

Tesis Doctoral

Producción de color en materiales microestructurados naturales y artificiales

Luna, Ana Eugenia

2014-08-06

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Luna, Ana Eugenia. (2014-08-06). Producción de color en materiales microestructurados naturales y artificiales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Luna, Ana Eugenia. "Producción de color en materiales microestructurados naturales y artificiales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-08-06.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

*Producción de color en materiales
microestructurados naturales y artificiales*

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Físicas

por *Ana Eugenia Luna*

Directora de Tesis: Dra. Diana C. Skigin
Consejero de Estudios: Dr. Pablo I. Tamborenea
Lugar de Trabajo: Grupo de Electromagnetismo Aplicado

Buenos Aires, Mayo 2014

Resumen

Las estructuras fotónicas naturales exhiben notables efectos de color como el aspecto metálico y la iridiscencia. En este trabajo se investigan algunas de las microestructuras de este tipo que se han identificado en coleópteros, específicamente en los escarabajos de la especie *Ceroglossus suturalis*, que exhiben una coloración iridiscente y son endémicos del extremo sur de América del Sur y del sur de Chile. Este fenómeno de iridiscencia se produce por reflexiones múltiples de la luz dentro de la epicutícula del élitro (ala delantera modificada por endurecimiento que encierra a las alas posteriores utilizadas en el vuelo), que es un sistema de multicapas alternadas de materiales de diferente densidad óptica. Por medio del empleo de técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM), y a través del procesamiento de las imágenes y micrografías, se obtuvieron los parámetros geométricos más relevantes de las microestructuras responsables del color estructural en estos escarabajos, tales como el número de capas y sus espesores. Utilizando un espectrofotómetro acoplado a fibra óptica se midieron los espectros de reflectancia y se obtuvieron los diagramas de cromaticidad para diferentes muestras, y bajo distintas condiciones de iluminación. Una vez confirmado el mecanismo físico involucrado en la producción de color en los especímenes estudiados, se aplicaron diferentes algoritmos de optimización para recuperar tanto la parte real como la imaginaria de la constante dieléctrica y los espesores de las capas de los materiales que componen el sistema natural de multicapas. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de diferentes estrategias de optimización heurística confirman que este tipo de algoritmos tiene un gran potencial como herramienta para investigar las estructuras fotónicas naturales. El estudio de la generación de color estructural en el mundo natural ya ha comenzado a inspirar el desarrollo

de dispositivos artificiales con aplicaciones tecnológicas, tales como sensores inteligentes y nuevos tipos de filtros.

Palabras Clave: Color Estructural, Iridiscencia, Multicapas, Cristales Fotónicos Naturales, Algoritmos Evolutivos

Abstract

Production of color in artificial and natural microstructured materials

Natural photonic structures exhibit remarkable color effects such as metallic appearance and iridescence. In this work, we investigate some of the microstructures of this kind that have been identified in Coleoptera, specifically in the beetles of the species *Ceroglossus suturalis*, which exhibit an iridescent coloration and mostly live endemically in the southern end of South America and the south of Chile. This phenomenon of iridescence is produced by multiple reflections of light within the epicuticle of their elytra (modified forewing of a beetle that encases the thin hind wings used in flight), which is a multilayer system that alternates materials of different optical density. By means of scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy techniques, and after processing the images and micrographs, the significant geometrical parameters of the microstructure responsible for the structural color in these beetles, such as the number of layers and their thicknesses, have been obtained. By using an optical fiber coupled spectrophotometer, reflectance spectra have been measured, and the chromaticity diagrams have been obtained for several samples under different illumination conditions. Once the physical mechanism underlying the color production in the studied specimens was confirmed, different optimization algorithms have been applied to retrieve the real and imaginary parts of the relative permittivity of the materials comprising the natural multilayer system, as well as the layers thicknesses. The results obtained by applying different heuristic optimization strategies confirm that this kind of algorithms have a great potential as a tool to investi-

gate natural photonic structures. The study of structural color generation in the natural world has already started to inspire the development of artificial devices for technological applications, such as smart sensors and new kinds of filters.

Keywords: Structural Color, Iridescence, Multilayers, Natural Photonic Crystals, Evolution Algorithms

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia, a mi pilares incondicionales, a mi esposo Pablo y a mis adorados hijos. El amor, la comprensión, la infinita paciencia y las continuas palabras de aliento y contención fueron sin duda los propulsores que me han permitido la culminación de este anhelado sueño...sin ellos nunca se hubiese concretado...

A mi madre, que a pesar de la distancia siempre estuvo presente en mi corazón.

A mi padre, cuya ausencia demasiado temprana no impidió que sintiera sus fuerzas que me ayudaron a no desmoronarme en mis peores momentos.

A todos los integrantes del Grupo de Electromagnetismo Aplicado, por su apoyo y colaboración. A Mariana, por escucharme, por su complicidad y sobre todo por su amistad. A Miriam por su dedicación y generosidad al compartir sus conocimientos de Latex. A María Luz, a Mauro, a Angela y a Marina.

Al Dr. Daniel Schinca, quien no sólo me abrió las puertas de su laboratorio brindándome la posibilidad de llevar a cabo la parte experimental de mi Tesis sino que además aportó ideas y mejoras para el diseño de los dispositivos experimentales.

A Demetrio, por sus Algoritmos Evolutivos y por sus prontas y acertadas respuestas a mis permanentes inquietudes.

Finalmente, quiero agradecer muy especialmente a Ricardo y a Diana por haber confiado en mí, por haberme dado una segunda oportunidad en mi Carrera de Doctorado. Les estaré eternamente agradecida...

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Color estructural	1
1.2. Coleópteros	4
1.3. Biomimética - Aplicaciones	7
1.4. Obtención de parámetros biológicos	8
2. Caracterización de las muestras biológicas	11
2.1. Motivación	11
2.2. Materiales	12
2.3. Técnicas de microscopía utilizadas	14
2.3.1. Microscopio óptico	15
2.3.2. Microscopio electrónico de barrido (SEM)	16
2.3.3. Microscopio electrónico de transmisión (TEM)	22
2.4. Procesado de imágenes y caracterización estructural	23
3. Mediciones de Reflectancia	29
3.1. Motivación	29
3.2. Esfera integradora	30
3.3. Espectrómetro acoplado a fibra óptica	31
3.4. Montaje experimental para incidencia normal	37
3.5. Mediciones de reflectancia polarizadas	41

4. Cálculo del Color e Iridiscencia	47
4.1. Motivación	47
4.2. Concepto y cálculo del color	48
4.3. Iluminantes patrones y campo visual	51
4.4. Iridiscencia	52
5. Modelo teórico	59
5.1. Motivación	59
5.2. Optimización heurística	60
5.2.1. Estrategias evolutivas (ES)	63
5.2.2. Optimización de enjambre de partículas (PSO)	64
5.3. Modelo de multicapas	66
5.4. Método 4 x 4	69
6. Obtención de parámetros relevantes	74
6.1. Motivación	75
6.2. Ejemplos de Validación	75
6.2.1. EJEMPLO 1: Obtención de dos variables objeto	75
6.2.2. EJEMPLO 2: Obtención de cuatro variables objeto	81
6.3. Ejemplos de Aplicación	87
6.3.1. Recuperación de las constantes dieléctricas de los materiales presentes en la estructura de multicapas del <i>Ceroglossus suturalis</i> verde a partir del espectro de reflectancia correspondiente a un ángulo de incidencia de 15°	87
6.3.2. Recuperación de parámetros relevantes de las muestras de <i>Ceroglossus suturalis</i> verde y dorado a partir del espectro de reflectancia correspondiente a un ángulo de incidencia de 30°	90
7. Conclusiones y perspectivas	103
A. Procesado de imágenes y caracterización estructural	112

B. Microscopios Electrónicos de Barrido	117
C. ImageJ	120
D. Prisma de Glan-Thompson	122
Bibliografía	124

Capítulo 1

Introducción

1.1. Color estructural

Ya en el siglo XVII, Hooke y Newton incursionaron en el estudio del llamativo color metalizado de algunas especies de insectos y de los colores brillantes e iridiscentes del pavo real. Pero fue recién en el año 1940, junto con el avance de la tecnología, y en especial con el desarrollo del microscopio electrónico, que se pudieron estudiar en detalle las estructuras biológicas en el rango de la nano-escala. Los pioneros de estas investigaciones fueron Anderson y Richard (1942), quienes estudiaron el color estructural de algunos insectos [1].

El color estructural es el tipo de color generado por la interacción de la luz con la microestructura de un tejido, y se origina por una particular distribución de índices de refracción. Este tipo de color ha atraído el interés de muchos especialistas de diferentes campos de investigación. Dicho interés se debe principalmente al hecho de que el mecanismo de generación del color estructural es de origen puramente físico, a diferencia del mecanismo de coloración usual por pigmento, que es de origen químico y se produce por la absorción selectiva de la luz en un cierto rango de longitudes de onda. Diferentes fenómenos ópticos dan origen al color estructural, entre los cuales encontramos la interferencia en láminas delgadas, la difracción en redes, la dispersión por estructuras aleatorias,

etc. En las estructuras naturales todos estos procesos se combinan y producen fenómenos ópticos complejos [2,3].

Entre las especies biológicas existen muchos ejemplos diferentes de estructuras con respuestas ópticas específicas. El ejemplo más antiguo y conocido es el ópalo (Fig. 1.1), una gema sedimentaria usada en la elaboración de artículos ornamentales y ceremoniales. A diferencia de otras gemas, el ópalo no tiene estructura cristalina, sino que está formado por esferas nanométricas de sílice. La difracción de la luz a través de este arreglo produce un juego de colores característico, determinado por el tamaño de las esferas y por la regularidad de la estructura periódica.

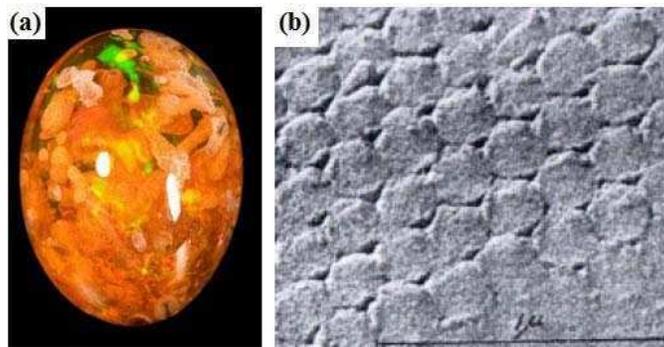


Figura 1.1: (a) Fotografía de un ópalo. (b) Imagen de la estructura interna de un ópalo natural observada en un microscopio electrónico de barrido (SEM).

El control estructural de la luz también se manifiesta en el mundo animal, como puede observarse en muchos insectos que aprovechan sus micro y nanoestructuras para generar su coloración externa que cambia con el ángulo de observación (iridiscencia) y/o presentar una apariencia metálica [4]. Algunos escarabajos poseen alas iridiscentes de aspecto metálico, y tienen la particularidad de reflejar selectivamente luz circularmente polarizada [5]. Los lepidópteros (mariposas y polillas) son bien conocidos por su diversidad de colores y diseños producidos por las escamas que cubren sus alas. Estas escamas tienen formas intrincadas, con estratificaciones, agujeros y surcos en formas complejas, los cuales producen diferentes fenómenos ópticos tales como interferencia, dispersión y difracción [6-8]. Estos organismos utilizan este efecto de color para la comunicación. También los colores pueden

servir como un criterio de selección para el apareamiento [9]. Otras funciones importantes que aporta el color en algunas especies es el camuflaje, como signo de advertencia en la interacción entre las diferentes especies, y hasta en la termorregulación [10].

Otro ejemplo conocido de color estructural es el color azul iridiscente de la mariposa *Morpho rhetenor* que se produce debido a la difracción de la luz en la microestructura presente en las escamas de sus alas [11]. Cada escama mide aproximadamente $200 \mu\text{m}$ de largo y $80 \mu\text{m}$ de ancho, está hecha de quitina y cubierta por alrededor de 1300 protuberancias paralelas por milímetro. Esta estructura periódica constituye una red de difracción cuya sección transversal tiene la geometría de un árbol (Fig. 1.2) [7,12–14].

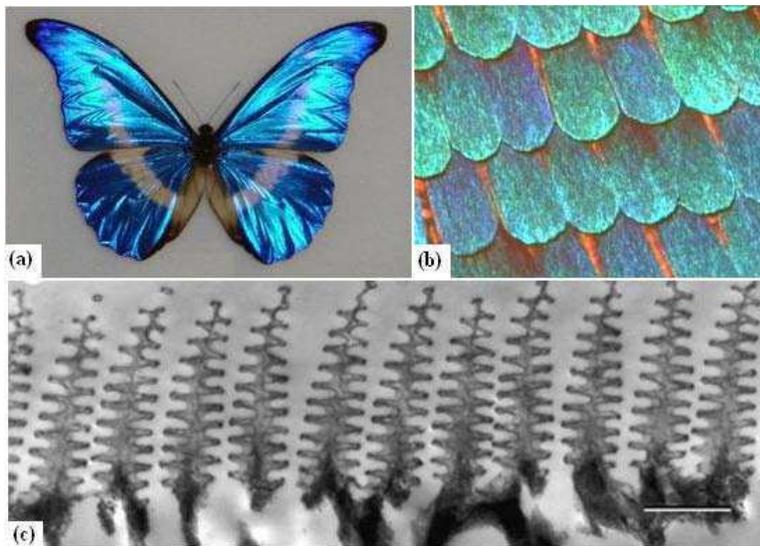


Figura 1.2: (a) Mariposa *Morpho rhetenor*. (b) Escamas del ala de la mariposa donde puede visualizarse el efecto de iridiscencia. (c) Imagen TEM de la sección transversal de la escama del ala de la mariposa. Escala: 800 nm.

Otra especie que posee color estructural es el ratón de mar (Fig. 1.3), que está recubierto por largos hilos y púas o espinas que producen una brillante iridiscencia [15]. Estas espinas poseen una microestructura periódica con simetría hexagonal que produce bandas prohibidas en varias direcciones de propagación, lo que explica su iridiscencia.

Recientemente también se ha reportado un efecto de puntillado multicolor iridiscente



Figura 1.3: Ratón de mar.

en el hongo de la especie *Diachea leucopoda*, perteneciente a la clase *Myxomycetes* (Protozoa) (Fig. 1.4), el cual también es generado por efectos fotónicos [16,17].



Figura 1.4: *Diachea leucopoda*.

1.2. Coleópteros

Los Coleópteros, vulgarmente conocidos como Escarabajos, son el orden de insectos milenarios con mayor variedad de ejemplares que exhiben color estructural. Este gran grupo de insectos contiene más especies que cualquier otro orden dentro del reino animal

(400.000 especies), seguido por los lepidópteros (mariposas y polillas), himenópteros (abejas, avispas y hormigas) y dípteros (moscas y mosquitos). Los coleópteros se caracterizan por tener el primer par de alas (élitros) atrofiadas y endurecidas, de manera que cumplen la función de protección. El segundo par de alas membranoso se pliega bajo los élitros y se emplean para el vuelo. Muchos de los coleópteros han perdido la capacidad de volar, por lo que sus alas posteriores pueden estar también parcial o totalmente atrofiadas. Se los suele encontrar en cualquier tipo de ambientes, tanto en la tierra como en el mar. Como los lepidópteros, los coleópteros poseen extraordinarios colores que cubren el cuerpo entero, incluyendo las patas, las antenas y los élitros. La superficie de los coleópteros se conoce con el nombre de cutícula, que es un sistema complejo compuesto por proteínas, lípidos y quitina, entre otros. Dentro de la cutícula se pueden distinguir dos partes principales: una capa externa y delgada conocida como epicutícula y otra interna y más gruesa que cubre la epidermis (procutícula). La epicutícula es una capa muy fina, a menudo sin pigmentación, que está formada por lípidos y proteínas (no posee quitina), y su función es mantener el medio químico del insecto evitando la pérdida de agua. Por otra parte, la procutícula está constituida por quitina y por varias proteínas, y es la responsable del aporte de la flexibilidad y dureza, además de tener un rol esquelético predominante (Fig. 1.5). Está formada por dos sub-capas: la exocutícula (parte más externa) y la endocutícula (parte más interna).

La epicutícula es la capa refráctil de la epidermis, está formada por lípidos y proteínas y está compuesta, a su vez, por varios estratos y por poro canales. En este arreglo de multicapas se produce el fenómeno de interferencia, a veces combinado con el fenómeno de polarización por reflexión causado por la estructura y los alvéolos de la superficie. Este conjunto de microestructuras que conforman la cutícula y que están presentes tanto en las escamas como en las alas de los coleópteros originan los hermosos colores que exhiben estos organismos.

En el presente trabajo de Tesis se estudia en profundidad la generación del color estructural en dos coleópteros endémicos de América del Sur pertenecientes a la especie *Ceroglossus suturalis* de dos colores diferentes: verde y dorado-cobrizo (Fig. 1.6). El estudio

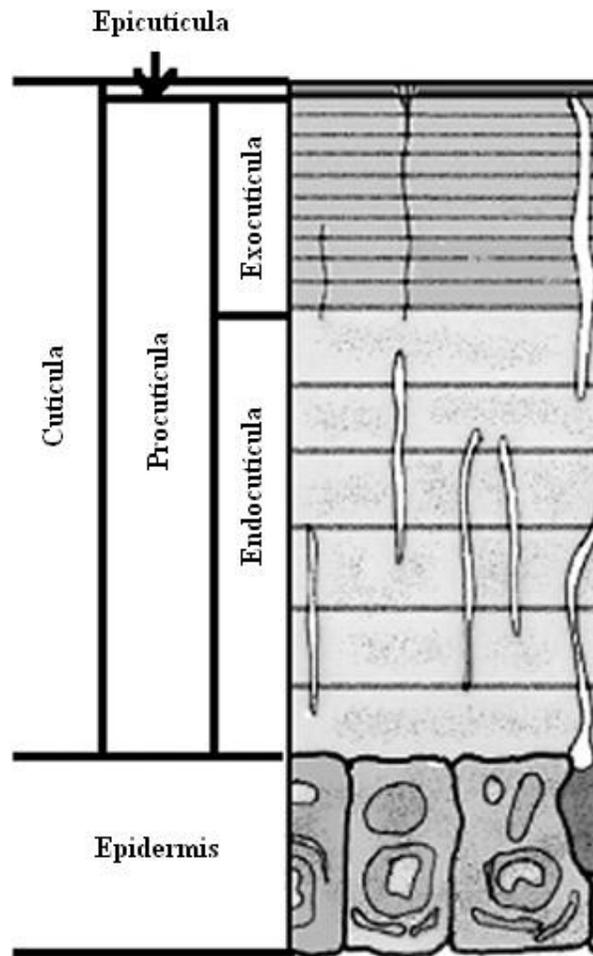


Figura 1.5: Esquema general de la estructura del tejido de los invertebrados con simetría bilateral dotados de un esqueleto externo y apéndices articulados. Se muestra su estratificación heterogénea que responde a distintas exigencias del medio.

de estos organismos constituye, por un lado una contribución a las ciencias biológicas mediante la identificación de las funciones del comportamiento de la especie [18], y por otro lado también podría constituir una fuente de inspiración de tecnologías biomiméticas con aplicaciones en diferentes industrias relacionadas con el color [19–23].



Figura 1.6: *Ceroglossus suturalis* verde y dorado.

1.3. Biomimética - Aplicaciones

La biomimética tiene como objetivo la réplica de materiales y la imitación de procesos biológicos, tanto orgánicos como inorgánicos, para aplicaciones y propósitos especiales. Desde el punto de vista electromagnético, su finalidad principal es el desarrollo de materiales funcionales a través del control de las propiedades y la geometría en la nanoescala. El estudio de las microestructuras biológicas es una de las ramas de mayor interés dentro de la biomimética, ya que provee información relevante para el diseño y la manufactura de nuevos materiales. La idea central de esta disciplina es aprovechar que a lo largo de miles de años la naturaleza ha resuelto ya muchos de los problemas que nosotros nos esforzamos en resolver actualmente. Los animales, las plantas y los microbios son organismos consumados. Por lo tanto, la emulación consciente de la naturaleza resulta ser una excelente estrategia para generar soluciones artificiales. Por un lado, el estudio de las propiedades ópticas de las estructuras fotónicas naturales inspira el diseño de estructuras artificiales con fines específicos, y por otro lado motiva el desarrollo de nuevas tecnologías de fabricación de nanomateriales, que en muchos casos ofrecen ventajas significativas comparadas con las provistas por las tecnologías convencionales [21]. Algunos ejemplos de aplicación son la creación de un sistema que focaliza rayos X inspirado en la estructura presente en los ojos de la langosta [24] y los dispositivos ópticos de

seguridad que emplean microestructuras similares a las que posee la mariposa *Morpho* en sus escamas [25, 26]. También se han desarrollado otros dispositivos bioinspirados para la inhibición de la emisión espontánea (diodos láser, diodos emisores de alta eficiencia) y en componentes ópticos integrados (guías de ondas, multiplexores para telecomunicaciones ópticas, entre otras), y se ha propuesto imitar las características geométricas de las alas de la mariposa *Suneve Coronata* para dispositivos anti-falsificación eficientes [27]. Una aplicación inédita inspirada en las estructuras helicoidales del escarabajo *Plusiotis resplendens* ha sido utilizada para controlar la reflexión de la luz circularmente polarizada en diodos ópticos sintonizables para láseres de cristal líquido [28–30]. Recientemente, ciertas estructuras naturales han inspirado otros desarrollos tecnológicos como cosméticos libres de pigmentos, adhesivos y pinturas sintéticas [22].

1.4. Obtención de parámetros biológicos

Uno de los desafíos que propone la investigación del color estructural en muestras biológicas es el conocimiento preciso de la geometría y de las constantes dieléctricas de las sustancias que componen el tejido biológico de la estructura en estudio. Sin embargo, la caracterización de la estructura interna que conforma la cutícula de estas especies es extremadamente difícil. En particular, el arreglo que produce el color en las especies estudiadas en este trabajo es una estructura de multicapas compuesta por un apilamiento periódico de bi-capas de diferentes densidades ópticas [31], localizada en la cutícula. Uno de los principales inconvenientes que se presenta es que la estructura de multicapas varía de un punto a otro [32] y, por lo tanto, cuando se analizan imágenes de diferentes cortes de una misma muestra, cada una de ellas no es representativa del sistema completo sino de un área localizada. Los espesores de las capas varían entre las diferentes muestras y aún en diferentes secciones de una misma muestra. Además, para poder estimar los espesores de las capas a partir de las imágenes de microscopio electrónico, se requiere de cortes de alta precisión. Sumado a esto, es importante resaltar que cada sección de la muestra usada en las mediciones de reflectancia es siempre diferente a la empleada en el

microscopio electrónico, por lo que existe una incertidumbre sobre los parámetros reales que corresponden a la curva de reflectancia. La rugosidad y la curvatura que exhiben este tipo de muestras hacen que sea extremadamente difícil hacer mediciones de reflectancia confiables, por lo que la medición constituye un desafío en sí mismo.

Algunos artículos recientes han reportado diferentes métodos que permiten recuperar parámetros relevantes de la estructura biológica, como por ejemplo los índices de refracción complejos de los materiales que la componen. En uno de estos trabajos se aplica la teoría de medio efectivo a un sistema de multicapas para determinar el índice de refracción del material que compone la cutícula de las alas de la mariposa *Morpho menelaus* [33]. Vukusic *et al.* lograron hallar el índice de refracción del material que compone la microestructura de las escamas de la mariposa *Morpho* utilizando técnicas de *index-matching* [34]. Mediante técnicas de caracterización óptica se logró determinar el índice de refracción complejo de los reflectores de multicapas naturales que presenta el escarabajo *Chrysochroa raja* [35]. Leertouwer *et al.* [36] emplearon microscopía de interferencia Jamin-Lebedeff para medir la dependencia del índice de refracción de las escamas de las alas de una mariposa y de las plumas de un ave con la longitud de onda. Recientemente se ha propuesto un procedimiento iterativo, basado en las ecuaciones de Cauchy y de Fresnel, para recuperar el índice de refracción de materiales biológicos a partir de mediciones de reflectancia [37] y Arwin *et al.* [38] usaron la matriz de Mueller con los datos obtenidos de una técnica de elipsometría para hallar el índice de refracción equivalente de los materiales que constituyen la multicapa de la cutícula de diferentes escarabajos [10]. Junto con una técnica experimental rigurosa, Noyes *et al.* [35] emplearon un algoritmo de ajuste recursivo para obtener los índices de refracción complejos de muestras biológicas.

Dadas las dificultades de medir experimentalmente los parámetros constitutivos de las estructuras naturales, se propone como uno de los principales objetivos de esta Tesis explorar la posibilidad de utilizar técnicas de optimización heurística para recuperar, a partir del espectro de reflectancia, los parámetros geométricos y las constantes dieléctricas involucradas en los sistemas biológicos en estudio. En contraposición al problema directo, que consiste en hallar la respuesta electromagnética de una estructura determinada, este

tipo de problema se conoce con el nombre de problema inverso, y se encuentra descrito en la Ref. [39]. Estas técnicas han sido exitosamente aplicadas fuera del contexto de muestras biológicas [40,41] y en el modelado de la función dieléctrica de los metales [42,43] para la optimización de estructuras plasmónicas [44,45], y muy recientemente, en la optimización de algunas propiedades resonantes de nano-estructuras metálicas con forma de estrella [46,47].

La organización de este trabajo es la siguiente. Como punto de partida, en el Capítulo 2 se muestran y caracterizan las especies a estudiar. Se detallan los métodos utilizados para la observación y la caracterización de las muestras, y el instrumental empleado. En el Capítulo 3 se explican en detalle los diferentes arreglos experimentales diseñados para la medición de la reflectancia de los élitros de los escarabajos, tanto para incidencia normal como oblicua, y para ambos modos de polarización. En el Capítulo 4 se introduce el concepto de color, y en especial la definición de color estructural como consecuencia de un efecto electromagnético. Se detalla el método para la obtención del color a partir del espectro de reflectancia de una muestra, y la interpretación de los diagramas de cromaticidad. El Capítulo 5 está dedicado a la presentación e implementación de varios métodos que utilizan diversas estrategias evolutivas que permiten obtener los parámetros relevantes de las estructuras presentes en las muestras en estudio. También se presenta el método 4x4, utilizado como método de resolución del problema directo, es decir, para la reproducción de la respuesta electromagnética de las especies en estudio. En el Capítulo 6 se validan los métodos presentados y se compara su desempeño para el objetivo planteado. Estos métodos también se aplican al caso particular del escarabajo *Ceroglossus suturalis* y se estudian en detalle sus respectivos desempeños. Finalmente, en el Capítulo 7 se expresan las conclusiones extraídas del presente trabajo, como así también las futuras líneas de investigación que surgen a partir del mismo.

Capítulo 2

Caracterización de las muestras biológicas

En este capítulo se presentan las especies de escarabajos seleccionados para su estudio. Se detallan las diferentes técnicas de microscopía utilizadas para observar y describir la microestructura que presentan los tejidos que recubren a dichas especies, como así también los métodos empleados para su caracterización.

