determinó una ecuación general para esta fuerza teniendo en cuenta la viscosidad y la conducción de calor del fluido. Expresión que fue aplicada posteriormente en el cálculo de la  $\vec{F}_{pr}$  sobre partículas rígidas (Doinikov, 1997b) y compresibles (Doinikov, 1997c) expuestas a ondas sonoras planas estacionarias y viajeras; encontrando para el caso de una onda estacionaria que si el espesor de la capa límite  $\delta$  sobre la partícula esférica era menor que su radio ( $r_o \gg \delta$ ) las correcciones de la  $\vec{F}_{pr}$  asociadas con la viscosidad eran despreciables (Wei *et al.* , 2004).

Debido a los usos de la  $\vec{F}_{pr}$  en la manipulación de poblaciones biológicas con tamaños micro y nanométrico, tales como células de diferentes tipos (Vargas *et al.* , 2016) o moléculas de ADN (Yasuda *et al.* , 1996), durante la última década se han realizado diferentes esfuerzos para mejorar y refinar los modelos teóricos que describen adecuadamente la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  a estas escalas. Es así como Bruss (2012) calculó en el caso no viscoso, al usar la aproximación de Gor'kov (1962), la  $\vec{F}_{pr}$  sobre partículas de tamaño micrométrico. Relación que fue modificada por Settnes & Bruus (2012) al considerar poblaciones con diámetros menores a  $3\mu m$ , escala en la que el espesor de la capa límite  $\delta$  es equivalente al tamaño del objeto, por lo tanto, según los estudios hechos por Doinikov, fue necesario en la expresión de la  $\vec{F}_{pr}$  incluir, dentro del coeficiente de dispersión  $f_2$ , correcciones relacionadas con la viscosidad del líquido.

Entonces, con el objetivo de usar la  $\vec{F}_{pr}$  para manipular y caracterizar propiedades mecánicas de parásitos del genero *Leishmania*, los cuales son responsables de generar la enfermedad conocida como leishmaniasis. En este capítulo se presentan los fundamentos teóricos de la  $\vec{F}_{pr}$  al calcular su expresión en tres, dos y una dimensión, sobre una partícula esférica compresible de tamaño micrométrico  $r_o > 3\mu m$ ; expuesta al interior de un dispositivo rectangular a un campo acústico estacionario que cumple con la condición  $\delta \ll r_o \ll \lambda$ , de modo que se desprecian los efectos relacionados con la viscosidad del líquido, limite no viscoso. Esto se hace, partiendo de las ecuaciones fundamentales de la dinámica de fluidos y de la teoría de perturbaciones, con las que se obtiene la ecuación de onda en el caso de sonido que se propaga en un líquido compresible, usando el método descrito en Landau & Lifshitz (1991) y explicado con mayor detalle en los textos de (Bruss, 2008) y Laurell & Lenshof (2015). Luego con la solución de la ecuación de onda para una onda estacionaria establecida al interior del dispositivo rectangular con paredes rígidas, se determina la  $\vec{F}_{pr}$  usando la expresión del potencial acústico  $U_{ac}$  desarrollada por Gor'kov (1962).

## 1.1. Ecuación De Onda En Un Líquido

Para determinar la ecuación de onda en un líquido compresible, se parte del conjunto de ecuaciones que describen el estado de movimiento de un fluido viscoso, las cuales, como se describe en el Apéndice A, tienen la forma

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho \vec{v}) \quad (1-1)$$

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = \eta \nabla^2 \vec{v} + \xi \eta \nabla (\nabla \cdot \vec{v}) - \nabla p - \rho (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \quad (1-2)$$

$$p = p(\rho) \quad (1-3)$$

Donde (1-1) es la ecuación de continuidad que describe el principio de conservación de la masa, (1-2) representa la ecuación de Navier-Stokes la cual determina el movimiento del fluido a partir del análisis de las interacciones entre éste y su entorno y (1-3) es la ecuación de estado termodinámico que relaciona la presión del líquido con su densidad para el caso adiabático. Es importante resaltar que en (1-1), (1-2) y (1-3) las cantidades  $p(\vec{r}, t)$ ,  $\rho(\vec{r}, t)$  y  $\vec{v}(\vec{r}, t)$  corresponden a los campos escalares y vectorial de presión, densidad y velocidad respectivamente, que pueden evolucionar en el tiempo  $t$  en una posición  $\vec{r}$  fija en el espacio, según la descripción Euleriana de un fluido<sup>1</sup>. Además, en (1-2) la constante  $\eta$  representa la viscosidad dinámica del fluido y  $\xi$  es un coeficiente adimensional dado por la razón entre la segunda viscosidad y la viscosidad dinámica del fluido, definido en la ecuación (A-67) del Apéndice A.

Entonces, considerando un líquido con densidad  $\rho_o$  y presión  $p_o$  constantes sobre el que no se propaga ninguna onda sonora, es decir, con un campo de velocidad en el estado inicial igual a  $\vec{v}_o = 0$ . Ahora suponiendo que en un instante posterior se propaga en este medio una onda acústica la cual genera pequeñas perturbaciones en el líquido que alteran, con respecto a su estado inicial, los campos de densidad  $\rho$ , presión  $p$  y velocidad  $\vec{v}$ , cuyos valores para este nuevo estado perturbado estarán dados por:

$$\rho = \rho_o + \rho_1 \quad (1-4)$$

<sup>1</sup> Se debe tener en cuenta al leer los cálculos desarrollados que los campos escritos como  $p$ ,  $\rho$  y  $\vec{v}$ , al igual que los campos perturbados, tienen dependencia espacial y temporal, la cual no es colocada explícitamente con el propósito de simplificar la escritura de las ecuaciones. Sin embargo, si alguno de estos campos depende únicamente de la posición o del tiempo se especificará su dependencia con alguna de estas variables.

$$p = p_o + \left( \frac{\partial p}{\partial \rho} \right)_s \rho_1 \quad (1-5)$$

$$\vec{v} = \vec{v}_1 \quad (1-6)$$

Siendo  $\rho_1$ ,  $p_1 = (\partial p / \partial \rho)_s \rho_1$  y  $\vec{v}_1$  los campos asociados con las pequeñas perturbaciones en el líquido al propagarse la onda sonora. Se debe notar que (1-5) es la forma explícita de la ecuación de estado termodinámico del medio en el caso adiabático donde la entropía permanece constante, expresión (1-3). Por lo tanto la relación (1-5) también es conocida como expansión isoentrópica, en la cual la derivada  $(\partial p / \partial \rho)_s$  representa la variación de la presión en función de la densidad a entropía constante, término que es asociado, mediante análisis dimensional Apéndice C , con la velocidad del sonido al cuadrado en el líquido  $c_o^2 = (\partial p / \partial \rho)_s$ .

Ahora, remplazando los campos  $\rho$ ,  $p$  y  $\vec{v}$ , para el estado inicial y estado perturbado, en las ecuaciones (1-1) (1-2) y usando la teoría de perturbaciones, Apéndice B, se obtiene para la ecuación de continuidad (1-1) en el estado inicial

$$\frac{\partial \rho_o}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho_o \vec{v}_o) \quad (1-7)$$

Recordando que  $\vec{v}_o = 0$ , se llega a

$$\frac{\partial \rho_o}{\partial t} = 0 \quad (1-8)$$

Relación que corresponde a la ecuación diferencial homogénea (orden cero) de (1-1). Por otro lado, para el estado perturbado al sustituir (1-4) y (1-6) en la ecuación de continuidad (1-1) se obtiene

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho_o + \rho_1) = -\nabla \cdot [(\rho_o + \rho_1) \vec{v}_1] \quad (1-9)$$

$$\frac{\partial \rho_o}{\partial t} + \frac{\partial \rho_1}{\partial t} = -\rho_o \nabla \cdot \vec{v}_1 - \rho_1 \nabla \cdot \vec{v}_1 \quad (1-10)$$

Haciendo cero el primer término de la izquierda en (1-10) , ver relación (1-8), y despreciando, según lo descrito en el Apéndice B , el producto  $\rho_1 \nabla \cdot \vec{v}_1$  entre las cantidades de primer orden, esta ecuación toma la forma

$$\frac{\partial \rho_1}{\partial t} = -\rho_o \nabla \cdot \vec{v}_1 \quad (1-11)$$

Así que (1-11) representa la ecuación de continuidad obtenida de los términos de primer orden en la perturbación. El siguiente paso es realizar el mismo procedimiento con (1-2) para obtener las relaciones de orden cero y primer orden en el caso de la ecuación de Navier-Stokes, por lo tanto al sustituir los campos asociados con el estado inicial en (1-2) se llega a:

$$\rho_o \frac{\partial \vec{v}_o}{\partial t} = \eta \nabla^2 \vec{v}_o + \xi \eta \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_o) - \nabla p_o - \rho_o (\vec{v}_o \cdot \nabla) \vec{v}_o \quad (1-12)$$

Donde nuevamente  $\vec{v}_o = 0$ , entonces la relación anterior se transforma en

$$\nabla p_o = 0 \quad (1-13)$$

La cual es la relación de orden cero para la ecuación (1-2). Ahora introduciendo los campos perturbados (1-4), (1-5) y (1-6) en (1-2)

$$\begin{aligned} (\rho_o + \rho_1) \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} &= \eta \nabla^2 \vec{v}_1 + \xi \eta \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) \\ &\quad - \nabla (p_o + c_o^2 \rho_1) - (\rho_o + \rho_1) (\vec{v}_1 \cdot \nabla) \vec{v}_1 \end{aligned} \quad (1-14)$$

$$\begin{aligned} \rho_o \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} + \rho_1 \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} &= \eta \nabla^2 \vec{v}_1 + \xi \eta \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) \\ &\quad - \nabla p_o - c_o^2 \nabla \rho_1 - \rho_o (\vec{v}_1 \cdot \nabla) \vec{v}_1 - \rho_1 (\vec{v}_1 \cdot \nabla) \vec{v}_1 \end{aligned} \quad (1-15)$$

Teniendo en cuenta la ecuación (1-13) y recordando que términos con productos entre cantidades de primer orden se desprecian, la relación (1-15) se escribe como

$$\rho_o \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} = \eta \nabla^2 \vec{v}_1 + \xi \eta \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) - c_o^2 \nabla \rho_1 \quad (1-16)$$

Donde (1-16) corresponde a la ecuación de Navier-Stokes obtenida de los términos de primer orden. Entonces, resumiendo el procedimiento anterior, se tiene que al definir pequeñas perturbaciones en el líquido cuando una onda acústica se propaga en su interior, campos perturbados, es posible mediante la teoría de perturbaciones descrita en el Apéndice B y aplicada en el desarrollo previo obtener el conjunto de ecuaciones (1-8), (1-11), (1-13) y (1-16), las cuales permiten encontrar la ecuación de onda en un medio compresible. Para ello se asume que la onda acústica al propagarse en el líquido genera campos de densidad  $\rho_1$ , presión  $p_1$  y velocidad  $\vec{v}_1$  con dependencia temporal armónica que están definidos por

$$\rho_1 = \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \quad (1-17)$$

$$p_1 = p_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \quad (1-18)$$

$$\vec{v}_1 = \vec{v}_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \quad (1-19)$$

En los que  $\omega = 2\pi f$  representa la frecuencia angular y donde la parte espacial del campo de presión puede ser escrita como

$$p_1(\vec{r}) = c_o^2 \rho_1(\vec{r}) \quad (1-20)$$

Según se definió en la expansión isoentrópica hecha para el campo de presiones perturbado ecuación (1-5). Ahora derivando con respecto al tiempo la ecuación de continuidad (1-11) se llega a

$$\frac{\partial}{\partial t} \left( \frac{\partial \rho_1}{\partial t} \right) = \frac{\partial}{\partial t} (-\rho_o \nabla \cdot \vec{v}_1) \quad (1-21)$$

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = -\nabla \cdot \left( \rho_o \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} \right) \quad (1-22)$$

Remplazando el término entre paréntesis de (1-22) por la ecuación (1-16) de Navier-Stokes de primer orden, se encuentra que

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = -\nabla \cdot \left[ \eta \nabla^2 \vec{v}_1 + \xi \eta \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) - c_o^2 \nabla \rho_1 \right] \quad (1-23)$$

Utilizando la identidad vectorial  $\nabla^2 \vec{A} = \nabla (\nabla \cdot \vec{A}) - \nabla \times (\nabla \times \vec{A})$  aplicada al vector velocidad  $\vec{v}_1$ , entonces

$$\nabla^2 \vec{v}_1 = \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) - \nabla \times (\nabla \times \vec{v}_1) \quad (1-24)$$

Recordando, según se definió en el Apéndice A, que el vector velocidad se puede escribir como el gradiente de un campo escalar  $\vec{v} = \nabla \phi$ , por lo tanto se tiene que  $\nabla \times \vec{v} = 0$ , con lo cual la identidad (1-24) toma la forma

$$\nabla^2 \vec{v}_1 = \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) \quad (1-25)$$

Sustituyendo (1-25) en la ecuación (1-23) y multiplicando el operador nabla con los términos entre corchetes cuadrados

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = -\eta \nabla^2 (\nabla \cdot \vec{v}_1) - \xi \eta \nabla^2 (\nabla \cdot \vec{v}_1) + c_o^2 \nabla^2 \rho_1 \quad (1-26)$$

Ahora factorizando en (1-26) el producto  $-\eta \nabla^2 (\nabla \cdot \vec{v}_1)$

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = c_o^2 \nabla^2 \rho_1 - (1 + \xi) \eta \nabla^2 (\nabla \cdot \vec{v}_1) \quad (1-27)$$

Tomando la ecuación de continuidad (1-11) y despejando el término  $(\nabla \cdot \vec{v}_1)$

$$\nabla \cdot \vec{v}_1 = -\frac{1}{\rho_o} \frac{\partial \rho_1}{\partial t} \quad (1-28)$$

Introduciendo (1-28) en la expresión (1-27) se obtiene

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = c_o^2 \nabla^2 \rho_1 + \frac{(1 + \xi) \eta}{\rho_o} \nabla^2 \left( \frac{\partial \rho_1}{\partial t} \right) \quad (1-29)$$

Multiplicando el último término de la derecha de (1-29) por  $c_o^2/c_o^2$  se llega a la ecuación

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = c_o^2 \nabla^2 \rho_1 + \frac{(1 + \xi) \eta}{c_o^2 \rho_o} c_o^2 \nabla^2 \left( \frac{\partial \rho_1}{\partial t} \right) \quad (1-30)$$

Es importante resaltar que (1-30) está escrita solo en términos del campo escalar de densidad  $\rho_1$ . El siguiente paso es reescribir esta ecuación como función del campo escalar de presiones  $p_1$ , para ello primero se calcularán las derivadas temporales en (1-30) del campo de densidad usando (1-17), entonces al calcular la primera derivada temporal se llega a

$$\frac{\partial \rho_1}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} \left[ \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] \quad (1-31)$$

$$\frac{\partial \rho_1}{\partial t} = \rho_1(\vec{r}) \frac{\partial}{\partial t} \exp(-i\omega t) \quad (1-32)$$

$$\frac{\partial \rho_1}{\partial t} = -i\omega \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \quad (1-33)$$

Para encontrar la segunda derivada temporal se deriva (1-33) nuevamente con respecto al tiempo con lo que se obtiene

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = \frac{\partial}{\partial t} \left[ -i\omega \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] \quad (1-34)$$

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = -i\omega \rho_1(\vec{r}) \frac{\partial}{\partial t} \exp(-i\omega t) \quad (1-35)$$

$$\frac{\partial^2 \rho_1}{\partial t^2} = i^2 \omega^2 \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \quad (1-36)$$

Remplazando (1-17), (1-33) y (1-36) en la ecuación (1-30)

$$i^2 \omega^2 \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) = c_o^2 \nabla^2 \left[ \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] + \frac{(1+\xi)\eta}{c_o^2 \rho_o} c_o^2 \nabla^2 \left[ -i\omega \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] \quad (1-37)$$

Puesto que el operador diferencial Laplaciano ( $\nabla^2$ ) depende solo de derivadas espaciales es posible en (1-37) eliminar los términos temporales haciendo que esta ecuación tome la forma

$$i^2 \omega^2 \rho_1(\vec{r}) = c_o^2 \nabla^2 \rho_1(\vec{r}) - i\omega \frac{(1+\xi)\eta}{c_o^2 \rho_o} c_o^2 \nabla^2 \rho_1(\vec{r}) \quad (1-38)$$

Ahora multiplicando el termino de la izquierda en (1-38) por  $c_o^2/c_o^2$  y recordando que el campo de presiones dependiente de la posición se puede escribir como la multiplicación entre la velocidad del sonido y el campo de densidad, ecuación (1-20), la relación anterior se escribe como

$$-\frac{\omega^2}{c_o^2} c_o^2 \rho_1(\vec{r}) = \nabla^2 c_o^2 \rho_1(\vec{r}) - i\omega \frac{(1+\xi)\eta}{c_o^2 \rho_o} \nabla^2 c_o^2 \rho_1(\vec{r}) \quad (1-39)$$

$$-\frac{\omega^2}{c_o^2} p_1(\vec{r}) = \nabla^2 p_1(\vec{r}) - i\omega \frac{(1+\xi)\eta}{c_o^2 \rho_o} \nabla^2 p_1(\vec{r}) \quad (1-40)$$

Factorizando el Laplaciano  $\nabla^2 p_1(\vec{r})$ , entonces

$$-\frac{\omega^2}{c_o^2} p_1(\vec{r}) = \left( 1 - i\omega \frac{(1+\xi)\eta}{c_o^2 \rho_o} \right) \nabla^2 p_1(\vec{r}) \quad (1-41)$$



Definiendo en (1-41) la constante sin dimensiones, Apéndice C,

$$\gamma = \omega \frac{(1 + \xi) \eta}{2c_o^2 \rho_o} \quad (1-42)$$

La cual se conoce como factor de amortiguamiento acústico, que en el caso del agua tiene un orden de magnitud pequeño de  $10^{-6}$ , por lo tanto, (1-41) se expresa en la forma

$$-\frac{\omega^2}{c_o^2} p_1(\vec{r}) = (1 - 2i\gamma) \nabla^2 p_1(\vec{r}) \quad (1-43)$$

Usando la serie de potencias con  $x = i\gamma$

$$\frac{1}{(1+x)^2} = 1 - 2x + 3x^2 - 4x^3 + \dots + n(-1)^{n+1} x^{n-1} \quad (1-44)$$

$$\frac{1}{(1+i\gamma)^2} = 1 - 2i\gamma + 3(i\gamma)^2 - 4(i\gamma)^3 + \dots + n(-1)^{n+1} (i\gamma)^{n-1} \quad (1-45)$$

Recordando que el factor de amortiguamiento  $\gamma$  tiene orden de magnitud pequeño, entonces los términos con potencia dos o mayor pueden ser despreciados, llegado a

$$\frac{1}{(1+i\gamma)^2} \approx 1 - 2i\gamma \quad (1-46)$$

El siguiente paso es sustituir (1-46) en (1-43) con lo que se obtiene

$$-\frac{\omega^2}{c_o^2} p_1(\vec{r}) = \left[ \frac{1}{(1+i\gamma)^2} \right] \nabla^2 p_1(\vec{r}) \quad (1-47)$$

$$-\left[ \frac{\omega}{c_o} (1+i\gamma) \right]^2 p_1(\vec{r}) = \nabla^2 p_1(\vec{r}) \quad (1-48)$$

Donde el término entre corchetes cuadrados corresponde al número de onda para el caso del sonido propagándose en un medio elástico, se debe notar que  $k$  tiene una parte imaginaria, sin embargo, es importante recordar que es la parte real de este número la que tiene la información física del problema

$$k = \frac{\omega}{c_o} (1+i\gamma) \quad (1-49)$$

Definiendo el número  $k_o = \omega/c_o$ , se tiene que el número de onda imaginario se puede representar como

$$k^2 = \left[ k_o (1 + i\gamma) \right]^2 \quad (1-50)$$

Para terminar se sustituye (1-50) en (1-48) con lo cual se obtiene que

$$\nabla^2 p_1(\vec{r}) = -k^2 p_1(\vec{r}) \quad (1-51)$$

La expresión (1-51) se conoce como ecuación de Helmholtz para ondas amortiguadas cuyo número de onda esta dado por (1-49). La solución de (1-51) da la parte espacial de la ecuación de onda que en este caso corresponde al campo escalar de presiones  $p_1(\vec{r})$ . Para calcular la ecuación de onda dependiente del tiempo, se asume en (1-47) que el campo de presiones tiene dependencia temporal dada por (1-18), entonces derivando este campo respecto al tiempo

$$\frac{\partial p_1}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} \left[ c_o^2 \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] \quad (1-52)$$

$$\frac{\partial p_1}{\partial t} = -i\omega c_o^2 \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \quad (1-53)$$

$$\frac{\partial p_1}{\partial t} = -i\omega p_1 \quad (1-54)$$

Para que la ecuación (1-54) sea valida se debe cumplir que

$$\frac{\partial}{\partial t} = -i\omega \quad (1-55)$$

$$\omega^2 = \frac{1}{i^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \quad (1-56)$$

Sustituyendo  $\omega^2$  en la expresión (1-47) se obtiene

$$-\left( \frac{1}{i^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) \frac{1}{c_o^2} p_1 = \left( \frac{1}{(1 + i\gamma)^2} \right) \nabla^2 p_1 \quad (1-57)$$

Si  $i^2 = -1$  y  $c_o$  es constante, el operador diferencial asociado con la derivada temporal en (1-57) actúa únicamente sobre el campo escalar  $p_1$  con lo que se llega a

$$\frac{1}{c_o^2} \frac{\partial^2 p_1}{\partial t^2} = \left( \frac{1}{(1 + i\gamma)^2} \right) \nabla^2 p_1 \quad (1-58)$$

$$\nabla^2 p_1 = \left( \frac{(1 + i\gamma)^2}{c_o^2} \right) \frac{\partial^2 p_1}{\partial t^2} \quad (1-59)$$

Escribiendo el número complejo en (1-59) como  $(1 + i\gamma)^2 = 1 + 2i\gamma - \gamma^2$  esta ecuación puede ser expresada, al tomar la parte real, en la forma

$$\nabla^2 p_1 = \left( \frac{1 - \gamma^2}{c_o^2} \right) \frac{\partial^2 p_1}{\partial t^2} \quad (1-60)$$

La relación (1-60) corresponde a la ecuación de onda amortiguada en tres dimensiones, cuya solución es el campo escalar de presiones  $p_1$  generado por una onda sonora que se propaga con velocidad del sonido  $c_o$  en un medio líquido. Sin embargo, si el medio de propagación tiene un coeficiente de amortiguamiento pequeño como en el caso del agua, entonces,  $\gamma^2$  puede ser despreciado, lo que permite escribir (1-60) como

$$\nabla^2 p_1 = \frac{1}{c_o^2} \frac{\partial^2 p_1}{\partial t^2} \quad (1-61)$$

La relación (1-61) representa la ecuación de onda, en el caso en el que se desprecian las fuerzas asociadas con la viscosidad, es decir, cuando  $\eta = 0$ , esta aproximación es conocida como ecuación de onda no viscosa. Las soluciones de (1-61) dependen del tipo de onda y de la geometría del problema, por ejemplo, si lo que se desea estudiar es una onda sonora viajera plana, onda que se propaga libremente en el espacio, la solución de (1-61) tienen la forma

$$p_1 = \Delta p_{1_{max}} \sin(\vec{k} \cdot \vec{r} \pm \omega t) \quad (1-62)$$

Donde  $\vec{k}$  y  $\vec{r}$  corresponden a los vectores de onda y de posición respectivamente y  $\Delta p_{1_{max}}$  representa la amplitud máxima de presión de la onda, que es constante debido a que se desprecian los términos disipativos asociados con la viscosidad. Por otro lado, si se quiere estudiar ondas sonoras estacionarias generadas al interior de una cavidad resonante la solución general de (1-61) esta dada por

$$p_1 = p_1(\vec{r}) \cos \omega t \quad (1-63)$$

La forma del campo escalar  $p_1(\vec{r})$  en (1-63) se encuentra al solucionar la ecuación de Helmholtz (1-51) para una geometría y condiciones de frontera dadas.

## 1.2. Ondas Estacionarias En Un Dispositivo Rectangular

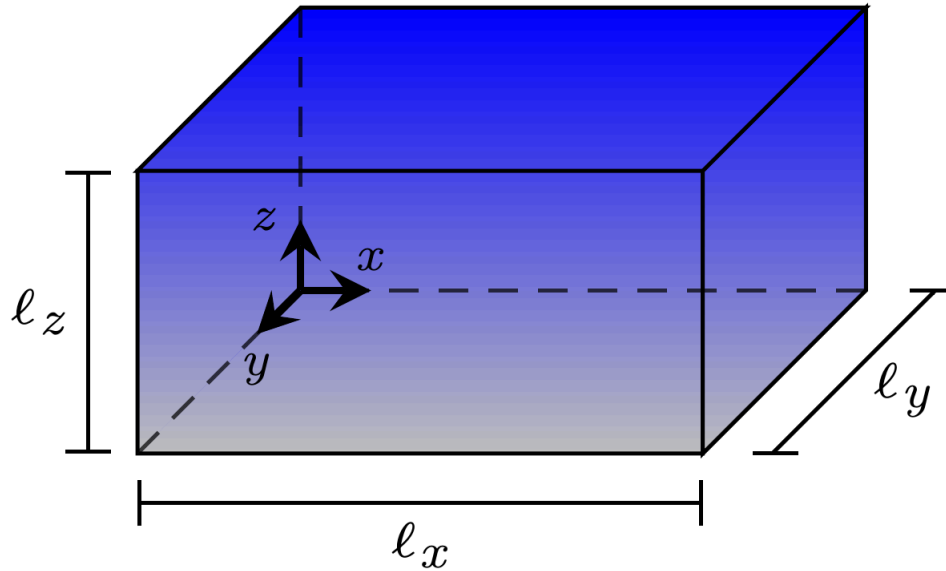


Figura 1-1.: Geometría del Dispositivo Acústico.

En esta sección se determina la solución (1-63), asociada con ondas sonoras estacionarias generadas al interior de un dispositivo acústico rectangular lleno de un medio elástico, como agua, Figura 1-1. Solución que se establece para dos casos particulares, el primero corresponde a un dispositivo con todas sus paredes rígidas y el segundo a un dispositivo en el cual las paredes en dirección  $x$  son suaves.

Entonces, suponiendo que al interior de este dispositivo se propagan ondas sonoras planas en las tres direcciones del espacio, las cuales son reflejadas al llegar a las paredes rígidas o suaves, lo que establece, por la superposición entre las ondas incidentes y las ondas reflejadas, modos de vibración al interior de la cavidad rectangular que son característicos del sistema, los cuales están definidos por la frecuencia de las ondas sonoras y por las propiedades físicas del medio como su densidad y elasticidad. Estas ondas sonoras estacionarias establecen un campo escalar de presiones  $p_1$  en el líquido que se encuentra descrito por la ecuación (1-63) y cuya parte espacial  $p_1(\vec{r})$  se obtiene al solucionar (1-51). Por lo tanto, según la geometría mostrada en la Figura 1-1, la ecuación de Helmholtz (1-51), se puede escribir en coordenadas cartesianas como

$$\frac{\partial^2 p_1(\vec{r})}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 p_1(\vec{r})}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 p_1(\vec{r})}{\partial z^2} + k^2 p_1(\vec{r}) = 0 \quad (1-64)$$

Para solucionar (1-64) se emplea el método de separación de variables descrito en Arfken (1985). De modo que se asume que las coordenadas cartesianas son independientes entre si, lo que permite definir el campo de presiones  $p_1(\vec{r})$  en la forma

$$p_1(\vec{r}) = p_1(x, y, z) = p_x(x) p_y(y) p_z(z) \quad (1-65)$$

Ahora, usando (1-65) para separar (1-64) en tres ecuaciones diferenciales ordinarias, se reemplaza (1-65) en (1-64), con lo que se obtiene

$$p_y(y) p_z(z) \frac{\partial^2 p_x(x)}{\partial x^2} + p_x(x) p_z(z) \frac{\partial^2 p_y(y)}{\partial y^2} + p_x(x) p_y(y) \frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} + k^2 p_x(x) p_y(y) p_z(z) = 0 \quad (1-66)$$

El siguiente paso es dividir (1-66) por (1-65), para llegar a

$$\frac{1}{p_x(x)} \frac{\partial^2 p_x(x)}{\partial x^2} + \frac{1}{p_y(y)} \frac{\partial^2 p_y(y)}{\partial y^2} + \frac{1}{p_z(z)} \frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} + k^2 = 0 \quad (1-67)$$

Dejando el término relacionado con la coordenada  $x$  a lado izquierdo de la ecuación y todo lo demás en la parte derecha (1-67) se puede expresar en la forma

$$\frac{1}{p_x(x)} \frac{\partial^2 p_x(x)}{\partial x^2} = -\frac{1}{p_y(y)} \frac{\partial^2 p_y(y)}{\partial y^2} - \frac{1}{p_z(z)} \frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} - k^2 \quad (1-68)$$

Recordando que las tres coordenadas espaciales se han asumido como independientes, por consiguiente, es posible igualar el termino izquierdo en (1-68) a una constante

$$\frac{1}{p_x(x)} \frac{\partial^2 p_x(x)}{\partial x^2} = -k_x^2 \quad (1-69)$$

Sustituyendo (1-69) en la ecuación (1-68)

$$-k_x^2 = -\frac{1}{p_y(y)} \frac{\partial^2 p_y(y)}{\partial y^2} - \frac{1}{p_z(z)} \frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} - k^2 \quad (1-70)$$

Reescribiendo (1-70) de tal manera que el término asociado con la coordenada  $y$  quede al lado izquierdo y todo lo demás al lado derecho

$$\frac{1}{p_y(y)} \frac{\partial^2 p_y(y)}{\partial y^2} = k_x^2 - \frac{1}{p_z(z)} \frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} - k^2 \quad (1-71)$$

Asumiendo nuevamente que el termino de lado izquierdo es igual a una constante

$$\frac{1}{p_y(y)} \frac{\partial^2 p_y(y)}{\partial y^2} = -k_y^2 \quad (1-72)$$

Remplazando (1-72) en (1-71)

$$-k_y^2 = k_x^2 - \frac{1}{p_z(z)} \frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} - k^2 \quad (1-73)$$

Por último, haciendo lo mismo con la coordenada  $z$

$$\frac{1}{p_z(z)} \frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} = k_x^2 + k_y^2 - k^2 \quad (1-74)$$

Igualando el factor del lado izquierdo en (1-74) a una constante

$$\frac{1}{p_z(z)} \frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} = -k_z^2 \quad (1-75)$$

Tomando (1-75) e introduciendo  $k_z^2$  en (1-74) se encuentra que la magnitud del número de onda en tres dimensiones puede ser escrita como

$$-k_z^2 = k_x^2 + k_y^2 - k^2 \quad (1-76)$$

$$k^2 = k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 \quad (1-77)$$

Es importante resaltar que por medio del método de separación de variables se logro dividir la ecuación (1-64) en el conjunto de ecuaciones (1-69), (1-72) y (1-75). Las cuales representan ecuaciones diferenciales ordinarias de segundo orden asociadas de manera independiente con cada una de las dimensiones del espacio y cuyas soluciones son las funciones  $p_x(x)$ ,  $p_y(y)$  y  $p_z(z)$ , que al ser remplazadas en (1-65) determinan la solución general de la ecuación de Helmholtz (1-64) en tres dimensiones.

Con el propósito de encontrar fácilmente la solución de (1-69), (1-72) y (1-75), para los dos casos de interés, se debe notar al igualar a cero estas ecuaciones que su forma matemática es del tipo oscilador armónico, como se observa en (1-78), (1-79) y (1-80).

$$\frac{\partial^2 p_x(x)}{\partial x^2} + k_x^2 p_x(x) = 0 \quad (1-78)$$

$$\frac{\partial^2 p_y(y)}{\partial y^2} + k_y^2 p_y(y) = 0 \quad (1-79)$$

$$\frac{\partial^2 p_z(z)}{\partial z^2} + k_z^2 p_z(z) = 0 \quad (1-80)$$

Por lo tanto las funciones solución de las relaciones anteriores pueden ser expresadas en términos de seno o coseno, sin embargo, para determinar las soluciones correctas es necesario tener en cuenta las condiciones de frontera dadas en cada caso de interés. Entonces, a continuación se presentan las soluciones de (1-78), (1-79) y (1-80) al considerar primero un dispositivo rectangular con todas sus paredes rígidas y segundo un dispositivo rectangular con paredes suaves en la dirección  $x$ .

El cambio en las condiciones de frontera en dirección  $x$  esta relacionado con el hecho de considerar el dispositivo rectangular como un canal en el que se introduce líquido de forma controlada a lo largo de  $x$ . Por consiguiente, el caso de paredes rígidas puede ser asumido como una situación completamente teórica de una cámara rectangular resonante. Sin embargo, la condición de paredes suaves en  $x$ , puede ser considerando como una situación en la cual se unen los extremos del dispositivo rectangular a conectores de otro material que permiten, por medio de bombas, el ingreso controlado de líquido convirtiendo a este sistema en un canal.

### 1.2.1. Solución Paredes Rígidas

Asumiendo un estado fundamental de resonancia en la cavidad donde el campo de presión tiene valores máximos en las paredes rígidas del dispositivo, antinodos de la onda estacionaria, y un valor de presión cero en el centro del dispositivo, nodo de la onda estacionaria, condición de resonancia que se establece cuando  $\ell_x = \ell_y = \ell_z = \frac{\lambda}{2}$ , Figura 1-2. Se tiene que los campos de presión  $p_x(x)$ ,  $p_y(y)$  y  $p_z(z)$  que satisfacen esta condición tienen la forma

$$p_x(x) = A_1 \cos(k_x x) \quad p_y(y) = A_2 \cos(k_y y) \quad p_z(z) = A_3 \cos(k_z z) \quad (1-81)$$

Donde  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  son constantes relacionadas con la amplitud de presión del campo  $p(\vec{r})$  descrito por (1-65). Entonces, si  $x = 0$ ,  $y = 0$  y  $z = 0$  los campos de presión (1-81) toman la forma  $p_x(0) = A_1$ ,  $p_y(0) = A_2$  y  $p_z(0) = A_3$  lo cual cumple con la condición de frontera mencionada previamente, al asociar valores máximos de estos campos en las paredes rígidas del dispositivo, Figura 1-2 .

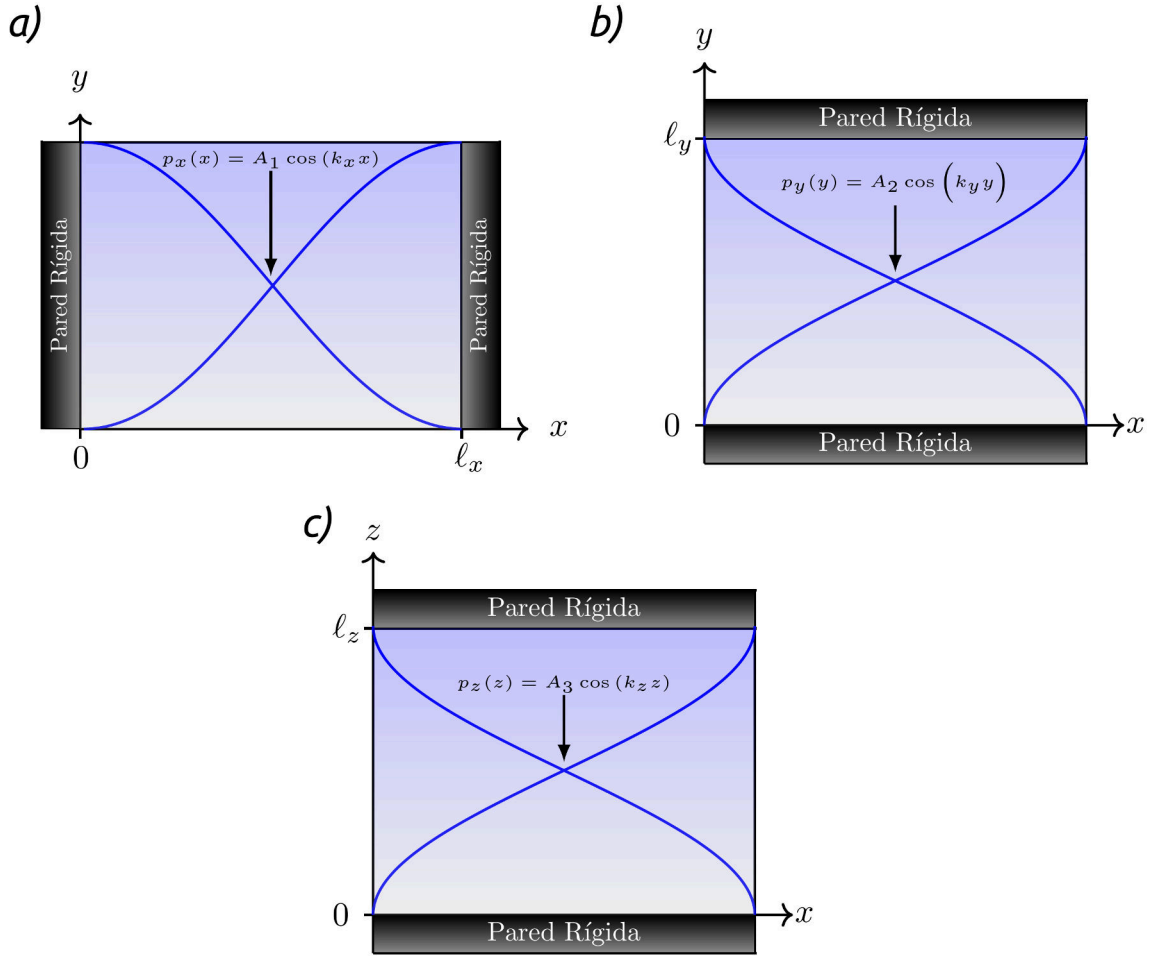


Figura 1-2.: Campos de presión en el dispositivo rectangular con paredes rígidas dada la condición de resonancia  $\ell_x = \ell_y = \ell_z = \frac{\lambda}{2}$ . a) Campo  $p_x(x)$ , b) Campo  $p_y(y)$  y c) Campo  $p_z(z)$ .

Así como las soluciones propuestas (1-81) cumplen con la condición de frontera en  $x = 0$ ,  $y = 0$  y  $z = 0$  es necesario, al tener paredes rígidas, que la velocidad del líquido sea cero en estas, condición que se expresa, para cada una de las dimensiones del espacio, como

$$\frac{dp_x}{dx} = 0 \quad \frac{dp_y}{dy} = 0 \quad \frac{dp_z}{dz} = 0 \quad (1-82)$$

Derivando las ecuaciones (1-81) según (1-82) y evaluando las derivadas obtenidas en las paredes, donde  $x = \ell_x$ ,  $y = \ell_y$  y  $z = \ell_z$ , se llega a

$$-\sin(k_x \ell_x) = 0 \quad -\sin(k_y \ell_y) = 0 \quad -\sin(k_z \ell_z) = 0 \quad (1-83)$$



Para que las igualdades (1-83) se cumplan se debe satisfacer que

$$k_x \ell_x = n_x \pi \quad k_y \ell_y = n_y \pi \quad k_z \ell_z = n_z \pi \quad (1-84)$$

En (1-84)  $n_x = 0, 1, 2, 3, \dots$ ,  $n_y = 0, 1, 2, 3, \dots$  y  $n_z = 0, 1, 2, 3, \dots$  toman valores de enteros positivos que representan los modos normales de vibración de la cavidad rectangular en cada una de las direcciones del espacio. Despejando de (1-84) los números de onda

$$k_x = \frac{n_x \pi}{\ell_x} \quad k_y = \frac{n_y \pi}{\ell_y} \quad k_z = \frac{n_z \pi}{\ell_z} \quad (1-85)$$

Entonces, al remplazar el conjunto de ecuaciones (1-81) en la solución general de la ecuación Helmholtz dada por (1-65) esta expresión toma la forma

$$p_1(\vec{r}) = A_1 A_2 A_3 \cos(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \quad (1-86)$$

Como la multiplicación entre constantes da una nueva constante, se puede definir  $p_a = A_1 A_2 A_3$ , con lo cual la solución (1-86) de la ecuación (1-64) para el caso de un resonador rectangular con paredes rígidas, Figura (1-2), puede ser escrita como

$$p_1(\vec{r}) = p_a \cos(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \quad (1-87)$$

Donde  $p_a$  es la amplitud máxima del campo de presiones y los valores de los números de onda  $k_x$ ,  $k_y$  y  $k_z$  están dados por (1-85). Ahora si se sustituye (1-87) en la solución de la ecuación de onda no viscosa en el caso de ondas acústicas estacionarias (1-63), se tiene que el campo de presión  $p_1$ , que es solución de (1-61), al interior de un resonador con paredes rígidas es

$$p_1 = p_a \cos(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \cos(\omega t) \quad (1-88)$$

### 1.2.2. Solución Paredes Suaves en Dirección $x$

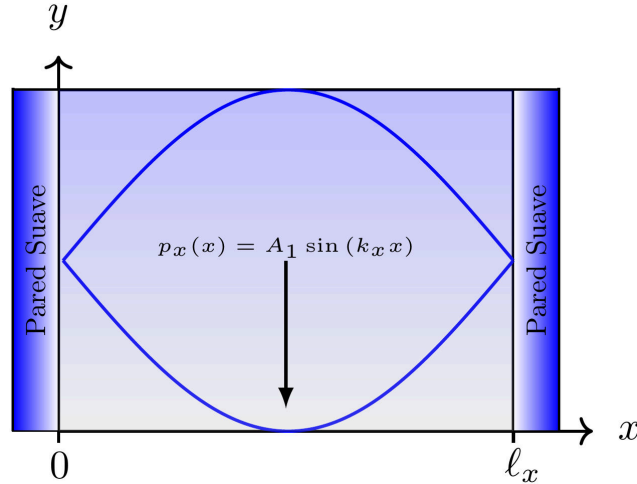


Figura 1-3.: Campo de presión  $p_x(x)$  en un dispositivo con paredes suaves en dirección  $x$ , modo de vibración fundamental.

Ahora , si se asume que el estado fundamental de resonancia se establece en un dispositivo rectangular donde la dirección  $x$  tiene paredes suaves, condición que genera nodos de presión sobre las paredes y un antinodo en  $\frac{\ell_x}{2}$ , Figura 1-3. A diferencia de las direcciones  $y$  y  $z$  con paredes rígidas donde los campos de presión  $p_y(y)$  y  $p_z(z)$ , en el estado fundamental, tienen la forma descrita en la solución de paredes rígidas, Figura 1-2b y 1-2c. Entonces, para cumplir con la condición de pared suave en dirección  $x$  , se tiene que el campo de presión se encuentra dado por

$$p_x(x) = A_1 \sin(k_x x) \quad (1-89)$$

Donde  $A_1$  es una constante asociada con la amplitud de presión  $p_a$ . Como (1-89) debe satisfacer las condiciones de frontera mencionadas se tiene que si  $x = 0$  el valor del campo de presión es igual a cero, lo cual cumple con esta condición sobre la pared izquierda. Por otro lado, si  $x = \ell_x$  se debe obtener el mismo resultado, entonces, al aplicar esta condición en (1-89) se llega a

$$0 = A_1 \sin(k_x \ell_x) \quad (1-90)$$

Ecuación que se cumple si el argumento de la función seno es un múltiplo entero de  $\pi$ , con lo cual se concluye que el número de onda en dirección  $x$  tiene la forma descrita en (1-85). Dado esto, si se sustituye la solución (1-89) junto con los campos de presión  $p_y(y)$  y  $p_z(z)$  definidos en el caso de paredes rígidas, ecuaciones (1-81), en la solución de la ecuación de

Helmholtz (1-65) se determina que la solución de la ecuación de onda no viscosa en el caso de ondas acústicas estacionarias, generadas al interior de un dispositivo rectangular con paredes suaves en dirección  $x$ , es

$$p_1 = p_a \sin(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \cos(\omega t) \quad (1-91)$$

### 1.2.3. Frecuencias de Resonancia

Como el número de onda en dirección  $x$  es igual en los ambos casos, pared rígida y suave, es posible encontrar la magnitud del vector número de onda  $\vec{k}$  al remplazar el conjunto de ecuaciones (1-85) en (1-77) con lo que se obtiene

$$k^2 = \left(\frac{n_x \pi}{\ell_x}\right)^2 + \left(\frac{n_y \pi}{\ell_y}\right)^2 + \left(\frac{n_z \pi}{\ell_z}\right)^2 \quad (1-92)$$

$$k^2 = \pi^2 \left(\frac{n_x^2}{\ell_x^2} + \frac{n_y^2}{\ell_y^2} + \frac{n_z^2}{\ell_z^2}\right) \quad (1-93)$$

$$k = \pi \sqrt{\frac{n_x^2}{\ell_x^2} + \frac{n_y^2}{\ell_y^2} + \frac{n_z^2}{\ell_z^2}} \quad (1-94)$$

Esta magnitud del número de onda permite establecer la frecuencia fundamental de resonancia en el dispositivo rectangular, Figura 1-2 y 1-3, al igual que otras frecuencias resonantes asociadas con modos de vibración diferentes. Para ello se escribe la velocidad del sonido  $c_o$  en términos de la frecuencia y la longitud de onda como

$$c_o = \lambda_{n_x, n_y, n_z} f_{n_x, n_y, n_z} \quad (1-95)$$

Recordando que la longitud de onda puede ser definida en la forma

$$\lambda_{n_x, n_y, n_z} = \frac{2\pi}{k} \quad (1-96)$$

Remplazando (1-96) en (1-95) y despejando la frecuencia se llega a

$$f_{n_x, n_y, n_z} = \left(\frac{c_o}{2\pi}\right) k \quad (1-97)$$

Por lo tanto, al sustituir la magnitud del número de onda dada por (1-94) en (1-97) se tienen que las frecuencias de resonancia (frecuencias naturales) en el dispositivo rectangular son

$$f_{n_x, n_y, n_z} = \frac{c_o}{2} \sqrt{\frac{n_x^2}{\ell_x^2} + \frac{n_y^2}{\ell_y^2} + \frac{n_z^2}{\ell_z^2}} \quad (1-98)$$

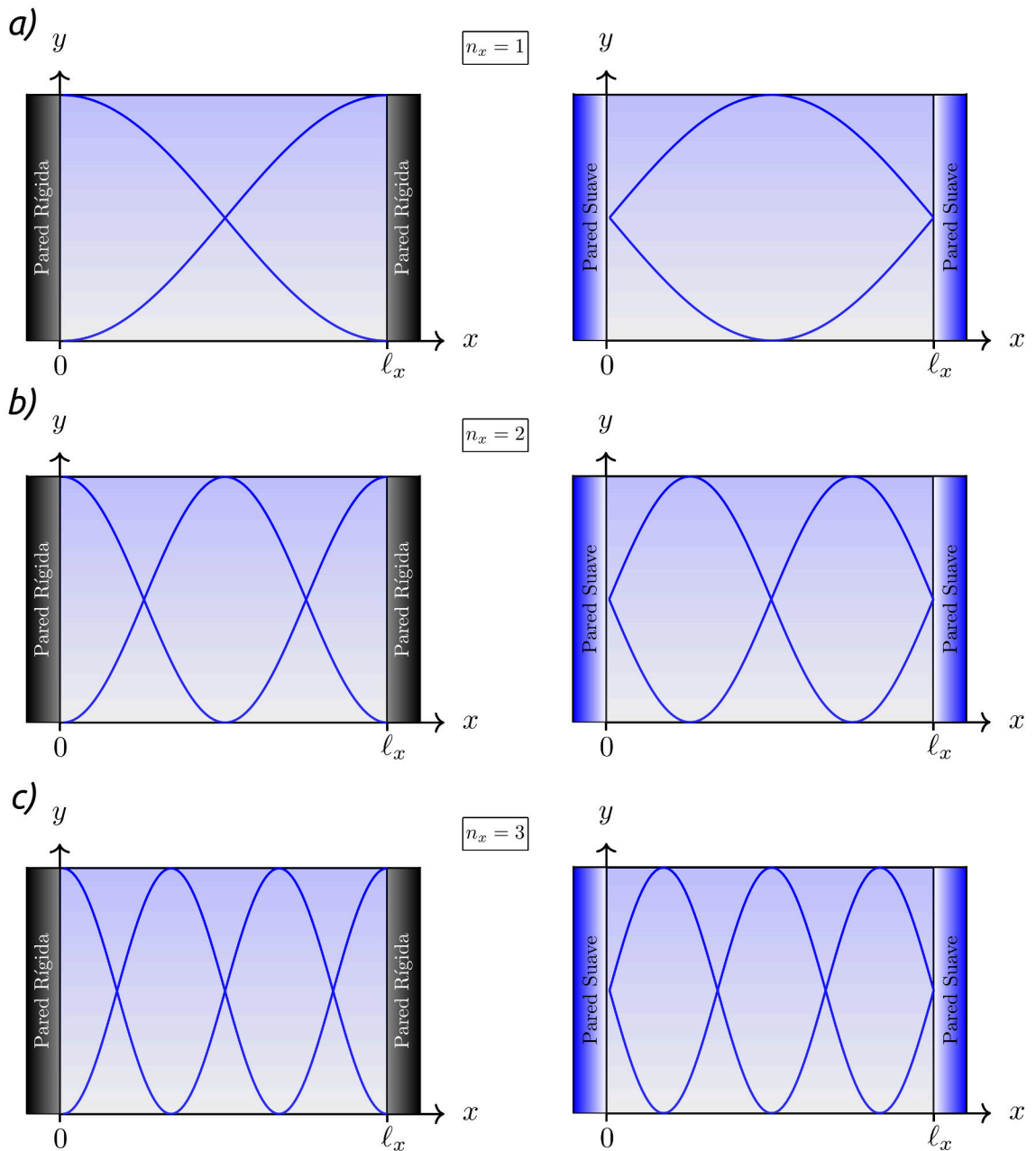


Figura 1-4.: Tres primeros modos de vibración de la cavidad resonante en dirección  $x$  con pared rígida y suave. Campo de presión con a)  $n_x = 1$ , b)  $n_x = 2$  y c)  $n_x = 3$ .

Si, por ejemplo, se supone que el dispositivo rectangular vibra en direcciones  $y$  y  $z$  con su modo de vibración fundamnetal,  $n_y = n_z = 1$ , se generan los campos de presión mostrados en las Figuras **1-2b** y **1-2c**. Pero si en dirección  $x$  donde las paredes pueden ser rígidas o suaves la cavidad vibra en alguno de sus tres primeros modos, se obtienen, en cada caso los campos de presión de la Figura **1-4**.

### 1.3. Campo Vectorial de Velocidades en el Dispositivo

Usando los resultados anteriores se hallará el campo vectorial de velocidades  $\vec{v}_1$  generado por la onda estacionaria al interior del dispositivo rectangular en los dos casos mencionados previamente. Para ello se parte de la ecuación de Navier-Stokes definida para los términos de primer orden (1-16), entonces, al remplazar la identidad (1-25) en (1-16) esta ecuación toma la forma

$$\rho_o \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} = \eta \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) + \xi \eta \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) - c_o^2 \nabla \rho_1 \quad (1-99)$$

Factorizando el termino  $\nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1)$  en (1-99) se obtiene

$$\rho_o \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} = \eta (1 + \xi) \nabla (\nabla \cdot \vec{v}_1) - c_o^2 \nabla \rho_1 \quad (1-100)$$

Sustituyendo el factor  $\nabla \cdot \vec{v}_1$  en (1-100) por la ecuación de continuidad descrita en (1-28) se llega a

$$\rho_o \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} = \eta (1 + \xi) \nabla \left( -\frac{1}{\rho_o} \frac{\partial \rho_1}{\partial t} \right) - c_o^2 \nabla \rho_1 \quad (1-101)$$

$$\rho_o \frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} = -\frac{(1 + \xi) \eta}{\rho_o} \nabla \left( \frac{\partial \rho_1}{\partial t} \right) - c_o^2 \nabla \rho_1 \quad (1-102)$$

Derivando respecto al tiempo el campo de velocidad armónico dado por (1-19)

$$\frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} \left[ \vec{v}_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] \quad (1-103)$$

$$\frac{\partial \vec{v}_1}{\partial t} = -i\omega \vec{v}(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \quad (1-104)$$

Insertando las derivadas (1-104) y (1-33) y el campo escalar de densidad  $\rho_1$  dado por (1-17) en (1-102)

$$\rho_o \left[ -i\omega \vec{v}_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] = -\frac{(1+\xi)\eta}{\rho_o} \nabla \left[ -i\omega \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] - c_o^2 \nabla \left[ \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] \quad (1-105)$$

reorganizando cada termino

$$-i\omega \rho_o \left[ \vec{v}_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] = i\omega \frac{(1+\xi)\eta}{\rho_o} \nabla \left[ \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] - \nabla \left[ c_o^2 \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] \quad (1-106)$$

Multiplicando el primer factor del lado derecho en (1-106) por  $c_o^2/c_o^2$  e introduciendo la velocidad del sonido al gradiente se llega a

$$-i\omega \rho_o \left[ \vec{v}_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] = i\omega \frac{(1+\xi)\eta}{c_o^2 \rho_o} \nabla \left[ c_o^2 \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] - \nabla \left[ c_o^2 \rho_1(\vec{r}) \exp(-i\omega t) \right] \quad (1-107)$$

En 1-107 los factores entre corchetes cuadrados corresponden a los campos de velocidad y presión dependientes del tiempo descritos en (1-18) y (1-19), por consiguiente estos términos se representan simplemente por  $\vec{v}_1$  y  $p_1$ . Además, recordando que el factor de amortiguamiento acústico  $\gamma$  esta dado por (1-42), se tiene que(1-107) toma la forma

$$-i\omega \rho_o \vec{v}_1 = 2i\gamma \nabla p_1 - \nabla p_1 \quad (1-108)$$

Ahora, factorizando el gradiente de presión y el signo menos

$$-i\omega \rho_o \vec{v}_1 = -(1 - 2i\gamma) \nabla p_1 \quad (1-109)$$

Si en la expresión anterior se introduce  $i^2 = -1$  y se aproxima el factor  $(1 - 2i\gamma)$  según (1-46), entonces, al despejar el campo de velocidades  $\vec{v}_1$  en (1-109) se obtiene

$$\vec{v}_1 = \frac{i^2}{-i\omega \rho_o (1 + i\gamma)^2} \nabla p_1 \quad (1-110)$$

$$\vec{v}_1 = -\frac{i}{\omega \rho_o (1 + i\gamma)^2} \nabla p_1 \quad (1-111)$$

En el caso del límite no viscoso, es decir, cuando  $\gamma \ll 1$ , aproximación donde se desprecian las fuerzas disipativas relacionadas a la viscosidad, el campo vectorial de velocidades se escribe como

$$\vec{v}_1 = -\frac{i}{\omega\rho_o} \nabla p_1 \quad (1-112)$$

Se debe resaltar que en las ecuaciones (1-111) y (1-112) se cumple con  $\vec{v}_1 = \nabla\phi_1$ , condición con la cual se estableció la identidad (1-25). Por lo tanto, según (1-111) y (1-112) para el caso amortiguado y no amortiguado, respectivamente, el potencial escalar  $\phi_1$  está definido por

$$\phi_1 = -\frac{i}{\omega\rho_o(1+i\gamma)^2} p_1 \quad \text{para } \eta \neq 0 \quad (1-113)$$

$$\phi_1 = -\frac{i}{\omega\rho_o} p_1 \quad \text{para } \eta = 0 \quad (1-114)$$

Para calcular la forma del campo vectorial de velocidades en el dispositivo acústico en los casos de pared rígida y suave, Figura 1-1. Inicialmente se debe recordar que al interior del resonador hay agua o un líquido con características similares, esto permite despreciar el término  $\gamma$  debido a su pequeño orden de magnitud, Apéndice C. Por lo tanto, bajo esta suposición  $\vec{v}_1$  se encuentra dado por (1-112), entonces, calculando primero el  $\nabla p_1$  tomando el campo de presión descrito por (1-88) para el caso de una cámara rectangular con paredes rígidas, se obtiene

$$\nabla p_1 = \frac{\partial p_1}{\partial x} \hat{i} + \frac{\partial p_1}{\partial y} \hat{j} + \frac{\partial p_1}{\partial z} \hat{k} \quad (1-115)$$

$$\begin{aligned} \nabla p_1 = p_a & \left[ \frac{\partial}{\partial x} \cos(k_x x) \right] \cos(k_y y) \cos(k_z z) \cos(\omega t) \hat{i} \\ & + p_a \cos(k_x x) \left[ \frac{\partial}{\partial y} \cos(k_y y) \right] \cos(k_z z) \cos(\omega t) \hat{j} \\ & + p_a \cos(k_x x) \cos(k_y y) \left[ \frac{\partial}{\partial z} \cos(k_z z) \right] \cos(\omega t) \hat{k} \end{aligned} \quad (1-116)$$

$$\begin{aligned} \nabla p_1 = -p_a k_x & \sin(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \cos(\omega t) \hat{i} \\ & - p_a k_y \cos(k_x x) \sin(k_y y) \cos(k_z z) \cos(\omega t) \hat{j} \\ & - p_a k_z \cos(k_x x) \cos(k_y y) \sin(k_z z) \cos(\omega t) \hat{k} \end{aligned} \quad (1-117)$$

Remplazado (1-117) en (1-112) se encuentra que el campo vectorial de velocidad, en el caso de paredes rígidas en  $x$ , esta dado por

$$\vec{v}_1 = \frac{ip_a}{\omega\rho_o} \left( k_x \sin(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \hat{i} + k_y \cos(k_x x) \sin(k_y y) \cos(k_z z) \hat{j} + k_z \cos(k_x x) \cos(k_y y) \sin(k_z z) \hat{k} \right) \cos(\omega t) \quad (1-118)$$

Por último, se calcula la magnitud de (1-118) para ello se debe notar que  $\vec{v}_1$  es complejo, por lo tanto, su magnitud esta definida según la relación

$$v_1^2 = \vec{v}_1 \cdot \vec{v}_1^* \quad (1-119)$$

Donde  $\vec{v}_1^*$  representa el complejo conjugado de (1-118) el cual esta dado por

$$\vec{v}_1^* = -\frac{ip_a}{\omega\rho_o} \left( k_x \sin(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \hat{i} + k_y \cos(k_x x) \sin(k_y y) \cos(k_z z) \hat{j} + k_z \cos(k_x x) \cos(k_y y) \sin(k_z z) \hat{k} \right) \cos(\omega t) \quad (1-120)$$

Haciendo el producto punto descrito en (1-119), se llega a

$$v_1^2 = \left( \frac{p_a}{\omega\rho_o} \right)^2 \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \cos^2(\omega t) \quad (1-121)$$

Sacando raíz cuadrada en ambos lados de (1-121) se tiene que la magnitud del campo de presiones en el caso de un dispositivo con todas sus paredes rígidas es

$$v_1 = \frac{p_a}{\omega\rho_o} \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right)^{1/2} \cos(\omega t) \quad (1-122)$$



Ahora realizando un procedimiento similar se calcula el campo de velocidades y su magnitud en el caso de paredes suaves en dirección  $x$ . Entonces partiendo de la expresión (1-115) donde se sustituye el campo de presiones (1-91) se encuentra que el gradiente del campo de presión es

$$\begin{aligned}\nabla p_1 = p_a & \left[ \frac{\partial}{\partial x} \sin(k_x x) \right] \cos(k_y y) \cos(k_z z) \cos(\omega t) \hat{i} \\ & + p_a \sin(k_x x) \left[ \frac{\partial}{\partial y} \cos(k_y y) \right] \cos(k_z z) \cos(\omega t) \hat{j} \\ & + p_a \sin(k_x x) \cos(k_y y) \left[ \frac{\partial}{\partial z} \cos(k_z z) \right] \cos(\omega t) \hat{k}\end{aligned}\quad (1-123)$$

$$\begin{aligned}\nabla p_1 = p_a k_x & \cos(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \cos(\omega t) \hat{i} \\ & - p_a k_y \sin(k_x x) \sin(k_y y) \cos(k_z z) \cos(\omega t) \hat{j} \\ & - p_a k_z \sin(k_x x) \cos(k_y y) \sin(k_z z) \cos(\omega t) \hat{k}\end{aligned}\quad (1-124)$$

Introduciendo (1-124) en (1-112) se concluye que el campo vectorial de velocidad, en el caso de paredes suaves en  $x$ , está dado por

$$\begin{aligned}\vec{v}_1 = -\frac{i p_a}{\omega \rho_o} & \left( k_x \cos(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) \hat{i} \right. \\ & \left. - k_y \sin(k_x x) \sin(k_y y) \cos(k_z z) \hat{j} \right. \\ & \left. - k_z \sin(k_x x) \cos(k_y y) \sin(k_z z) \hat{k} \right) \cos(\omega t)\end{aligned}\quad (1-125)$$

Haciendo el producto punto (1-119) se tiene que la magnitud al cuadrado del campo vectorial (1-125) es

$$\begin{aligned}v_1^2 = \left( \frac{p_a}{\omega \rho_o} \right)^2 & \left( k_x^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ & \left. + k_y^2 \sin^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ & \left. + k_z^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \cos^2(\omega t)\end{aligned}\quad (1-126)$$

Aplicando raíz cuadrada en ambos lados de (1-126) se obtiene finalmente que la magnitud del campo de velocidades en este caso es

$$\begin{aligned}
 v_1 = \frac{p_a}{\omega \rho_o} & \left( k_x^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
 & + k_y^2 \sin^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
 & \left. + k_z^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right)^{1/2} \cos(\omega t)
 \end{aligned} \tag{1-127}$$

## 1.4. Fuerza de Primaria de Radiación Acústica

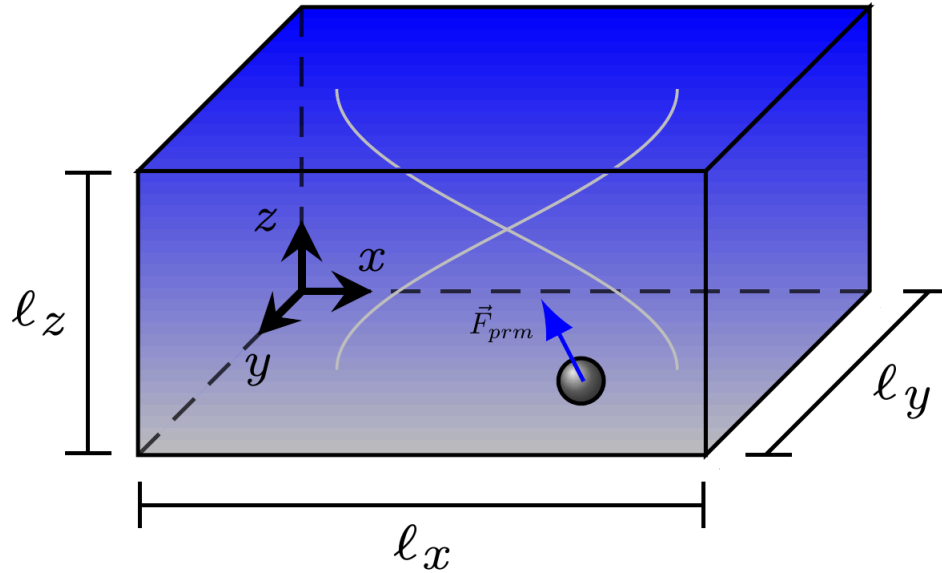


Figura 1-5.:  $\vec{F}_{pr}$  sobre una partícula esférica al interior del resonador rectangular. La línea gris representa el campo de presión  $p_z(z)$  generado al interior del dispositivo para  $n_z = 1$ . Es importante resaltar que la resonancia ocurre en las tres dimensiones del espacio, sin embargo, en esta imagen, por simplicidad, solo aparece la componente  $p_z(z)$  del campo de presiones.

Al suspender una partícula esférica al interior del resonador rectangular ésta interactúa con el campo de presiones descrito por (1-88) si todas las paredes del dispositivo son rígidas o con el campo de presiones (1-91) si las paredes en dirección  $x$  son suaves, lo que genera, por transferencia de momentum entre la onda sonora y la partícula, una fuerza sobre ella conocida como fuerza primaria de radiación acústica  $\vec{F}_{pr}$ , vector azul Figura 1-5. Si el campo de presión  $p_1$  es originado por ondas con frecuencias del orden de  $MHz$ , la  $\vec{F}_{pr}$  se obtiene del promedio temporal en un ciclo de oscilación completo, esto se debe, a que el movimiento de la partícula, inducido por la  $\vec{F}_{pr}$ , es lento comparado con la escala de tiempo asociada al periodo de oscilación de los campos de presión (1-88), (1-91) y velocidad (1-118), periodo

que tiene un orden de magnitud de los  $\mu s$ . Por lo tanto, para calcular la  $\vec{F}_{pr}$  es necesario escribir los campos  $p_1$  y  $\vec{v}_1$  usando promedios temporales, según la definición

$$\langle \mathcal{F} \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T \mathcal{F}(t) dt \quad (1-128)$$

Donde  $T$  es el periodo de oscilación de la onda y  $\langle \mathcal{F} \rangle$  representa el promedio temporal del campo  $\mathcal{F}$  que en este caso puede ser el campo escalar de presiones, ecuaciones (1-88) y (1-91), o la magnitud del campo vectorial de velocidades dada por las relaciones (1-122) y (1-127). Entonces, partiendo de la expresión general para la  $\vec{F}_{pr}$ , en la cual se asume esta fuerza promedio igual al gradiente de un potencial (Gor'kov, 1962)

$$\vec{F}_{pr} = \langle F_{ac} \rangle = -\nabla U_{ac} \quad (1-129)$$

Siendo  $U_{ac}$  el potencial acústico, el cual se determina a partir de la diferencia entre  $\langle E_P \rangle$  y  $\langle E_k \rangle$  ecuación(1-130), cantidades que según el análisis dimensional hecho en el Apéndice C representan, respectivamente, el promedio de la densidad de energía potencial acústica  $\langle E_P \rangle$ , la cual se relaciona con la elasticidad del líquido y su deformación en cada punto del espacio, y el promedio de la densidad de energía cinética acústica  $\langle E_k \rangle$  del medio, energía cinética que es transmitida a una partícula de volumen  $V$  suspendida en el líquido. Con lo acabado de mencionar, se tiene que  $U_{ac}$  esta dado por:

$$U_{ac} = V \left[ f_1 \langle E_P \rangle - \frac{3}{2} f_2 \langle E_k \rangle \right] \quad (1-130)$$

Si en (1-130) los promedios de densidad de energía se definen según las ecuaciones

$$\langle E_P \rangle = \frac{1}{2\beta_f} \langle p_1^2 \rangle \quad (1-131)$$

$$\langle E_k \rangle = \frac{\rho_o}{2} \langle v_1^2 \rangle \quad (1-132)$$

Donde  $\beta_f = \rho_o c_o^2$  representa el módulo de elasticidad volumétrico del líquido. De manera que la expresión (1-130) se puede escribir como

$$U_{ac} = V \left[ \frac{f_1}{2\beta_f} \langle p_1^2 \rangle - \frac{3f_2\rho_o}{4} \langle v_1^2 \rangle \right] \quad (1-133)$$

En (1-130) y (1-133) los factores  $f_1$  y  $f_2$  corresponden a términos relacionados con la compresibilidad y densidad, respectivamente, conocidos como coeficientes monopolar y dipolar, los cuales se calculan mediante la teoría de dispersión (Bruss, 2012) y cuyas ecuaciones tiene la forma

$$f_1 = 1 - \frac{1}{\zeta \kappa^2} \quad f_2 = \frac{2\zeta - 2}{2\zeta + 1} \quad (1-134)$$

Aquí  $\zeta$  y  $\kappa$  son constantes adimensionales que corresponden a la densidad relativa entre la partícula y el fluido y a la razón entre las velocidades del sonido en la partícula y el medio

$$\kappa = \frac{c_p}{c_f} \quad \zeta = \frac{\rho_p}{\rho_f} \quad (1-135)$$

Entonces, para calcular la  $\vec{F}_{pr}$  dada por (1-129) en el caso de paredes rígidas y suaves en dirección  $x$ , primero se encontrarán los promedios de la densidad de energía potencial y cinética descritos por las ecuaciones (1-131) y (1-132).