2.1. Motivación

Uno de los primeros objetivos del presente trabajo de investigación fue la identificación de especies de escarabajos de interés que exhiben propiedades particulares desde el punto de vista electromagnético. Para llevar a cabo esta tarea, se recurrió al Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN). Con la colaboración del Director del Departamento de Entomología, Dr. Arturo Roig Alsina, se logró identificar un grupo de especies que, desde el punto de vista de su apariencia de color metálico e iridiscente, aparecían como potenciales candidatas a generar su color por medio de efectos estructurales. De este grupo de ejemplares, se seleccionaron en un principio cuatro especies para comenzar a estudiar, a saber: *Ceroglossus suturalis*, *Desmonota variolosa*, *Entimus imperialis* y *Megaphanaeus bonariensis*.

2.2. Materiales

El *Ceroglossus suturalis* es un escarabajo perteneciente al orden de los Coleópteros, de la familia de los carábidos (Fig. 2.1). La gran mayoría de los carábidos son predadores, carnívoros. *Ceroglossus* es un género endémico de la Patagonia argentina y chilena, desde Santiago de Chile hasta el extremo sur del continente. En particular se los encuentra en los bosques *Nothofagus* del extremo sur de Sudamérica, bajo palos secos. También se los puede hallar en quebradas de la precordillera con diversa vegetación e incluso habitan en las islas del extremo sur del continente, ya que están adaptados a medios semiacuáticos, donde hallan su refugio. Estos escarabajos poseen una cutícula extremadamente dura y

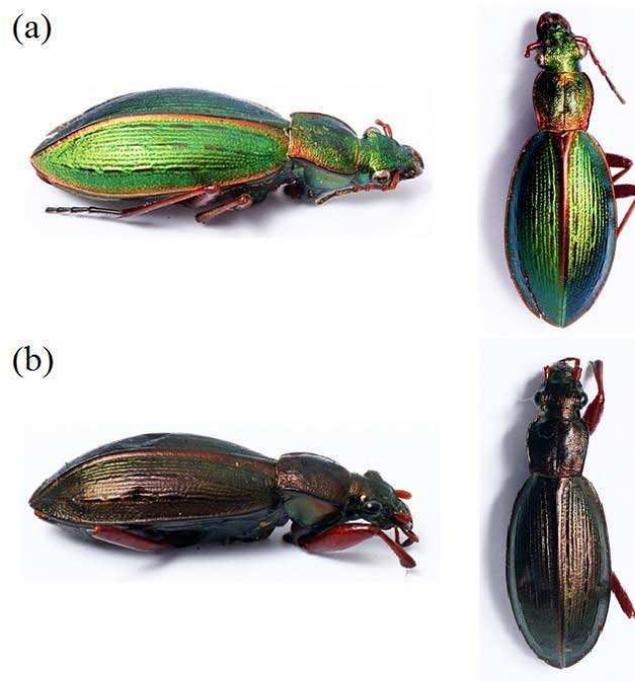


Figura 2.1: Fotografías del escarabajo *Ceroglossus suturalis*. Vista lateral y dorsal de un ejemplar de: (a) *Ceroglossus suturalis* de color verde, hallado en Tierra del Fuego-Argentina; (b) *Ceroglossus suturalis* de color cobrizo, hallado en Chile.

pueden alcanzar una longitud de hasta 6 cm. Esta especie llama mucho la atención de

los coleccionistas, pues algunos ejemplares son de gran tamaño y exhiben colores muy brillantes, en tonos muy variados.

El *Desmonota variolosa* es un escarabajo endémico de América del Sur que se emplea en la fabricación de joyas debido a su color verde iridiscente que se asemeja al de una esmeralda (Fig. 2.2).



Figura 2.2: Vista frontal, lateral, posterior y dorsal del escarabajo *Desmonota variolosa*.

La especie *Entimus imperialis* también pertenece al orden de los Coleópteros (Fig. 2.3). Estos escarabajos se pueden encontrar en Brasil y alcanzan una longitud de unos 16-30 milímetros. Su color de base es muy oscuro y sus élitros (alas anteriores modificadas por endurecimiento) poseen una gran curvatura y se encuentran comprimidos lateralmente. Las microcavidades que los recubren son muy brillantes y se asemejan a pequeños diamantes, por lo cual a esta especie también se la utiliza para la joyería.



Figura 2.3: Vista lateral, frontal y dorsal del escarabajo *Entimus imperialis*.

En la Fig. 2.4 se muestran imágenes de un ejemplar de *Megaphanaeus bonariensis*, que

habita en la Argentina (Córdoba, Tucumán, Chaco, Salta, Jujuy, Corrientes y Misiones), Paraguay y Bolivia.



Figura 2.4: Vista dorsal, frontal y lateral del escarabajo *Megaphanaeus bonariensis*.

2.3. Técnicas de microscopía utilizadas

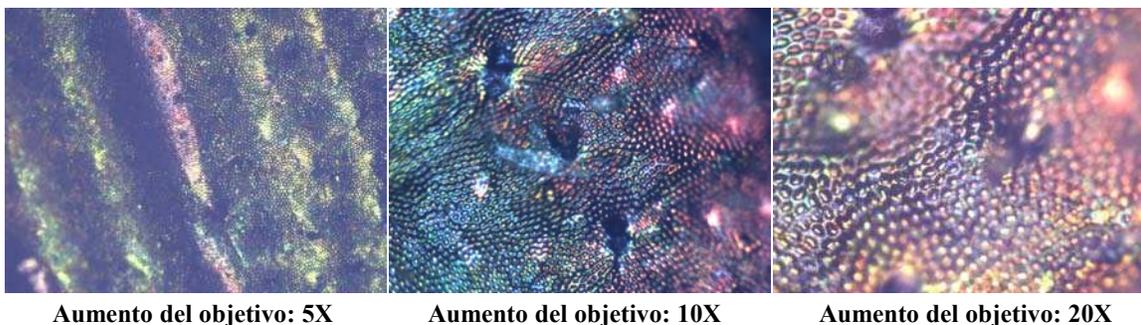
El objetivo principal del presente trabajo de Tesis es el desarrollo de algoritmos que permitan estimar las constantes dieléctricas y los parámetros geométricos de los tejidos más externos de las especies bajo estudio, y para ello es necesario conocer las características estructurales de las muestras. Por tal motivo, se registraron diversas imágenes de los élitros de todos los escarabajos, tanto de su topografía como de diferentes secciones transversales, para un posterior procesamiento. Las micrografías y las diapositivas se obtuvieron utilizando tres técnicas diferentes que permiten obtener imágenes con distintos aumentos: un microscopio óptico, un microscopio electrónico de barrido (SEM) y un microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Dado que la implementación y validación de los algoritmos de recuperación de parámetros incógnita de estructuras biológicas se ejemplificará en el caso de dos ejemplares de la especie *Ceroglossus suturalis*, a partir de aquí nos concentraremos en la caracterización de esta especie. La caracterización del resto de las especies seleccionadas se presenta en el Apéndice A.

2.3.1. Microscopio óptico

En primera instancia se observaron las muestras a través de un microscopio óptico (Olympus BX60M) ubicado en la Sala de Muestras del Pab. I - FCEyN - UBA. Dichas imágenes fueron capturadas por una cámara Fotométrica CoolSnap_{cf}. En la Figura 2.5 se muestran algunas de las imágenes de un sector dorsal del élitro del *Ceroglossus suturalis* verde y del cobrizo obtenidas con diferentes aumentos. En todas las fotografías se puede

Ceroglossus suturalis “verde”



Ceroglossus suturalis “dorado”

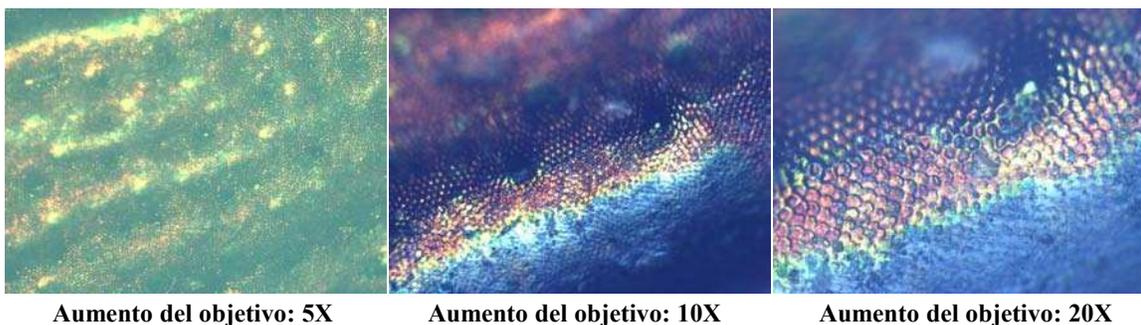


Figura 2.5: Fotografías tomadas a través de un microscopio óptico de un sector dorsal del élitro del *Ceroglossus suturalis* verde y del dorado, o cobrizo. En todos los casos el aumento del ocular es de 10X.

apreciar cómo estos dos ejemplares se caracterizan por el colorido de sus élitros en distintas gamas, el cual va variando según la muestra. También se observan canaletas paralelas entre sí, la falta de uniformidad en la corteza y la infinidad de pocitos que recubren todo el lomo

de los escarabajos. En estas imágenes preliminares ya se puede visualizar la complejidad de la topografía de esta especie.

2.3.2. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Para poder obtener información más detallada acerca de la microestructura de las muestras, es necesario recurrir a otras técnicas de microscopía más avanzadas, que proporcionen una resolución mayor. La microscopía electrónica de barrido permite reconstruir y observar con mayor detalle la topografía de una muestra, ya que provee información morfológica del material analizado a través de la detección de los electrones reflejados. La preparación de las muestras es relativamente sencilla pues la mayoría de los equipos de este tipo sólo requieren que éstas sean conductoras, por lo que se las recubre de una capa de algún material conductor tal como el carbón o el oro. Este recubrimiento debe ser lo suficientemente grueso como para que circule la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y a la vez lo suficientemente delgado para que no enmascare o tape las características superficiales de interés. En nuestro caso, el montaje de diferentes secciones de los élitros de los escarabajos consistió en asegurarlas al porta-muestra con cinta de carbono de doble cara adhesiva, y en algunos casos se aumentó la conductividad eléctrica recubriendo a la muestra con una capa muy fina de oro (sputtering). Cabe aclarar que el SEM proporciona imágenes en blanco y negro, dado que no utiliza luz visible.

Las imágenes que se muestran en este trabajo fueron obtenidas mediante dos microscopios SEM diferentes: Zeiss DSM 982 Gemini FE-SEM y Zeiss Supra 40 FESEM (ver detalles en el Apéndice B). Ambos equipos pertenecen al Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la FCEyN - UBA.

En la Fig. 2.6 se muestran las primeras imágenes de la topografía de un corte del élitro del *Ceroglossus suturalis* verde. En este caso la muestra no fue metalizada, sino sólo fijada con cinta de carbón al porta-muestras metálico del SEM. Se pueden apreciar con nitidez diversas secciones del élitro del escarabajo *Ceroglossus* verde, con diferentes aumentos. Los élitros de esta especie son alargados y convexos, y presentan una geometría particular

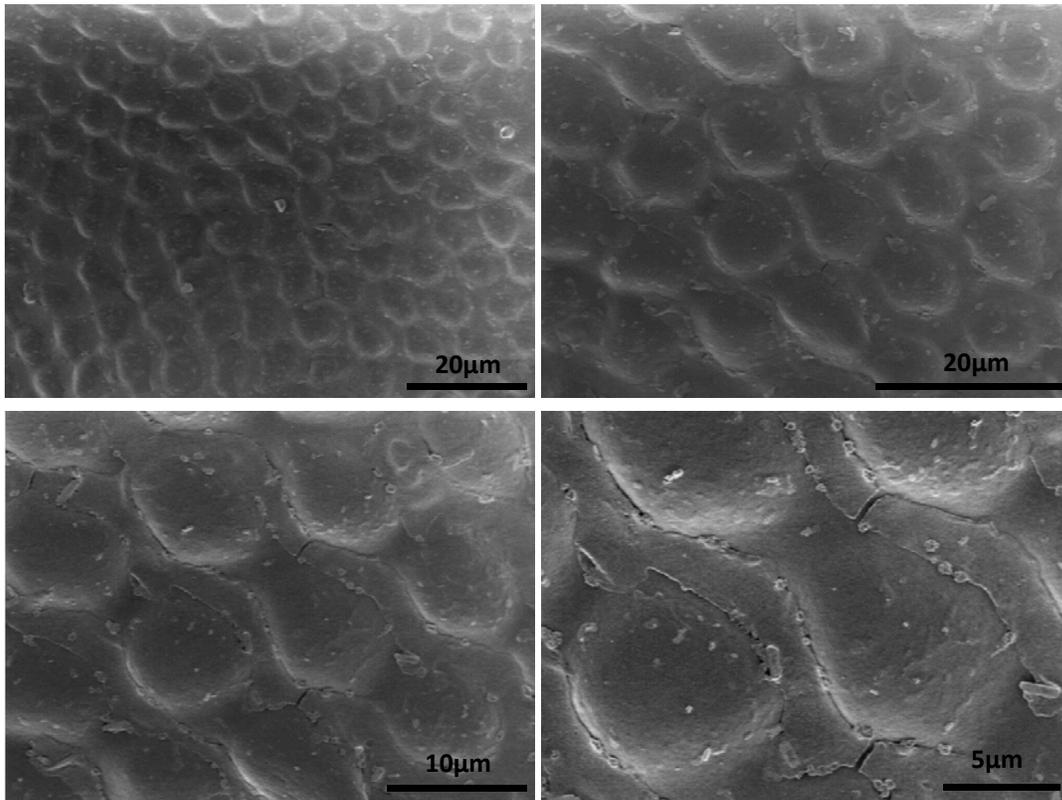


Figura 2.6: Imágenes correspondientes a la topografía del élitro del *Ceroglossus suturalis* verde obtenidas con el microscopio electrónico Zeiss DSM 982 Gemini FE-SEM del CMA, con distintos aumentos. La muestra no fue metalizada, sólo fijada con cinta de carbón al porta-muestras metálico del SEM.

caracterizada por estrías longitudinales y paralelas entre sí. Además, entre estas estrías hay costas salientes o alvéolos bastante pronunciados que son los que se pueden observar en detalle y a diferentes escalas en la Fig. 2.6. Todos los alvéolos son convexos y bastante similares en tamaño, y están distribuidos regularmente a lo largo del élitro. Estas imágenes permitieron estimar tanto los tamaños de estas microcavidades como la distancia entre ellas, las cuales recubren toda la superficie dorsal del escarabajo.

Con el objeto de obtener una mejor resolución en las imágenes, se procedió a metalizar las muestras con un tratamiento de deposición de capas de oro de entre 5 y 10 nm. Las imágenes obtenidas se observan en la Figura 2.7. Se pueden observar las protuberancias

en el élitro del escarabajo [paneles (a) - (c)], y también las capas internas y transversales a la vista superior del mismo [paneles (d) - (f)].

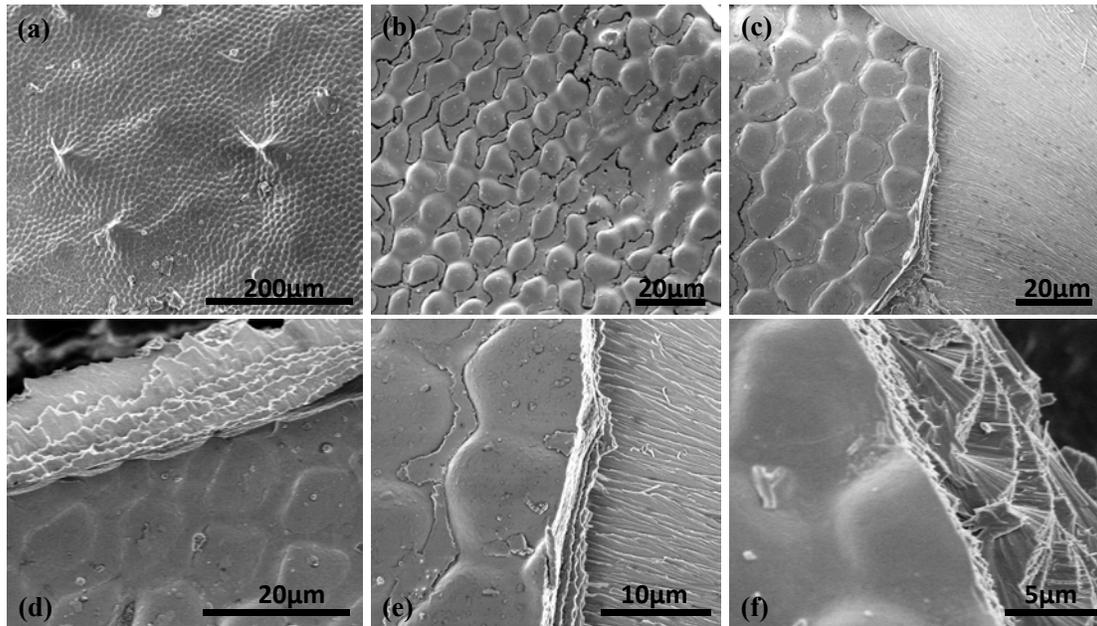


Figura 2.7: Imágenes correspondientes a la topografía de un corte del élitro del *Ceroglossus suturalis* verde obtenidas con el microscopio electrónico Zeiss DSM 982 Gemini FE-SEM del CMA, con distintos aumentos. Se pueden distinguir las protuberancias en el élitro del escarabajo [paneles (a) - (c)], y también las capas internas y transversales a la vista superior del mismo [paneles (d) - (f)].

En la Figura 2.8 se muestran imágenes de microscopía SEM correspondientes a cortes metalizados de un ejemplar de *Ceroglossus suturalis* dorado. Se repite cualitativamente la topografía y la presencia de la misma estructura interna de capas, respecto de lo observado para el ejemplar verde; incluso el tamaño de las microcavidades que conforman el élitro es similar.

Durante el desarrollo del presente trabajo de investigación el CMA adquirió un nuevo microscopio electrónico de barrido, el Zeiss Supra 40 FESEM, que mejora, entre otros aspectos, la resolución de las imágenes (1 nm). Dicho microscopio permite obtener detalles de la superficie en estudio sin necesidad de metalizarla, y por tal razón beneficia el estudio

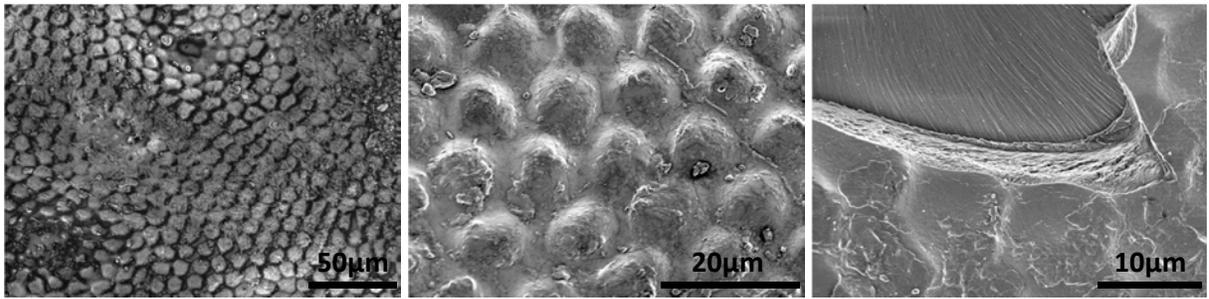


Figura 2.8: Imágenes correspondientes a la topografía de un corte del élitro del *Ceroglossus suturalis* dorado obtenidas con el microscopio electrónico Zeiss DSM 982 Gemini FE-SEM del CMA, con diferentes aumentos. Se repite la topografía y la presencia de la misma estructura interna respecto de lo observado en las Figuras 2.6 y 2.7 para el ejemplar verde.

de muestras biológicas, que no son conductoras. Dado que estamos interesados en conocer los parámetros geométricos de la microestructura de nuestras muestras con la mayor precisión posible, se volvieron a adquirir imágenes con este último microscopio de barrido, el cual nos permitió mejorar considerablemente la resolución y la escala de trabajo a pesar de no haber metalizado las muestras. Una selección de estas imágenes se muestra en la Fig. 2.9.

Al observarse en detalle las Figuras 2.6 - 2.9, se puede concluir que la topografía y la estructura interna de los escarabajos *Ceroglossus suturalis* verde y dorado son muy similares. Con respecto a la topografía, en ambos ejemplares los élitros presentan una curvatura global y estrías de puntos en hileras paralelas y longitudinales. Los intersticios entre las estrías elitrales se encuentran densamente punteados por alvéolos convexos que a su vez también poseen una curvatura local.

En las imágenes correspondientes a un corte transversal de la estructura interna de estos escarabajos, es posible distinguir varios conjuntos de multicapas. Como se especificó en el Capítulo 1 (Fig. 1.5), la capa externa o epicutícula del caparazón de estos escarabajos está constituida por un sistema de multicapas, y la capa interna o procutícula está formada por otros dos sistemas de multicapas. En la Fig. 2.10 se muestran las diferentes partes

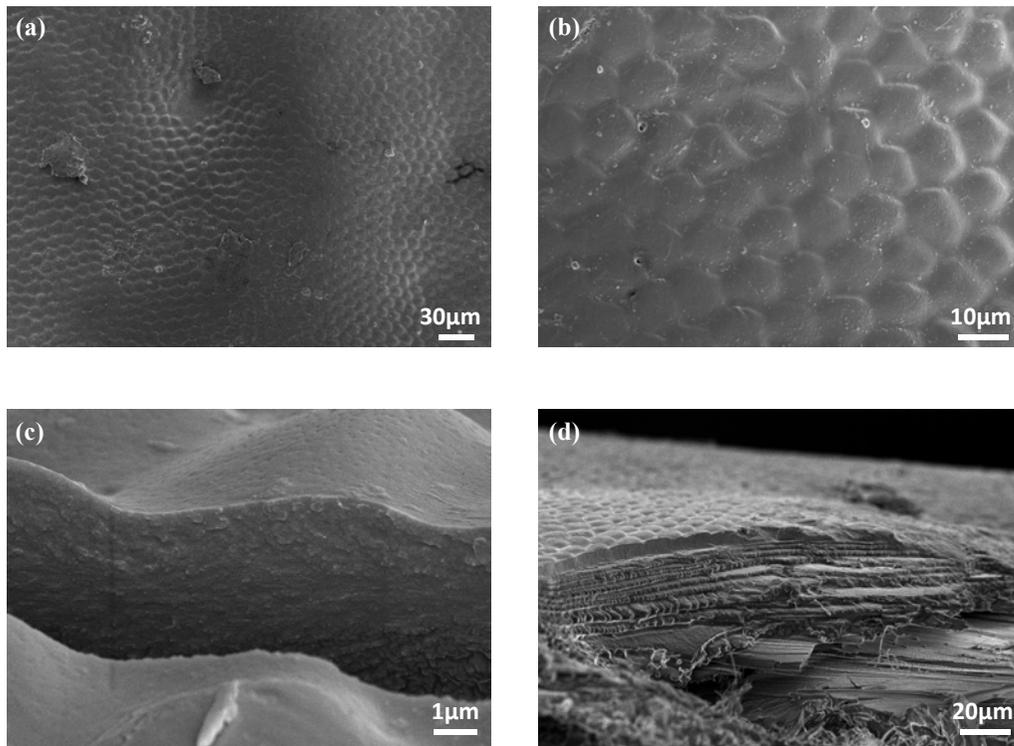


Figura 2.9: Imágenes de diferentes cortes del *Ceroglossus suturalis* dorado observadas con el microscopio electrónico de barrido. (a) - (b): Topografía del escarabajo, donde se distingue la presencia de los alvéolos que cubren todo el caparazón. (c) Corte transversal, se puede observar el detalle de la curvatura de un alvéolo. (d) Imagen de una sección transversal; se visualizan los alvéolos en el caparazón y las multicapas más profundas.

que componen la cutícula de un élitro de la especie *Ceroglossus suturalis* verde registradas por un SEM, las cuales son análogas en la especie dorada.

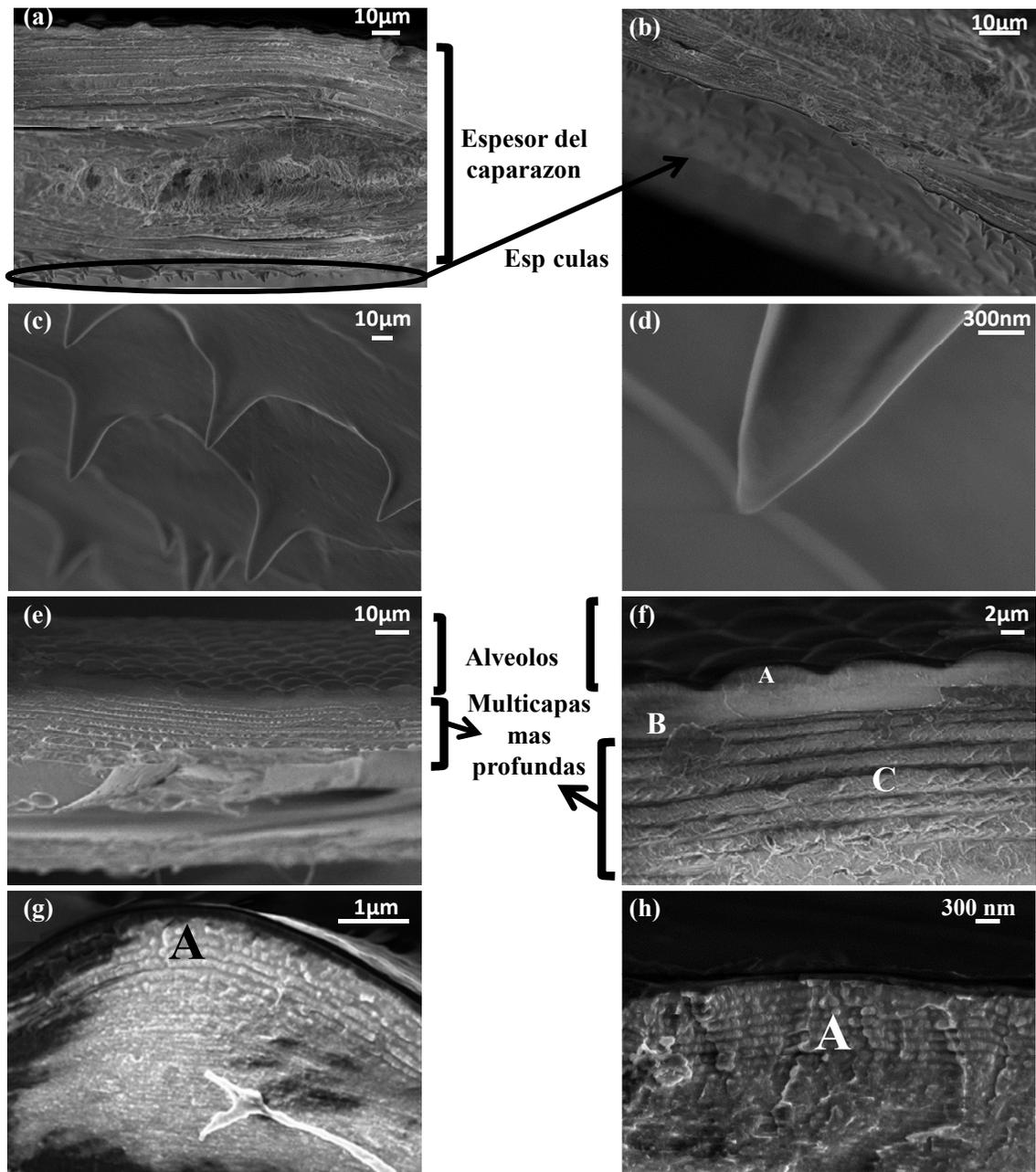


Figura 2.10: Imágenes del *Ceroglossus suturalis* verde. (a) Imagen de un corte transversal total del caparazón; (b) - (c) detalle de las espículas de la parte ventral del exoesqueleto; (d) detalle de una espícula; (e) detalle de los alvéolos del caparazón del escarabajo y de las capas más profundas de la endocutícula; (f) corte transversal observado en un SEM donde se muestran algunos de los alvéolos que componen la microestructura de la superficie del élitro y su estructura interna. La región A representa la exocutícula y la capa B se denomina mesocutícula, que es una zona homogénea y flexible y está compuesta por quitina. La mesocutícula separa la exocutícula de la endocutícula (C). (g) - (h) conjunto de multicapas pertenecientes a la exocutícula.

2.3.3. Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

El TEM provee información acerca de la composición de la muestra. Su funcionamiento básico consiste en la emisión de un haz de electrones dirigido hacia el objeto del cual se desea obtener una imagen aumentada. Parte de estos electrones rebotan o son absorbidos por el objeto, y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra, la cual es registrada en una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto. El microscopio electrónico de transmisión permite alcanzar una resolución de hasta 0.1 nm, y además tiene la capacidad de lograr un gran aumento, pudiendo llegar hasta un valor de 1 millón de veces. El TEM provee información acerca de la composición de la muestra, de su estructura interna y de detalles ultraestructurales. La imagen obtenida corresponde a la zona de la muestra que fue atravesada por los electrones, y su nitidez es proporcional al número de electrones que son transmitidos a través de la misma. Por esta razón, la porción de la especie analizada debe ser un corte ultrafino. Si bien el TEM proporciona imágenes muy precisas y de alta resolución y magnificación, la técnica de preparación de las muestras debe cumplir con protocolos establecidos y debe ser realizada por personal técnico especializado. Además, las imágenes obtenidas son planas, lo cual hace necesario, en algunos casos, un procesamiento posterior mediante algún software especializado en análisis de imágenes. Al igual que en el caso del SEM, el TEM proporciona imágenes en blanco y negro.

El microscopio TEM utilizado para las imágenes de este trabajo es un Philips - EM301, que se encuentra en el Centro de Microscopías Avanzadas de la FCEyN - UBA.

En la Figura 2.11 se muestran imágenes digitalizadas de cortes transversales del élitro de una muestra de *Ceroglossus suturalis* verde. En la parte superior de la micrografía (a) se distinguen y remarcan los alvéolos que recubren en forma regular y uniforme la superficie externa de los élitros de estos escarabajos. En la imagen (b) es posible observar cómo se compone la cutícula de esta especie, cuya estructura es compleja y multilaminada. La región A corresponde a la exocutícula, de espesor nanométrico, y las capas más profundas, B y C son la mesocutícula y la endocutícula, respectivamente, y pertenecen también a la

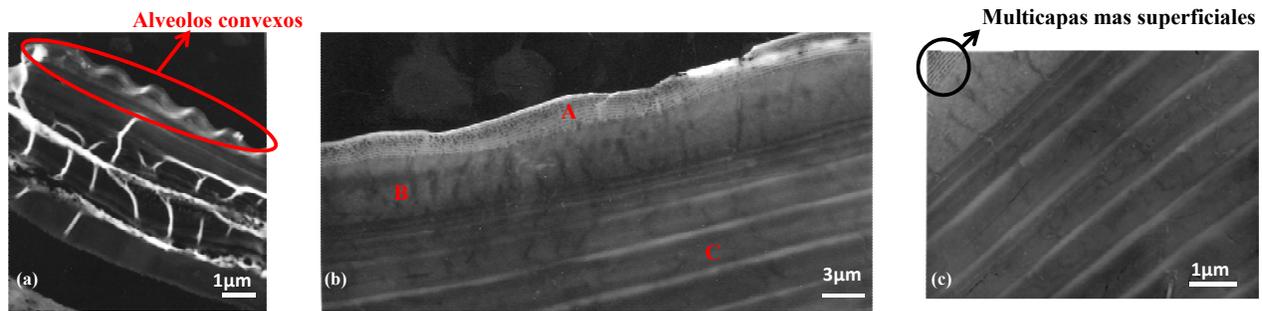


Figura 2.11: Imágenes TEM de cortes transversales del élitro de una muestra de *Ceroglossus suturalis* verde. En la micrografía (a) se visualizan los alvéolos que recubren todo el élitro. La imagen (b) permite diferenciar el conjunto de multicapas de la exocutícula (región A), la capa correspondiente a la mesocutícula (región B) y las multicapas más profundas de la endocutícula (región C). En la diapositiva (c) se remarca el conjunto de multicapas externas de la procutícula y de espesores nanométricos.

procutícula. B es una región de color homogéneo y C es otro conjunto de multicapas de mayor espesor, flexible, blando y permeable al agua.

Esta descripción, obtenida a partir del estudio de diapositivas registradas con un TEM, coincide con las imágenes observadas en el SEM.

2.4. Procesado de imágenes y caracterización estructural

Todas las especies estudiadas en esta Tesis exhiben un color iridiscente, el cual resulta de la interacción de la luz con la microestructura. Dado que uno de los objetivos del presente trabajo es comprender los mecanismos de producción de color en dichas estructuras, resulta imprescindible conocer en detalle y con precisión los parámetros geométricos, tanto de la topografía como de la estructura interna de las muestras en estudio, como ser el espesor del caparazón, el número de capas, la cantidad de períodos, el tamaño de los alvéolos, el espesor de cada capa, etc.

Para el procesamiento y el análisis de todas las imágenes digitales adquiridas se empleó el programa *ImageJ* [48] (ver Apéndice C). La totalidad de las imágenes adquiridas con los microscopios electrónicos de barrido y de transmisión (para todas las especies de escarabajos en estudio) se utilizaron como espacio muestral para el análisis estadístico que permitió la caracterización estructural de cada corte. En todas las imágenes digitales, previo a las mediciones y al análisis de las mismas, se extrajo el ruido de fondo, se ajustó el brillo y el contraste, se usó la escala de grises para visualizar detalles finos, y finalmente se calibró la escala.

A continuación se describe el procedimiento que se llevó a cabo para la especie *Ceroglossus suturalis* y para el resto de las especies con el objeto de obtener el número de períodos correspondientes a cada conjunto de multicapas. Como primera medida se seleccionó una determinada área que contenga a la zona de interés y se realizó un gráfico del perfil de intensidades. A modo de ejemplo, en la Fig. 2.12 correspondiente a la especie *Ceroglossus suturalis*, se muestra una imagen obtenida mediante el TEM (Fig. 2.12 (a)), una ampliación de la zona de multicapas más externas (Fig. 2.12 (b)), y el perfil de intensidades de gris correspondiente (Fig. 2.12 (c)). En esta última figura se pueden observar 8 picos correspondientes a las zonas más oscuras del conjunto de multicapas seleccionadas, que corresponden al número de capas “negras” que se pueden contabilizar a simple vista en la Fig. 2.12 (b).

Con respecto a la obtención de los espesores de cada capa, se pre-calibró espacialmente cada imagen teniendo en cuenta la escala correspondiente a cada diapositiva y micrografía, y a continuación se seleccionaron las capas de interés y se obtuvieron los espesores y longitudes buscadas. En todos los casos se realizó un análisis estadístico completo a través de histogramas, cuyos resultados finales se resumen en los cuadros 2.1 y 2.2.

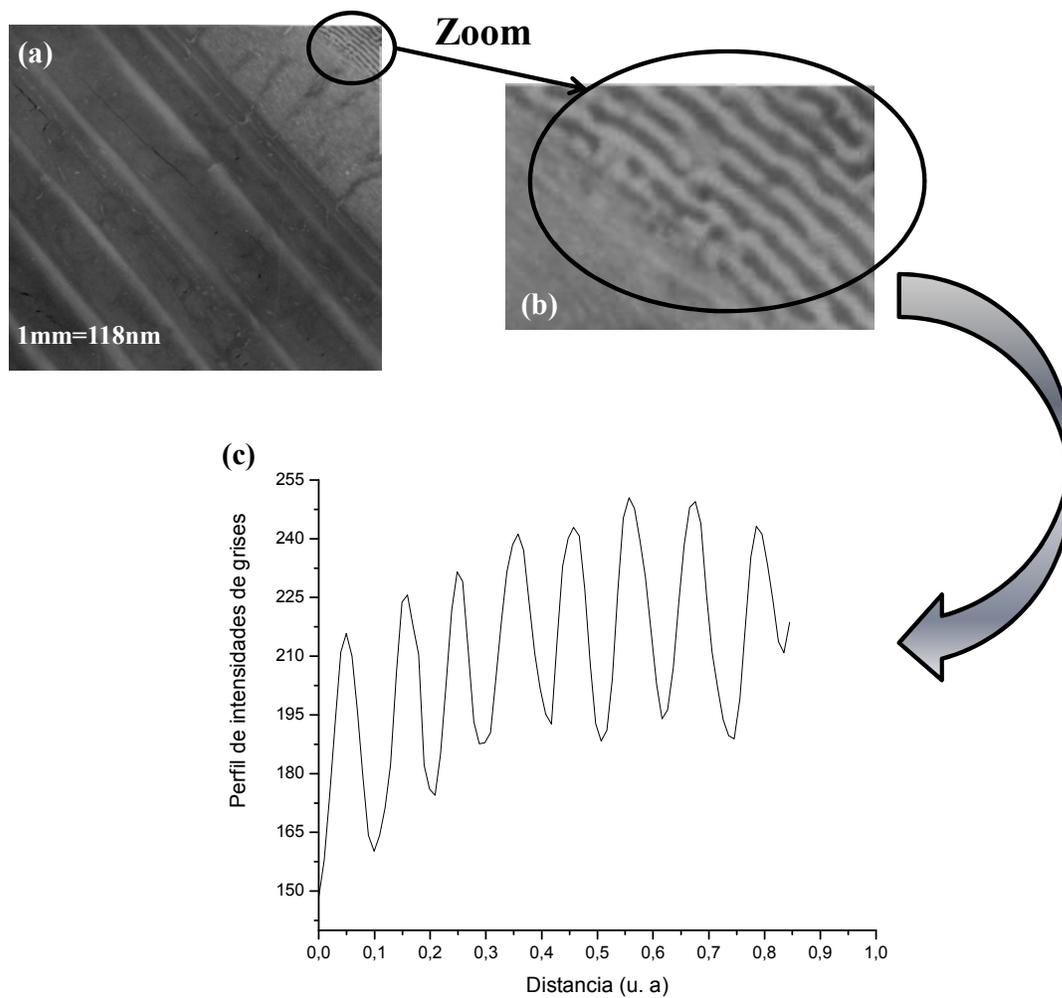
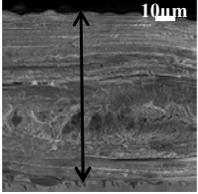
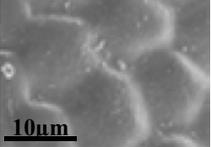
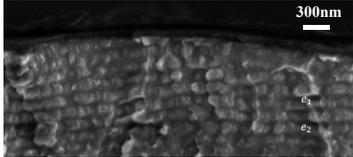
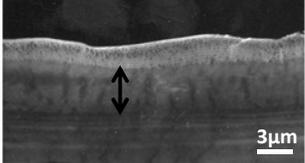


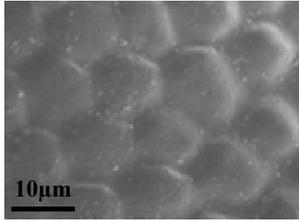
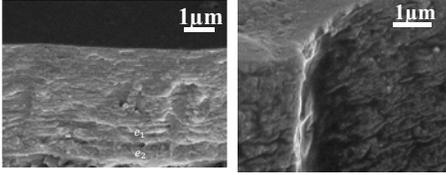
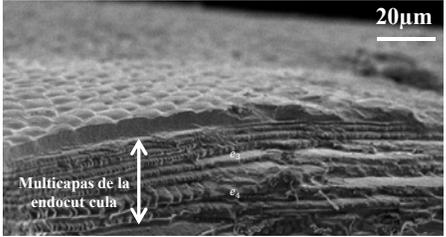
Figura 2.12: (a) Micrografía TEM de un corte del *Ceroglossus suturalis* verde. (b) Detalle de la zona de interés. (c) Se analiza, con el programa *ImageJ*, el perfil de intensidades de las capas más superficiales preseleccionadas.

CORTE ELEGIDO del <i>Ceroglossus suturalis</i> “verde” 	IMAGENES REFERENCIALES	ESPESORES (nm)
Caparazón		90000±600
Alvéolos		Diámetro de un alvéolo: 10130±130 Altura de un alvéolo: 2500±150
Multicapas superiores (bicapa compuesta por 9 periodos)		e_1 : espesor de las capas “negras”: 60± 4 e_2 : espesor de las capas “grises”: 100± 7
Mesocutícula (capa intermedia que divide la multicapa superior de la profunda de la procutícula)		2500±60
Multicapas más profundas (bicapa compuesta por 15 periodos)		e_3 : espesor de las capas grises “oscuras”: 1155±55 e_4 : espesor de las capas grises “claras”: 415±25

Cuadro 2.1: Síntesis de los parámetros medidos para el caparazón del escarabajo *Ceroglossus suturalis* verde.

Las caracterizaciones estructurales del resto de las especies, *Desmonota variolosa*, *Entimus imperialis* y *Megaphanaeus bonariensis*, se presentan en el Apéndice A.

Las imágenes adquiridas y mostradas en el presente capítulo con el microscopio óptico, el SEM y el TEM se complementaron entre sí y fueron utilizadas para la caracterización de las especies. En síntesis, la topografía de los élitros del escarabajo *Ceroglossus suturalis* consta de estrías paralelas longitudinales de color cobrizo-dorado, entre las cuales se

CORTE ELEGIDO del <i>Ceroglossus suturalis</i> “dorado” 	IMAGENES REFERENCIALES	ESPESORES (nm)
Alvéolos		Diámetro de un alvéolo: 11120 ± 130 Altura de un alvéolo: 2500 ± 150
Multicapas superiores (bicapa compuesta por 20 periodos)		e_1 : espesor de las capas “negras”: 70 ± 4 e_2 : espesor de las capas “grises”: 120 ± 7
Multicapas más profundas (bicapa compuesta por 33 periodos)		e_3 : espesor de las capas “grises”: 1300 ± 60 e_4 : espesor de las capas “negras”: 640 ± 30

Cuadro 2.2: Síntesis de los parámetros medidos para el caparazón del escarabajo *Ceroglossus suturalis* dorado.

visualizan alvéolos de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de diámetro y $2.5 \mu\text{m}$ de profundidad, distribuidos en forma uniforme y regular. Por otro lado, analizando una sección transversal del ala, es posible distinguir dos conjuntos de multicapas: uno más superficial conformado por un arreglo periódico de bicapas (período formado por dos capas de diferentes espesores e índices de refracción) cuyo espesor es de cientos de nanómetros, y otro sistema de multicapas más profundo cuyo período ($e_3 + e_4$) es mayor que los valores de las longitudes de onda correspondientes al espectro visible, por lo que se espera que su rol no sea

primordial en la generación del color de la muestra. Las diferencias fundamentales entre los sistemas de multicapas del ejemplar verde y del dorado radican en los espesores de las multicapas y en el número de períodos que los conforman.

Esta descripción detallada de los parámetros geométricos de las microestructuras presentes en estos escarabajos, es el punto de partida si se desea construir un modelo electromagnético que intente reproducir la generación de color estructural o la respuesta electromagnética de dichos ejemplares. Teniendo en mente además, que el objetivo principal de esta Tesis es el desarrollo de algoritmos que permitan la recuperación de los parámetros relevantes de dichas microestructuras, como por ejemplo las constantes dieléctricas y los espesores de las capas, la caracterización llevada a cabo en este capítulo es fundamental para la elaboración del modelo electromagnético que forma parte de tales algoritmos, y que se presentará en detalle en el Capítulo 5.

Capítulo 3

Mediciones de Reflectancia

*Tal como se mencionara en el capítulo anterior, a partir de aquí el trabajo de Tesis se focaliza en el estudio de la especie *Ceroglossus suturalis*. En este capítulo se detallan los diferentes montajes experimentales utilizados para obtener la respuesta reflejada de las muestras para incidencia normal y para incidencia oblicua, para ambos modos de polarización. Luego se muestran y analizan las curvas de reflectancia obtenidas para los dos ejemplares de *Ceroglossus suturalis* estudiados, el verde y el dorado.*

3.1. Motivación

Teniendo en mente que el objetivo final de este trabajo de Tesis es lograr un método para la obtención de los parámetros relevantes de la microestructura natural responsable del color estructural, como por ejemplo los índices de refracción de los materiales que componen dicha microestructura, es necesario conocer su respuesta electromagnética. Hay muchas maneras de obtener dicha respuesta, y en cada caso, la información obtenida es diferente [49]. En particular, para la recuperación de parámetros relevantes de una determinada muestra, es conveniente contar con un conjunto de curvas de reflectancia obtenidas para diferentes ángulos de incidencia y modos de polarización.

Uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación es el estudio de la producción de color en materiales naturales microestructurados. Dado que tanto la geometría

como la composición de los materiales que conforman estas estructuras es muy compleja, para poder conocer los mecanismos físicos que subyacen en la generación del color estructural, es necesario recurrir a modelos electromagnéticos simplificados. En muchos casos, no resulta sencillo discriminar los parámetros relevantes del sistema. Por ejemplo, se mencionó en capítulos anteriores que la cutícula del escarabajo *Ceroglossus suturalis* presenta un sistema periódico de multicapas que es el responsable de la iridiscencia. Sin embargo, los espesores de las capas no son iguales en cada período, ni se mantienen constantes en las diferentes muestras ni en diferentes secciones de un mismo corte. La estructura presenta una curvatura global que no es despreciable, y las interfases entre capa y capa presentan rugosidad aleatoria. Si bien se puede extraer información geométrica de las micrografías SEM y TEM, la muestra utilizada para obtener dichas imágenes siempre es diferente de la utilizada para las mediciones de reflectancia, lo cual dificulta la caracterización. Otro de los obstáculos que deben enfrentarse para realizar este tipo de estudios es el vacío que hay en la literatura respecto de las constantes dieléctricas de los tejidos biológicos. Todos estos inconvenientes nos motivaron a buscar una alternativa que nos permitiera recuperar los parámetros relevantes de la estructura biológica a partir de los espectros de reflectancia medidos, es decir, un método para resolver el problema inverso [50, 51].

Dado que en general el problema inverso no tiene solución única, los métodos de este tipo deben alimentarse con la mayor cantidad de información acerca de la muestra en cuestión, para evitar la degeneración en las soluciones halladas y la convergencia a una solución falsa. Es por eso que resulta imperativo poder obtener curvas de reflectancia confiables para diferentes configuraciones incidencia-observación y para diferentes modos de polarización. A continuación se detallan los diferentes montajes utilizados para la realización de dichas mediciones.

3.2. Esfera integradora

Uno de los métodos experimentales más empleados para la obtención de la respuesta reflejada, con la finalidad de extraer información acerca del color estructural de la mues-

tra, es el uso de esferas integradoras [52]. Básicamente, la función de estos dispositivos es integrar espacialmente el flujo radiante reflejado por una muestra sin importar la dirección hacia donde refleja. Una esfera integradora tiene su interior hueco recubierto de un material blanco de sulfato de bario (Ba_2SO_4) de gran pureza que refleja y esparce la luz muy eficientemente en todas direcciones. El principio en que se basa es que luego de varias reflexiones en sus paredes interiores, el flujo radiante reflejado se uniformiza, por lo cual para obtener el flujo total que refleja la muestra es correcto medir el flujo luminoso que llega a una área pequeña y multiplicarlo proporcionalmente al área total de la esfera.

Las primeras mediciones de reflectancia de nuestros especímenes fueron realizadas en el INQUIMAE, FCEN, con la colaboración de la Dra. Gabriela Lagorio, en cuyo laboratorio hay un espectrofotómetro de esfera integradora UV-VIS-NIR ISR-3100. Para realizar la medición, las muestras fueron colocadas sobre una cartulina negra opaca y ésta sobre el porta-muestras. A continuación, y ya con la placa de Ba_2SO_4 insertada para ser usada como referencia, se realizó la corrección de la línea de base, tanto para el 100% de reflectividad como para el 0%. Con este montaje se obtuvieron espectros de reflectancia extremadamente baja, debido a que ninguna de las muestras cubría en su totalidad el área del porta-muestras y por lo tanto el detector también recibía múltiples reflexiones que claramente no provenían del corte en estudio. Por otra parte, las reflexiones múltiples no son convenientes para lograr el objetivo propuesto debido a que opacan el estado de polarización de la luz. Por tal razón, utilizando esferas integradoras convencionales no es posible discriminar la dependencia angular y la polarización óptica [35]. Por todos estos motivos, descartamos las mediciones de las curvas de reflectancia con un espectrofotómetro de esfera integradora.

3.3. Espectrómetro acoplado a fibra óptica

Durante el desarrollo de esta Tesis, el Grupo de Electromagnetismo Aplicado de la FCEN-UBA (GEA) comenzó a montar un laboratorio destinado principalmente a la medición de la respuesta electromagnética de muestras biológicas. Uno de los primeros equipos

adquiridos (por considerarse el más apropiado para concretar nuestras mediciones de reflectancia) fue un espectrómetro acoplado a fibra óptica, de la marca Ocean Optics USB4000, que trabaja en el rango de detección de longitudes de onda de 200 - 1100 nm. Dicho espectrómetro es versátil y portátil, sus dimensiones son 89.1 mm x 63.3 mm x 34.4 mm y su peso es de sólo 190 g. El espectrómetro viene asociado con un programa, el *SpectraSuite*, que es una plataforma para la recopilación, almacenamiento y análisis de los datos espectrales.

Para una correcta adquisición de los espectros de intensidad, de reflectancia, de transmitancia y/o de absorbancia en función de la longitud de onda, es necesario ajustar varios parámetros del programa, tales como el tiempo de integración y la cantidad de muestras o barridos promedio. El tiempo de integración es el período de tiempo en el cual el detector recolecta fotones antes de enviar la señal al programa. Su ajuste se emplea para reducir el ruido que suele visualizarse en el espectro. Aumentando el tiempo de integración se logra igualar el número de variaciones aleatorias por debajo y por encima de la señal de interés, anulando así la contribución del ruido. De esta manera, se permite detectar un mayor número de cuentas, logrando una mayor precisión en el espectro. Sin embargo, el detector tiene una capacidad limitada de detección de cuentas por medición, que para nuestro dispositivo es de 65535 cuentas, a partir del cual el detector satura. Para que esto no ocurra, se debe ajustar la cantidad de barridos a promediar en cada medición. Esta función establece el número de barridos individuales que se utilizarán para promediar en los resultados que se muestran. Por ejemplo, si se aumenta este número se logra mejorar la relación señal-ruido, disminuyendo el ruido observado en la gráfica. Finalmente, otro parámetro importante es el ancho del “boxcar” que promedia en base a los pixeles adyacentes del detector y no en base al espectro total, como lo hace el promediado de barridos promedio. Por ejemplo, un boxcar de 10 toma un intervalo entre 10 pixeles a la izquierda y 10 pixeles a la derecha del pixel actual (incluyendo el pixel actual), y luego promedia los valores detectados. El valor promedio es el que se asigna al pixel actual o central de la adquisición. Más detalles acerca de las especificaciones, de los componentes y del funcionamiento del espectrómetro USB4000 se pueden encontrar en la referencia [53].

La reflectancia se define como el porcentaje de potencia reflejada respecto de la potencia incidente, para una longitud de onda fija [54]. Un método posible para medir la potencia incidente es a partir de la potencia reflejada de una superficie que refleje toda la luz que incide sobre ella. Si bien en la práctica no existen superficies que sean 100 % reflectantes, hay algunas que se aproximan bastante y son las que se utilizan como referencias patrón. En este trabajo de investigación se utilizaron dos patrones blancos: una cinta de teflón sobre un porta-muestras y el patrón comercial de reflectancia difusa Ocean Optics. La siguiente ecuación sintetiza cómo calcula el programa *SpectraSuite* la reflectancia de una muestra para una determinada longitud de onda λ a partir de tres intensidades [55]:

$$R_\lambda = \frac{S_\lambda - O_\lambda}{P_\lambda - O_\lambda} * 100 \quad (3.1)$$

donde S_λ corresponde a la intensidad de fotones reflejada por la muestra, P_λ es la intensidad del patrón blanco utilizado y O_λ es la intensidad en ausencia de luz. La variable O_λ es básicamente la intensidad producida por ruido propio del espectrómetro y/o por luces externas al experimento. Para tener una medición confiable de intensidad, tanto de la muestra como de la referencia, es necesario sustraer este ruido de fondo, y es por eso que se resta O_λ tanto en el numerador como en el denominador.

Para realizar una medición, en primer lugar se deben ajustar las variables de muestreo, es decir, el tiempo de integración, la cantidad de barridos a promediar y el ancho del boxcar. Previo al registro del espectro que se quiere grabar se deben adquirir los espectros de intensidad de los patrones de referencia blanco (máxima reflectancia medible) y negro (mínima reflectancia). De esta manera, el programa aplicará la ecuación (3.1) para mostrar la curva de reflectancia de la muestra en estudio en función de las longitudes de onda del espectro visible. Para el registro del espectro oscuro basta con bloquear el paso de la luz hacia el espectrómetro. Luego de esta calibración se coloca la muestra y se adquiere su espectro de reflectancia. Es importante remarcar que si se cambia cualquiera de las variables de muestreo como el tiempo de integración, el número de muestras a promediar, el ángulo, la temperatura, el tamaño de la fibra, etc., se debe registrar un nuevo espectro oscuro de referencia.

Para la realización de las mediciones de intensidad en función de la longitud de onda se utilizó como fuente de luz una lámpara de tungsteno, y el espectrofotómetro Ocean Optics USB4000 se acopló a una fibra óptica determinada, según la medición realizada. Una de las fibras utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis es un juego de fibra óptica bifurcado en forma de “Y” (fibra coaxial), cuyo rango de longitudes de onda de mejor eficiencia está entre 200 y 1100 nm [56] (Fig. 3.1 (a)). Este conjunto, de 2 metros de largo y un núcleo de diámetro $400 \pm 8 \mu\text{m}$, posee en su extremo principal 7 fibras ópticas, una central y 6 a su alrededor, dispuestas como se puede observar en la Fig. 3.1 (b). En el nexo de bifurcación la fibra se divide: por un lado el núcleo central continúa en una de las ramas, y por el otro las 6 fibras de alrededor. Todas las fibras tienen igual diámetro.

La medida de intensidad se lleva a cabo enfrentando el extremo principal de la fibra coaxial con la muestra a medir. El extremo de la fibra óptica con 6 fibras, que lleva la luz incidente, debe ser conectado a la fuente de iluminación (lámpara de tungsteno), y el que posee una sola fibra central debe conectarse al espectrómetro. De esta manera se logra iluminar con mayor intensidad y al coleccionar la luz con un único núcleo se aumenta la precisión en la medición.