### 1.4.1. Densidad de Energía Potencial $\langle E_P \rangle$

Para calcular  $\langle E_p \rangle$  primero se determina el promedio temporal del campo de presiones  $p_1$  asociado con la solución de paredes rígidas mediante la expresión (1-131), por lo tanto, tomando (1-88) y elevando esta ecuación al cuadrado se llega a

$$p_1^2 = p_a^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \cos^2(\omega t) \quad (1-136)$$

Aplicando la definición (1-128) para calcular el promedio temporal de (1-136)

$$\langle p_1^2 \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T p_1^2 dt \quad (1-137)$$

Sustituyendo (1-136) en (1-137)

$$\langle p_1^2 \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T p_a^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \cos^2(\omega t) dt \quad (1-138)$$

Como la integral esta definida sobre la variable temporal, entonces, el operador  $\int dt$  actúa únicamente sobre la parte temporal de (1-136), obteniendo

$$\langle p_1^2 \rangle = \frac{p_a^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z)}{T} \int_0^T \cos^2(\omega t) dt \quad (1-139)$$

Para solucionar la integral en (1-139) se usa la identidad trigonométrica

$$\cos^2(x) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(2x) \quad (1-140)$$

Tomando la integral temporal en (1-139) y haciendo la sustitución  $x = \omega t$  y  $dt = \frac{dx}{\omega}$  la integral toma la forma

$$\int_0^T \cos^2(\omega t) dt = \frac{1}{\omega} \int_0^x \cos^2(x) dx \quad (1-141)$$

Ahora reemplazando la identidad (1-140) en (1-141)

$$\frac{1}{\omega} \int_0^x \cos^2(x) dx = \frac{1}{\omega} \int_0^x \left( \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(2x) \right) dx \quad (1-142)$$

$$\frac{1}{\omega} \int_0^x \cos^2(x) dx = \frac{1}{\omega} \left[ \frac{1}{2} \int_0^x dx + \frac{1}{2} \int_0^x \cos(2x) dx \right] \quad (1-143)$$

Si  $u = 2x$  y  $dx = \frac{du}{2}$

$$\frac{1}{\omega} \int_0^x \cos^2(x) dx = \frac{1}{\omega} \left[ \frac{1}{2} x + \frac{1}{4} \int_0^u \cos(u) du \right] \quad (1-144)$$

Haciendo la integral de  $\cos(u)$  y sustituyendo  $u = 2x$ , se obtiene la solución

$$\frac{1}{\omega} \int_0^x \cos^2(x) dx = \frac{1}{\omega} \left[ \frac{1}{2} x + \frac{1}{4} \sin(2x) \right]_0^x \quad (1-145)$$

Recordando que  $x = \omega t$  y  $dx = \omega dt$ , por lo tanto, al sustituir  $x$  en (1-145) y evaluando los límites de integración

$$\frac{1}{\omega} \int_0^T \cos^2(\omega t) \omega dt = \frac{1}{\omega} \left[ \frac{1}{2} \omega t + \frac{1}{4} \sin(2\omega t) \right]_0^T \quad (1-146)$$

$$\int_0^T \cos^2(\omega t) dt = \frac{T}{2} + \frac{1}{4\omega} \sin(2\omega T) \quad (1-147)$$

Escribiendo  $T = \frac{2\pi}{\omega}$  en la función trigonométrica  $\sin(2\omega T)$  de (1-147)

$$\int_0^T \cos^2(\omega t) dt = \frac{T}{2} + \frac{1}{4\omega} \sin\left(2\omega \left(\frac{2\pi}{\omega}\right)\right) \quad (1-148)$$

$$\int_0^T \cos^2(\omega t) dt = \frac{T}{2} + \frac{1}{4\omega} \sin(4\pi) \quad (1-149)$$

Como  $\sin n\pi = 0$  el segundo término de la derecha en (1-149) se hace cero, por lo tanto la solución de la integral es

$$\int_0^T \cos^2(\omega t) dt = \frac{T}{2} \quad (1-150)$$

Ahora, sustituyendo (1-150) en (1-139) se tiene que el promedio temporal de  $p_1^2$  es

$$\langle p_1^2 \rangle = \frac{p_a^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) T}{T} \frac{T}{2} \quad (1-151)$$

$$\langle p_1^2 \rangle = \frac{p_a^2}{2} \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \quad (1-152)$$

Para terminar y encontrar la densidad promedio de energía potencial en el caso de paredes rígidas en  $x$  se reemplaza (1-152) en (1-131) con lo cual se obtiene

$$\langle E_P \rangle = \frac{p_a^2}{4\beta_f} \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \quad (1-153)$$

Ahora si se realiza el mismo procedimiento, descrito para el caso rígido, usando el campo de presiones asociado a paredes suaves en dirección  $x$ , ecuación (1-91), se encuentra que la densidad promedio de energía potencial al tomar paredes suaves es

$$\langle E_P \rangle = \frac{p_a^2}{4\beta_f} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \quad (1-154)$$

### 1.4.2. Densidad de Energía Cinética $\langle E_k \rangle$

$\langle E_k \rangle$  se calcula teniendo presente la ecuación (1-132), en la que se observa que es necesario primero determinar el promedio de la magnitud del campo vectorial de velocidad  $\vec{v}_1$ , entonces, aplicando la definición (1-128) a la magnitud de este campo

$$\langle v_1^2 \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T v_1^2 dt \quad (1-155)$$

Introduciendo primero en (1-155) la magnitud al cuadrado  $v_1^2$  hallada para el caso de paredes rígidas en el dispositivo, dada por (1-121), se llega a

$$\begin{aligned} \langle v_1^2 \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T \left[ \left( \frac{p_a}{\omega \rho_o} \right)^2 \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \right. \\ \left. \left. + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \right. \\ \left. \left. + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \cos^2(\omega t) \right] dt \end{aligned} \quad (1-156)$$

Recordando que el operador  $\int dt$  actúa sobre la parte temporal en (1-156), por lo tanto

$$\begin{aligned} \langle v_1^2 \rangle = \frac{1}{T} \left[ \left( \frac{p_a}{\omega \rho_o} \right)^2 \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \right. \\ \left. \left. + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \right. \\ \left. \left. + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \right] \int_0^T \cos^2(\omega t) dt \end{aligned} \quad (1-157)$$

Remplazando la solución de la integral (1-150) en (1-157)

$$\begin{aligned} \langle v_1^2 \rangle = \frac{1}{T} \left[ \left( \frac{p_a}{\omega \rho_o} \right)^2 \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \right. \\ \left. \left. + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \right. \\ \left. \left. + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \right] \frac{T}{2} \end{aligned} \quad (1-158)$$

Cancelando el periodo y organizando los términos, el promedio  $\langle v_1^2 \rangle$  puede ser escrito finalmente como

$$\langle v_1^2 \rangle = \frac{p_a^2}{2\omega^2 \rho_o^2} \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \quad (1-159)$$

Por último, al remplazar (1-159) en (1-132), escribiendo la frecuencia angular en términos de la magnitud del vector número de onda y la velocidad del sonido como  $\omega = c_o k$ , se obtiene

$$\langle E_k \rangle = \frac{\rho_o p_a^2}{4(c_o k)^2 \rho_o^2} \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \quad (1-160)$$

$$\langle E_k \rangle = \frac{p_a^2}{4k^2 (\rho_o c_o^2)} \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \quad (1-161)$$

Recordando que  $\rho_o c_o^2$  corresponde al modulo de elasticidad volumétrico del líquido  $\beta_f$ , entonces, el promedio de densidad de energía cinética en el caso de un dispositivo rectangular con todas sus paredes rígidas es

$$\langle E_k \rangle = \frac{p_a^2}{4\beta_f k^2} \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \quad (1-162)$$

De igual manera se calcula el promedio de densidad de energía cinética en el caso de un dispositivo rectangular con paredes suaves en dirección  $x$ . Por lo tanto, al calcular primero el promedio de la magnitud del campo vectorial de velocidad  $\vec{v}_1$  con el resultado (1-126) y luego introduciendo el promedio obtenido en (1-132) se llega a



$$\langle E_k \rangle = \frac{p_a^2}{4\beta_f k^2} \left( k_x^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_y^2 \sin^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. + k_z^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \quad (1-163)$$

### 1.4.3. $\vec{F}_{pr}$ en Dispositivos con Paredes Rígidas

Con los resultados anteriores es posible a partir de (1-129) calcular el vector  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones que actúa sobre una partícula esférica al interior de un resonador rectangular con paredes rígidas, Figura 1-5. Para ello, primero se determina el potencial acústico al sustituir (1-153) y (1-162) en la expresión (1-130) con lo que se obtiene

$$U_{ac}(x, y, z) = V \left[ \frac{p_a^2}{4\beta_f} f_1 \left( \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right) \right. \\ \left. - \frac{3p_a^2}{8\beta_f k^2} f_2 \left( k_x^2 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \right. \\ \left. \left. + k_y^2 \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \right. \\ \left. \left. + k_z^2 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \right] \quad (1-164)$$

Factorizando el término  $\frac{p_a^2}{8\beta_f}$  y multiplicado el primer miembro a la derecha de (1-164) por  $2f_1$  y el segundo por  $-\frac{3f_2}{k^2}$ , se llega a

$$U_{ac}(x, y, z) = \frac{V p_a^2}{8\beta_f} \left[ 2f_1 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-165)$$

Ahora, definiendo el potencial acústico máximo  $U_o$  como

$$U_o = \frac{V p_a^2}{8\beta_f} \quad (1-166)$$

$$U_o = \frac{V}{2} E_{ac} \quad (1-167)$$

Donde  $U_o$  tiene unidades de energía, Apéndice C. En (1-167) el termino  $E_{ac}$  corresponde a una cantidad física que representa la densidad máxima de energía acústica, según se evidencia en el análisis dimensional hecho en el Apéndice C ecuación (C-34). Entonces, al comparar (1-166) con (1-167) se concluye que  $E_{ac}$  puede ser escrito en la forma

$$E_{ac} = \frac{p_a^2}{4\beta_f} \quad (1-168)$$

Sustituyendo (1-166) en (1-165) se encuentra que el potencial acústico  $U_{ac}(x, y, z)$  esta dado por

$$U_{ac}(x, y, z) = U_o \left[ 2f_1 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-169)$$

Recordando que la  $\vec{F}_{pr}$  se determina al calcular el gradiente de (1-169), según se definió en (1-129). Por lo tanto, al aplicar el operador diferencial nabla al potencial  $U_{ac}(x, y, z)$  (1-169) toma la forma

$$\vec{F}_{pr} = -\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial x} \hat{i} - \frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial y} \hat{j} - \frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial z} \hat{k} \quad (1-170)$$

El siguiente paso es calcular cada una de las componentes de (1-170) usando (1-169). De tal modo que al hacer las derivadas espaciales se encuentran para cada dirección del espacio los resultados que se describen a continuación

### Componente $x$ de la Fuerza $\vec{F}_{pr}$

Derivando (1-169) respecto a  $x$

$$\begin{aligned}
-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial x} = -U_o \frac{\partial}{\partial x} & \left[ 2f_1 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& - 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
& - 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
& \left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-171)
\end{aligned}$$

Aplicando el operador deriva solo a los términos que dependen de  $x$

$$\begin{aligned}
-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial x} = -U_o & \left[ 2f_1 \frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& - 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \frac{\partial}{\partial x} \left( \sin^2(k_x x) \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
& - 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
& \left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-172)
\end{aligned}$$

Haciendo la derivada  $\frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right)$  se obtiene

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right) = \frac{\partial}{\partial x} \left( \cos(k_x x) \cos(k_x x) \right) \quad (1-173)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right) = \cos(k_x x) \frac{\partial}{\partial x} \cos(k_x x) + \frac{\partial}{\partial x} \cos(k_x x) \cos(k_x x) \quad (1-174)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right) = \cos(k_x x) \left( -k_x \sin(k_x x) \right) + \left( -k_x \sin(k_x x) \right) \cos(k_x x) \quad (1-175)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right) = -k_x 2 \sin(k_x x) \cos(k_x x) \quad (1-176)$$

Usando la identidad de ángulo doble  $\sin(2x) = 2 \sin(x) \cos(x)$  en (1-176) la derivada toma la forma

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \cos^2(k_x x) \right) = -k_x \sin(2k_x x) \quad (1-177)$$

Ahora encontrando la derivada  $\frac{\partial}{\partial x} \left( \sin^2(k_x x) \right)$

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \sin^2(k_x x) \right) = \frac{\partial}{\partial x} \left( \sin(k_x x) \sin(k_x x) \right) \quad (1-178)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \sin^2(k_x x) \right) = \sin(k_x x) \frac{\partial}{\partial x} \sin(k_x x) + \frac{\partial}{\partial x} \sin(k_x x) \sin(k_x x) \quad (1-179)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \sin^2(k_x x) \right) = \sin(k_x x) \left( k_x \cos(k_x x) \right) + \left( k_x \cos(k_x x) \right) \sin(k_x x) \quad (1-180)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \sin^2(k_x x) \right) = k_x 2 \sin(k_x x) \cos(k_x x) \quad (1-181)$$

Empleando la identidad de ángulo doble en (1-181), la derivada anterior se escribe como

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \sin^2(k_x x) \right) = k_x \sin(2k_x x) \quad (1-182)$$

Remplazando los resultados de las derivadas (1-177) y (1-182) en (1-172)

$$\begin{aligned} -\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial x} = -U_o \left[ 2f_1 \left( -k_x \sin(2k_x x) \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \left( k_x \sin(2k_x x) \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \left( -k_x \sin(2k_x x) \right) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ \left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \left( -k_x \sin(2k_x x) \right) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-183) \end{aligned}$$

Factorizando  $k_x \sin(2k_x x)$  y operando los signos

$$\begin{aligned}
-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial x} = k_x U_o \sin(2k_x x) & \left[ 2f_1 \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& + 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
& - 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
& \left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-184)
\end{aligned}$$

Agrupando términos en (1-184) se encuentra que la componente  $x$  de la  $\vec{F}_{pr}$  es

$$\begin{aligned}
-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial x} = k_x U_o \sin(2k_x x) & \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_y^2}{k^2} \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \right] \quad (1-185)
\end{aligned}$$

### Componente $y$ de la Fuerza $\vec{F}_{pr}$

Tomando la derivada correspondiente a la componente  $y$  en (1-170) y remplazando el potencial

$$\begin{aligned}
-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial y} = -U_o \frac{\partial}{\partial y} & \left[ 2f_1 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& - 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
& - 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\
& \left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-186)
\end{aligned}$$

Aplicando el operador derivada a los factores dependientes de la coordenada  $y$

$$\begin{aligned}
-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial y} = -U_o \left[ 2f_1 \cos^2(k_x x) \frac{\partial}{\partial y} \left( \cos^2(k_y y) \right) \cos^2(k_z z) \right. \\
- 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \frac{\partial}{\partial y} \left( \cos^2(k_y y) \right) \cos^2(k_z z) \\
- 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \frac{\partial}{\partial y} \left( \sin^2(k_y y) \right) \cos^2(k_z z) \\
\left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \frac{\partial}{\partial y} \left( \cos^2(k_y y) \right) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-187)
\end{aligned}$$

Si se concluye, al comparar (1-187) con los resultados (1-177) y (1-182), que las derivadas en la ecuación anterior y tienen la forma

$$\frac{\partial}{\partial y} \left( \cos^2(k_y y) \right) = -k_y \sin(2k_y y) \quad (1-188)$$

$$\frac{\partial}{\partial y} \left( \sin^2(k_y y) \right) = k_y \sin(2k_y y) \quad (1-189)$$

Remplazando las derivadas (1-188) y (1-189) en (1-187)

$$\begin{aligned}
-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial y} = -U_o \left[ 2f_1 \cos^2(k_x x) \left( -k_y \sin(2k_y y) \right) \cos^2(k_z z) \right. \\
- 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \left( -k_y \sin(2k_y y) \right) \cos^2(k_z z) \\
- 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \left( k_y \sin(2k_y y) \right) \cos^2(k_z z) \\
\left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \left( -k_y \sin(2k_y y) \right) \sin^2(k_z z) \right] \quad (1-190)
\end{aligned}$$

Si se operan los signos y factoriza el termino  $k_y \sin(2k_y y)$ , al igual que se hizo con la coordenada  $x$ , se llega a

$$-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial y} = k_y U_o \sin(2k_y y) \left[ \begin{aligned} &2f_1 \cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z) \\ &-3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_z z) \\ &+3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z) \\ &-3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_z z) \end{aligned} \right] \quad (1-191)$$

Por último, agrupando los factores que se encuentra al interior de los corchetes cuadrados se obtiene

$$-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial y} = k_y U_o \sin(2k_y y) \left[ \begin{aligned} &\left(2f_1 + 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2}\right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z) \\ &-3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_z z) \right) \end{aligned} \right] \quad (1-192)$$

### Componente $z$ de la Fuerza $\vec{F}_{pr}$

Para calcular esta componente se realiza el mismo procedimiento, con el cual se llegó a las ecuaciones (1-185) y (1-192), entonces, para la dirección  $z$  se tiene que

$$-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial z} = k_z U_o \sin(2k_z z) \left[ \begin{aligned} &\left(2f_1 + 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2}\right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \\ &-3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) + \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \right) \end{aligned} \right] \quad (1-193)$$

### $\vec{F}_{pr}$ en Tres Dimensiones

Recordando que la  $\vec{F}_{pr}$  se encuentra dada por el gradiente del potencial acústico  $U_{ac}$ , entonces, sustituyendo los resultados encontrados para cada componente, ecuaciones (1-185), (1-192) y (1-193), en (1-170) se obtiene

$$\begin{aligned}
\vec{F}_{pr} = & k_x U_o \sin(2k_x x) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_y^2}{k^2} \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right) \right] \hat{i} \\
& + k_y U_o \sin(2k_y y) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_z z) \right) \right] \hat{j} \\
& + k_z U_o \sin(2k_z z) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) + \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \right) \right] \hat{k} \quad (1-194)
\end{aligned}$$

Ahora reemplazando los términos  $\sin^2(k_y y) = 1 - \cos^2(k_y y)$ ,  $\sin^2(k_z z) = 1 - \cos^2(k_z z)$  y  $\sin^2(k_x x) = 1 - \cos^2(k_x x)$

$$\begin{aligned}
\vec{F}_{pr} = & k_x U_o \sin(2k_x x) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_y^2}{k^2} [1 - \cos^2(k_y y)] \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) [1 - \cos^2(k_z z)] \right) \right] \hat{i} \\
& + k_y U_o \sin(2k_y y) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} [1 - \cos^2(k_x x)] \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) [1 - \cos^2(k_z z)] \right) \right] \hat{j} \\
& + k_z U_o \sin(2k_z z) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} [1 - \cos^2(k_x x)] \cos^2(k_y y) + \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) [1 - \cos^2(k_y y)] \right) \right] \hat{k} \quad (1-195)
\end{aligned}$$

Multiplicado los factores en el segundo termino de cada componente de la igualdad (1-195), factorizando  $\cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z)$  en  $\hat{i}$ ,  $\cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z)$  en  $\hat{j}$  y  $\cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y)$  en  $\hat{k}$  y agrupando términos con factor común  $-3f_2$  se llega a



$$\begin{aligned}
\vec{F}_{pr} = & k_x U_o \sin(2k_x x) \left[ \left( 2f_1 + \frac{3f_2}{k^2} [k_x^2 + k_y^2 + k_z^2] \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \right) \right] \hat{i} \\
& + k_y U_o \sin(2k_y y) \left[ \left( 2f_1 + \frac{3f_2}{k^2} [k_y^2 + k_x^2 + k_z^2] \right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \right) \right] \hat{j} \\
& + k_z U_o \sin(2k_z z) \left[ \left( 2f_1 + \frac{3f_2}{k^2} [k_z^2 + k_x^2 + k_y^2] \right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_y y) + \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \right) \right] \hat{k} \quad (1-196)
\end{aligned}$$

Recordando que  $k^2$  esta dado por (1-77) la ecuación (1-196) se transforma en

$$\begin{aligned}
\vec{F}_{pr} = & k_x U_o \sin(2k_x x) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \right) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \right) \right] \hat{i} \\
& + k_y U_o \sin(2k_y y) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \right) \right] \hat{j} \\
& + k_z U_o \sin(2k_z z) \left[ \left( 2f_1 + 3f_2 \right) \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \right. \\
& \left. - 3f_2 \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_y y) + \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \right) \right] \hat{k} \quad (1-197)
\end{aligned}$$

Para terminar de calcular la  $\vec{F}_{pr}$  se toma el termino  $2f_1 + 3f_2$  y se introducen en este los coeficientes  $f_1$  y  $f_2$  dados por (1-134) , lo que permite reescribir este factor como

$$2f_1 + 3f_2 = 2 \left( 1 - \frac{1}{\zeta \kappa^2} \right) + 3 \left( \frac{2\zeta - 2}{2\zeta + 1} \right) \quad (1-198)$$

$$2f_1 + 3f_2 = 2 - \frac{2}{\zeta\kappa^2} + \frac{6\zeta - 6}{2\zeta + 1} = \left( \frac{6\zeta - 6}{2\zeta + 1} + 2 \right) - \frac{2}{\zeta\kappa^2} \quad (1-199)$$

$$2f_1 + 3f_2 = \left( \frac{6\zeta - 6 + 4\zeta + 2}{2\zeta + 1} \right) - \frac{2}{\zeta\kappa^2} = \frac{10\zeta - 4}{2\zeta + 1} - \frac{2}{\zeta\kappa^2} \quad (1-200)$$

Factorizando el 2 en 1-200 se llega a

$$2f_1 + 3f_2 = 2 \left( \frac{5\zeta - 2}{2\zeta + 1} - \frac{1}{\zeta\kappa^2} \right) \quad (1-201)$$

Si el termino entre paréntesis en (1-201) se define como

$$\phi = \frac{5\zeta - 2}{2\zeta + 1} - \frac{1}{\zeta\kappa^2} \quad (1-202)$$

Donde la constante  $\phi$  se conoce como factor de contraste acústico o impedancia acústica, constante que es de importancia ya que al estar definida a partir de la relación entre densidades y velocidades del sonido de la partícula y el medio, su valor, para partículas con diferentes propiedades físicas, puede ser positivo o negativo lo cual se relaciona con la dirección del vector  $\vec{F}_{pr}$ ; por lo tanto, si  $\phi > 0$  la dirección de  $\vec{F}_{prm}$  es hacia los nodos de la onda estacionaria, pero si  $\phi < 0$  la dirección  $\vec{F}_{pr}$  es hacia los antinodos de la onda, en la Figura 1-5 se ilustra el caso de una partícula con  $\phi > 0$ . Entonces, sustituyendo (1-202) en (1-201) se puede escribir en la forma

$$2f_1 + 3f_2 = 2\phi \quad (1-203)$$

Introduciendo (1-203) en (1-197), factorizando el  $2\phi$  del termino entre corchetes cuadrados y definiendo la constante adimensional

$$\phi' = \frac{3f_2}{2\phi} = \frac{f_2}{\frac{2}{3}f_1 + f_2} \quad (1-204)$$

se obtiene que la ecuación de la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones es

$$\begin{aligned} \vec{F}_{pr} = & 2k_x\phi U_o \sin(2k_x x) \left[ \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) - \phi' \left( \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \right) \right] \hat{i} \\ & + 2k_y\phi U_o \sin(2k_y y) \left[ \cos^2(k_x x) \cos^2(k_z z) - \phi' \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \right) \right] \hat{j} \\ & + 2k_z\phi U_o \sin(2k_z z) \left[ \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) - \phi' \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_y y) + \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \right) \right] \hat{k} \end{aligned}$$

considerando que  $\cos^2 \theta = (\cos 2\theta + 1)/2$  la expresión de la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones toma la forma

$$\begin{aligned}
\vec{F}_{pr} = & 2k_x \phi U_o \sin(2k_x x) \left[ \frac{1}{4} + \frac{1}{4} \cos(2k_y y) \cos(2k_z z) + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_z^2}{k^2} \right\} \cos(2k_y y) \right. \\
& \left. + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_y^2}{k^2} \right\} \cos(2k_z z) - \frac{\phi'}{2k^2} (k_y^2 + k_z^2) \right] \hat{i} \\
+ & 2k_y \phi U_o \sin(2k_y y) \left[ \frac{1}{4} + \frac{1}{4} \cos(2k_x x) \cos(2k_z z) + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_z^2}{k^2} \right\} \cos(2k_x x) \right. \\
& \left. + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_x^2}{k^2} \right\} \cos(2k_z z) - \frac{\phi'}{2k^2} (k_x^2 + k_z^2) \right] \hat{j} \\
+ & 2k_z \phi U_o \sin(2k_z z) \left[ \frac{1}{4} + \frac{1}{4} \cos(2k_x x) \cos(2k_y y) + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_y^2}{k^2} \right\} \cos(2k_x x) \right. \\
& \left. + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_x^2}{k^2} \right\} \cos(2k_y y) - \frac{\phi'}{2k^2} (k_x^2 + k_y^2) \right] \hat{k}
\end{aligned} \tag{1-205}$$

Se debe recordar en la expresión (1-205) que la magnitud del número de onda  $k$  y los números  $k_x$ ,  $k_y$  y  $k_z$ , asociados con el estado de resonancia, están dados por las ecuaciones (1-85) y (1-94). Además, es importante resaltar que en (1-194) las constantes  $\phi$  y  $\phi'$  están relacionados con las propiedades físicas del medio y la partícula, como se evidencia en las expresiones (1-134), (1-135), (1-202) y (1-204).

### $\vec{F}_{pr}$ en Dos Dimensiones

Si la componente  $x$  en el resonador rectangular, Figura 1-5, se hace grande comparada con las otras dos dimensiones  $\ell_x \gg \ell_y$  y  $\ell_x \gg \ell_z$ , no hay resonancia en esta dirección, así que

$$k_x = \frac{n_x \pi}{\ell_x} \approx 0 \tag{1-206}$$

Por lo tanto, la componente  $x$  en (1-205) se hace cero, debido a que  $\sin(2k_x x) = \sin(0) = 0$ . Entonces, para un capilar rectangular en el que  $\ell_x$  es grande comparado con las otras dos dimensiones del espacio y, además,  $\ell_y \neq \ell_z$ , la  $\vec{F}_{pr}$  tiene solo dos componentes y su ecuación, al usar la condición (1-206) en (1-205), es

$$\begin{aligned} \vec{F}_{pr} = 2k_y \phi U_o \sin(2k_y y) & \left[ \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(2k_z z) - \phi' \frac{k_z^2}{k^2} \right] \hat{j} \\ & + 2k_z \phi U_o \sin(2k_z z) \left[ \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(2k_y y) - \phi' \frac{k_y^2}{k^2} \right] \hat{k} \end{aligned} \quad (1-207)$$

### $\vec{F}_{pr}$ en Una Dimensión

Ahora asumiendo que hay resonancia solo en la dirección  $y$ , situación que puede ser ilustrada con el campo de presiones representado en la Figura 1-2b, por consiguiente, para que se de esta condición de resonancia es necesario que

$$k_z = \frac{n_z \pi}{\ell_z} \approx 0 \quad (1-208)$$

Entonces, al remplazar (1-208) en (1-207) se concluye que la  $\vec{F}_{pr}$  en una dimensión tiene la forma

$$\vec{F}_{pr} = 2\phi k_y U_o \sin(2k_y y) \hat{j} \quad (1-209)$$

### 1.4.4. $\vec{F}_{pr}$ en Dispositivos con Paredes Suaves en $x$

Para calcular la  $\vec{F}_{pr}$  cuando se consideran paredes suaves en la dirección  $x$  del dispositivo primero se determina, al igual que en el desarrollo hecho con paredes rígidas, la forma del potencial acústico usando la densidad de energía potencial y cinética. Por tanto, al sustituir (1-154) y (1-163) en la relación (1-130) se obtiene que el potencial acústico en este caso esta dado por

$$\begin{aligned} U_{ac}(x, y, z) = U_o & \left[ 2f_1 \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \right. \\ & - 3f_2 \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\ & - 3f_2 \frac{k_y^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \sin^2(k_y y) \cos^2(k_z z) \\ & \left. - 3f_2 \frac{k_z^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \sin^2(k_z z) \right] \end{aligned} \quad (1-210)$$

Donde  $U_o$  es el valor de potencial acústico máximo definido según la expresión (1-166),  $k$  la magnitud del vector de onda dada por (1-94) y  $k_x$ ,  $k_y$  y  $k_z$  los números de onda descritos en

la ecuación (1-85). Ahora, recordando que la forma de la  $\vec{F}_{pr}$  se calcula mediante el gradiente del potencial acústico, expresión (1-129). Entonces, al derivar (1-210) respecto a  $x$ ,  $y$  y  $z$  y haciendo un procedimiento similar al descrito en el caso rígido con el cual se encontró (1-185), (1-192) y (1-193), se obtiene que las componentes de la  $\vec{F}_{pr}$  son

$$-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial x} = -2k_x \phi U_o \sin(2k_x x) \left[ \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) - \phi' \left( \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \right) \right] \quad (1-211)$$

$$-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial y} = 2k_y \phi U_o \sin(2k_y y) \left[ \sin^2(k_x x) \cos^2(k_z z) - \phi' \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \right) \right] \quad (1-212)$$

$$-\frac{\partial U_{ac}(x, y, z)}{\partial z} = 2k_z \phi U_o \sin(2k_z z) \left[ \left( \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) \right) - \phi' \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_y y) + \frac{k_y^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \right) \right] \quad (1-213)$$

Siendo  $\phi$  el factor de contraste acústico y  $\phi'$  una constante definidas por las expresiones (1-202) y (1-204), respectivamente. Por último, al sustituir (1-211), (1-212) y (1-213) en (1-170) se encuentra, para el caso del dispositivo rectangular con paredes suaves en dirección  $x$ , que la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones tiene la forma

$$\begin{aligned} \vec{F}_{pr} = & -2k_x \phi U_o \sin(2k_x x) \left[ \cos^2(k_y y) \cos^2(k_z z) - \phi' \left( \frac{k_y^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \cos^2(k_y y) \right) \right] \hat{i} \\ & + 2k_y \phi U_o \sin(2k_y y) \left[ \sin^2(k_x x) \cos^2(k_z z) - \phi' \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_z z) + \frac{k_z^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \right) \right] \hat{j} \\ & + 2k_z \phi U_o \sin(2k_z z) \left[ \sin^2(k_x x) \cos^2(k_y y) - \phi' \left( \frac{k_x^2}{k^2} \cos^2(k_y y) + \frac{k_y^2}{k^2} \sin^2(k_x x) \right) \right] \hat{k} \end{aligned}$$

De igual forma que en el caso de paredes rígidas si  $\cos^2 \theta = (\cos 2\theta + 1)/2$  y  $\sin^2 \theta = (1 - \cos 2\theta)/2$  la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional puede ser escrita como

$$\begin{aligned}
\vec{F}_{pr} = & -2k_x \phi U_o \sin(2k_x x) \left[ \frac{1}{4} + \frac{1}{4} \cos(2k_y y) \cos(2k_z z) + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_z^2}{k^2} \right\} \cos(2k_y y) \right. \\
& \left. + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_y^2}{k^2} \right\} \cos(2k_z z) - \frac{\phi'}{2k^2} (k_y^2 + k_z^2) \right] \hat{i} \\
+ & 2k_y \phi U_o \sin(2k_y y) \left[ \frac{1}{4} - \frac{1}{4} \cos(2k_x x) \cos(2k_z z) - \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_z^2}{k^2} \right\} \cos(2k_x x) \right. \\
& \left. + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_x^2}{k^2} \right\} \cos(2k_z z) - \frac{\phi'}{2k^2} (k_x^2 + k_z^2) \right] \hat{j} \\
+ & 2k_z \phi U_o \sin(2k_z z) \left[ \frac{1}{4} - \frac{1}{4} \cos(2k_x x) \cos(2k_y y) - \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_y^2}{k^2} \right\} \cos(2k_x x) \right. \\
& \left. + \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{2} - \frac{\phi' k_x^2}{k^2} \right\} \cos(2k_y y) - \frac{\phi'}{2k^2} (k_x^2 + k_y^2) \right] \hat{k}
\end{aligned} \tag{1-214}$$

Es importante resaltar en (1-214) que si no hay resonancia en la dirección  $x$ , es decir, si  $k_x = 0$  todas las componentes de la fuerza acústica en (1-214) se hacen cero. Por lo tanto, si se va a definir para este caso la fuerza en dos dimensiones solo se puede hacer al considerar las componentes de la fuerza en los planos  $(x, y)$  o  $(x, z)$ .

### $\vec{F}_{pr}$ en Dos Dimensiones

Tomando  $k_y = 0$  o  $k_z = 0$  en (1-214) la  $\vec{F}_{pr}$  en dos dimensiones, para el caso de paredes suaves en dirección  $x$ , se puede escribir en los planos  $(x, z)$  y  $(x, y)$  como

$$\begin{aligned}
\vec{F}_{pr} = & -2k_x \phi U_o \sin(2k_x x) \left[ \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(2k_z z) - \phi' \frac{k_z^2}{k^2} \right] \hat{i} \\
& + 2k_z \phi U_o \sin(2k_z z) \left[ \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos(2k_x x) - \phi' \frac{k_x^2}{k^2} \right] \hat{k} \quad \text{plano } (x, z)
\end{aligned} \tag{1-215}$$

$$\begin{aligned}
\vec{F}_{pr} = & -2k_x \phi U_o \sin(2k_x x) \left[ \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(2k_y y) - \phi' \frac{k_y^2}{k^2} \right] \hat{i} \\
& + 2k_y \phi U_o \sin(2k_y y) \left[ \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos(2k_x x) - \phi' \frac{k_x^2}{k^2} \right] \hat{j} \quad \text{plano } (x, y)
\end{aligned} \tag{1-216}$$

### $\vec{F}_{pr}$ en Una Dimensión

Por último, para establecer la forma de la  $\vec{F}_{pr}$  en una dimensión se asume que  $k_y = k_z = 0$  con lo cual se obtiene que su expresión, en el caso de paredes suaves en  $x$ , esta dada por

$$\vec{F}_{pr} = -2k_x \phi U_o \sin(2k_x x) \hat{i} \quad (1-217)$$

Es importante notar al comparar (1-209) con (1-217) que su forma en general es igual en ambos casos, sin embargo, al utilizar paredes suaves la fuerza tiene asociado un signo menos que cambia el sentido de esta fuerza.

Con el resultado de la  $\vec{F}_{pr}$  en una dimensión para el caso de un dispositivo con paredes suaves en  $x$ , ecuación (1-217), termina la deducción de la  $\vec{F}_{pr}$  en tres, dos y una dimensión para los dos casos considerados, ahora con las expresiones teóricas encontradas en el siguiente capítulo se propondrá un modelo físico tridimensional que describe el movimiento de partículas esféricas de tamaño micrométrico con propiedades similares a las de parásitos de *Leishmania* sometidas a la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  generada por un campo acústico de onda estacionaria y un flujo transversal en dirección  $x$ .

## Capítulo 2

# Movimiento en el Campo Acústico

En el capítulo 1 se calculó, mediante la expresión general desarrollada por Gor'kov (1962) en términos del potencial acústico, la  $\vec{F}_{pr}$  que actúa sobre una partícula esférica suspendida al interior de un resonador rectangular con paredes rígidas y suaves en la dirección  $x$ , Figura 1-5, con lo cual se hallaron las expresiones teóricas (1-205) y (1-214) que representan la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones en los dos casos de interés.

En este capítulo se usarán las ecuaciones (1-205) y (1-214) en el desarrollo de un modelo físico que permita estudiar el movimiento en tres y dos dimensiones de partículas o parásitos de *Leishmania* sometidos a la acción del campo acústico al interior del dispositivo rectangular. Para ello, además de la  $\vec{F}_{pr}$ , se supondrá que las poblaciones al interior del dispositivo interactúan con el campo gravitacional y el líquido el cual ejerce sobre estas una fuerza de arrastre viscoso y de empuje. Adicionalmente a las fuerzas que actúan sobre partículas o células individuales, se considerará también una fuerza de interacción entre éstas generada por el contacto que experimentan en las zonas de equilibrio acústico.

Entonces, después de identificar las fuerzas sobre las partículas se estableció, mediante un análisis dinámico, la ecuación de movimiento de las poblaciones. Ecuación que se solucionó usando el algoritmo Forest-Ruth optimizado el cual se emplea en dinámica molecular para simular el movimiento de sistemas con muchas partículas. Esto permitió por medio de simulaciones visualizadas con Gnuplot 5.0 estudiar el movimiento individual y en grupo de  $N$  partículas esféricas de tamaño similar al de los parásitos de *Leishmania*. Análisis que provee información para comprender el comportamiento de los parásitos expuestos a un campo acústico de una onda estacionaria. Por consiguiente en la primera parte de este capítulo se describe cada una de las fuerzas mencionadas con excepción de la  $\vec{F}_{pr}$  la cual fue presentada el capítulo previo. Luego se explica el procedimiento mediante el cual se solucionó la ecuación de movimiento y por último se describen los resultados obtenidos.



## 2.1. Fuerzas Sobre las Partículas o Parásitos

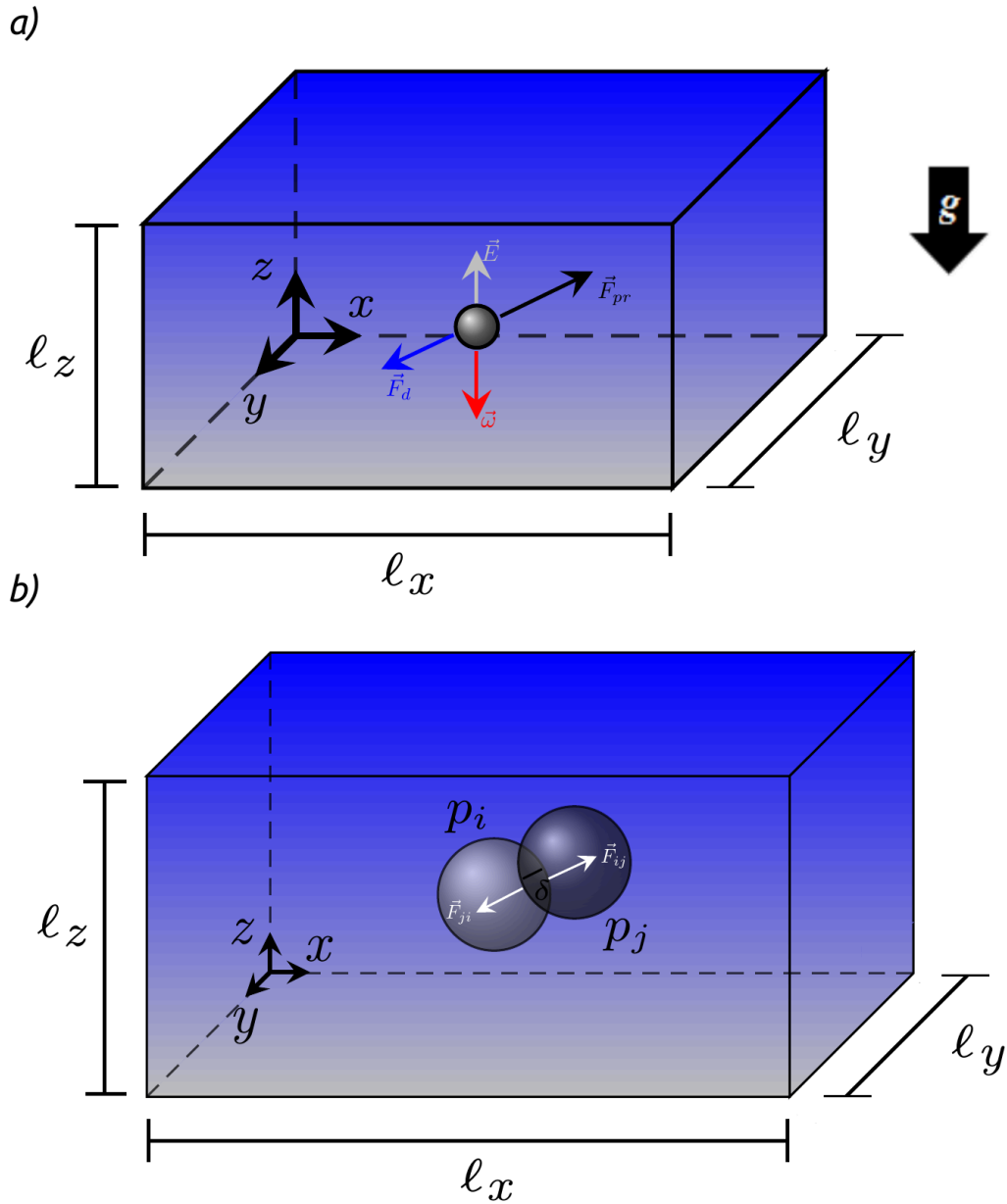


Figura 2-1.: Fuerzas que actúan sobre las partícula o parásitos en el dispositivo rectangular. (a) Fuerzas debido al campo gravitacional  $\vec{\omega}$ , al arrastre del líquido  $\vec{F}_d$ , al empuje del líquido  $\vec{E}$  y al campo acústico  $\vec{F}_{pr}$ , para dibujar estas fuerzas se supuso que el objeto se desplazaba diagonalmente hacia arriba según la dirección de la  $\vec{F}_{pr}$ . (b) Fuerzas de contacto entre las partículas en las zonas de equilibrio acústico  $\vec{F}_{ij}$  o  $\vec{F}_{ji}$ .

Para construir el modelo, además de la fuerza acústica vector negro Figura 2-1a, se supuso que las partículas por la interacción con el fluido experimentaban dos tipos de fuerzas. Por una lado, fuerzas de arrastre viscoso, vector azul Figura 2-1a, relacionadas con su movimiento o con el flujo generado en dirección  $x$ . Y por otro, fuerzas de empuje asociadas con la presión hidrostática establecida por el peso del líquido, vector gris Figura 2-1a, las cuales tiene la misma dirección pero sentido contrario al peso de cada partícula o célula, vector rojo Figura 2-1a. Es importante resaltar que al llegar a la zona de equilibrio acústico, adicionalmente las poblaciones interactúan entre si en los agregados a través de fuerzas de contacto asumidas para el modelo como fuerzas de Hertz, vectores blancos Figura 2-1b. A continuación se describe en detalle cada una de estas fuerzas con el propósito de establecer la ecuación de movimiento para las  $N$  partículas o células al interior del dispositivo acústico con geometría rectangular.

### 2.1.1. Fuerza de Arrastre Viscoso $\vec{F}_d$

La  $\vec{F}_d$ , vector azul Figura 2-1a, es una fuerza generada por la fricción que ejerce el líquido sobre los objetos que se mueven en él o si el objeto esta en reposo y el fluido en movimiento con velocidad  $\vec{v}$  se puede interpretar  $\vec{F}_d$  como la fuerza que ejerce el flujo sobre el objeto. Al ser esta una fuerza disipativa su dirección es opuesta a la dirección de movimiento del objeto cuando este se mueve el líquido, pero si el objeto es transportado por el fluido la dirección de  $\vec{F}_d$  va en la dirección del flujo. En general esta fuerza depende de la forma del cuerpo, de la velocidad  $\vec{u}$  a la cual se mueve el objeto en líquido, de la velocidad del flujo  $\vec{v}$  si hay movimiento del fluido y de la viscosidad dinámica  $\eta$  del líquido (Cengel & Cimbala, 2006; Nakayama, 2000). Con lo anterior la  $\vec{F}_d$  puede ser definida en magnitud como

$$F_d = C_d A \frac{\rho v^2}{2} \quad (2-1)$$

Donde  $A$  es el área del cuerpo proyectada sobre un plano vertical a la dirección del flujo,  $C_d$  es un coeficiente adimensional conocido como coeficiente de arrastre cuyo valor depende de la forma del cuerpo y el termino  $\rho v^2/2$  corresponde a la presión dinámica del líquido en la cual  $\rho$  representa la densidad del líquido y  $v^2$  su rapidez o magnitud de la velocidad relativa entre el movimiento del líquido y el objeto. Si el objeto que se mueve en el líquido es de forma esférica el coeficiente de arrastre, para números de Reynolds <sup>1</sup> pequeños ( $R_e \leq 1$ ), (Cengel & Cimbala, 2006; Nakayama, 2000) tiene la forma

$$C_d = \frac{24}{R_e} \quad (2-2)$$

<sup>1</sup> Factor adimensional que predice si el flujo de un líquido es laminar o turbulento, este número depende de la densidad  $\rho$  del fluido, de la viscosidad dinámica  $\eta$  del líquido, del diámetro del ducto  $D'$  o de su radio hidráulico  $R$ , siendo  $D' = 4R$ , y de la rapidez promedio  $\bar{v}$  del flujo, con lo anterior este número está dado según la expresión  $R_e = \frac{\bar{v} D' \rho}{\eta}$  (Mott., 1996).

Al sustituir (2-2) en (2-1) la fuerza de arrastre generada sobre un objeto de forma esférica, conocida como fuerza de Stokes, se puede escribir como

$$\vec{F}_d = -6\pi\eta r_o (\vec{u} - \vec{v}) \quad (2-3)$$

El signo menos en (2-3) se relaciona con el hecho que esta fuerza es contraria a la dirección de movimiento de la partícula,  $r_o$  representa el radio de la partícula esférica y la resta entre velocidades corresponde a la velocidad relativa del objeto y el fluido.

### 2.1.2. Fuerza de Flotación $\vec{F}_b$

La fuerza de flotación  $\vec{F}_b$  se genera al sumar el vector de peso  $\vec{\omega}$  del objeto, generado por la interacción de su masa con el campo gravitacional, flecha roja Figura 2-1a, con el vector asociado al empuje  $\vec{E}$ , fuerza que se establece por la diferencia en la presión hidrostática del líquido, flecha gris Figura 2-1a. Entonces si se definen los vectores de peso y empuje como

$$\vec{\omega} = m_{obj}\vec{g} \quad (2-4)$$

$$\vec{E} = -m_{liq}\vec{g} \quad (2-5)$$

Donde  $\vec{g} = 9,8\frac{m}{s^2}(-\hat{k})$  es el vector de aceleración gravitacional,  $m_{obj}$  la masa del objeto y  $m_{liq}$  la masa del líquido, masas que pueden ser escritas en términos de la densidad en la forma  $m_{obj} = \rho_{obj}V$  y  $m_{liq} = \rho_{liq}V$  respectivamente, siendo  $\rho_{liq}$  la densidad del líquido,  $\rho_{obj}$  la densidad del objeto y  $V$  su volumen. Con esto se tiene al sumar las fuerzas en dirección vertical, Figura 2-1a, que  $\vec{F}_b$  puede ser escrita como

$$\vec{F}_b = \vec{\omega} + \vec{E} \quad (2-6)$$

$$\vec{F}_b = V(\rho_{obj} - \rho_{liq})\vec{g} \quad (2-7)$$

Ahora si se tiene un objeto de forma esférica, como una partícula de Látex, con radio  $r_o$  al sustituir  $V$  por el volumen de una esfera (2-7) toma la forma

$$\vec{F}_b = \frac{4}{3}\pi r_o^3(\rho_{obj} - \rho_{liq})\vec{g} \quad (2-8)$$

Es importante resaltar en (2-8) que  $\vec{F}_b$  puede ser positiva, negativa o cero, dependiendo de la diferencia entre la densidad del objeto y el fluido. Por ejemplo, si  $\rho_{obj} > \rho_{liq}$  la  $\vec{F}_b$  es negativa, dado el sentido del vector  $\vec{g}$ , lo que significa que el objeto se hundiría en el líquido, por otro lado, si  $\rho_{obj} < \rho_{liq}$  la  $\vec{F}_b$  es positiva haciendo que el objeto se desplace hacia arriba, en dirección  $z$  positivo, o flote y por último si  $\rho_{obj} = \rho_{liq}$  la  $\vec{F}_b$  es cero, lo que quiere decir, que el objeto estaría suspendido en el líquido sin ningún movimiento efectivo hacia arriba o hacia abajo en dirección  $z$  (Cengel & Cimbala, 2006).

### 2.1.3. Fuerza de Hertz $\vec{F}_{ij}$

La  $\vec{F}_{ij}$  es una fuerza de contacto que se genera entre partículas por la agregación de  $N$  de ellas en las zonas de equilibrio acústico, nodos de presión de la onda estacionaria, entonces, si se supone que se tienen dos partículas, la partícula  $i$ -ésima  $p_i$  y la partícula  $j$ -ésima  $p_j$ , que entran en contacto al ubicarse en la zona de equilibrio estas ejercen una sobre la otra el par de fuerzas normales a las superficies en contacto  $\vec{F}_{ij}$  y  $\vec{F}_{ji}$ , vectores blancos Figura 2-1b, las cuales corresponden a la fuerza que ejerce  $p_i$  sobre  $p_j$  y la fuerza que ejerce  $p_j$  sobre  $p_i$ , respectivamente, cuya magnitud y dirección es igual pero su sentido es opuesto. Estas fuerzas en magnitud dependen de la forma de las superficies en contacto, de la rigidez de los objetos y de la distancia de penetración relativa entre ellos  $\delta$ , Figura 2-1b (Skrinjar *et al.* , 2018). Por lo tanto, se define la magnitud de esta fuerza, conocida como fuerza de Hertz, en la forma

$$F_{ij} = K' \delta^n \quad (2-9)$$

Donde los subíndices en (2-9) representan la interacción entre la partícula  $i$ -ésima y  $j$ -ésima de las  $N$  partículas ubicadas en el nodo al interior del dispositivo acústico,  $K'$  es conocido como parámetro de rigidez y  $n$  es un exponente no lineal que al igual que  $K'$  depende de las propiedades elásticas del material y de la forma geométrica de las superficies en contacto. Entonces dado el contacto entre dos esferas con radios  $r_i$  y  $r_j$ , como las partículas mostradas en Figura 2-1b, el parámetro  $K'$  puede ser calculado según la relación (Skrinjar *et al.* , 2018)

$$K' = \frac{4}{3(h_i - h_j)} \sqrt{\frac{r_i r_j}{r_i + r_j}} \quad (2-10)$$

Siendo el parámetro  $h_k$  definido para cada partícula en la forma

$$h_k = \frac{1 - \nu_k^2}{Y_k} \quad k = i, j, \quad (2-11)$$

Expresión en la que los términos  $Y_k$  y  $\nu_k$  representan el modulo de elasticidad de Young y el coeficiente de Poisson del material, respectivamente (Skrinjar *et al.* , 2018).

## 2.2. Ecuación de Movimiento

Para encontrar la ecuación asociada con el movimiento de un partícula al interior del dispositivo acústico, sometida a la acción de la  $\vec{F}_{pr}$ , definida por (1-205) o (1-214), de la fuerza de arrastre  $\vec{F}_d$ , (1-214), de la fuerza de flotación  $\vec{F}_b$ , (2-8), y de la fuerza de Hertz, (2-9), se hace la suma vectorial de estas fuerzas, con lo que se obtiene, si la partícula se desplaza hacia una región de equilibrio acústico, nodo de presión, que la ecuación de movimiento en tres dimensiones puede ser escrita en la forma

$$\vec{F}_{pr} + \vec{F}_d + \vec{F}_b = m_p \vec{a} \quad (2-12)$$

Siendo  $m_p$  la masa de la partícula y  $\vec{a}$  su aceleración. Se debe resaltar que en (2-12) no se tienen en cuenta la interacción entre partículas. Sin embargo, cuando la partícula llega al nodo de presión esta interactúa con otras debido al contacto generado entre ellas, por lo tanto, bajo tal condición es necesario adicionar a la ecuación de movimiento (2-12) la fuerza de Hertz, (2-9), con lo cual (2-12) se escribe como

$$\vec{F}_{pr} + \vec{F}_d + \vec{F}_b + \vec{F}_{ij} = m_p \vec{a} \quad (2-13)$$

Las ecuaciones (2-12) y (2-13) representan las ecuaciones de movimiento de la partícula, las cuales pueden ser reescritas de forma general si se tiene presente que la suma de fuerzas definida al lado izquierdo de cada ecuación representa la fuerza neta  $\vec{F}_N$  sobre la partícula, por lo tanto, la ecuación de movimiento en cualquier caso es

$$\vec{F}_N = m_p \vec{a} \quad (2-14)$$

$$\vec{a} + \frac{\vec{F}_N}{m_p} = 0 \quad (2-15)$$

Recordando que la aceleración de la partícula se puede definir como la segunda derivada del vector de posición  $\vec{r}$ , la ecuación (2-15) toma la forma

$$\frac{d^2 \vec{r}(t)}{dt^2} + \frac{\vec{F}_N}{m_p} = 0 \quad (2-16)$$

Esta expresión, en términos matemáticos, es una ecuación diferencial de segundo orden cuya solución es la función vectorial  $\vec{r}(t)$ , solución que se obtiene al integrar (2-16) respecto al tiempo. Sin embargo, su solución puede ser determinada analíticamente o no dependiendo

de la forma de la  $\vec{F}_N$ . En nuestro caso debido a la forma de la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones establecida en el capítulo 1, ecuaciones (1-205) o (1-214), la relación (2-16) no puede ser solucionada analíticamente por tanto se desarrolló un algoritmo con C++ que permitió mediante integración numérica encontrar la solución aproximada de (2-16).

Es necesario resaltar que solucionar (2-16) físicamente significa determinar la posición, velocidad y aceleración de la partícula en cualquier instante de tiempo, lo que permite definir su trayectoria en el espacio, ayudando, así a comprender el comportamiento de la partícula cuando actúan sobre ella las fuerzas  $\vec{F}_{pr}$ ,  $\vec{F}_d$ ,  $\vec{F}_b$  y  $\vec{F}_{ij}$  descritas previamente.

### 2.2.1. Solución de la Ecuación de Movimiento

Para solucionar (2-16) numéricamente es necesario notar que esta ecuación se puede describir como dos ecuaciones diferenciales de primer orden. Para ello se debe recordar que la aceleración de la partícula corresponde al cambio de su velocidad en el tiempo, por lo tanto, si  $\vec{a} = \Delta\vec{u}/\Delta t$  la ecuación de movimiento expresada según (2-14) toma la forma

$$\Delta\vec{u} = \frac{\vec{F}_N}{m_p} \Delta t \quad (2-17)$$

$$\vec{u} = \vec{u}(t) + \frac{\vec{F}_N}{m_p} \Delta t \quad (2-18)$$

Por otro lado, si se considera que la velocidad de la partícula es la razón de cambio de su desplazamiento  $\Delta\vec{r}$ , se define la otra ecuación de primer orden como

$$\Delta\vec{r} = \vec{u} \Delta t \quad (2-19)$$

$$\vec{r} = \vec{r}(t) + \vec{u} \Delta t \quad (2-20)$$

Entonces, la solución de (2-16), para un sistema acústico con  $N$  partículas, se obtiene al encontrar  $\vec{u}$  y  $\vec{r}$  de todas las partículas en diferentes tiempos dadas unas condiciones iniciales, es decir, con los valores del vector de posición  $\vec{r}(0)$  y de velocidad  $\vec{u}(0)$  en  $t = 0$ . Para lograr esto se eligió el algoritmo Forest-Ruth optimizado, usado en simulaciones de dinámica molecular, que permite integrar las ecuaciones de movimiento en sistemas de muchas partículas con alta eficiencia computacional (Omelyan *et al.*, 2002).

### 2.2.1.1. Algoritmo Forest-Ruth Optimizado

Este algoritmo permite encontrar  $\vec{u}$  y  $\vec{r}$  en un tiempo posterior partiendo de sus valores iniciales,  $\vec{r}(0)$  y  $\vec{u}(0)$ , con los cuales se determina la fuerza neta para este tiempo y luego, después de un paso de tiempo  $\Delta t = h$ , se establecen los nuevos valores de posición, velocidad y fuerza sobre la partícula. Esto se logra al seguir la rutina definida por (Omelyan *et al.*, 2002) en la cual se establecen los pasos de evolución de la posición y velocidad desde un tiempo  $t$  hasta un tiempo  $t + h$  como

$$\begin{aligned}
\vec{u}_1 &= \vec{u}(t) + \sigma \frac{h\vec{f}[\vec{r}(t)]}{m} \\
\vec{r}_1 &= \vec{r}(t) + \frac{(1-2\zeta)}{2} h\vec{u}_1 \\
\vec{u}_2 &= \vec{u}_1 + \chi \frac{h\vec{f}[\vec{r}_1]}{m} \\
\vec{r}_2 &= \vec{r}_1 + \zeta h\vec{u}_2 \\
\vec{u}_3 &= \vec{u}_2 + (1-2(\chi+\sigma)) \frac{h\vec{f}[\vec{r}_2]}{m} \\
\vec{r}_3 &= \vec{r}_2 + \zeta h\vec{u}_3 \\
\vec{u}_4 &= \vec{u}_3 + \chi \frac{h\vec{f}[\vec{r}_3]}{m} \\
\vec{r}(t+h) &= \vec{r}_3 + \frac{(1-2\zeta)}{2} h\vec{u}_4 \quad \text{nueva posición} \\
\vec{u}(t+h) &= \vec{u}_4 + \sigma \frac{h\vec{f}[\vec{r}(t+h)]}{m} \quad \text{nueva velocidad}
\end{aligned} \tag{2-21}$$

En (2-21)  $\sigma$ ,  $\zeta$  y  $\chi$  representan constantes cuyos valores están dados por (Omelyan *et al.*, 2002)

$$\begin{aligned}
\sigma &= +0,1644986515575760E + 00 \\
\zeta &= -0,2094333910398989E - 01 \\
\chi &= +0,1235692651138917E + 01
\end{aligned} \tag{2-22}$$

Entonces, para calcular  $\vec{r}(t+h)$  y  $\vec{u}(t+h)$ , usando (2-21), se implemento este algoritmo en un código desarrollado en C++, donde al dar los valores de  $\vec{r}(t)$  y  $\vec{u}(t)$  en  $t = 0$ , se determina la fuerza neta y luego, según (2-21), se calculan los valores de  $\vec{u}_1$  y  $\vec{r}_1$  con los que nuevamente se establece la fuerza y los valores  $\vec{u}_2$  y  $\vec{r}_2$  proceso que se repite hasta encontrar  $\vec{u}_4$  y  $\vec{r}_3$  con

los que finalmente se hallan los nuevos valores de la posición y velocidad de la partícula en un tiempo  $t + h$ . Ahora si esto se repite al introducir (2-21) en un bucle de tiempo se obtiene la evolución temporal de  $\vec{r}(t)$  y  $\vec{u}(t)$  para  $N$  partículas al interior del dispositivo acústico sometidas a la acción de las fuerzas  $\vec{F}_{pr}$ ,  $\vec{F}_d$ ,  $\vec{F}_b$  y  $\vec{F}_{ij}$ .

## 2.3. Resultados

Para obtener los resultado que se presentaran en esta sección es necesario tener en cuenta que en la integración numérica de (2-16) con (2-21) se uso un paso de tiempo de  $h = 1\mu s$  y que los parámetros, con los que se definen las fuerzas consideradas, asociados a las partículas y el líquido, como su densidad, viscosidad y velocidad del sonido en cada medio, se tomaron según los valores dados en el Cuadro 2-1.

Parámetro	Símbolo	Valor
Densidad de partículas	$\rho_p$	$1050 \frac{kg}{m^3}$
Densidad del agua	$\rho_f$	$998 \frac{kg}{m^3}$
Viscosidad agua 20°C	$\eta$	$1,003 \times 10^{-3} Pa \cdot s$
Velocidad del sonido en agua	$c_f$	$1483 \frac{m}{s}$
Velocidad del sonido en partículas	$c_p$	$1700 \frac{m}{s}$
Razón de velocidades del sonido	$\kappa$	1,15
Densidad relativa	$\zeta$	1,05
Módulo de Young poliestireno	$Y$	3200 – 3400MPa
Razón de Poisson poliestireno	$\nu$	0,33

Cuadro 2-1.: Parámetros físicos usados en la simulación. Tomados de (Bangs Laboratories, 2015; Barnkob *et al.* , 2010).

Antes de usar el modelo propuesto se validaron los resultados encontrados con la integración



numérica, al solucionar (2-16) para una partícula que se mueve en el plano  $(x, y)$  bajo la acción de la fuerza acústica en una dimensión (1-209), con componente en dirección  $y$  donde no hay acción de la fuerza gravitacional ni de la presión hidrostática. Entonces, si una partícula de  $5\mu m$  se mueve transversalmente en dirección  $y$ , bajo la acción de la fuerza acústica unidimensional (1-209) y de la fuerza de arrastre (2-3), se encuentra, al tomar su posición inicial  $y(0) = 10\mu m$ , la densidad de energía acústica  $E_{ac} = 6\frac{J}{m^3}$  y el ancho del dispositivo  $\ell_y = 200\mu m$ , que sus gráficas de posición transversal  $y(t)$  como función del tiempo y de rapidez como función de la posición  $u_p(y)$ , línea verde sólida Figura 2-2, ajustan perfectamente con las curvas  $y(t)$  y  $u_p(y)$  encontradas a partir de las soluciones analíticas dadas en Barnkob *et al.* (2010) y Laurell & Lenshof (2015), línea negra sólida Figura 2-2, y cuya forma matemática está representada por las expresiones (2-23) y (2-24) respectivamente.

$$y(t) = \frac{1}{k_y} \arctan \left[ \tan(k_y y(0)) \exp \left( \frac{4\phi}{9\eta} (k_y r_o)^2 E_{ac} t \right) \right] \quad (2-23)$$

$$u_p(y) = \frac{2\phi k_y r_o^2 E_{ac}}{9\eta} \sin(2k_y y) \quad (2-24)$$

Donde  $k_y$  corresponde al número de onda en dirección  $y$ ,  $\phi$  es el factor de contraste acústico definido en (1-202),  $y(0)$  la posición inicial de la partícula en esta dirección,  $r_o$  el radio de la partícula,  $\eta$  la viscosidad dinámica del líquido y  $E_{ac}$  la densidad de energía acústica dada por (1-168). Es de resaltar que (2-23) y (2-24) se obtienen del estado de equilibrio entre la  $\vec{F}_{pr}$  en una dimensión y la fuerza de arrastre  $\vec{F}_d$ .

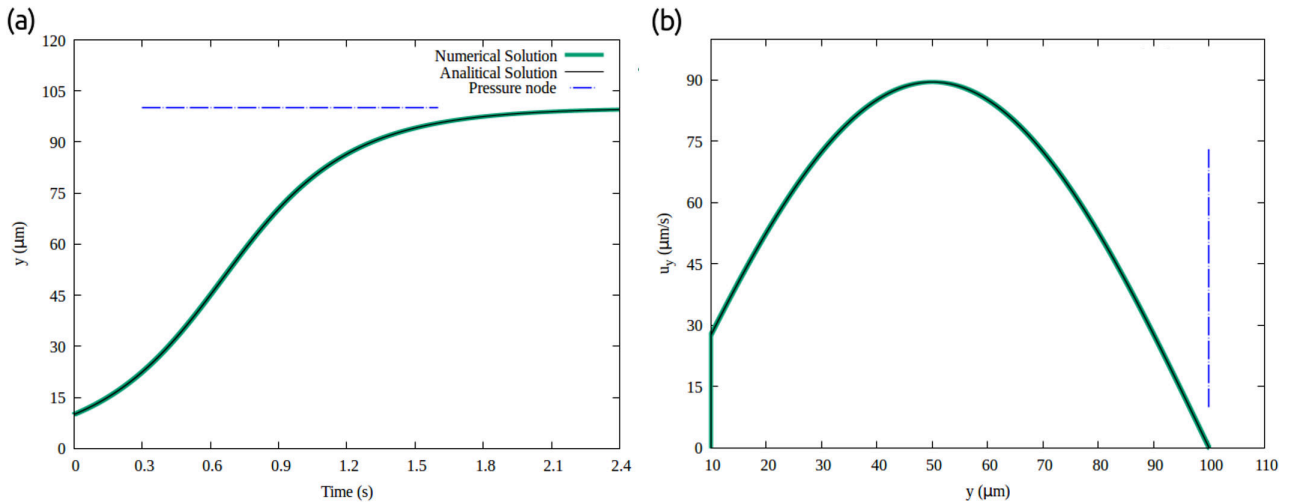


Figura 2-2.: Comparación entre solución numérica y analítica en una dimensión, ambas soluciones describen el mismo comportamiento de la partícula. a) Posición en el tiempo de la partícula que se mueve transversalmente bajo la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  y b) Rapidez de la partícula como función de su posición  $y$ .

Por otro lado, para la solución de (2-16) en tres y dos dimensiones se usó las librerías *Vector.h* y *Random63.h* desarrolladas en C++ y facilitadas por el Grupo de Simulación de Sistemas Físicos de la Universidad Nacional de Colombia dirigido por el profesor José Daniel Muñoz. Lo anterior permitió, al incluir estas librerías en el programa construido, trabajar los vectores de posición, velocidad y fuerza de forma tridimensional y generar distribuciones ordenadas de partículas, en  $t = 0$ , al interior del dispositivo simulado.

Entonces, teniendo presente lo mencionado previamente, a continuación se presentan por medio de gráficas e imágenes los resultados encontrados al solucionar (2-16) en tres dimensiones para  $N$  partículas ubicadas en el dispositivo rectangular al considerar, primero, todas sus paredes rígidas y segundo sus paredes suaves en dirección  $x$ .

### 2.3.1. Dispositivo con Paredes Rígidas

Con el objetivo de determinar la solución de (2-16) en el caso de paredes rígidas, se tomo en la simulación, además de las fuerzas descritas por (2-3), (2-8) y (2-9), la  $\vec{F}_{pr}$  dada por (1-205), encontrando los resultados que se describen en la siguiente parte de este trabajo.

#### 2.3.1.1. Movimiento en tres dimensiones

Habiendo definido la expresión de la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones, primero se simuló el movimiento de  $N$  partículas de  $15\mu m$  sometidas a la acción de esta fuerza para una  $E_{ac} = 18,2\frac{J}{m^3}$  en un dispositivo acústico, sin flujo, cuyas dimensiones fueron elegidas de tal manera que el canal siempre vibraba con la misma frecuencia de  $3,7MHz$ . Dadas estas condiciones, se encontró, para el modo de vibración fundamental  $n_x = n_y = n_z = 1$ , un nodo de presión en el centro del dispositivo donde se agregaban la mayoría de las partículas, Figura 2-3, sin embargo, se observó que partículas en ciertas regiones, en particular aquellas con alguna componente de su vector de posición  $\leq \lambda/7$ , alcanzaban sus posiciones de equilibrio acústico sobre las paredes del dispositivo cúbico, Figura 2-3c. Además de lo anterior, es importante resaltar la existencia de zonas de equilibrio inestable identificadas con los números en la Figura 2-3b en las cuales las partículas permanecen por un tiempo corto durante la aplicación del campo hasta que finalmente tienden a desplazarse hacia las paredes laterales o inferiores. El hecho de que las partículas en estas zonas se desplacen de esta forma y no hacia las paredes superiores se relaciona con el efecto de la fuerza gravitacional en dirección  $z$ .

En el caso del modo de vibración  $n_x = 2$  y  $n_y = n_z = 1$  se establecieron dos agregados de partículas en el centro del dispositivo, Figura 2-4, pero al igual que en el modo fundamental, se encontró que no todas las partícula se agregaban en estos nodos de presión, hallando algunas en las paredes, Figura 2-4c, es interesante resaltar que la zona donde más partículas son agregadas sobre las paredes corresponde a  $x = \lambda/2 = 200$  y además que al cambiar el

modo de vibración el patrón de movimiento en el plano frontal ( $y, z$ ) también varía como se identifica al comparar la distribución de partículas de las Figuras 2-3b con 2-4b.

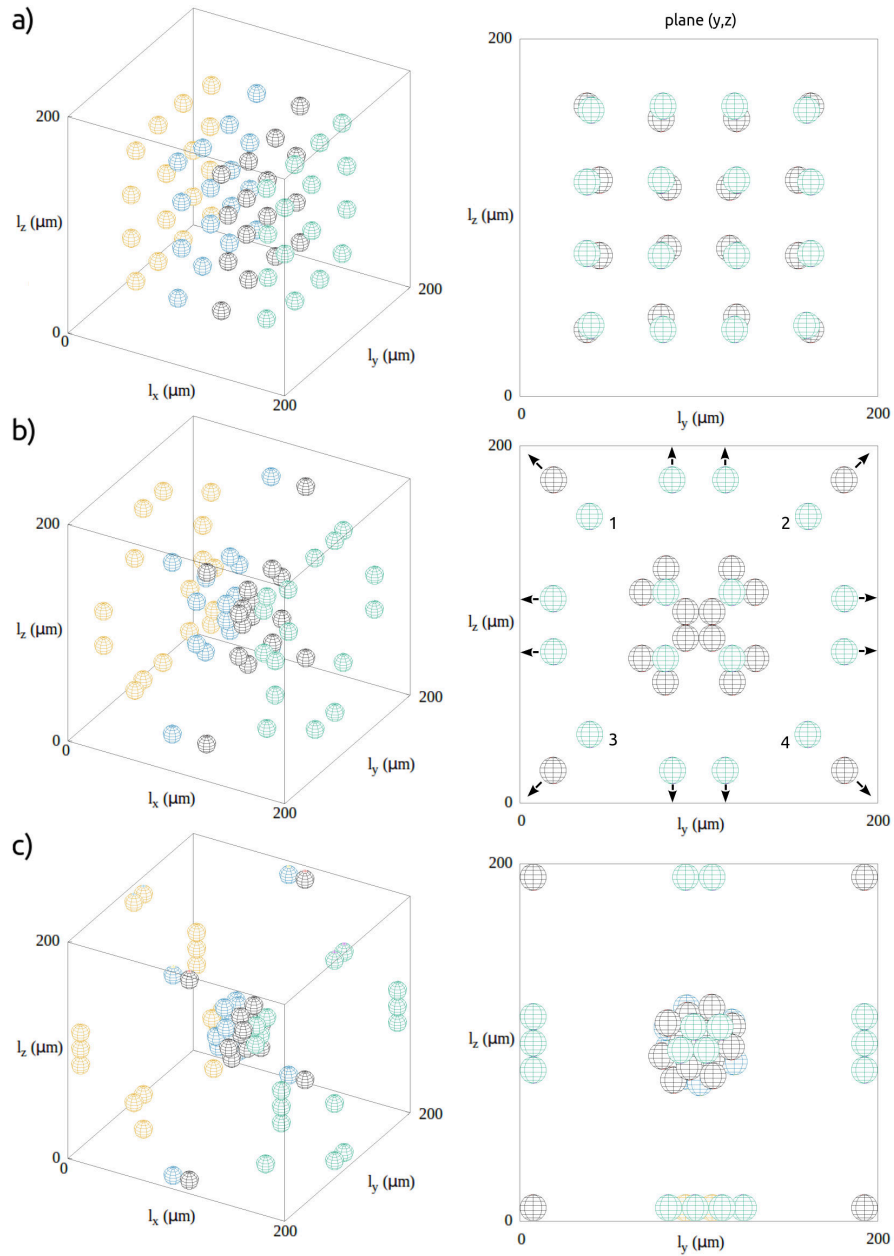


Figura 2-3.: Agregados formados por la  $\vec{F}_{pr}$  3D que actúa sobre 64 partículas de  $15\mu m$  para el modo de vibración fundamental,  $n_x = n_y = n_z = 1$ . a) Posición inicial de las partículas. b) Movimiento de las partículas hacia las posiciones de equilibrio y c) Posición final de las partículas.

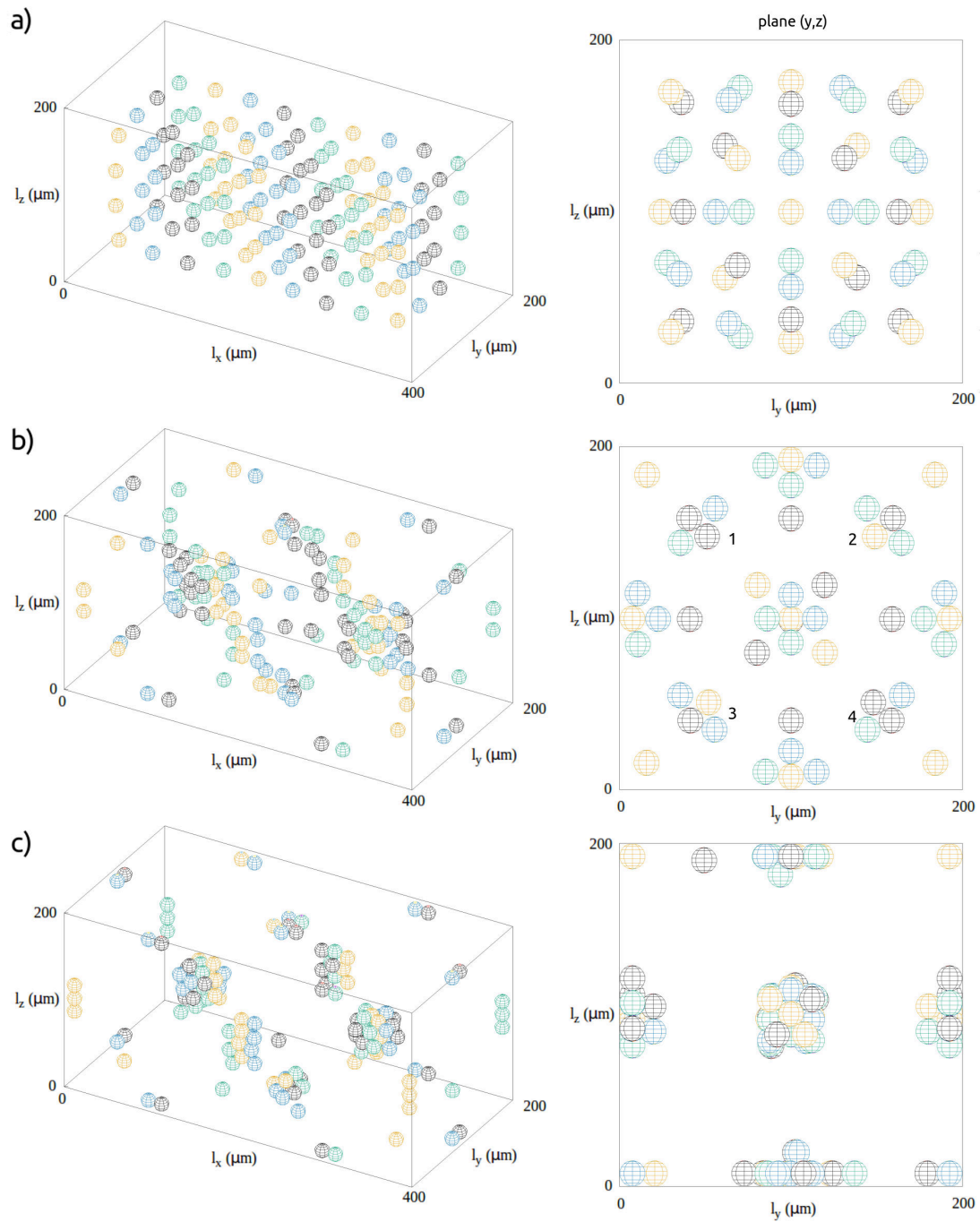


Figura 2-4.: Agregados formados por la  $\vec{F}_{pr}$  3D que actúa sobre 144 partículas de  $15\mu\text{m}$  para el modo de vibración  $n_x = 2$  y  $n_y = n_z = 1$ . a) Posición inicial de las partículas. b) Movimiento de las partículas hacia las posiciones de equilibrio y c) Posición final de las partículas.

Por otro lado, al considerar el modo  $n_x = 3$  y  $n_y = n_z = 1$  bajo la misma frecuencia de resonancia se observó la formación de tres agregados de partículas en el centro del canal

al igual que movimientos de partículas hacia las paredes con características similares a los descritos en los dos modos de vibración anteriores, Figura 2-5.

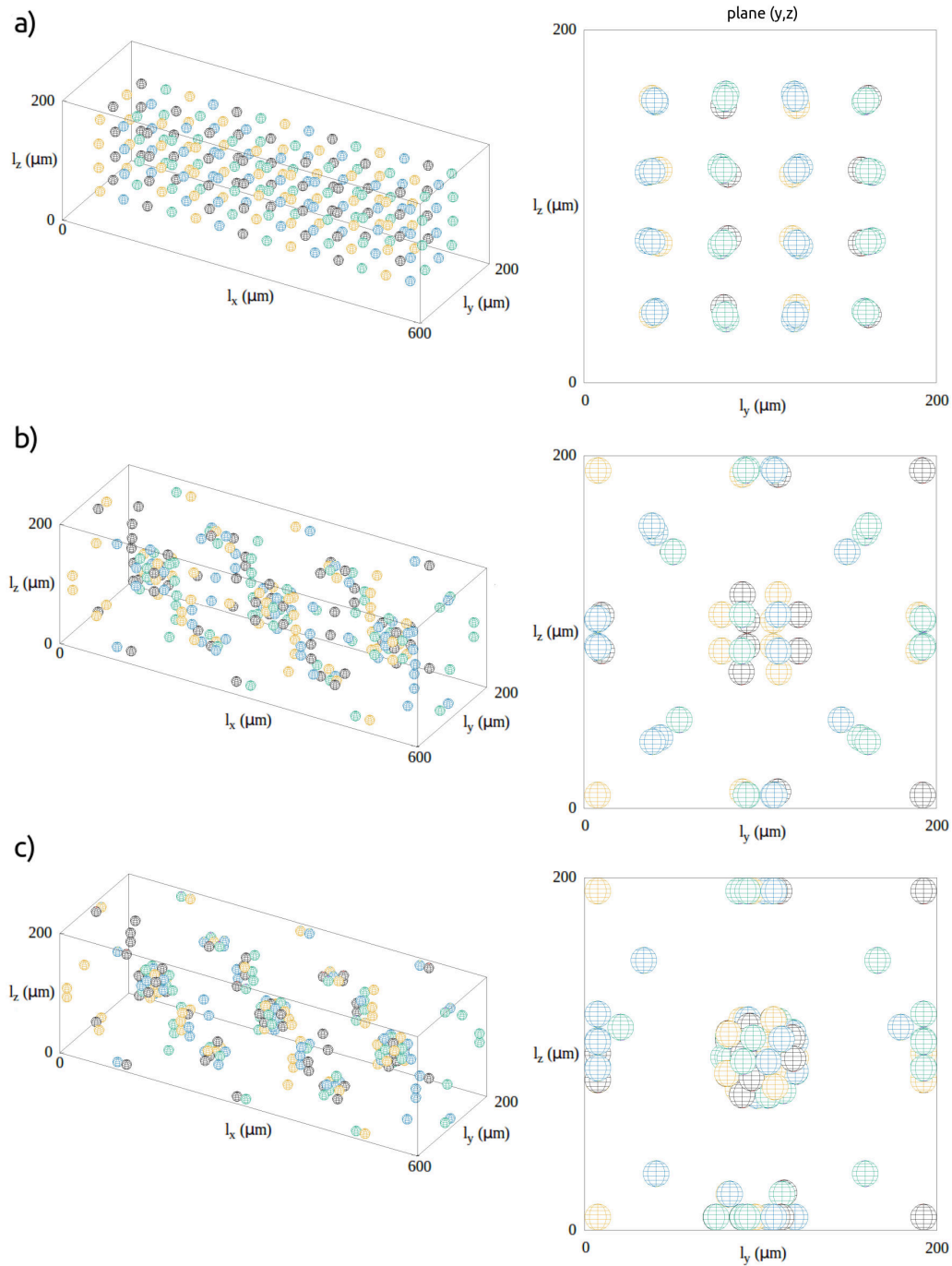


Figura 2-5.: Agregados formados por la  $\vec{F}_{pr}$  3D que actúa sobre 224 partículas de  $15\mu m$  para el modo de vibración  $n_x = 3$  y  $n_y = n_z = 1$ . a) Posición inicial de las partículas. b) Movimiento de las partículas hacia las posiciones de equilibrio y c) Posición final de las partículas.

Estos mismos resultados fueron encontrados al simular el movimiento de partículas con diámetros de  $5\mu m$  y  $10\mu m$ , las cuales, en su mayoría se agregaban en las mismas zonas de equilibrio acústico formando estructuras similares a las mostradas en las Figuras 2-3, 2-4 y 2-5. No obstante, al cambiar el diámetro de las partículas se observó, al usar la misma  $E_{ac}$ , que las partículas de  $5\mu m$  gastan más tiempo en alcanzar los nodos de presión comparado con el tiempo que les tomaba a partículas de  $10\mu m$  o  $15\mu m$ , resultado que se puede explicar teniendo presente que la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  es directamente proporcional al volumen de la partícula, por lo tanto, al variar su diámetro cambia el volumen y por ende se modifica la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  que actúa sobre la partícula.

Posteriormente para evaluar el efecto del flujo  $Q$  sobre los agregados formados en los nodos de presión se simuló, para las diferentes dimensiones del dispositivo con la misma cantidad de partículas y valor de  $E_{ac}$ , el movimiento de las partículas usando un flujo en dirección  $x$  con rapidez media  $\bar{v}$  de  $600\frac{\mu m}{s}$ <sup>2</sup>. Evidenciado, en partículas de  $15\mu m$ , que la formación y forma de los agregados se afecta considerablemente por el flujo establecido en dirección  $x$ , es decir, que aunque prima la acción  $\vec{F}_{pr}$  inicialmente formando los agregados esperados, luego estos son arrastrados por el flujo hasta que finalmente todas las partículas terminan por depositarse en la pared derecha del canal. Conclusión que se obtiene al comparar los resultados presentados para los diferentes modos de vibración en la Figura 2-6. Por otro lado, al cambiar el valor de la velocidad media en dirección  $x$  manteniendo la misma  $E_{ac}$  se encontró con el aumento del flujo que el proceso de arrastre de los agregados se realizaba en menor tiempo.

Además, al estudiar el efecto del flujo  $Q$  se identificó con la simulación que partículas de menor diámetro experimentaban un movimiento de arrastre mayor que el movimiento de conducción, establecido por la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional, hacia los nodos, hecho que se relaciona con la disminución de la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  al reducir el diámetro de la partícula, según se menciono anteriormente.

Después de obtener los resultados descritos en los párrafos anteriores, se asumió, en la simulación, que largo  $\ell_x$  del dispositivo era mucho mayor que  $\ell_y$  y que  $\ell_z$  condición que se establece por razones experimentales, según se discutirá en el Capítulo 3 donde se describen y caracterizan los resonadores acústicos construidos para la manipulación de parásitos. Entonces, definiendo ahora un dispositivo con  $\ell_x = 4,0mm$  y  $\ell_y = \ell_z = 200\mu m$  el cual vibra en las tres direcciones con su frecuencia fundamental, se simuló para una sección del canal de  $400\mu m$  el movimiento de 144 partículas de  $15\mu m$  sometidas a la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  con  $E_{ac} = 18,2\frac{J}{m^3}$ , (1-205), la fuerza de flotación, (2-8), la fuerza de Hertz, (2-9), y la fuerza de arrastre, (1-214).

<sup>2</sup> Para calcular el flujo asociados con estas velocidades medias se debe recordar que el caudal o flujo volumétrico se define como  $Q = A\bar{v}$ , donde  $A$  es el área de la sección transversal del canal. Entonces, dada la  $\bar{v}$  usada en las simulación se tiene que su caudal correspondiente es  $0,09ml/h$ .



Encontrando al considerar un sistema sin flujo en dirección  $x$  que no se establece un agregado central en el dispositivo rectangular y que en lugar de ello todas las partículas se desplazan hacia las paredes laterales para agruparse sobre estas formando cuatro agregados continuos tipo cadena de perlas como se evidencia en los tres modos de vibración que se presentan en la Figura 2-7.

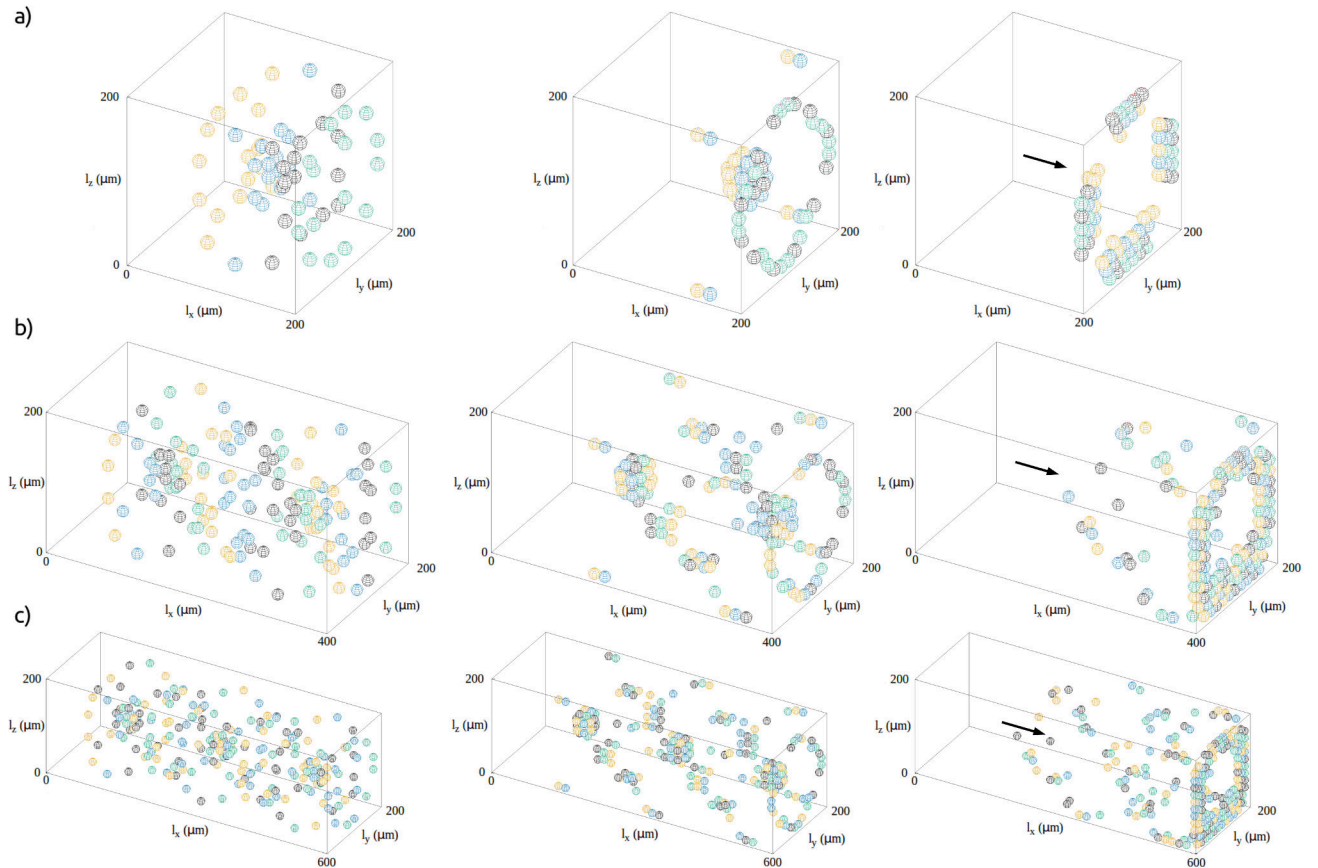


Figura 2-6.: Efecto del flujo en dirección  $x$  sobre los agregados formados en dispositivo de paredes rígidas para los modos de vibración a)  $n_x = n_y = n_z = 1$ . b)  $n_x = 2$  y  $n_y = n_z = 1$  y c)  $n_x = 3$  y  $n_y = n_z = 1$ .

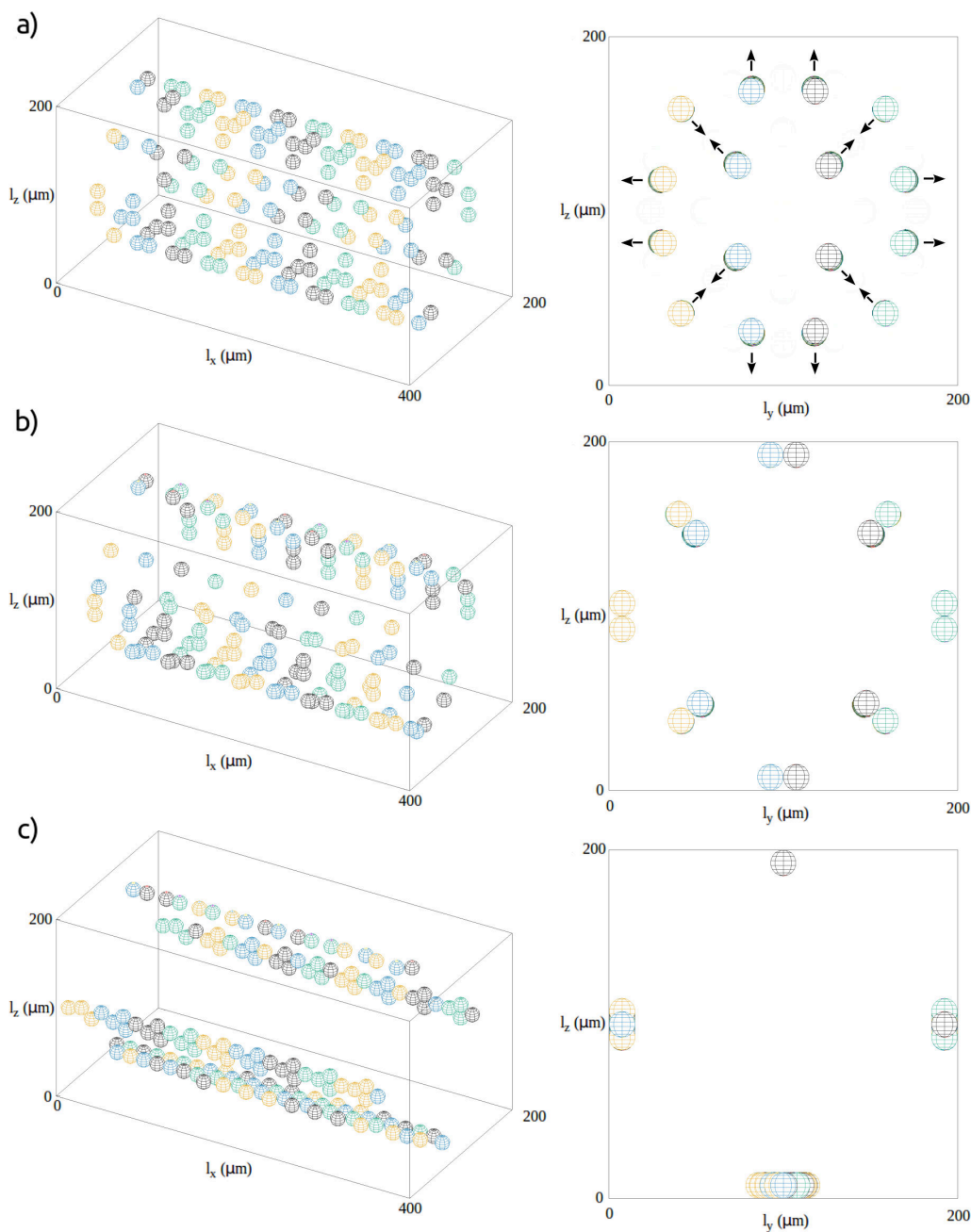


Figura 2-7.: Agregados formados en un dispositivo de paredes rígidas con  $\ell_x = 4mm$  sin flujo en dirección  $x$  para el modo de vibración  $n_x = n_y = n_z = 1$ . a) Posición inicial de las partículas, b) Movimiento de conducción hacia las paredes del dispositivo y c) Agregados finales.

### 2.3.1.2. Análisis del movimiento de las partículas

Para terminar el caso con paredes rígidas se estudió el movimiento de tres partículas ubicadas en diferentes posiciones iniciales al interior de cualquiera de los dispositivos rectangulares



mostrados en las Figuras 2-3, 2-4 y 2-5. Entonces, al considerar la partícula 1 en la Figura 2-8 con posición inicial  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 20\mu\text{m}$  se observa que esta se desplaza hacia la parte inferior del dispositivo encontrando su posición de equilibrio sobre una de las aristas del canal rectangular, trayectoria naranja Figura 2-8. Sin embargo, si la posición inicial de la partícula tiene en todas sus componentes valores cercanos a  $\lambda/8$  o mayores, la partícula se mueve hacia el nodo más cercano ubicado en el centro del dispositivo como lo muestra la trayectoria azul de la partícula 2 en la Figura 2-8. Pero si cualquiera de las componentes en la posición inicial de la partícula tiene un valor  $< \lambda/8$ , como en el caso de la partícula 3 con posición inicial  $x_i(0) = 50\mu\text{m}$ ,  $y_i(0) = 35\mu\text{m}$  y  $z_i(0) = 20\mu\text{m}$ , Figura 2-8, esta alcanza su posición de equilibrio sobre alguna de las paredes del dispositivo.

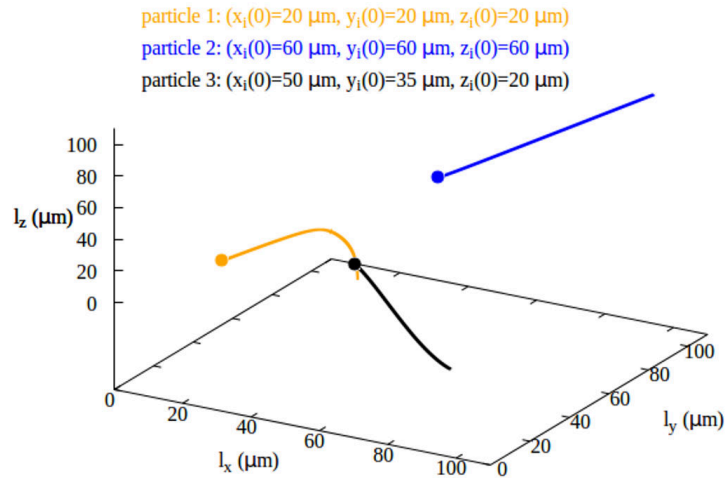


Figura 2-8.: Trayectoria de tres partículas en diferentes posiciones iniciales bajo la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional para la condición de paredes rígidas.

Con el propósito de comprender mejor el efecto de la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional sobre el movimiento de las partículas se gráfico para las tres partículas consideradas en la Figura 2-8 su posición como función del tiempo, con lo cual fue posible evidenciar la influencia de los términos adicionales de la  $\vec{F}_{pr}$  3D con paredes rígidas, ecuación (1-207), en cada dirección del espacio. En concreto, la partícula 1, con posición inicial en  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 20\mu\text{m}$ , presenta gráficas de posición-tiempo que confirman que ésta no alcanza su posición de equilibrio en el centro del dispositivo, Figura 2-9a. En lugar de esto, según la superposición observada de estas gráficas para  $x$  y  $y$  la partícula 1 alcanza una posición constante en estas direcciones en  $\sim \lambda/8$  lo que indica que posiblemente se ubica en una posición de equilibrio inestable durante los primeros segundos. Ubicación que se modifica con el tiempo por la acción de la fuerza gravitacional en dirección  $z$  la cual genera anisotropía en el proceso como se identifica claramente con la línea negra de la Figura 2-9a que muestra un comportamiento distinto en dirección  $z$ , el cual se asocia a un movimiento de caída que permite a la partícula finalmente

alcanzar su posición de equilibrio en una de las aristas del canal.

Es importante resaltar que la caída de la partícula 1 en dirección  $z$  no corresponde solamente a un proceso de sedimentación establecido por la fuerza gravitacional, si no que en adición a este la partícula es llevada por la fuerza acústica hacia  $z = 0$ , conclusión que se obtiene al notar que la gráfica de posición  $z$  de la partícula como función del tiempo no corresponde al comportamiento típico de un objeto que cae libremente en un fluido, Figura 2-9a.

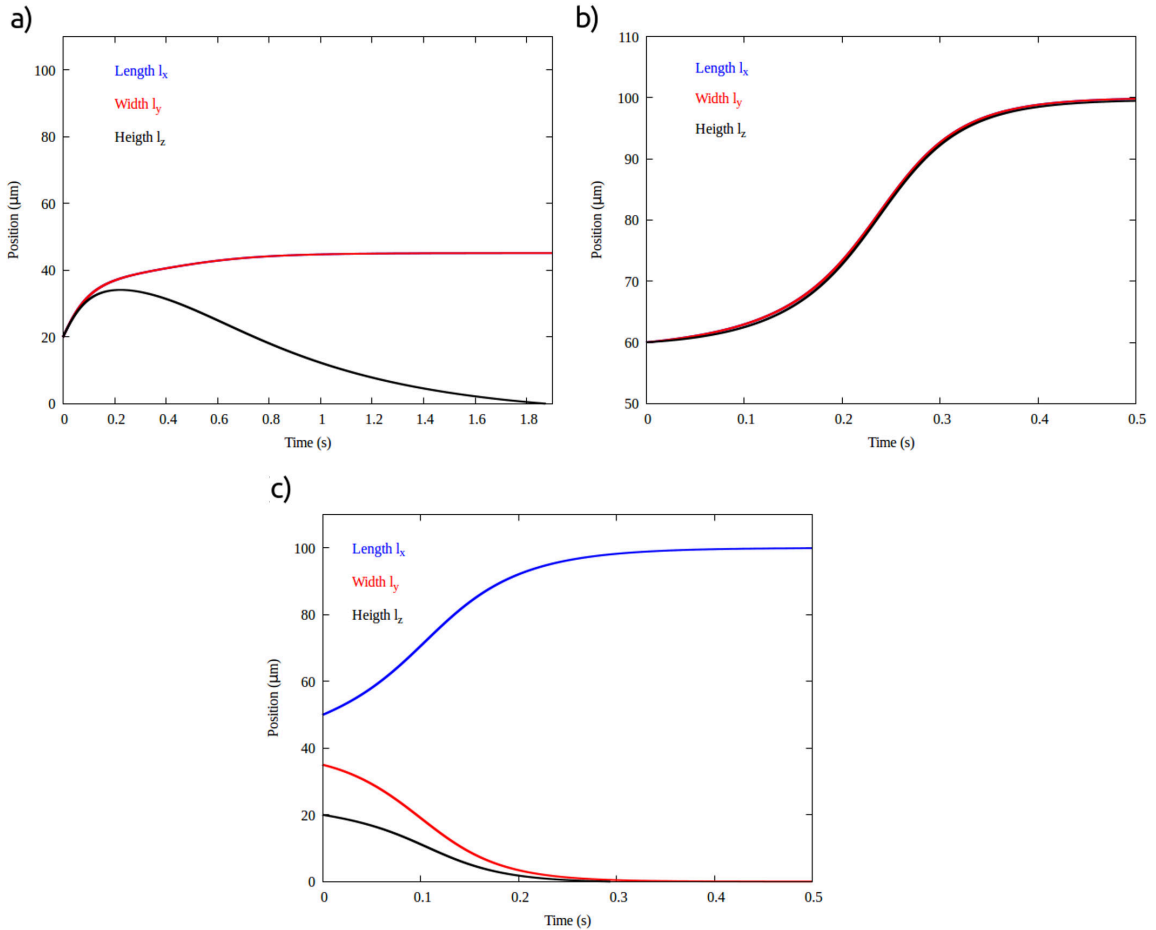


Figura 2-9.: Gráficas de posición tiempo para tres partículas con diferentes posiciones iniciales en el canal con todas sus paredes rígidas. a) Partícula 1, b) Partícula 2 y c) partícula 3 en las posiciones iniciales mostradas en la Figura 2-8.

Por otro lado, las gráficas de posición-tiempo para la partícula 2 con posición inicial en  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 60\mu m$  muestran superposición en las tres direcciones del espacio describiendo un movimiento con el mismo comportamiento observado experimentalmente y analizado teóricamente mediante la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional, Figuras 2-9b y 2-2a, donde la partícula en consideración alcanza su posición de equilibrio en  $x = y = z = 100\mu m$ , la cual es la ubicación del nodo de presión más cercano en el centro del canal. Lo anterior implica

que si la partícula tiene una posición inicial con valores  $> \lambda/8$  en las tres direcciones del espacio lo más probable es que esta se comporte según lo descrito en la literatura para la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional. Para terminar el análisis de las curvas de posición-tiempo se ratifica, con la partícula 3 Figura 2-9c, el hecho que al cambiar la posición inicial se modifica el movimiento de la partícula, es así, como dada la posición  $x_i(0) = 50\mu m$ ,  $y_i(0) = 35\mu m$  y  $z_i(0) = 20\mu m$  para la partícula 3 esta alcanza su estado de equilibrio sobre una de las paredes del dispositivo en  $x = \lambda/4$  con  $y = z = 0$  y no en los nodos de presión localizados en el centro del dispositivo.

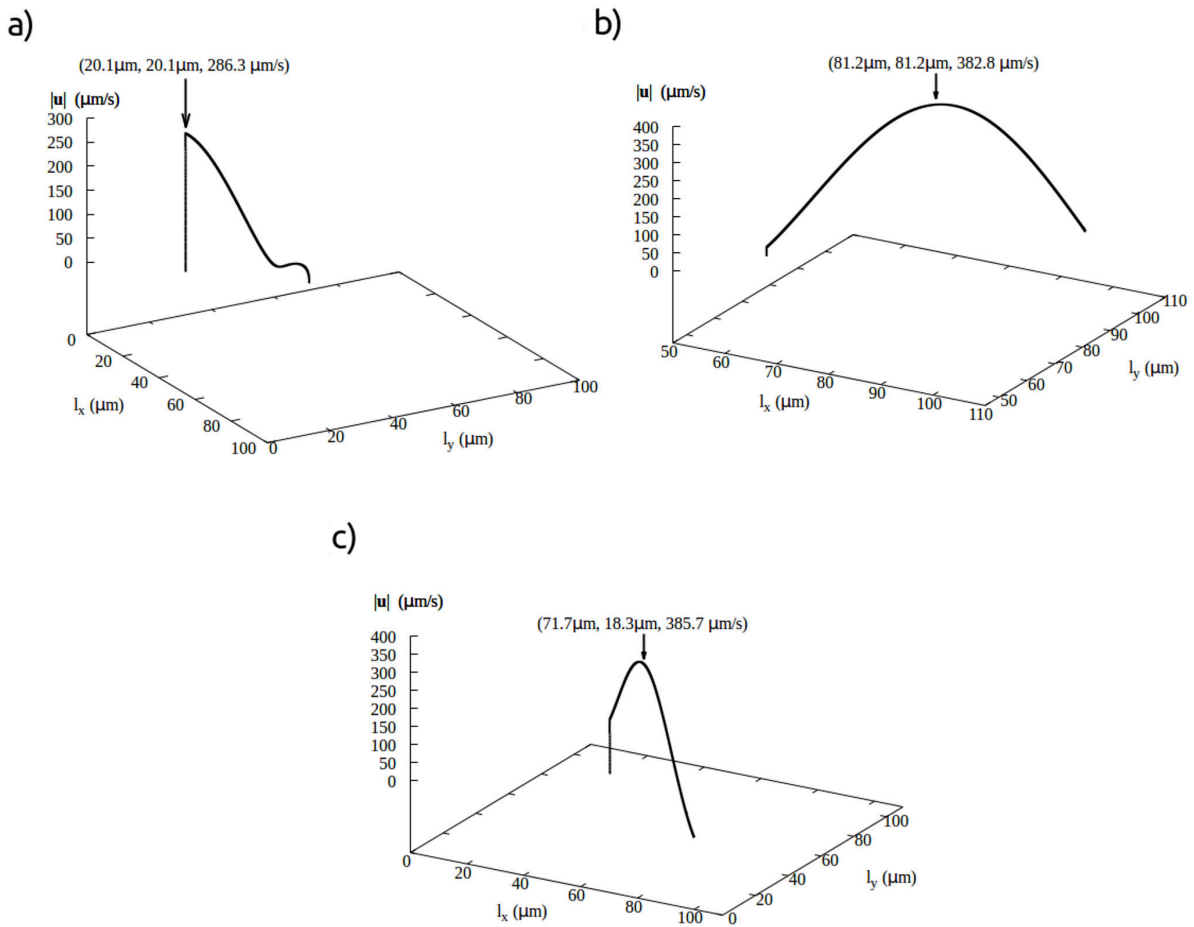


Figura 2-10.: Magnitud de la velocidad generada por la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional en cada posición sobre tres partículas con diferentes posiciones iniciales. a)  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 20\mu m$ , b)  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 60\mu m$  y c)  $x_i(0) = 50\mu m$ ,  $y_i(0) = 35\mu m$  y  $z_i(0) = 20\mu m$ .

Las gráficas en la Figura 2-10 muestran en el plano  $(x, y)$  el efecto de la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional sobre la velocidad de las partículas con las mismas posiciones descritas en la Figura 2-8, en las cuales, independientemente de su posición inicial, se observa que la magnitud de la velocidad tiene una evolución similar a la descrita con la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional, Figura 2-2a presentando

siempre un máximo de velocidad en cierta posición del espacio y un valor de velocidad cero en la posición de equilibrio de la partícula, Figura 2-10. Entonces, dada la posición inicial de la partícula 1 esta inicia su movimiento pasando abruptamente de su velocidad inicial cero a su velocidad máxima sobre la misma posición en  $x = y = 20,1\mu m$ , luego la magnitud de su velocidad decae hasta un pequeño mínimo ubicado en  $\sim \lambda/10$  y posteriormente la velocidad se incrementa un poco hasta que finalmente llega a cero en  $x = y = 45\mu m$ , Figura 2-10a.

Ahora considerando la posición inicial de la partícula 2 se identifica nuevamente que su movimiento resultante es hacia alguno de los nodos de presión localizado en el centro del dispositivo, por lo tanto, en su gráfica de velocidad para el plano  $(x, y)$  se observa inicialmente un incremento moderado en la magnitud de su velocidad hasta que alcanza el máximo en  $\sim \lambda/5$ , valor de velocidad que llega a cero una vez que la partícula 2 alcanza el nodo de presión localizado en  $x = y = z = \lambda/4$ , Figura 2-10b. Por último, en el caso de la partícula 3 la gráfica de velocidad describe un comportamiento similar al de la partícula 2, sin embargo, al no alcanzar su posición de equilibrio en el centro del dispositivo, la ubicación del máximo de velocidad cambia, según se evidencia en la 2-10c. Estas gráficas muestran el efecto sobre la magnitud de la velocidad debido al cambio de la posición inicial de la partícula donde su valor máximo es alcanzado en la posición con mayor intensidad de fuerza acústica.

Adicionalmente, se notó que para un mismo valor de  $E_{ac}$  las partículas de menor diámetro gastan más tiempo en alcanzar su posición de equilibrio comparado con el tiempo que le toma a partículas más grandes, hecho que se relaciona con la disminución en la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  al emplear partículas de menor volumen. Además, también es importante destacar en que en la dirección  $z$  las partículas son afectadas por la fuerza de flotación (2-8), lo cual implica un efecto del peso sobre la posición de equilibrio que alcanza la partícula en esta dirección, ya que el peso al dirigirse hacia  $-\hat{k}$  desplaza la posición de equilibrio de la partícula ubicándola unos micrómetros por debajo del nodo de presión. Situación que es más evidente cuando las partículas son sometidas a fuerzas acústicas de menor intensidad asociadas con valores de densidad de energía pequeños.

## 2.3.2. Dispositivo con Paredes Suaves

Ahora para encontrar la solución de la ecuación de movimiento (2-16) en un dispositivo con paredes suaves en la dirección  $x$ , se usó la expresión (1-214), encontrando los resultados que se describen a continuación.

### 2.3.2.1. Movimiento en tres dimensiones

Del mismo modo que en la situación de paredes rígidas, se simuló el movimiento de  $N$  partículas de  $15\mu m$  sometidas a la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional para una  $E_{ac} = 18,2 \frac{J}{m^3}$  en un dispositivo rectangular sin flujo, que vibra con los modos de vibración  $n_x = n_y = n_z = 1$ ,

$n_x = 2$ ,  $n_y = n_z = 1$  y  $n_x = 3$ ,  $n_y = n_z = 1$  para una frecuencia constante de  $3,7MHz$ , Figuras 2-11, 2-12 y 2-13. Se debe resaltar que al considerar las paredes suaves en  $x = 0$  y  $x = \ell_x$  se genera un campo de presión diferente dentro del canal rectangular, lo cual modifica la dinámica de las partículas.

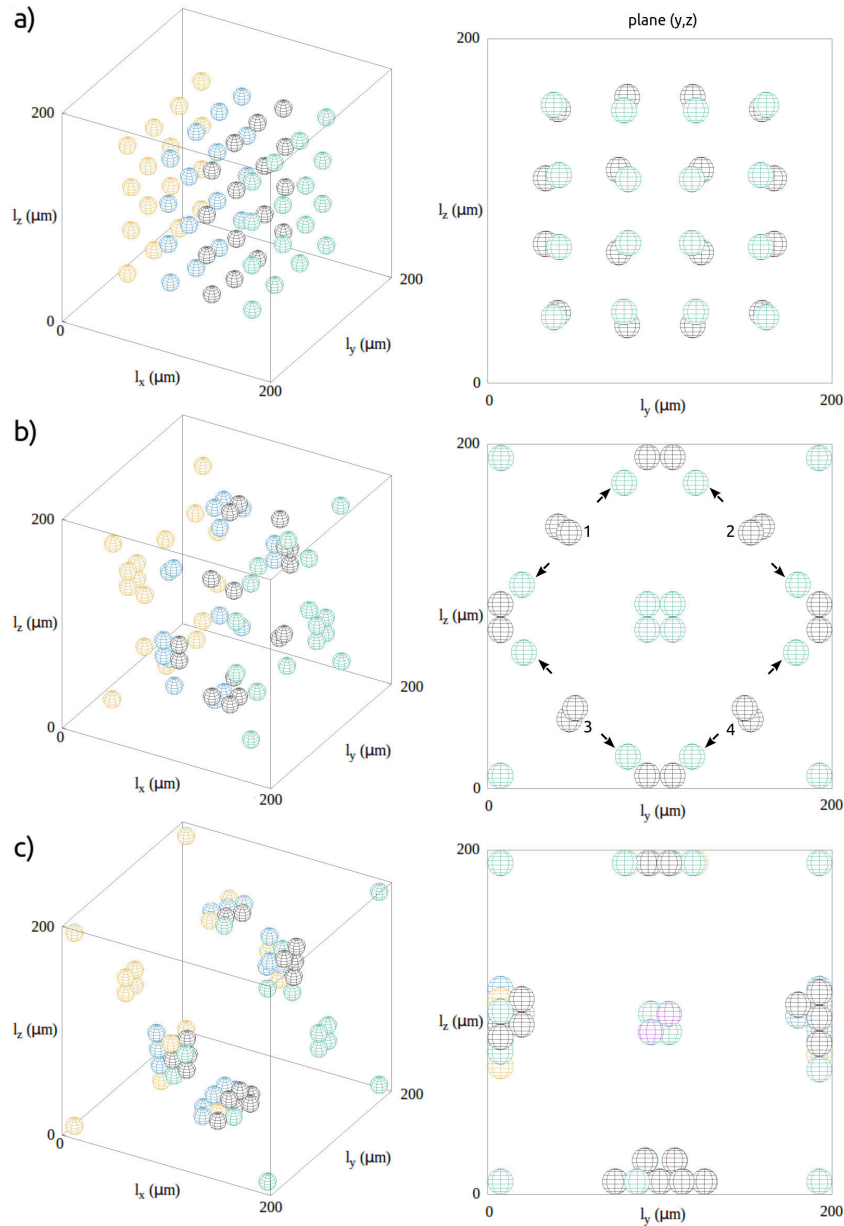


Figura 2-11.: Agregados formados por la  $\vec{F}_{pr}$  3D que actúa sobre 64 partículas de  $15\mu m$  para el modo de vibración fundamental,  $n_x = n_y = n_z = 1$ . a) Posición inicial de las partículas. b) Movimiento de las partículas hacia las posiciones de equilibrio y c) Posición final de las partículas.

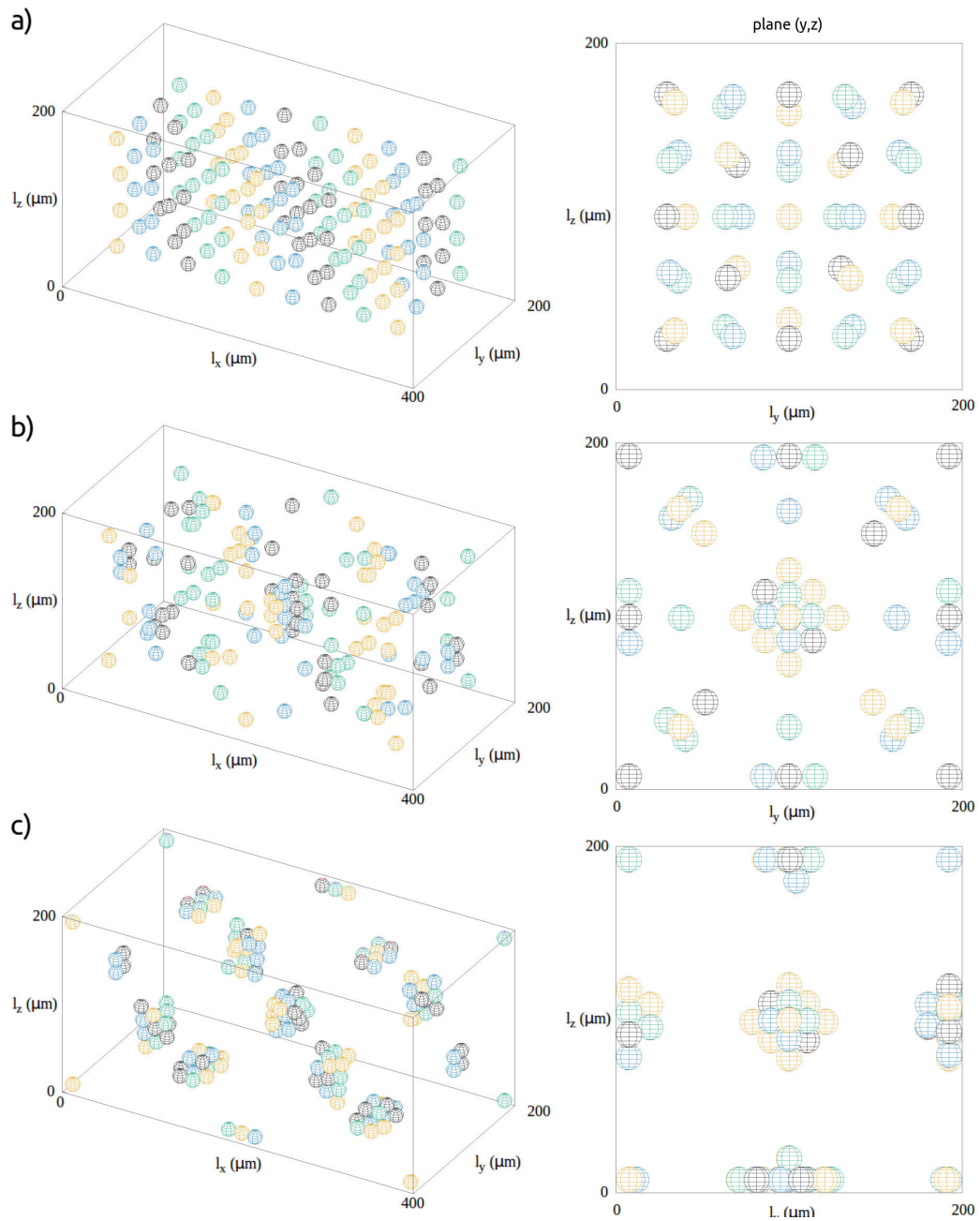


Figura 2-12.: Agregados formados por la  $\vec{F}_{pr}$  3D que actúa sobre 144 partículas de  $15\mu\text{m}$  para el modo de vibración  $n_x = 2$  y  $n_y = n_z = 1$ . a) Posición inicial de las partículas. b) Movimiento de las partículas hacia las posiciones de equilibrio y c) Posición final de las partículas.

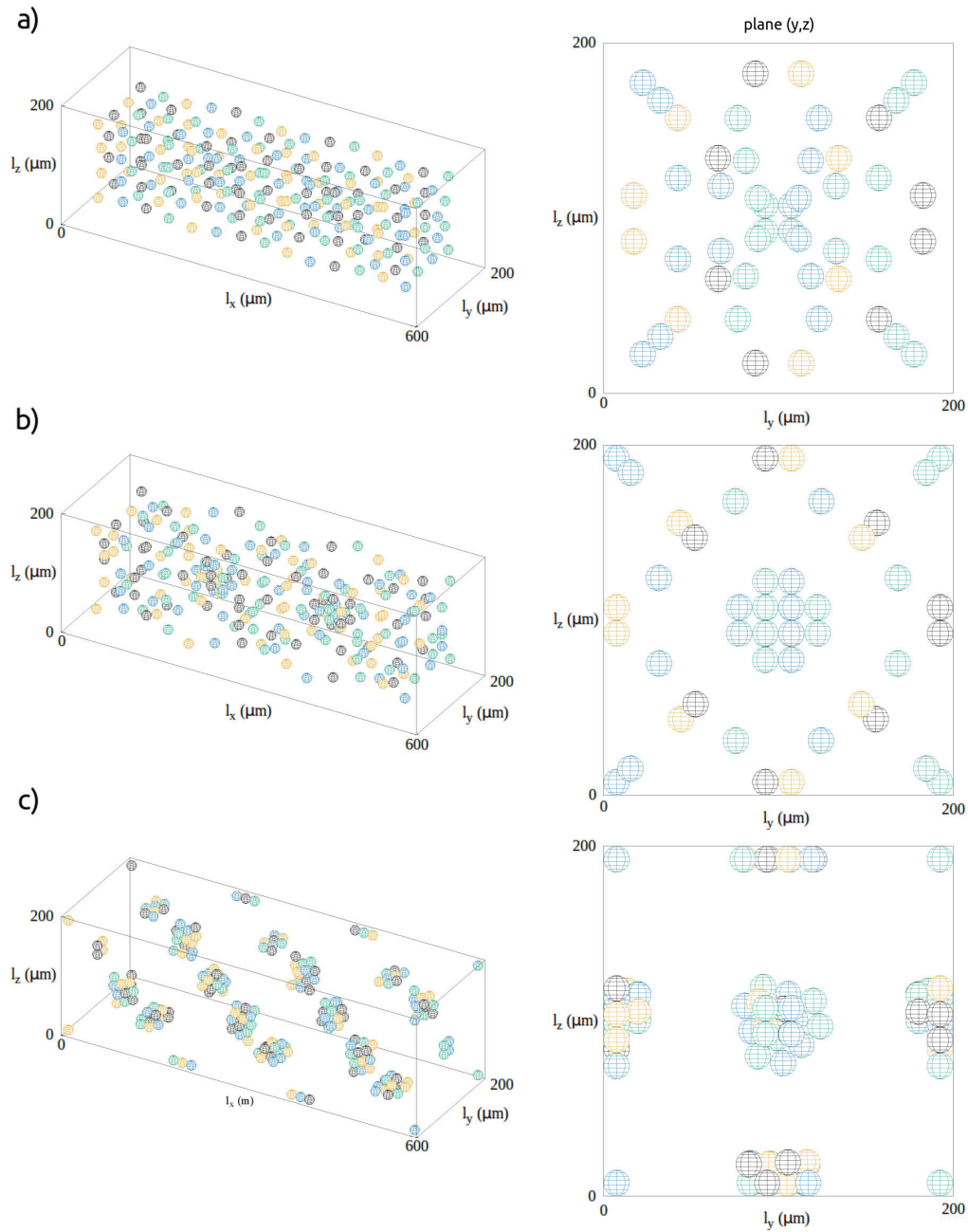


Figura 2-13.: Agregados formados por la  $\vec{F}_{pr}$  3D que actúa sobre 224 partículas de  $15\mu\text{m}$  para el modo de vibración  $n_x = 3$  y  $n_y = n_z = 1$ . a) Posición inicial de las partículas. b) Movimiento de las partículas hacia las posiciones de equilibrio y c) Posición final de las partículas.

Entonces, considerando el modo de vibración  $n_x = n_y = n_z = 1$  se encontró que las partículas se mueven con diferentes velocidades hacia las paredes del canal donde forman seis agregados en las paredes del dispositivo, Figura 2-11, situación inesperada porque la fuerza acústica unidimensional predice la formación de solo dos agregados ubicados sobre las paredes la-



terales del dispositivo en  $x = 0$  y  $x = \ell_x$ , efecto que no se observó al considerar la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional, ecuación (1-214), donde en lugar de esto pocas partículas se desplazan hacia estas paredes en dirección  $x$  lo cual se puede relacionar con la influencia de los términos adicionales de la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional sobre el movimiento de las partículas.

En adición a esto se encontró en el plano  $(y, z)$  que existen cuatro regiones de equilibrio inestable en  $\sim \lambda/8$ , identificadas con los números en la Figura 2-11b, en las que cierta cantidad de partículas permanecen durante un corto tiempo hasta que finalmente caen para ubicarse en los nodos localizados en  $\ell_z/2$  y en  $z = 0$ . La razón de que el movimiento de estas partículas sea hacia la parte inferior del canal se debe a la anisotropía generada por la fuerza gravitacional en dirección  $z$ . También es de resaltar para este modo de vibración que algunas partículas alcanzan sus posiciones de equilibrio en las esquinas del dispositivo.

Para el caso del modo de vibración  $n_x = 2$  y  $n_y = n_z = 1$  se identificó la formación de un agregado en el centro del dispositivo en  $x = \lambda/2$  y  $y = z = \lambda/4$ . Sin embargo, gran cantidad de partículas alcanzan sus posiciones de equilibrio sobre las paredes laterales del canal particularmente en  $x = \lambda/4$  y  $x = 3\lambda/4$  como se observa en la Figura 2-12 donde se presenta el proceso de formación del agregado. Situación que no es predicha por la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional con la que se pronostica la formación de tres agregados uno en centro del dispositivo y dos sobre las paredes en  $x = 0$  y  $x = \ell_x$ .

En el proceso de agregación para el modo  $n_x = 3$  y  $n_y = n_z = 1$  con paredes suaves se encontró la formación de dos agregados centrales, Figura 2-13, en  $x = \lambda/4$  y  $x = \lambda$ , así como, ciertas regiones cada  $n\lambda/4$  con  $n = 1, 3, 5, \dots$  donde las partículas alcanzan sus posiciones de equilibrio en las paredes del dispositivo. Por otro lado, se destaca el cambio en la dinámica de las partículas bajo la condición de paredes suaves el cual se evidencia al comparar el movimiento en plano  $(y, z)$  para esta condición, Figuras 2-11, 2-12 y 2-13, con el observado en paredes rígidas, Figuras 2-3, 2-4 y 2-5 donde se identifican claramente diferentes patrones de resonancia generados por las partículas para los mismos modos de vibración.

Luego para evaluar el efecto del flujo  $Q$  en la formación de los agregados se simuló con la misma cantidad de partículas de  $15\mu m$ , dimensiones del dispositivo y valor de  $E_{ac}$  este proceso para los modos de vibración ya definidos usando una  $\bar{v} = 600 \frac{\mu m}{s}$ . Encontrando, al igual que en la situación de paredes rígida, que primero la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional forma los agregados de partículas en las posiciones ya descritas para la condición sin flujo, los cuales posteriormente son arrastrados por flujo en dirección  $x$  terminando su movimiento en la pared derecha del dispositivo.



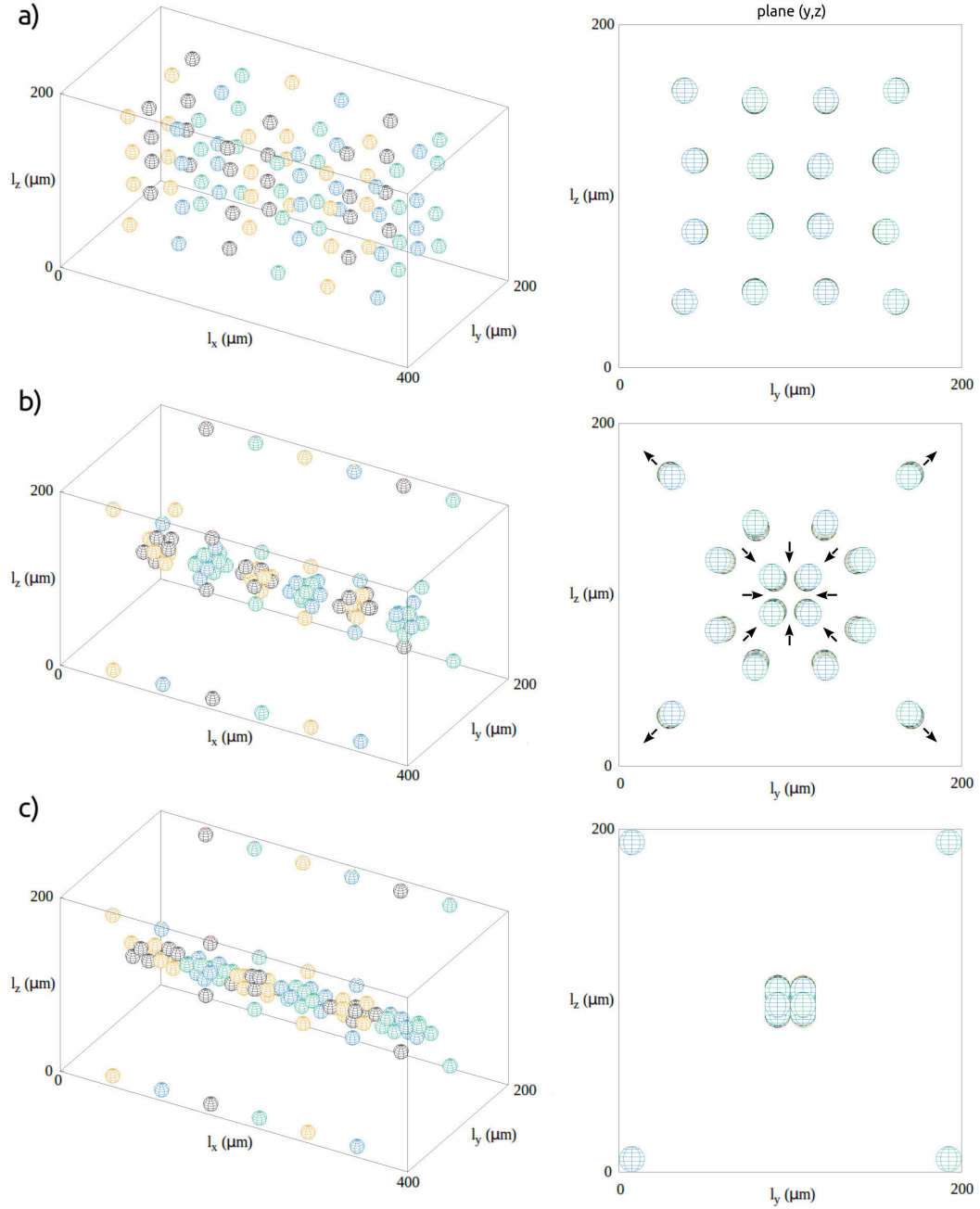


Figura 2-14.: Formación de agregado tipo cadena de perlas con la  $\vec{F}_{pr}$  3D para la condición de frontera de paredes suaves con  $l_x \gg l_y, l_z$  y  $n_x = n_y = n_z = 1$ . a) Posición inicial de las partículas. b) Movimiento hacia las zonas de equilibrio acústico y c) Posición final.

Para terminar este análisis de la  $\vec{F}_{pr}$  en un dispositivo con paredes suaves en dirección  $x$  se simuló, usando 144 partículas de  $15\mu m$  con densidad de energía  $18,2\frac{J}{m^3}$  para el modo de vibración fundamental  $n_x = n_y = n_z = 1$ , el movimiento de las partículas considerando

$\ell_x = 4mm$ , es decir, que el largo del dispositivo era mucho mayor que su ancho  $\ell_y$  y su alto  $\ell_z$ . Hallando, al tomar una sección arbitraria del dispositivo con un largo de  $400\mu m$  y flujo igual a cero, que las partículas después de estar organizadas de manera regular, Figura 2-14a, se desplazaban hacia el centro del dispositivo rectangular para formar pequeños grupos de partículas, Figura 2-14b, que luego se unían en la dirección  $x$  para finalmente generar el agregado tipo cadena de perlas mostrado en la Figura 2-14c. Además, es interesante notar que no todas las partículas bajo estas condiciones se agregan en el centro si no que en lugar de ello algunas partículas dadas ciertas posiciones iniciales tienden a alcanzar su posición de equilibrio en las aristas del canal rectangular.

### 2.3.2.2. Análisis del movimiento de las partículas

Con el propósito de entender mejor el cambio en la dinámica de las partículas bajo la condición de frontera de paredes suaves se estudio el movimiento de tres partículas con las mismas posiciones iniciales usadas en paredes rígidas, Figura 2-15. Hallando al analizar las trayectorias de las partículas 1 y 3 que viajan desde las posiciones iniciales en  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 20\mu m$  y  $x_i(0) = 50\mu m, y_i(0) = 35\mu m$  y  $z_i(0) = 20\mu m$  respectivamente, que ambas alcanzan su posición de equilibrio en  $x = y = z = 0$  en una de las esquinas del dispositivo, como se observa en las trayectorias naranja y negra de la Figura 2-15.

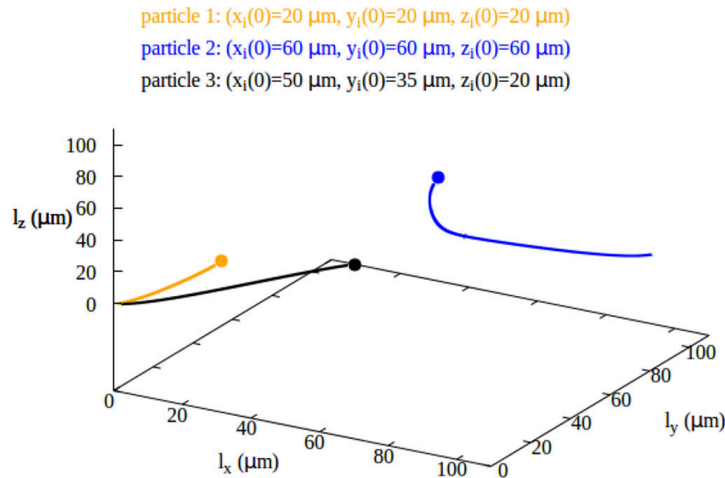


Figura 2-15.: Trayectoria de tres partículas en diferentes posiciones iniciales bajo la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional para la condición de paredes suaves.

Ahora considerando la trayectoria de la partícula 2 se encontró que debido a su posición inicial esta tiene una posición de equilibrio diferente, línea azul Figura 2-15. Entonces, para la posición inicial en  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 60\mu m$  la partícula es transportada por la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional hacia el plano  $(x, y)$  en  $x = y = \lambda/4$  llegando a su posición final en  $z = 0$ ,

ubicándose así en la pared inferior del dispositivo.