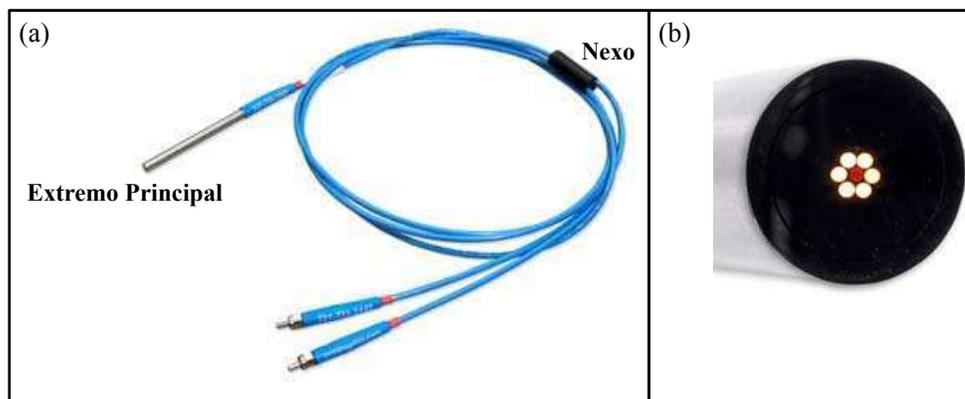


Figura 3.1: Fibra óptica coaxial. (a) Vista completa de la fibra, en la que se observa el extremo principal y el nexo previo a la bifurcación; (b) vista frontal del extremo principal de la fibra óptica coaxial con un total de 7 núcleos dispuestos uno en el centro y seis alrededor de éste.

Los primeros espectros se tomaron bajo incidencia y ángulo de observación normal, utilizando la fibra óptica coaxial antes mencionada, la cual se introduce en un soporte o plataforma cilíndrica de aluminio anodizado que posee un orificio cilíndrico central a 90° de la superficie de apoyo, y cuyo diámetro es aproximadamente el mismo que el de la cubierta exterior de la fibra óptica. Este soporte posee un escalón interno que permite fijar la distancia entre el extremo de la fibra y la muestra en estudio. Tal distancia focal, a la cual se minimiza el tamaño de la zona iluminada, es de aproximadamente 6 mm. En la Fig. 3.2 se muestra un esquema del arreglo experimental para la adquisición de las reflectancias de los escarabajos a incidencia normal.

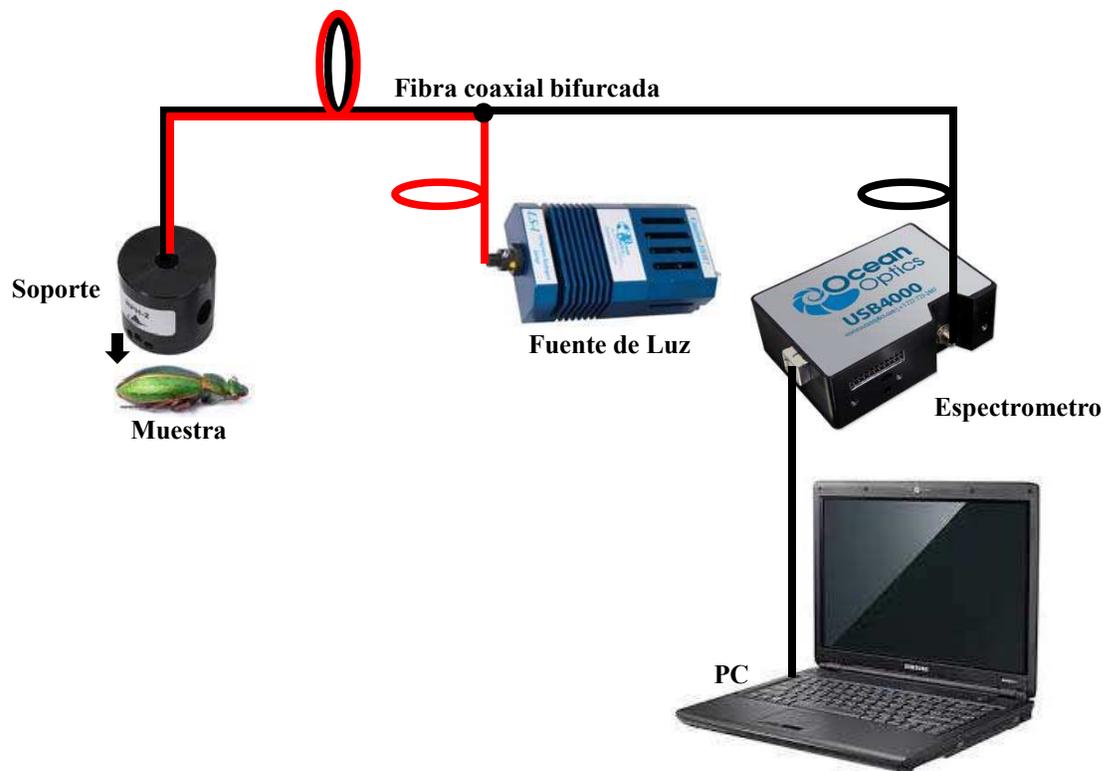


Figura 3.2: Esquema del dispositivo experimental para mediciones de reflectancia bajo incidencia normal empleando una fibra coaxial. (Obs.: los elementos no se presentan a escala).

En la Fig. 3.3 se pueden observar algunos de los espectros de reflectancia del escarabajo

Ceroglossus suturalis verde obtenidos de esta manera, en función de la longitud de onda. Cada una de las curvas de dicha figura corresponde a un sector diferente de la muestra, y fue obtenida tal como se describió en detalle en los párrafos previos.

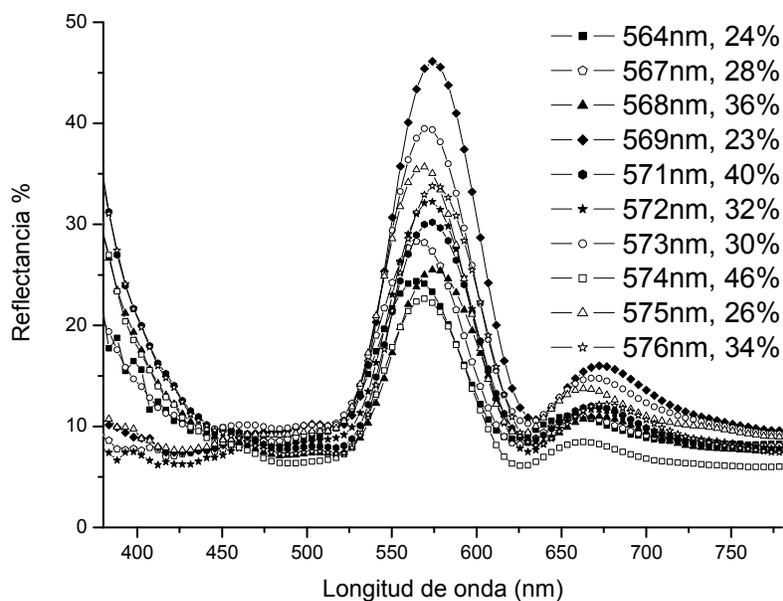


Figura 3.3: Espectros de reflectancia para incidencia y observación normal, sobre diferentes sectores del caparazón de una muestra de *Ceroglossus suturalis* verde, medidos con la fibra coaxial y el espectrómetro Ocean Optics USB4000.

Como puede verse en la Figura 3.3 para un ángulo de incidencia y observación normal a la superficie media de la muestra, tanto la posición espectral del pico como su reflectancia dependen de la zona iluminada. Para las zonas de la muestra medidas en este caso, la longitud de onda correspondiente al pico de máxima reflectancia varía entre 564 nm y 576 nm, que corresponde al verde-amarillo, lo cual es consistente con el color observado a simple vista. Por otra parte, la reflectancia máxima varía entre el 23 % y el 46 % según el sector de la muestra. También se observa un segundo pico de reflectancia ubicado aproximadamente en los 668 nm, que corresponde a un tono rojizo. Este pico da cuenta de la influencia de las estrías alternadas de color cobre distribuidas sobre el caparazón (ver Fig. 2.1 (a) del Capítulo 2) y que son captadas por la fibra óptica.

De acuerdo con los espectros observados en la Fig. 3.3 para distintas zonas del caparazón, la topografía de la muestra biológica claramente influye fuertemente en la respuesta reflejada, y en particular, en la posición espectral del pico. Además, tal como se explicó en el Capítulo 2, la muestra no es plana sino que posee una curvatura que dificulta el apoyo del soporte sobre la misma. Todo esto hace muy difícil obtener medidas repetibles con este montaje.

Estas primeras mediciones pusieron en evidencia que este montaje experimental no permite obtener curvas repetibles para este tipo de muestras complejas. Las fluctuaciones de las características representativas de las curvas, como son la longitud de onda del pico y la máxima reflectancia, son demasiado importantes. Además, teniendo en cuenta que se pretende obtener mediciones de reflectancia confiables para diferentes ángulos de incidencia y modos de polarización, se hizo evidente la necesidad de optimizar el dispositivo experimental para lograr este objetivo.

En la siguiente Sección se describe el montaje experimental optimizado, que fue utilizado para obtener las curvas de reflectancia definitivas.

3.4. Montaje experimental para mediciones a incidencia normal

Las mediciones de reflectancia de las muestras biológicas en estudio que fueron finalmente empleadas para la recuperación de los parámetros relevantes de la estructura, se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Daniel Schinca en su laboratorio del Centro de Investigaciones Ópticas de La Plata (CIOp). Como primer paso, se propuso verificar experimentalmente la iridiscencia de las muestras bajo estudio. Para estas mediciones se utilizó una lámpara halógena (no polarizada) bi-pin de tungsteno como fuente de luz. Se posicionó un diafragma para controlar la iluminación y colimar el haz de entrada, el cual incide sobre una lente convergente en cuyo foco se colocó la fibra óptica emisora que ilumina a la muestra. Las muestras de *Ceroglossus suturalis* se montaron en un porta-

muestras y se colocaron en forma perpendicular a la base de un goniómetro, facilitando de esta manera el posicionamiento angular preciso de la fibra óptica colectora para diferentes ángulos de observación. Esta fibra tiene una longitud de 2 metros de largo y el diámetro de su núcleo es de $200 \pm 6 \mu\text{m}$. A continuación se la acopló a un espectrómetro Ocean Optics USB650, y éste último se conectó finalmente a una computadora. Un esquema de este montaje se puede ver en la Figura 3.4.

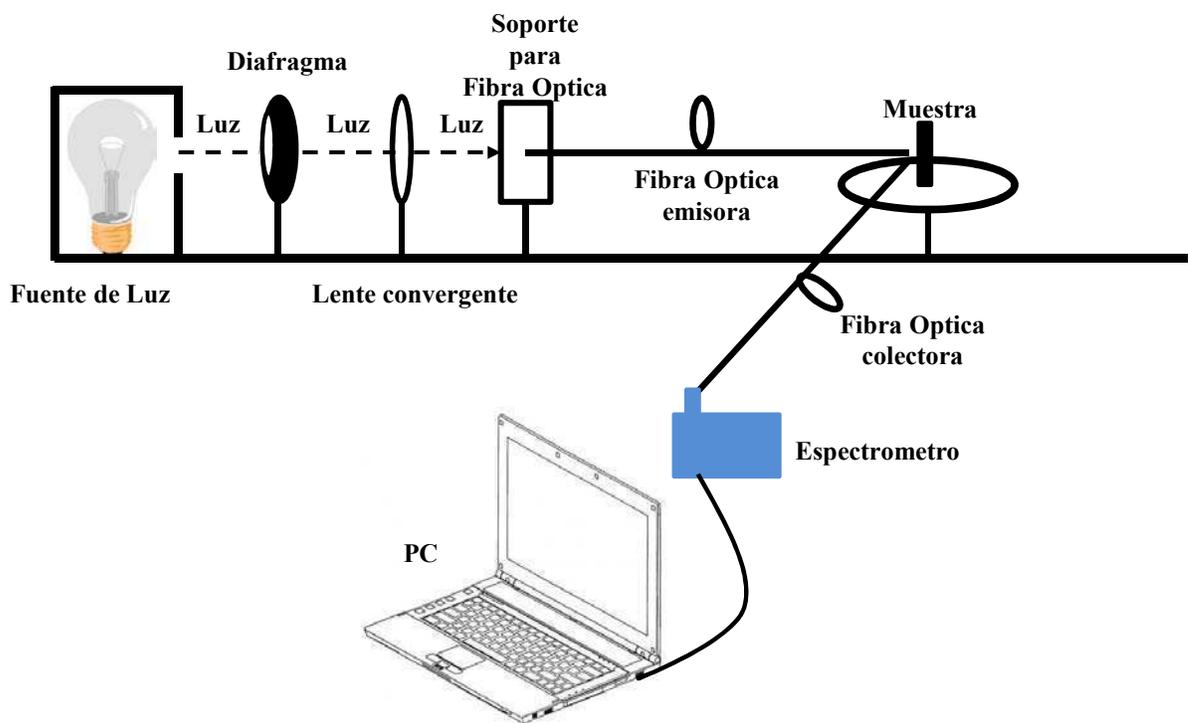


Figura 3.4: Esquema del montaje experimental para mediciones de reflectancia a incidencia normal. En líneas punteadas se remarca el camino seguido por la luz. (Obs.: los elementos no se presentan a escala).

Las fotografías de la Figura 3.5 (a)-(b) muestran el arreglo experimental descrito en el párrafo anterior. Esta configuración fue utilizada para las primeras mediciones a incidencia normal y observación a diferentes ángulos. En la fotografía (c) de dicha figura se observa en detalle el sistema de iluminación sobre la muestra en estudio y el sistema de recolección de la luz reflejada.

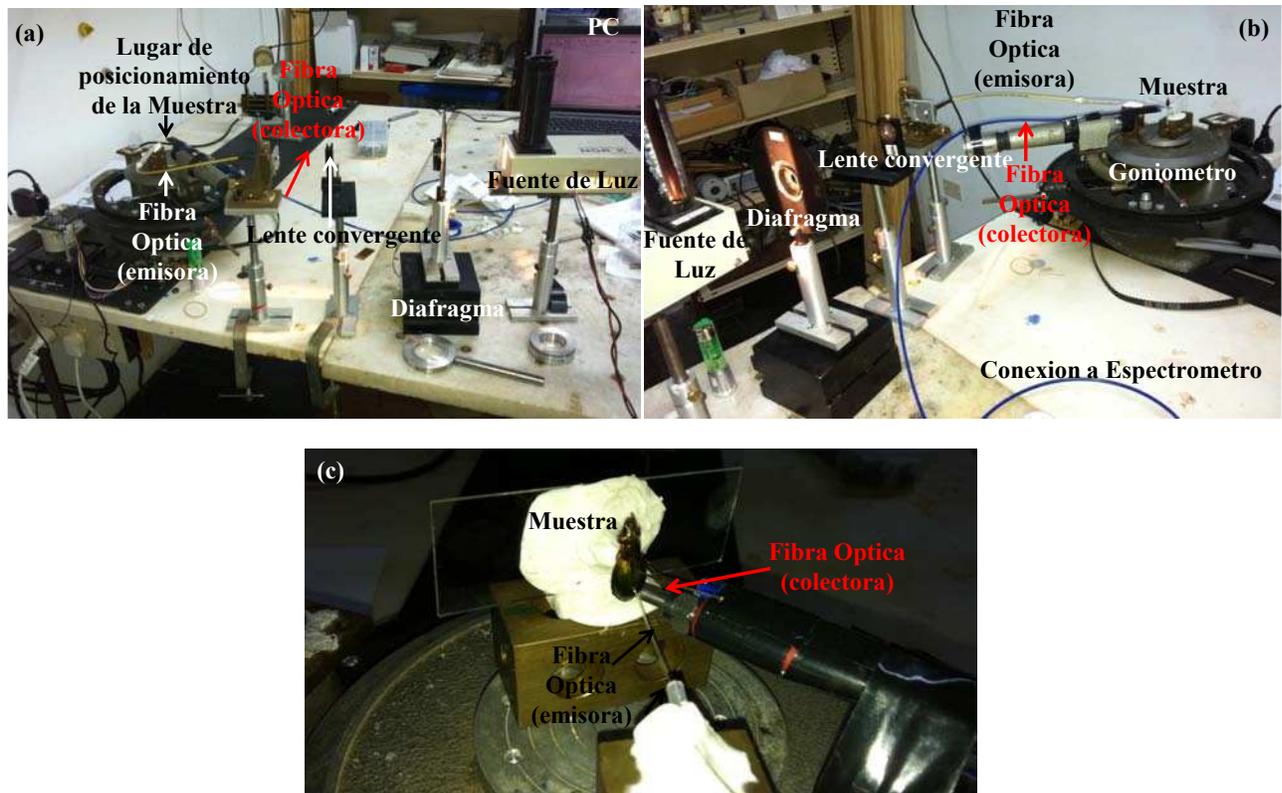


Figura 3.5: (a)-(b): Fotografías del dispositivo experimental utilizado para incidencia normal sobre la muestra. El iluminante empleado es una fuente de luz blanca no polarizada (lámpara bi-pin de tungsteno) y el espectrómetro comercial es un Ocean Optics USB650. (c) Vista superior del goniómetro sobre el cual se posiciona la muestra, que es iluminada bajo incidencia normal a través de una fibra óptica. La segunda fibra óptica se encuentra acoplada al espectrómetro.

Se adquirieron y registraron los espectros de reflectancia para incidencia normal de los dos ejemplares de escarabajos *Ceroglossus suturalis*, el verde y el cobrizo. El área iluminada del caparazón fue en todos los casos menor a 1.8 mm^2 . Se obtuvieron curvas para distintos ángulos de observación en función de la longitud de onda, dentro del espectro visible. El error angular en la determinación de los ángulos fue de aproximadamente 3° . El tiempo de integración del espectrómetro utilizado en estas mediciones fue de 2 segundos y las curvas obtenidas corresponden al promedio de 4 barridos. Los espectros obtenidos para ambos

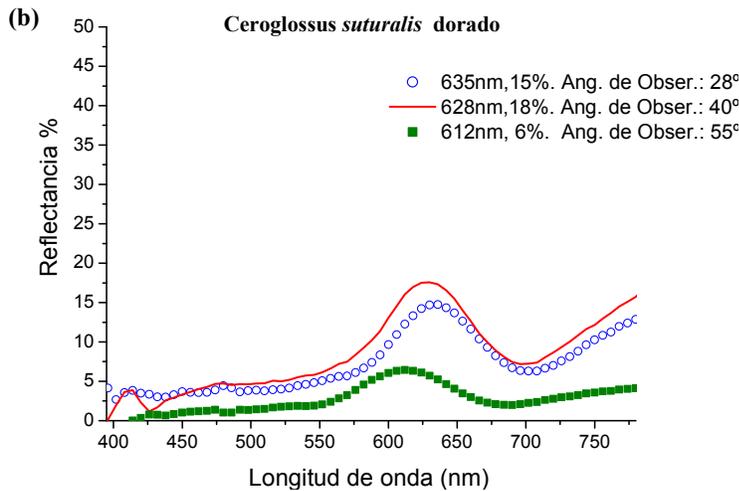
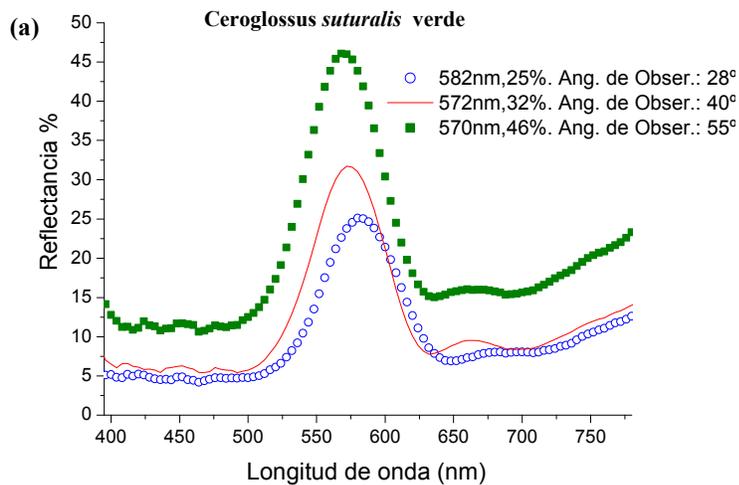


Figura 3.6: (a)-(b) Espectros de reflectancia de dos muestras de *Ceroglossus suturalis* obtenidos a incidencia normal y para diferentes ángulos de observación: 28°, 40° y 55°. (a) *Ceroglossus suturalis* verde y (b) *Ceroglossus suturalis* dorado. (c)-(d) Detalle del color reflejado por la muestra del escarabajo verde en dos zonas diferentes del caparazón. Se puede observar la influencia de la topografía y de la curvatura en el color observado. (e) Fotografía de una de las zonas iluminadas del caparazón del escarabajo dorado.

ejemplares se muestran en la Figura 3.6. En ambas especies se observa que a medida que aumenta el ángulo de observación hay un corrimiento del pico de reflectancia hacia valores menores en longitud de onda. Esto demuestra que el color observado depende del ángulo de observación. Este fenómeno, conocido con el nombre de iridiscencia, ha atraído el interés

de biólogos y químicos, como así también de físicos especialistas en fotónica [57, 58]. La coloración iridiscente de estos escarabajos es generada por las reflexiones múltiples que se producen en la cutícula de sus élitros. Este sistema conformado por diferentes conjuntos de multicapas de varios períodos (detallado en el Capítulo 2), constituye en sí mismo un cristal fotónico unidimensional natural.

3.5. Mediciones de reflectancia polarizadas

Tal como se explicara al comienzo de este capítulo, para evitar soluciones no deseadas al recuperar los parámetros relevantes de la estructura mediante la aplicación de métodos de resolución del problema inverso [52, 59], es necesario conocer en forma simultánea la mayor cantidad de datos acerca de la misma muestra. Por tal razón, se decidió realizar nuevas mediciones de reflectancia, considerando no sólo el ángulo de incidencia y de observación sino también la polarización de la luz incidente y reflejada.

En la Figura 3.7 se puede ver un esquema del montaje experimental utilizado para mediciones de reflectancia copolarizadas. Para este nuevo conjunto de mediciones, el dispositivo experimental consta de una lámpara de luz blanca bi-pin de tungsteno no polarizada, la cual es obturada por un diafragma y luego atraviesa el primer polarizador lineal que permanecerá fijo a lo largo de toda la medición. A continuación se focaliza el haz de luz polarizada incidente en un determinado punto de la muestra, por medio de la lente L_1 . En todas las mediciones se tuvo la precaución de lograr que la mancha de luz correspondiente a la zona iluminada del caparazón tenga la forma de una circunferencia, cuyo diámetro medido fue de aproximadamente 1.5 mm. La muestra se montó en un porta-muestras en posición vertical respecto del plano del goniómetro en el que se lo apoyó (el error angular fue de aproximadamente 1°). La luz reflejada fue colectada por la lente L_2 , en cuyo foco se colocó un segundo polarizador Glan-Thompson (ver Apéndice D). Finalmente se acopló la fibra óptica al espectrómetro Ocean Optics USB650 y éste se conectó a una computadora.

Los polarizadores fueron colocados de tal manera que dejan pasar la misma compo-

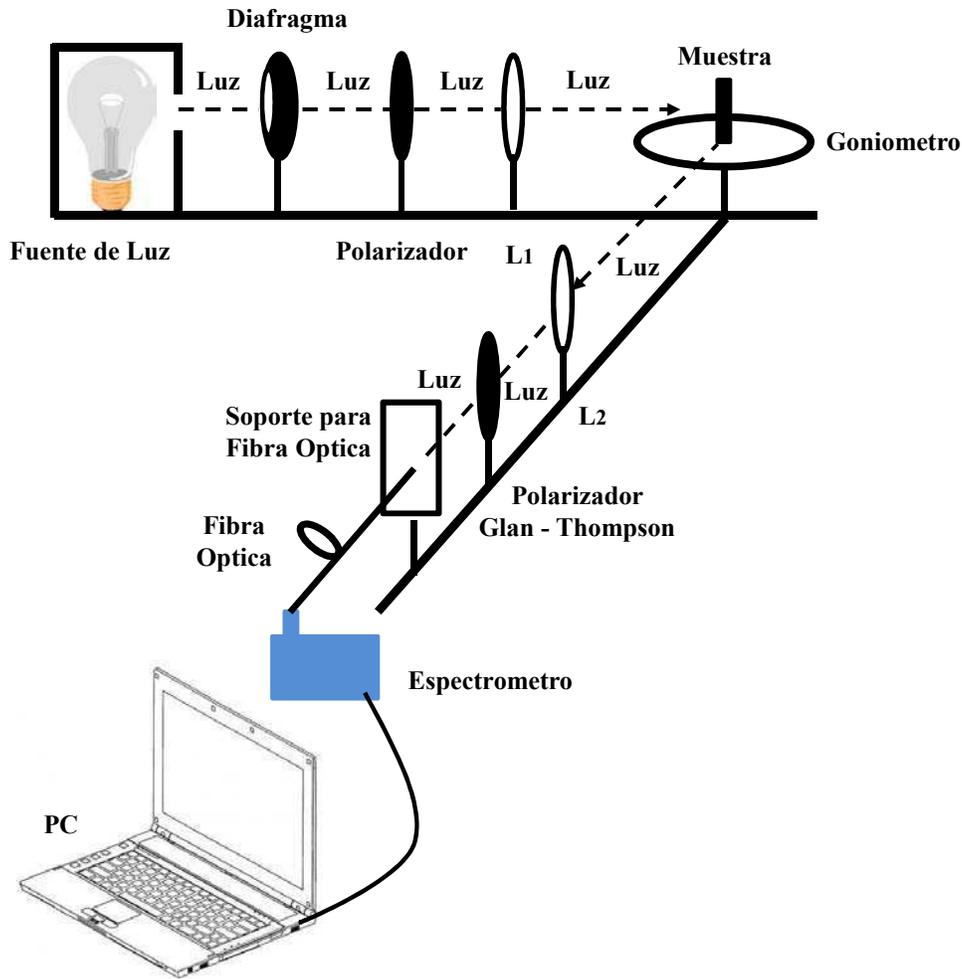


Figura 3.7: Esquema del montaje experimental utilizado para la medición de reflectancia vs longitud de onda para diferentes ángulos de incidencia y de observación, registrando medidas copolarizadas. L_1 y L_2 son lentes convergentes de distancia focal de 10 cm. En líneas punteadas se remarca el camino seguido por la luz. (Obs.: los elementos no se presentan a escala).

nente del campo eléctrico, perpendicular a la mesa de trabajo. Es decir, que el eje de transmisión del polarizador lineal se ubicó perpendicular a la mesa. Por otra parte, la luz reflejada por la muestra es colimada por una lente convergente e incide en el polarizador Glan-Thompson, del cual emergen dos haces. De estos haces, sólo el que tiene la misma polarización que la luz incidente es captado por la fibra óptica. De esta manera,

las medidas recolectadas están copolarizadas, es decir, que tanto la luz incidente como la luz reflejada poseen el mismo estado de polarización. En particular, el montaje descrito previamente corresponde al modo de polarización TE o polarización s .