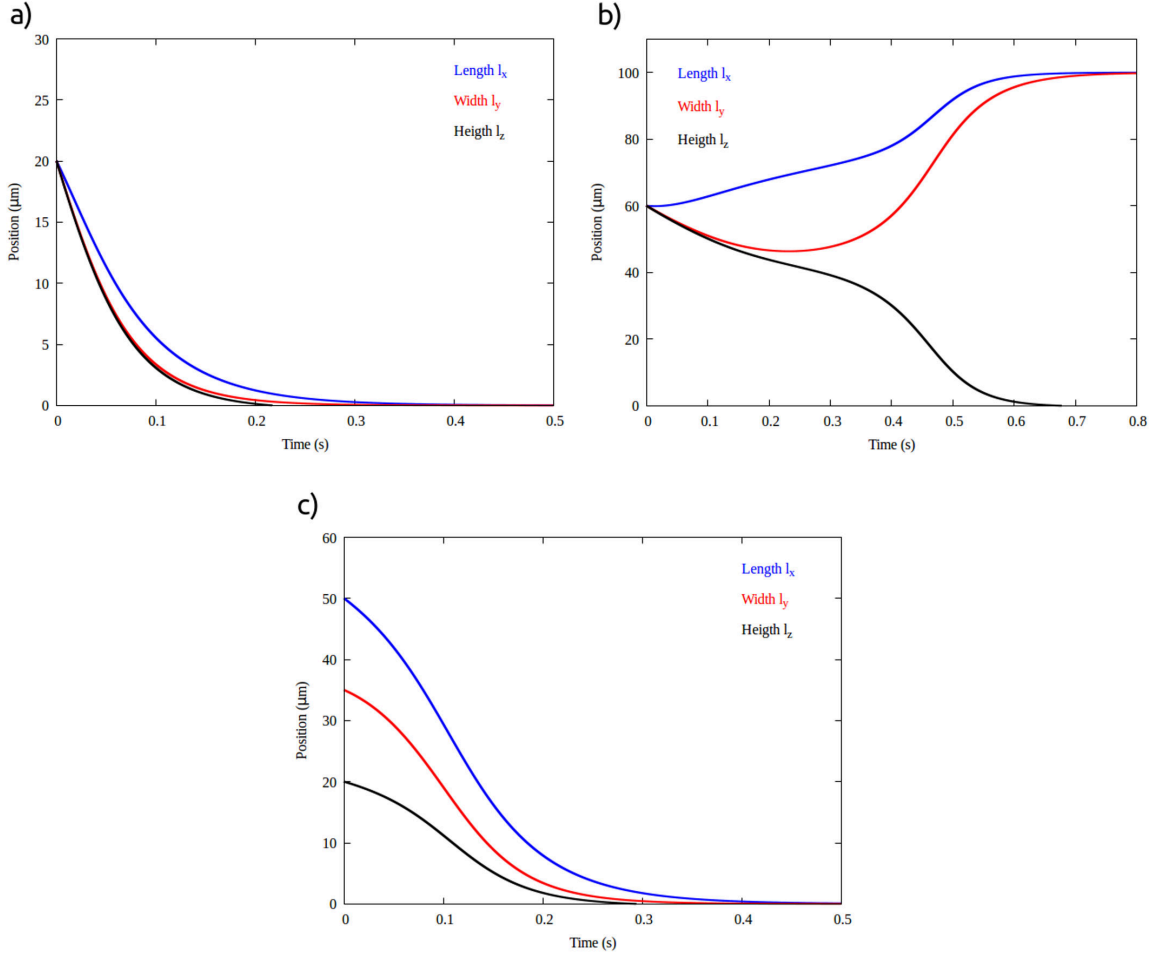


Figura 2-16.: Gráficas de posición tiempo para tres partículas con diferentes posiciones iniciales en la condición de paredes suaves. a) Partícula 1, b) Partícula 2 y c) partícula 3 en las posiciones iniciales mostradas en la Figura 2-15.

Los resultados anteriores son reforzados por las graficas de la posición de cada partícula como función del tiempo, Figura 2-16. Donde se identifica claramente que las partículas 1 y 3 alcanzan su posición final en  $x = y = z = 0$ , sin embargo, la partícula 1 alcanza primero esta posición que la partícula 3 debido a su cercanía con la pared inferior del dispositivo, Figuras 2-16a y 2-16c. Por otra parte la partícula 2 describe tres curvas de posición-tiempo diferentes en las tres direcciones del espacio lo que sugiere que el cambio en las condiciones de frontera en  $x$ , así como, la acción de la fuerza gravitacional en dirección  $z$  generan anisotropía en las componentes de la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional, 2-16b. Pero a pesar de las diferencias en el movimiento asociado a cada dirección del espacio se tiene que la partícula 2 alcanza la misma posición de equilibrio en las direcciones  $x$  y  $y$ , curvas azul y roja 2-16b, no obstante, su posición de equilibrio en la dirección  $z$  resulta ser distinta.

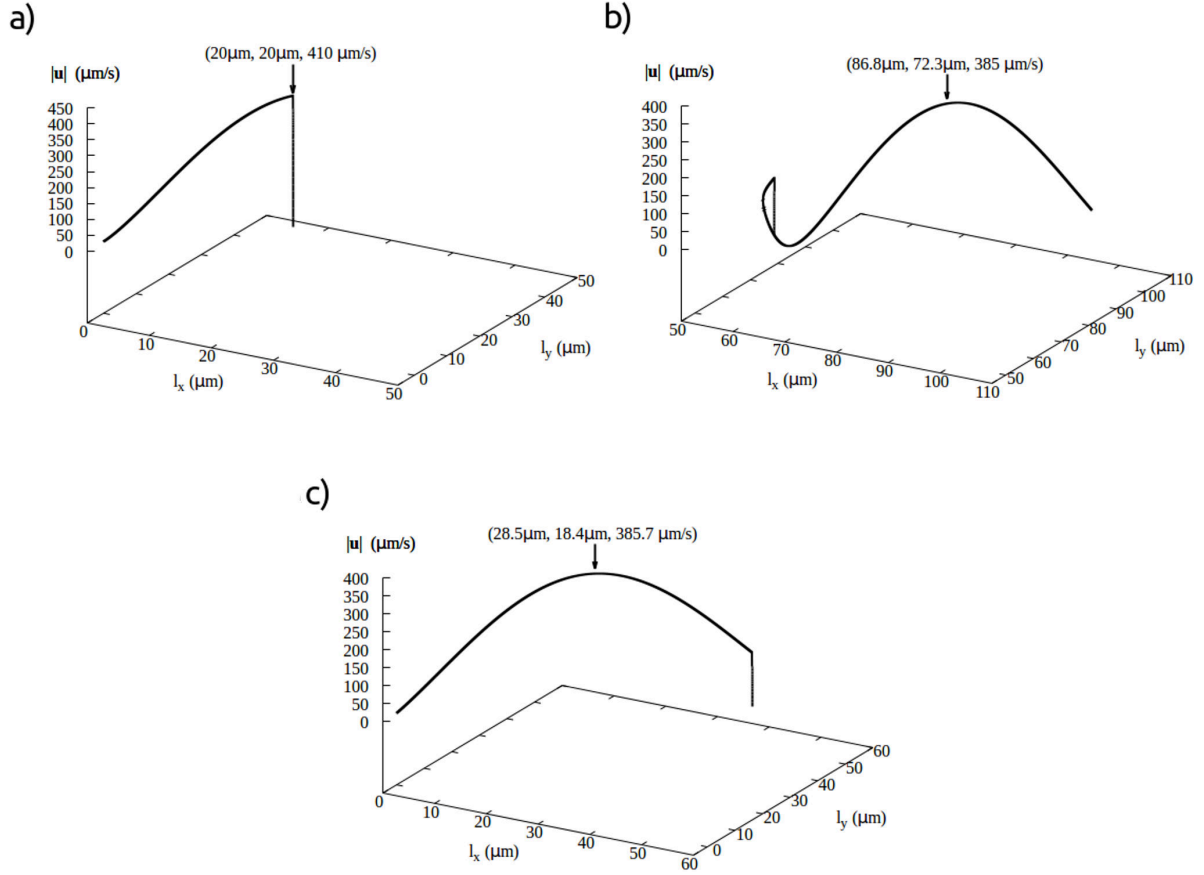


Figura 2-17.: Magnitud de la velocidad generada por la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional en cada posición sobre tres partículas con diferentes posiciones iniciales. a)  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 20 \mu\text{m}$ , b)  $x_i(0) = y_i(0) = z_i(0) = 60 \mu\text{m}$  y c)  $x_i(0) = 50 \mu\text{m}$ ,  $y_i(0) = 35 \mu\text{m}$  y  $z_i(0) = 20 \mu\text{m}$ .

En cuanto a las gráficas de la magnitud de la velocidad como función de la posición en el plano  $(x, y)$  la partícula describe variaciones de velocidad similares a las obtenidas en condiciones de paredes rígidas, Figura 2-17. Donde la partícula 1 al estar cerca de la pared inferior experimenta una  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional intensa que incremente abruptamente la magnitud de su velocidad inicial alcanzando en el primer instante de tiempo su magnitud máxima la cual decrece posteriormente a cero con un comportamiento casi lineal, Figura 2-17a.

Por otra parte, la partícula 2 comienza su movimiento con un incremento menos abrupto en la magnitud de su velocidad, cuyo valor decrece después hasta un pequeño mínimo ubicado en  $x = 70 \mu\text{m}$  y  $y = 46,6 \mu\text{m}$ . Luego la magnitud de la velocidad se incrementa nuevamente hasta llegar al valor máximo en  $x = 86,8 \mu\text{m}$  y  $y = 72,3 \mu\text{m}$  y finalmente cae a cero en la posición de equilibrio de la partícula, Figura 2-17b. Por último, la magnitud de la velocidad

para la partícula 3 describe el mismo comportamiento que el observado en las gráficas de las partículas anteriores, Figura 2-17c.

Hasta aquí se ha presentado un estudio del movimiento de partículas esféricas sometidas a la acción  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones al interior de un dispositivo rectangular con todas sus paredes rígidas y suaves en dirección  $x$ , para ello se desarrolló un modelo físico teniendo en cuenta la interacción de estas partículas con el campo acústico, el campo gravitacional y el fluido, lo cual se logró gracias a los resultados encontrados en el capítulo 1. Como siguiente paso en el capítulo 3 se usará este modelo para medir *in situ* la  $E_{ac}$  en los dispositivos construidos para manipular parásitos de *Leishmania*. Mediciones que permitieron desarrollar un método indirecto de medición de la elasticidad de los parásitos a partir de una expresión lineal entre su compresibilidad y densidad. Para terminar el capítulo 3 se analiza el movimiento de *Leishmania* en el campo acústico con el propósito de establecer la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  en parásitos de diferentes cepas y estadios, identificando, así, diferencias en la intensidad de esta fuerza que puedan estar relacionadas con cambios en sus propiedades físicas.

## Parásito de *Leishmania* y Campo Acústico

En el capítulo 1 se calculó la  $\vec{F}_{pr}$  sobre partículas esféricas suspendidas al interior de un resonador rectangular de sección transversal cuadrada en dos casos particulares, el primero asumiendo todas sus paredes rígidas y el segundo considerando las paredes en dirección  $x$  suaves. Esto se logró mediante la expresión general desarrollada por Gor'kov (1962), ecuación (1-129), con la cual se encontraron las expresiones teóricas de la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones para los dos casos mencionados, Ecuaciones (1-205) y (1-214). Posteriormente en el capítulo 2, usando los resultados teóricos del capítulo 1, se propuso un modelo físico que permitió estudiar el movimiento de partículas, así como la formación de agregados al interior del resonador rectangular. En el desarrollo de este modelo se supuso que, además de la  $\vec{F}_{pr}$ , las partículas eran afectadas por la fuerza de arrastre, la fuerza de flotación y al ubicarse en el nodo de presión por una fuerza de contacto conocida como fuerza de Hertz. Luego de identificar las interacciones de las partículas con el líquido, entre ellas y con el campo acústico y gravitacional fue posible definir su ecuación de movimiento, que se solucionó mediante el algoritmo Forest-Ruht optimizado, determinando de esta manera la posición y velocidad de las partículas en tres dimensiones al interior del dispositivo.

En este capítulo se estudiará el movimiento de parásitos *Leishmania* expuestos al campo acústico generado por ondas sonoras estacionarias en el rango de los ultrasonido establecidas al interior de un dispositivo microfluídico construido con este propósito. Para ello se usarán los valores de propiedades físicas mediadas en los parásitos, tales como volumen, densidad y elasticidad, el modelo físico desarrollado en el capítulo 2 y registros en video e imágenes obtenidas por microscopia de luz del movimiento de diferentes cepas de *Leishmania* en los dispositivos desarrollados.

Entonces, en la primera parte del capítulo, se describirá la metodología empleada para caracterizar los dispositivos acústicos construidos usando capilares de vidrio de sección transversal cuadrada. El objetivo de esta caracterización fue medir la densidad de energía acústica  $E_{ac}$ ,

la amplitud de presión y la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  máxima en el dispositivo, con ayuda del método descrito por [Barnkob et al. \(2010\)](#).

Saber la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  y la  $E_{ac}$  es importante no sólo para lograr un alto grado de manipulación de la muestra, lo que permite usar la  $\vec{F}_{pr}$  para medir o evaluar cambios en las propiedades mecánicas en parásitos de *Leishmania*. Si no que además, en el caso de aplicaciones médicas o biológicas como esta, ayuda a determinar el daño que pueden sufrir las células expuestas a este tipo de campos ([Wiklund, 2012](#)), información de relevancia puesto que la mayoría de estos procedimientos se hacen con fines preparativos, es decir, que después del tratamiento acústico las muestras biológicas son recolectadas para hacer ensayos posteriores, como por ejemplo estudios bioquímicos o genéticos, en los cuales se busca que las características de las células usadas reflejen su estado *in vivo*.

Después de caracterizar los dispositivos acústicos, se determinaron las propiedades físicas de los parásitos como el tamaño y forma, usando un contador Coulter Beckman Z2 e imágenes tomadas con microscopia de luz, la densidad, al hallar su punto isopícnico en gradientes de Percoll y la elasticidad, mediante una expresión lineal encontrada con el modelo teórico propuesto en el capítulo 2 que relaciona su densidad y elasticidad. Luego de medir las propiedades físicas se describe el movimiento de *Leishmania* en el campo acústico usando los registros obtenidos de la manipulación acústica de promastigotes y amastigotes en los dispositivos construidos. Para terminar, se emplea en la simulación la  $\vec{F}_{pr}$  3D con paredes suaves en  $x$ , las propiedades físicas mediadas y la  $E_{ac}$  en el dispositivo para estimar la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  sobre los parásito identificando de esta manera si cambios en su volumen, densidad o elasticidad generan efectos significativos en la intensidad de la fuerza acústica.

Antes de iniciar con la presentación de resultados se debe tener en cuenta que las medidas experimentales reportadas en este capítulo tienen una incertidumbre asociada con los errores de medida, los cuales se especifican, para las diferentes cantidades, en el Apéndice E.

### 3.1. Caracterización de los Dispositivos Acústicos

En el desarrollo de este trabajo se construyeron dispositivos acústicos microfluidicos al acoplar transductores cerámicos Pz26 de 4MHz marca Ferroperm A/S a capilares de vidrio de sección transversal cuadrada con lado igual a  $200 \pm 0,05\mu m$ , en la Figura 3-1 se presentan dos de los resonadores acústicos desarrollados. El dispositivo 1 se fabricó al unir un capilar rectangular con un solo transductor piezoeléctrico, Figura 3-1c, lo que permitió registrar con un microscopio de reflexión el comportamiento de partículas de látex de diferentes tamaños. Sin embargo, al comenzar las pruebas con parásitos de *Leishmania* en este dispositivo fue imposible registrar el comportamiento de las células en el campo acústico, debido a que este tipo de microscopio está diseñado para la observación de materiales sólidos, característica

que es adecuada al tomar registros con partículas sobre la superficie del material cerámico, pero no al usar parásitos. Por tal motivo se desarrollaron otros resonadores como el dispositivo 2, Figura 3-1c, al acoplar dos transductores en el capilar lo que permitió sobre la región libre de transductores visualizar el comportamiento de los parásitos en el campo acústico usando un microscopio invertido diseñado para observar y monitorear este tipo de muestras.

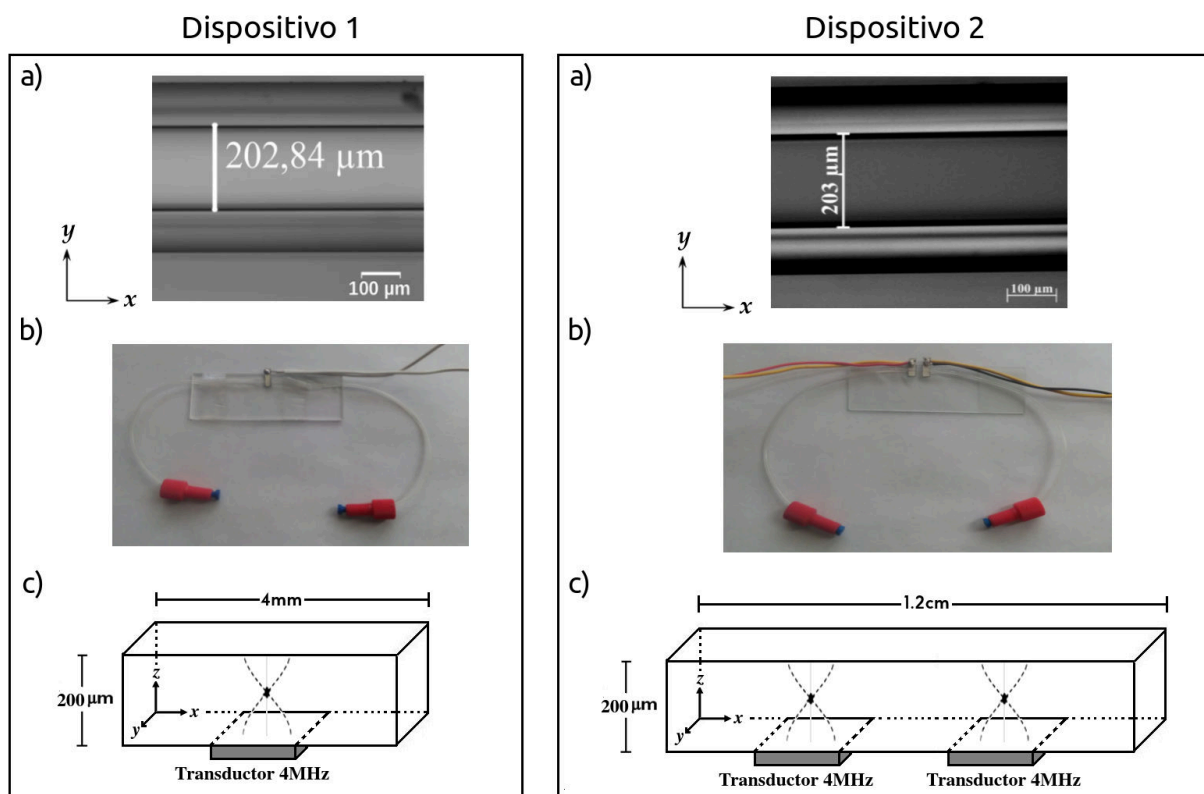


Figura 3-1.: Resonadores acústicos construidos. a) Vista del plano  $(x, y)$ , imágenes tomadas para el dispositivo 1 con un microscopio de reflexión Olympus BX51 y para el dispositivo 2 con un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss, magnificación  $10X$ . b) Resonadores construidos con largo  $x_1 = 4,0 \pm 0,3\text{mm}$  y  $x_2 = 1,20 \pm 0,03\text{cm}$  respectivamente. c) Dimensiones de los dispositivos donde se presentan los esquemas de las ondas estacionarias generadas en el plano de acción de la fuerza gravitacional  $(x, z)$ .

Ambos dispositivos presentaban una entrada y una salida, Figura 3-1b, por medio de las cuales se estableció un flujo controlado para inyectar los parásitos de *Leishmania* o diferentes suspensiones de partículas de Latex Polybead® (Polysciences Inc) con diámetro de  $4,518\mu\text{m}$  y  $S.D = 0,152$ . El control del flujo se logró gracias a dos bombas, una bomba (Pump 33 Harvard Apparatus) conectada en la entrada y otra (Kds Scientific) conectada a la salida de los dispositivos. Las ondas estacionarias, Figura 3-1c, se establecieron en el interior de



los dispositivos al conectar los transductores *Pz26* a un generador de funciones con dos salidas (Tektronix AFG3102C), cuya señal fue seguida permanentemente con un osciloscopio (Tektronix TBS 1102). El dispositivo 1 fue conectado a una sola salida del generador, lo que permitió, al hacer vibrar el transductor con una frecuencia determinada, generar ondas estacionarias al interior del dispositivo con un nodo en el centro del capilar, Figura 3-1c. Por otro lado, el dispositivo 2 al tener dos transductores se conecto a las dos salidas del generador, estableciendo, por superposición de las ondas estacionarias generadas por cada transductor, un nodo aproximadamente en el centro del capilar sobre la zona entre los transductores, lo cual se logró al hacer vibrar simultáneamente estos con la misma frecuencia, Figura 3-1c.

Adicionalmente, para tomar los registros en imagen y vídeo del comportamiento de las partículas de látex o parásitos sometidos a la acción del campo acústico se usaron para el dispositivo 1 un microscopio de reflexión (Olympus BX51M) junto con una cámara (Olympus SC100) y para el dispositivo 2 un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss conectado a una cámara (AxioCam HRc), las mediciones de distancia y tamaño, Figura 3-1a, se llevaron a cabo con los programas Stream Basic 1.9 (Olympus Corporation) y AxioVisión Rel. 4.8.2 (Zeiss) los cuales fueron calibrados previamente.

### 3.1.1. Frecuencia de resonancia en los dispositivos

Antes de emplear los dispositivos 1 y 2 en la manipulación de partículas o células se determinó según su geometría y con el propósito de establecer un nodo de presión en su centro, la frecuencia de resonancia de estos dispositivos, entonces, asumiendo el modelo más sencillo en el cual se tiene resonancia en una sola dimensión para el primer armónico ( $n = 1$ ) se encuentra al considerar estas condiciones en la ecuación (1-98) que la frecuencia tiene la forma

$$f_o = \frac{c_o}{2\ell} \quad (3-1)$$

Donde  $c_o$  es la velocidad del sonido en el líquido, que para el caso del agua a temperatura ambiente o fluidos como el medio de cultivo usado con los parásitos tiene un valor aproximado de  $1482\text{m/s}$ , y  $\ell$  la longitud de la sección transversal en el capilar, cuyo valor medido fue  $\approx 200 \pm 0,05\mu\text{m}$ , Figura 3-1a. Entonces, al remplazar los valores de  $c_o$  y  $\ell$  en la ecuación (3-1) se llega a

$$f_o = \frac{1482\text{m/s}}{2(200 \times 10^{-6}\text{m})} = 3705000\text{Hz} \quad (3-2)$$

$$f_o = 3,705\text{MHz} \quad (3-3)$$

Este valor de frecuencia, fue introducido en el generador de funciones con el objetivo de hacer vibra los transductores en los dispositivos 1 y 2 con esta frecuencia. Encontrando experimentalmente que en ambos dispositivos se establecía resonancia en su interior lo que producía sobre las partículas de látex o parásitos un movimiento de conducción hacia la región central del capilar, donde se definió el nodo de presión de la onda estacionaria, generando un agregado tipo cadena como los encontrados en el modelo teórico al considerar  $\ell_x \gg \ell_y, \ell_z$ , Figura 3-2.

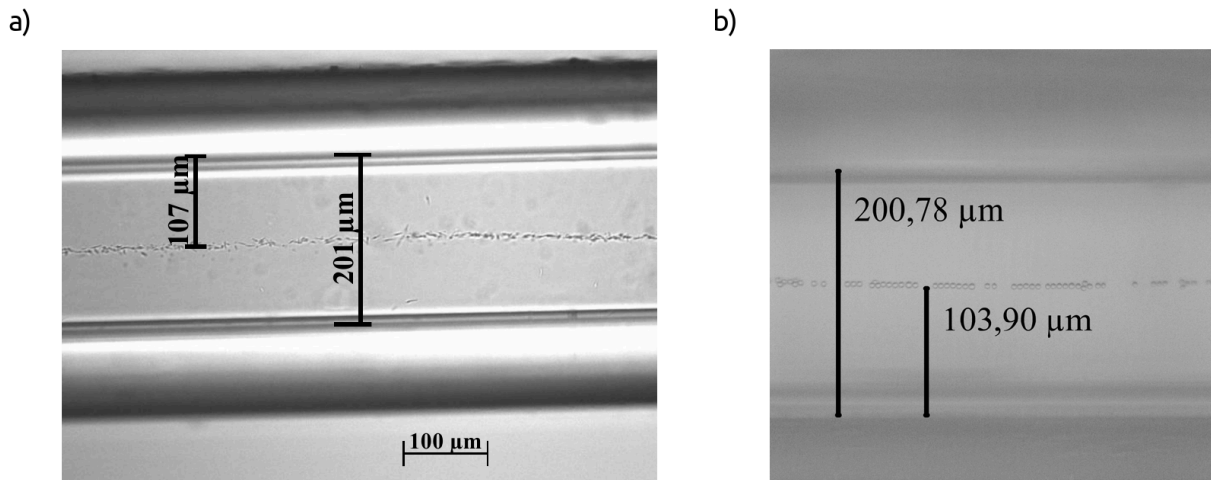


Figura 3-2.: a) Resonancia en el dispositivo 2 con parásitos de *Leishmania*, magnificación 10X b) Resonancia en el dispositivo 1 con partículas de látex de  $5\mu m$ , magnificación 20X.

### 3.1.2. Medición de la Energía Acústica $E_{ac}$ y Amplitud de Presión

Luego de verificar la resonancia en los dispositivos para la frecuencia calculada, ecuación (3-3), el siguiente paso fue hacer la caracterización de estos resonadores mediante el método descrito por Barnkob *et al.* 2010 el cual permite medir *in situ*, la densidad de energía acústica  $E_{ac}$  y la amplitud de presión  $p_a$ , dada por (1-168), en dispositivos microfluídicos, al ajustar la gráfica de la posición  $y$  de la partícula en función  $t$  encontrada experimentalmente con la gráfica obtenida de la solución de la ecuación de movimiento (2-16) para el estado de equilibrio entre la  $\vec{F}_{pr}$  y la fuerza de arrastre de Stokes .

Entonces, se tomaron registros en vídeo del movimiento de varias muestras de partículas de  $4,518\mu m$  al ser expuestas al campo acústico en el dispositivo 1, vídeos que posteriormente fueron analizados con el programa Tracker 4.11.0 para establecer las trayectorias experimentales de las partículas al interior del dispositivo, Figura 3-3a y 3-4a. Es necesario resaltar que en la preparación de la muestra para estos experimentos se midió el tamaño de las partículas usando un contador Coulter Beckman Z2 calibrado para una apertura de  $50\mu m$ , Apéndice

D, encontrando que las partículas usadas tenían un diámetro medio de  $4,589 \pm 0,005 \mu m$  con desviación estándar de 1,100, Figura 3-3b, y, además, las suspensiones fueron preparadas empleando agua HPLC Promega Ref DW099A (water, Amplification Grade) con el propósito de eliminar las interacciones eléctricas entre partículas debido a la presencia de iones en el agua.

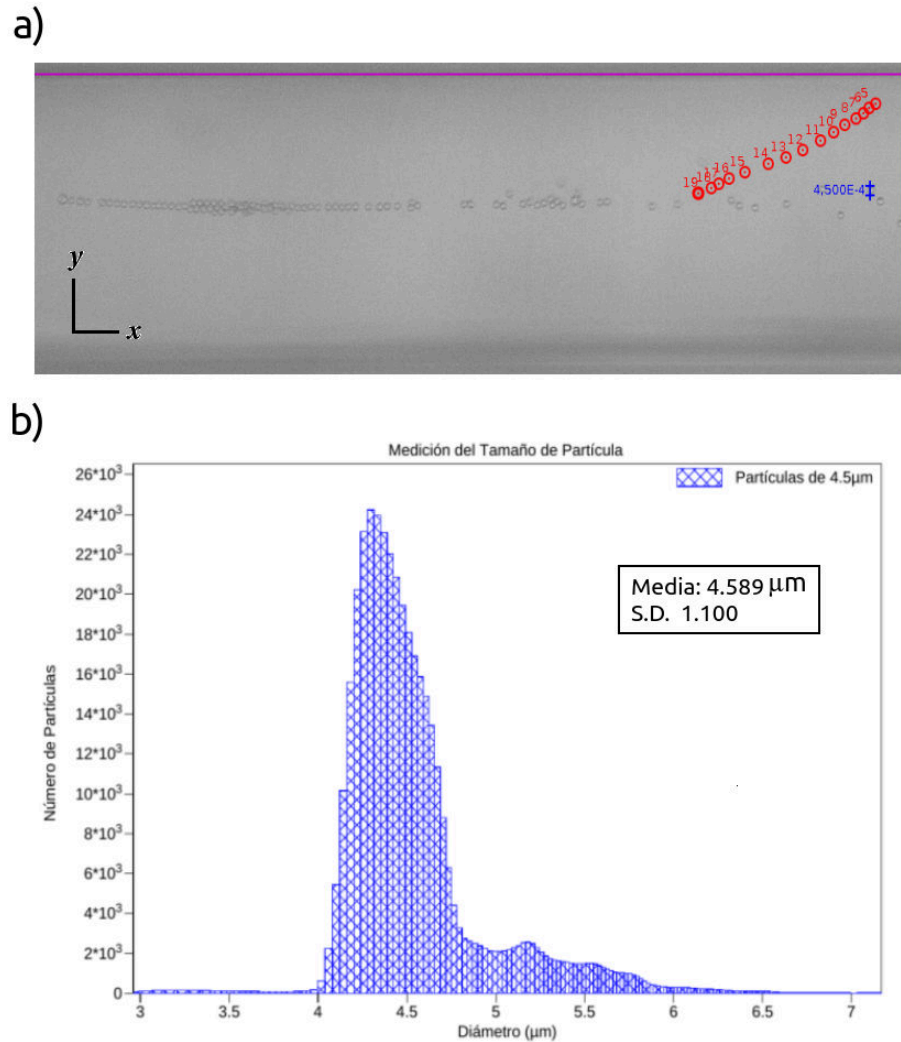


Figura 3-3.: a) Trayectoria experimental de partícula de  $4,5 \mu m$  medida con Tracker 4.1.1.0 en el dispositivo 1, la escala mostrada en azul está en centímetros. b) Medición del diámetro de las partículas con el contador Coulter Beckman Z2.

Posteriormente, usando la solución de la ecuación de movimiento (1-209) para la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional en el plano  $(x, y)$  se gráfico la posición  $y$  de la partícula contra  $t$ , Figura 3-4b, curva que se ajusto con la trayectoria experimental, Figura 3-4a, usando polinomios de tercer orden obtenidos con el software libre Grace-5.1.25, Figura 3-4c. Para elegir la curva teórica que más se aproximaba a la experimental se varió la  $E_{ac}$  en la simulación computacional

hasta tener un polinomio con valores similares al encontrado experimentalmente buscando entre los dos el menor error relativo, Figura 3-4d.

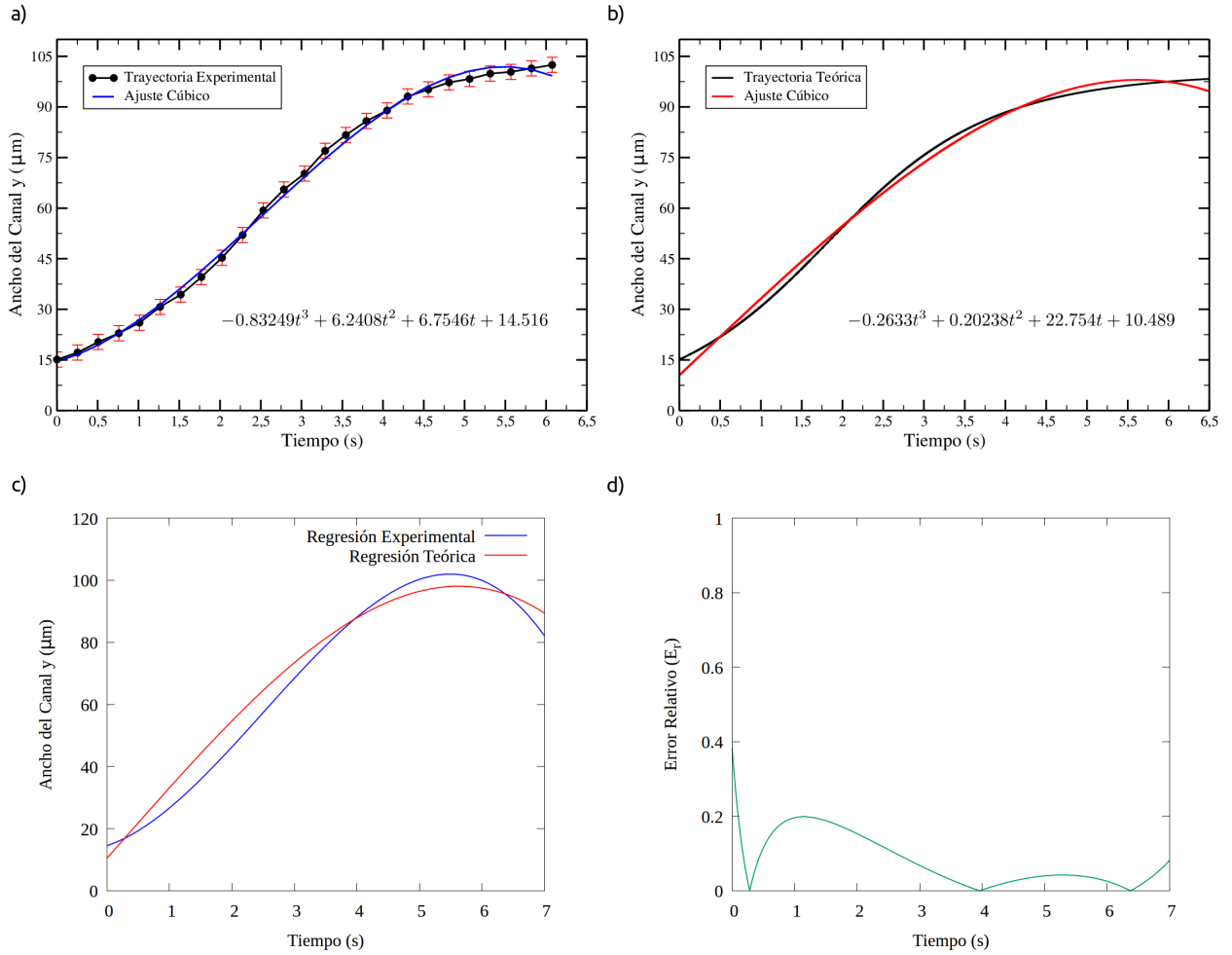


Figura 3-4.: Medición de la  $E_{ac}$  para la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional en el dispositivo 1. a) Gráfica experimental. b) Gráfica teórica. c) Gráfica del ajuste con polinomios de tercer orden y d) Error relativo entre los valores de los polinomios encontrados experimental y teóricamente.

Entonces se encontró para el caso unidimensional que el valor de  $E_{ac}$  con el error relativo más pequeño en el dispositivo 1 correspondía a una energía de  $2,05 \frac{J}{m^3}$ , Figura 3-4d y 3-5, la cual tenía asociada una amplitud máxima de presión que se calculó a partir de la expresión (1-168) al despejar  $p_a$  con lo que se obtuvo la relación

$$p_a = 2\sqrt{\beta_f E_{ac}} \quad (3-4)$$

Donde  $\beta_f = \rho_f c_f^2$  corresponde al módulo volumétrico del agua el cual puede ser escrito en

términos de la densidad del líquido  $\rho_f$  y la velocidad del sonido en el fluido  $c_f$ , por lo tanto, al remplazar los valores de estas cantidades, Cuadro 2-1, en (3-4) se llega a

$$p_a = 2\sqrt{998 \frac{kg}{m^3} \left(1483 \frac{m}{s}\right)^2 2,05 \frac{J}{m^3}} \approx 0,134 Mpa \quad (3-5)$$

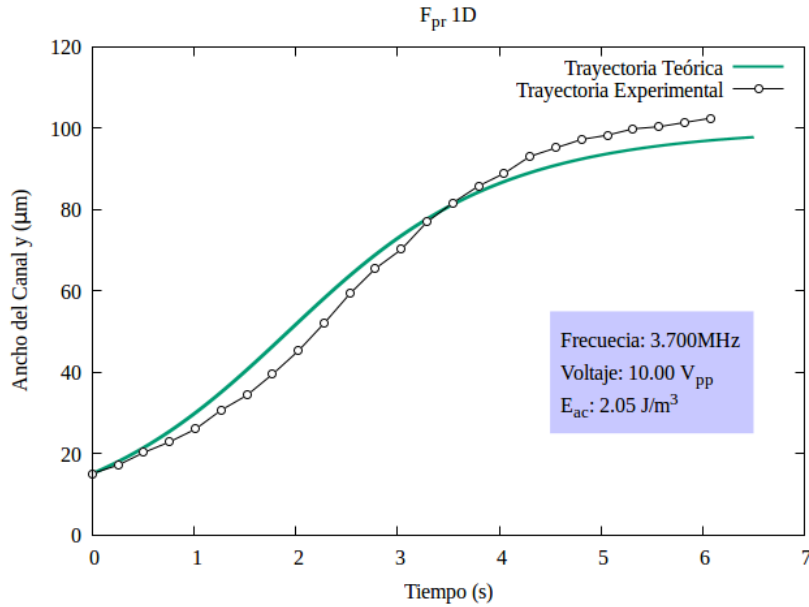


Figura 3-5.: Ajuste de las gráficas de  $y$  en función de  $t$  para la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional usando la energía acústica medida.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente las partículas en cualquiera de los dispositivos construidos están sometidas a una  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional, dada por la solución para paredes suaves en dirección  $x$ , ecuación (1-214), cuyas componentes son afectadas por la resonancia en las tres direcciones del espacio. Entonces, utilizando esta solución se determinó nuevamente el valor de la  $E_{ac}$  siguiendo el método descrito en el caso unidimensional, para ello, primero se identificó el modo de vibración en la dirección  $x$  puesto que no se podía considerar que  $n_x = 1$  debido a que el largo  $\ell_x$  de los dispositivos era mucho mayor que sus otras dimensiones, Figura 3-1. Por lo tanto, se determinó  $n_x$  asumiendo que en  $x$  el dispositivo vibraba con la frecuencia de resonancia dada por (3-3), la cual, podía escribirse como

$$f_n = n_x \frac{c_o}{2\ell_x} \quad (3-6)$$

Despejando de la ecuación anterior  $n_x$  y asumiendo que  $\ell_x = 4mm$  para el dispositivo 1 se

encontró que

$$n_x = \frac{2f_n \ell_x}{c_o} = \frac{2(3,705 \times 10^6 \text{ Hz})(4 \times 10^{-3} \text{ m})}{1483 \frac{\text{m}}{\text{s}}} \approx 20 \quad (3-7)$$

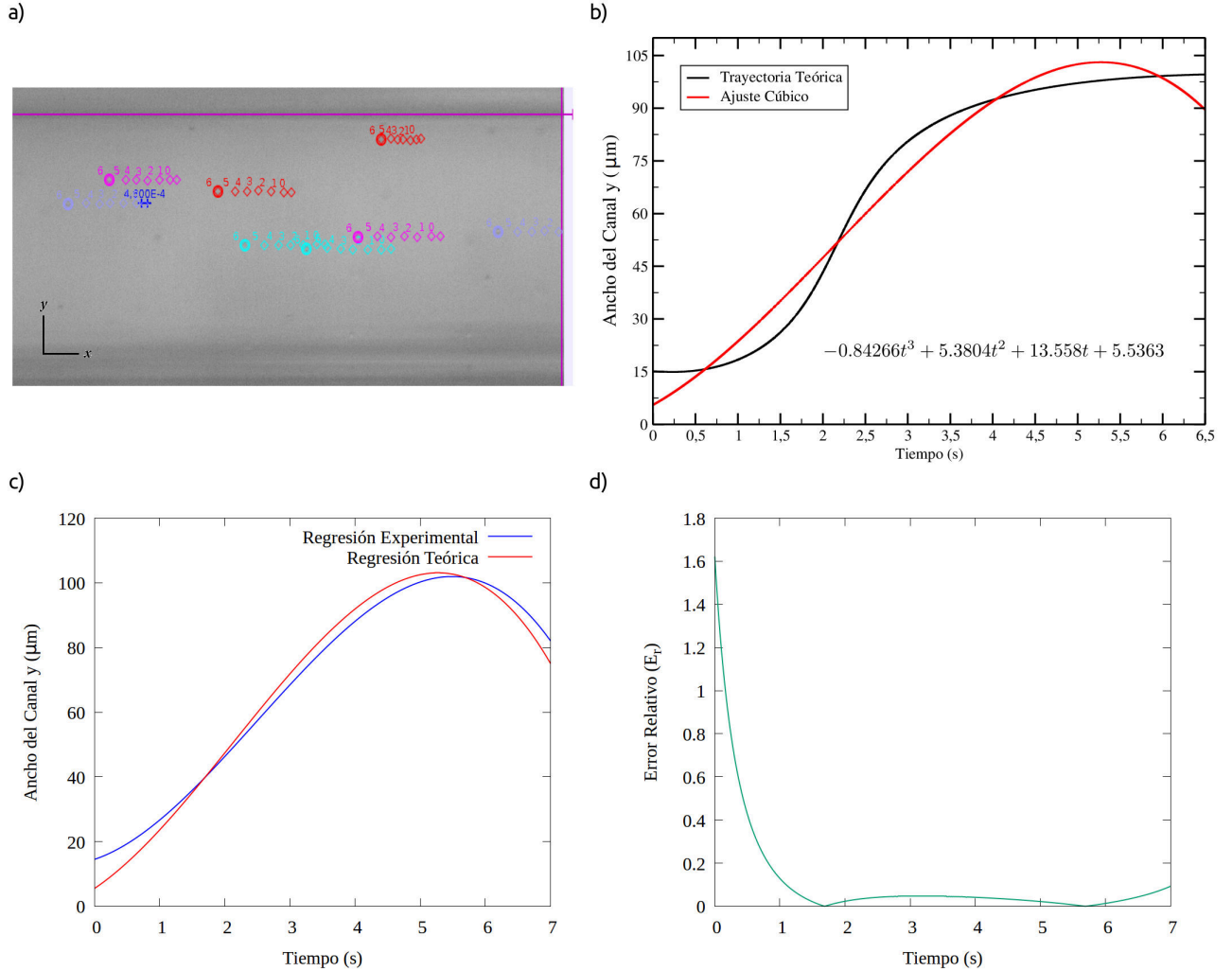


Figura 3-6.: Medición de la  $E_{ac}$  para la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional en el dispositivo 1. a) Determinación con Tracker 4.11.0 de la velocidad del flujo en  $x$ . b) Gráfica teórica. c) Gráfica del ajuste con polinomios de tercer orden y d) Error relativo entre los valores de los polinomios encontrados experimental y teóricamente.

Adicionalmente, usando el programa Tracker 4.11.0 se estableció que la velocidad del flujo en  $x$  era aproximadamente  $36,4 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ , Figura 3-6a, valor que es importante puesto que en la situación tridimensional la posición  $y$  de la partícula se afecta considerablemente por el flujo en dirección  $x$  según se describió al final del Capítulo 2 en el caso de la  $\vec{F}_{pr}$  en paredes suaves.

Después de estimar el modo de vibración y la velocidad del flujo en dirección  $x$  se introdujo los valores encontrados junto a  $\ell_x = 4mm$ ,  $\ell_y = \ell_z = 200\mu m$  y  $n_y = n_z = 1$  en la simulación tomando como posición inicial de la partícula la definida en la trayectoria experimental, Figura (3-4)a, obteniendo así la gráfica teórica de la posición  $y$  de la partícula como función del tiempo  $t$  que se presenta en la Figura 3-6b.

Seguido de esto y al igual que en el caso unidimensional se ajusto el polinomio asociado a la curva teórica con el obtenido de los datos experimentales, Figura 3-6c, al cambiar el valor de la  $E_{ac}$  en la simulación, encontrando, que el error relativo mas pequeño estaba dado para una densidad de energía de  $9,2\frac{J}{m^3}$ , Figuras 3-6d y 3-7, con la cual, se halló que la amplitud máxima de presión en el caso tridimensional era

$$p_a = 2\sqrt{998\frac{kg}{m^3} \left(1483\frac{m}{s}\right)^2 9,2\frac{J}{m^3}} \approx 0,284Mpa \quad (3-8)$$

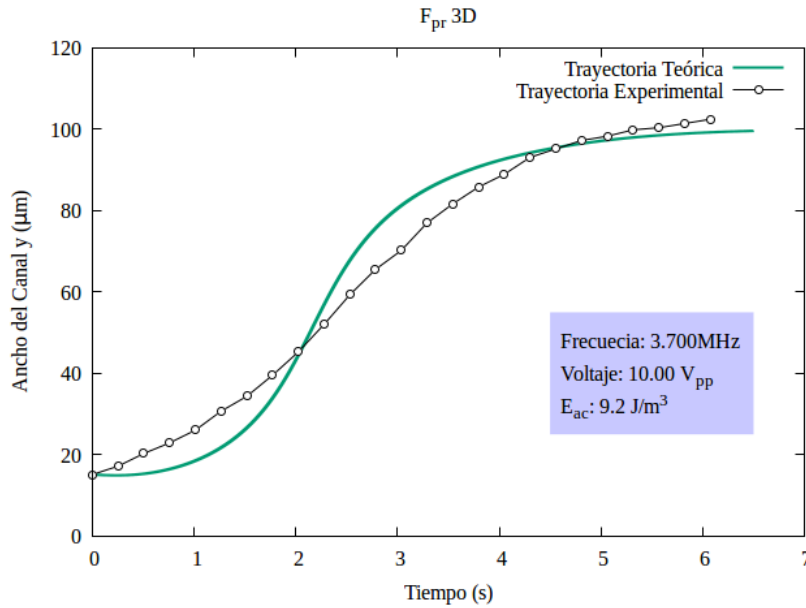


Figura 3-7.: Ajuste de las gráficas de  $y$  en función de  $t$  para la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional usando la energía acústica medida.

Es importante resaltar, al comparar las energías y presiones encontradas en el caso unidimensional y tridimensional en el dispositivo 1, ecuaciones (3-5) y (3-8), que al aumentar el valor de la  $E_{ac}$  a más del triple la presión máxima  $p_a$  se duplica, situación que resulta en un incremento de la  $\vec{F}_{pr}$  como se evidencia al comparar la gráfica de la componente  $y$  de esta fuerza en función de ancho del dispositivo obtenida al considerar la fuerza tridimensional,

curva azul Figura 3-8, con la gráfica encontrada al considerar la fuerza en una dimensión, curva verde Figura 3-8.

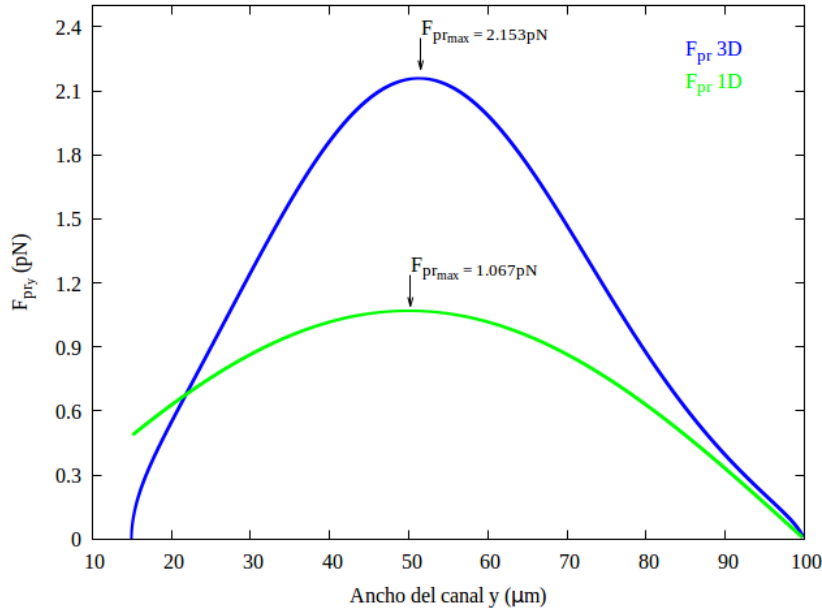


Figura 3-8.: Gráfica de la componente  $y$  de la  $\vec{F}_{pr}$  en función del ancho del dispositivo 1 en el caso 3D, curva azul, y 1D, curva verde.

Por otro lado, la medición de la  $E_{ac}$  permitió analizar la  $\vec{F}_{pr}$  en los dispositivos construidos, esto se logró al determinar los valores máximos de esta fuerza,  $F_{pr_{max}}$ , usando gráficas como las mostradas en la Figura 3-8, lo que ayudó a establecer la relación entre la  $F_{pr_{max}}$  y el tamaño, densidad y elasticidad de la partícula, Figuras 3-9, 3-10 y 3-11, según se describe a continuación al considerar la  $\vec{F}_{pr}$  3D para paredes suaves en el dispositivo 1.

### 3.1.2.1. $F_{pr_{max}}$ y tamaño de partícula

La relación entre la  $F_{pr_{max}}$  y el diámetro se halló manteniendo las propiedades del fluido y de la partícula constantes en la simulación para una posición inicial  $y_o = 15,1\mu\text{m}$ , posteriormente se varió el tamaño de partícula desde  $2\mu\text{m}$  hasta  $10\mu\text{m}$  para determinar los valores de la  $F_{pr_{max}}$  que se muestran en el Cuadro 3-1.



Diámetro ( $\mu m$ )	Radio ( $\mu m$ )	$F_{pr_{max}}$ (pN)
2	1,0	0,17818
3	1,5	0,59549
4	2,0	1,40068
5	2,5	2,73057
6	3,0	4,21179
7	3,5	5,76640
8	4,0	7,37201
9	4,5	8,69283
10	5,0	9,83618

Cuadro 3-1.: Valores de la  $F_{pr_{max}}$  para diferentes tamaños de partícula.

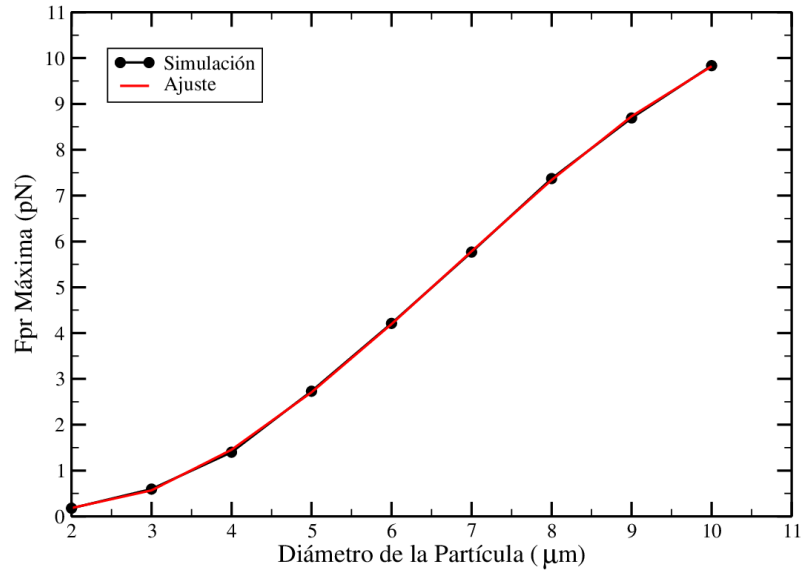


Figura 3-9.: Gráfica de la  $F_{pr_{max}}$  como función del tamaño de la partícula.

Encontrando, al graficar la  $F_{pr_{max}}$  como función del diámetro y haciendo un ajuste con el programa Grace-5.1.25, que estas dos variables obedecen una relación cúbica, Figura 3-9, la cual es descrita por la ecuación

$$F_{pr_{max}} = -0,022238d^3 + 0,45067d^2 - 1,4456d + 1,4482 \tag{3-9}$$

donde  $d$  corresponde al diámetro de la partícula en  $\mu m$  y  $F_{pr_{max}}$  al valor máximo en magnitud de la fuerza acústica en  $pN$ . Es de resaltar, en este caso, que al ajustar los datos obtenidos de la simulación con un polinomio cúbico el coeficiente de correlación es igual a 0,9924.

### 3.1.2.2. $F_{pr_{max}}$ y densidad de la partícula

Por otro lado, la relación entre la magnitud de la  $F_{pr_{max}}$  y la densidad de la partícula  $\rho_p$  se estableció al variar en la simulación la densidad relativa, factor  $\zeta$  dado por la ecuación (1-135), manteniendo su diámetro y elasticidad constantes pero cambiando la  $\rho_p$  desde  $1000 \frac{kg}{m^3}$  hasta  $1100 \frac{kg}{m^3}$ , con lo que se determinó los valores máximos de esta fuerza mostrados en el Cuadro 3-2.

Densidad de la Partícula $\rho_p$ ( $kg/m^3$ )	$\zeta = \rho_p/\rho_{H_2O}$	$F_{pr_{max}}$ (pN)
1000	1,00	1,77543
1010	1,01	1,85734
1020	1,02	1,93242
1030	1,03	2,00739
1040	1,04	2,08020
1050	1,05	2,15301
1060	1,06	2,21786
1070	1,07	2,28385
1080	1,08	2,34983
1090	1,09	2,40785
1100	1,10	2,46587

Cuadro 3-2.: Valores de la  $F_{pr_{max}}$  para partículas con diferente densidad.

Observado que al aumentar la densidad de las partículas la  $F_{pr_{max}}$  se incrementa proporcionalmente, afirmación que fue corroborada al graficar esta fuerza como función de la densidad relativa  $\zeta$ , Figura 3-10, hallando, al hacer el ajuste sobre los puntos obtenidos, una relación lineal entre estas dos variables, con un coeficiente de correlación de 0,9988, relación que es descrita por la ecuación

$$F_{pr_{max}} = 6,906\zeta - 5,112 \quad (3-10)$$

siendo  $\zeta$  la densidad relativa un término adimensional y  $F_{pr_{max}}$  el valor máximo en magnitud de la fuerza acústica en  $pN$ .

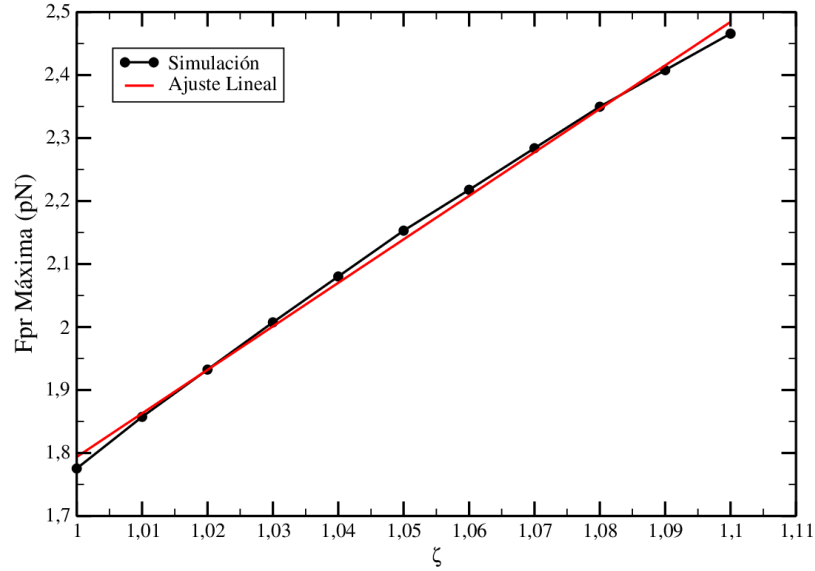


Figura 3-10.: Gráfica de la  $F_{pr_{max}}$  como función de la densidad relativa de la partícula  $\zeta$ .

### 3.1.2.3. $F_{pr_{max}}$ y elasticidad de la partícula

Por último, la relación entre velocidad del sonido en la partícula  $c_p$  y la  $F_{pr_{max}}$  se definió de manera similar a los casos anteriores, es decir, que se mantuvo en la simulación constante todas las propiedades excepto el factor adimensional  $\kappa$ , el cual está dado por la razón entre la velocidad del sonido en la partícula y el fluido, ecuación (1-135). Entonces se varió este factor al tomar velocidades del sonido en la partícula entre dos rangos el primero de  $1483 \frac{m}{s}$  a  $2966 \frac{m}{s}$ , Cuadro 3-3, y el segundo de  $1483 \frac{m}{s}$  a  $1631 \frac{m}{s}$ , Cuadro 3-4. La elección de estos intervalos para la velocidad del sonido se hizo teniendo en cuenta que en partículas de látex la velocidad del sonido es de aproximadamente  $2099 \frac{m}{s}$  lo que corresponde a un factor  $\kappa \approx 1,42$  que según la Figura 3-11a está en una región de comportamiento no lineal. Sin embargo, en células se estableció, teniendo presente los resultados de densidad y compresibilidad dados por Hartono *et al.* (2011) y Wang *et al.* (2018) en diferentes poblaciones celulares, Cuadros 3-5 y 3-7, que la velocidad del sonido se encuentra dentro del rango de  $1464 \frac{m}{s}$ , velocidad en células de la línea M4e a  $1658 \frac{m}{s}$  que es la velocidad del sonido en glóbulos rojos, por lo tanto, el factor  $\kappa$  para estas velocidades está en el intervalo de 0,9 a 1,1 que corresponde a una región de comportamiento lineal, Figura 3-11b.

Velocidad del Sonido en la Partícula $c_p$ (m/s)	$\kappa = c_p/c_f$	$F_{pr_{max}}$ (pN)
1483	1,0	0,25923
1631	1,1	1,63618
1780	1,2	2,51820
1928	1,3	2,98540
2076	1,4	3,26033
2224	1,5	3,43477
2373	1,6	3,56655
2521	1,7	3,65358
2669	1,8	3,73038
2818	1,9	3,78498
2966	2,0	3,83959

Cuadro 3-3.: Valores de la  $F_{pr_{max}}$  en partículas con velocidades del sonido entre  $1483 \frac{m}{s}$  y  $2966 \frac{m}{s}$ , rango para partículas de látex.

Entonces, al graficar la  $F_{pr_{max}}$  como función de  $\kappa$  se encontró, haciendo el ajuste correspondiente, para los valores del Cuadro 3-3 que la relación entre estas dos variables es no lineal, Figura 3-11a, y esta descrita por el polinomio cúbico

$$F_{pr_{max}} = 9,362\kappa^3 - 47,707\kappa^2 + 81,15\kappa - 42,453 \tag{3-11}$$

con un coeficiente de correlación de 0,877, donde nuevamente  $F_{pr_{max}}$  es el valor máximo en magnitud de la fuerza acústica en pN y  $\kappa$  el término adimensional relacionado con la velocidad del sonido en la partícula. Por otro lado, al tomar los valores del Cuadro 3-4 se halló con el ajuste de la gráfica obtenida que la relación entre la  $F_{pr_{max}}$  y el factor  $\kappa$  está dada en este intervalo por la expresión lineal

$$F_{pr_{max}} = 14,177\kappa - 13,943 \tag{3-12}$$

con coeficiente de correlación de 0,9995.

Velocidad del Sonido en la Partícula $c_p$ ( $m/s$ )	$\kappa = c_p/c_f$	$\vec{F}_{pry}$ Máxima ( $pN$ )
1483	1,00	0,25923
1498	1,01	0,37156
1513	1,02	0,49966
1527	1,03	0,64179
1542	1,04	0,79113
1557	1,05	0,94304
1572	1,06	1,09223
1587	1,07	1,23800
1602	1,08	1,38180
1616	1,09	1,51399
1631	1,10	1,63618

Cuadro 3-4.: Valores de la  $F_{prmax}$  en partículas con velocidades del sonido entre  $1483 \frac{m}{s}$  y  $1631 \frac{m}{s}$ , rango de para poblaciones biológicas.

Población	$\rho_c$ ( $kg/m^3$ )	$\zeta = \rho_c/\rho_{H_2O}$	$K$ ( $\times 10^{-10} Pa^{-1}$ )	$c_c$ ( $m/s$ )	$\kappa = c_c/c_{H_2O}$
Partículas de Látex	1050	1,050	$2,16 \pm 0,11$	2099,8	1,415
Células cáncer de mama MCF-7	1068	1,068	$4,22 \pm 0,19$	1489,6	1,004
Células cáncer de colon HT-29	1077	1,077	$4,04 \pm 0,16$	1516,0	1,022
Fibroblastos NIH/3T3	1079	1,079	$3,78 \pm 0,17$	1565,8	1,056
Glóbulos Rojos	1099	1,099	$3,31 \pm 0,22$	1658,0	1,118

Cuadro 3-5.: Valores de densidad  $\rho_c$ , compresibilidad  $K$  y velocidad del sonido  $c_c$  en partículas de látex y en algunas poblaciones celulares (Hartono *et al.* , 2011).

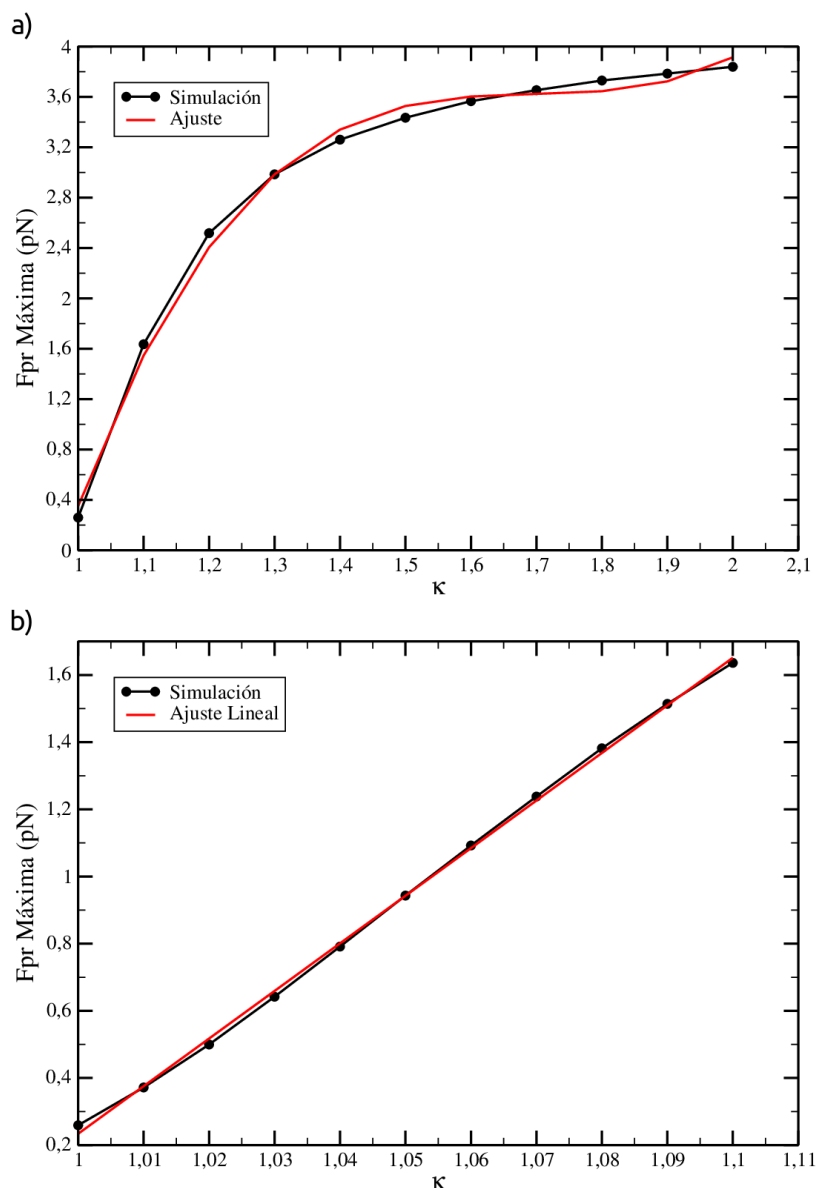


Figura 3-11.: Gráfica de la  $F_{pr\text{ máx}}$  como función del factor  $\kappa$  para valores entre a) 1 y 2 y b) 1 y 1,1.

#### 3.1.2.4. Relación entre $\kappa$ y $\zeta$

Teniendo presente que la densidad de las partículas de látex está dentro del rango asociado a las poblaciones celulares, Cuadros 3-5 y 3-7, donde el comportamiento entre la  $F_{pr\text{ máx}}$  y la densidad relativa  $\zeta$  está dado por la relación lineal (3-10) y que además la razón entre velocidades  $\kappa$  es proporcional a la  $F_{pr\text{ máx}}$ , ecuación (3-12), para valores de velocidad en el rango asociado con algunas poblaciones celulares, Cuadro 3-5 y Figura (3-11)b, en esta subsección se establece una relación entre el factor  $\kappa$  y la densidad relativa  $\zeta$  que se usará

con los parásitos de *Leishmania* para determinar su elasticidad por medio de su densidad. Relación que fue definida a partir de los resultados teóricos hallados con la simulación para la  $F_{pr_{max}}$  en tres dimensiones, ecuaciones (3-10) y (3-12), y con mediciones experimentales de la compresibilidad obtenidas de la literatura, Cuadros 3-5 y 3-7.

Para ello, se asumió que la magnitud de la  $F_{pr_{max}}$  contiene información de las propiedades físicas de las partículas o células, afirmación que puede ser corroborada fácilmente en el caso de la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional, expresiones (1-209) y (1-217), puesto que el valor máximo de esta fuerza se encuentra si el  $\sin(2k_y y) = 1$  situación en la cual esta fuerza no tendría dependencia espacial relacionando su valor directamente con las propiedades mecánicas. Entonces, asumiendo que la  $F_{pr_{max}}$  es independiente de la posición y por otro lado que se relaciona con las propiedades de las partículas o células, se toma la ecuación de esta fuerza en función de la densidad relativa  $\zeta$ , ecuación (3-10), y se determina su valor al considerar la densidad de las células de cáncer de mama *MCF-7* y de los glóbulos rojos, Cuadro 3-5, obteniendo

- Para las *MCF-7* ( $\zeta = 1,068$ )

$$F_{pr_{max}} = 6,9064pN(1,068) - 5,1125pN \quad (3-13)$$

$$F_{pr_{max}} = 2,264pN \quad (3-14)$$

- Para los Glóbulos Rojos ( $\zeta = 1,099$ )

$$F_{pr_{max}} = 6,9064pN(1,099) - 5,1125pN \quad (3-15)$$

$$F_{pr_{max}} = 2,478pN \quad (3-16)$$

Ahora usando el resultado teórico encontrado al estudiar la relación entre la  $F_{pr_{max}}$  y el factor adimensional  $\kappa$ , donde se estableció la relación lineal (3-12) al tomar poblaciones con velocidad del sonido similar al de las poblaciones celulares en el Cuadro 3-5, se puede escribir la relación entre estas dos cantidades como

$$F_{pr_{max}} = m\kappa + b \quad (3-17)$$

Siendo  $m$  la pendiente de la recta y  $b$  el punto de corte con el eje vertical, respectivamente, cantidades que se determinaron al emplear los valores de la  $F_{pr_{max}}$  definidos por las expresiones (3-12) y (3-16) junto con los términos de  $\kappa$  dados en el Cuadro 3-5 para células  $MCF - 7$  y glóbulos rojos, con lo cual se escribió la expresión (3-17) para cada una de estas poblaciones en la forma

$$2,264pN = m(1,004) + b \quad MCF - 7 \quad (3-18)$$

$$2,478pN = m(1,118) + b \quad Glóbulos\ Rojos \quad (3-19)$$

La pendiente  $m$  de (3-17) se calculó al restar las ecuaciones (3-18) y (3-19) encontrando que su valor era igual a

$$-0,214pN = m(-0,114) \quad (3-20)$$

$$m = 1,877pN \quad (3-21)$$

Remplazando (3-21) en la expresión (3-17) esta toma la forma

$$F_{pr_{max}} = (1,877pN)\kappa + b \quad (3-22)$$

Por otro lado, la constante  $b$  en (3-22) se obtiene al sustituir en esta ecuación los valores de  $F_{pr_{max}}$  y  $\kappa$ , definidos en (3-14) y en el Cuadro 3-5 para las células  $MCF - 7$ , con lo que se llega a

$$2,264pN = (1,877pN)(1,004) + b \quad (3-23)$$

$$b = 0,38pN \quad (3-24)$$

Entonces, al remplazar  $b$  en (3-22), se tiene que la relación entre la  $F_{pr_{max}}$  y  $\kappa$  para células en el intervalo de velocidades del sonido asociado con el comportamiento lineal, Figura (3-11)b, es

$$F_{pr_{max}} = (1,877pN)\kappa + 0,38pN \quad (3-25)$$



Establecida la expresión (3-25) fue posible relacionar los factores adimensionales  $\kappa$  y  $\zeta$  en la región de comportamiento lineal, al igualar esta expresión con (3-10), procedimiento que se hace al asumir que una célula con densidad y elasticidad diferentes está sometida a la misma  $F_{pr_{max}}$ , por lo tanto, se tiene que

$$(1,877pN) \kappa + 0,38pN = 6,906pN\zeta - 5,112pN \quad (3-26)$$

Para terminar, se reorganiza (3-26) con el propósito de definir el factor  $\kappa$  como función de  $\zeta$ , obteniendo

$$(1,877pN) \kappa = 6,906pN\zeta - 5,492pN \quad (3-27)$$

$$\kappa = \frac{6,906pN}{1,877pN} \zeta - \frac{5,492pN}{1,877pN} \quad (3-28)$$

$$\kappa = 3,679\zeta - 2,926 \quad (3-29)$$

La expresión (3-29) es de importancia ya que al relacionar los factores adimensionales  $\kappa$  y  $\zeta$  se puede, al conocer la densidad de cierta población celular  $\rho_c$ , determinar su módulo volumétrico  $\beta$  y compresibilidad  $K$  puesto que estas cantidades se relacionan con la velocidad del sonido en la célula  $c_c$  según las ecuaciones

$$\beta = c_c^2 \rho_c \quad (3-30)$$

$$K = \frac{1}{\beta} \quad (3-31)$$

velocidad que es determinada a partir de (3-29). Por otro lado, es de importancia resaltar que en (3-30) la velocidad del sonido y la densidad de las células están en unidades del sistema internacional, por lo que las unidades de  $\beta$  y  $K$  son  $Pa$  y  $Pa^{-1}$ , respectivamente.

Además, de lo ya mencionado se evaluó la validez de (3-29) al usar en la simulación la expresión de la  $\vec{F}_{pr}$  unidimensional, ecuación (1-209) o (1-217), con lo que se determinó nuevamente la relación entre la  $F_{pr_{max}}$  y los factores  $\kappa$  y  $\zeta$ , encontrando, según el proceso descrito previamente para la  $\vec{F}_{pr}$  3D, que las relaciones entre estos coeficientes adimensionales en poblaciones con tamaños de  $5\mu m$ ,  $10\mu m$  y  $15\mu m$ , estaban dadas por

$$\begin{aligned}
 \kappa &= 3,669\zeta - 2,914 & 5\mu m \\
 \kappa &= 3,668\zeta - 2,921 & 10\mu m \\
 \kappa &= 3,680\zeta - 2,926 & 15\mu m
 \end{aligned}
 \tag{3-32}$$

Resultados que evidencian, al comparar las expresiones (3-32) entre si y con la ecuación (3-29), que la relación entre  $\kappa$  y  $\zeta$  es independiente por un lado del tamaño de la población considerada y por otro de la densidad de energía acústica  $E_{ac}$ , conclusión a la que se llega, puesto que, la expresión (3-29) para la  $\vec{F}_{pr}$  en 3D se definió usando en la simulación una  $E_{ac} = 9,2\frac{J}{m}$ , mientras que, las ecuaciones (3-32) para la  $\vec{F}_{pr}$  en 1D se obtuvieron al tomar la  $E_{ac} = 2,02\frac{J}{m}$ . Por último para concretar la forma de la relaciona entre  $\kappa$  y  $\zeta$  se promediaron los resultados encontrados para  $m$  y  $b$  en una y tres dimensiones, con lo que se estableció la relación

$$\kappa = 3,674\zeta - 2,922
 \tag{3-33}$$

Población	$\zeta$	$\kappa = 3,674\zeta - 2,922$	$c_c$ (m/s)	$K$ ( $\times 10^{-10} Pa^{-1}$ )
Células cáncer de mama MCF-7	1,068	1,002	1486,0	4,240
Células cáncer de colon HT-29	1,077	1,035	1534,9	3,941
Fibroblastos NIH/3T3	1,079	1,042	1545,3	3,881
Glóbulos Rojos	1,099	1,116	1655,0	3,322

Cuadro 3-6.: Valores de velocidad del sonido y de compresibilidad en diferentes poblaciones celulares determinados con la ecuación (3-33).

La ecuación (3-33) es válida si  $\kappa$  está en el intervalo de 1,0 a 1,1 y si el valor de densidad celular se encuentra entre  $1068\frac{kg}{m^3}$  a  $1099\frac{kg}{m^3}$ . Para corroborar la validez de (3-33) se calculo la velocidad del sonido en células  $c_c$  usando esta expresión y posteriormente se determinó su compresibilidad  $K$  según las relaciones dadas en (3-30) y (3-31), hallando al comparara los resultados presentados en el Cuadro 3-6 con los del Cuadro 3-5, donde  $K$  fue obtenida experimentalmente como se describe en Hartono *et al.* (2011), que los valores de  $K$  encontrados al usar (3-33) están dentro del error permitido.

Pero, a pesar de encontrar resultados similares a los experimentales usando (3-33), esta ecuación no describe correctamente la relación entre  $\kappa$  y  $\zeta$  ya que al considerar densidades menores a  $1068 \frac{kg}{m^3}$  o densidades celulares asociadas con factores  $\kappa < 1$ , como los mostrados en el Cuadro 3-7, esta expresión no predice correctamente los valores presentados en la literatura. Por tal razón, fue necesario definir una segunda relación lineal que permita especificar la compresibilidad  $K$  bajo estas condiciones, entonces, usando los datos obtenidos experimentalmente por Wang *et al.* (2018) al medir la elasticidad en líneas celulares de cáncer de cabeza y garganta (HNC), Cuadro 3-7, se determinó tomando los datos de células de cáncer de mama *MCF-7* y de la línea celular *Tu686* nuevamente la expresión que relaciona los factores adimensionales  $\kappa$  y  $\zeta$ .

Población	$\rho_c$ ( $kg/m^3$ )	$\zeta = \rho_c/\rho_{H_2O}$	$K$ ( $\times 10^{-10} Pa^{-1}$ )	$c_c$ ( $m/s$ )	$\kappa = c_c/c_{H_2O}$
Línea Celular HEPG2	1087	1,087	$4,28 \pm 0,12$	1466,1	0,989
Línea Celular Tu686	1026	1,026	$4,02 \pm 0,12$	1557,1	1,050
Línea Celular 686LN	1059	1,059	$4,28 \pm 0,12$	1485,4	1,002
Línea Celular M4e	1080	1,080	$4,32 \pm 0,12$	1464,0	0,987
Línea Celular 37B	1045	1,045	$4,40 \pm 0,12$	1474,7	0,994

Cuadro 3-7.: Valores de densidad  $\rho_c$ , compresibilidad  $K$  y velocidad del sonido  $c_c$  en células de cáncer de hígado (Hartono *et al.*, 2011) y en líneas celulares de cáncer de cabeza y garganta (HNC) (Wang *et al.*, 2018).

Entonces, siguiendo el mismo procedimiento con el que se determinó la ecuación (3-29), pero considerando ahora los términos  $\kappa$  y  $\zeta$  de la línea celular *Tu686* dados en el Cuadro 3-7, se encontró que la relación entre estos factores es

$$\kappa = -1,096\zeta + 2,174 \quad (3-34)$$

Expresión que es válida si la densidad celular está entre  $1068 kg/m^3$  y  $1026 kg/m^3$  con  $\kappa$  en el intervalo de 1,0 a 1,1 pero que también se cumple con densidades mayores a  $1068 kg/m^3$  siendo  $\kappa < 1$ , hecho que se verificó al calcular con (3-34) la velocidad del sonido y posteriormente la

elasticidad celular de las poblaciones celulares presentadas en el Cuadro 3-7 encontrando que los valores obtenidos con (3-34), Cuadro 3-8, son similares a los definidos experimentalmente.

Población	$\zeta$	$\kappa = -1,096\zeta + 2,174$	$c_c$ (m/s)	$K$ ( $\times 10^{-10} Pa^{-1}$ )
HEPG2	1,087	0,983	1457,3	4,33
Tu686	1,026	1,050	1557,2	4,02
686LN	1,059	1,013	1502,3	4,18
M4e	1,080	0,990	1468,2	4,30
37B	1,045	1,029	1526,0	4,11

Cuadro 3-8.: Valores de velocidad del sonido y de compresibilidad en diferentes poblaciones celulares determinadas con la ecuación (3-34).

Para terminar, se debe resaltar que al igual que con (3-33) la expresión (3-34) es independiente del tamaño de la partícula, de la  $E_{ac}$  y del dispositivo acústico empleado.

Hasta aquí se presentan los resultados encontrados al caracterizar la  $\vec{F}_{pr}$  en el dispositivo 1 el cual fue empleado en la manipulación de partículas, en la siguiente sección después de definir el modelo biológico y medir sus propiedades físicas, usando esta misma metodología se determinará la energía  $E_{ac}$ , la amplitud de presión  $p_a$  y la  $F_{pr_{max}}$  en el dispositivo 2 que experimentan los parásitos de *Leishmania* al ser manipulados en este dispositivo.

## 3.2. Propiedades Mecánicas de *Leishmania*

### 3.2.1. Modelo Biológico: Parásitos de *Leishmania*

Leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* que son transmitidos por la picadura de un insecto vector hematófago de los géneros *Lutzomyia* en el viejo mundo y *Phlebotomus* en el nuevo mundo (Cantacessi *et al.*, 2015). Basados en estimaciones recientes cerca de 0,4 millones y 1,2 millones de casos de Leishmaniasis visceral (LV) y cutánea (LC), respectivamente, ocurren cada año en 98 países. A pesar de su amplia distribución, más de 90% de los casos mundiales de LV se producen sólo en 6 países: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil, mientras que la

mayoría de los casos de LC, entre 70-75 %, se registran en diez países: Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudán del Norte, Costa Rica y Perú. Por lo general las leishmaniasis afectan personas de escasos recursos en zonas rurales donde se dan las condiciones para la proliferación del vector (Cantacessi *et al.*, 2015). Actualmente estas enfermedades son catalogadas como emergentes puesto que la actividad humana asociada con deforestación y cambio climático alteran factores ambientales, que llevan a una redistribución geográfica del parásito (Ashford, 2000).

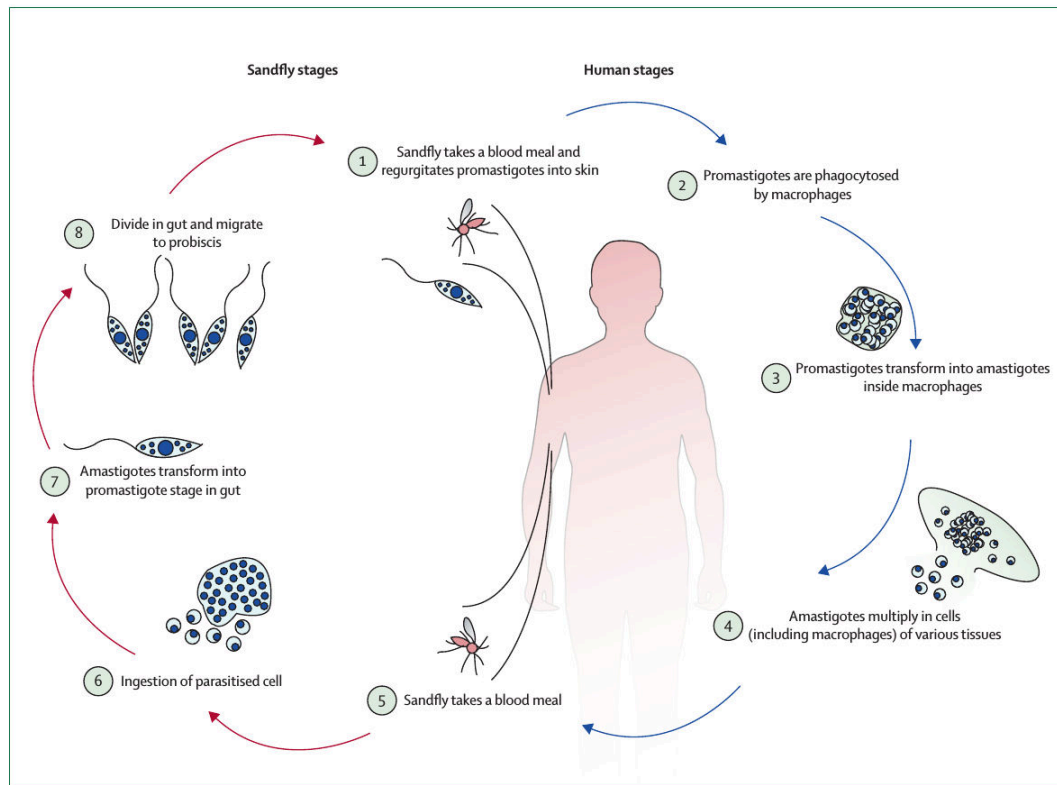


Figura 3-12.: Ciclo de vida de *Leishmania*, imagen tomada de (Reithinger *et al.*, 2007).

El ciclo de vida del parásito tiene dos estadios uno al interior del hospedero invertebrado y otro al interior de un hospedero vertebrado que puede ser el hombre, Figura 3-12. Este ciclo comienza cuando *Leishmania* en su forma infectiva de promastigote metacíclico es transmitido por la picadura del insecto vector al hospedero vertebrado (Etapa 1 Figura 3-12) en el cual los parásitos son fagocitados por células del sistema inmune, macrófagos (Etapa 2 Figura 3-12) para ser confinados, posteriormente en un compartimento endolisosomal conocido como vacuola parasitófora (VP), donde debido a las condiciones ambientales, se diferencian a su forma amastigote (Etapa 3 Figura 3-12). Dentro de la VP se multiplican y salen a infectar otros macrófagos, células dendríticas y ocasionalmente fibroblastos (Etapa 4 Figura 3-12). El ciclo continúa cuando otro vector se alimenta del hospedero mamífero

infectado (Etapa 5 Figura 3-12), adquiriendo así células con amastigotes (Etapa 6 Figura 3-12). Luego dentro del intestino del vector el parásito inicia su proceso de diferenciación de la forma amastigote a la forma de promastigote procíclico después de 12 a 28 horas de la alimentación del vector (Etapa 7 Figura 3-12). Por último los promastigotes en su forma procíclica migran hacia el intestino del insecto donde se adhieren a las paredes y comienzan su división por ser altamente replicativo, pero poco infeccioso (Etapa 8 Figura 3-12) (Besteiro *et al.*, 2007).

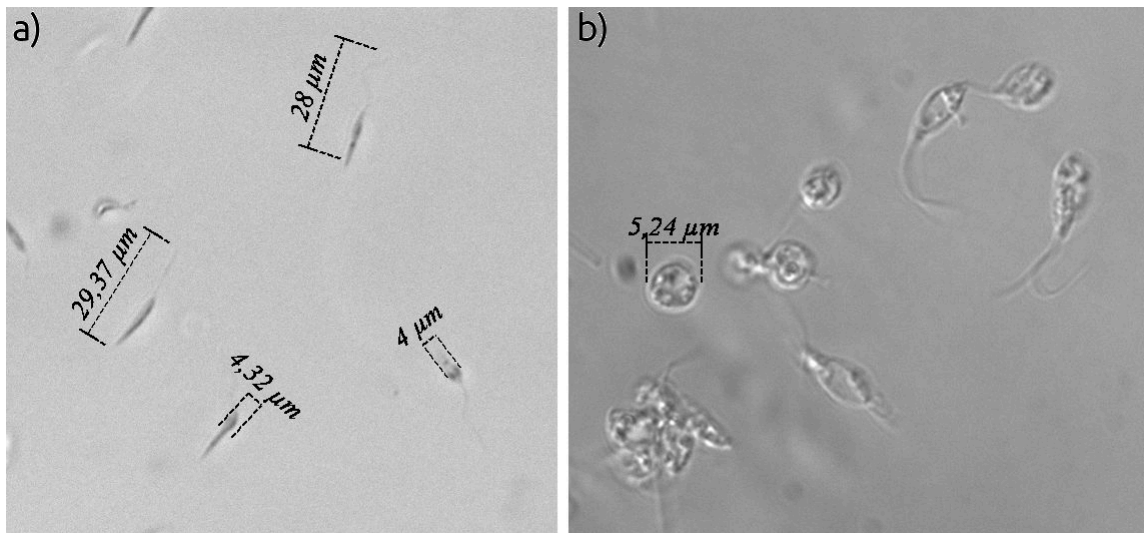


Figura 3-13.: Cultivos *in vitro* de *Leishmania tropica* WT donde se observa la forma que toma el parásito al adaptarse a los diferentes ambientes en su ciclo de vida. a) Forma promastigote y b) Forma amastigote. Imágenes tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss para magnificaciones de 40X y 100X, respectivamente.

Como se describió en el ciclo de vida, durante la transición entre los ambientes extra e intracelular *Leishmania* es expuesto a cambios de pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno y al tipo de nutrientes (Besteiro *et al.*, 2007). Dentro del intestino del vector *Leishmania*, en su etapa flagelada, está sometido a  $\sim 24^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} \sim 7,4$  (Marchesini & Docampo, 2002) y osmolaridad de  $300\text{mOsm}$  o más (Lefurgey *et al.*, 2005), condiciones que cambian en la VP donde el parásito, en su etapa no flagelada, debe tolerar temperaturas  $\sim 35 - 37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH} \sim 5$  (Antoine *et al.*, 1990). La estrategia adoptada por el parásito para sobrevivir a estos cambios ambientales ha sido el desarrollo de formas altamente especializadas y adaptadas, que se distinguen por sus requerimientos nutricionales, tasa de crecimiento, capacidad de dividirse, expresión regulada de sus proteínas de membrana y su morfología (Besteiro *et al.*, 2007). El parásito en su forma de promastigote metacíclico es diferente de la forma procíclica, no solamente por tener un flagelo más largo, sino además, porque expresa proteínas de membrana que le permiten sobrevivir en el huésped mamífero, Figura 3-13a. Por otra parte,

la forma de amastigote tomada por *Leishmania* en la VP después de ser fagocitado es no móvil, con un tamaño reducido y un flagelo retraído, el cual no emerge del bolsillo flagelar (Besteiro *et al.* , 2007), Figura 3-13b.

Aunque se han realizado estudios con la ayuda de cultivos *in vitro* para entender los mecanismos de adaptación del parásito a estos ambientes (Barak *et al.* , 2005), todavía se tiene poca información sobre la expresión de genes asociados con la diferenciación de *Leishmania* a estas formas altamente adaptadas. Sin embargo, se sabe que los Tripanosomatide son caracterizados por la presencia de un citoesqueleto el cual es responsable, en parásitos como *Leishmania*, de mantener y modular su forma a través de todo el ciclo celular. Así por ejemplo, Fong & Chang (1981) demostraron en estudios *in vitro* con *Leishmania mexicana* que el parásito en la forma promastigote sintetiza más tubulina que en la forma amastigote, encontrando que este cambio en la biosíntesis de tubulina está asociado con las modificaciones morfológicas de los microtubulos en el flagelo del parásito y el citoesqueleto durante su transformación de la forma promastigote a amastigote, lo que indica que parte de los mecanismos adoptados por el parásito para sobrevivir a los diferentes ambientes están asociados con la transcripción de genes que codifican para ciertas proteínas como la tubulina que se asocia con la estructura y conformación del citoesqueleto.

Estas alteraciones en la síntesis de tubulina que modifican el citoesqueleto del parásito cuando este pasa de promastigote a amastigote también sugieren, al considerar la célula como un material continuo, que su densidad y elasticidad pueden cambiar durante su ciclo de vida, ya que, según Rodríguez *et al.* (2013) el comportamiento mecánico de una célula está determinado por el conjunto de su membrana celular, núcleo y citoesqueleto. Esto se debe a que la membrana celular, además de ser barrera entre el interior y exterior de la célula, contiene proteínas que permiten la interacción entre citoesqueleto y ambiente extracelular. El núcleo, por otro lado, aparte de cumplir su papel fundamental en la regulación de la expresión génica aporta cierto grado de rigidez estructural que afecta la mecánica de la célula y su mecanotransducción. Por último, el citoesqueleto interactúa con la membrana celular y el núcleo por ser una red intrincada de proteínas la cual se extiende a través de todo el citoplasma (Alberts *et al.* , 2014).

Así las funciones del citoesqueleto son: (i) mantener la forma de la célula, (ii) organizar organelos, (iii) servir como camino molecular de proteínas conectando diferentes regiones de una célula, y (iv) actuar como estructura dinámica que resiste, transmite y genera fuerzas mecánicas (Rodríguez *et al.* , 2013). Sus propiedades se encuentran determinadas por las características físicas y químicas de los tres grupos de filamentos que lo conforman: intermedios, microtúbulos y microfilamentos de actina. Los filamentos intermedios son los de menor rigidez, característica que los hace capaces de resistir mejor fuerzas de tensión (Fletcher & Mullins, 2010). Estos filamentos proveen a la célula su integridad, organización y tienen



como función principal dar resistencia cuando la células es sometida a tensión mecánica. Un filamento intermedio es como una cuerda en la que muchas hebras largas son trenzadas entre sí para proporcionar resistencia a la tensión y donde cada hebra tiene un diámetro aproximado de  $10nm$  y longitud de cientos de nanómetros (Alberts *et al.* , 2014). Los microtúbulos, en contraste, son estructuras huecas más rígidas conformadas por capas alternas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, que emergen de una estructura central ubicada cerca de núcleo llamada centrosoma con diámetro alrededor de  $24nm$  y longitud del orden de milímetros. Una de las características más importantes de los microtúbulos es la dinámica de su estructura, que les permite desensamblarse rápidamente en un lugar del citosol y rearmarse en otro. Estos filamentos cumplen dos funciones básicas (Alberts *et al.* , 2014):

1. Crear un sistema de vías dentro de la célula que permite el transporte y posicionamiento de vesículas, organelos y macromoléculas en su interior.
2. Formar estructuras estables como los flagelos, que se extienden desde la superficie de la célula y que dan movilidad, para nadar en un medio líquido.

Por otro lado, los microfilamentos de actina son esenciales para movimiento celular, en especial aquel que involucra el arrastre de la célula sobre una superficie y, además, están asociados con los cambios de forma que experimenta la célula durante el proceso de fagocitosis. Un microfilamento de actina se compone por monómeros de actina, G-actina, los cuales forman una cadena trenzada de  $7nm$  de diámetro que es más delgada, flexible y corta que un microtúbulo. Los microfilamentos de actina interactúan con diferentes proteínas de unión para formar estructuras más rígidas y estables que tienen distintas funciones (Alberts *et al.* , 2014).

Entonces, si el parásito cambia la conformación de su citoesqueleto al adaptarse a los diferentes ambientes, situación que se refleja en la pérdida del flagelo, Figura 3-13b, se tiene, según la relación entre membrana celular, núcleo y citoesqueleto descrita en los párrafos anteriores, que cualquier cambio físico o químico en las proteínas de alguno de estos elementos o en las partes que los componen, pueden alterar sus características mecánicas macroscópicas como su volumen, densidad y elasticidad.

Teniendo en cuenta que los parásitos de *Leishmania* son capaces de adaptarse a ambientes tan diferentes durante su ciclo de vida, el grupo de Biofísica y Biología de membranas de la Universidad Nacional de Colombia se ha interesado en los últimos años en comprender los mecanismos mediante los cuales *Leishmania* logra sobrevivir a estos cambios de temperatura, pH y osmolaridad. Es así, como ha centrado su atención en estudiar cuatro genes reportados en el genoma de *L. braziliensis* *LbrM01 V2.0210 (LbCLC-A)*, *LbrM04 V2.1010 (LbCLC-D)*, *LbrM32 V2.3670 (LbCLC-B)* y *LbrM33 V2.1260 (LbCLC-C)* que al ser transcritos por promastigotes y amastigotes de *Leishmania* codifican como proteínas CLC, las cuales, según lo encontrado por el grupo, pueden estar asociadas con la adaptación del parásito a los cambios



de  $pH$  y osmoloridad durante el ciclo de vida (Camacho & Lozano, 2015).

Esta hipótesis llevó a clonar los genes *LbCLC-A*, *LbCLC-B* y *LbCLC-C* para hacer su caracterización funcional (Lozano, 2012; Parada, 2014; Quintero, 2014). Encontrando que *LbCLC-A* es voltaje dependiente y su corriente pico no se altera con cambios de  $pH$  (García, 2016), además, se identificó que la disminución de la proteína *LbCLC-A* por silenciamiento de su mRNA (cepa E1), se traduce en promastigotes de mayor volumen, con menor tasa de crecimiento, capaces de infectar macrófagos pero incapaces de diferenciarse a amastigotes una vez se encuentran dentro de la vacuola parasitófora (Zapata, 2016). Los cambios encontrados en esta cepa silenciada indican alteraciones de las propiedades físicas del parásito como su volumen. Por otro lado, García (2016) en la caracterización de *LbCLC-B* estableció que la voltaje dependencia de esta proteína es óptima a  $pH$  ácido y encontró para dos cepas: C1 y C3, luego de un procedimiento de silenciamiento similar al realizado para *LbCLC-A*, menor regulación de volumen en promastigotes ante retos hipoosmóticos.

Estas modificaciones morfológicas reportadas en parásitos de *Leishmania* al silenciar los genes de interés sugieren que además de estos efectos pueden existir otros relacionados a variaciones en las propiedades físicas macroscópicas asociadas al parásito tales como su densidad o elasticidad, conclusión a la que se llega puesto que Zapata (2016) y García (2016) asociaron el efecto en la morfología de las cepas E1, C1 y C3 con una posible interferencia de la proteína  $\alpha$  - *tubulina* generada por los constructos diseñados, interferencia que también parece presentarse en la cepa control del silenciamiento (cepa pSP). Esto implica, al tener reducción de  $\alpha$  - *tubulina* en las cepas silenciadas, que los microtúbulos en el citoesqueleto de *Leishmania* pueden ser afectados lo que supone alteraciones en elasticidad y densidad de los parásitos.

Dado lo anterior a continuación se presentan los resultados obtenidos de la caracterización física, hecha a las cepas clonadas E1, C1, C3, pSP y silvestre (WT), con la que se buscó establecer si existen cambios en la elasticidad y densidad de los parásitos lo que confirma si el silenciamiento de los genes estudiados por el grupo tiene algún efecto en la producción de  $\alpha$  - *tubulina* y además, si estos cambios afectan el movimiento de estas células cuando son expuestas al campo acústico en el interior del dispositivo 2 situación que puede evidenciarse estudiando su trayectoria bajo la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  mediante el modelo físico desarrollado en el capítulo 2.

### 3.2.2. Cultivo *in vitro* Parásitos de *Leishmania*

En la medición de las propiedades físicas se usaron parásitos de *L. tropica* silvestres (WT T.; HOM/BR/75/M2903) adquiridos en el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM, Cali, Colombia), de las cepas de *L. tropica* con silenciamiento de

los genes *LbCLC-A* y *LbCLC-B*, E1 (Zapata, 2016), C1 y C3 (Garcia, 2016), de *Leishmania mexicana* usada como cepa control de transfección (pSP) (Garcia, 2016; Zapata, 2016) y de *L. braziliensis* silvestres (WT B.). Los parásitos de las diferentes cepas se cultivaron en RPMI<sup>1</sup> o en medio Schneider<sup>2</sup> suplementado con 5 – 10 % de suero fetal bovino (SFB; Biowest<sup>3</sup>) a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  en frascos de  $25\text{cm}^2$  (TPP<sup>4</sup>). Así mismo, se generaron y cultivaron amastigotes axénicos de todas las cepas a partir de  $1 \times 10^8$  promastigotes a  $35^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}$  5 en RPMI + 10 % SFB en frascos de  $25\text{cm}^2$ . En la figura 3-13 se presentan imágenes de uno de los cultivos *in vitro* de la cepa WT usados en la caracterización física, se observa las formas promastigote, Figura 3-13a, y amastigote axénico, Figura 3-13b, que se obtienen luego de usar la metodología descrita.

### 3.2.3. Forma y Tamaño de los Parásitos

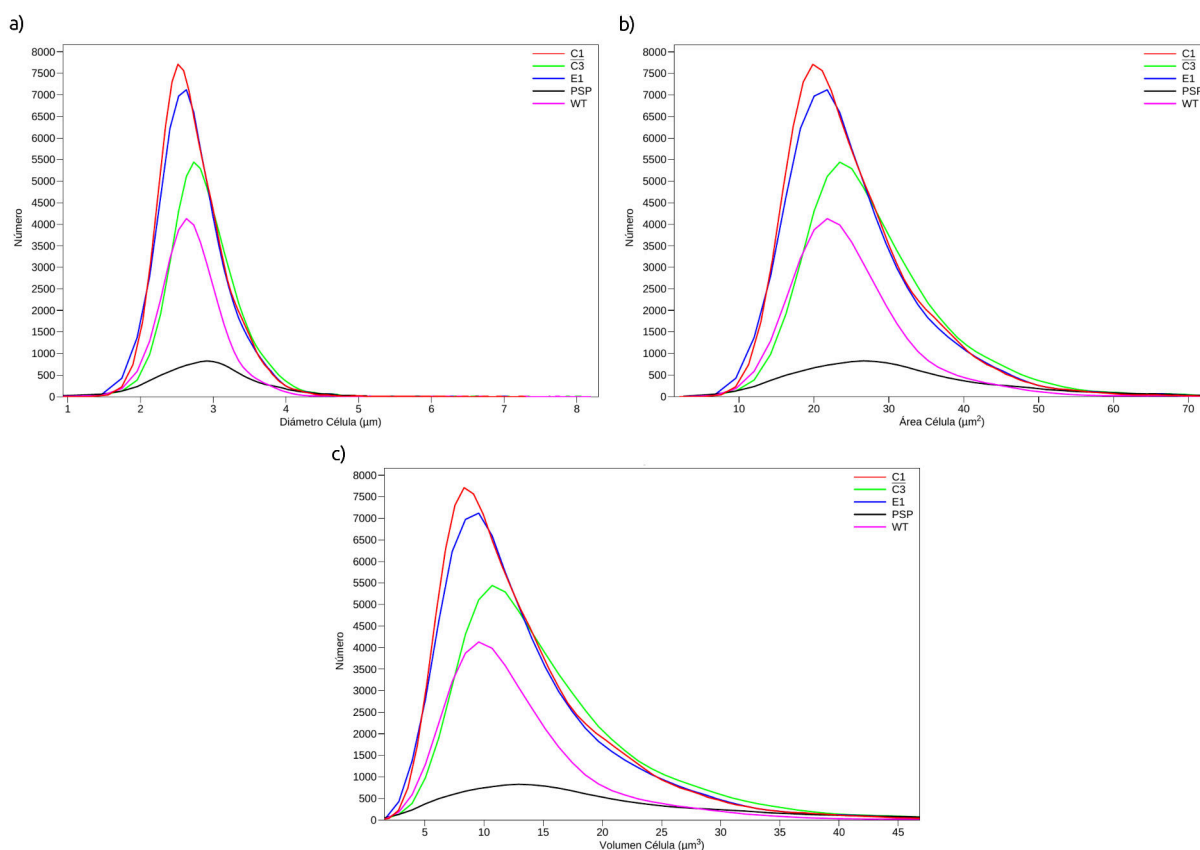


Figura 3-14.: Medición de diámetro, área, volumen en promastigotes de cepas de *Leishmania* con un Coulter Beckman Z2. a) Diámetro, b) Área y c) Volumen.

<sup>1</sup> 23400021, Invitrogen, Life Technologies

<sup>2</sup> Life Technologies

<sup>3</sup> S1810, Biowest, Kansas City, MO

<sup>4</sup> Z707481, Techno Plastic Products AG (TPP), Trasadingen, Suiza

Para determinar el área, volumen y diámetro de parásitos de las cepas C1, C3, pSP, E1, WT T. y WT B. inicialmente se usó un contador Coulter Beckman Z2 calibrado para una apertura de  $50\mu\text{m}$  con perlas de látex de  $3\mu\text{m}$ , Apéndice D. Las muestras fueron preparadas diluyendo  $200\mu\text{l}$  de parásitos en  $5\text{ml}$  de PBS 1X a temperatura ambiente y  $\text{pH} = 7,2$ . Luego usando el contador de partículas Coulter se tomaron  $0,1\text{ml}$  de muestra obteniendo registros en el rango de  $2\mu\text{m}$  a  $8\mu\text{m}$  como los presentados en las Figuras 3-14 y 3-15.

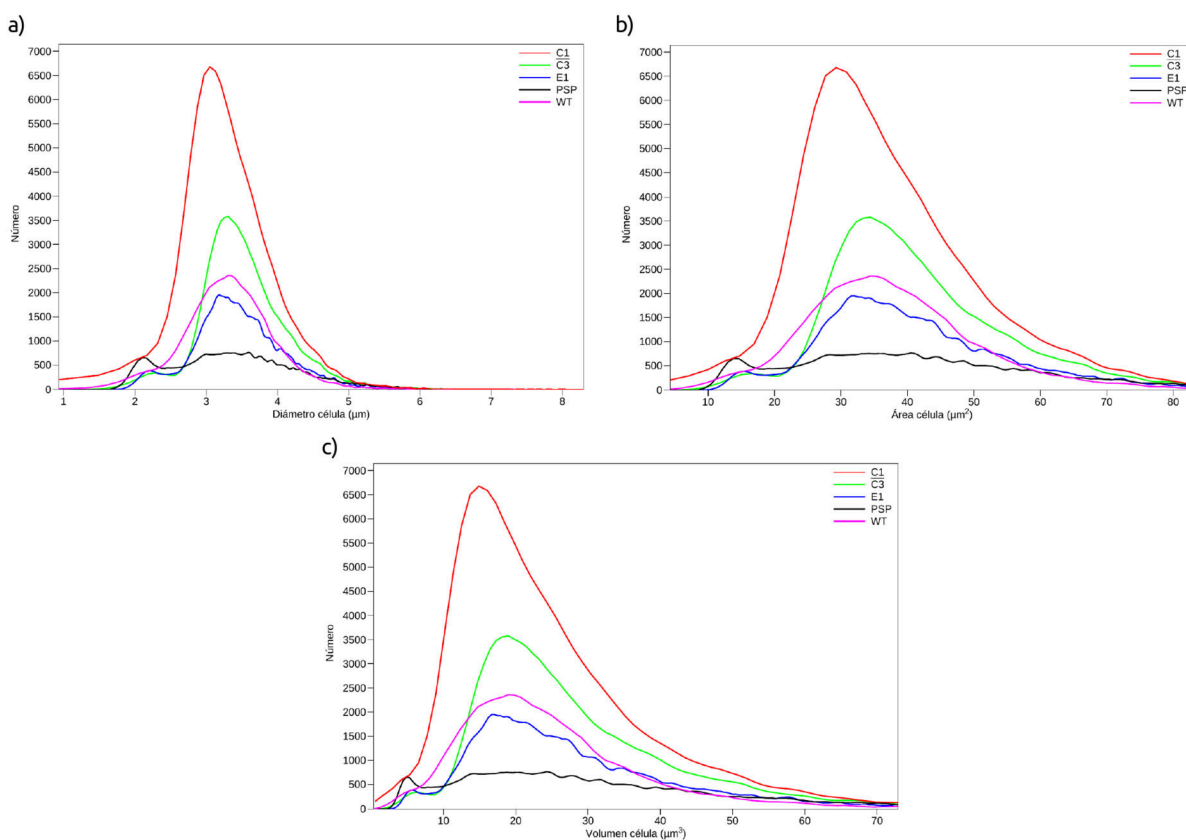


Figura 3-15.: Medición de diámetro, área, volumen de amastigotes de cepas de *Leishmania* con un Coulter Beckman Z2. a) Diámetro, b) Área y c) Volumen.

Mediciones que se hicieron en diferentes experimentos usando promastigotes, Figura 3-16, y amastigotes, Figura 3-17, respectivamente, con lo que se determinó los valores que se presentan en los Cuadros 3-9 y 3-10. Aunque en las figuras descritas no se presentan los registros con *L. braziliensis* WT para estos parásitos se hizo el mismo procedimiento, encontrando con el Coulter curvas similares a las presentadas con las otras cepas, las cuales permitieron establecer los datos presentados en los cuadros.

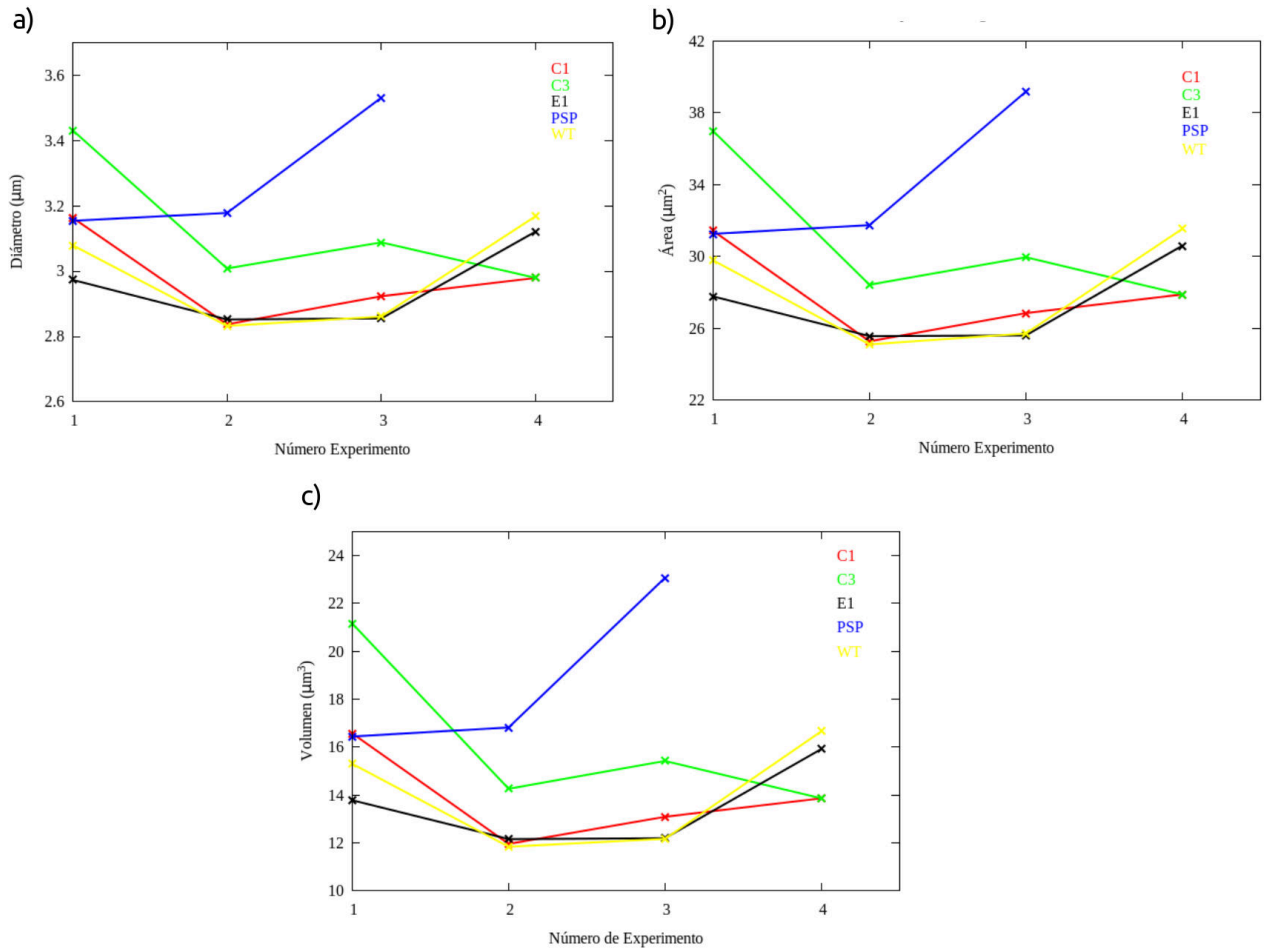


Figura 3-16.: Gráfica de a) diámetro, b) área y c) volumen en función del número de experimentos para promastigotes de *Leishmania*.

Cepa	Diámetro ( $\mu m$ )	SD ( $\mu m$ )	Área ( $\mu m^2$ )	SD ( $\mu m^2$ )	Volumen ( $\mu m^3$ )	SD ( $\mu m^3$ )
C1	$2,988 \pm 0,005$	1,173	$27,86 \pm 0,09$	1,376	$13,87 \pm 0,07$	1,614
C3	$3,171 \pm 0,005$	1,184	$31,67 \pm 0,10$	1,403	$16,83 \pm 0,08$	1,664
E1	$2,950 \pm 0,005$	1,202	$27,39 \pm 0,09$	1,446	$13,52 \pm 0,07$	1,742
pSP	$3,288 \pm 0,005$	1,261	$34,06 \pm 0,10$	1,591	$18,78 \pm 0,08$	2,008
WT T.	$2,985 \pm 0,005$	1,174	$28,04 \pm 0,09$	1,380	$13,99 \pm 0,07$	1,622
WT B.	$3,284 \pm 0,005$	1,175	$33,88 \pm 0,10$	1,381	$18,54 \pm 0,08$	1,622

Cuadro 3-9.: Datos obtenidos con el Coulter para promastigotes de *Leishmania*.

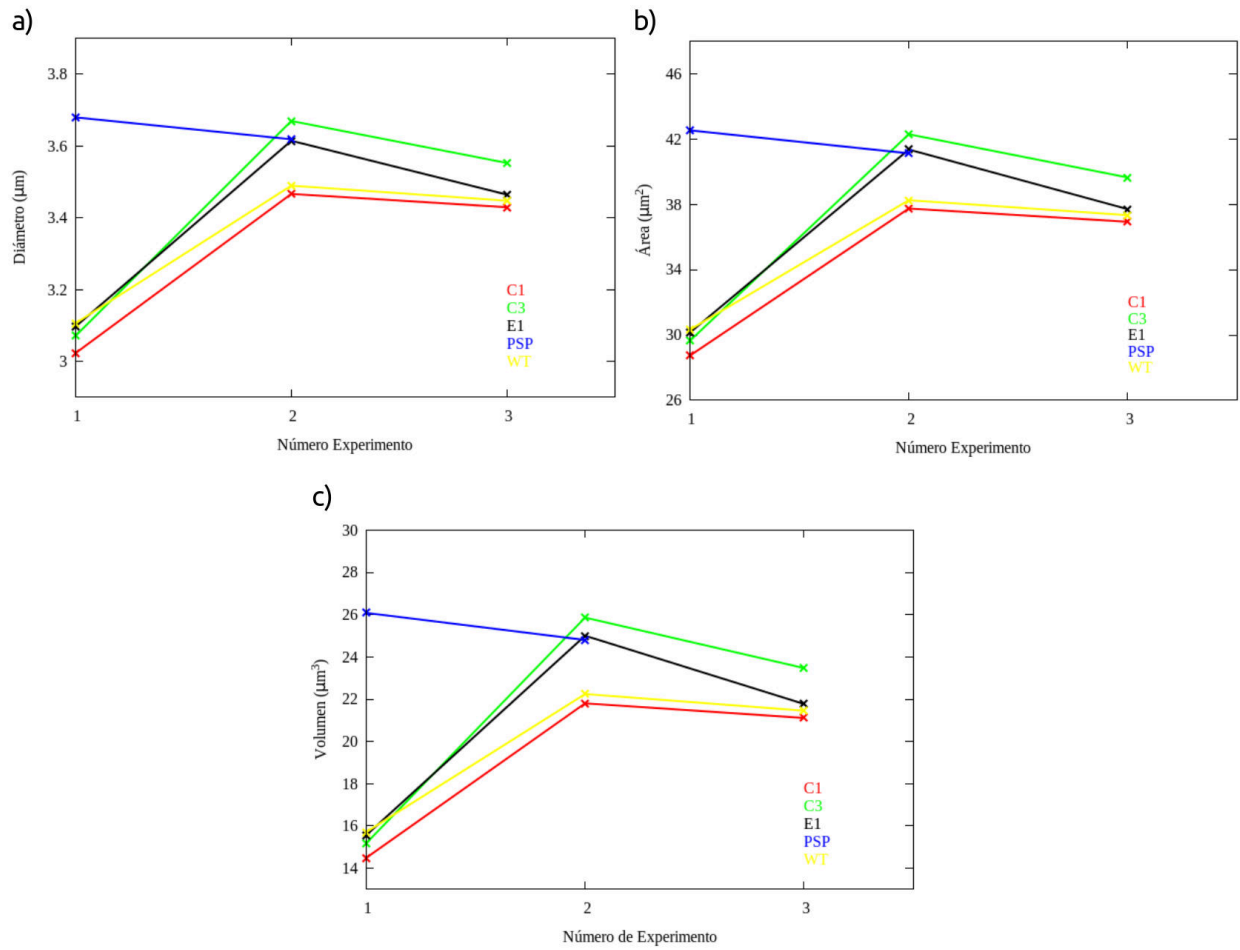


Figura 3-17.: Gráfica de a) diámetro, b) área y c) volumen en función del número de experimentos para amastigotes de *Leishmania*.

Cepa	Diámetro ( $\mu m$ )	SD ( $\mu m$ )	Área ( $\mu m^2$ )	SD ( $\mu m^2$ )	Volumen ( $\mu m^3$ )	SD ( $\mu m^3$ )
C1	$3,306 \pm 0,005$	1,231	$34,47 \pm 0,10$	1,515	$19,13 \pm 0,08$	1,869
C3	$3,431 \pm 0,005$	1,222	$37,19 \pm 0,11$	1,497	$21,50 \pm 0,09$	1,835
E1	$3,392 \pm 0,005$	1,235	$36,40 \pm 0,11$	1,527	$20,78 \pm 0,09$	1,890
pSP	$3,648 \pm 0,005$	1,274	$41,82 \pm 0,11$	1,623	$25,44 \pm 0,10$	2,067
WT T.	$3,347 \pm 0,005$	1,195	$35,30 \pm 0,10$	1,429	$19,80 \pm 0,09$	1,709
WT B.	$3,426 \pm 0,005$	1,222	$36,87 \pm 0,11$	1,494	$21,05 \pm 0,09$	1,825

Cuadro 3-10.: Datos obtenidos con el Coulter para amastigotes de *Leishmania*.

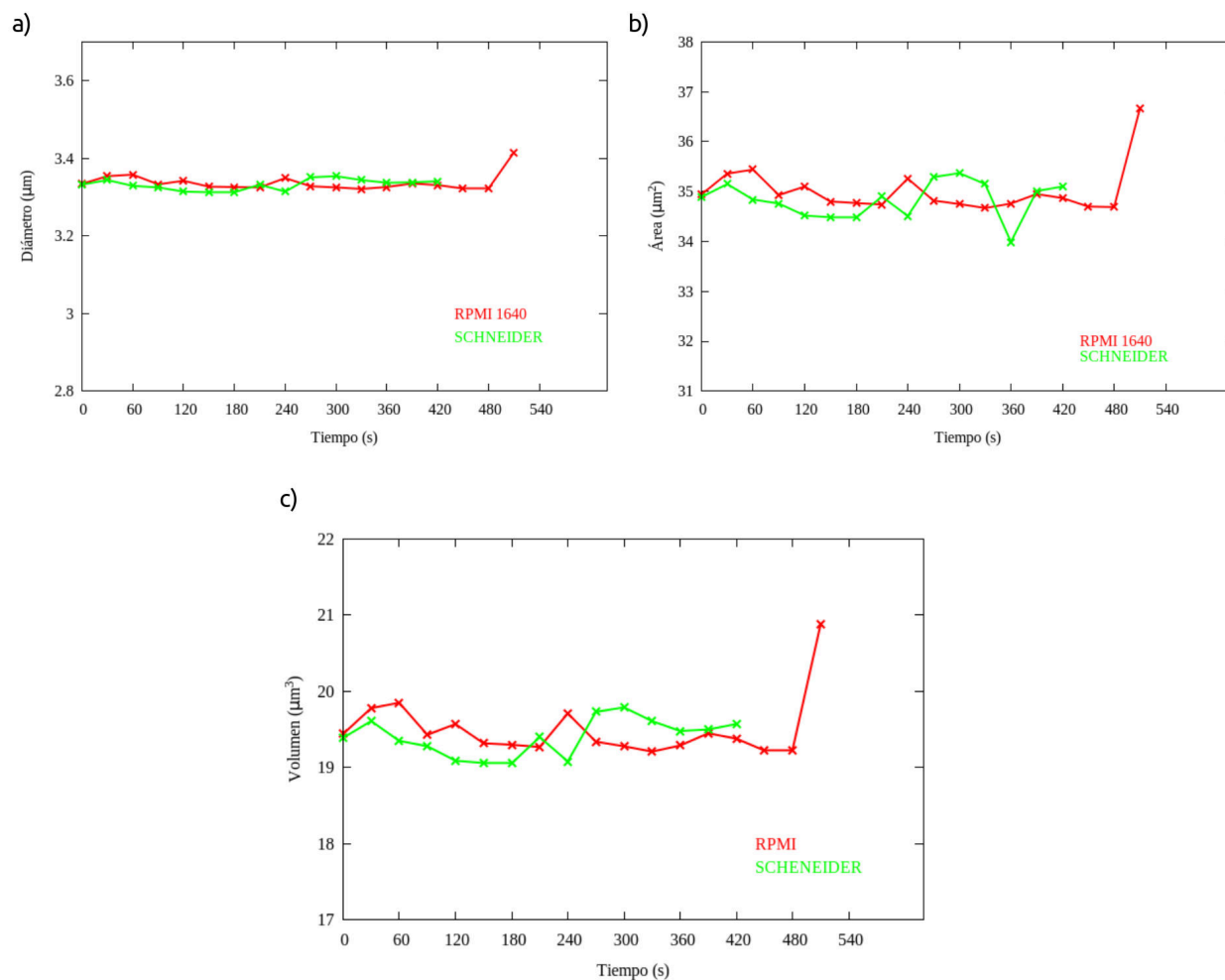


Figura 3-18.: Efecto del medio de cultivo en a) diámetro, b) área y c) volumen de los promastigotes de *Leishmania*.

Además, de lo ya mencionado y teniendo presente que los cultivos se hicieron usando dos medios de cultivo diferentes se estudio el efecto de estos medios en el tamaño de los promastigotes, para ello se tomaron medidias de tamaño en el tiempo de la cepa WT T., encontrando, Figura 3-18, que el medio no genera un efecto significativo en el tamaño de los parásitos. Posteriormente para definir la forma de los parásitos y verificar las mediciones hechas con el Coulter se tomaron registros en imagen mediante un microscopio invertido marca Zeiss, usando un objetivo de 40X, de las diferentes cepas usadas, Figuras 3-19 a 3-24.

Con lo que se halló al comparar las medidias del Coulter, Cuadros 3-9 y 3-10, con las mediciones obtenidas de las imágenes, Figuras 3-19 a 3-24, que la estimación de área y volumen de los promastigotes de *Leishmania* dada con el Coulter presenta un error significativo, puesto que, para calcular estas cantidades el aparato asume que la forma de estas poblaciones es esférica, estimando su área y volumen a partir del ancho medido del parásito sin considerar

su largo y el flagelo. Por lo tanto, para dar una mejor estimación del volumen de los parásitos se usó las medidas de su ancho y largo con el propósito de calcular nuevamente su volumen teniendo en cuenta que la forma de los promastigotes es casi cilíndrica al no considerar su flagelo, Cuadro **3-11**. Entonces, el volumen para estos parásitos está dado por la relación

$$V_{pa} = \left( \frac{\pi D^2}{4} \right) l \quad (3-35)$$

Donde  $D$  es el diámetro medido con el Coulter y  $l$  el largo determinado a partir de las imágenes tomadas con microscopia de luz. Luego de esto, se emplea el  $V_{pa}$  para calcular un diámetro como si los promastigotes fueran de forma esférica con el propósito de simular, usando el modelo físico presentado en el capítulo 2 construido para esferas, el movimiento de esferas con volumen similar al de los promastigotes, situación que no se presenta con los amastigotes ya que en este caso los parásitos al experimentar el cambio de  $pH$  y temperatura del medio toman una forma casi esférica como se evidencia en las figuras **3-19b**, **3-20b**, **3-21b**, **3-22b**, **3-23b** y **3-24b**.

El hecho de que el volumen de los parásitos no puede estar asociado con objetos de diámetros  $< 3\mu m$ , se ratifica con los resultados experimentales presentados en la última sección de este capítulo, debido a que poblaciones de este tamaño al ser expuestas al campo acústico de una onda estacionaria no presentan un movimiento de conducción hacia los nodos si no que son arrastradas por flujos circulares generados en el líquido por la energía transmitida de la onda sonora a este, efecto conocido como *acoustic streaming* (Laurell & Lenshof, 2015), fenómeno que no se observa al exponer promastigotes y amastigotes de las diferentes cepas al campo acústico.

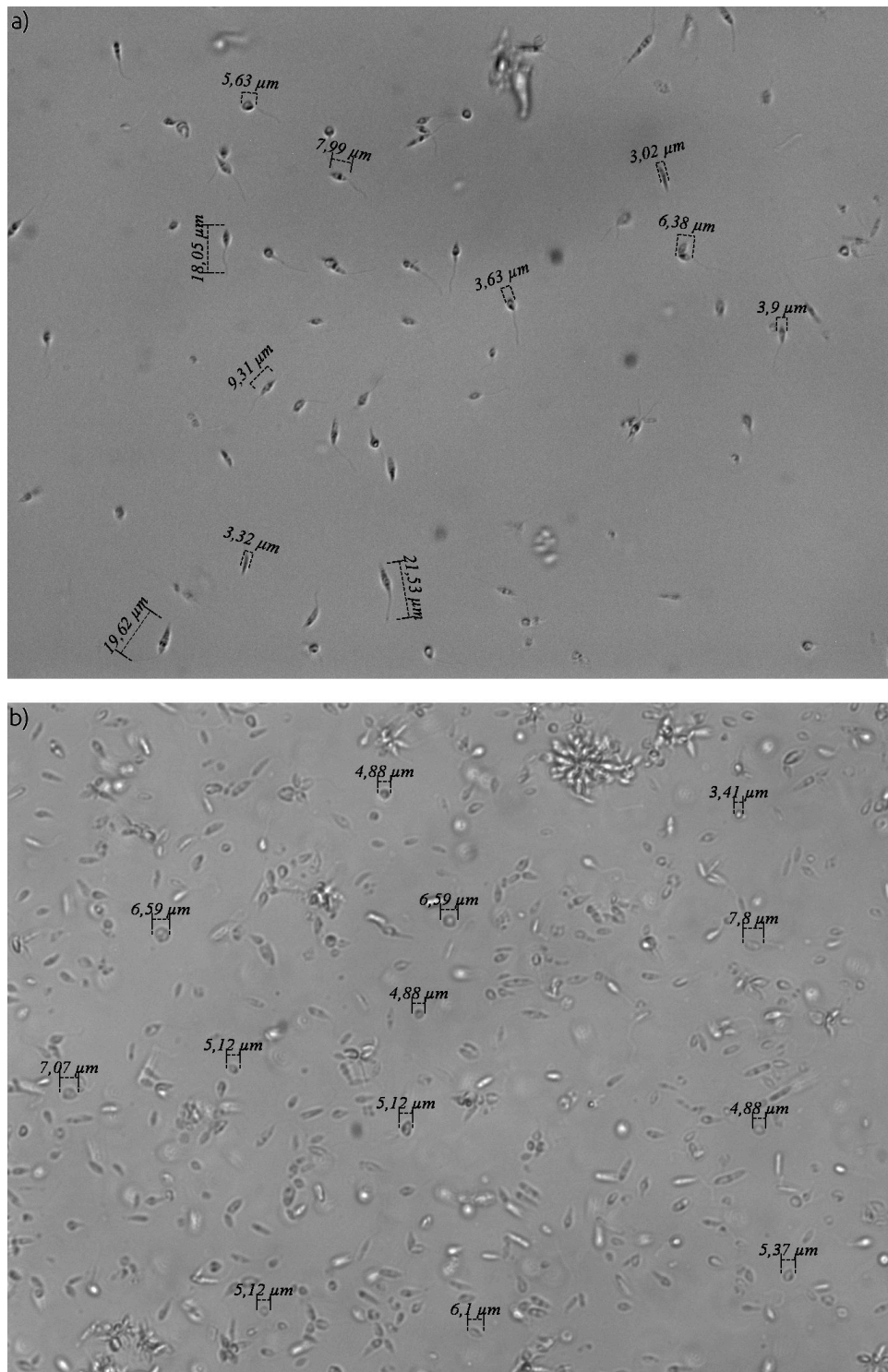


Figura 3-19.: Forma de los parásitos en cultivos *in vitro* de la cepa C1 a) promastigotes y b) amastigotes axénicos.



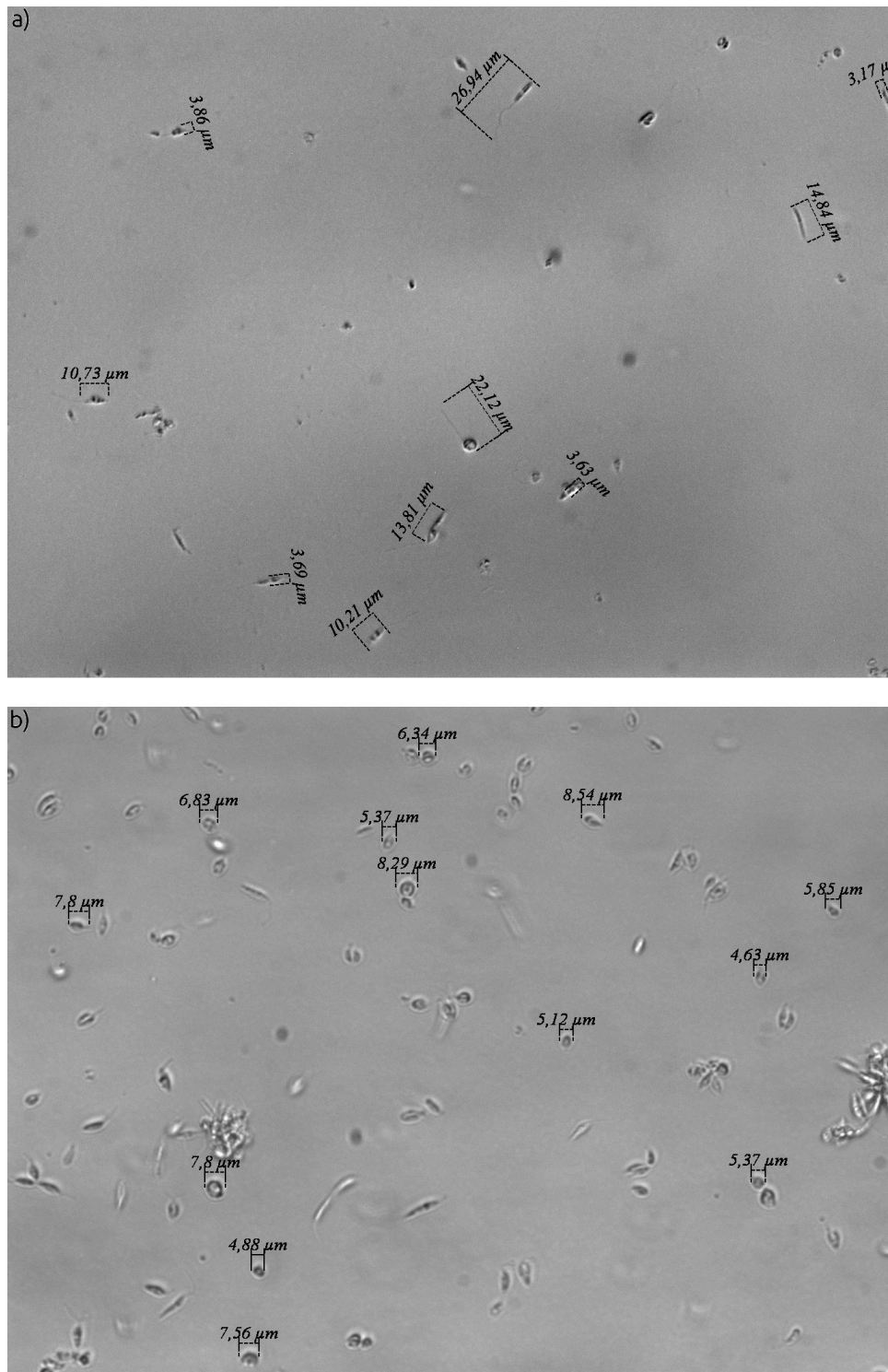


Figura 3-20.: Forma de los parásitos en cultivos *in vitro* de la cepa C3 a) promastigotes y b) amastigotes axénicos.

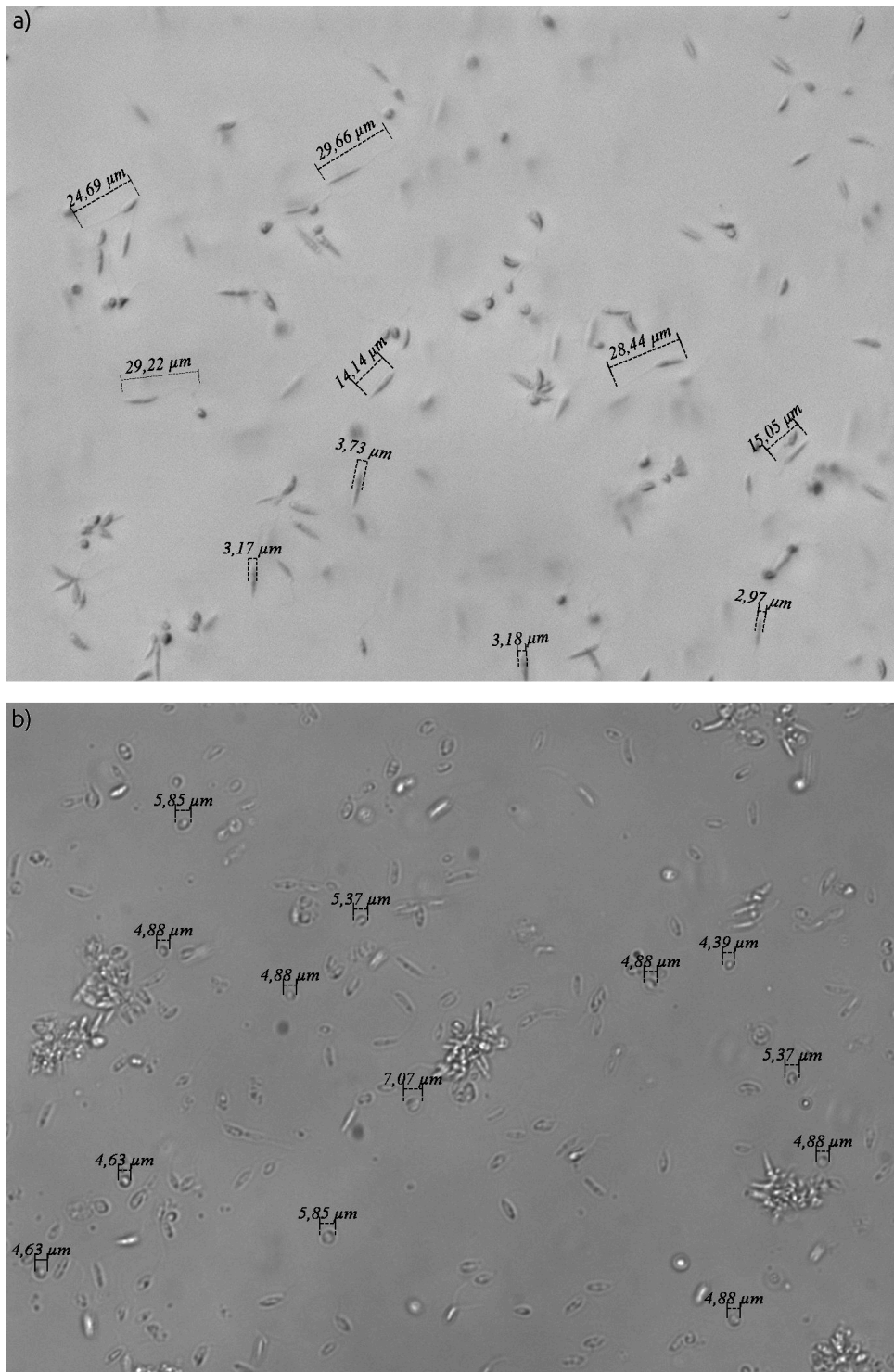


Figura 3-21.: Forma de los parásitos en cultivos *in vitro* de la cepa E1 a) promastigotes y b) amastigotes axénicos.