En la Figura 3.8 se muestran distintas fotografías del dispositivo experimental descrito en el párrafo anterior. La imagen (a) es una vista panorámica superior del montaje, y la fotografía (b) es una ampliación de la zona cercana a la muestra, en la que se puede observar la iluminación de la misma en un punto de su élitro para un determinado ángulo de incidencia.

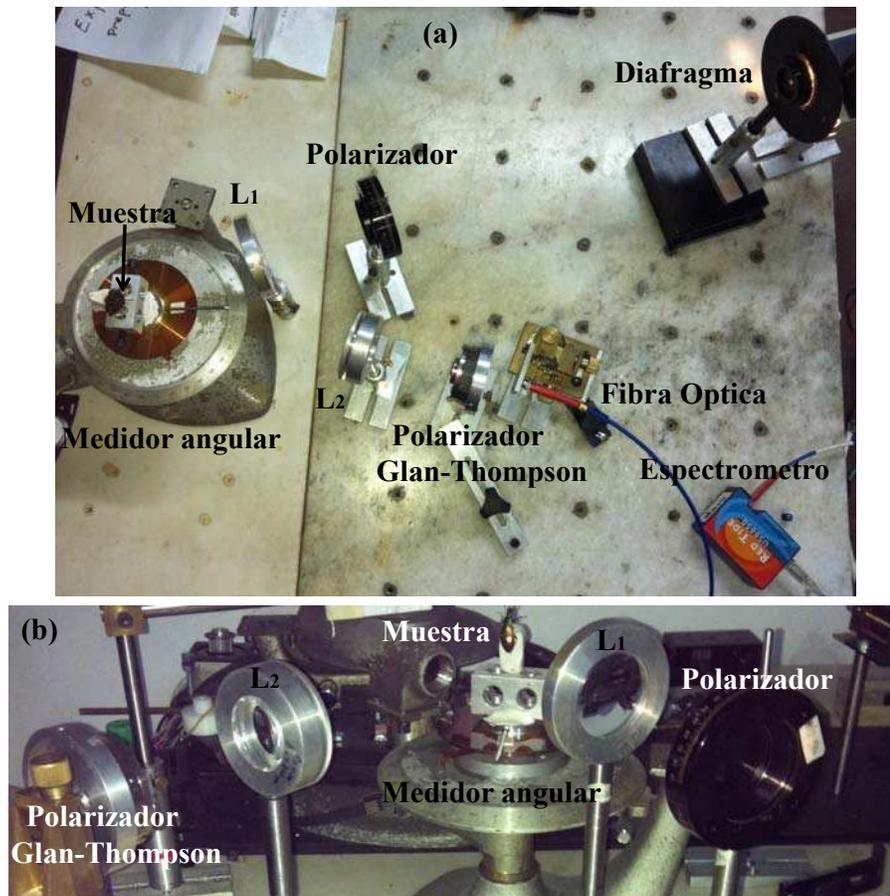


Figura 3.8: Dispositivo experimental para la medición de reflectancia vs longitud de onda para diferentes ángulos de incidencia y de observación registrando medidas copolarizadas. (a) Vista superior; (b) ampliación de la zona cercana a la muestra iluminada.

En la Figura 3.9 se presentan curvas de reflectancia especular registradas para las

dos muestras de *Ceroglossus suturalis*: verde y dorado. Las mismas corresponden a tres ángulos de incidencia distintos (15° , 30° y 45°), y a polarización s . En todos los casos se consideraron 10 barridos para el promedio y el tiempo de integración empleado para las mediciones fue de 1050 ms, 350 ms y 400 ms para los ángulos de incidencia de 15° , 30° y 45° , respectivamente.

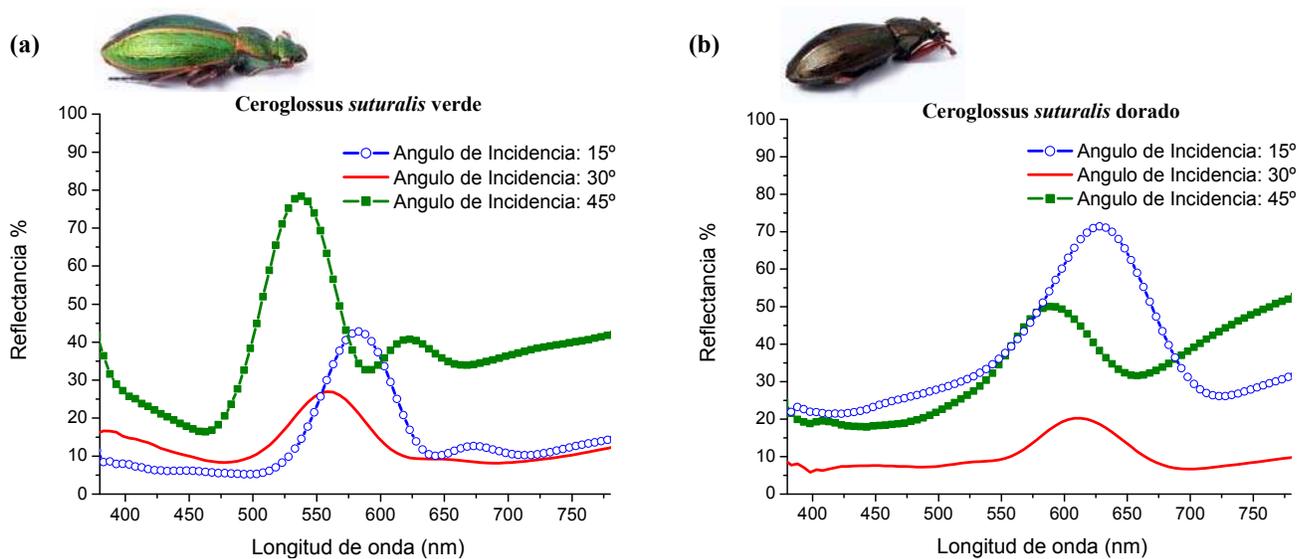


Figura 3.9: Reflectancia especular copolarizada medida para dos ejemplares de *Ceroglossus suturalis* para polarización s y para diferentes ángulos de incidencia. (a) *Ceroglossus suturalis* verde; (b) *Ceroglossus suturalis* dorado.

Tanto para el ejemplar verde como para el dorado, se observa que a medida que aumenta el ángulo de incidencia el pico de reflectancia se corre hacia longitudes de onda menores. Este comportamiento ya ha sido reportado para otras especies de escarabajos que presentan color estructural, como por ejemplo el *Chrysochroa fulgidissima* [60]. Para el *Ceroglossus suturalis* verde (Fig. 3.9 (a)), el pico de reflectancia máxima se obtuvo para un ángulo de incidencia de 45° , mientras que para el *Ceroglossus suturalis* dorado (Fig. 3.9 (b)) el pico se registró para una incidencia de 15° .

Tal como se explicó previamente en esta Sección y como se detalla en el Apéndice D,

el polarizador Glan-Thompson divide al haz reflejado por la muestra en dos haces con polarizaciones ortogonales entre sí. En el caso del *Ceroglossus suturalis* verde, al observar a ojo desnudo la mancha del haz copolarizado sobre una pantalla, se ve un color verde intenso, mientras que el color de la mancha que no es registrada por la fibra se ve mucho más tenue, casi extinguido (no se muestra). Esto también se verificó para la muestra de *Ceroglossus suturalis* dorado, aunque en este caso la mancha del haz capturado por la fibra es de color cobre claro.

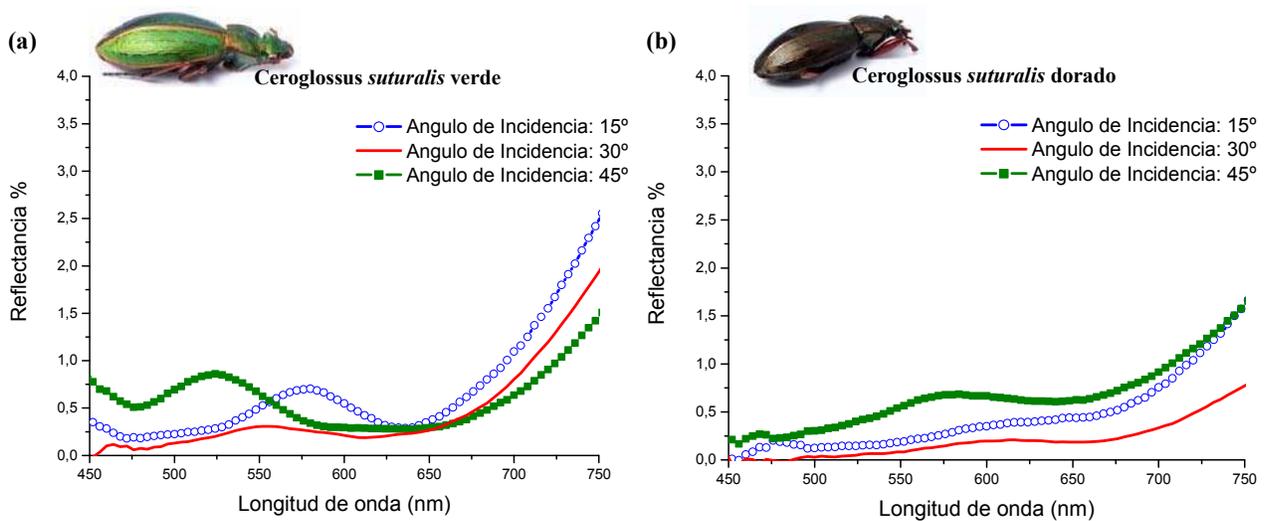


Figura 3.10: Reflectancia especular medida para dos ejemplares de *Ceroglossus suturalis*, para incidencia con polarización s y detección de la polarización cruzada, para diferentes ángulos de incidencia. (a) *Ceroglossus suturalis* verde; (b) *Ceroglossus suturalis* dorado.

En la Fig. 3.10 se muestran los espectros de reflectancia registrados para ambas muestras de *Ceroglossus suturalis*, pero para polarizaciones cruzadas. Es decir, que estas curvas se obtuvieron rotando 90° el polarizador Glan-Thompson con respecto al montaje utilizado para registrar las curvas de la Fig. 3.9. Se emplearon los mismos ángulos de incidencia que para la Fig. 3.9 y también se trabajó con un haz incidente con polarización s . En todos los casos se consideraron 10 barridos para el promedio y el tiempo de integración

empleado para las mediciones fue de 1050 ms, 350 ms y de 400 ms para los ángulos de incidencia de 15° , 30° y 45° , respectivamente.

En ambas especies se observa una considerable disminución de la reflectancia con respecto a la medida copolarizada. También en este caso se observa que a medida que aumenta el ángulo de incidencia, la longitud de onda del pico de reflectancia se corre hacia valores menores, lo cual se condice con lo reportado en trabajos anteriores [60]. Si bien para algunos ángulos de incidencia la reflectancia es casi nula, para otros sí se visualizan pequeños valores de reflectancia. Por lo tanto, si se descarta el posible error del montaje, este fenómeno habilitaría a pensar que algunas de las muestras estudiadas podrían tener cierto grado de anisotropía en su estructura, la cual podría provenir tanto de la geometría de la estructura misma como de los materiales que la constituyen. Para poder avanzar sobre esta hipótesis, sería necesario realizar más mediciones con diferentes tipos de montaje y llevar a cabo un estudio más detallado, lo cual excede los objetivos de esta Tesis.

En síntesis, en este capítulo se presentaron los espectros de reflectancia medidos para dos muestras de escarabajos, para diferentes ángulos de incidencia y teniendo en cuenta la polarización de la luz incidente y reflejada. Se diseñaron diversas configuraciones experimentales que nos permitieron garantizar la repetibilidad y la reproducibilidad de la medición, lo cual es fundamental para poder llevar a cabo el objetivo final de este trabajo, es decir, la recuperación de parámetros relevantes involucrados en la generación de color en estructuras biológicas. Este análisis, utilizando las curvas de reflectancia medidas, se presenta en el Capítulo 5.

Capítulo 4

Cálculo del Color e Iridiscencia

*En este capítulo se explica cómo obtener el color de una muestra a partir de las curvas de reflectancia, y se hace un breve resumen del sistema colorimétrico XYZ empleado en el presente trabajo. A continuación se analiza el color observado en las muestras del *Ceroglossus suturalis*, y se estudia la iridiscencia de las mismas a través de diagramas de cromaticidad.*

4.1. Motivación

Una de las manifestaciones más comunes de color estructural es la iridiscencia, es decir, la variación del color con el ángulo de observación o con el ángulo de iluminación. Este efecto es muy frecuente en los coleópteros, y en particular en la especie *Ceroglossus suturalis*, en todos los tonos en que ésta aparece en la naturaleza. Para poder verificar este fenómeno, se debe calcular el color observado a partir de las curvas de reflectancia obtenidas para diferentes ángulos de observación y/o para diferentes ángulos de incidencia. Por lo tanto, en este capítulo se explora el efecto de iridiscencia presente en esta especie, y la influencia de los distintos parámetros geométricos de la estructura en la generación de color estructural.

4.2. Concepto y cálculo del color

El color es una sensación generada por un proceso interactivo entre el iluminante y la interpretación que hace el cerebro de las señales que le envían los ojos. Es decir, que la percepción del color es un proceso complejo que involucra a la fuente de luz, las condiciones generales de iluminación ambiente, el objeto en cuestión, las células especializadas de la retina (conos y bastones), el nervio óptico, etc. De todo el espectro electromagnético, el ser humano es capaz de percibir sólo la porción correspondiente al espectro visible, que comprende las longitudes de onda entre 380 nm y 780 nm. Cada longitud de onda corresponde a un color determinado.

En 1931, la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE) recomendó la adopción de un nuevo sistema basado en tres estándares primarios, los valores triestímulo CIE X , Y y Z , para la formación de todos los colores del espectro por mezclas aditivas. Si se superponen los tres colores primarios y se varían sus pesos relativos con el objeto de lograr un color de la mezcla igual al color de la muestra, este color quedará especificado unívocamente por las cantidades X , Y , Z de los colores primarios utilizadas para lograr la igualación y describir un estímulo cromático. Las correspondientes funciones \bar{x} , \bar{y} , y \bar{z} son las denominadas “funciones colorimétricas” o “funciones de correspondencia de color”, y describen la respuesta cromática del observador. En particular, la función \bar{y} representa físicamente el ajuste entre la sensibilidad de los ojos y la luminosidad o brillo. Su valor y el del resto de las funciones colorimétricas \bar{x} y \bar{z} se han establecido de modo tal que las áreas por debajo de las curvas correspondientes sean iguales entre sí, tal como se puede apreciar en la Fig. 4.1. Las medidas de estas funciones colorimétricas indican las cantidades de cada uno de los estímulos de referencia que se necesitan para igualar cada radiación monocromática del espectro visible, para un vatio de potencia. Es decir, son los valores triestímulo de las componentes espectrales de la radiación equienergética, cuyo flujo radiante es la unidad.

La cromaticidad de un color muestra se especifica mediante sus coordenadas de cromaticidad (x, y, z) , las cuales se definen en función de sus valores triestímulo X , Y , y Z

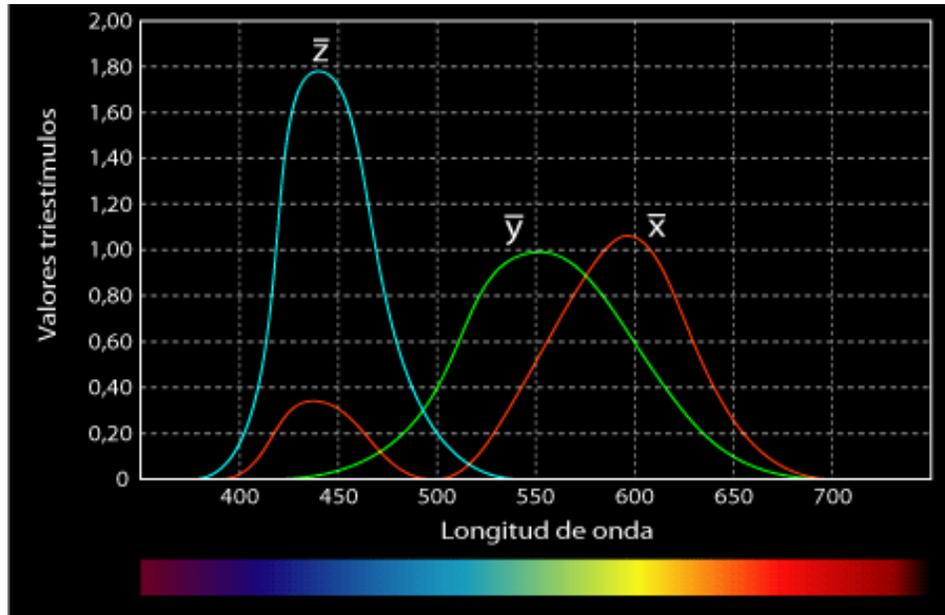


Figura 4.1: Funciones colorimétricas \bar{x} , \bar{y} y \bar{z} en función de la longitud de onda para el observador patrón CIE 1931.

mediante las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned}
 x &= \frac{X}{X + Y + Z}, \\
 y &= \frac{Y}{X + Y + Z}, \\
 z &= \frac{Z}{X + Y + Z}.
 \end{aligned}
 \tag{4.1}$$

Por ejemplo, si $X = 8$, $Y = 48$, $Z = 24$, entonces $X+Y+Z = 80$ y $x = 8/80 = 0.1$; $y = 48/80 = 0.6$; $z = 24/80 = 0.3$. Esto significa que este color contiene un 10% de x , un 60% de y y un 30% de z . Como x se corresponde de modo aproximado al rojo, y al verde y z al azul, se puede pensar que se trata de un verdeazulado de un factor de luminancia Y a mitad del blanco y el negro. Estas coordenadas son entonces las fracciones de cada color primario que se necesitan para igualar el color resultante al color muestra y dado que el ojo humano tiene tres tipos de sensores de color que responden a

diferentes rangos de longitudes de onda, un gráfico completo de todos los colores visibles sería una figura tridimensional. Sin embargo, el concepto de color puede dividirse en dos partes: la luminosidad o brillo y la cromaticidad. Además, la suma $x + y + z$ de las coordenadas de cromaticidad de un color es siempre igual a 1, por lo que son necesarias y suficientes sólo dos coordenadas (variables independientes) para especificar y representar la cromaticidad de un color en un espacio bidimensional de las coordenadas (x,y) que se denomina diagrama cromático o diagrama de cromaticidad (Fig. 4.2).

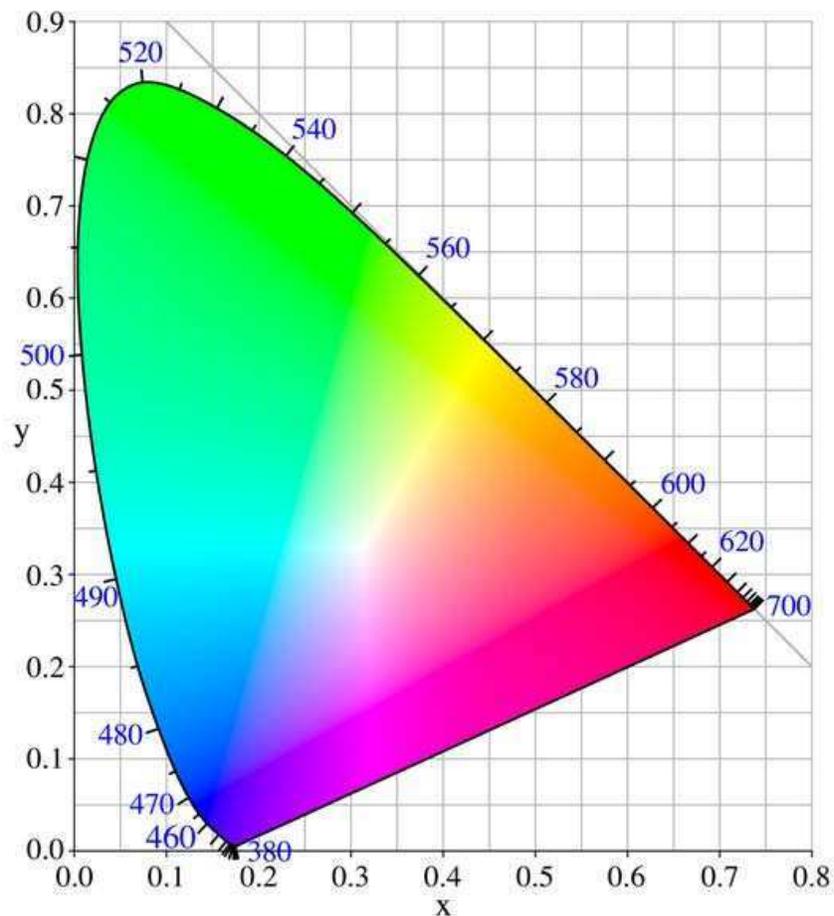


Figura 4.2: Diagrama de cromaticidad del espacio de color CIE 1931. Las longitudes de onda que se muestran en color azul se encuentran en nanómetros.

Este diagrama proporciona una manera de representar toda la cromaticidad, es decir,

todos los colores posibles, descontando la luminancia. La línea curva del diagrama indica el límite espectral posible y la línea recta es la línea del púrpura. Las coordenadas x e y toman valores entre 0 y 1. Además, conociendo este par de valores (x,y) es posible también calcular la cantidad relativa z del tercer primario.

Tal como se mencionó más arriba, los valores triestímulo X , Y y Z representan los pesos de las respectivas funciones colorimétricas necesarios para aproximarse a un determinado espectro [12]. Consideremos, por ejemplo, que la estructura en estudio tiene una reflectividad $R(\lambda)$ al ser iluminada por un iluminante cuya distribución de energía está dada por $D(\lambda)$. Siguiendo las definiciones de la CIE, los valores triestímulo pueden calcularse utilizando las siguientes fórmulas [12]:

$$\begin{aligned} X &= \frac{1}{k} \int D(\lambda) R(\lambda) \bar{x}(\lambda) d\lambda, \\ Y &= \frac{1}{k} \int D(\lambda) R(\lambda) \bar{y}(\lambda) d\lambda, \\ Z &= \frac{1}{k} \int D(\lambda) R(\lambda) \bar{z}(\lambda) d\lambda, \end{aligned} \tag{4.2}$$

donde k es un factor de normalización definido de tal manera que un objeto con reflectividad $R(\lambda) = 1$ da una componente Y de luminosidad igual a 1. Entonces, para analizar el color observado por el ojo humano, es suficiente retener en las integrales de la ecuación (4.2) sólo el rango de longitudes de onda del espectro visible (380 - 780 nm). Finalmente, para poder visualizar los colores en una pantalla digital, las componentes X , Y , Z se pueden convertir a componentes RGB (del inglés **R**ed-rojo, **G**reen-verde, **B**lue-azul) a través de transformaciones lineales [61,62].

4.3. Iluminantes patrones y campo visual

En 1931, la CIE también adoptó iluminantes patrones para colorimetría. Si bien la luz solar tiene un espectro relativamente uniforme y es considerada un estándar para la luz blanca por excelencia, las mediciones experimentales suelen realizarse con una lámpara de tungsteno, que por tratarse de luz artificial, tiende a tener grandes variaciones en algunas

regiones del espectro. Se definió entonces al iluminante A que corresponde a la luz emitida por una lámpara de filamento de tungsteno a la temperatura de color de 2875 K . Por otra parte, el D65 (Daylight 6500 K) es otro iluminante e intenta representar la luz de día incluyendo la región ultravioleta, y se define de manera tal que tenga aproximadamente la misma temperatura de color que la luz solar. Cabe mencionar que existen otros iluminantes, como por ejemplo el B o el C, definidos por la CIE en función de sus distribuciones espectrales relativas de energía, pero dadas nuestras condiciones y dispositivos experimentales, trabajaremos con el iluminante A.

A la hora de analizar e interpretar el color observado de un objeto es importante tener en cuenta otro parámetro esencial, el denominado “campo visual”. Básicamente, este parámetro indica la amplitud del ángulo dentro del cual el ojo está en condiciones de ver cuando el mismo está enfocado en un punto fijo. Al mirar los objetos, en general la información proviene de un ancho angular de 10° a 20° , y cuando se miran detalles, el ángulo percibido es mucho menor, de 2° ó 3° , dependiendo del objeto.

Las mediciones de reflectancia en función del ángulo de observación y de iluminación sobre las muestras en estudio se llevaron a cabo con luz proveniente de una lámpara de filamento de tungsteno y para un tipo de observación “normal”. De manera que para los cálculos subsiguientes se empleó un iluminante A y un campo visual de 10° . Así se obtuvieron las coordenadas de color que nos permitieron analizar la evolución del color con el ángulo de observación y con el de iluminación para las dos muestras de escarabajos, lo cual se desarrolla en el siguiente apartado.

4.4. Iridiscencia

Al examinar el color del caparazón de los escarabajos *Ceroglossus suturalis* al variar el ángulo de observación, notamos variaciones muy marcadas. Este fenómeno se conoce con el nombre de iridiscencia y se caracteriza por dar un aspecto brillante y metálico al objeto. Si el origen de los colores fuera exclusivamente pigmentario, difícilmente variarían, a excepción de ángulos de observación o de iluminación muy grandes y/o cuando la luz

es altamente polarizada. De lo contrario, el aspecto del color sería mate e incluso opaco [2]. En el caso de las muestras verde y dorada del *Ceroglossus suturalis* se observa una coloración iridiscente producida por reflexiones múltiples provenientes de la cutícula de sus respectivos élitros, los cuales están compuestos por un arreglo periódico de tipo bicapa [31]. Cuando la luz blanca interactúa con este sistema, se producen colores brillantes e iridiscentes.



Figura 4.3: Vista de las superficies dorsales de los escarabajos *Ceroglossus suturalis* verde y dorado.

Para cada una de las muestras se midieron los espectros de reflectancia y se investigaron las características iridiscentes de este escarabajo al variar el ángulo de observación y también el de iluminación. En la Fig. 4.3 se ve una fotografía de los dos ejemplares de *Ceroglossus suturalis* estudiados. Dependiendo de la muestra, el color iridiscente observado en estos escarabajos es verde o dorado. En ambos casos, los caparazones están cubiertos por alvéolos, y en la especie verde se observan estrías amarronadas. La diferencia en la coloración no está relacionada con el género [63]. Al variar el ángulo de observación desde una posición normal a oblicua, el escarabajo verde cambia suavemente su coloración hacia los tonos azules, mientras que el escarabajo dorado lo hace hacia las tonalidades verdosas. Esta característica constituye una primera evidencia del origen estructural del color en

los escarabajos *Ceroglossus suturalis*.

Con el fin de investigar el fenómeno de iridiscencia, se midió la reflectancia de las muestras para diferentes ángulos de observación, dejando fijo el ángulo de incidencia normal a la muestra (el detalle del diseño experimental y de los espectros obtenidos se encuentra en el Capítulo 3). El iluminante empleado fue una lámpara de luz blanca no polarizada (lámpara bi-pin de tungsteno).