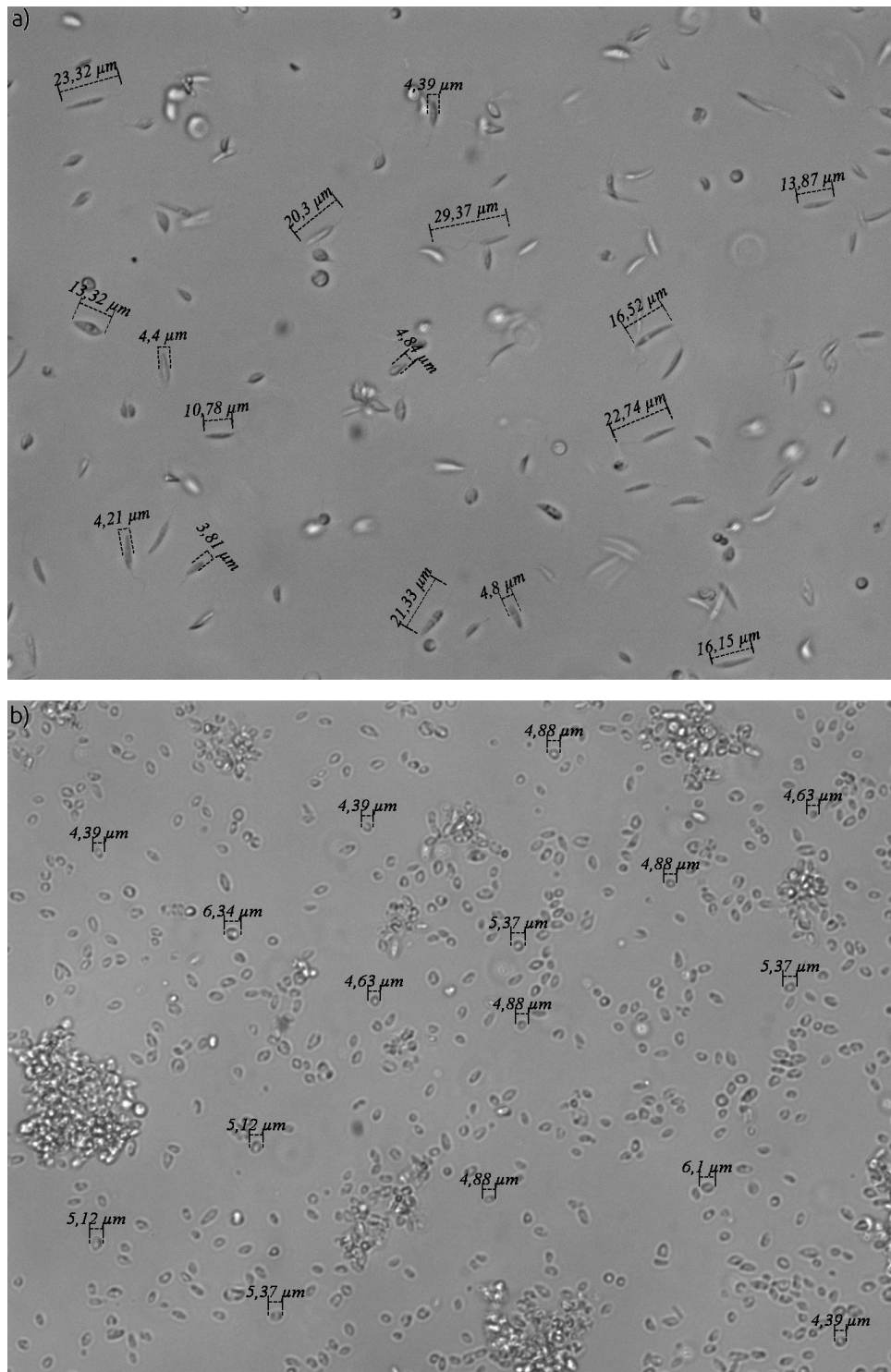


Figura 3-22.: Forma de los parásitos en cultivos *in vitro* de la cepa pSP a) promastigotes y b) amastigotes axénicos.

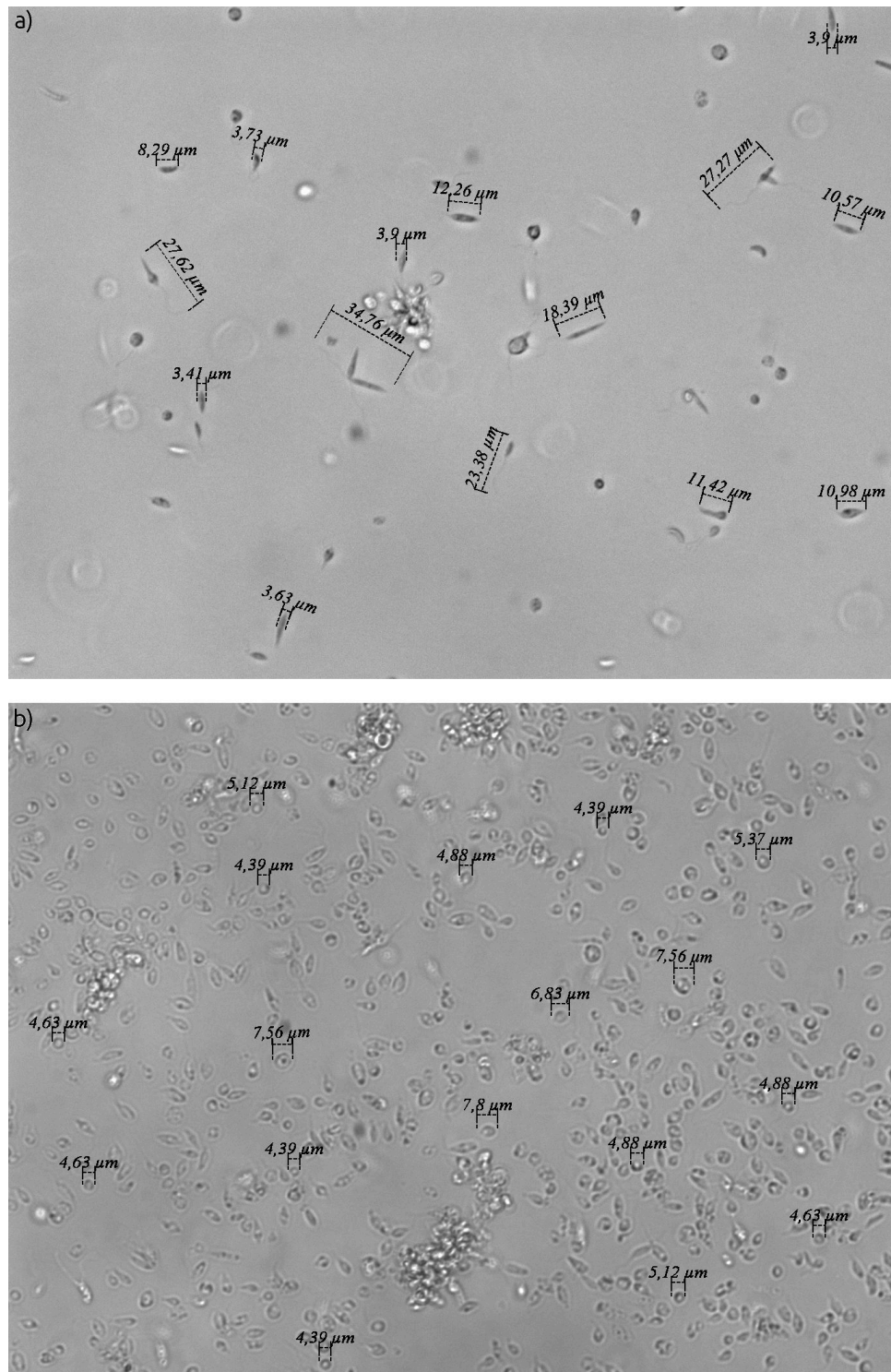


Figura 3-23.: Forma de los parásitos en cultivos *in vitro* de la cepa WT T. a) promastigotes y b) amastigotes axénicos.

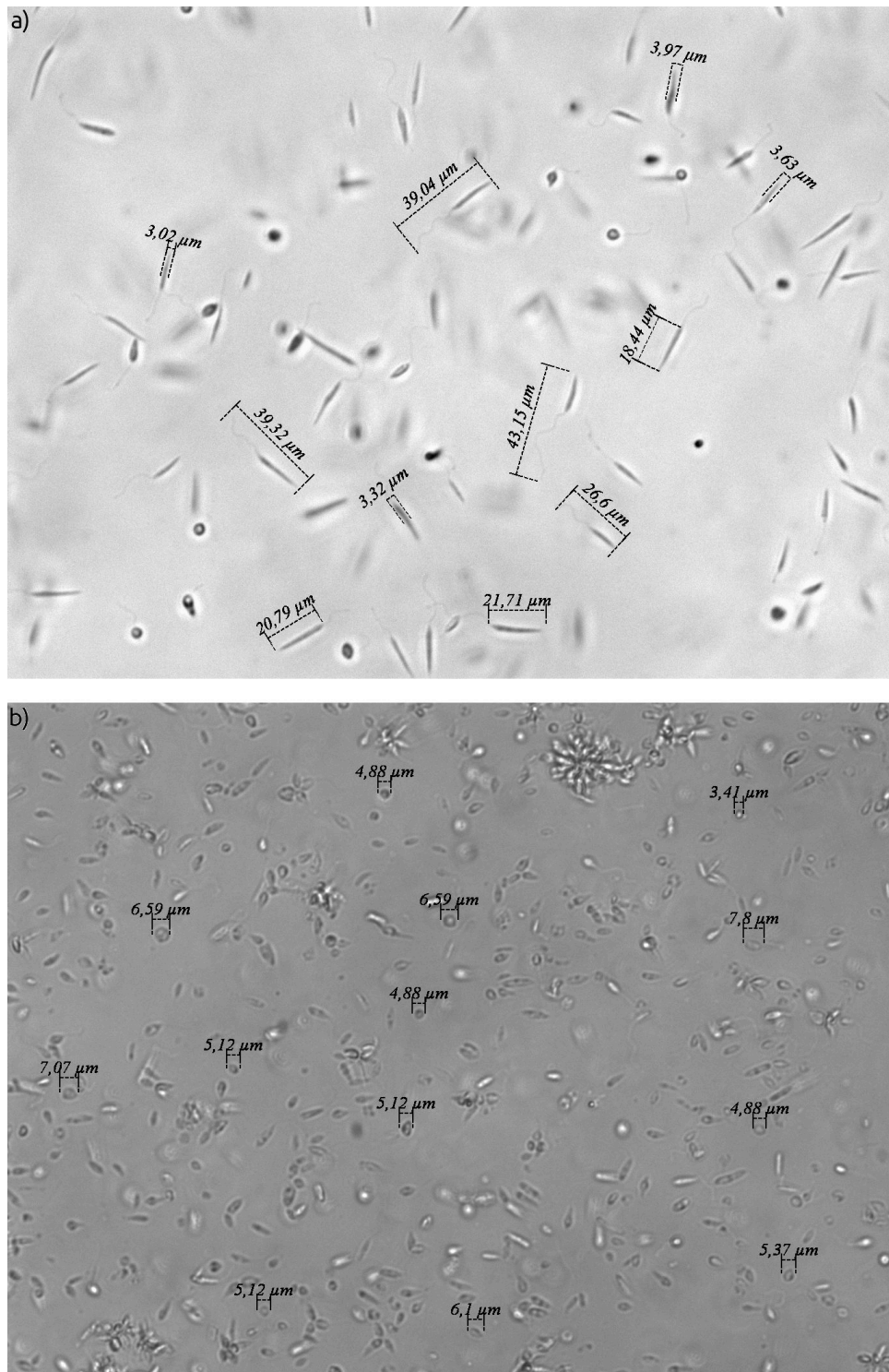


Figura 3-24.: Forma de los parásitos en cultivos *in vitro* de la cepa WT B. a) promastigotes y b) amastigotes axénicos.



Cepa	Diámetro Transversal ( $\mu m$ )	Largo ( $\mu m$ )	SD ( $\mu m$ )	$V_p(\mu m^3)$	Diámetro Esfera ( $\mu m$ )
C1	$2,988 \pm 0,005$	$10,15 \pm 0,05$	2,153	$71,19 \pm 0,59$	5,142
C3	$3,171 \pm 0,005$	$12,15 \pm 0,05$	2,263	$95,92 \pm 0,69$	5,679
E1	$2,950 \pm 0,005$	$14,47 \pm 0,05$	1,735	$98,93 \pm 0,68$	5,738
pSP	$3,288 \pm 0,005$	$14,23 \pm 0,05$	1,432	$120,82 \pm 0,79$	6,134
WT T.	$2,985 \pm 0,005$	$13,24 \pm 0,05$	2,191	$92,65 \pm 0,66$	5,540
WT B.	$3,284 \pm 0,005$	$18,82 \pm 0,05$	3,237	$159,40 \pm 0,90$	6,727

Cuadro 3-11.: Volumen estimado de promastigotes en las diferentes cepas de *Leishmania*. El largo fue medido en 50 individuos de cada cepa.

Los resultados presentados en el Cuadro 3-11, tienen correlación con los medidos por Zapata (2016) en la morfometría hecha a promastigotes de las cepas pSP y WT T. evidenciando que estas dos cepas son las de mayor tamaño y volumen situación que se explica teniendo en cuenta que son especies de *Leishmania* diferentes. Sin embargo, respecto a la cepa E1 se presentan diferencias significativas, según lo encontrado por Zapata (2016), ya que se determino, Cuadro 3-11, un cuerpo del promastigote mayor de aproximadamente de  $14,474\mu m$  y un diámetro transversal menor de  $2,950\mu m$ , lo que se traduce en poco cambio de volumen del parásito respecto a la cepa WT T. (control). Por otro lado, la cepa C3 no presenta una diferencia de volumen con la cepa control aunque se nota cambio en su diámetro transversal y largo, pero estos cambios son compensados, puesto que, un aumento del diámetro implica una disminución del largo lo que mantiene el volumen del parásito constante. Por último, se debe resaltar que la cepa C1 es la de menor tamaño, presentando una disminución considerable de su volumen respecto al control, observación que esta de acuerdo con lo reportado por Garcia (2016) en su estudio funcional del gen *LbCLC-B*.

### 3.2.4. Densidad

La densidad de los parásitos fue determinada a partir de una técnica conocida como gradientes de densidad en la que se usa un coloide, en este caso Percoll<sup>5</sup>, para determinar por centrifugación el punto isopícnico<sup>6</sup> de las células. Esta consiste en construir gradientes al utilizar soluciones con diferentes densidades (densidad deseada  $\rho_{des}$ ), las cuales se obtienen

<sup>5</sup> Coloide polidisperso compuesto de partículas de sílice con tamaños que oscilan entre 15 a 30nm. Su densidad es de  $1,130 \pm 0,005 \frac{g}{ml}$  y su pH a temperatura de 20°C es  $9,0 \pm 0,5$  (Amersham, 2007).

<sup>6</sup> Posición de equilibrio alcanzada por una célula cuando su densidad es igual a la densidad de la capa en el gradiente.

al mezclar dos sustancias de densidad conocida, en este caso medio de cultivo celular o NaCl 0,15M,  $\rho_{med}$ , y solución isotónica de Percoll (SIP)<sup>7</sup>,  $\rho_{SIP}$ , que tienen dos porcentajes de volumen diferentes  $V_{med}$  y  $V_{SIP}$ , respectivamente, los cuales han sido especificados para un volumen de solución final,  $V_{total}$ , establecido con anterioridad. Es decir, que para una solución final con un volumen total  $V_{total}$  y densidad deseada se encuentran el  $V_{med}$  y  $V_{SIP}$  que se deben usar para obtener la solución final con  $\rho_{des}$  teniendo en cuenta las relaciones

$$V_{med} = V_{total} \left( \frac{\rho_{SIP} - \rho_{des}}{\rho_{SIP} - \rho_{med}} \right) \quad (3-36)$$

$$V_{SIP} = V_{total} - V_{med} \quad (3-37)$$

Para estandarizar la técnica se hicieron medidas usando diferentes poblaciones celulares tales como células de Schwann (Vargas, 2013), células del sistema inmune, macrófagos, (Camacho *et al.*, 2014) así como macrófagos infectados con *Leishmania* y vacuolas parasitoforas (Navarrete, 2013), en particular, en la descripción de la técnica que se hará a continuación se presentan los resultados encontrados al medir la densidad de amastigotes exénicos de *Leishmania amazonensis*, el propósito de esto es ilustrar el procedimiento seguido para medir la densidad de las distintas cepas de *Leishmania*.

Entonces, dadas la expresiones (3-36) y (3-37) se calcula el volumen de medio  $V_{med}$  y  $V_{SIP}$  para un  $V_{total} = 4ml$  con la intención de obtener soluciones de densidades iguales a las que se presentan en el Cuadro 3-12, las cuales están en el rango de las reportadas en poblaciones celulares (Hartono *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018), satisfaciendo de esta manera la relación lineal entre densidad y elasticidad celular, ecuaciones (3-33) y (3-34).

Al tener listas las soluciones con diferentes densidades, se toman  $150 \pm 0,125\mu l$ <sup>8</sup> de cada una y se sirven por capas, depositando las soluciones de menor a mayor densidad, en tubos eppendorff de 2ml, construyendo en ellos gradientes iguales con las densidades deseadas. Después, en la última capa, se deposita  $150 \pm \mu l$  de cultivo celular o  $150 \pm 0,125\mu l$  de una mezcla de perlas marcadoras de densidad, Density Marker Bead, kit DMB -10 Sigma o kit Cospheric, Figura 3-25a, se cierran los tubos y se introducen en la centrifuga donde se centrifugan a 500g (rotor de ángulo fijo) durante 30min, al terminar este tiempo los tubos son sacados y se miden las distancias de los agregados formados en su interior, por las células y perlas marcadoras, respecto a la parte inferior del tubo usando el programa Tracker 4.11.0, Figura 3-25b y Cuadro 3-13.

<sup>7</sup> La SIP fue hecha al adicionar 9 partes (V/V) de Percoll a 1 parte (V/V) de NaCl 1,5M, por lo que se obtiene una solución con densidad  $\rho_{SIP} = 1,123g/ml$ .

<sup>8</sup> El error del volumen se define teniendo presente que en la construcción de los gradientes se usaron pipetas de 200 $\mu l$  y 1000 $\mu l$ .





Capa	Densidad $\rho$ ( $g/ml$ )	Distancia $y$ ( $mm$ )
Verdes F.	1,025	$25,14 \pm 0,5$
Amarillas	1,035	$22,22 \pm 0,5$
Blancas #1	1,050	$19,79 \pm 0,5$
Blancas #2	1,050	$17,29 \pm 0,5$
Moradas	1,069	$15,32 \pm 0,5$
Naranja	1,088	$9,510 \pm 0,5$
Verdes Oscuras	1,097	$5,540 \pm 0,5$
Amastigotes	¿?	$14,07 \pm 0,5$

Cuadro 3-13.: Distancias medidas en los gradientes de Percoll con el programa Tracker, el cual se calibró asociando  $1mm$  como el tamaño del cuadro, Figura, línea azul.

Por último los datos de densidad de las perlas marcadoras y de distancia medida a cada agregado, se ubican como puntos en un plano para hacer un ajuste con los valores medidos, con lo que es posible, siendo este un ajuste lineal con un coeficiente de correlación  $R = -0,9878$ , Figura 3-26, determinar la densidad aproximada de las células al sustituir la distancia medida al agregado formado por estas en la ecuación (3-38), expresión que es obtenida del ajuste lineal.

$$\rho(y) = -0,0038y + 1,1215 \quad (3-38)$$

Donde la pendiente y el punto de corte en la recta (3-38) tienen unidades de  $g/ml \cdot mm$  y  $g/ml$  respectivamente, por lo tanto, la densidad  $\rho$  está en  $g/ml$  y la distancia  $y$  en milímetros, entonces, si  $y = 14,1 \pm 0,5mm$  para los amastigotes de *L. amazonensis*, Cuadro 3-13, se tiene que la densidad de estos parásitos es

$$\rho_A \approx 1,068 \pm 0,002g/ml \quad (3-39)$$

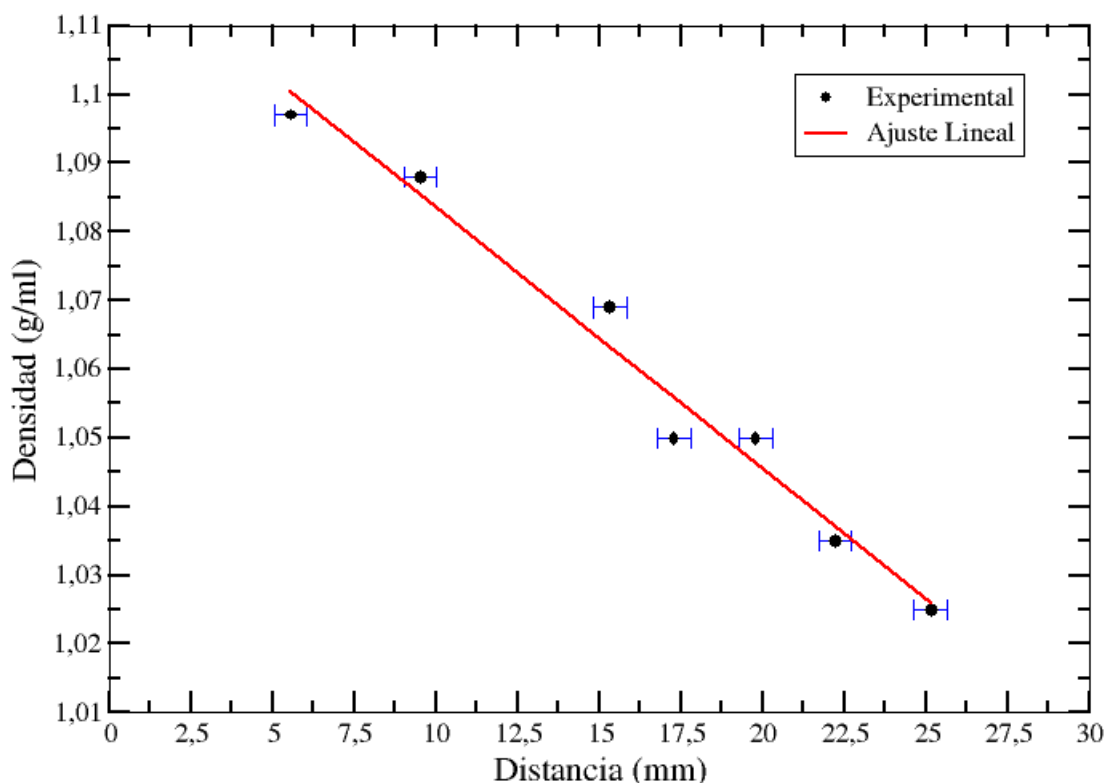


Figura 3-26.: Ajuste lineal de los datos presentados en la tabla 3-13.

Haciendo este mismo procedimiento se determinó la densidad de las diferentes cepas de *Leishmania*, esto se logró a partir de la expresión (3-40) que fue obtenida de los resultados encontrados con las partículas marcadoras de Sigma y Cospheric al hacer gradientes con las mismas condiciones, 3-27. Hallando con la regresión lineal en diferentes experimentos,  $n = 10^9$ , que la expresión en todos los casos es similar como se evidencia al comparar la ecuación (3-38) con las ecuaciones presentadas en la Figura 3-27, concordancia que permite establecer que la relación entre densidad  $\rho$  y posición vertical  $y$  de los agregados formados está dada por

$$\rho(y) = -0,0035y + 1,1139 \quad (3-40)$$

Expresión que es válida siempre y cuando se mantengan las condiciones de los gradientes descritas previamente, entonces, al conocer la posición  $y$  del agregado formado en el tubo donde se deposita la muestra se puede estimar la densidad de parásitos o de cualquier otra población celular con (3-40). Se debe resaltar que las cantidades en esta ecuación tienen las mismas unidades que en (3-38).

<sup>9</sup>Número de experimentos realizados con perlas marcadoras para definir la expresión (3-40).

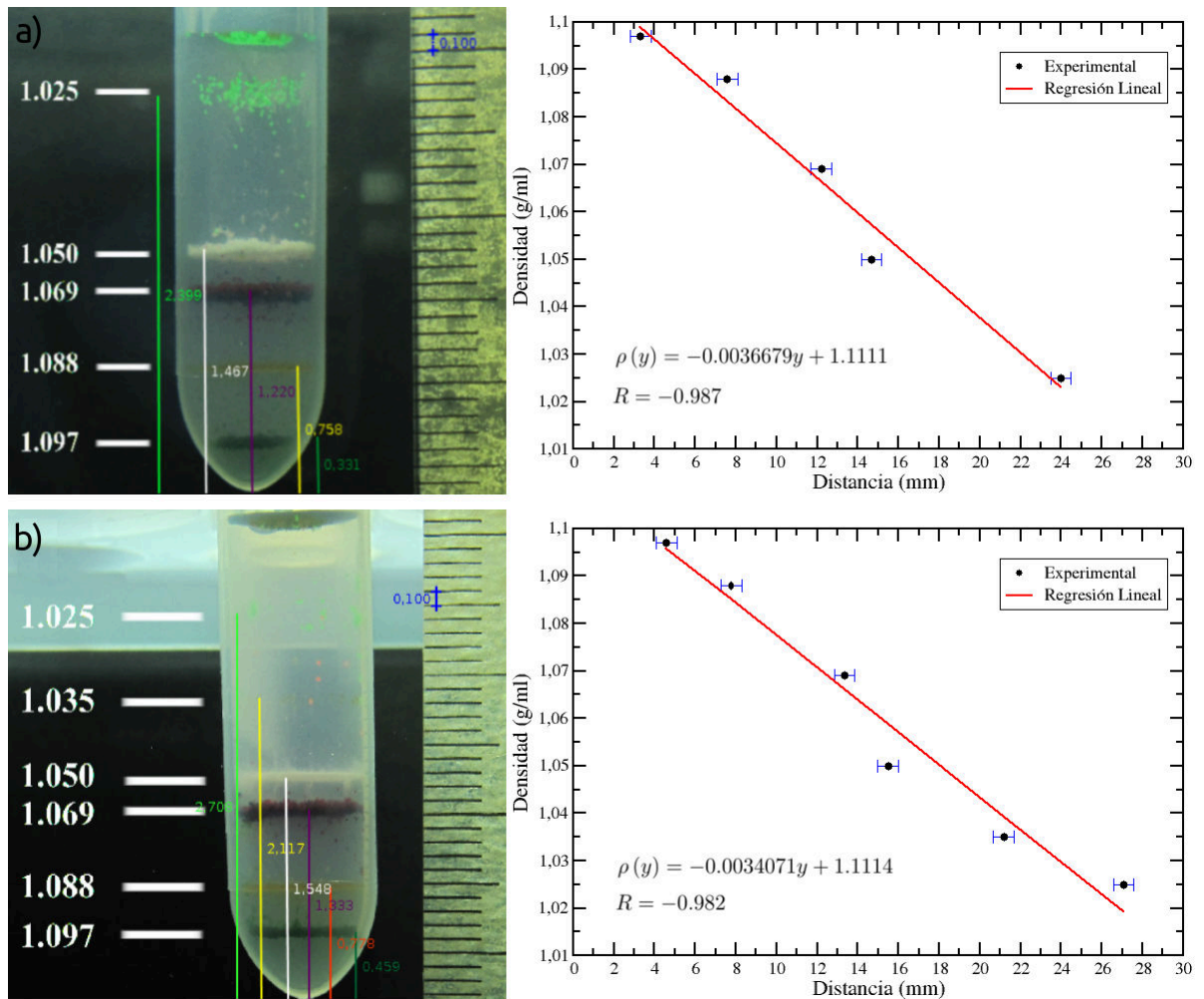


Figura 3-27.: Resultados obtenidos de los gradientes de densidad con perlas marcadoras de Sigma y Cospheric. a) Experimento 1 y b) Experimento 2.

Ahora, en las siguientes subsecciones se presentan los resultados encontrados con (3-40) al hacer gradientes usando las diferentes cepas de *Leishmania*. Es necesario tener en cuenta que las imágenes de los gradientes que se muestran a continuación no se encuentran a escala y que además las unidades empleadas por el programa Tracker al medir la distancia están en centímetros y no milímetros.

### 3.2.4.1. Control

Como control se midió la densidad de partículas de látex de  $5\mu m$  de la marca Coulter Beckman (CC Size Standard L5, nominal  $5\mu m$  latex particles) cuyo valor de densidad reportado es de  $1,050g/ml$ . Entonces, al realizar el gradiente se encontró que el agregado de partículas formado estaba a una distancia vertical  $y = 18,40 \pm 0,5mm$  medida desde la parte inferior del tubo eppendorff, Figura 3-28.

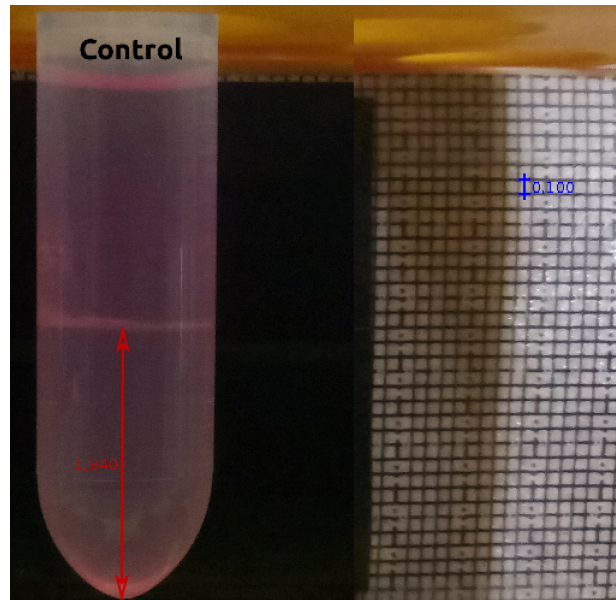


Figura 3-28.: Gradiente control de partículas de látex, distancias medidas con el programa Tracker.

Al sustituir la distancia  $y$  en (3-40) se halló que la densidad medida, en este caso, era

$$\rho_{control} = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (18,40mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-41)$$

$$\rho_{control} \approx 1,050 \pm 0,002g/ml \quad (3-42)$$

Valor de densidad que corresponde al reportado en la literatura para este tipo de partículas.

### 3.2.4.2. Parásitos de la cepa E1

En los gradientes hechos con parásitos de esta cepa se identificó que los agregados se formaron en las distancias verticales  $y = 14,00 \pm 0,5mm$  y  $y = 20,02 \pm 0,5mm$  para promastigotes y amastigotes, respectivamente, Figura 3-29. Al sustituir estos valores en la expresión (3-40) se obtuvo que las densidades estimadas en parásitos de la cepa E1 eran

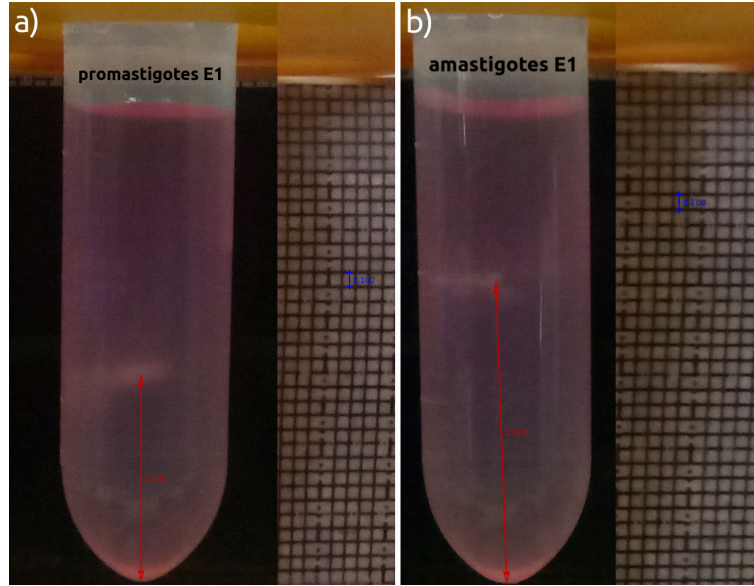


Figura 3-29.: Gradiente de densidad cepa E1. a)Estadio promastigote y b) Estadio amastigote.

- Promastigotes

$$\rho_{E1} = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (14,00mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-43)$$

$$\rho_{E1} \approx 1,065 \pm 0,002g/ml \quad (3-44)$$

- Amastigotes

$$\rho_{E1} = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (20,02mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-45)$$

$$\rho_{E1} \approx 1,044 \pm 0,002g/ml \quad (3-46)$$

### 3.2.4.3. Parásitos de la cepa pSP

Por otro lado con la cepa pSP se determinó, en el caso de promastigotes, que el agregado se formaba en  $y = 13,16 \pm 0,5mm$ , Figura 3-30a, sin embargo, al hacer gradientes con amastigotes de esta cepa se establecieron dos agregados al interior del tubo uno a  $14,51 \pm$

$0,5mm$  y el otro a  $22,21 \pm 0,5mm$ , Figura 3-30b, situación que sugiere dos poblaciones de amastigotes con diferente densidad. Para identificar, estas poblaciones se hizo otro gradiente usando un cultivo de amastigotes en apoptosis, Figura 3-30c, encontrando, que el agregado formado se ubicaba en  $y = 12,90 \pm 0,5mm$ , con lo cual, se estableció, al sustituir este valor de  $y$  en (3-40), que parásitos de la cepa pSP en este estado tienen una densidad aproximada de  $1,069 \pm 0,002g/ml$ , valor que es parecido al hallado en el agregado 1 de la Figura 3-30b, ecuación (3-50), razón por la cual se concluye que los parásitos en el primer agregado corresponden a células en apoptosis.

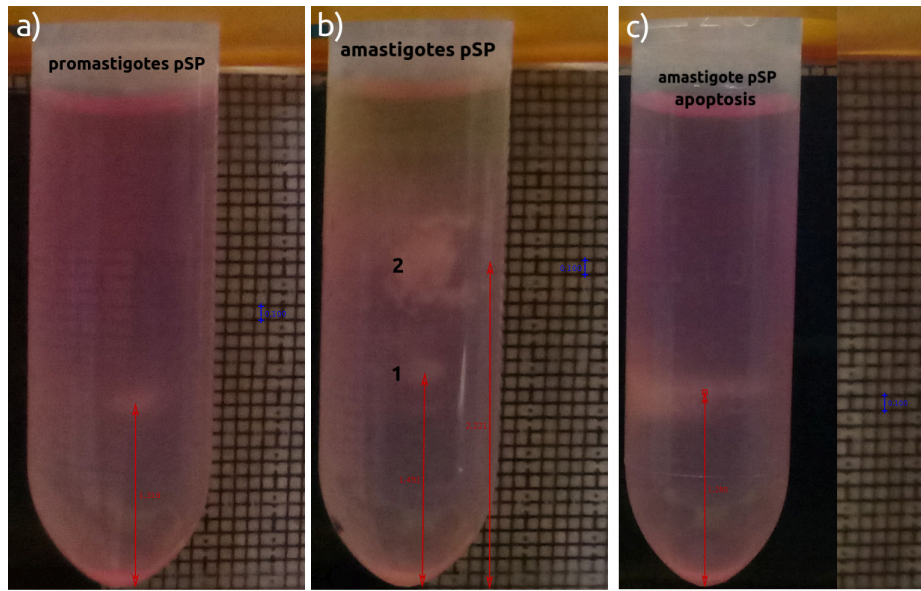


Figura 3-30.: Gradiente de densidad cepa pSP. a)Estadio promastigote. b) Estadio amastigote y c) Cultivo amastigotes axénicos en apoptosis.

- Promastigotes

$$\rho_{pSP} = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (13,16mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-47)$$

$$\rho_{pSP} \approx 1,069 \pm 0,002g/ml \quad (3-48)$$

- Amastigotes

$$\rho_{pSP_1} = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (14,51mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-49)$$



$$\rho_{pSP_1} \approx 1,063 \pm 0,002g/ml \quad (3-50)$$

$$\rho_{pSP_2} = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (22,21mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-51)$$

$$\rho_{pSP_2} \approx 1,036 \pm 0,002g/ml \quad (3-52)$$

#### 3.2.4.4. Parásitos de la cepa WT T.

Después de medir la densidad en dos de las cepas modificadas, se construyeron gradientes para estimar esta propiedad en la cepa silvestre de *L. tropica*, encontrando que las posiciones de los agregados eran en promastigotes  $y = 13,89 \pm 0,5mm$  y en amastigotes  $y = 18,70 \pm 0,5mm$ , Figura 3-31, valores que al introducirse en (3-40) dan como resultado las siguientes densidades

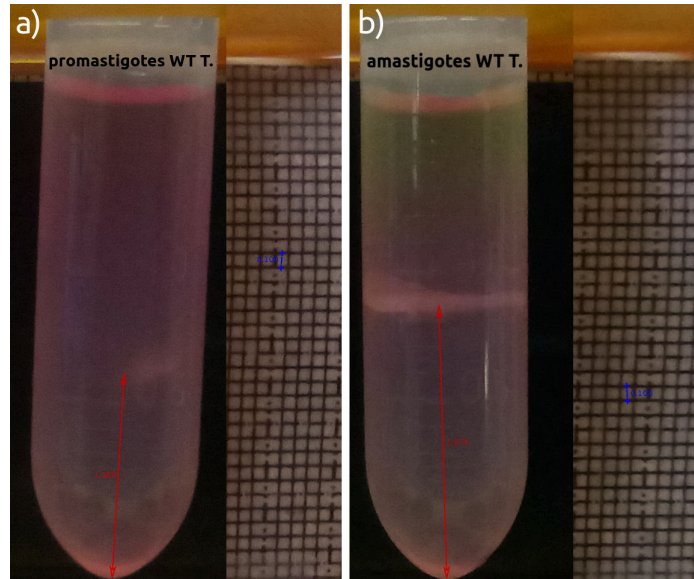


Figura 3-31.: Gradiente de densidad *L. trópica* silvestre. a)Estadio promastigote y b) Estadio amastigote.

- Promastigotes

$$\rho_T = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (13,89mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-53)$$

$$\rho_T \approx 1,065 \pm 0,002g/ml \quad (3-54)$$

- Amastigotes

$$\rho_T = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (18,70mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-55)$$

$$\rho_T \approx 1,048 \pm 0,002g/ml \quad (3-56)$$

### 3.2.4.5. Parásitos de la cepa WT B.

Por último, también se estimó la densidad en parásitos de *L. braziliensis* teniendo presente que las distancias medidas en este caso fueron  $y = 15,57 \pm 0,5mm$  y  $y = 11,22mm \pm 0,5mm$ , Figura 3-32, con lo cual se estableció que la densidad de estos parásitos era

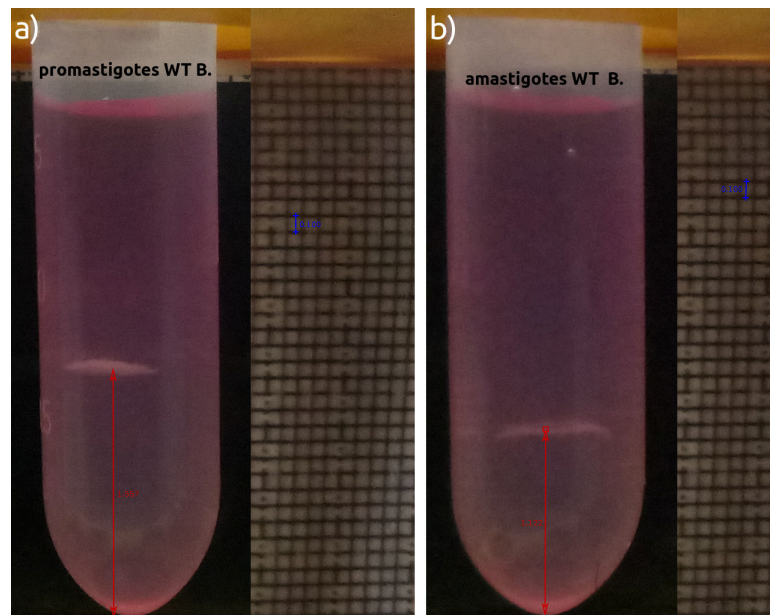


Figura 3-32.: Gradiente de densidad *L. braziliensis* silvestre. a) Estadio promastigote y b) Estadio amastigote.

- Promastigotes

$$\rho_B = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (15,57mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-57)$$

$$\rho_B \approx 1,059 \pm 0,002g/ml \quad (3-58)$$



▪ Amastigotes

$$\rho_B = -0,0035 \frac{g}{ml \cdot mm} (11,22mm) + 1,1139 \frac{g}{ml} \quad (3-59)$$

$$\rho_B \approx 1,075 \pm 0,002g/ml \quad (3-60)$$

Hasta aquí se presentan los resultados encontrados al medir la densidad de las diferentes cepas de parásitos usando la expresión (3-40), ahora el siguiente paso es calcular su elasticidad utilizando los valores definidos en (3-44), (3-46), (3-48), (3-52), (3-54), (3-56), (3-58) y (3-60).

### 3.2.5. Elasticidad

La elasticidad de los promastigotes y amastigotes de *Leishmania* se determinó utilizando la expresiones (3-33) si la densidad de los parásitos estaba en el intervalo de  $1068 \frac{kg}{m^3}$  a  $1099 \frac{kg}{m^3}$  y la (3-34) al considerar densidades entre  $1068 \frac{kg}{m^3}$  a  $1026 \frac{kg}{m^3}$ . Los errores asociados con la velocidad del sonido en los parásitos  $c_c$  y su compresibilidad  $K$  se determinaron según las expresiones (E-10) y (E-12), definidas en el Apéndice E.

Cepa	$\rho_c (g/ml)$	$\kappa$	$c_c (m/s)$	$K (\times 10^{-10} Pa^{-1})$
E1	$1,065 \pm 0,002$	1,007	$1493 \pm 3$	$4,21 \pm 0,02$
pSP	$1,069 \pm 0,002$	1,006	$1492 \pm 11$	$4,20 \pm 0,07$
WT T.	$1,065 \pm 0,002$	1,007	$1493 \pm 3$	$4,21 \pm 0,02$
WT B.	$1,059 \pm 0,002$	1,013	$1502 \pm 3$	$4,18 \pm 0,02$

Cuadro 3-14.: Elasticidad promastigotes de las diferentes cepas de *Leishmania*.

Cepa	$\rho_c (g/ml)$	$\kappa$	$c_c (m/s)$	$K (\times 10^{-10} Pa^{-1})$
E1	$1,044 \pm 0,002$	1,030	$1528 \pm 3$	$4,10 \pm 0,02$
pSP	$1,036 \pm 0,002$	1,038	$1539 \pm 3$	$4,07 \pm 0,02$
WT T.	$1,048 \pm 0,002$	1,025	$1520 \pm 3$	$4,13 \pm 0,02$
WT B.	$1,075 \pm 0,002$	1,028	$1524 \pm 11$	$4,00 \pm 0,07$

Cuadro 3-15.: Elasticidad amastigotes de las diferentes cepas de *Leishmania*.

Luego de hallar los valores de elasticidad de los parásitos, presentados en los Cuadros 3-14 y 3-15, estos datos se usaron, junto con la densidad y el tamaño de amastigotes y promastigotes, para determinar teóricamente la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  que actuó sobre estas células al interior del dispositivo 2 con el modelo físico definido en el Capítulo 2. Entonces, a continuación y como última parte de este trabajo se exponen los resultados teóricos y experimentales encontrados al estudiar el movimiento de parásitos sometidos al campo acústico de la onda estacionaria.

### 3.3. Movimiento de *Leishmania* en el Campo Acústico

Para estudiar el movimiento de los parásitos en el dispositivo 2, Figura 3-1b, primero fue necesario estimar el valor de la energía acústica al interior de este dispositivo para ello se empleó la misma metodología descrita en la subsección 3.1.2, con la cual, se definió el valor de  $E_{ac}$  en el dispositivo 1. Por lo tanto, al ajustar la trayectoria teórica, obtenida del modelo tridimensional usando la  $\vec{F}_{pr}$  3D de paredes suaves en  $x$  Figura 3-34b, con la trayectoria medida experimentalmente sobre una partícula de látex de  $4,5\mu m$  de diámetro expuesta al campo acústico al interior del dispositivo 2, Figuras 3-33 y 3-34a, se halló al comparar los polinomios cúbicos, Figura 3-34c, que el menor error correspondía a un valor de  $E_{ac} = 7 \frac{J}{m^3}$ , Figura 3-34d. Encontrando, así, que el mejor ajuste entre la curva experimental y teórica está dado para este valor de energía como se observa en la Figura 3-35 donde se comparan las dos curvas obtenidas.

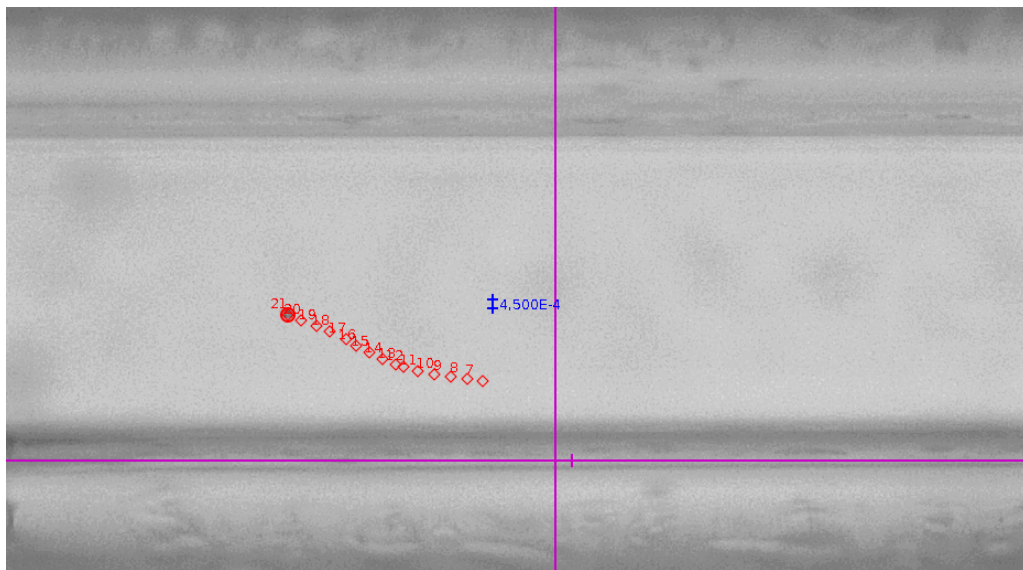


Figura 3-33.: Trayectoria experimental medida en el dispositivo 2 con partículas de  $4,5\mu m$  usando el programa Tracker.

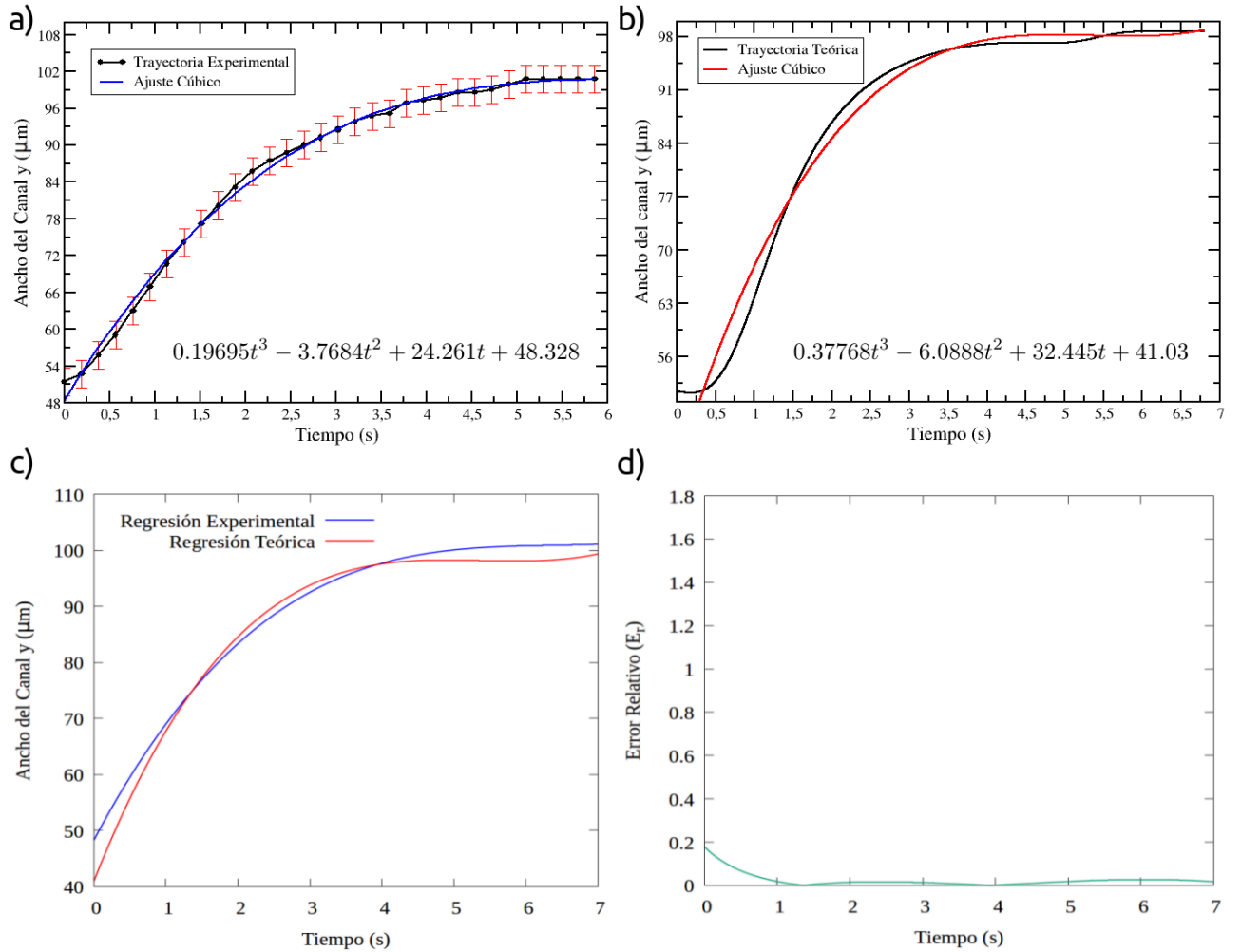


Figura 3-34.: Medición de la  $E_{ac}$  en el dispositivo 2. a) Gráfica experimental. b) Gráfica teórica. c) Ajuste de los polinomios de tercer orden. d) Error relativo entre los polinomios hallados con los ajustes.

Después de establecer la  $E_{ac}$  fue posible mediante la ecuación (3-4) determinar la presión máxima que se ejerce sobre las células al interior del dispositivo, la cual, tiene un valor de

$$p_a = 2\sqrt{998 \frac{kg}{m^3} \left(1483 \frac{m}{s}\right)^2 7,00 \frac{J}{m^3}} \approx 0,248 Mpa \quad (3-61)$$

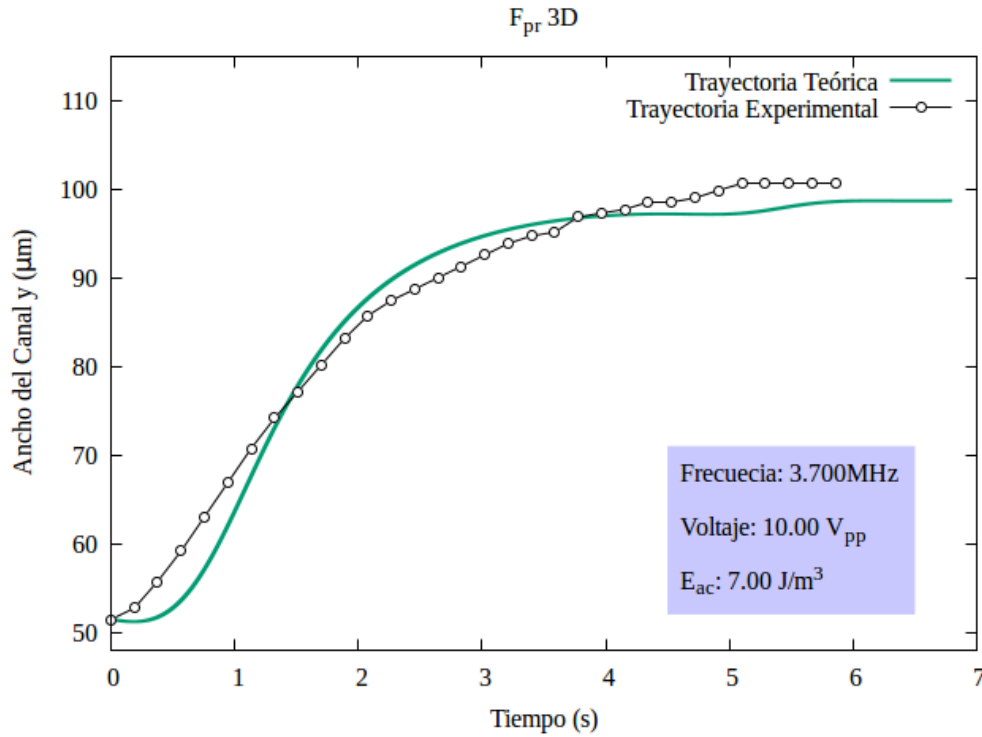


Figura 3-35.: Ajuste obtenido con las trayectorias teórica y experimental para una  $E_{ac} = 7,00 \frac{J}{m^3}$  en el dispositivo 2.

Con la energía y presión máxima medidas, Figura 3-35 y ecuación (3-61), el siguiente paso fue estudiar experimentalmente el movimiento de las diferentes cepas de *Leishmania* en el dispositivo 2. Para ello se tomaron 2ml de cultivos *in vitro* de cada una de las cepas de parásitos, los cuales, se introdujeron de manera controlada mediante dos bombas conectadas a la entrada y salida del canal. Luego con la muestra en el interior del resonador 2 y buscando mantener un flujo transversal igual a cero se estableció, usando los transductores Pz26, la onda estacionaria ajustando la frecuencia del generador de funciones con el valor dado en (3-3).

Observando, al hacer vibrar el dispositivo con esta frecuencia que los promastigotes se desplazan hacia el nodo de presión establecido en el centro del canal, corroborando así que los parásitos en este estadio tienen un factor de contraste acústico  $\phi$  positivo, Figuras 3-36c, 3-37c, 3-38c, 3-39c, 3-40c. Además, en su desplazamiento hacia el nodo se resalta que los promastigotes se orientan de tal forma que su cuerpo celular se dirige hacia el nodo de presión y el flagelo se ubica en sentido contrario, Figuras 3-37b, 3-39b y 3-40a, efecto en su movimiento que se relaciona con la dependencia directa entre la  $\vec{F}_{pr}$  y el volumen de la célula, entonces, el cuerpo del parásito, por su mayor volumen, experimenta una fuerza acústica más intensa que el flagelo.

Adicionalmente se encontró que los promastigotes al llegar al nodo de presión se ordenan de tal manera que su cuerpo toma una posición casi horizontal formando inicialmente un agregado tipo cadena como los obtenidos en el capítulo 2 al considerar partículas que se mueven bajo la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  3D en un dispositivo con  $l_x \gg l_y, l_z$ , Figuras 3-36a y 3-40b. Sin embargo, al irse acumulando más parásitos en la posición de equilibrio estos comienzan a formar una estructura ovalada, similar a la observada con partículas de látex de  $5\mu\text{m}$  en el dispositivo 1 Figura 3-41, estructura en la que las últimas células agregadas mantienen los flagelos hacia el exterior, Figuras 3-36b, 3-38a, 3-38b y 3-39a. Según lo encontrado es posible relacionar la forma de estos agregados con la acción de la  $\vec{F}_{pr}$  tridimensional y un flujo en la dirección  $x$ . Puesto que en la situación experimental, con parásitos y partículas, aunque se trató de hacer el flujo igual a cero se observó un movimiento de arrastre generado por el líquido sobre células o partículas individuales en esta dirección.

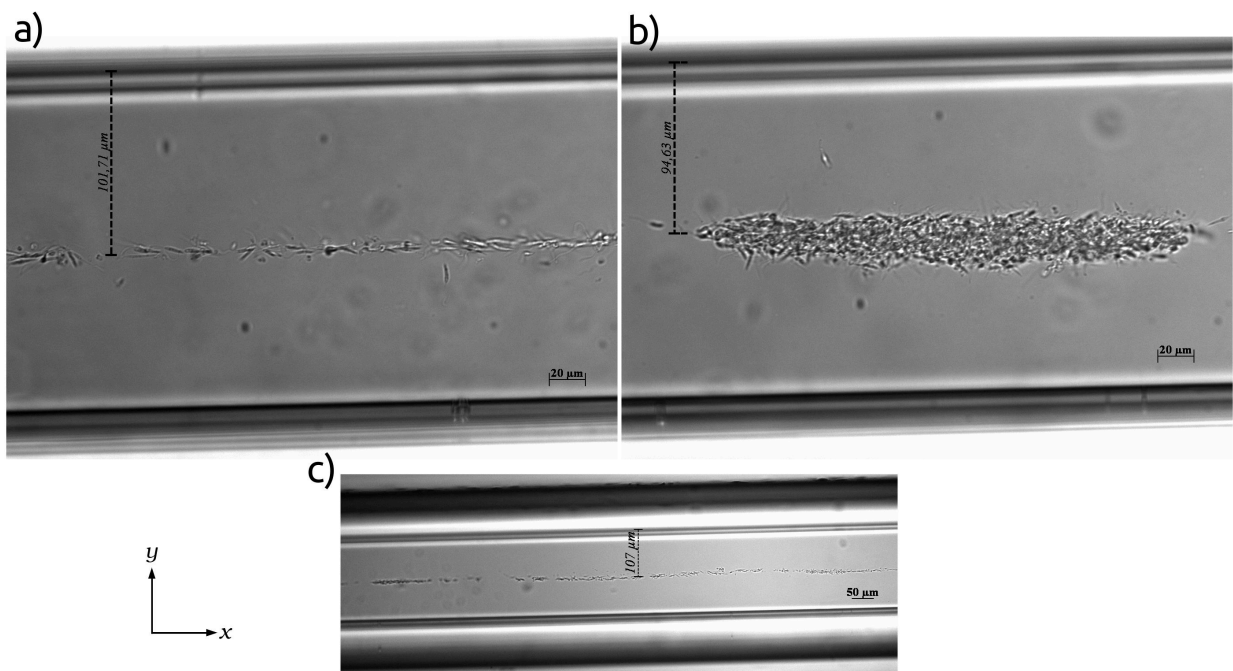


Figura 3-36.: Promastigotes de la cepa *Full tropica* expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.

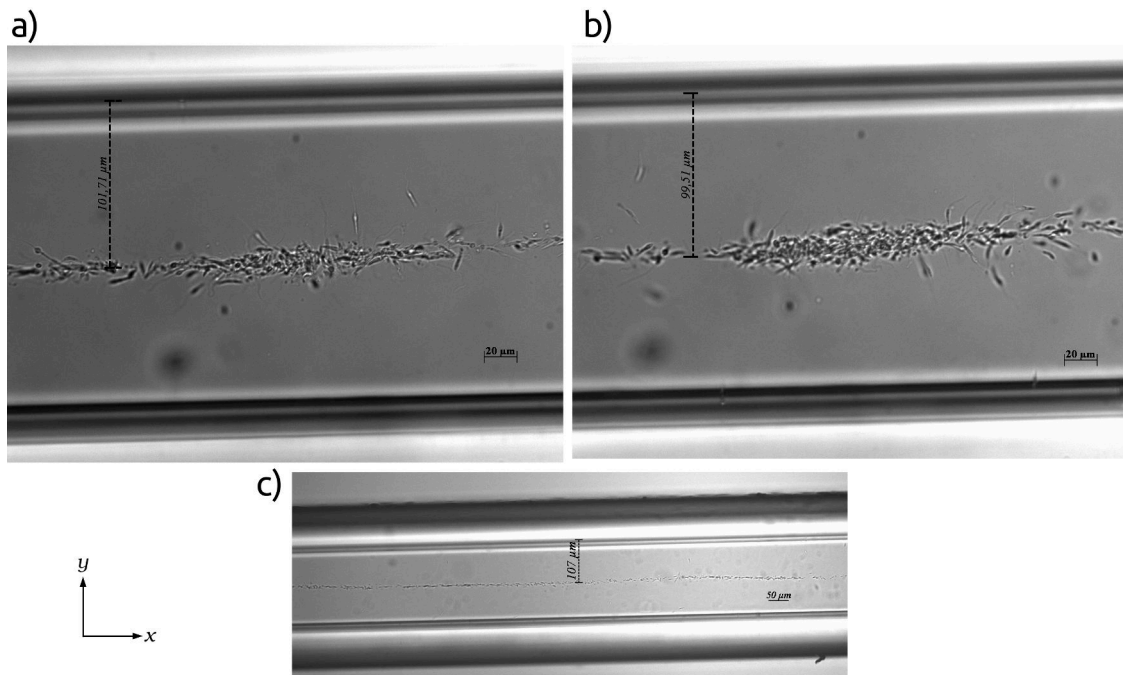


Figura 3-37.: Promastigotes de la cepa E1 expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.

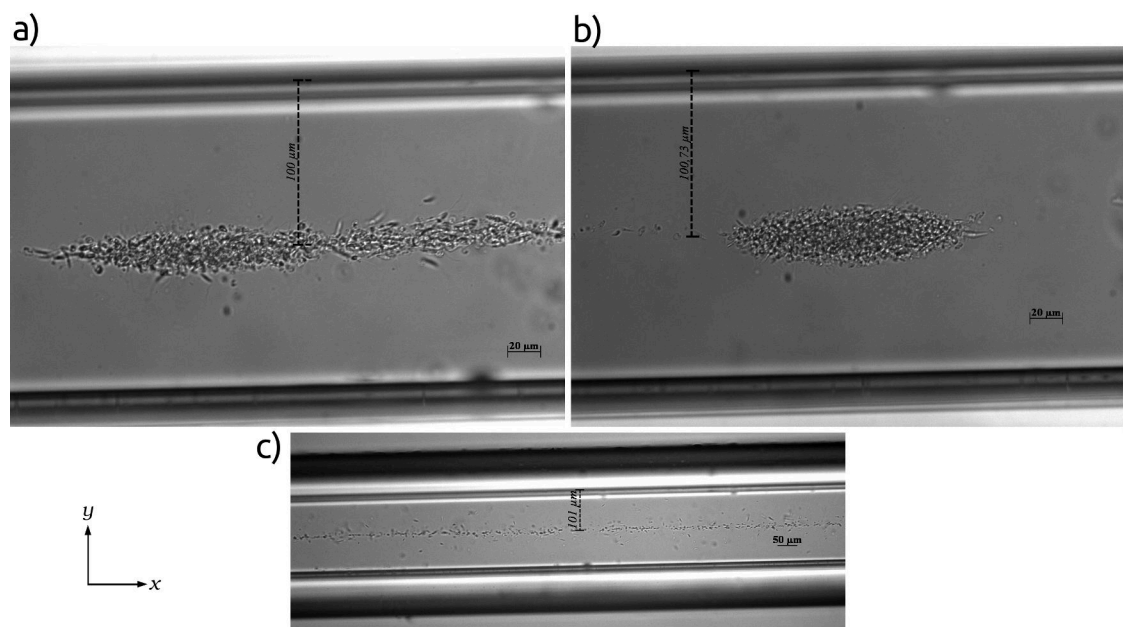


Figura 3-38.: Promastigotes de la cepa pSP expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.

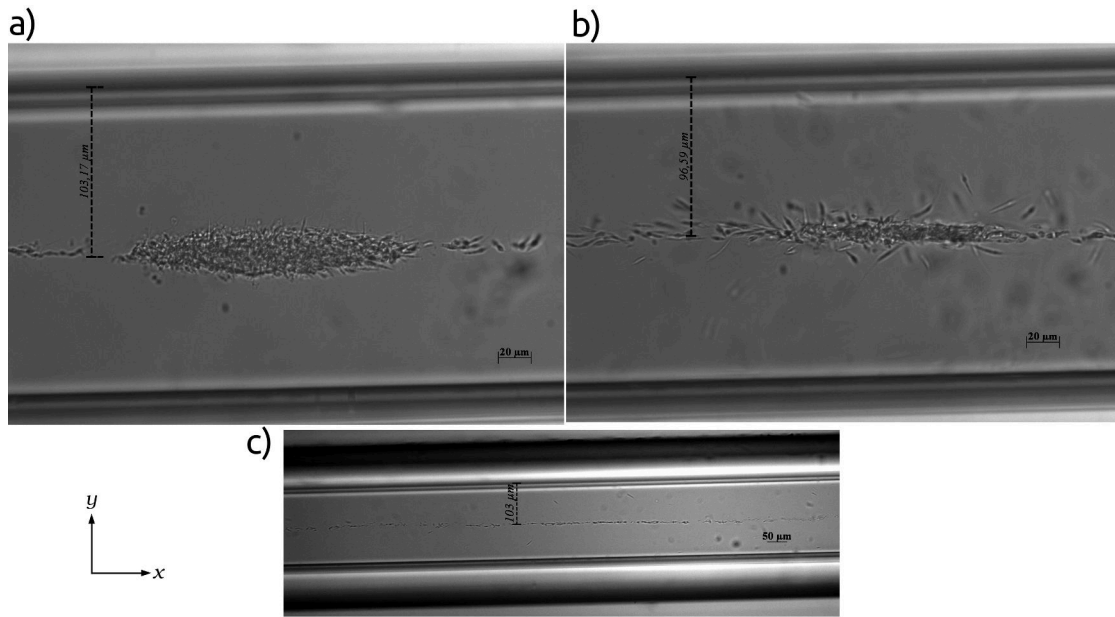


Figura 3-39.: Promastigotes de la cepa WT tropica expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.

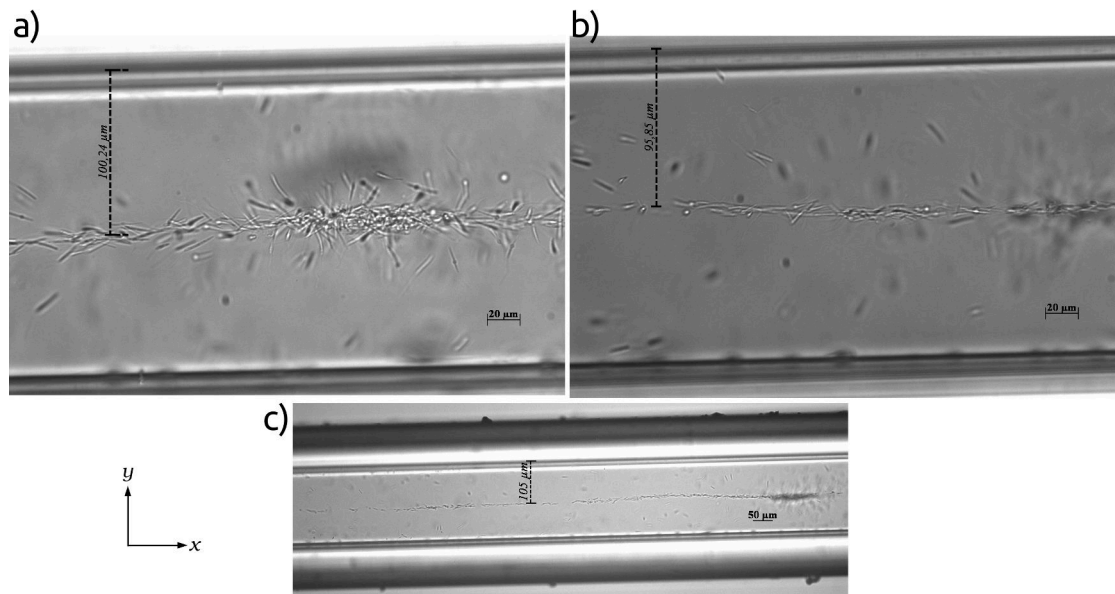


Figura 3-40.: Promastigotes de la cepa WT braziliensis expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.



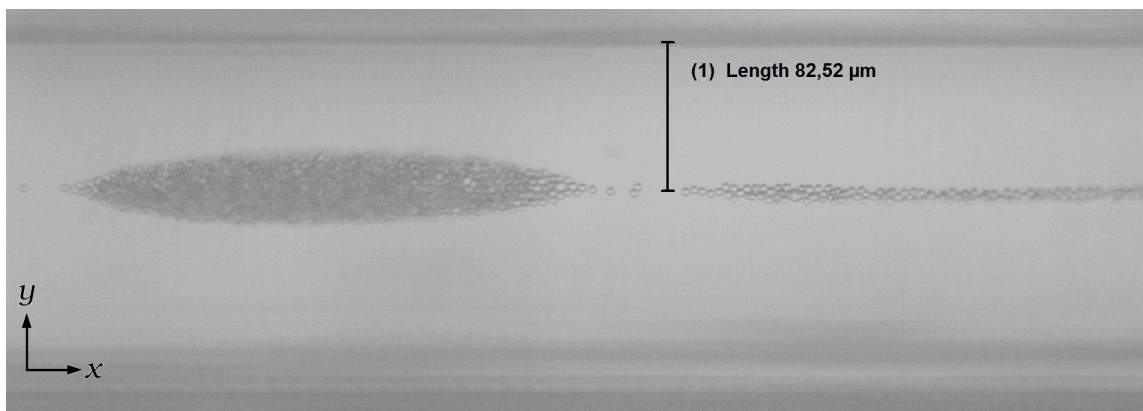


Figura 3-41.: Partículas de  $5\mu m$  en el dispositivo 1 formando un agregado en el centro, objetivo  $20X$ .

En cuanto a la rotación de los promastigotes en el campo acústico debido a su forma no se observó, al considerar células individuales, un movimiento de este tipo a pesar de que los parásitos si toman una posición particular en el campo, según se describió en los párrafos anteriores. No obstante, al formarse la estructura ovalada con los parásitos, Figuras 3-36b, 3-38a, 3-38b y 3-39a, se identificó rotación de todo el agregado celular respecto al nodo en el plano frontal ( $y, z$ ) situación que no se presentó en partículas de látex. Este movimiento podría ser generado por la disposición espacial en el plano ( $y, z$ ) de los últimos promastigotes ubicados en el agregado, donde se tiene que estos se ubican de tal manera que sus cuerpos y flagelos están dispuestos diagonalmente a la estructura, Figura 3-42, disposición que debido a la forma del parásito en su estadio promastigote puede favorecer la generación de un momento de torsión neto sobre el agregado, el cual puede estar asociado con el propio movimiento del flagelo, el cual es usado por los promastigotes para desplazarse en el líquido.

Asimismo, se halló que las rosetas, las cuales, son estructuras formadas por varios promastigotes de *Leishmania* en cultivos *in vitro* durante su fase de crecimiento estacionario<sup>10</sup>, Figura 3-43a, describen un movimiento de rotación respecto a su centro al estar expuestas al campo, siendo este contrario al de las manecillas del reloj, en el plano ( $x, y$ ), como se describe en la Figura 3-43b en la que se presenta el movimiento de una roseta de la cepa E1. Es interesante resaltar que los parásitos en estas estructuras se ubican con su cuerpo en el centro dejando hacia afuera sus flagelos, disposición similar a la observada en los agregados formados por promastigotes expuestos al campo acústico en el plano ( $y, z$ ), Figura 3-42.

<sup>10</sup> La presencia de rosetas indica el estado de infección de los parásitos en el cultivo *in vitro*.



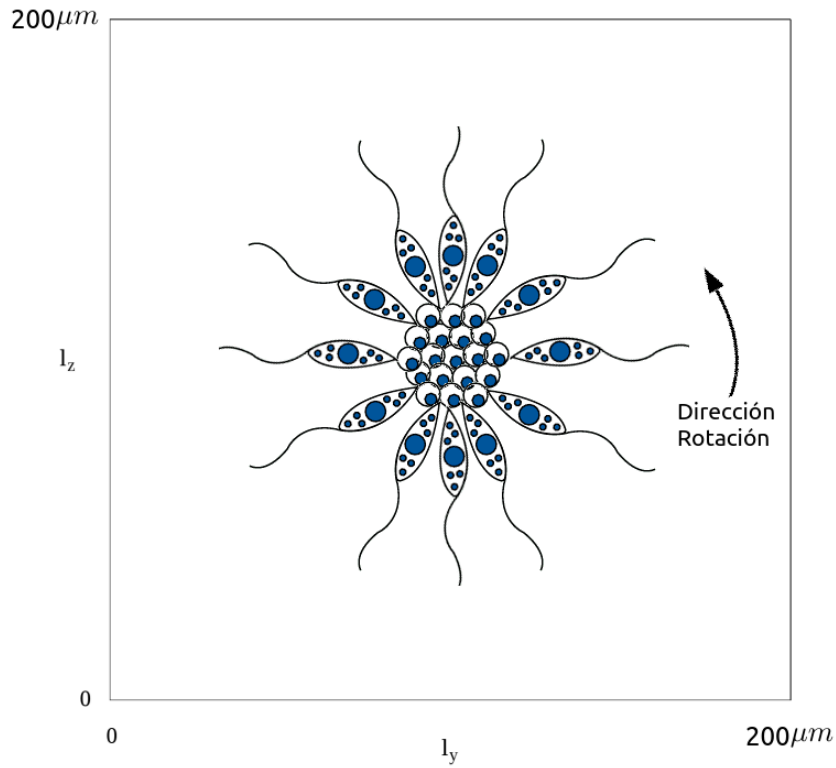


Figura 3-42.: Vista frontal del dispositivo, rotación del agregado con promastigotes en el plano  $(y, z)$ .

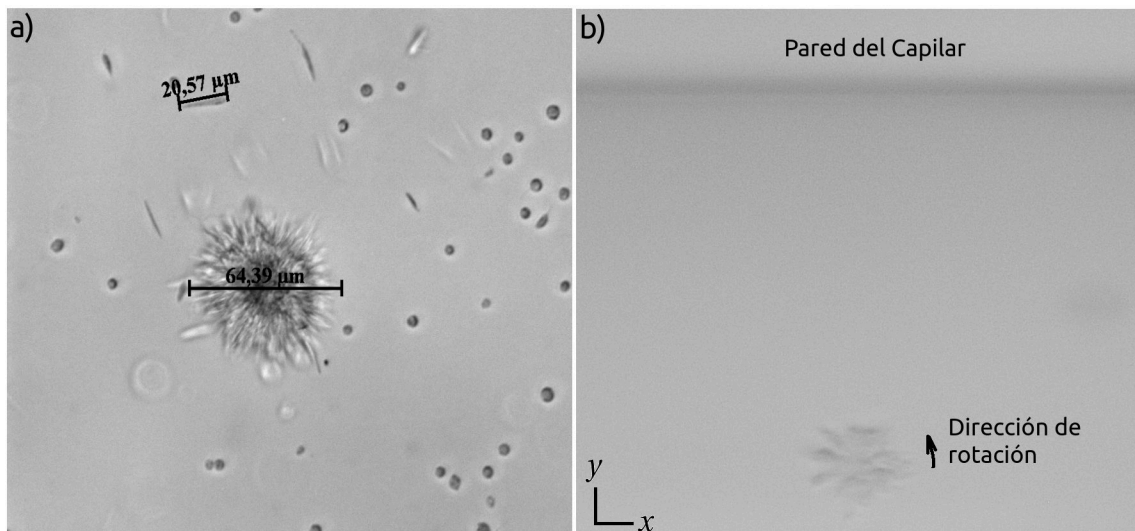


Figura 3-43.: a) Roseta formada por promastigotes de *Leishmania*. b) Movimiento de rotación para una roseta de la cepa E1 en el campo acústico del dispositivo 1, objetivo 50X.

Por otro lado, al someter los amastigotes de las diferentes cepas de *Leishmania* al campo acústico en el dispositivo 2 se encontró, al igual que con los promastigotes, que inicialmente en ellos se establecía un movimiento de migración hacia el centro del dispositivo, Figuras 3-44c, 3-45c, 3-46c y 3-47c, indicando nuevamente un valor positivo del factor de contraste acústico  $\phi$ . Amastigotes que con el tiempo y debido a su desplazamiento se ubicaban en el nodo de presión para formar agregados tipo cadena, como los que se presentan en las Figuras 3-44a-b, 3-45a-b, 3-56a y 3-47a, los cuales después de un tiempo se convierte en agregados ovalados en el centro del canal, Figura 3-47b, iguales a los observados con promastigotes. No obstante, al exponer parásitos en su estadio amastigote al campo acústico y luego de formar estos agregados no se observó rotación de la estructura ovalada en el plano  $(y, z)$  hecho que puede estar relacionado con el cambio en la forma de los parásitos, los cuales en su estadio amastigote son más parecidos a una partícula esférica.

Respecto a movimientos de rotación en amastigotes no se registró ningún movimiento de este tipo en parásitos individuales, sin embargo, se encontró que al estar ya ubicados en el nodo los amastigotes, además, del agregado ovalado generan otro tipo de estructura con forma de muelle o resorte, Figura 3-46b, la cual si describe un movimiento de rotación al rededor del nodo de presión, plano  $(y, z)$ . La forma y el movimiento de rotación de esta estructura también se ha evidenciado en partículas de látex de tamaño micrométrico sometidas al campo acústico, por consiguiente, es posible asociar dicha estructura a la forma esférica de partículas o amastigotes, Figura 3-48.

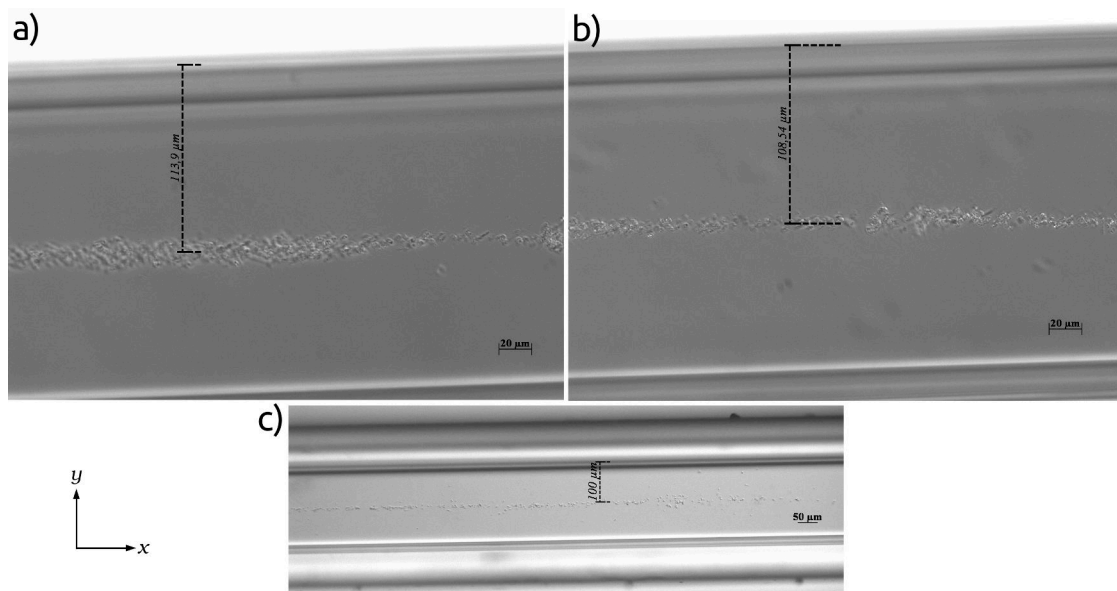


Figura 3-44.: Amastigotes de la cepa E1 expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.

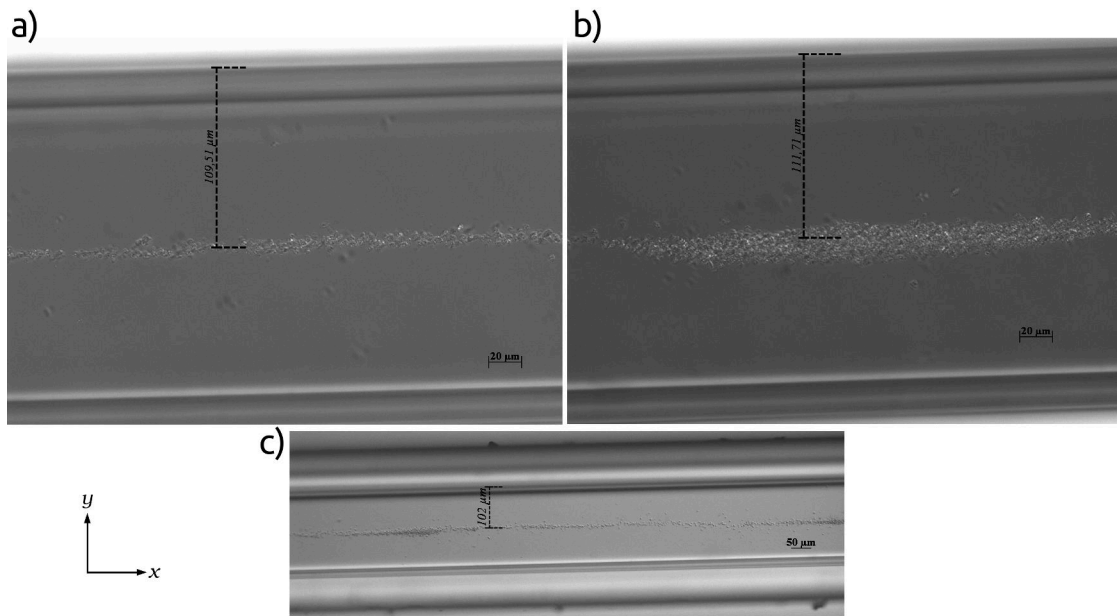


Figura 3-45.: Amastigotes de la cepa pSP expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.

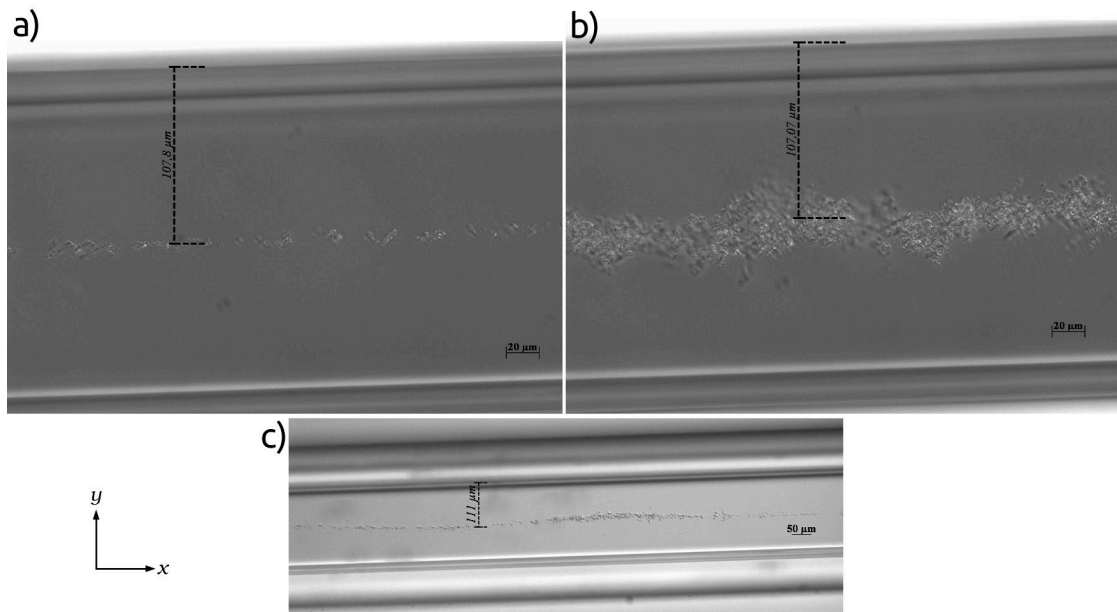


Figura 3-46.: Amastigotes de la cepa WT trópica expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.

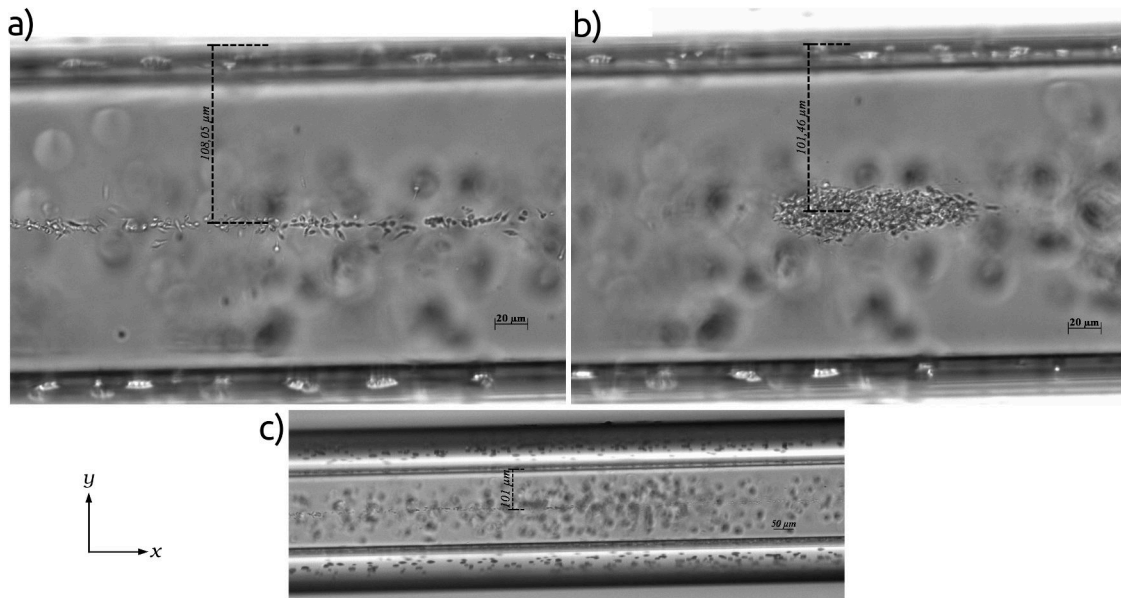


Figura 3-47.: Amastigotes de la cepa WT *braziliensis* expuestos al campo acústico en el dispositivo 2. a) y b) Imágenes tomadas con un objetivo de 40X. c) Imagen tomada con un objetivo de 10X.

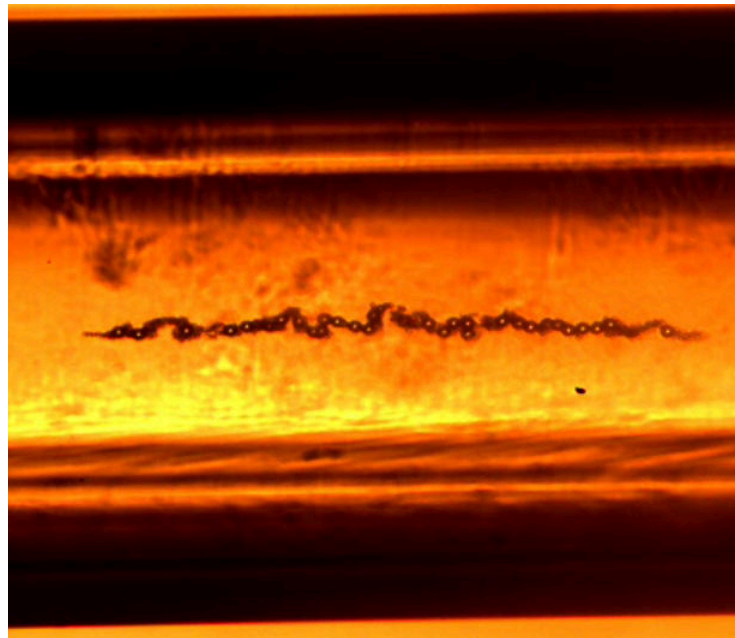


Figura 3-48.: Estructura formada por partículas de látex de 6 y 20 $\mu\text{m}$  en el nodo las cuales describen un movimiento de rotación en esta posición. Imagen facilitada por la investigadora Iciar González.

Para terminar de estudiar el movimiento de los parásitos de *Leishmania* en el campo acústico,

se tomaron los valores de las propiedades físicas medidas para estas células, cuadros 3-10, 3-11, 3-14 y 3-15, junto con la  $E_{ac}$  determinada en el dispositivo 2, Figura 3-47, con el propósito de estimar, usando el modelo físico 3D para paredes suaves en  $x$ , capítulo 2, la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  que experimentan las diferentes cepas de parásitos al interior del dispositivo 2. Para cumplir con esto se asumió que la posición en dirección  $y$  de los parásitos era  $42,44\mu m$ , la cual se tomó igual a la posición de la partícula en la Figura 3-33. Y por otro lado, las posiciones en  $x$  y  $z$  se definieron en  $\ell_x/2$  y  $\ell_z/2$ .

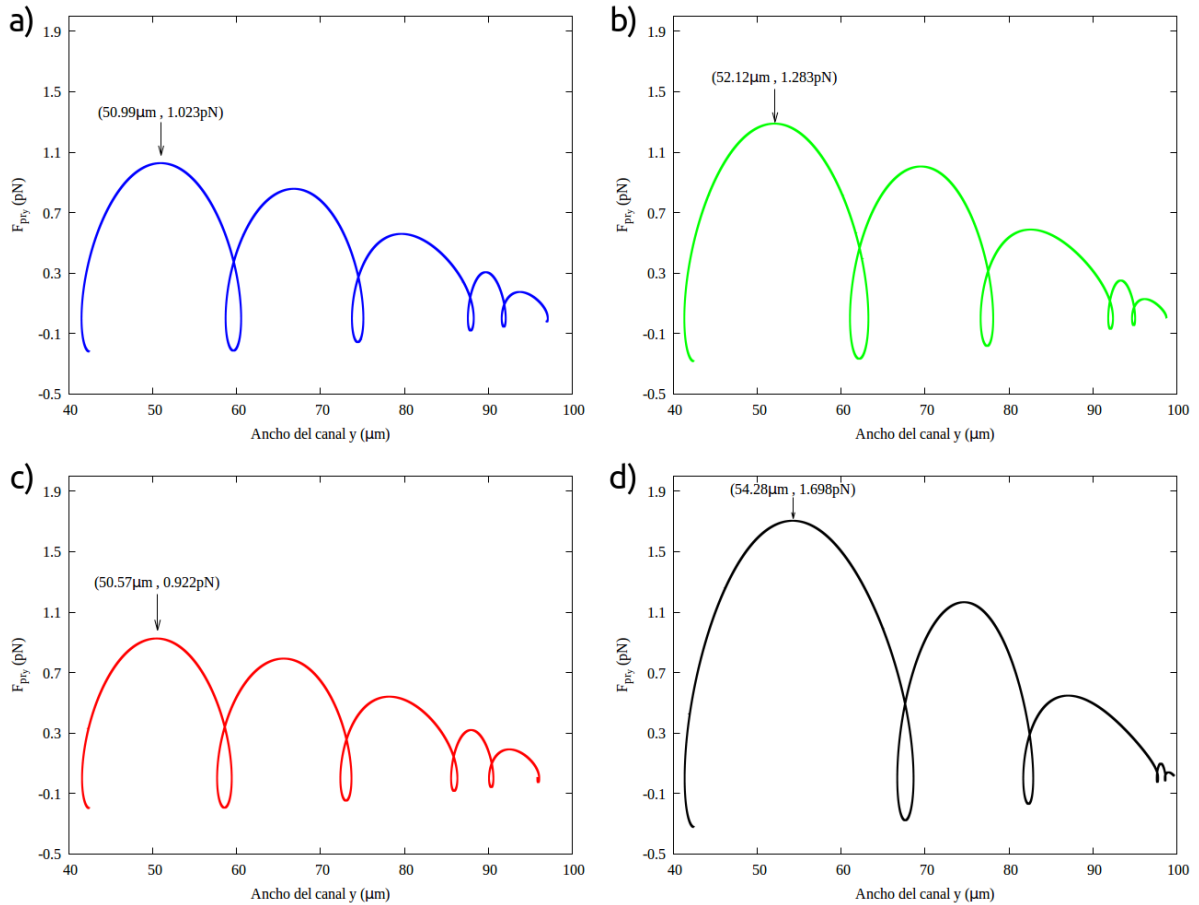


Figura 3-49.: Magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  en dirección  $y$  que actuó sobre los promastigotes de *Leishmania*. a) Ceba E1, b) Ceba pSP, c) Ceba *tropica* Silvestre y d) Ceba *braziliensis* silvestre.

Además de especificar la posición inicial de los parásitos se usaron las mismas condiciones de flujo junto con los modos de vibración definidos en el modelo al medir la  $E_{ac}$  en el dispositivo 2, es decir, que los resultados que se muestran en las Figuras 3-49, 3-50, 3-51 y 3-52 se hallaron al considerar  $\bar{v} = 39,2\mu m$  y  $n_y = n_z = 1$  y  $n_x = 60$ . También es necesario resaltar, antes de describir estos resultados, que la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  en promastigotes fue determinada al considerar los parásitos con forma esférica, esto se hizo porque las expresiones de la

$\vec{F}_{pr}$ , ecuaciones (1-205) y (1-214), usadas en el modelo 3D fueron halladas considerando un objeto esférico, no obstante, el radio de la esfera asociada a cada cepa de promastigotes fue establecido con el volumen medido para estos parásitos, Cuadro 3-11.

Entonces, establecidas las condiciones anteriores en la simulación con el modelo 3D se encontró que los promastigotes de *L. braziliensis* silvestre experimentan una  $\vec{F}_{pr}$  de mayor magnitud, Figura 3-49d, que la experimentada por las cepas de *L. trópica* WT, Figura 3-49c, *L. trópica* modificada E1, Figura 3-49a y la cepa pSP de *L. mexicana*, Figura 3-49b. Identificando una disminución en la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  relacionada con cambio en las propiedades físicas de las diferentes especies de *Leishmania*, en particular, si se observa el Cuadro 3-14, donde se presentan los valores medidos de densidad y elasticidad, se nota que estas dos propiedades en las diferentes cepas son muy similares. Sin embargo, al comparar los valores del volumen en promastigotes  $V_p$ , Cuadro 3-14, se observan cambios significativos de esta propiedad, de ahí que se pueda concluir, para las cepas estudiadas, que las variaciones en la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  están asociadas al volumen del parásito. Por otra parte, también es de resaltar que los valores máximos de la  $\vec{F}_{pr}$  se alcanzan en diferentes posiciones y que esta fuerza disminuye considerablemente su magnitud a medida que los parásitos se acercan al nodo de presión, ubicado en la mitad del dispositivo aproximadamente a  $100\mu m$  de sus paredes, Figura 3-49, situación que se esperaba teóricamente según lo descrito en el Capítulo 2.

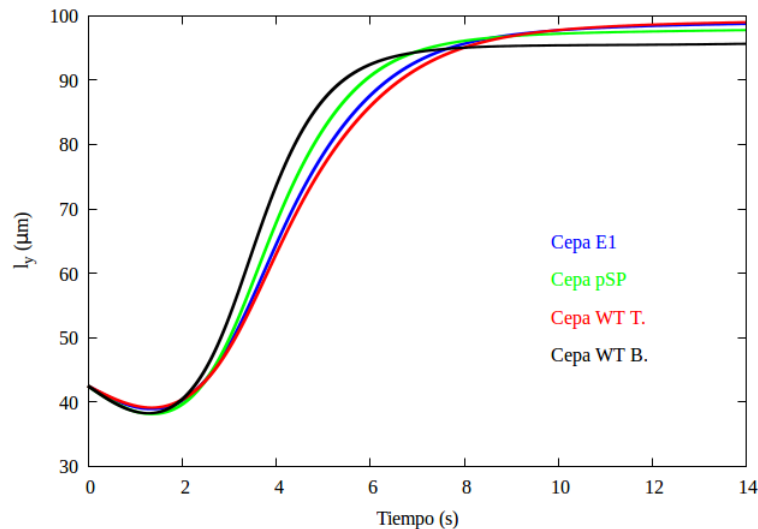


Figura 3-50.: Gráfica de posición  $y$  de promastigotes como función del tiempo  $t$  para un flujo con velocidad medias de  $10\mu m/s$ .

Este efecto en la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  también se evidencia al graficar la posición  $y$  de los promastigotes como función del tiempo  $t$ , Figura 3-50, donde se observa que a los parásitos de *L. braziliensis* les toma menos tiempo en alcanzar su posición de equilibrio comparado



con el tiempo empleado por las otras cepas, Figura 3-50, hecho relacionado directamente con la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  que experimentan las células. Asimismo se concluye al cotejar las gráficas de las cepas E1 y *L. trópica* Silvertre (curvas azul y roja) que existe poca diferencia entre la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  que experimentan estas dos cepas, sugiriendo, como se evidencia en los Cuadros 3-11 y 3-14, que su densidad, elasticidad y volumen tienen valores cercanos destacándose la diferencia más significativa en su volumen.

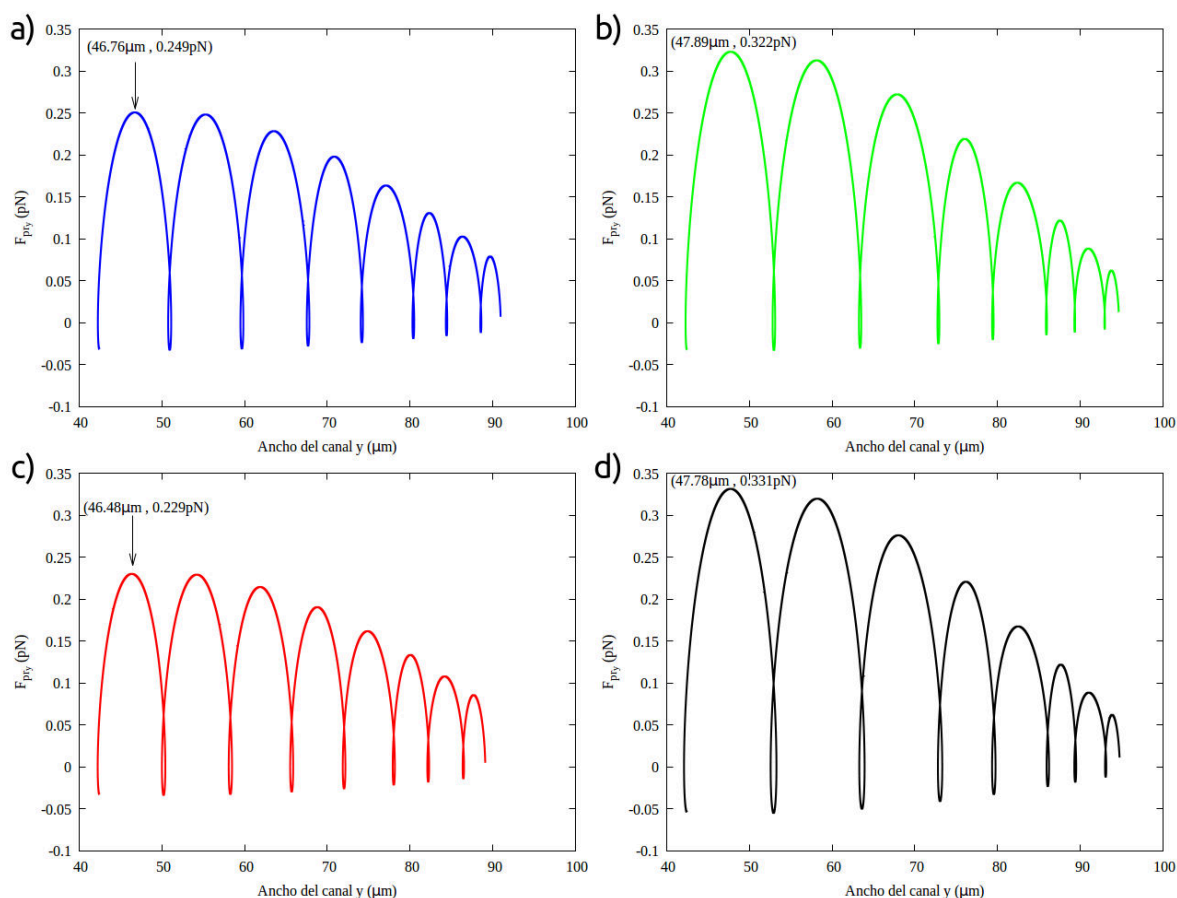


Figura 3-51.: Magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  que actuó sobre los amastigotes de *Leishmania*. a) Ceba E1, b) Ceba pSP, c) Ceba *tropica* Silvestre y d) Ceba *braziliensis* silvestre.

Haciendo el mismo análisis con los amastigotes se halló que la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  sobre estos parásitos es menor que en parásitos con forma promastigote, Figura 3-51, disminución que está asociada con el cambio en las propiedades físicas experimentado por el parásito al pasar a su forma amastigote, estadio en el cual estas células tienen una menor densidad, elasticidad y volumen, como se evidencia en los Cuadros 3-15 y 3-10. Efectos que descritos en términos moleculares están relacionados con modificaciones en el citoesqueleto de los parásitos, puesto que en su estadio amastigote hay una disminución significativa en la síntesis de tubulina según

fue determinado por Fong & Chang (1981) dando como resultado la retracción del flagelo de los promastigotes.

Adicionalmente, al contrastar los resultados encontrados con las diferentes cepas se reconoció que los amastigotes de *L. braziliensis* y pSP experimenta una  $\vec{F}_{pr}$  de igual magnitud, Figura 3-51b-d, la cual tiene mayor intensidad que la  $\vec{F}_{pr}$  que actúa en parásitos de las cepas E1 y *L. tropica*, Figura 3-51a-c. Resultado que también se destaca en las gráficas de posición  $y$  de los amastigotes como función del tiempo  $t$ , Figura 3-52, donde se observa una superposición de estas gráficas para las cepas de *L. braziliensis* y pSP, parásitos que requieren de menos tiempo para alcanzar su posición de equilibrio comparado con el tiempo que les toma a los amastigotes de E1 y *L. trópica*. Esto indica, al hacer un parangón entre los valores de densidad, elasticidad y volumen presentados en los Cuadros 3-10 y 3-15, que las cepas de *L. braziliensis* y pSP a pesar de tener diferencias significativas en sus propiedades estas se compensan entre sí dando como resultado la misma intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  sobre estos parásitos. Sin embargo, y aunque las cepas E1 y *L. tropica* tienen la misma densidad y elasticidad la pequeña diferencia en su volumen genera un cambio considerable en la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  que actúa sobre estas cepas, Figura 3-52.

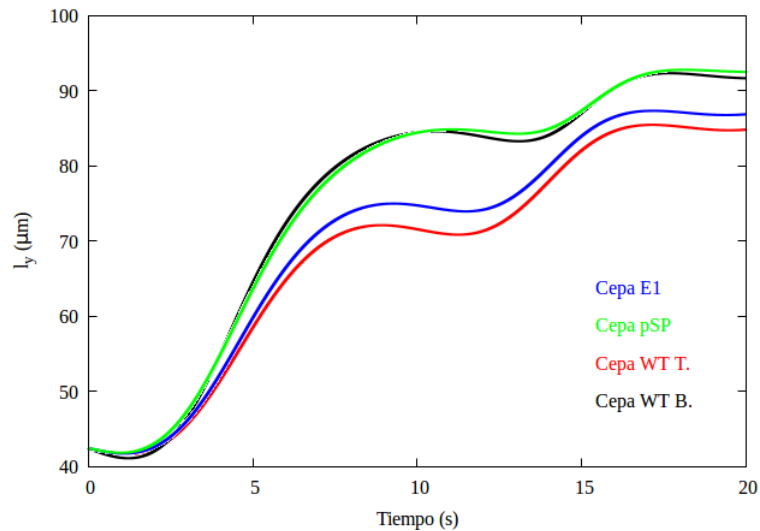


Figura 3-52.: Gráfica de posición  $y$  de amastigotes como función del tiempo  $t$  para un flujo con velocidad media de  $10\mu\text{m}/\text{s}$

Respecto al efecto del silenciamiento de los genes *LbrM01 V2.0210 (LbCLC-A)*, y *LbrM32 V2.3670 (LbCLC-B)* en la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$ , solo es posible hacer el análisis entre las cepas WT T. y E1, puesto que los parásitos en estas cepas corresponden a la misma especie de *Leishmania*. Entonces, al comparar las propiedades físicas encontradas en los promastigotes de WT T. y E1 se identificó un aumento en su volumen de  $6,28\mu\text{m}^3$  cuando se hace el silenciamiento del gen *LbrM01 V2.0210* en los promastigotes control (cepa WT T.), aunque su densidad y compresibilidad no cambian como se observa al comparar los resultados de estas



propiedades presentados en el Cuadro **3-14**, mismo efecto en el volumen que es reportado por [Zapata, 2016](#) en su estudio morfológico de los promastigotes de estas cepas. Además, se debe resaltar que este cambio de volumen en los promastigotes conlleva un incremento en la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  de  $0,1pN$  encontrado al contrastar las gráficas **3-49a** y **3-49c**. Con este resultado se puede suponer que el silenciamiento del gen *LbrM01 V2.0210* en los promastigotes de WT T. genera una disminución de la proteína relacionada con este gen que afecta el volumen de los parásitos, sin embargo, al no presentarse cambios en la densidad o elasticidad de los promastigotes no es claro que este silenciamiento afecte directamente las propiedades del citoesqueleto del parásito.

En cuanto a los resultados encontrados con los amastigotes de las cepas WT T. y E1, lo primero que se identificó es la disminución significativa de volumen, densidad y compresibilidad de los amastigotes respecto a los promastigotes efecto que se relaciona con modificaciones en la producción de diferentes proteínas, como la tubulina, según se discutió en párrafos anteriores. No obstante, al comparar las propiedades físicas de amastigotes de la cepa control, WT T., con las de la cepa silenciada, E1, no se observó cambio en la densidad y compresibilidad de los parásitos, Cuadro **3-15**, pero además, su aumento de volumen fue de  $0,98\mu m^3$  valor que es menor al encontrado en promastigotes, teniendo como consecuencia un aumento en la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$  poco significativo de  $0,02pN$ , gráficas **3-51a** y **3-51c**. Resultado que sugiere que el silenciamiento del gen *LbrM01 V2.0210* afecta más al parásito en su estadio promastigote que amastigote, por lo tanto, el constructo diseñado por [Zapata, 2016](#) debe afectar una proteína que se expresa principalmente en promastigotes pero no en amastigotes. Esto pone en duda la posible interferencia de la proteína tubulina sugerida por [Zapata, 2016](#) y [Garcia, 2016](#), ya que, de ser cierta esta interferencia el efecto del silenciamiento debería ser el mismo en amastigotes que en promastigotes y además si alguna de las proteínas que conforman el citoesqueleto, como la tubulina, fuera afectada esto debería traducirse en cambios de densidad o elasticidad de los parásitos, iguales a los que se observan cuando *Leishmania* cambia de estadio.

Por último, se debe destacar que el aumento en la densidad de los amastigotes de *L. braziliensis* identificado al comparar los valores presentados en los Cuadros **3-14** y **3-15** está relacionado con el hecho que esta cepa es la única que se transforma completamente de promastigote a amastigote en el cultivo *in vitro*, situación que no se presenta con las otras cepas de *Leishmania* lo cual se refleja en una disminución de la densidad del amastigote en lugar de un aumento.

Con esto se concluye el estudio del movimiento de los parásitos de *Leishmania* en el campo acústico donde se tuvo presente los resultados encontrados experimentalmente con los dispositivos construidos y los teóricos determinados a partir del modelo 3D desarrollado en el Capítulo 2. Para terminar este documento en el siguiente capítulo se presentan las

conclusiones más importantes del trabajo.

## Conclusiones

La simulación y los dispositivos acústicos desarrollados permitieron por primera vez realizar un estudio teórico-experimental del comportamiento de parásitos expuestos a un campo acústico.

### 4.1. Modelo Teórico y Simulación

Por primera vez se presenta un modelo teórico tridimensional el cual permite estudiar y predecir la dinámica colectiva de partículas o células con ultrasonidos.

En el Capítulo 1 al determinar las expresiones teóricas de la  $\vec{F}_{pr}$  en tres dimensiones para las dos condiciones de frontera definidas en dirección  $x$ , ecuaciones (1-205) y (1-214), se evidencio que las componentes de esta fuerza no son independientes entre sí puesto que se hallaron términos adicionales que multiplican la fuerza unidimensional en cada componente, los cuales depende de los números de onda y de las coordenadas  $x$ ,  $y$  y  $z$  en el espacio, indicando que existe un fenómeno de interferencia entre las ondas estacionarias relacionado con la vibración del dispositivo en las tres dimensiones.

El modelo teórico 3D desarrollado en este trabajo confirma diferentes comportamientos de alineación y agregación dependiendo las condiciones de frontera de la cámara resonante.

El estudio tridimensional del movimiento hecho en el Capítulo 2 con la simulación computacional ratifica que las componentes de la  $\vec{F}_{pr}$  3D no son independientes entre si, ya que existe interferencia entre las ondas estacionarias que afecta la dinámica de las partículas en el dispositivo.

## 4.2. Experimental

Se desarrollaron dispositivos acústico para manipular parásitos y hacer estudios de compresibilidad.

Se usaron ultrasonidos como una nueva herramienta tecnológica para estudiar cambios en el ciclo de vida del parásito.

## 4.3. Medición de Propiedades Físicas en Parásitos de *Leishmania*

En este trabajo se estandarizó una metodología para medir la densidad de células usando la ecuación (3-40) obtenida de gradientes discontinuos de Percoll , ecuación que es válida siempre y cuando se mantengan las condiciones descritas.

Se propuso a partir de los valores máximos de la  $\vec{F}_{pr}$  una forma indirecta de estimar la compresibilidad celular con la densidad usando las expresiones lineales (3-33) y (3-34) .

Como se describió en el ciclo de vida de *Leishmania*, estos parásitos cambian de forma para adaptarse a los diferentes ambientes a los cuales son expuestos, sin embargo, este mecanismo de adaptación no solo implica variaciones en la forma del parásito sino que, además, se relaciona con modificaciones significativas de las propiedades físicas del parásito tales como volumen, densidad y elasticidad, efecto que se evidencio al medir estas propiedades en las diferentes cepas de *Leishmania* en estado amastigote y promastigote, Cuadros 3-10, 3-11, 3-14 y 3-14.

Los parásitos en estadio promastigote tienen mayor densidad, compresibilidad y volumen que los parásitos de las mismas cepas en estadio amastigote , Cuadros 3-10, 3-11, 3-14 y 3-14. Efecto en las propiedades que afecta directamente la magnitud de la  $\vec{F}_{pr}$ , la cual, es mayor en promastigotes que en amastigotes, como se identifica al comparar la Figura 3-47 con la Figura 3-49.

El cambio en las propiedades físicas del parásito cuando este pasa de su estadio promastigote a amastigote está relacionado con la modificación de su citoesqueleto que es afectado por la disminución en la producción de tubulina durante su transformación. Este efecto en el citoesqueleto del parásito conlleva a una disminución considerable en la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$ , como se evidencia en las Figuras 3-47 y 3-49.

Usando los dispositivos acústicos construidos se determinó experimentalmente que promasti-

gotes y amastigotes tiene un factor de contraste acústico  $\phi$  positivo, puesto que estas células al ser expuestas al campo acústico generan agregados en el centro del dispositivo donde se ubica el nodo de presión de la onda estacionaria, Figuras 3-36 a 3-40 y 3-44 a 3-47.

#### 4.4. $\vec{F}_{pr}$ y Parásitos de *Leishmania*

Aunque se generen cambios significativos en las propiedades físicas de los parásitos, al cambiar todas las propiedades simultáneamente, estas variaciones pueden ser compensadas dando como resultado la misma intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  en diferentes cepas de parásitos. Situación que se presentó con los amastigotes, cepas pSP y WT B., las cuales, a pesar de tener volumen, densidad y elasticidad diferentes, Cuadros 3-10 y 3-15, experimentan una  $\vec{F}_{pr}$  de la misma magnitud, Figura 3-51b y 3-51d.

Con la medición de las propiedades físicas y la estimación de la intensidad de la  $\vec{F}_{pr}$  en las cepas de parásitos WT T. y E1 se logró establecer que el silenciamiento del gen *LbrM01 V2.0210 (LbCLC-A)* afecta más a los promastigotes que a los amastigotes, en concreto, modifica significativamente el volumen de los promastigotes, manteniendo constante su densidad y compresibilidad. Resultado, que pone en duda la interferencia del constructo diseñado sobre la tubulina puesto que no se detectaron modificaciones en la densidad y compresibilidad de los parásitos que evidenciaran un efecto sobre el citoesqueleto.

#### 4.5. Recomendaciones y Perspectivas

Comparar las medidas indirectas de elasticidad de parásitos con medidas directas obtenidas por microscopia de fuerza atómica o por alguna técnica desarrollada con acustofluídica que permita medir directamente el módulo volumétrico usando campos acústicos de ondas estacionarias.

Optimizar el modelo teórico 3D con promastigotes al considerar en la simulación una expresión sencilla de la  $\vec{F}_{pr}$  calculada para objetos de forma cilíndrica.

Incluir el flujo en el modelo físico 3D y en el estudio experimental.

Medir densidad y elasticidad en las cepas C1 y C3 para evidenciar si el silenciamiento del gen *LbrM32 V2.3670* genera efectos en la  $\vec{F}_{pr}$  que se relacionen con modificaciones en el citoesqueleto del parásito.

## Dinámica de Fluidos

El propósito en este apéndice es presentar de forma general cada una de las ecuaciones usadas en el estudio del movimiento de un fluido ecuación de continuidad, ecuación de Navier-Stokes y ecuación del estado termodinámico del fluido. Conocer la física detrás de estas expresiones permitirá en el cálculo de la  $\vec{F}_{prm}$  realizar las aproximaciones correspondientes teniendo en cuenta criterios físicos y ,además, ayudarán a interpretar adecuadamente la  $\vec{F}_{prm}$  lo que es conveniente al usar esta fuerza para caracterizar propiedades mecánicas de parásitos de *Leishmania*. Por ello, a continuación se describirá cada una de estas ecuaciones según la teoría presentada en [Landau & Lifshitz \(1991\)](#), [Feynman \*et al.\* \(1964\)](#) y [Bruss \(2008\)](#) .

### Ecuación de Continuidad

Ecuación de la mecánica de fluidos que expresa el principio de conservación de la masa en un fluido, entonces, para definir esta ecuación suponga que tiene un volumen de forma arbitraria  $V_o$  fijo en el espacio a través del cual fluye un líquido de densidad  $\rho$  a una velocidad  $\vec{v}$ , Figura [A-1](#)<sup>1</sup>. Si  $V_o$  es dividido en pequeños elementos de volumen infinitesimales  $dV$ , la masa total  $m$  contenida en este volumen puede ser escrita como

$$m = \int_{V_o} \rho dV \tag{A-1}$$

---

<sup>1</sup>Se debe resaltar que  $\rho$  y  $\vec{v}$  representan campos escalares y vectoriales, respectivamente, que varían en el espacio y el tiempo ( $\rho(x, y, z, t)$  y  $\vec{v}(x, y, z, t)$ ), campos, que según la descripción euleriana del movimiento de un fluido, están asociados con el volumen fijo  $V_o$  y no con un elemento de fluido.

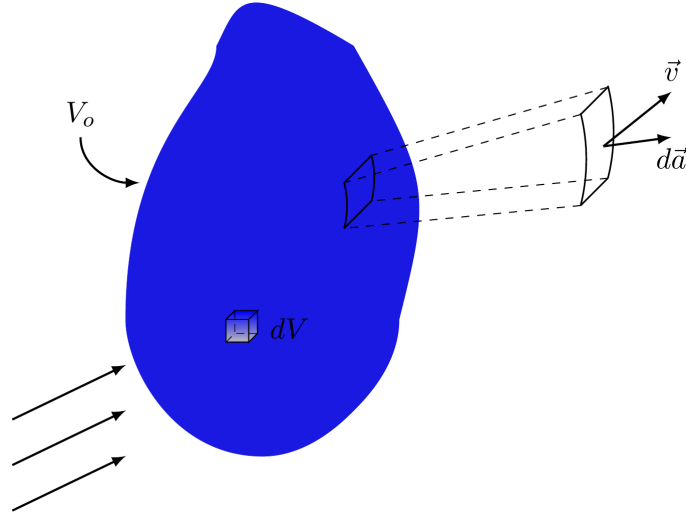


Figura A-1.: Volumen fijo  $V_o$  que es atravesado por un líquido a velocidad  $\vec{v}$ . Las flechas en la parte inferior izquierda representan la dirección del flujo.

Ahora, debido al movimiento del líquido, la disminución de la masa de fluido al interior de  $V_o$  por unidad de tiempo  $t$ , usando (A-1), es

$$\frac{\partial m}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial t} \int_{V_o} \rho dV \quad (\text{A-2})$$

Por otro lado, al dividir la superficie  $S$ , que encierra a  $V_o$ , en elementos de área infinitesimales  $da$  es posible definir el flujo de masa que pasa por unidad de tiempo como el producto punto entre el vector  $d\vec{a}$ , con magnitud igual al área del elemento  $da$  y dirección saliendo de la superficie, y el vector densidad de flujo másico o vector de momentum por unidad de volumen definido como

$$\vec{J} = \rho \vec{v} \quad (\text{A-3})$$

La dirección de  $\vec{J}$  corresponde a la del movimiento del fluido y su magnitud es igual a la cantidad de masa de fluido que está circulando en el tiempo a través del elemento de área  $da$ , Figura A-1. Entonces, la cantidad de masa que pasa en el tiempo a través de  $da$  está dada por

$$d\Phi_m = \rho \vec{v} \cdot d\vec{a} \quad (\text{A-4})$$

Donde  $d\Phi_m$  es positivo si el fluido sale de  $V_o$  o negativo si el fluido entra en  $V_o$ . Para calcular el flujo total de masa que pasa por  $V_o$  en el tiempo se integra sobre toda la superficie  $S$ , lo

que significa que se suman todos los flujos infinitesimales dados por (A-4), con lo cual se llega a

$$\Phi_m = \oint_S \rho \vec{v} \cdot d\vec{a} \quad (\text{A-5})$$

Note que tanto (A-2) y (A-5) representan que tanta masa atraviesa la superficie  $S$  en el tiempo, por lo tanto, igualando estas dos ecuaciones se obtiene

$$-\frac{\partial}{\partial t} \int_{V_o} \rho dV = \oint_S \rho \vec{v} \cdot d\vec{a} \quad (\text{A-6})$$

Usando el teorema de la divergencia en la parte derecha de (A-6) para reescribir la integral de superficie como una integral de volumen y aplicando el operador de derivada temporal sobre la densidad del líquido, la relación anterior toma la forma

$$-\int_{V_o} \frac{\partial \rho}{\partial t} dV = \int_{V_o} \nabla \cdot (\rho \vec{v}) dV \quad (\text{A-7})$$

Por último, igualando a cero y factorizando el operador  $\int dV$  en (A-7)

$$\int_{V_o} \left[ \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{v}) \right] dV = 0 \quad (\text{A-8})$$

Como esta integral debe ser válida para cualquier volumen, entonces, en (A-8) se debe cumplir que

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{v}) = 0 \quad (\text{A-9})$$

Donde (A-9) corresponde a la ecuación de continuidad de un líquido compresible. Si se estudia el movimiento de un fluido a escala micrométrica, como en aplicaciones de microfluídica, la velocidad del flujo es mucho menor que la velocidad de las ondas de presión, sonido, que se propagan en el líquido, por lo tanto,  $\rho$  se considera constante en el tiempo y el espacio (Bruss, 2008), lo que permite reescribir (A-9) en la forma

$$\nabla \cdot \vec{v} = 0 \quad (\text{A-10})$$

Expresión que corresponde a la ecuación de continuidad para un fluido incompresible.



## Ecuación de Movimiento Para el Fluido

Ésta ecuación permite estudiar el movimiento de un fluido a partir del análisis de las fuerzas que actúan sobre él, dependiendo de cómo son sus interacciones con el entorno el líquido se puede encontrar en estado de reposo o de movimiento. Por ejemplo, en ausencia de esfuerzo cortante y bajo la acción de un campo de fuerzas externo como el campo gravitacional el líquido estará sometido a dos tipos de fuerza una asociada a los esfuerzos normales, presión, y otra fuerza generada por la interacción de la masa del líquido con el campo gravitacional, peso; si la fuerza debida a la presión es balanceada por el peso el fluido alcanza un estado de equilibrio, reposo, en el cual la presión en su interior, conocida como presión hidrostática, varía linealmente con la profundidad. Por otro lado, si además de las fuerzas ya mencionadas, al líquido se le aplica una fuerza tangente a su superficie, esfuerzo de corte, éste se moverá debido a que la interacción entre sus moléculas no es fuerte comparada con las fuerzas entre las moléculas de un sólido. La facilidad con la que el fluido cede bajo la acción de un esfuerzo de corte depende de como interactúan las diferentes capas del fluido, característica que es determinada por su fricción interna o viscosidad. Entonces, teniendo en cuenta estos tres tipos de fuerzas es posible escribir de forma general la ecuación de movimiento para un fluido, al aplicar la segunda ley de Newton sobre un elemento de volumen  $V_o$  de éste, como

$$\Sigma \vec{f} = \vec{f}_{neta} = \vec{f}_p + \vec{f}_{ext} + \vec{f}_{vis} \quad (\text{A-11})$$

Donde  $\vec{f}_{neta}$  representa la fuerza neta por unidad de volumen que actúa sobre el líquido,  $\vec{f}_p$  es la fuerza por unidad de volumen asociada a la presión,  $\vec{f}_{ext}$  es la fuerza por unidad de volumen relacionada con campos externos y  $\vec{f}_{vis}$  corresponde a una fuerza interna por unidad de volumen vinculada con las fuerzas tangentes que actúan sobre la superficie  $S$  que encierra el volumen  $V_o$  de líquido. Si el fluido no está en reposo y se encuentra acelerado la ecuación (A-11) toma la forma

$$\rho \vec{a} = \vec{f}_p + \vec{f}_{ext} + \vec{f}_{vis} \quad (\text{A-12})$$

Siendo  $\rho$  la densidad del líquido y  $\vec{a}$  el campo vectorial de aceleración. Es importante resaltar que en (A-12) el campo  $\vec{a}$  así como el campo vectorial de velocidad  $\vec{v}$ , que es solución de esta ecuación, son definidos según la descripción euleriana del movimiento de un fluido, es decir, que estos campos contienen, en su expresión matemática, una parte que evoluciona en el tiempo  $t$  en una posición  $\vec{r}$  fija del espacio. Teniendo presente esto, a continuación se describen las ecuaciones de movimiento para dos casos: el primero esta relacionado con un fluido donde se desprecian las fuerzas de fricción, viscosidad, y la acción de campos externos, ecuación de Euler. Y el segundo para un fluido en el cual se consideran los efectos disipativos, es decir, las fuerzas relacionadas con la viscosidad del líquido, ecuación de Navier-Stokes.

## Ecuación de Euler

Suponga que tiene un líquido contenido en el volumen fijo  $V_o$  sobre el que no actúan fuerzas de campos externos ni fuerzas relacionadas con la viscosidad, por lo tanto, la única fuerza que se ejerce sobre este volumen de fluido está relacionada con los esfuerzos normales, entonces, bajo esta condición la ecuación de movimiento (A-12) toma la forma

$$\rho \frac{d\vec{v}}{dt} = \vec{f}_p \quad (\text{A-13})$$

Donde  $\frac{d\vec{v}}{dt}$  representa el campo vectorial de aceleración  $\vec{a}$ . Ahora, para encontrar  $\vec{f}_p$  se define la fuerza total que actúa sobre toda la superficie  $S$ , que encierra al volumen de líquido  $V_o$ , como la suma de la presión  $p$  ejercida sobre cada elemento de área  $da$ , con lo que se obtiene

$$\vec{F}_p = - \oint_S p d\vec{a} \quad (\text{A-14})$$

El signo menos en (A-14) indica que  $\vec{F}_p$  tiene sentido contrario al vector de área  $d\vec{a}$ , es decir, que su dirección es hacia el interior del volumen. Aplicado el teorema de la divergencia en (A-14)

$$\vec{F}_p = - \oint_S p d\vec{a} = - \int_{V_o} \nabla p dV \quad (\text{A-15})$$

Dividiendo (A-15) por el volumen se define la fuerza por unidad de volumen relacionada con la presión como

$$\vec{f}_p = -\nabla p \quad (\text{A-16})$$

Sustituyendo (A-16) en la ecuación de movimiento (A-13)

$$\frac{d\vec{v}}{dt} = -\frac{1}{\rho} \nabla p \quad (\text{A-17})$$

Para calcular la derivada de la velocidad con respecto al tiempo en (A-17) se debe resaltar que ésta derivada designa la variación respecto al tiempo de la velocidad de una partícula de fluido<sup>2</sup> determinada cuando la partícula se mueve en el espacio, cantidad que está asociada con puntos fijos del espacio. Lo anterior se evidencia, notando que la variación de velocidad

<sup>2</sup>Una partícula de fluido es un volumen muy pequeño de fluido en comparación con el volumen total del sistema pero grande al contrastarlo con las distancias entre las moléculas (Landau & Lifshitz, 1991).

$d\vec{v}$  de una partícula de fluido esta compuesta por la rapidez a la que cambia la velocidad con el tiempo en un punto fijo del espacio más la diferencia, en el mismo instante de tiempo, entre las velocidades para dos puntos del espacio separados una distancia  $d\vec{r}$ , siendo  $d\vec{r}$  el desplazamiento realizado por la partícula de fluido durante el mismo intervalo de tiempo (Landau & Lifshitz, 1991), por lo tanto,  $d\vec{v}$  puede ser escrita como

$$d\vec{v} = \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} \right) dt + (d\vec{r} \cdot \nabla) \vec{v} \quad (\text{A-18})$$

Donde el segundo miembro en la parte derecha de (A-18) representa

$$(d\vec{r} \cdot \nabla) \vec{v} = dx \frac{\partial \vec{v}}{\partial x} + dy \frac{\partial \vec{v}}{\partial y} + dz \frac{\partial \vec{v}}{\partial z} \quad (\text{A-19})$$

Si la variación  $d\vec{v}$ , definida por (A-18), ocurre en un intervalo de tiempo  $dt$ , la derivada temporal de  $\vec{v}$  en (A-17) toma la forma

$$\frac{d\vec{v}}{dt} = \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} \right) \frac{dt}{dt} + \left( \frac{d\vec{r}}{dt} \cdot \nabla \right) \vec{v} \quad (\text{A-20})$$

$$\frac{d\vec{v}}{dt} = \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \quad (\text{A-21})$$

Remplazando (A-21) en (A-17) se llega a

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\frac{1}{\rho} \nabla p \quad (\text{A-22})$$

(A-22) es la ecuación de movimiento en notación vectorial para un fluido ideal conocida como ecuación de Euler, obtenida por primera vez por L. Euler en 1755 (Landau & Lifshitz, 1991); es importante resaltar que los fluidos estudiados con (A-22) son considerados ideales porque en ellos se desprecia los procesos de disipación de la energía.

Sin embargo, como las fuerzas que actúan sobre la superficie  $S$  pueden estar dirigidas en distintas direcciones respecto a la dirección de orientación de la superficie, se ejerce sobre el volumen  $V_o$  de fluido encerrado por  $S$  diferentes esfuerzos, por lo tanto, para describir todos los esfuerzos que actúan sobre  $V_o$  es necesario expresar (A-22) usando cantidades de estructura más compleja que los vectores, conocidas como tensores, las cuales recogen esta información al ser especificados mediante nueve elementos que dependen de las tres direcciones del espacio y de la dirección del vector normal a la superficie en cada punto.

Entonces, para representar (A-22) de forma tensorial primero se define el tensor de densidad de flujo de momentum  $\Pi_{ik}$  (Landau & Lifshitz, 1991), el cual se determina al calcular el flujo asociado con la cantidad de movimiento transportada por el fluido, por lo tanto, derivando respecto al tiempo la cantidad de momentum por unidad de volumen dada en (A-3) se obtiene

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho \vec{v}) = \rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \frac{\partial \rho}{\partial t} \vec{v} \quad (\text{A-23})$$

Reescribiendo (A-9), (A-22) y (A-23), respectivamente, usando notación tensorial<sup>3</sup>

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = - \frac{\partial (\rho v_k)}{\partial x_k} \quad (\text{A-24})$$

$$\frac{\partial v_i}{\partial t} = -v_k \frac{\partial v_i}{\partial x_k} - \frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x_i} \quad (\text{A-25})$$

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho v_i) = \rho \frac{\partial v_i}{\partial t} + \frac{\partial \rho}{\partial t} v_i \quad (\text{A-26})$$

Sustituyendo (A-24) y (A-25) en (A-26) se llega a

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho v_i) = \rho \left( -v_k \frac{\partial v_i}{\partial x_k} - \frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x_i} \right) + \left( - \frac{\partial (\rho v_k)}{\partial x_k} \right) v_i \quad (\text{A-27})$$

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho v_i) = -\rho v_k \frac{\partial v_i}{\partial x_k} - \frac{\partial p}{\partial x_i} - v_i \frac{\partial (\rho v_k)}{\partial x_k} \quad (\text{A-28})$$

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho v_i) = - \frac{\partial p}{\partial x_i} - \left[ v_i \frac{\partial (\rho v_k)}{\partial x_k} + \rho v_k \frac{\partial v_i}{\partial x_k} \right] \quad (\text{A-29})$$

Los términos entre paréntesis cuadrados en (A-29) corresponden a la derivada espacial del producto  $\rho v_i v_k$ , es decir, que

$$\frac{\partial}{\partial x_k} (\rho v_i v_k) = \frac{\partial (v_i \rho v_k)}{\partial x_k} = v_i \frac{\partial (\rho v_k)}{\partial x_k} + \rho v_k \frac{\partial v_i}{\partial x_k} \quad (\text{A-30})$$

<sup>3</sup>La notación tensorial de este trabajo es tomada del libro Landau & Lifshitz (1991) en la cual los índices latinos  $i$  y  $k$  toman valores de 1, 2, 3 que corresponden a las componentes del vector o tensor en la dirección  $x$ ,  $y$ ,  $z$ , respectivamente. Si se tiene el producto punto entre dos vectores, este producto puede ser expresado con esta notación como  $\vec{A} \cdot \vec{B} = A_1 B_1 + A_2 B_2 + A_3 B_3 = \Sigma A_i B_i = A_i B_i$ . Donde el índice repetido, en el último término a la derecha de la expresión anterior, representa la suma.

Con lo anterior, al introducir (A-30) en (A-29) se tiene

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho v_i) = -\frac{\partial p}{\partial x_i} - \frac{\partial}{\partial x_k}(\rho v_i v_k) \quad (\text{A-31})$$

Ahora escribiendo el primer término a la derecha de (A-31) usando el tensor identidad<sup>4</sup>  $\delta_{ik}$  cuyas componentes equivalen a la unidad si  $i = k$  o son cero si  $i \neq k$ , entonces

$$\frac{\partial p}{\partial x_i} = \delta_{ik} \frac{\partial p}{\partial x_k} \quad (\text{A-32})$$

Remplazando (A-32) en (A-31) y factorizando el operador  $\frac{\partial}{\partial x_k}$  se obtiene

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho v_i) = -\delta_{ik} \frac{\partial p}{\partial x_k} - \frac{\partial}{\partial x_k}(\rho v_i v_k) \quad (\text{A-33})$$

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho v_i) = -\frac{\partial}{\partial x_k}(p\delta_{ik} + \rho v_i v_k) \quad (\text{A-34})$$

Definiendo el factor entre paréntesis como el tensor de densidad de flujo de momentum  $\Pi_{ik}$ , el cual, según esta notación, representa la componente  $i$  del momentum que fluye por unidad de tiempo a través de un elemento de área infinitesimal perpendicular a la dirección  $x_k$  (Landau & Lifshitz, 1991), cuya ecuación se encuentra dada por

$$\Pi_{ik} = p\delta_{ik} + \rho v_i v_k \quad (\text{A-35})$$

Es importante notar que (A-35) corresponde a una transferencia de momentum reversible debida al transporte mecánico de las partículas de fluido de un lugar a otro y a las fuerzas asociadas con la presión que actúa en el fluido (Landau & Lifshitz, 1991). Para terminar, se sustituye (A-35) en (A-34), con lo cual se puede escribir la ecuación de Euler en términos de  $\Pi_{ik}$  como

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho v_i) = -\frac{\partial \Pi_{ik}}{\partial x_k} \quad (\text{A-36})$$

Las ecuaciones (A-10) y (A-22), cuya representación tensorial esta dada por (A-36), fueron usadas inicialmente por King (1934) para calcular la  $\vec{F}_{prm}$  sobre partículas esféricas rígidas,

<sup>4</sup>Al igual que otros tensores como el de polarización, el de conductividad o el de inercia el tensor  $\delta_{ik}$  permite relacionar un vector con otro de la siguiente manera  $A_i = \delta_{ik} A_k$  siendo  $A_i$  un vector cualquiera. Análogamente, para relaciones entre tensores, si  $A_{kl}$  es un tensor de rango dos, se tienen las expresiones  $A_{il} = \delta_{ik} A_{kl}$  y  $A_{ii} = \delta_{ik} A_{ik}$  (Landau & Lifshitz, 1991).

luego Yosioka & Kawaaima (1955) y Gor'kov (1962) tomaron las relaciones (A-9) y (A-22), complementando el trabajo hecho por King (1934), desarrollando lo que actualmente se conoce como teoría clásica de la  $\vec{F}_{prm}$ . Teoría que fue modificada posteriormente por Doinikov (1997a) y Settnes & Bruus (2012) al incluir efectos disipativos relacionados con la viscosidad del líquido en (A-22).