Para analizar la evolución del color con el ángulo de observación, en la Figura 4.4 se muestran los espectros de reflectancia registrados para 3 ángulos de observación θ diferentes, como así también sus respectivos diagramas de cromaticidad. En estos diagramas se representan las coordenadas cromáticas para dichos ángulos, para cada ejemplar de *Ceroglossus suturalis*, el verde y el dorado. Debido a que la fuente de luz empleada para las mediciones es una lámpara halógena, usamos el iluminante patrón A y un campo visual de 10° .

Tal como se mencionara en el Capítulo 3, se puede notar que a medida que aumenta el ángulo de observación, el pico de reflectancia se mueve hacia longitudes de onda menores, y esto ocurre para ambas muestras. Es decir, que en el caso del ejemplar verde la posición espectral del pico se corre desde los verdes hacia los azules, mientras que en el caso del ejemplar dorado el pico vira desde el marrón-rojizo hacia los verdes. Para el escarabajo verde, las coordenadas de cromaticidad están localizadas en la zona naranja del diagrama, y a medida que aumenta el ángulo de observación las coordenadas se mueven hacia la región amarilla-verde. Por otro lado, las coordenadas de la muestra dorada comienzan en la zona roja-naranja del diagrama y se mueven en sentido horario a través del diagrama hacia la región de los colores naranjas a medida que aumenta el ángulo. Como se explicó en la Sección 4.2, el diagrama de cromaticidad es un gráfico en 2D y no es posible representar en él el tono y brillo real del color, que se representa en el eje z . Para una mejor visualización del color resultante, se obtuvieron las coordenadas RGB y el color para cada muestra y para cada ángulo de observación (ver debajo de cada uno de los paneles en la Fig. 4.4 (c) y (d)). Teniendo esto en cuenta, se observa una buena concordancia entre los colores observados y los calculados a partir de las medidas.

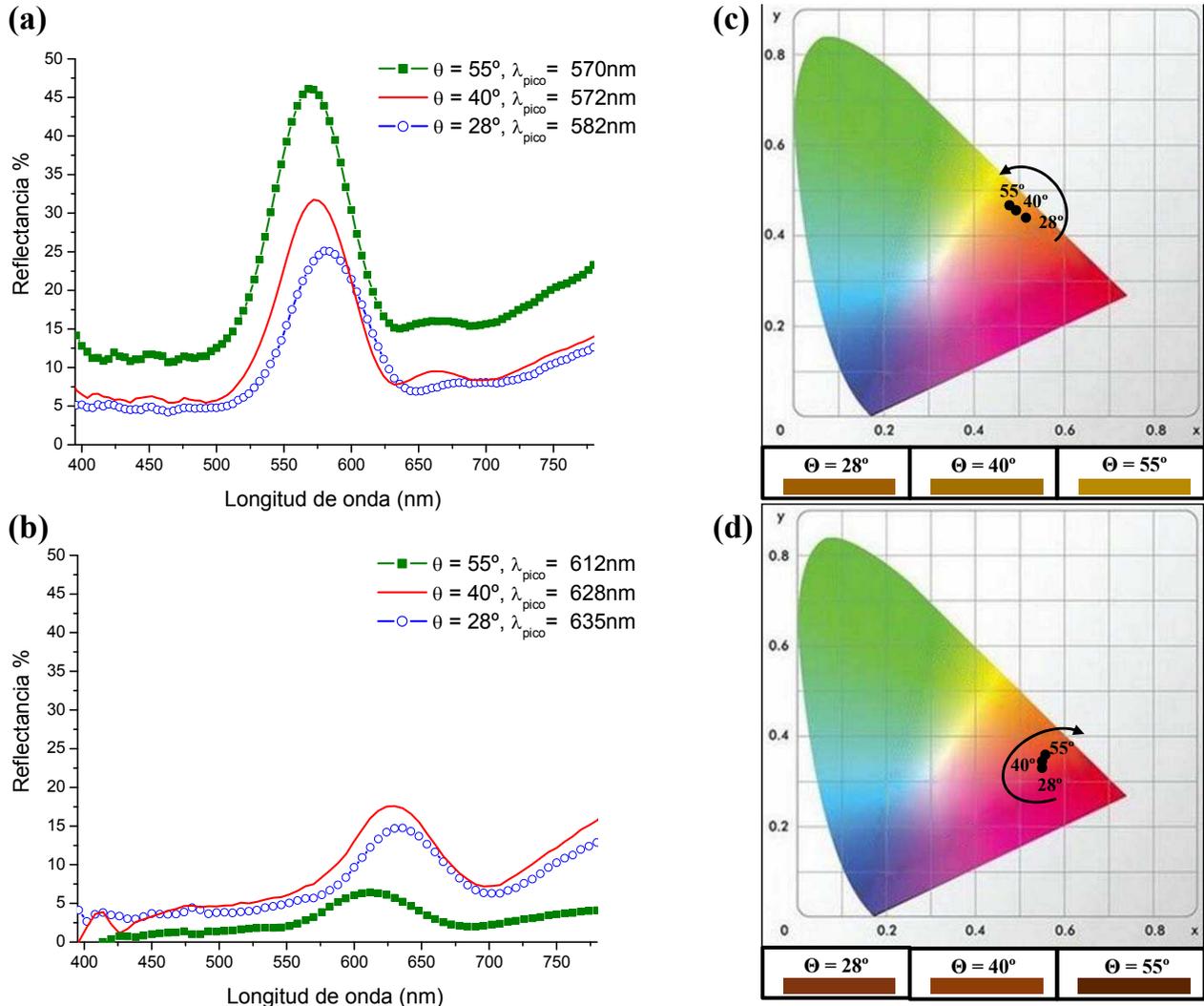


Figura 4.4: (a) - (b): Espectros de reflectancia medidos para incidencia normal y para diferentes ángulos de observación en el rango visible para los escarabajos *Ceroglossus suturalis* verde (a) y dorado (b). (c) - (d): Coordenadas cromáticas para el escarabajo verde (c) y para el dorado (d) obtenidas a partir de la reflectancia medida. En ambos casos el iluminante usado es el A, para 10° de campo visual. Las flechas indican la dirección del incremento de θ . Los colores de los rectángulos bajo cada diagrama corresponden a los colores equivalentes en el sistema RGB para los diferentes ángulos de observación.

En el caso de que las muestras biológicas estudiadas tengan propiedades iridiscentes, ese fenómeno también se pondrá de manifiesto si variamos el ángulo de iluminación. Por

tal razón, en las tablas de la Figura 4.5, para el *Ceroglossus* verde, y de la Figura 4.6 para el *Ceroglossus* dorado, se muestra el color observado al cambiar el ángulo de incidencia dejando fijo el ángulo de observación, para dos ángulos de iluminación diferentes. En tales tablas se ven además los respectivos diagramas de color, en los que se graficaron las coordenadas cromáticas para los distintos ángulos de iluminación.

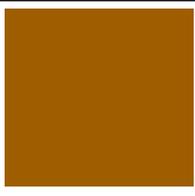
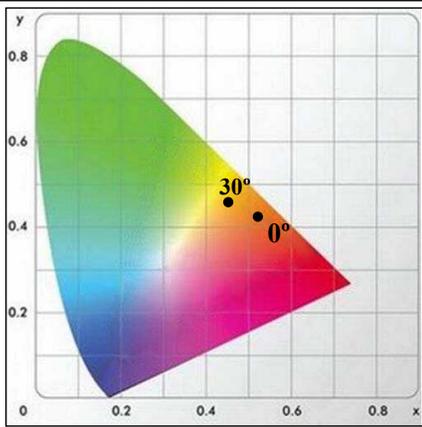
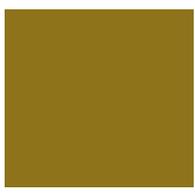
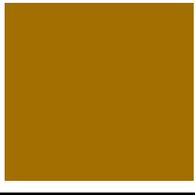
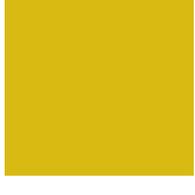
	Angulo de Incidencia	Angulo de Observacion	Color	Diagrama de Color
<i>Ceroglossus suturalis</i> verde	0°	30°		
	30°			
	0°	40°		
	40°			

Figura 4.5: Tabla correspondiente al escarabajo *Ceroglossus suturalis* verde donde se muestra el fenómeno de iridiscencia para distintos ángulos de iluminación. En la última columna se ven los diagramas de cromaticidad, en los que se ubicaron las coordenadas de color correspondientes a los diferentes ángulos de incidencia. El ángulo de observación permaneció fijo.

Ceroglossus suturalis dorado

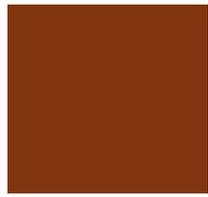
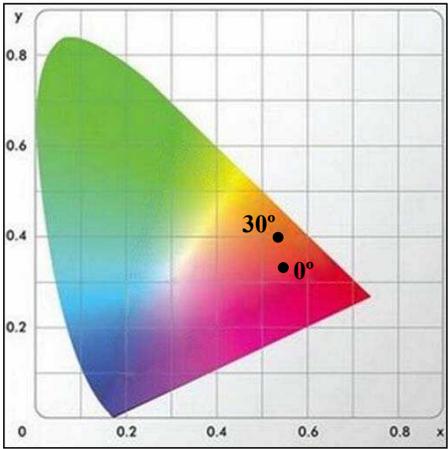
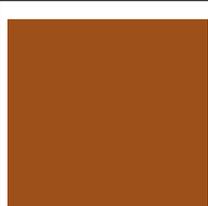
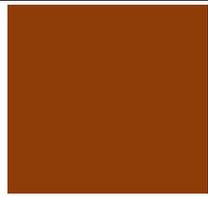
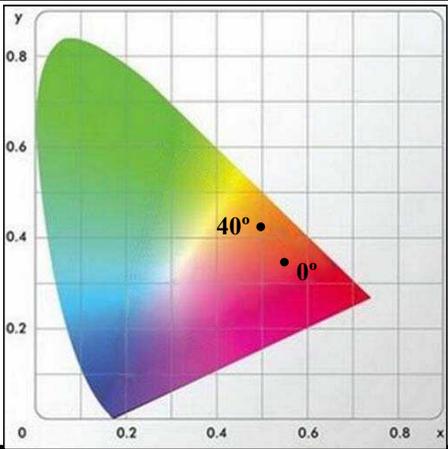
Angulo de Incidencia	Angulo de Observacion	Color	Diagrama de Color
0°	30°		
30°			
0°	40°		
40°			

Figura 4.6: Tabla correspondiente al escarabajo *Ceroglossus suturalis* dorado donde se muestra el fenómeno de iridiscencia para distintos ángulos de iluminación. En la última columna se ven los respectivos diagramas de cromaticidad, en los que se ubicaron las coordenadas de color correspondientes a los diferentes ángulos de incidencia. El ángulo de observación permaneció fijo.

Si ahora observamos la tabla correspondiente al escarabajo dorado (Figura 4.6), se ve cómo a medida que aumenta el ángulo de incidencia, para un ángulo fijo de observación de 30°, la muestra cambia su color de marrón oscuro a un marrón claro. Aumentando y fijando el ángulo de observación en 40°, también varía su color desde el tono de los

marrones al anaranjado, al aumentar el ángulo de iluminación.

En síntesis, en este capítulo se verificó la iridiscencia que exhiben los dos ejemplares de *Ceroglossus suturalis* estudiados. Se mostró que el color observado varía tanto con el ángulo de observación como con el ángulo de iluminación. Se calcularon además las coordenadas cromáticas de las muestras a partir de las medidas de reflectancia para diferentes ángulos de observación, demostrando que al aumentar dicho ángulo el tono predominante se corre hacia longitudes de onda menores, tal como era de esperar. Finalmente y por completitud, también se mostró el estudio de la iridiscencia en los dos ejemplares de escarabajos al variar el ángulo de iluminación.

Al conocer ahora los espectros de reflectancia experimentales para distintos ángulos de incidencia y de observación, y para una determinada polarización (Capítulo 3) y habiendo estimado los espesores y el número de las capas que conforman el sistema de multicapas de las estructuras internas de las muestras (Capítulo 2), es posible implementar algoritmos que permitan obtener, por ejemplo, las constantes dieléctricas de los materiales que constituyen cada una de las capas que componen el sistema periódico bi-capas del caparazón de estos especímenes. Este análisis se presentará en detalle en los siguientes capítulos.

Capítulo 5

Modelo teórico

En este capítulo se presentan tres algoritmos de optimización heurística diferentes, utilizados para recuperar los parámetros relevantes de las estructuras biológicas en relación a la generación de color estructural. Los algoritmos utilizados son las estrategias evolutivas, en sus variantes elitista y no elitista, y el método de optimización de enjambre de partículas. Una de las componentes fundamentales de dichos algoritmos es el método de resolución del problema directo. Teniendo en cuenta las características de las estructuras estudiadas en este trabajo, para reproducir su respuesta electromagnética se utilizó el método 4×4 , el cual se presenta hacia el final de este capítulo.

5.1. Motivación

Además de las diferentes características geométricas de los sistemas responsables del color estructural en muestras biológicas, tales como la rugosidad de las superficies y la presencia de múltiples capas periódicas o aperiódicas, los índices de refracción de los materiales involucrados son determinantes en el mecanismo de generación de estos efectos. Por consiguiente, un aspecto clave en la investigación de este tipo de sistemas es el conocimiento preciso de los parámetros constitutivos de los materiales que componen los tejidos biológicos [3].

Es sabido que la quitina y la melanina son sustancias presentes en la mayoría de las

microestructuras biológicas, especialmente en escarabajos. Sin embargo, diferentes autores han reportado valores distintos de sus índices de refracción para diferentes especies, inclusive en algunos casos estos valores son reales y en otros incluyen una parte imaginaria no nula. De manera que si bien es lícito suponer que la estructura de multicapas de la procutícula del *Ceroglossus suturalis* está compuesta por capas alternadas de quitina y de melanina, no resulta claro a partir de la literatura especializada cuáles son los valores de sus índices de refracción.

Tal como se mencionara en la Introducción de esta Tesis, debido al alto grado de irregularidad de las muestras biológicas, la caracterización precisa de la estructura interna que conforma su cutícula es extremadamente difícil. Esto también complica enormemente el empleo de técnicas de medición directa de los índices de refracción de las sustancias que la componen. Dado que son muy pocos los trabajos que han reportado métodos confiables que permitan recuperar los parámetros relevantes de sistemas biológicos, resulta de sumo interés explorar las posibilidades que pueden proveer las estrategias de inversión para la recuperación de dichos parámetros. Estos métodos han demostrado ser exitosos para resolver diversos problemas inversos fuera del contexto de las estructuras biológicas.

Se propone entonces la aplicación de algoritmos de optimización heurística con el objeto de recuperar los parámetros relevantes de microestructuras naturales, como por ejemplo los índices de refracción complejos de los materiales que componen un sistema biológico de multicapas, a partir de espectros de reflectancia de la muestra.

5.2. Optimización heurística

Para poder realizar un modelado teórico riguroso y fiel de las estructuras biológicas responsables de los efectos de color estructural, es necesario conocer, con la mayor precisión posible, las características geométricas de dichas microestructuras, como así también los valores de los índices de refracción de los materiales que las componen. Mediante la aplicación de algún método electromagnético, es posible computar los campos reflejados y transmitidos de una muestra o estructura arbitraria. Sin embargo, la relación entre esta

información y las características geométricas y de los materiales de la microestructura en cuestión no es trivial. En consecuencia, la creación y aplicación de un esquema de inversión que funcione conjuntamente con un modelo electromagnético es el desafío que se plantea en este capítulo. Para llevar a cabo este objetivo, se propone utilizar técnicas de optimización estocásticas, las cuales ya han sido utilizadas con éxito para resolver variados problemas fuera del contexto de sistemas naturales [42, 43]. La idea esencial del método de inversión propuesto en este trabajo se esquematiza en la Figura 5.1, la cual muestra los pasos básicos para recuperar los parámetros relevantes de la estructura, en este caso, las constantes dieléctricas de los materiales involucrados.

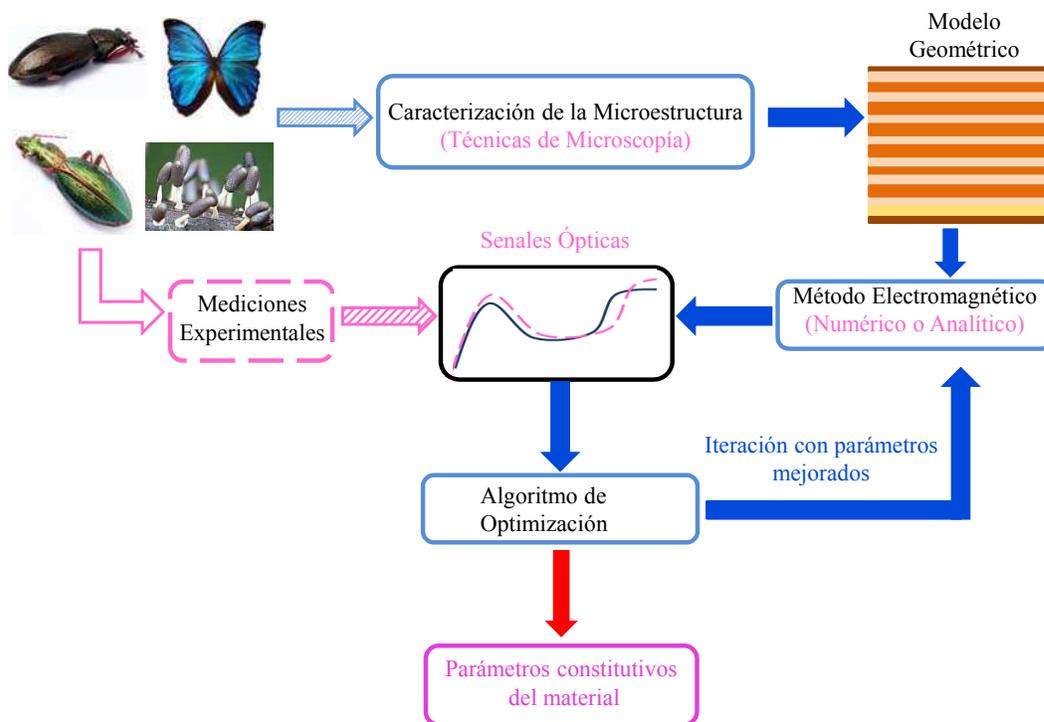


Figura 5.1: Esquema del procedimiento propuesto para recuperar los parámetros relevantes de las microestructuras biológicas.

Las flechas rosadas rayadas de dicho esquema indican la medición experimental de la respuesta óptica de la muestra, por ejemplo, el espectro de reflectancia. Por otro lado, la flecha rayada azul ilustra la importancia que tiene la caracterización precisa de la

microestructura de la muestra, a través de diferentes técnicas de microscopía, en la determinación de un modelo geométrico adecuado. Una vez hecho esto, se emplea un método electromagnético riguroso (analítico o numérico) para calcular la señal óptica para diferentes parámetros geométricos y constitutivos del sistema natural. Como indica la flecha azul, esto lleva a la obtención de una curva teórica que, en principio, debe coincidir con la curva experimental. Lo descrito hasta aquí corresponde a la resolución del problema directo. Sin embargo, tal como lo indica la flecha roja, el objetivo principal de este trabajo es la recuperación de los parámetros constitutivos de un sistema natural a partir de la información de la reflectancia experimental y teórica. Por lo tanto, con la flecha azul en sentido contrario se muestra un ciclo de retroalimentación que acopla el modelo que resuelve el problema directo con alguna de las técnicas de optimización heurística. En particular, en este trabajo se investiga la posibilidad de recuperar, a partir de los datos experimentales y numéricos, alguno o varios de los parámetros relevantes del sistema de multicapas que compone la estructura interna de las muestras de los dos ejemplares de escarabajos *Ceroglusus suturalis* bajo estudio.

Se utilizan técnicas conocidas de optimización bio-inspirada, como las estrategias evolutivas (ES, Evolution Strategies) y la optimización de enjambre de partículas (PSO, Particle Swarm Optimization). Para su aplicación, como primer paso se define el funcional, al que denominaremos *función de ajuste* como:

$$f(\mathbf{p}^T) = \|I^{\text{exp}}(\lambda) - I^{\text{teo}}(\lambda|\mathbf{p}^T)\|_2^2, \quad (5.1)$$

donde $\|\cdot\|_2$ es la norma euclídeana, las componentes del vector \mathbf{p}^T son los parámetros a ser recuperados, e $I^{\text{exp}}(\lambda)$ e $I^{\text{teo}}(\lambda|\mathbf{p}^T)$ representan, respectivamente, los espectros medidos en forma experimental y los generados en forma numérica (por ejemplo, la reflectancia). Por lo tanto, $I^{\text{exp}}(\lambda)$ será la función objetivo a la cual debe tender la función $I^{\text{teo}}(\lambda|\mathbf{p}^T)$ a medida que se suceden las iteraciones del algoritmo. En principio, la minimización de la ecuación (5.1) debe generar, si la solución es única, un conjunto de parámetros que reproducen la señal óptica experimental. En el caso de este trabajo, estos parámetros corresponden a las partes real e imaginaria de las constantes dieléctricas de los materiales

involucrados, y/o a los espesores de las capas de la estructura de multicapas estudiada. Sin embargo, esta elección no es restrictiva y por lo tanto este conjunto de parámetros podría incluir otras magnitudes de interés según la estructura en cuestión.

5.2.1. Estrategias evolutivas (ES)

Los algoritmos evolutivos han demostrado ser una herramienta adecuada y versátil para la optimización de funcionales similares al de la ec. (5.1) [40, 41]. El primer paso, previo al inicio del proceso de optimización, es generar al azar un conjunto de vectores \mathbf{p}^T que conformarán la población inicial $P_\mu^{(g)}|_{g=0}$, donde μ es el número de elementos de la población y g es la iteración del algoritmo. Un algoritmo de optimización evolutivo canónico está basado en la aplicación, sobre un número definido de iteraciones, de dos *operadores genéticos* con roles bien definidos. El primero es la Recombinación, la cual explora el espacio de búsqueda a través de un intercambio de información entre los diferentes elementos ρ de la población. El segundo operador es la Mutación, que se emplea para explorar el espacio de búsqueda introduciendo variaciones al azar en la población. La aplicación de estos operadores genéticos en la población inicial conlleva a la generación de una población secundaria $P_\lambda^{(g)}$ de λ elementos. Es justamente en este punto del proceso evolutivo que se vincula la parte física del problema estudiado con el algoritmo de optimización.

El procedimiento antes mencionado se realiza minimizando el funcional de la ec. (5.1), el cual puede ser interpretado como una medida de cuán “cerca” se encuentran los datos de la reflectancia medida, de los calculados por un método previamente establecido. Cada elemento de la población secundaria será evaluado, y sólo aquellos elementos de $P_\lambda^{(g)}$ que minimicen la norma euclidiana serán retenidos, a través de un método de selección, como parte de la población $P_\mu^{(g+1)}$ para la próxima iteración del proceso evolutivo. El procedimiento se repite hasta que se alcanza el criterio de finalización. Los tamaños de las poblaciones inicial y secundaria, $P_\mu^{(g)}$ y $P_\lambda^{(g)}$, permanecen constantes durante todo el proceso de búsqueda. Un último parámetro que se define y que permanece constante es

el número de realizaciones. Éste corresponde al número de veces que se llevará a cabo el proceso completo de optimización. Es importante mencionar que las poblaciones iniciales pueden ser elegidas de dos maneras diferentes: No-Elitista (NE) y Elitista (E). La principal diferencia entre estos dos esquemas es que el primero selecciona sólo los mejores elementos de la población mutada. El segundo, en cambio, selecciona los mejores elementos de una población intermedia generada por la combinación de las poblaciones inicial y mutada. Como consecuencia, un elemento prometedor perteneciente a la primera población inicial puede sobrevivir durante todo el proceso de optimización. Si bien este atributo de la estrategia elitista garantiza un decrecimiento o un crecimiento monótono de la función de ajuste, éste puede también inducir a una convergencia prematura a un óptimo local. Los pasos operacionales básicos de las estrategias elitista y no elitista explicados en los párrafos anteriores se esquematizan en la Fig. 5.2. En la Ref. [64] se pueden encontrar más detalles acerca de esta representación.

5.2.2. Optimización de enjambre de partículas (PSO)

El PSO es un método de optimización heurística bastante reciente propuesto por Eberhart y Kennedy a mediados de los años noventa [65]. El mecanismo biológico subyacente de esta técnica, basada también en la generación de una población, no está relacionada con la evolución de los elementos pertenecientes a dicha población, como es el caso de los algoritmos genéticos [66] o las estrategias evolutivas [67]. Por el contrario, el PSO imita, a lo largo del proceso de búsqueda del óptimo, el comportamiento social y colaborativo de un grupo de individuos como por ejemplo, una bandada de pájaros, un cardumen o un enjambre de abejas, durante la búsqueda de su alimento. Esta exploración de una región del espacio potencialmente rica en comida depende del intercambio de información basado tanto en el conocimiento común del enjambre como en la experiencia personal de cada uno de sus elementos. A continuación se resumen los principios operacionales del PSO, utilizando la misma notación que la empleada para la descripción de los algoritmos evolutivos en la Sección anterior. Para mayores detalles se sugiere recurrir a las

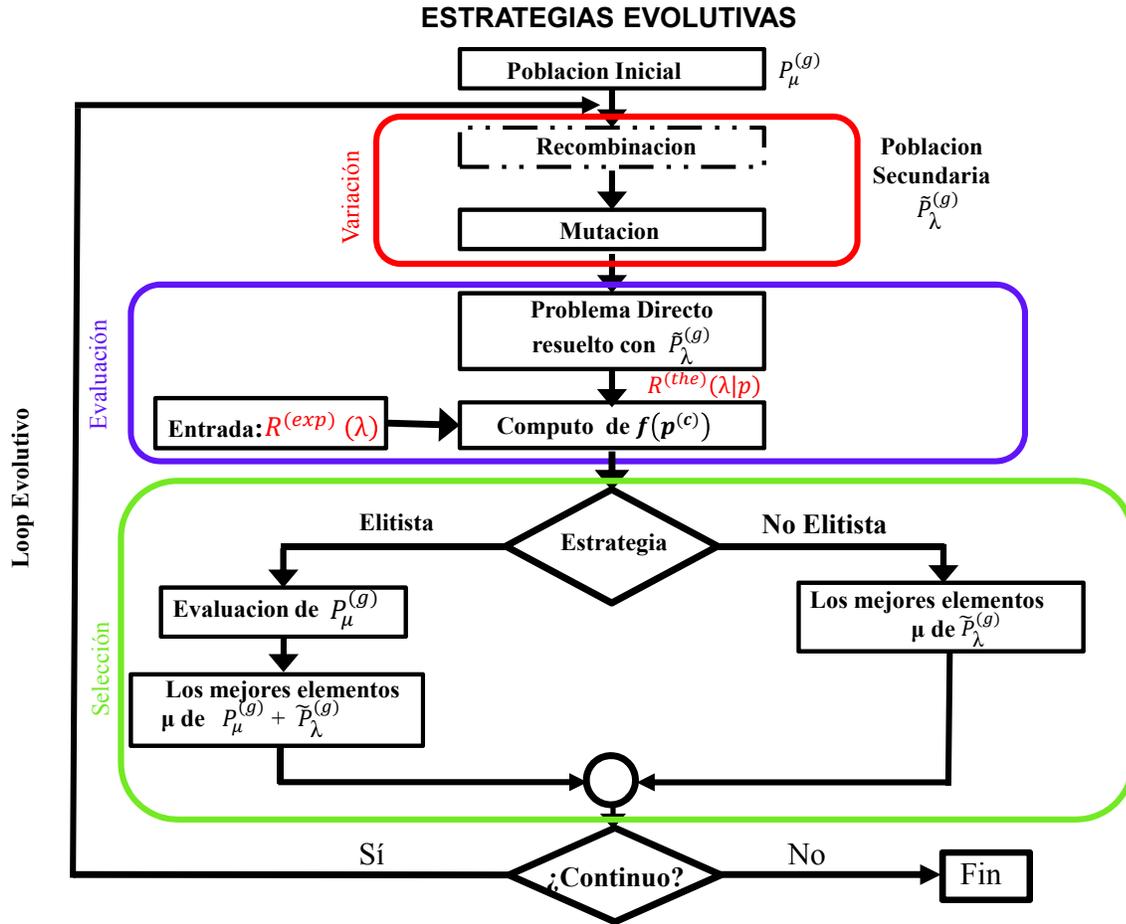


Figura 5.2: Esquema de los principios operacionales de las estrategias evolutivas.