Entonces, para incluir efectos disipativos relacionados con la viscosidad del líquido en (A-22) o (A-36) a continuación se establece a partir de (A-12) la ecuación de movimiento para un líquido en el caso más general. Ecuación que es fundamental en la teoría propuesta por Doinikov (1997a) y más recientemente en los desarrollos teóricos realizados por Settnes & Bruus (2012) para la utilización de la  $\vec{F}_{prm}$  en la manipulación de poblaciones de tamaño micrométrico.

## Ecuación de Navier-Stokes

Para determinar esta expresión se parte de la ecuación de movimiento (A-12), la cual, al despreciar las fuerzas debidas a campos externos, toma la forma

$$\rho \vec{a} = \vec{f}_p + \vec{f}_{vis} \quad (\text{A-37})$$

Recordando que  $\vec{f}_p$  y  $\vec{f}_{vis}$  son densidades de fuerza relacionadas con los esfuerzos normales y de corte respectivamente, es decir, que estas densidades se asocian con fuerzas que actúan sobre la superficie  $S$  que encierra al volumen de fluido  $V_o$ . Por lo tanto, al agrupar estas dos densidades, (A-37) puede ser definida en términos de la densidad de fuerza superficial  $\vec{f}_{sup}$  como

$$\rho \frac{d\vec{v}}{dt} = \vec{f}_{sup} \quad (\text{A-38})$$

Donde  $\vec{f}_{sup} = \vec{f}_p + \vec{f}_{vis}$  es la fuerza superficial por unidad de volumen. Para definir la expresión de  $\vec{f}_{sup}$ , es necesario resaltar, según se menciono al escribir la ecuación de Euler en forma tensorial, que las fuerzas superficiales  $\vec{F}_{sup}$  asociadas con  $\vec{f}_{sup}$  no tienen una dirección privilegiada, es decir, que pueden estar orientadas hacia cualquier dirección en el espacio lo que genera sobre el volumen de líquido  $V_o$  diferentes tipos de esfuerzos. Entonces, para describir todos los esfuerzos asociados a  $\vec{F}_{sup}$  es indispensable introducir el tensor de segundo rango  $\sigma_{ik}$  conocido como tensor de esfuerzo o de tensiones<sup>5</sup> el cual contiene en sus nueve componentes elementos que representan los esfuerzos normales, presiones, y los esfuerzos

<sup>5</sup>En esta notación cada elemento  $\sigma_{ik}$  representa el esfuerzo generado en la dirección  $k$  que actúa sobre una superficie con vector normal en dirección  $i$ .

de corte relacionados con la viscosidad. Por lo tanto, si la fuerza  $d\vec{F}_{sup}$  que actúa sobre un elemento infinitesimal de área  $da$  esta dada por

$$d\vec{F}_{sup} = \sigma_{ik} \cdot d\vec{a} \quad (\text{A-39})$$

Al sumar todas las fuerzas (A-39) que actúan en cada elemento  $da$  se encuentra que la  $\vec{F}_{sup}$  que se ejerce sobre la superficie  $S$  es

$$\vec{F}_{sup} = \oint_s \sigma_{ik} \cdot d\vec{a} \quad (\text{A-40})$$

Aplicando el teorema de la divergencia a (A-40) se reescribe la integral de superficie como una integral de volumen, lo que permite expresar la  $\vec{F}_{sup}$  en la forma

$$\vec{F}_{sup} = \int_{V_o} \nabla \cdot \sigma_{ik} dV \quad (\text{A-41})$$

Dividiendo la fuerza superficial descrita por (A-41) entre el volumen, se tiene que  $\vec{f}_{sup}$  esta dada por

$$\vec{f}_{sup} = \nabla \cdot \sigma_{ik} \quad (\text{A-42})$$

Sustituyendo (A-21) y (A-42) en la ecuación de movimiento (A-38) se llega a

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right) = \nabla \cdot \sigma_{ik} \quad (\text{A-43})$$

Para especificar completamente esta ecuación de movimiento se debe determinar  $\sigma_{ik}$ , por consiguiente, a continuación, empleando la notación tensorial definida previamente, se establecerá la forma de éste tensor.

### Tensor de Esfuerzo $\sigma_{ik}$

Con el objetivo de obtener la expresión que describe a  $\sigma_{ik}$  primero se le suma al tensor  $\Pi_{ik}$ , dado por la ecuación (A-35), el termino  $-\sigma'_{ik}$ , el cual corresponde al tensor de esfuerzo viscoso<sup>6</sup> que representa la transferencia de momentum irreversible en el fluido asociada con

<sup>6</sup>En esta notación cada elemento de  $\sigma'_{ik}$  representa el esfuerzo asociado con la componente  $i$  de la fuerza de fricción por unidad de área que actúa sobre un elemento de superficie orientado con su vector normal paralelo a la dirección del espacio  $k$  (Bruss, 2008).

la fricción interna del líquido o viscosidad (Landau & Lifshitz, 1991). Entonces, al adicionar este factor en (A-35) el tensor  $\Pi_{ik}$  para un fluido viscoso toma la forma<sup>7</sup>

$$\Pi_{ik} = p\delta_{ik} - \sigma'_{ik} + \rho v_i v_k \quad (\text{A-44})$$

Agrupando en (A-44) los términos de presión y viscosidad al factorizar el signo menos, se llega a

$$\Pi_{ik} = -(\sigma'_{ik} - p\delta_{ik}) + \rho v_i v_k \quad (\text{A-45})$$

$$\Pi_{ik} = -\sigma_{ik} + \rho v_i v_k \quad (\text{A-46})$$

Donde el factor entre paréntesis en (A-45) corresponde a  $\sigma_{ik}$ , es decir, que el tensor de esfuerzo tiene la forma

$$\sigma_{ik} = \sigma'_{ik} - p\delta_{ik} \quad (\text{A-47})$$

Para especificar completamente a  $\sigma_{ik}$  es necesario en (A-47) definir el tensor  $\sigma'_{ik}$  el cual está relacionado con la viscosidad. Por lo tanto, si los procesos de fricción interna en un fluido se presentan cuando las partículas de fluido se mueven con velocidades diferentes lo que genera entre ellas un movimiento relativo que implica una dependencia del tensor  $\sigma'_{ik}$  con el gradiente de velocidad (Landau & Lifshitz, 1991), es posible definir  $\sigma'_{ik}$  mediante el esfuerzo de corte que, en el caso de un líquido, es directamente proporcional a la derivada espacial de la velocidad (Feynman *et al.*, 1964) según la relación

$$\sigma' = \frac{\Delta F}{\Delta A} = \eta \frac{\partial v_i}{\partial x_k} \quad (\text{A-48})$$

Donde  $\eta$  se conoce como viscosidad dinámica la cual es una constante positiva si la temperatura y presión no cambia significativamente en el fluido (Landau & Lifshitz, 1991) y  $\sigma'$  es el esfuerzo de corte o cizalla calculado mediante la componente de la fuerza en dirección  $i$  que es tangente a una superficie con vector normal paralelo a la dirección  $k$ . Ahora, suponiendo un caso más general donde la superficie  $S$ , que encierra el volumen de líquido  $V_o$ , está sometida a la acción de varias fuerzas tangentes al mismo tiempo, se define, según (A-48), el tensor

<sup>7</sup>El procedimiento aquí descrito es equivalente a incluir en la ecuación de Euler el término de las fuerzas viscosas con lo cual se obtiene la ecuación (A-43).



$\sigma'_{ik}$  asociado con todos los esfuerzos de corte sobre  $S$ , mediante combinaciones lineales de las derivadas  $\partial v_i / \partial x_k$  (Feynman *et al.*, 1964), en la forma

$$\sigma'_{ik} = \eta \left( \frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} \right) \quad (\text{A-49})$$

Combinaciones que se deben anular si el líquido rota con velocidad angular constante puesto que no debe existir esfuerzos de corte en un fluido con rotación uniforme (Landau & Lifshitz, 1991) (Feynman *et al.*, 1964). Por tal razón, si el fluido rota de esta manera es necesario que la segunda derivada en (A-49) satisfaga la igualdad  $\partial v_k / \partial x_i = -\partial v_i / \partial x_k$ , con la cual, esta ecuación se hace cero cumpliendo con la condición mencionada. Si además, de lo anterior se considera que el fluido es compresible, suposición importante al estudiar ondas sonoras que se propagan en líquidos, el tensor de esfuerzo viscoso dado por (A-49) contiene otro término adicional relacionado con fuerzas internas en el líquido durante la compresión (Feynman *et al.*, 1964) y cuya forma vectorial esta dada por

$$b \nabla \cdot \vec{v} \quad (\text{A-50})$$

Donde la constante  $b$  puede ser expresada como

$$b = \zeta - \frac{2}{3}\eta \quad (\text{A-51})$$

Siendo  $\zeta$  el segundo coeficiente de viscosidad que permanece constante, al igual que  $\eta$ , si la temperatura y presión no varían considerablemente en el fluido (Landau & Lifshitz, 1991). Se debe notar que (A-50) aparece solo si el líquido es compresible de lo contrario, según (A-10), este factor se hace cero. Ahora reemplazando (A-51) en (A-50) el término adicional es expresado, usando notación tensorial, en la forma

$$\left( \zeta - \frac{2}{3}\eta \right) \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \quad (\text{A-52})$$

Sumando (A-52) a (A-49) se obtiene que

$$\sigma'_{ik} = \eta \left( \frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} \right) + \left( \zeta - \frac{2}{3}\eta \right) \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \quad (\text{A-53})$$

Operando el término final en la parte derecha de la ecuación anterior y tomando la viscosidad dinámica  $\eta$  como factor común se llega a

$$\sigma'_{ik} = \eta \left( \frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} - \frac{2}{3} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \right) + \zeta \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \quad (\text{A-54})$$

Sustituyendo (A-54) en (A-47) se concluye que la forma del tensor de esfuerzo, el cual describe el movimiento de un fluido viscoso según la ecuación (A-43), es

$$\sigma_{ik} = -p\delta_{ik} + \eta \left( \frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} - \frac{2}{3} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \right) + \zeta \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \quad (\text{A-55})$$

El siguiente paso es usar el tensor definido por (A-55) para especificar completamente la ecuación de movimiento (A-43). Para ello, se determina la divergencia de (A-55), la cual se expresa en forma tensorial como

$$\nabla \cdot \sigma_{ik} = \frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = \frac{\partial}{\partial x_k} \left[ -p\delta_{ik} + \eta \left( \frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} - \frac{2}{3} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \right) + \zeta \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \right] \quad (\text{A-56})$$

Aplicando la derivada espacial a cada uno de los elementos de  $\sigma_{ik}$  asumiendo  $\eta$  y  $\zeta$  constantes

$$\frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = -\frac{\partial}{\partial x_k} (\delta_{ik} p) + \eta \frac{\partial}{\partial x_k} \left( \frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} - \frac{2}{3} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \delta_{ik} \right) + \zeta \frac{\partial}{\partial x_k} \left( \delta_{ik} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \right) \quad (\text{A-57})$$

$$\frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = -\frac{\partial}{\partial x_k} (\delta_{ik} p) + \eta \left( \frac{\partial^2 v_i}{\partial x_k^2} + \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_k}{\partial x_k} - \frac{2}{3} \frac{\partial}{\partial x_k} \left( \delta_{ik} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \right) \right) + \zeta \frac{\partial}{\partial x_k} \left( \delta_{ik} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \right) \quad (\text{A-58})$$

Tomando en la ecuación anterior los términos de  $\delta_{ik}$  diferentes de cero, es decir, que  $i = k$  en los factores de (A-58) que depende de éste tensor, se obtiene

$$\frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \eta \left( \frac{\partial^2 v_i}{\partial x_k^2} + \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_k}{\partial x_k} - \frac{2}{3} \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \right) + \zeta \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \quad (\text{A-59})$$

Haciendo el índice mudo  $k = i$  en la derivada  $\partial v_k / \partial x_k$ , operando términos y factorizando se llega a

$$\frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \eta \left( \frac{\partial^2 v_i}{\partial x_k^2} + \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} - \frac{2}{3} \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \right) + \zeta \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \quad (\text{A-60})$$

$$\frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \eta \left( \frac{\partial^2 v_i}{\partial x_k^2} + \left( 1 - \frac{2}{3} \right) \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \right) + \zeta \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \quad (\text{A-61})$$

$$\frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \eta \frac{\partial^2 v_i}{\partial x_k^2} + \frac{1}{3} \eta \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} + \zeta \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \quad (\text{A-62})$$

$$\frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \eta \frac{\partial^2 v_i}{\partial x_k^2} + \left( \zeta + \frac{1}{3} \eta \right) \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial v_l}{\partial x_l} \quad (\text{A-63})$$

Escribiendo (A-63) en notación vectorial

$$\nabla \cdot \sigma_{ik} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{v} + \left( \zeta + \frac{1}{3} \eta \right) \nabla (\nabla \cdot \vec{v}) \quad (\text{A-64})$$

Remplazando (A-64) en (A-43) se obtiene que la ecuación de movimiento para un fluido viscoso y compresible, en forma vectorial, es

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{v} + \left( \zeta + \frac{1}{3} \eta \right) \nabla (\nabla \cdot \vec{v}) \quad (\text{A-65})$$

Si el fluido es incompresible se sustituye la ecuación de continuidad (A-10) en (A-65), con lo cual se obtiene que la ecuación de movimiento para un líquido viscoso e incompresible está dada por

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{v} \quad (\text{A-66})$$

Para terminar, se reescribe la ecuación (A-65) usando una constante adimensional definida a partir de la razón entre las viscosidades (Bruss, 2008) como

$$\xi = \frac{\zeta}{\eta} + \frac{1}{3} \quad (\text{A-67})$$

Cuyo valor medido experimentalmente para agua a  $25^\circ C$  es  $\approx 3,0$  (Laurell & Lenshof, 2015). Entonces operando la densidad en la parte izquierda de (A-65) y factorizando  $\eta$  en el último término a la derecha de ésta ecuación se encuentra que

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{v} + \eta \left( \frac{\zeta}{\eta} + \frac{1}{3} \right) \nabla (\nabla \cdot \vec{v}) \quad (\text{A-68})$$

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = \eta \nabla^2 \vec{v} + \eta \xi \nabla (\nabla \cdot \vec{v}) - \nabla p - \rho (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \quad (\text{A-69})$$

Donde (A-69) es la ecuación de Navier-Stokes escrita en la forma usada en el Capítulo 1 para determinar la  $\vec{F}_{prm}$  sobre una partícula esférica.

## Teoría de Perturbaciones

La teoría de perturbaciones permite encontrar soluciones analíticas aproximadas de ecuaciones diferenciales parciales no lineales acopladas, como el conjunto de ecuaciones (A-69) a partir de considerar una pequeña perturbación, respecto al equilibrio, de los campos escalares o vectoriales del sistema de ecuaciones a solucionar. Entonces suponga, como describe Bruss (2008), que un problema dado puede ser formulado en términos del operador diferencial  $\mathbf{D}$  actuando sobre un campo vectorial o escalar  $\mathcal{F}(\vec{r}, t)$ , por lo tanto el conjunto de ecuaciones diferenciales parciales, que describen el problema, se pueden escribir en la forma

$$\mathbf{D}\mathcal{F}(\vec{r}, t) = 0 \tag{B-1}$$

El objetivo al solucionar el conjunto de ecuaciones (B-1) es determinar la forma del campo  $\mathcal{F}(\vec{r}, t)$ . Para ello se asume que  $\mathbf{D}$  puede ser escrito como la serie:

$$\mathbf{D} = \mathbf{D}_o + \alpha\mathbf{D}_1 + \alpha^2\mathbf{D}_2 + \dots \tag{B-2}$$

Donde  $\mathbf{D}_o$  representa el operador diferencial en el problema mas sencillo, sin perturbar y  $\alpha$  es un termino adimensional conocido como parámetro de perturbación, el cual describe que tan lejos el problema a solucionar se desvía del caso no perturbado ( $\alpha = 0$ ). Como se observa en la ecuación (B-2) los factores perturbativos son proporcionales a términos de  $\alpha$  elevados a potencias igual o mayores que uno.

Ahora escribiendo  $\mathcal{F}(\vec{r}, t)$  en términos del parámetro  $\alpha$ , se tiene que la solución aproximada del problema se puede escribir como:

$$\mathcal{F} = \mathcal{F}_o + \alpha\mathcal{F}_1 + \alpha^2\mathcal{F}_2 + \dots \tag{B-3}$$

Sabiendo  $\alpha$  el objetivo de este problema es encontrar la solución aproximada calculando los campos  $\mathcal{F}_o, \mathcal{F}_1, \mathcal{F}_2, \dots$ . Para ello se remplazan las ecuaciones (B-2) y (B-3) en la ecuación (B-1) con lo que se obtiene:

$$(\mathbf{D}_o + \alpha \mathbf{D}_1 + \alpha^2 \mathbf{D}_2 + \dots) (\mathcal{F}_o + \alpha \mathcal{F}_1 + \alpha^2 \mathcal{F}_2 + \dots) = 0 \quad (\text{B-4})$$

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_o \mathcal{F}_o + \alpha \mathbf{D}_o \mathcal{F}_1 + \alpha^2 \mathbf{D}_o \mathcal{F}_2 \\ + \alpha \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_o + \alpha^2 \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_1 + \alpha^3 \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_2 \\ + \alpha^2 \mathbf{D}_2 \mathcal{F}_o + \alpha^3 \mathbf{D}_2 \mathcal{F}_1 + \alpha^4 \mathbf{D}_2 \mathcal{F}_2 + \dots = 0 \end{aligned} \quad (\text{B-5})$$

Agrupando los términos que tienen el mismo parámetro de perturbación

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_o \mathcal{F}_o + \alpha (\mathbf{D}_o \mathcal{F}_1 + \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_o) \\ + \alpha^2 (\mathbf{D}_o \mathcal{F}_2 + \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_1 + \mathbf{D}_2 \mathcal{F}_o) \\ + \alpha^3 (\mathbf{D}_1 \mathcal{F}_2 + \mathbf{D}_2 \mathcal{F}_1) + \alpha^4 \mathbf{D}_2 \mathcal{F}_2 + \dots = 0 \end{aligned} \quad (\text{B-6})$$

En la practica la mayoría de veces solo es necesario calcular hasta términos de segundo orden, por lo tanto, al despreciar todos los términos mayores o iguales a tercer orden en la ecuación (B-6), se obtiene la relación

$$\mathbf{D}_o \mathcal{F}_o + \alpha (\mathbf{D}_o \mathcal{F}_1 + \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_o) + \alpha^2 (\mathbf{D}_o \mathcal{F}_2 + \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_1 + \mathbf{D}_2 \mathcal{F}_o) = 0 \quad (\text{B-7})$$

Para que la ecuación (B-7) se satisfaga se deben cumplir las siguientes igualdades:

$$\mathbf{D}_o \mathcal{F}_o = 0 \quad (\text{B-8})$$

$$\mathbf{D}_o \mathcal{F}_1 + \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_o = 0 \quad (\text{B-9})$$

$$\mathbf{D}_o \mathcal{F}_2 + \mathbf{D}_1 \mathcal{F}_1 + \mathbf{D}_2 \mathcal{F}_o = 0 \quad (\text{B-10})$$

La expresión (B-8) representa una ecuación diferencial homogénea de orden cero ( $\alpha^0$ ) cuya solución no perturbada  $\mathcal{F}_o$  se encuentra analíticamente. Por otro lado la ecuación (B-9)

representa una ecuación diferencial no homogénea obtenida del primer orden de perturbación ( $\alpha^1$ ) cuyo campo solución  $\mathcal{F}_1$  puede ser calculado con  $\mathcal{F}_o$  que es la solución en la ecuación (B-8) de orden cero. Por último la expresión (B-10) es también una ecuación diferencial no homogénea definida a partir del segundo orden de perturbación ( $\alpha^2$ ) el campo solución  $\mathcal{F}_2$  de esta relación se calcula a partir de  $\mathcal{F}_o$  y  $\mathcal{F}_1$  que son las soluciones de las ecuaciones (B-8) y (B-9), respectivamente. Entonces, al solucionar el conjunto de ecuaciones (B-8), (B-9) y (B-10) se encuentran los campos  $\mathcal{F}_o, \mathcal{F}_1$  y  $\mathcal{F}_2$  los cuales permiten establecer la solución aproximada del problema, la cual a segundo orden esta dada por la ecuación:

$$\mathcal{F}(\vec{r}, t) = \mathcal{F}_o + \alpha \mathcal{F}_1 + \alpha^2 \mathcal{F}_2 \quad (\text{B-11})$$

Resumiendo el procedimiento anterior, se tiene que el objetivo del método de perturbaciones es calcular el campo aproximado  $\mathcal{F}(\vec{r}, t)$ , ecuación (B-3), de orden deseado encontrando los términos de mayor orden con términos de menor orden.

## Análisis Dimensional y Orden de Magnitud

El análisis dimensional de una cantidad física consiste en hacer explícitas sus dimensiones (longitud  $[L]$ , masa  $[M]$  y tiempo  $[T]$  en el caso mecánico) lo que permite comprobar mediante un análisis sencillo si la relación entre diferentes cantidades físicas tiene la forma correcta o no. Además, hacer este tipo de análisis sobre constantes o cantidades obtenidas al hallar una nueva ecuación permite dar significado físico a cantidades cuya interpretación física no es clara. Por otra parte, si se quiere determinar cuando una cantidad física es despreciable lo que ayuda a aproximar y simplificar una relación, o si lo que se desea es comparar una cantidad física con otras para saber si distintos fenómenos ocurren en la misma escala, es necesario definir el orden de magnitud, lo cual consiste en expresar el valor de la cantidad física en notación científica, es decir, en potencias de base 10.

Por lo tanto, el objetivo de este anexo es realizar análisis dimensional y calcular el orden de magnitud de algunas de las cantidades que se presentan en los diferentes capítulos del trabajo con el fin de comprender su significado físico y determinar, en el caso del orden de magnitud, cuando una cantidad puede ser despreciada al hacer una aproximación.

### Variación de la Presión con la Densidad a Entropía Constante

$$\left(\frac{\partial p}{\partial \rho}\right)_s = \frac{N/m^2}{kg/m^3} = \frac{Nm^3}{kgm^2} = \frac{Nm}{kg} \quad (C-1)$$

$$\left[\left(\frac{\partial p}{\partial \rho}\right)_s\right] = \frac{\frac{[M][L]^2}{[T]^2}}{[M]} = \frac{[M][L]^2}{[M][T]^2} = \frac{[L]^2}{[T]^2} \quad (C-2)$$

$$\left[\left(\frac{\partial p}{\partial \rho}\right)_s\right] = \left(\frac{[L]}{[T]}\right)^2 \quad (C-3)$$

En la expansión isoentrópica el termino relacionado con la derivada de presión en función de la densidad tiene unidades de velocidad al cuadrado como se evidencia en C-3. Lo que permite relacionar este factor con la velocidad del sonido ( $c_o$ ) en el medio, concluyendo que :

$$\left(\frac{\partial p}{\partial \rho}\right)_s = c_o^2 \quad (\text{C-4})$$

## Factor de Amortiguamiento Acústico $\gamma$

$$\gamma = \omega \frac{(1 + \xi) \eta}{2c_o^2 \rho_o} \quad (\text{C-5})$$

Recordando que  $\xi$  es un factor adimensional entonces las dimensiones de  $\gamma$  son

$$\gamma = \frac{\left(\frac{1}{s}\right) \left(\frac{kg}{m \cdot s}\right)}{\left(\frac{m^2}{s^2}\right) \left(\frac{kg}{m^3}\right)} \quad (\text{C-6})$$

$$[\gamma] = \frac{\frac{[M]}{[L][T]^2}}{\frac{[M]}{[L][T]^2}} = \frac{[M] [L] [T]^2}{[M] [L] [T]^2} = 1 \quad (\text{C-7})$$

Se concluye según el resultado anterior ecuación (C-7) que  $\gamma$  es un factor adimensional. Ahora para calcular el orden de magnitud de  $\gamma$  se definen para el caso del agua el valor de las constantes  $c_o$ ,  $\rho_o$ ,  $\eta$ , y  $\xi$ . Entonces, si la velocidad del sonido, la densidad y viscosidad del agua son, respectivamente,  $c_o = 1,5 \times 10^3 \frac{m}{s}$ ,  $\rho_o = 1000 \frac{kg}{m^3}$  y  $\eta = 1,002 \times 10^{-3} Pa \cdot s$  y por otro lado, si la constante adimensional  $\xi$  para el agua a  $25^\circ C$  toma el valor  $\xi = 3,0$  (Bruss, 2008). Por lo tanto, al asumir frecuencias  $f \geq 1,5 MHz$ , se tiene que

$$\omega = 2\pi f = 2\pi (1,5 \times 10^6 Hz) \quad (\text{C-8})$$

$$\omega = 3\pi \times 10^6 \frac{1}{s} \quad (\text{C-9})$$

Remplazando (C-9) y el valor de las constantes en (C-5) se llega a

$$\gamma = 3\pi \times 10^6 \frac{1(1+3)1,002 \times 10^{-3} Pa \cdot s}{s 2 \left(1,5 \times 10^3 \frac{m}{s}\right)^2 \left(1000 \frac{kg}{m^3}\right)} \quad (\text{C-10})$$



$$\gamma \approx 8,4 \times 10^{-6} \quad (\text{C-11})$$

De (C-11) se concluye que el factor de amortiguamiento acústico  $\gamma$  es pequeño ( $\gamma \ll 1$ ) y tiene un orden de magnitud de  $10^{-6}$  para el caso del agua.

## Densidad de Energía Acústica Potencial y Cinética

De las ecuaciones (1-133), (1-133) y (1-130) se tiene que el factor  $\langle E_P \rangle$  esta dado por

$$\langle E_P \rangle = \frac{1}{2\rho_o c_o^2} \langle p_1^2 \rangle \quad (\text{C-12})$$

el cual, se puede escribir en términos del módulo de elasticidad volumétrico del líquido  $\beta_f$  si se recuerda que  $\beta_f = \rho_o c_o^2$  o se puede relacionar con la compresibilidad del líquido  $\kappa_f$  si  $\kappa_f = 1/\beta_f$ , entonces, (C-12) puede ser escrita como

$$\langle E_P \rangle = \frac{1}{2\beta_f} \langle p_1^2 \rangle \quad (\text{C-13})$$

$$\langle E_P \rangle = \frac{\kappa_f}{2} \langle p_1^2 \rangle \quad (\text{C-14})$$

Pero independientemente de la definición usada  $\langle E_P \rangle$  tiene las mismas dimensiones, las cuales, al hacer análisis dimensional sobre (C-12) resultan ser

$$[E_P] = \frac{pa^2}{\frac{kg}{m^3} \frac{m^2}{s^2}} = \frac{\frac{N^2}{m^4}}{\frac{N \cdot m}{m^3}} = \frac{N^2 \cdot m^3}{N \cdot m^5} \quad (\text{C-15})$$

$$[E_P] = \frac{N \cdot m}{m^3} = \frac{J}{m^3} \quad (\text{C-16})$$

$$[E_P] = \frac{\left(\frac{kg \cdot m}{s^2}\right) \cdot m}{m^3} = \frac{\frac{kg \cdot m^2}{s^2}}{\frac{m^3}{1}} = \frac{[M] \cdot [L]^2}{[T]^2 \cdot [L]^3} \quad (\text{C-17})$$

$$[E_P] = \frac{[M]}{[T]^2 \cdot [L]} \quad (\text{C-18})$$

Las dimensiones de  $\langle E_P \rangle$  corresponden a una cantidad que se puede interpretar como energía por unidad de volumen según se evidencia en (C-16) y (C-18), es decir, que  $\langle E_P \rangle$  representa el promedio de densidad de energía potencial acústica asociada al medio y que depende de las propiedades elásticas del mismo dadas por  $\beta_f$  o  $\kappa_f$ . Ahora, se toma de (1-133), (1-133) y (1-130) el término  $\langle E_k \rangle$  el cual tiene la forma

$$\langle E_k \rangle = \frac{\rho_o}{2} \langle v_1^2 \rangle \quad (\text{C-19})$$

Haciendo el análisis dimensional de  $\langle E_k \rangle$  se obtiene

$$[E_k] = \frac{kg \ m^2}{m^3 \ s^2} = \frac{N \cdot m}{m^3} \quad (\text{C-20})$$

$$[E_k] = \frac{J}{m^3} \quad (\text{C-21})$$

Cancelando los metros en (C-20)  $[E_k]$  se puede escribir en términos de las cantidades fundamentales como

$$[E_k] = \frac{kg}{s^2 \cdot m} \quad (\text{C-22})$$

Especificando las dimensiones en (C-22) se llega a

$$[E_k] = \frac{[M]}{[T]^2 \cdot [L]} \quad (\text{C-23})$$

Se observa al comparar (C-21) y (C-23) con (C-16) y (C-18) que  $\langle E_k \rangle$  también corresponde a una cantidad que representa una densidad de energía por unidad de volumen. Sin embargo,  $\langle E_k \rangle$  a diferencia de  $\langle E_p \rangle$  esta relacionada con energía cinética transmitida al líquido cuando se propaga la onda sonora, por lo tanto,  $\langle E_k \rangle$  se interpreta como el promedio de densidad de energía cinética acústica.

## Potencial Acústico Máximo $U_o$

Tomando la definición dada por (1-166), en la cual el potencial acústico máximo esta dado por

$$U_o = \frac{V p_a^2}{8\beta_f} \quad (\text{C-24})$$

Donde  $V$  representa el volumen de la partícula,  $p_a$  la amplitud máxima de presión y  $\beta_f$  el módulo de elasticidad volumétrico del líquido. Por lo tanto, especificando las unidades de estas cantidades en (C-24), para identificar las dimensiones de  $U_o$ , se obtiene

$$[U_o] = \frac{m^3 \cdot \left(\frac{N}{m^2}\right)^2}{\left(\frac{N}{m^2}\right)} = m^3 \cdot \left(\frac{N}{m^2}\right) \quad (\text{C-25})$$

$$[U_o] = N \cdot m = J \quad (\text{C-26})$$

$$[U_o] = \left(\frac{kg \cdot m}{s^2}\right) \cdot m = \frac{kg \cdot m^2}{s^2} \quad (\text{C-27})$$

$$[U_o] = \frac{[M] \cdot [L]^2}{[T]^2} \quad (\text{C-28})$$

En (C-26) y (C-28) se observa que las dimensiones de  $U_o$  corresponden a una cantidad física que representa energía. Por otra parte, si se escribe  $U_o$  usando  $E_{ac}$ , ecuación (1-167), entonces la forma de  $E_{ac}$  según (1-168) es

$$E_{ac} = \frac{p_a^2}{4\beta_f} \quad (\text{C-29})$$

Haciendo explícitas las unidades en (C-29)

$$[E_{ac}] = \frac{\left(\frac{N}{m^2}\right)^2}{\left(\frac{N}{m^2}\right)} = \left(\frac{N}{m^2}\right) \quad (\text{C-30})$$

$$[E_{ac}] = \frac{N \cdot m}{m^3} = \frac{J}{m^3} \quad (\text{C-31})$$

Tomando (C-30) y escribiendo  $[E_{ac}]$  en términos de las unidades fundamentales, para definir sus dimensiones

$$[E_{ac}] = \frac{\frac{kg \cdot m}{s^2}}{\frac{m^2}{1}} = \frac{kg \cdot m}{m^2 \cdot s^2} \quad (\text{C-32})$$

$$[E_{ac}] = \frac{kg}{s^2 \cdot m} \quad (\text{C-33})$$

Con lo anterior se tiene que las dimensiones de  $E_{ac}$  son

$$[E_{ac}] = \frac{[M]}{[T]^2 \cdot [L]} \quad (\text{C-34})$$

Comparando (C-34) con (C-18) y (C-23) se concluye, junto a la ecuación (C-31), que  $E_{ac}$  tiene dimensiones de densidad de energía.

# Apéndice D

## El contador Coulter

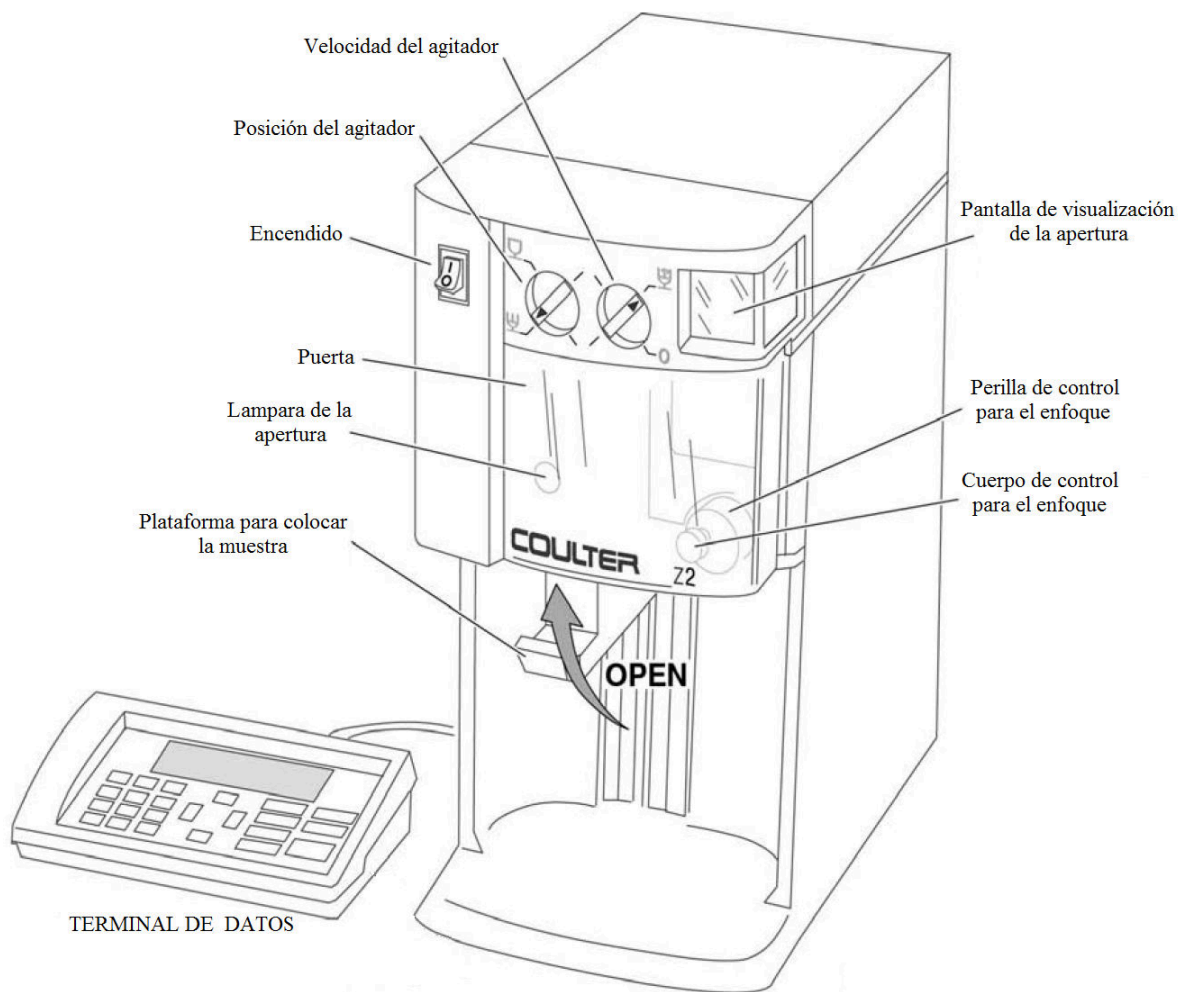


Figura D-1.: Contador de partículas y analizador de tamaños Coulter Z2 (Coulter Beckman, 2002).

Un contador Coulter es un dispositivo, como el ilustrado en la Figura D-1, que permite contar y medir el tamaño de partículas o células suspendidas en una solución electrolítica. Este aparato, fue desarrollado en los años 40 por el inventor estadounidense Wallace H. Coulter, quien determinó que era posible, al usar un campo eléctrico, establecer el tamaño y número de partículas presentes en un líquido conductor.

## Principio de Funcionamiento

El método usado por este aparato para contar y medir el tamaño, está basado en la detección y medición de los cambios en la resistencia eléctrica producida por una partícula o célula, suspendida en un líquido conductor diluyente), que pasa a través de una pequeña abertura cilíndrica. Al suspender partículas o células en un líquido conductor, estas pueden ser consideradas como pequeñas piezas discretas de material aislante, que al pasar individualmente por un orificio, en el que circula una corriente eléctrica, producen un cambio en la impedancia del circuito eléctrico entre los dos electrodos sumergidos y ubicados a cada lado de la apertura. En la Figura D-2 se ilustra el paso de una partícula a través de una apertura, que genera un pulso eléctrico, causado por el desplazamiento de la solución electrolítica en su interior (Coulter Beckman, 2002).

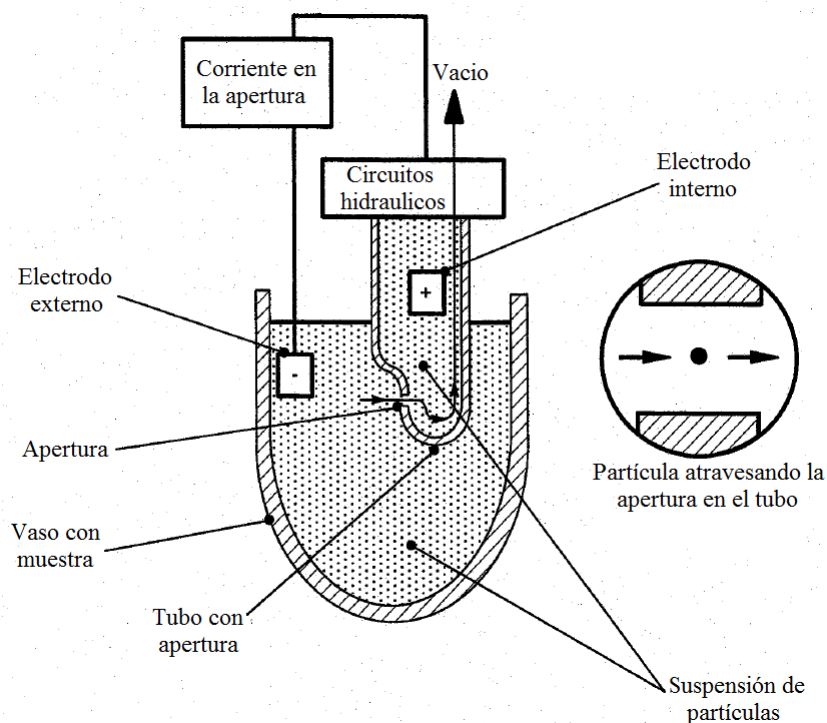


Figura D-2.: Principio básico de un contador Coulter (Coulter Beckman, 2002).

Mientras el número de pulsos eléctricos indica el conteo de las partículas, la amplitud de estos

pulsos está relacionada con su volumen. La resistencia efectiva entre los dos electrodos es debida a la resistencia del líquido conductor dentro de los límites de la abertura. La presencia dentro de estos límites de una partícula o célula, aumenta la resistencia en el circuito, por una cantidad que depende del volumen de las partículas (Coulter Beckman, 2002).

## Calibración

Para realizar las medidas de tamaño descritas en este trabajo se uso el contador Coulter Beckman Z2 con una apertura de  $50\mu\text{m}$  la cual fue calibrada usando perlas de látex de  $3\mu\text{m}$ , CC Size Standard L3, nominal  $3\mu\text{m}$  latex particles, suspendidas en  $5\text{ml}$  de ISOTON<sup>®</sup> II según el procedimiento descrito en la sección 3 del manual Coulter Beckman (2002), obteniendo un diámetro de calibración constante ( $Kd$ ) igual a 27,01. Después de hacer la calibración del dispositivo se midió el diámetro de partículas de  $3\mu\text{m}$  encontrando los resultados que se presentan en la Figura D-3.

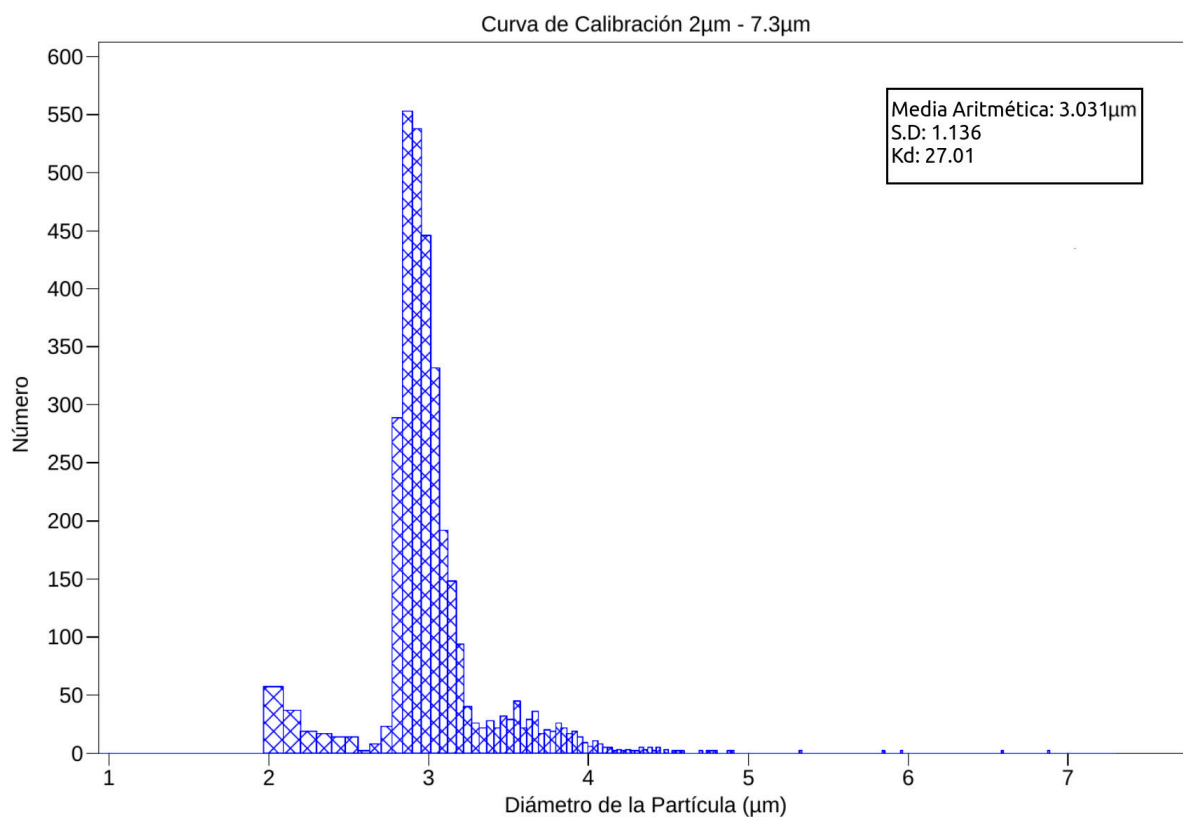


Figura D-3.: Medición del diámetro de partículas de  $3\mu\text{m}$  después del proceso de calibración.

## Errores de Medida

Al realizar mediciones de una cierta cantidad como la longitud, densidad o elasticidad de los parásitos lo que se busca es establecer un valor numérico de estas magnitudes, pero debido al error experimental no es posible definir un valor exacto de hecho lo que se tiene es un intervalo con ciertos límites en el que se encuentra el valor verdadero de la medida, la cual es más precisa si los límites de este intervalo se encuentra más cerca entre si ([Gutiérrez Aranzeta, 2007](#)). Por lo tanto, el objetivo en este apéndice es estimar el error asociado con las medidas obtenidas usando el Colulter y los microscopios invertido (Zeiss) y de reflexión (Olympus), así como también los errores asociados con las medidas indirectas del volumen de promastigotes ([3-35](#)), la densidad de los parásitos y su elasticidad ([3-33](#)), para esto se seguirá el método descrito por [Gutiérrez Aranzeta \(2007\)](#).

### Error medidas del Coulter

Al calibrar el Coulter para la apertura de  $50\mu m$  usando partículas de  $3\mu m$ , Apéndice D, se encontró, al tomar los diferentes registros que este aparato toma medidas de diámetros con tres décimas de exactitud por lo que el error, al tomar el menor valor y dividirlo entre 2, es  $\delta D = 0,005\mu m$ , es decir, que todas las medidas de diámetro hechas con este aparato deben ser reportadas con un intervalo de error de  $\pm 0,005\mu m$ . Por otro lado, las medidas de área y volumen al ser calculadas con el diámetro tienen una incertidumbre asociada con mediciones indirectas de una sola variable ([Gutiérrez Aranzeta, 2007](#)), por lo tanto, para determinar la incertidumbre se deriva la función asociada al área y volumen de la partícula en términos del diámetro, que para el caso del Coulter se relacionan con una partícula de forma esférica, entonces, al definir estas funciones se tiene que

- Incertidumbre área

Recordando que el área de una esfera, se encuentra dada por

$$A = \pi D^2 \tag{E-1}$$



Donde  $D$  es el diámetro, ahora derivando (E-1), se obtiene que la incertidumbre para el área medida por el Coulter es

$$\delta A = 2\pi D\delta D \quad (\text{E-2})$$

- Incertidumbre volumen

Por otro lado, si el volumen de una esfera en términos del diámetro se define como

$$V = \frac{\pi D^3}{6} \quad (\text{E-3})$$

Derivando (E-3) se obtiene que el error asociado con el volumen medido por el Coulter esta dada por

$$\delta V = \frac{\pi D^2}{2}\delta D \quad (\text{E-4})$$

Usando las relaciones (E-2) y (E-4) se especificaron las incertidumbres de las medidas mostradas en las Tablas 3-9 y 3-10.

## Error medidas de microscopia

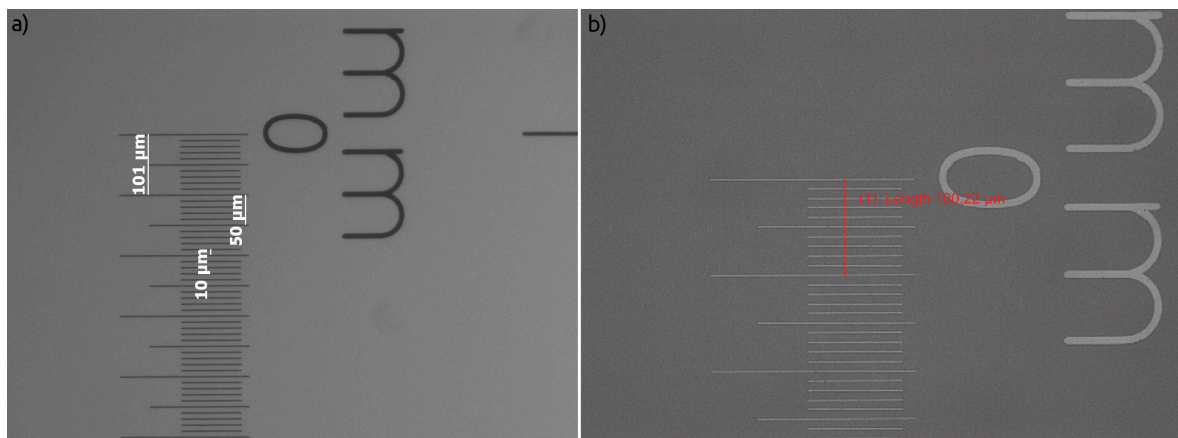


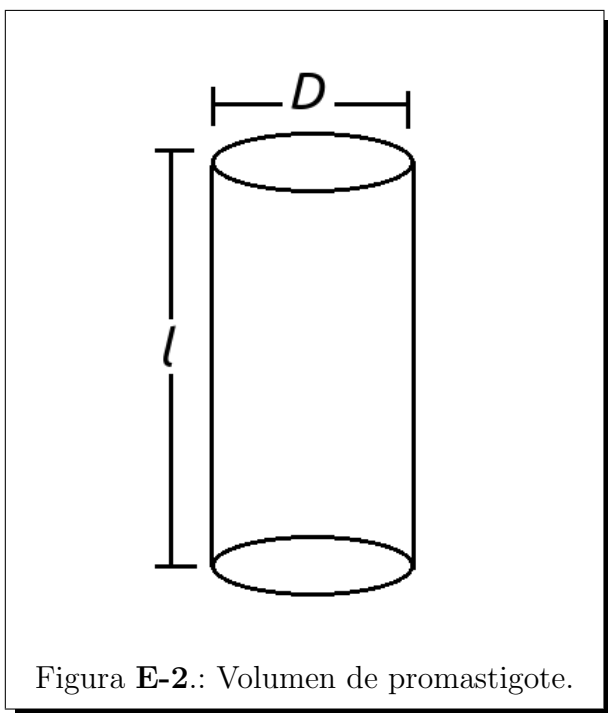
Figura E-1.: Calibración de microscopios con regla Zeiss a) Microscopio invertido objetivo 10X y b) Microscopio de reflexión objetivo 20X.

En el caso de las imágenes registradas usando los microscopios de reflexión (Olympus BX51M) o invertido (Zeiss) el error asociado a las medidas de tamaño registradas con los programas Stream Basic 1.9 (Olympus Corporation) y AxioVisión Rel. 4.8.2 (Zeiss) se determinó

después de la calibración hecha a los dos microscopios usando la regla marca Zeiss para los diferentes objetivos, Figura E-1, entonces, considerando, como se observa de la Figura 3-19 a la 3-24, que al medir el tamaño de los parásitos el resultado se presenta con dos décimas, lo que significa que la incertidumbre esta asociada a la última cifra decimal, por lo que, todas las medidas hechas con estos microscopios se deben reportar con una incertidumbre de  $\pm 0,05\mu m$ .

### Error de la medición indirecta del volumen de promastigotes

Para calcular la incertidumbre asociada con la ecuación (3-35) a partir de la cual se estimó el volumen de los promastigotes al considerar estos con forma cilíndrica, Figura E-2, se debe tener presente que la obtención de esta cantidad se hizo de forma indirecta a partir de las medidas del diámetro  $D$  tomadas por el Coulter y del largo  $l$  del parásito determinado con el microscopio invertido Zeiss, por tal razón, para definir la incertidumbre en la medida del volumen de los promastigotes ( $\delta V_{pa}$ ) se considera la expresión (3-35) como una función de dos variables (Gutiérrez Aranzeta, 2007), con lo cual, se obtiene al derivar (3-35) que la incertidumbre para el volumen de los promastigotes es



$$\delta V_{pa} = \frac{\partial}{\partial D} \left( \frac{\pi D^2 l}{4} \right) \delta D + \frac{\partial}{\partial l} \left( \frac{\pi D^2 l}{4} \right) \delta l \quad (\text{E-5})$$

Aplicando las derivas parciales a la función de volumen se llega a

$$\delta V_{pa} = \left( \frac{\pi D}{2} l \right) \delta D + \left( \frac{\pi D^2}{4} \right) \delta l \quad (\text{E-6})$$

### Error de la medición indirecta de la densidad y elasticidad

Por último se especifica la incertidumbre asociada con la medición de la densidad y la elasticidad de los parásitos, para lo cual, es necesario tener presente que estas dos cantidades son definidas usando relaciones lineales, que en el caso de la densidad se establece con la

posición de la capa de células formadas, según se describió en el capítulo al determinar la densidad de los parásitos con gradientes de Percoll, entonces de forma general se puede expresar la relación entre la densidad y la posición como

$$\rho(y) = my + b \quad (\text{E-7})$$

Donde  $m$  es la pendiente de la recta,  $b$  el punto de corte con el eje de las ordenadas y  $y$  la posición de la capa de células formada. Entonces, al derivar (E-7) se encuentra que la incertidumbre asociada a la densidad es

$$\delta\rho = m\delta y \quad (\text{E-8})$$

Por otro lado, al considerar la relación lineal (3-33) entre los coeficientes adimensionales  $\kappa$  y  $\zeta$  que se definen con la velocidad del sonido en la célula  $c_c$  y la densidad celular  $\rho_c$  según la expresiones (1-135), es posible al sustituir estos factores en (3-33) escribir una relación lineal entre la velocidad del sonido en la célula y su densidad, la cual tiene la forma

$$c_c = \left( \frac{mc_f}{\rho_f} \right) \rho_c + bc_f \quad (\text{E-9})$$

Siendo  $m$  la pendiente,  $b$  el punto de corte con el eje vertical,  $c_f$  y  $\rho_f$  la velocidad del sonido y la densidad del líquido, respectivamente, ahora derivando (E-9) y asumiendo todo constante excepto  $\rho_c$  se tiene que el error de la velocidad del sonido en la célula es

$$\delta c_c = \left( \frac{mc_f}{\rho_f} \right) \delta \rho_c \quad (\text{E-10})$$

Determinando esta incertidumbre es posible con las ecuaciones (3-30) y (3-30) establecer el error asociado con la medida de la compresibilidad al derivar la expresión de la compresibilidad respecto a la velocidad  $c_c$  y a la densidad  $\rho_c$  encontrando

$$\delta K = \frac{\partial}{\partial c_c} \left( \frac{1}{c_c^2 \rho_c} \right) \delta c_c + \frac{\partial}{\partial \rho_c} \left( \frac{1}{c_c^2 \rho_c} \right) \delta \rho_c \quad (\text{E-11})$$

Aplicando las derivadas en la ecuación (E-11) se tiene finalmente que

$$\delta K = - \left( \frac{2}{c_c^3 \rho_c} \right) \delta c_c - \left( \frac{1}{c_c^2 \rho_c^2} \right) \delta \rho_c \quad (\text{E-12})$$

# Bibliografía

- Alberts, B., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. 2014. *Molecular Biology of The Cell*. Sixth edition edn. Garland Science Taylor & Francis Group.
- Amersham, Biosciences. 2007. *Pecoll: Methodology and Applications*. Amersham Biosciences.
- Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C., & Bongrand, P. 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infection and Immunity*, **58**, 779–787.
- Arfken, George. 1985. *Mathematical Methods For Physicists*. Third edn. Academic Press, INC.
- Ashford, R. W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **30**, 1269–1281.
- Bangs Laboratories, Inc. 2015. *Material Properties of Polystyrene and Poly(methyl methacrylate) (PMMA) Microspheres*. Tech. rept. Bangs Laboratories, Inc.
- Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N., & Zilberstein, D. 2005. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **141**, 99–108.
- Barmatz, M., & Collas, P. 1985. Acoustic radiation Potential on a Sphere in Plane, Cylindrical and Spherical Standing Waves Fields. *J. Acoust. Soc. Am.*, **77**(3).
- Barnkob, R., & Bruss, H. 2009 (June). *Acoustofluidics in microsystems: investigation of resonances*. M.Phil. thesis, Technical University of Denmark.
- Barnkob, Rune, Augustsson, Per, Laurell, Thomas, Bruus, Henrik, *et al.*. 2010. Measuring the local pressure amplitude in microchannel acoustophoresis. *Lab Chip*, **10**, 563–570.
- Besteiro, S., Williams, R., Coombs, G., & Mottram, J. 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, **37**, 1063–1075.
- Bruss, Henrik. 2008. *Theoretical Microfluidics*. Oxford University Press Inc., New York.
- Bruss, Henrik. 2012. Acoustofluidics 7: The acoustic radiation force on small particles. *Lab Chip*, **14**, 1014–1021.
- Camacho, M., & Lozano, Y. 2015. ¿ Están los CLC de *Leishmania* asociados con la adaptación del parásito a cambios de pH y/o osmolaridad? . *Acta Biológica Colombiana*, **21**(1).

- Camacho, M., Zapata, A. C., Vargas, A., Ochoa, D. C., Navarrete, I. C., & Hoyos, M. 2014. *Uso de levitación acústica para separación y clasificación de células: con aplicaciones para folículos tiroideos y células infectadas con Leishmania o Plasmodium*. . Tech. rept. Colciencias.
- Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J., & Otranto, D. 2015. The past, present, and future of Leishmania genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitology*, **31**(3).
- Cengel, Yunus A., & Cimbala, John M. 2006. *Fluid Mechanics Fundamentals and Applications* . McGraw - Hill.
- Coakley, W T, Hawkes, J J, Sobanski, A. M, Cousins, C M, Spengler, J, *et al.* . 2000. Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation of cells and microparticles. . *Ultrasonics*, **38**, 638–641.
- Coulter Beckman. 2002. *Beckman Coulter Z Series User Manual 9914591-D*. Beckman Coulter.
- Ding, X., Lin, S., Kiraly, B., Yue, H., Li, S., Chiang, I-kao., Shi, J., Benkovic, S. J., & Huang, T. J. 2012. On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(28), 11105–11109.
- Doinikov, Alexander A. 1997a. Acoustic radiation force on a spherical particle in a viscous heat-conducting fluid. I. General formula . *J. Acoust. Soc. Am.*, **101**(2).
- Doinikov, Alexander A. 1997b. Acoustic radiation force on a spherical particle in a viscous heat-conducting fluid. II. Force on a rigid sphere . *J. Acoust. Soc. Am.*, **101**(2).
- Doinikov, Alexander A. 1997c. Acoustic radiation force on a spherical particle in a viscous heat-conducting fluid. III. Force on a liquid drop . *J. Acoust. Soc. Am.*, **101**(2).
- Doinikov, Alexander A. 2003. Acoustic radiation force: Classical theory and recent advances . *Recent Res. Devel. Acoustics*, **1**, 39–67.
- Feynman, Richard., Leighton, Robert B., Sands, Matthew, *et al.* . 1964. *The Feynman Lectures on Physics Mainly Electromagnetism and Matter*. Vol. 2. Addison Wesley.
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, **463**(Jan.), 485–492.
- Fong, D., & Chang, Kwang-Poo. 1981. Tubulin biosynthesis in the developmental cycle of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Changes during differentiation of motile and nonmotile stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**.
- Garcia, M. 2016. *Caracterización funcional de un canal de cloruro ClC en Leishmania*. Ph.D. thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Gor'kov, L. P. 1962. On the Forces Acting on a Small Particle in an Acoustical Field in an Ideal Fluid. *Soviet Physics Doklady*, **6**, 773.
- Guo, F., Li, P., French, J., Mao, Z., Zhao, H., Li, S., Nama, N., Fick, J., Benkovic, S., & Huang, T. J. 2015. Controlling cell–cell interactions using surface acoustic waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(1), 43–48.
- Gutiérrez Aranzeta, C. 2007. *Introducción a la Metodología Experimental*. Segunda edición

- edn. Editorial Limusa. S. A.
- Haar, G T, & Wyard, S J. 1978. Blood Cell Banding in Ultrasonic Standing Wave Fields: A Physical Analysis. . *Ultrasound in Med. & Biol.* **4**, 111–112.
- Hartono, D, Liu, Y, Tan, P L, Then, X Y Sherlene, Yung, L Y Lanry, & Lim, Kian-Meng. 2011. On-chip measurements of cell compressibility via acoustic radiation. *Lab Chip*, **11**, 4072.
- Hoyos, M., Niño, A., Camargo, M., Diaz, J. C., León, S., & Camacho, M. 2009. Separation of Leishmania-infected macrophages by step-SPLITT fractionation. *Journal of Chromatography B*, **877**, 3712–3718.
- King, Louis V. 1934. On the Acoustic Radiation Pressure on Spheres. *Royal Society of London, Mathematical and Physical Sciences*, **A**(June), 212–240.
- Landau, D. L., & Lifshitz, M. E. 1991. *Mecánica de Fluidos* . Editorial Reverte, S. A.
- Laurell, T, Petersson, F, & Nilsson, A. 2007. Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles. *Chem. Soc. Rev.* **36**.
- Laurell, Thomas., & Lenshof, Andreas. (eds). 2015. *Microscale Acoustofluidics* . The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK.
- Lefurgey, A., Gannon, M., Blum, J., & Ingram, P. 2005. Leishmania donovani Amastigotes Mobilize Organic and Inorganic Osmolytes During Regulatory Volume Decrease. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **52**, 277–289.
- Li, Peng, Mao, Zhangming, Peng, Zhangli, Zhou, Lanlan, Chen, Yuchao, Huang, Po-Hsun, Truica, Cristina I., Drabick, Joseph J., El-Deiry, Wafik S., Dao, Ming, Suresh, Subra, & Huang, Tony Jun. 2015. Acoustic separation of circulating tumor cells. *PNAS*, **112**(16), 4970–4975.
- Lim, C. T., Zhou, E. H., & Quek, S. T. 2006. Mechanical models for living cells – a review. *Journal of Biomechanics*, **39**, 195–216.
- Lozano, Y. 2012. *Estudio de un canal de cloruro de Leishmania y su importancia en la fisiología del parásito*. Ph.D. thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Marchesini, N., & Docampo, R. 2002. A plasma membrane P-type H<sup>+</sup>-ATPase regulates intracellular pH in Leishmania mexicana amazonensis. *Molecular and biochemical parasitology*, **119**, 225–236.
- Mott., Robert L. 1996. *Mecánica de Fluidos Aplicada* . Prentice Hall.
- Nakayama, Y. 2000. *Introduction to Fluid Mechanics*. Yokendo CO. LTD.
- Navarrete, I. C. 2013. *Modelo Físico de los parámetros y efectos hidrodinámicos involucrados en una separación óptima de células usando una técnica Campo-Flujo (S-SPLITT)*. M.Phil. thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Omelyan, I.P., Mryglod, I.M., & Folk, R. 2002. Optimized Forest–Ruth- and Suzuki-like algorithms for integration of motion in many-body systems. *Computer Physics Communications*, **146**, 188–202.
- Parada, O. J. 2014. *Comportamiento electrofisiológico en un sistema heterólogo de la proteína*

- putativa codificada por el gen LbrM.33.1260 de Leishmania mediante la técnica de patch clamp*. M.Phil. thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Quintero, N. 2014. *Estudio funcional de un canal de cloruro de Leishmania, caracterización electrofisiológica y molecular*. M.Phil. thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis . *Lancet Infect Dis.*, **7**(9), 581–596.
- Rodriguez, M. L., McGarry, P. J., & Sniadecki, N. J. 2013. Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches. *Applied Mechanics Reviews*, **65**(Nov.).
- Settnes, Mikkel., & Bruus, Henrik. 2012. Forces acting on a small particle in an acoustical field in a viscous fluid . *PHYSICAL REVIEW E*, **85**.
- Skrinjar, Luka., Slavič, Janko., & Boltežar, Miha. 2018. A review of continuous contact-force models in multibody dynamics . *International Journal of Mechanical Sciences*, **145**(July).
- Spinel, C., Hoyos, M., Marin, M., Dominguez, D., Cortes, G., & Camacho, M. 2007. *Prototipos para generar sistemas de separación celular en corto tiempo, con bajo costo y alta eficiencia*. Centro Internacional de Física - CIF, Universidad Nacional de Colombia.
- Suresh, S., Spatz, J., Mills, J.P., Micoulet, A., Dao, M., Lim, C.T., Beil, M., & Seufferlein, T. 2005. Connections between disease states and single-cell mechanical response: human pancreatic cancer and malaria. *Acta Biomaterialia*, **1**, 15–30.
- Vargas, Abelino. 2013. *Modelo Físico Para La Separación de Células en un Canal Step-SPLITT*. M.Phil. thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Vargas, Abelino, Navarrete, Ivan, González, Itziar, & Camacho, Marcela. 2016. Efectos Físicos Inducidos en Cultivos In Vitro Expuestos a Campos Acústicos . *Revista Cubana de Física (RCF)*, **33**(2).
- Velasco, K. 2008. *Características de solubilidad de proteínas reconocidas por anticuerpos monoclonales en Plasmodium falciparum (Plasmodiidae)*. Trabajo de Pregrado, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.
- Wang, H., Liu, Z., Shin, D. M., Chen, Z. G., Cho, Y., Kim, Y. J., & Han, A. 2018. Single-cell compressibility quantification for assessing metastatic potential of cancer cells through multi-frequency acoustophoresis . *Microfluidics and Nanofluidics*, **22**(68).
- Wei, Wei., Thiessen, David B., Marston, Philip L., *et al.* . 2004. Acoustic radiation force on a compressible cylinder in a standing wave . *J. Acoust. Soc. Am.*, **116**(1).
- Weiser, M. A. H., Apfel, R. E., & Neppiras, E. A. 1984. Interparticle Forces on Red Cells in a Standing Wave Field. *Acustica*, **56**(2), 114–119.
- Wiklund, Martin. 2012. Biocompatibility and cell viability in microfluidic acoustic resonators . *Lab on a Chip*, Apr.
- Wu, Mengxi., Ozcelik, Adem., Rufo, Joseph., Wang, Zeyu., Fang, Rui., & Jun Huang, Tony. 2019. Acoustofluidic separation of cells and particles . *Microsystems and Nanoengineering*, **5**(32), 1–18.
- Yasuda, K., Kiyama, M., Umemura, S., Takeda, K., *et al.* . 1996. DNA concentration using

- acoustic radiation force. *J. Acoust. Soc. Am.*, **99**, 1248–1251.
- Yosioka, K., & Kawaaima, Y. 1955. Acoustic radiation Pressure On a Compressible Sphere . *Acustica*, **5**.
- Zapata, A. C. 2016. *Impacto del silenciamiento de la expression de un transportador de la familia CLC sobre el ciclo de vida in vitro de parasitos del genero Leishmania*. Ph.D. thesis, Pontificia Universidad Javeriana.
- Zhang, W., Kai, K., Choi, D. S., Iwamoto, T., Nguyen, Y. H., Wong, H., & Qin, L. 2012. Microfluidics separation reveals the stem-cell-like deformability of tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(46), 18707–18712.