Refs. [68, 69].

El primer paso, previo a la búsqueda del óptimo, es la generación al azar de una población de μ partículas. Cada una de ellas está compuesta por n variables que, dependiendo del contexto del problema estudiado, representa las cantidades de interés que se desean optimizar. Estas variables también son interpretadas como las coordenadas de cada partícula en un espacio de dimensión n . Una vez que las ubicaciones y las velocidades iniciales han sido generadas, el proceso de búsqueda comienza con la evaluación de la aptitud individual ($pbest$) de cada partícula de la población. El óptimo global del enjambre, $gbest$, es luego obtenido del conjunto de óptimos $pbest$ previamente computados. Esta

información se utiliza para modificar la ubicación del enjambre a través del operador

$$x_{m,i}^{<g+1>} = x_{m,i}^{<g>} + \Delta t v_{m,i} , \quad (5.2)$$

donde $m = 1, 2, \dots, \mu$ e $i = 1, 2, \dots, n$ representan un elemento del enjambre y su correspondiente variable de interés, respectivamente. El índice g está asociado a una iteración específica del proceso de búsqueda, y en general el valor del factor Δt se toma igual a 1. La velocidad $v_{m,i}$ es modificada utilizando la siguiente suma pesada:

$$v_{m,i} = w v_{m,i} + c_1 U_1(pbest_{m,i} - x_{m,i}) + c_2 U_2(gbest_i - x_{m,i}) , \quad (5.3)$$

donde $0 \leq U_\alpha \leq 1$, con $\alpha = 1, 2$, son dos números uniformemente distribuidos al azar que sirven para incluir el comportamiento impredecible del enjambre durante la búsqueda completa. Los coeficientes c_1 y c_2 son dos factores de escala que determinan, respectivamente, la influencia que la aptitud individual ($pbest$) y la aptitud global del enjambre ($gbest$) tendrán sobre la nueva velocidad y posición de la partícula en la siguiente iteración del proceso de búsqueda. El coeficiente $0 \leq w \leq 1$ se denomina *factor de inercia* y mide cuánto se ve afectada la ubicación original de la partícula por los óptimos personal y global, respectivamente. Los pasos descritos anteriormente se repiten hasta que se alcanza el criterio preestablecido para detener el proceso. Éste puede estar dado por un número de iteraciones o por la convergencia de la población hacia el óptimo. Cabe mencionar que el tamaño de la población, al igual que en el caso de las ES, permanece constante a lo largo de todo el proceso de optimización.

Los códigos correspondientes a la implementación numérica de los métodos de optimización heurística utilizados en este trabajo habían sido desarrollados previamente por el Dr. Demetrio Macías, de la Université de Technologie de Troyes, Francia. Estos programas fueron adaptados al problema de interés de esta Tesis.

5.3. Modelo de multicapas

En general, diferentes microestructuras tales como películas delgadas, redes de difracción, cristales fotónicos, etc., pueden ser identificadas como las responsables de los efectos

de color. En muchas estructuras biológicas, la respuesta iridiscente está claramente gobernada por las multicapas periódicas presentes en la mayoría de los tejidos que componen la capa externa. Estas estructuras suelen tener imperfecciones, tales como rugosidades en la superficie, espesores no uniformes y distribuciones que no son perfectamente periódicas. Sin embargo, como primera aproximación, una estructura periódica de multicapas planas parecería ser un modelo adecuado para representar nuestro sistema natural, es decir, los élitros de los escarabajos analizados. Tal como se mostró en el Capítulo 2, la capa externa del caparazón del escarabajo *Ceroglossus suturalis* está dividida en varias sub-capas de decenas de nanómetros de espesor (ver por ejemplo, Tablas 2.1 y 2.2). Por otra parte, los resultados mostrados en los Capítulos 3 y 4 evidencian la iridiscencia presente en esta especie, que se origina en la interacción de la luz con la estructura periódica de multicapas. Dado que este efecto se observa en el rango visible del espectro electromagnético, es razonable pensar que la estructura de multicapas presente en la epicutícula del escarabajo, es la responsable de la coloración del élitro. En el Capítulo 2 se vio también que la superficie del élitro de estos escarabajos presenta alvéolos o micro-protuberancias de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de diámetro y de $2.5 \mu\text{m}$ de altura. Dado que el tamaño de estas rugosidades es mucho mayor que las longitudes de onda del espectro visible, no se espera que produzcan efectos de difracción, sino que sólo actúen como dispersores de la luz y produzcan un ensanchamiento de los picos de reflectancia.

Por todo lo antedicho, para reproducir los efectos estructurales del color observado en esta especie, utilizamos un modelo electromagnético simplificado que consiste en una estructura con un número finito ($N - 1$) de multicapas planas sobre un sustrato (capa N -ésima), siendo el superestrato aire (capa 0). El superestrato, cada una de las capas y el sustrato están caracterizados por sus respectivas permitividades eléctricas ϵ_j y permeabilidades magnéticas μ_j , donde el subíndice j denota la capa y $0 \leq j \leq N$. Para los materiales naturales considerados en este trabajo $\mu_j = 1$, ya que son medios no magnéticos. En cambio, las constantes dieléctricas ϵ_j toman en general valores complejos, ya que los materiales que constituyen las capas y el sustrato pueden presentar absorción.

En la Fig. 5.3 se muestra un esquema del planteo del problema electromagnético y del

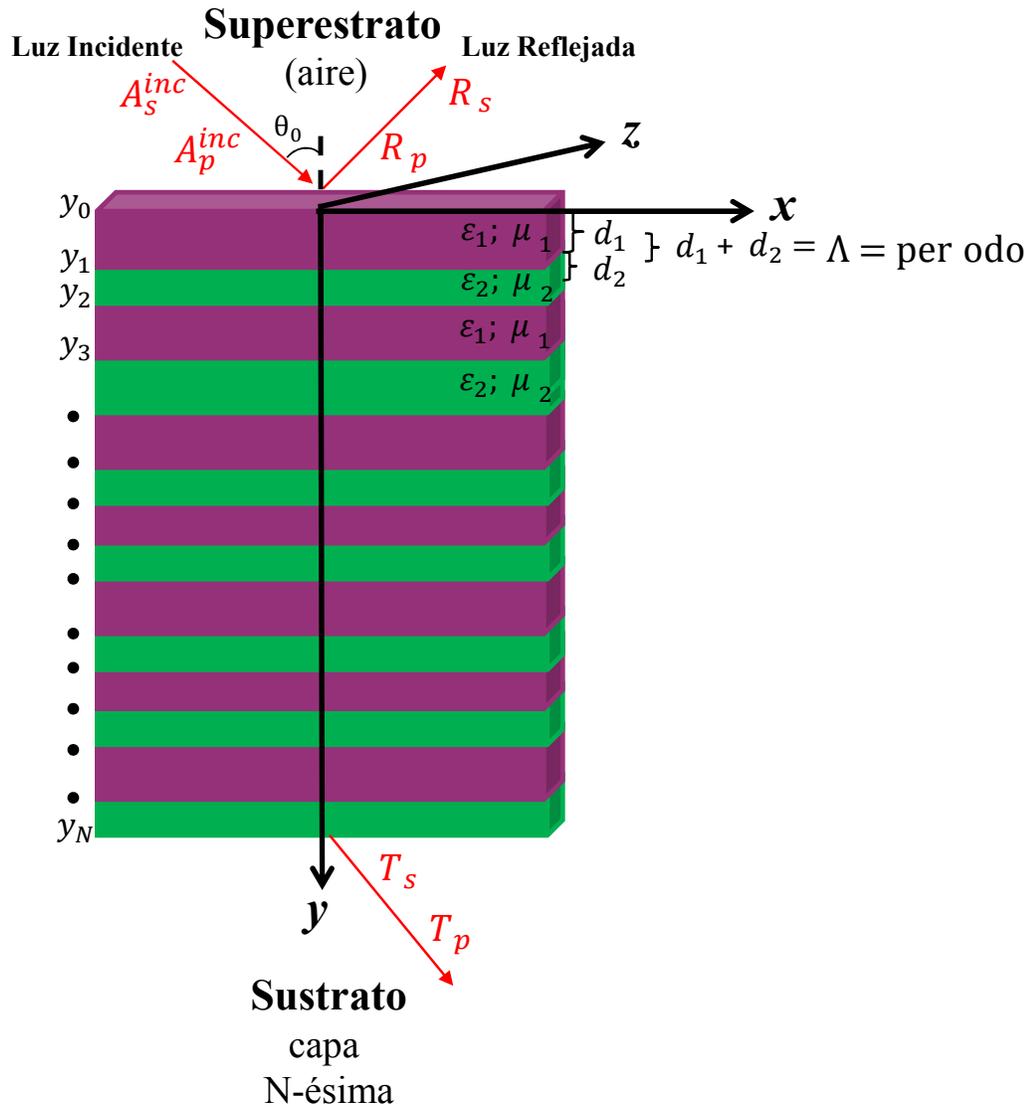


Figura 5.3: Esquema del sistema periódico de multicapas planas utilizado como modelo electromagnético. Cada período de la estructura (Λ) está formado por dos capas de espesores d_1 y d_2 , de diferentes materiales, representadas con diferentes colores. ϵ_j y μ_j son los parámetros constitutivos de los materiales de cada capa. θ_0 es el ángulo de incidencia formado por el vector de onda incidente con la normal a la superficie. A^{inc} (onda progresiva), R (onda regresiva) y T (onda progresiva) son las amplitudes de las ondas incidentes, reflejadas y transmitidas en cada una de las capas. Los diferentes modos de polarización se distinguen por medio de los subíndices s (TE) y p (TM). Se muestra también el sistema de coordenadas utilizado.

sistema utilizado para representar la estructura a estudiar. Se considera una onda plana de longitud de onda λ incidente con un ángulo θ_0 desde el superestrato. Los espesores de las capas se denominan d_j y el período del sistema binario es Λ . En el esquema también se representan con flechas la onda incidente (A^{inc}), la reflejada (R) y la transmitida (T), y se indican sus respectivas amplitudes con subíndices s o p según el modo de polarización.

Para resolver este problema se utiliza el método 4×4 , que permite hallar los campos reflejados y transmitidos por la estructura [70]. En el contexto de los algoritmos implementados para recuperar los valores de los parámetros relevantes de la estructura, este método se utilizará como método electromagnético para la resolución del problema directo. De esta manera, en sucesivas iteraciones, el algoritmo va introduciendo un conjunto de parámetros (espesores de las capas, constantes dieléctricas, etc.), y extrae el correspondiente espectro de reflectancia para ser comparado con el espectro medido y así poder converger al conjunto de parámetros más acertado.

A continuación se da una breve descripción del tratamiento electromagnético y del método 4×4 utilizado para la resolución del problema de interferencia - difracción por un sistema de multicapas planas.

5.4. Método 4×4

En esta Tesis se emplea el método 4×4 para el cómputo de los campos reflejados y transmitidos por la estructura, es decir, como modelo electromagnético que nos permite emular el fenómeno físico involucrado en la producción de color de las especies naturales analizadas. Es importante resaltar que el método 4×4 es un método muy general para el tratamiento de problemas de scattering por multicapas planas, y contempla la posibilidad de considerar medios anisótropos, estructuras de multicapas tanto periódicas como no periódicas y medios con relaciones constitutivas generales dadas por tensores arbitrarios de permitividad eléctrica y permeabilidad magnética. Previo al desarrollo de este trabajo, este método ya había sido utilizado dentro del Grupo de Electromagnetismo Aplicado para otras aplicaciones. Los detalles del formalismo matemático se pueden encontrar en la

referencia [70]. En el presente trabajo, la implementación del método 4 x 4 se utiliza como una herramienta que permite reproducir la respuesta electromagnética de las especies biológicas analizadas y se emplea para la resolución del problema directo. Nuestro sistema, como se mencionó en la sección anterior, se modeló como una estructura periódica binaria de multicapas, en la que los medios que la constituyen, el superestrato y el sustrato son homogéneos e isotropos (ver Fig. 5.3).

El primer paso del método consiste en combinar las ecuaciones de Maxwell con las relaciones constitutivas correspondientes a los materiales de cada una de las capas. De esta manera, se genera un sistema de 6 ecuaciones diferenciales, donde las incógnitas son las 3 componentes del campo eléctrico y las 3 del campo magnético. Aprovechando la simetría de traslación que presenta el sistema en la dirección z , y sabiendo que la dependencia en x de todos los campos debe ser de la forma $\exp\{i(\alpha x)\}$ (ya que la estructura es iluminada por medio de ondas planas cuyo plano de incidencia es el plano (x, y) y las condiciones de contorno imponen la continuidad de la componente tangencial de todos los vectores de onda), entonces el sistema se puede reducir a uno de 4 ecuaciones con 4 funciones incógnita (de aquí el nombre del método), que son las componentes E_x y E_z del campo eléctrico y H_x y H_z del campo magnético. En el caso de un medio estratificado en la dirección y , este sistema se puede expresar como un problema de autovalores y autovectores, donde los autovalores corresponden a las componentes del vector de onda en la dirección y , y representan ondas progresivas y regresivas. A cada autovalor le corresponde un autovector. En particular, un autovector con $H_z = 0$ corresponde al modo de polarización s y un autovector con $E_z = 0$ corresponde al modo de polarización p . De esta manera, se tratan ambos modos de polarización en forma simultánea (el sistema de coordenadas utilizado se detalla en la Figura (5.3)).

Imponiendo luego las condiciones de contorno en cada interfaz (continuidad de las componentes tangenciales del campo eléctrico y del campo magnético) y sabiendo que la estructura es iluminada por medio de una onda plana, se obtiene finalmente un sistema matricial de 4 x 4 para las amplitudes de los campos fuera de la estructura, es decir, la amplitud transmitida en el sustrato y la amplitud reflejada en el superestrato o medio de

incidencia.

El vínculo entre las amplitudes de los campos en el superestrato y el sustrato de nuestro sistema de multicapas unidimensional está dado por una matriz que es el resultado de un producto de matrices que surgen de ir vinculando las amplitudes de los campos en las capas sucesivas a través de las condiciones de contorno. Dicha matriz se conoce con el nombre de *matriz de transferencia*. El método 4x4 permite entonces obtener las amplitudes de las ondas reflejadas y transmitidas por la estructura en su conjunto sin necesidad de conocer las amplitudes de las ondas en el interior de la misma.

Una vez obtenidas las amplitudes reflejadas en el superestrato (R_s y R_p) y transmitidas en el sustrato (T_s , T_p) se pueden calcular los coeficientes de reflexión y de transmisión para cada polarización, que se definen como:

$$r_{pol} = \frac{R_{pol}}{A_{pol}^{inc}}, \quad (5.4)$$

$$t_p = \frac{T_{pol}}{A_{pol}^{inc}}, \quad (5.5)$$

donde el subíndice $pol = s$ o $pol = p$ indica el modo de polarización.

A partir de aquí es posible calcular la reflectancia de la estructura, la cual se define como el cociente entre la potencia reflejada y la potencia incidente, y la transmitancia, definida como la fracción de la potencia incidente que se va en la onda transmitida, para cada modo de polarización. Como consecuencia de la conservación del flujo de potencia debe cumplirse que la suma de las potencias reflejada, transmitida y absorbida (en el caso de medios con pérdidas) por el sistema, debe ser igual a la potencia incidente.

Para el desarrollo de este trabajo se contó con una implementación numérica del método 4x4 programada en lenguaje Fortran. Desde el punto de vista práctico, se debe introducir en el programa un conjunto de datos, para obtener la respuesta electromagnética de la estructura. Los datos de entrada son los siguientes: el intervalo de longitudes de onda de interés, el número de períodos de la estructura y el número de capas que compone cada período (en nuestro sistema se consideran dos capas por período), el rango de ángulos de incidencia en el que se va a trabajar, los valores de los parámetros constitutivos del

sustrato, del superestrato, y de cada capa ϵ_j , al igual que sus espesores d_j . La constante dieléctrica del sustrato se estima como el promedio de las constantes dieléctricas que conforman el sistema binario, de manera que $\epsilon_N = (\epsilon_1 + \epsilon_2)/2$, y el sustrato es aire, o sea que su permitividad eléctrica es $\epsilon_0 = 1$. Como se mencionó más arriba, para las especies biológicas estudiadas los materiales que conforman las capas, el superestrato y el sustrato son no magnéticos, de manera que sus valores de permeabilidad magnética son $\mu_0 = \mu_j = \mu_N = 1$. Los parámetros geométricos del sistema (número de períodos, número de capas en cada período y espesores) se obtuvieron a partir de las imágenes SEM y TEM.

En esta sección se ha realizado una breve síntesis del procedimiento que emplea el método 4 x 4 para obtener la reflectancia y la transmitancia de un sistema de multicapas, para ambos modos de polarización. De esta manera se cuenta con un modelo que permite representar el sistema natural y reproducir los correspondientes espectros. Dada la naturaleza de nuestro objeto de estudio, sólo consideramos el rango de longitudes de onda pertenecientes al espectro visible.

Resumiendo, el método 4 x 4 es un método general para el cálculo de la reflectancia y de la transmitancia de sistemas finitos de multicapas planas, que se utiliza en el contexto de los métodos de optimización heurística para encontrar la solución del problema directo. Respecto de los medios involucrados, permite considerar no sólo materiales isótropos, sino también anisótropos y quirales, y con respecto a la distribución de las capas, contempla tanto estructuras periódicas como no periódicas. Estas posibilidades lo hacen atractivo para su aplicación al modelado de estructuras fotónicas naturales, que en muchos casos presentan estas características. En general, las diferentes microestructuras presentes en las especies naturales exhiben una gran variedad de geometrías y de materiales que las componen, y por lo tanto, dependiendo del tipo de estructura, debe ser elegido el modelo electromagnético adecuado para resolver el problema directo. De manera que los algoritmos de inversión propuestos en este capítulo son independientes del tipo de estructura que

se esté analizando, y por lo tanto, introduciendo un modelo electromagnético adecuado, son potencialmente aplicables a otros tipos de estructuras biológicas.

En el Capítulo 6 se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de los métodos desarrollados en el presente capítulo, para la recuperación de parámetros incógnita de las microestructuras que presentan los escarabajos de la especie *Ceroglossus suturalis*.

Capítulo 6

Obtención de parámetros relevantes de estructuras biológicas

*En este capítulo se presentan y aplican las estrategias de optimización heurística desarrolladas en el Capítulo 5, para recuperar las constantes dieléctricas y/o los espesores de los materiales que constituyen los sistemas de multicapas naturales. En primer lugar, se dan ejemplos de validación de los métodos propuestos y luego éstos se aplican al caso del escarabajo *Ceroglossus suturalis*. Se compara también el desempeño de los diferentes métodos de inversión, demostrando que este tipo de algoritmos posee un gran potencial como herramienta para investigar estructuras fotónicas naturales.*

*Los resultados presentados en este capítulo han dado lugar a tres publicaciones en revistas internacionales: “Retrieval of the relevant parameters of natural multilayer systems” [71], “Retrieval of relevant parameters of natural multilayer systems by means of bio-inspired optimization strategies” [39], y “Characterization of the iridescence-causing multilayer structure of the *Ceroglossus suturalis* beetle using bio-inspired optimization strategies” [72]. Éstos dos últimos trabajos han sido seleccionados por el *Virtual Journal for Biomedical Optics*.*

6.1. Motivación

Los métodos de inversión desarrollados para recuperar los parámetros relevantes de las microestructuras responsables de los llamativos efectos de color, parecen ser una herramienta muy prometedora para el estudio de efectos electromagnéticos en estructuras biológicas. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es poner a prueba dichos algoritmos para el caso particular estudiado en esta Tesis, es decir, el escarabajo *Ceroglossus suturalis*, y analizar el desempeño de cada uno de ellos en relación al número de variables que se desean recuperar.

6.2. Ejemplos de Validación

En esta Sección se dan ejemplos que permiten probar el funcionamiento de los algoritmos de optimización implementados. Para ello, se utiliza como función objetivo el espectro de reflectancia generado por el propio método de resolución del problema directo, que en este caso es el método 4x4. El hecho de tomar como función objetivo una función generada numéricamente con el modelo electromagnético tiene la ventaja de asegurarnos que existe un conjunto de parámetros que reproduce exactamente la curva, y por lo tanto permite evaluar el desempeño de los diferentes algoritmos propuestos en la búsqueda de las variables incógnita en un caso en que se conocen los valores de las variables que se desean recuperar. En el primer ejemplo se analiza el caso en que se pretenden obtener los valores de dos variables objeto, y en el segundo se estudia el caso de cuatro variables objeto.

6.2.1. EJEMPLO 1: Obtención de dos variables objeto

Con este ejemplo se pretende hacer una primera evaluación del desempeño de los algoritmos propuestos para la recuperación de dos variables objeto. Consideramos una estructura bicapa periódica finita constituida por nueve períodos (18 capas en total), con espesores de capa $d_1 = 60$ nm y $d_2 = 100$ nm, sobre un sustrato. Estos espesores son típicos

de la exocutícula de los escarabajos que exhiben coloración iridiscente. Los espectros utilizados como función objetivo fueron generados en forma numérica con el método 4×4 , para lo cual se asumió una onda plana incidente sobre el sistema con un ángulo $\theta_0 = 45^\circ$. Se consideraron ambos modos de polarización: s y p . Se fijó el valor de la constante dieléctrica de una de las capas en $\epsilon_1 = (2,3829 + i0,434)$ (este valor permaneció inalterable durante todo el proceso de optimización), y el otro en $\epsilon_2 = (2,8215 + i0,1008)$. Estos valores fueron reportados por Noyes *et al.* [35] para el escarabajo bupréstido *Chrysochroa raja*, el cual presenta características de color y una estructura de multicapas muy similares a las del *Ceroglossus suturalis*. El medio de incidencia es aire y el valor de la constante dieléctrica del sustrato se tomó como el promedio de las constantes dieléctricas de cada una de las capas, $\epsilon_{\text{sus}} = (\epsilon_1 + \epsilon_2)/2$, tal como se ha utilizado ya por diferentes autores para otras estructuras presentes en los tejidos de escarabajos [60]. Los espectros generados para ser utilizados como funciones objetivo están representados con línea continua roja (polarización s) y negra (polarización p) en la Fig. 6.1.

El objetivo de este ejemplo es recuperar el valor de ϵ_2 a partir del espectro de reflectancia, es decir, obtener los valores de sus componentes real e imaginaria, conociendo todos los demás parámetros de la estructura y de incidencia. De manera que $\Re\{\epsilon_2\}$ e $\Im\{\epsilon_2\}$ son las dos variables objeto.

Para la realización de este experimento numérico se fijaron los tamaños de las poblaciones inicial y secundaria correspondientes a las estrategias evolutivas en $\mu_E = 14$ y $\lambda = 100$, respectivamente, que permanecen constantes durante todo el proceso. Esto quiere decir que se inicializa la población con un número de elementos $\mu_E = 14$ y a cada elemento se le asigna como valor inicial un valor aproximado a la solución. Luego se aplican los operadores genéticos, explicados en la subsección 5.2.1 (Estrategias evolutivas) del Capítulo 5, a la población inicial y se genera la población secundaria con un número de elementos $\lambda = 100$. Después se reemplaza cada elemento en el método de resolución del problema directo con el fin de obtener una nueva función que se compara con la función objetivo a través de la función de aptitud (fitness). Este proceso se repite cíclicamente hasta alcanzar el criterio de finalización impuesto previamente en el programa. También,

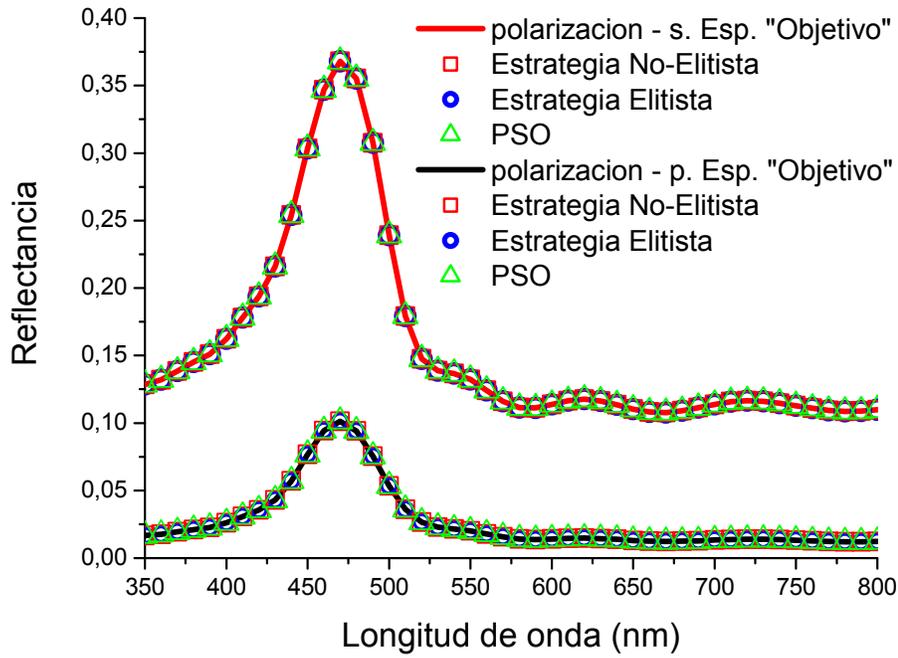


Figura 6.1: Espectros de reflectancia utilizados como función objetivo y espectros optimizados obtenidos con las diferentes estrategias de optimización, para una estructura periódica bicapa compuesta por 9 períodos, con espesores de las capas $d_1 = 60$ nm y $d_2 = 100$ nm y constantes dieléctricas $\epsilon_1 = (2,3829 + i0,434)$ y $\epsilon_2 = (2,8215 + i0,1008)$, para un ángulo de incidencia de 45° . El medio de incidencia es aire y la constante dieléctrica del sustrato es $\epsilon_{\text{sus}} = (\epsilon_1 + \epsilon_2)/2$.

se establecieron el número de elementos a ser recombinados en $\rho = 2$ y el número de generaciones en el ciclo evolutivo en $g = 100$. Es decir, que todo el ciclo, que incluye la recombinación, la mutación, el cálculo del espectro de reflectancia correspondiente a cada elemento, el cálculo de la norma euclidiana, y la selección, se repite 100 veces, ya que el número de iteraciones es el criterio de terminación implementado. Cada elemento de la población es un conjunto de valores de $\Re\{\epsilon_2\}$ e $\Im\{\epsilon_2\}$ generados al azar. Para definir el espacio de búsqueda, se asignaron los límites inferior y superior en $0 \leq \Re\{\epsilon_2\}, \Im\{\epsilon_2\} \leq 10$.

En este ejemplo se probaron las estrategias de evolución No Elitista (NE) y Elitista (E), y el método PSO. Tal como se explicara en el Capítulo 5, la principal diferencia entre los dos esquemas NE y E radica en cómo se seleccionan los mejores elementos que

sobreviven para la siguiente iteración.

Para poder comparar los resultados de las estrategias evolutivas con los del algoritmo PSO, para este último se consideró un enjambre de $\mu_P = \mu_E + \lambda = 114$ elementos. También se fijó el número de iteraciones del PSO en $g = 100$. Bajo estas condiciones, las tres estrategias evalúan la función de ajuste el mismo número de veces.

Otro parámetro adicional y constante que debe definirse en el programa es el número de realizaciones, y corresponde al número de veces que se llevará a cabo el proceso completo de optimización. Este número permanece constante y en este ejemplo se fijó en 200, con lo cual el experimento numérico se repite 200 veces.

La Figura 6.2 ilustra un ejemplo que corresponde a los valores de la función de ajuste arrojados en la realización número 21 para las estrategias evolutivas E, NE y para el PSO. Los parámetros utilizados para los algoritmos son los mismos que los empleados en la Figura 6.1 donde se asumió una onda plana incidente sobre el sistema con un ángulo $\theta_{inc} = 45^\circ$. El medio de incidencia es aire y el valor de la constante dieléctrica del sustrato se tomó como el promedio de las constantes dieléctricas de cada una de las capas, $\epsilon_{sus} = (\epsilon_1 + \epsilon_2)/2$. En la Figura 6.2 se graficó el valor de la función de ajuste definida en la ec. (5.1), como función del número de generaciones (número de la iteración del algoritmo), y se muestran las curvas correspondientes a las tres estrategias en las que se observan diferentes comportamientos de convergencia. Las curvas roja, azul y verde corresponden a las estrategias NE, E y PSO, respectivamente.

El comportamiento oscilante que se observa en la curva roja de la Fig. 6.2 es típico de la estrategia NE, y puede ser interpretado como un deterioro temporario del valor de la función de ajuste durante el proceso de optimización. En ciertas situaciones, esta característica puede ser beneficiosa para evitar la convergencia prematura a un óptimo local, es decir, a una solución no deseada. Es importante destacar y remarcar que las curvas que se presentan en la Fig. 6.2 son sólo las que se obtuvieron en una determinada realización y se muestran aquí sólo como ejemplos de tres curvas típicas diferentes para la función de ajuste vs. el número de generaciones. Esto no implica que el método en sí genere curvas que tengan siempre este comportamiento; si se toma otro caso, es decir,

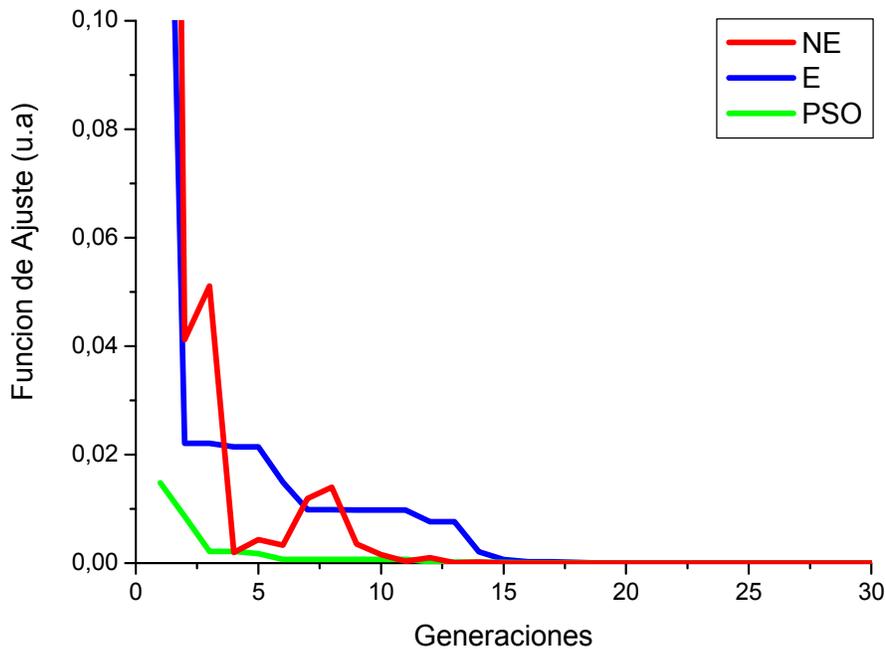


Figura 6.2: Convergencia de la función de ajuste para los diferentes algoritmos de optimización utilizados en el caso de las funciones objetivo de la Fig. 6.1, para una población inicial y secundaria $\mu_E = 14$, $\mu_P = 114$ y $\lambda = 100$ respectivamente, el número de generaciones fue de 100, ρ se fijó en 2, y el número de realizaciones fue 200. La onda plana incidente que ilumina al sistema forma un ángulo $\theta_0 = 45^\circ$ con la normal a la superficie. NE (curva roja), E (curva azul) y PSO (curva verde).

otra realización del mismo proceso, seguramente se obtendrán curvas diferentes para la estrategia NE e inclusive podría darse que esta nueva función de ajuste converja en forma monótona decreciente.

Un criterio para evaluar si las estrategias convergen al espectro de reflectancia objetivo es, por ejemplo, imponer un determinado valor para el error relativo porcentual entre dos valores sucesivos de la función de ajuste. Si se fija que dicho error debe ser del orden de la milésima parte, entonces, para este caso y para el algoritmo PSO son suficientes 12 iteraciones para asegurar su convergencia. Como se puede observar en la Fig. 6.2, cada estrategia requiere de un número de generaciones distinto para converger: la NE necesita

15 generaciones y la E requiere de 17 iteraciones para lograr el ajuste deseado.

En el Cuadro 6.1 se muestran los valores recuperados de $\Re\{\epsilon_2\}$ e $\Im\{\epsilon_2\}$, y el correspondiente valor de la función de ajuste para ambas polarizaciones, para las tres estrategias aplicadas y para el caso de los espectros de reflectancia de la Fig. 6.1.

	$\Re\{\epsilon_2\}$	$\Im\{\epsilon_2\}$	<i>Función de ajuste</i>
Parámetros “Objetivo”	2.8215	0.1008	0.0
Polarización p , $\theta_0 = 45^\circ$			
NE	2.821499986	0.1007999782	5.877777112e-16
E	2.821499986	0.1007999782	5.877778394e-16
PSO	2.821499979	0.1007999766	6.022657738e-16
Polarización s , $\theta_0 = 45^\circ$			
NE	2.821499984	0.1007999854	2.827176200e-14
E	2.821499984	0.1007999854	2.827176316e-16
PSO	2.821499994	0.1007999926	2.861409860e-14

Cuadro 6.1: Valores de los parámetros optimizados por medio de las diferentes estrategias de optimización, para el caso de los espectros de la Fig. 6.1. En la última columna se dan los valores de la función de ajuste.

Se puede observar en el cuadro que los valores optimizados de las partes real e imaginaria de la constante dieléctrica ϵ_2 corresponden a los utilizados para la generación del espectro objetivo. El bajo valor de la función de ajuste (tendiente a cero) confirma que el espectro de reflectancia objetivo se encuentra bien reproducido por el modelo de multicapas planas con los parámetros especificados en la Fig. 6.1.

Los espectros asociados a los valores de ϵ_2 recuperados con las diferentes estrategias también se muestran en la Fig. 6.1, en la cual los símbolos azules corresponden a la estrategia E, los símbolos rojos a la NE, y los verdes a la PSO. Tal como era de esperar de acuerdo con los valores de ϵ_2 mostrados en el Cuadro 6.1, se puede observar que para las tres estrategias utilizadas dichos espectros prácticamente se superponen con los corres-

pendientes espectros objetivo. Teniendo en cuenta que el método PSO es de naturaleza muy diferente a las estrategias evolutivas, este resultado nos provee de cierto grado de confianza en la aplicabilidad de estas herramientas para recuperar parámetros incógnita de estructuras biológicas.

En resumen, en este ejemplo se mostró que al fijar los espesores de las capas y el valor de la constante dieléctrica de una de las capas que componen la estructura bicapa periódica, las tres estrategias (Elitista, No-Elitista y PSO) convergen exitosamente a los valores correctos de las partes real e imaginaria de la constante dieléctrica desconocida, para un ángulo de incidencia de 45° y para ambos modos de polarización. En el siguiente ejemplo analizaremos el desempeño de estas estrategias para el caso de cuatro variables objeto.

6.2.2. EJEMPLO 2: Obtención de cuatro variables objeto

Es sabido que a medida que el número de incógnitas a recuperar aumenta, la topología de la función de ajuste se va haciendo más compleja, aumentando la cantidad de mínimos, y, por consiguiente, la probabilidad de converger a un óptimo local, es decir, a una solución no deseada, también se incrementa. Por lo tanto, en este ejemplo de validación se pretende evaluar el desempeño de las estrategias de optimización para la recuperación de cuatro variables objeto.

Se considera el mismo sistema de multicapas del ejemplo anterior, pero en este caso las variables objeto a ser recuperadas son las partes real e imaginaria de ambas constantes dieléctricas complejas ϵ_1 y ϵ_2 . Al igual que en el ejemplo previo, los espectros objetivo son generados numéricamente con los mismos parámetros de entrada. Los tamaños de las poblaciones inicial y secundaria también se fijaron en $\mu_E = 14$, $\lambda = 100$, respectivamente, y el número de elementos a ser recombinados en $\rho = 2$. El número de generaciones en el ciclo evolutivo se fijó en $g = 100$ y es el que provee el criterio de finalización.

En este ejemplo, cada elemento de la población es un conjunto de valores de ϵ_1 y ϵ_2 generados al azar, lo que significa que se buscan cuatro incógnitas: las partes reales e

imaginarias de cada una de las constantes dieléctricas. Para definir el espacio de búsqueda, se asignaron los límites inferior y superior $-10 \leq \Re\{\epsilon_1\}, \Im\{\epsilon_1\}, \Re\{\epsilon_2\}, \Im\{\epsilon_2\} \leq 10$.

Se pusieron a prueba las estrategias evolutivas NE y E, y el PSO para la búsqueda de la solución óptima a partir de 200 estados iniciales (realizaciones) diferentes. Para poder realizar, de manera objetiva, una comparación entre los resultados del PSO y los de las estrategias evolutivas, se fijó el tamaño del enjambre $\mu_P = \mu_E + \lambda = 114$. También se consideró el mismo número de iteraciones en el ciclo de optimización para las tres estrategias, y de esta manera se aseguró que la función de ajuste fuera evaluada la misma cantidad de veces en todos los casos.

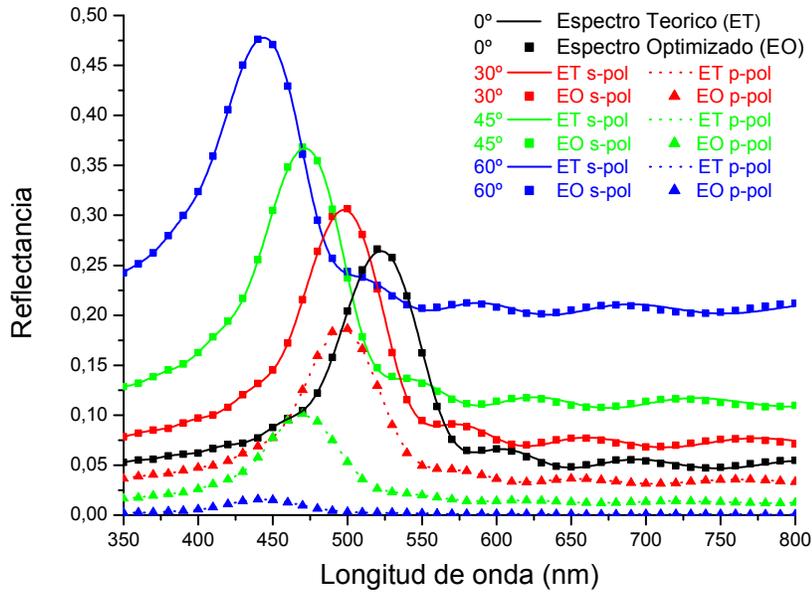


Figura 6.3: Espectros teóricos y optimizados de una estructura bicapa periódica con $d_1 = 60$ nm, $d_2 = 100$ nm, $\epsilon_1 = (2,3829 + i0,434)$, $\epsilon_2 = (2,8215 + i0,1008)$ y un total de 9 períodos, para ambos modos de polarización (líneas continuas corresponden a polarización s y líneas punteadas a polarización p) y para diferentes ángulos de incidencia: 0° (negro), 30° (rojo), 45° (verde) y 60° (azul). El superestrato es aire y la constante dieléctrica del sustrato es $(\epsilon_1 + \epsilon_2)/2$.

En la Fig. 6.3 se muestran los espectros de reflectancia obtenidos numéricamente para diferentes ángulos de incidencia y para los dos modos de polarización. Estas curvas

constituyen las funciones objetivo consideradas en este ejemplo. Los diferentes colores denotan diferentes ángulos de incidencia; las líneas continuas corresponden a polarización s y las líneas punteadas a polarización p . También se muestran con diferentes símbolos los correspondientes espectros optimizados hallados usando las tres estrategias: NE, E y PSO. Dado que todos los espectros optimizados correspondientes a las diferentes realizaciones se solapan, se muestra sólo un conjunto de símbolos para cada espectro objetivo.

En las Figs. 6.4 y 6.5 se resumen los resultados obtenidos con los tres esquemas de inversión en histogramas correspondientes a cada una de las variables objeto recuperadas. Cada histograma representa el número de realizaciones para las cuales las incógnitas (componentes reales e imaginarias de ϵ_1 y de ϵ_2) se encuentran en el intervalo preestablecido. Por ejemplo, en el caso de $\Re\{\epsilon_1\}$, se consideraron sólo valores que se encontraban entre 2.3 y 2.4. En ambas figuras, los paneles (a) y (b) corresponden a la estrategia NE, (c) y (d) a la estrategia E, y (e) y (f) al método PSO. En cada panel se incluyen todos los valores recuperados, incluyendo ambos modos de polarización y todos los ángulos de incidencia considerados: 0° , 30° , 45° , y 60° . Esto significa que se evaluó el desempeño de cada uno de los algoritmos para siete condiciones de iluminación diferentes, ya que para incidencia normal la respuesta de ambas polarizaciones es la misma; es decir que se incluyeron los resultados de los siete procesos independientes. Cada experimento numérico se repitió 200 veces, dando un total de 1400 realizaciones.

Como se observa en la Fig. 6.4, prácticamente todas las soluciones caen en un intervalo muy pequeño alrededor del valor objetivo, con un error menor a 3×10^{-4} y a 3.7×10^{-5} para la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica ϵ_1 , respectivamente. Lo mismo ocurre para el caso de las soluciones que se muestran en la Fig. 6.5, donde el error correspondiente al valor objeto es menor a 4.6×10^{-4} para la parte real de ϵ_2 y menor a 3.5×10^{-6} para su respectiva parte imaginaria. En resumen, como todos los valores de las variables incógnita cayeron en un intervalo muy estrecho, estos resultados proveen un alto grado de confianza en los métodos empleados, por lo que cualquiera de las tres estrategias podría, en principio, ser utilizada para recuperar los parámetros incógnita de la estructura estudiada en esta Tesis. Además, las respectivas funciones de ajuste alcanzan valores muy

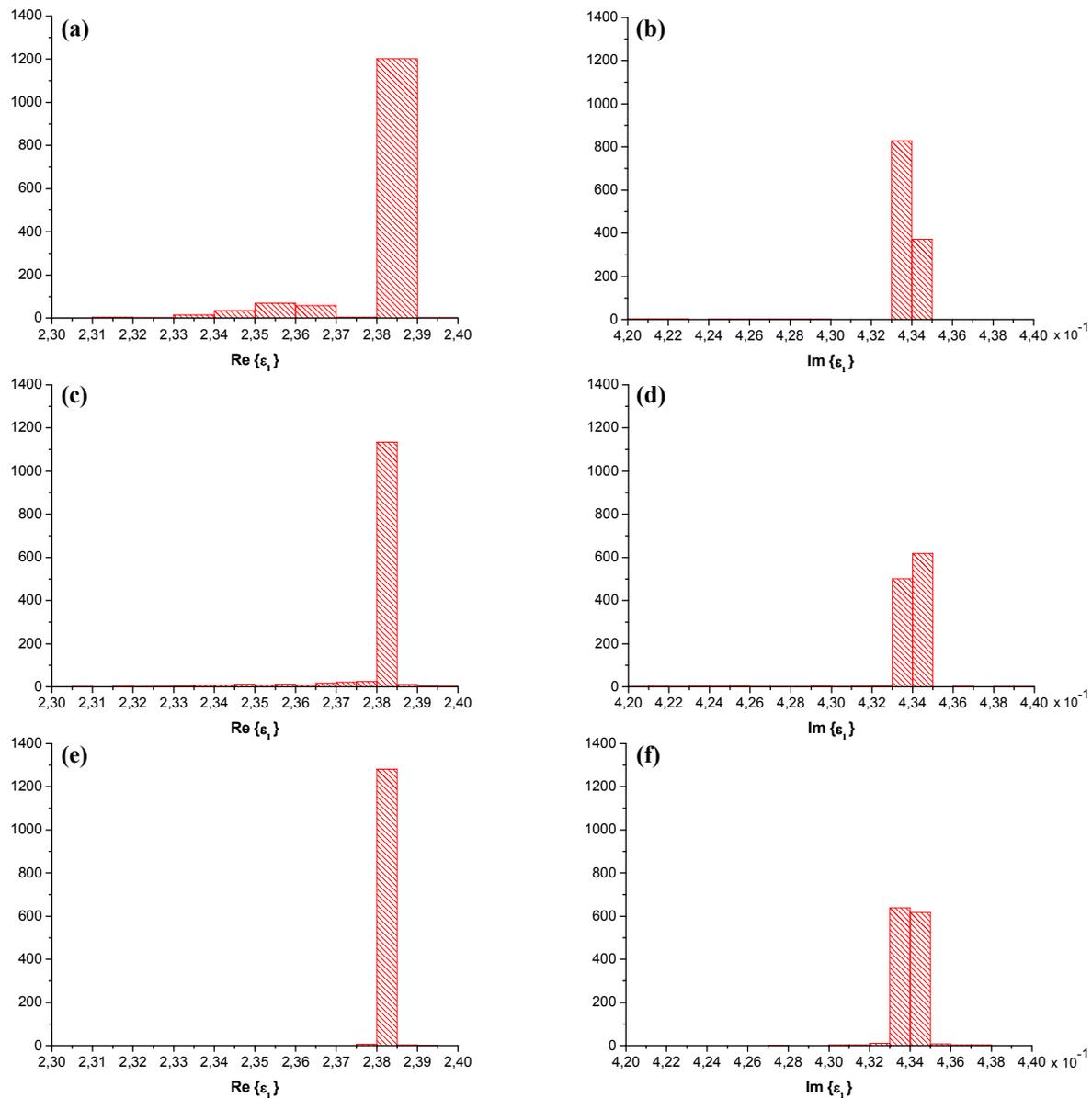


Figura 6.4: Histogramas de los valores de las partes real (a, c, e) e imaginaria (b, d, f) de ϵ_1 para una estructura bicapa de 9 períodos con $d_1 = 60$ nm, $d_2 = 100$ nm, para los tres esquemas de inversión: (a)-(b) NE; (c)-(d) E; (e)-(f) PSO. En cada figura se incluyen los resultados para los dos modos de polarización y para los cuatro ángulos de incidencia considerados (0° , 30° , 45° y 60°).

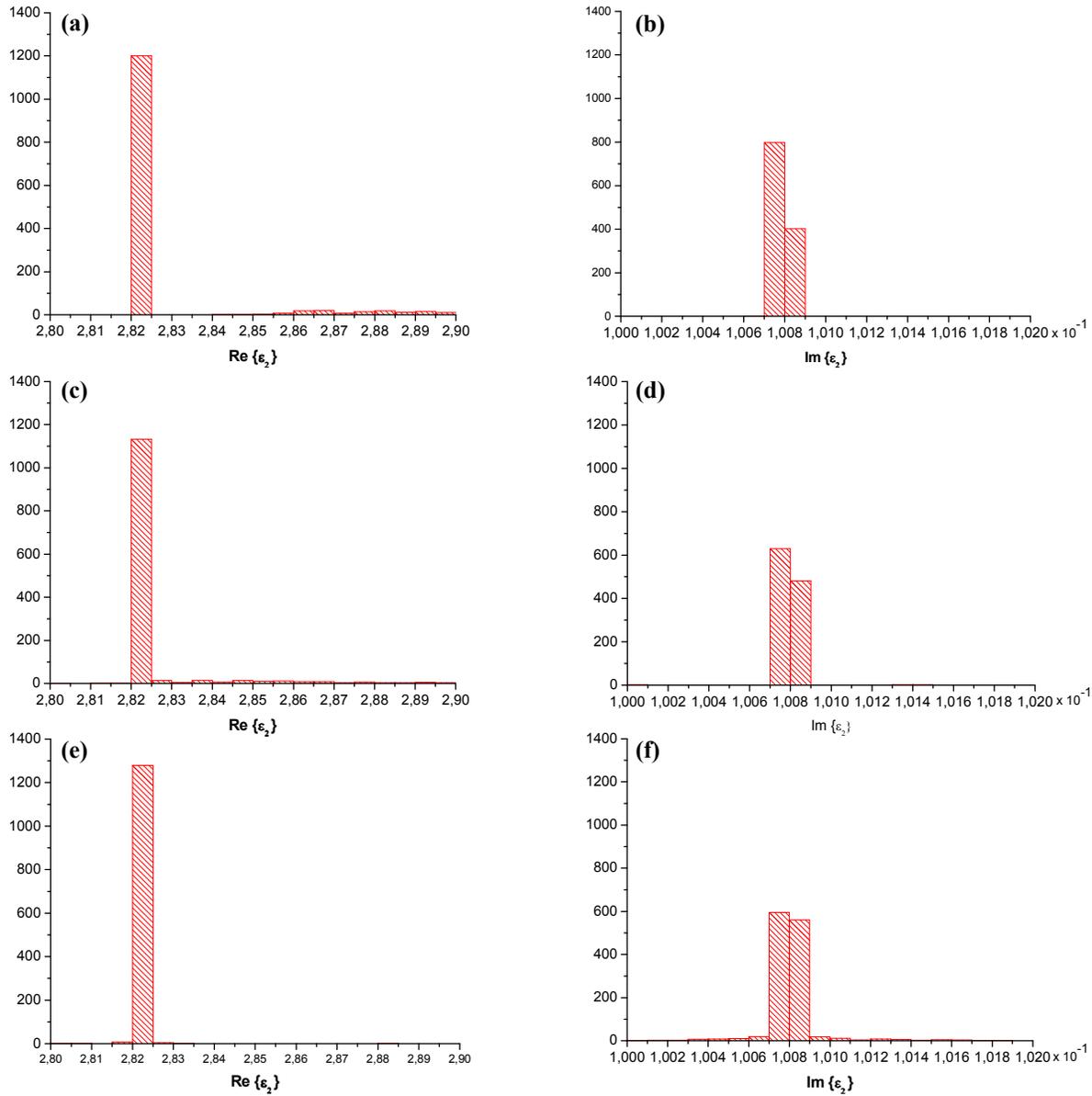


Figura 6.5: Histogramas de los valores de las partes real (a, c, e) e imaginaria (b, d, f) de ϵ_2 para una estructura bicapa de 9 períodos con $d_1 = 60$ nm, $d_2 = 100$ nm, para los tres esquemas de inversión: (a)-(b) NE; (c)-(d) E; (e)-(f) PSO. En cada figura se incluyen los resultados para los dos modos de polarización y para los cuatro ángulos de incidencia considerados (0° , 30° , 45° y 60°).

pequeños, del orden de 10^{-16} .

Para analizar el desempeño de las estrategias utilizadas para la recuperación de las constantes dieléctricas del sistema, en el Cuadro 6.2 se muestra el porcentaje de éxito relativo de cada una de ellas al recuperar cada una de las variables objeto. En cada porcentaje se incluyen los valores de las incógnitas recuperadas que caen dentro de los intervalos preestablecidos, que son los siguientes: para las componentes real e imaginaria de ϵ_1 los intervalos son $[2.3, 2.4]$ y $[0.42, 0.44]$, respectivamente, y para las componentes real e imaginaria de ϵ_2 los intervalos son $[2.8, 2.9]$ y $[0.1, 0.102]$, respectivamente. Estrictamente hablando, no es posible una comparación directa entre las ES y el PSO debido a los diferentes paradigmas biológicos sobre los cuales se basan cada una de las técnicas. Sin embargo, dejando de lado que ninguno de los métodos de optimización reportados en la literatura pueden garantizar la convergencia hacia un óptimo global, los resultados numéricos mostrados en el Cuadro 6.2 sugieren la existencia de lo que parece ser una solución única. Por otro lado, basándonos en los resultados informados en este Cuadro, para este ejemplo la estrategia E parece ser la opción menos adecuada. En dicho cuadro se observa que con la técnica Elitista se alcanzó el porcentaje más bajo de éxito relativo en la recuperación de las variables incógnita, y probablemente esto obedece a que el algoritmo cae en un óptimo local que no es la solución físicamente buscada.

	$\Re\{\epsilon_1\}$	$\Im\{\epsilon_1\}$	$\Re\{\epsilon_2\}$	$\Im\{\epsilon_2\}$
NE	99.36	86.57	94.86	85.71
E	91.07	82.36	89.93	80.50
PSO	92.29	92.07	92.57	90.21

Cuadro 6.2: Porcentaje del éxito relativo de las diferentes estrategias en la recuperación de las partes real e imaginaria de las constantes dieléctricas de los materiales que componen el sistema de multicapas del ejemplo generado en forma numérica.

6.3. Ejemplos de Aplicación

En esta Sección se ponen a prueba las diferentes estrategias de optimización para recuperar los parámetros relevantes de estructuras biológicas a partir de los espectros de reflectancia medidos experimentalmente. Utilizando como funciones objetivo las curvas experimentales presentadas en el Capítulo 3, se propone investigar el desempeño de estas estrategias para recuperar simultáneamente varias incógnitas. En el primer ejemplo se toma como función objetivo uno de los espectros de reflectancia obtenidos para el escarabajo *Ceroglossus suturalis* verde, y se pretende recuperar las constantes dieléctricas complejas de los materiales que componen la estructura de multicapas correspondiente (cuatro variables objeto). En el segundo ejemplo se utilizan también como funciones objetivo los espectros de reflectancia medidos para la muestra dorada del *Ceroglossus suturalis*, y se estudia el desempeño de las tres estrategias para la recuperación de cuatro y seis variables objeto, es decir, incluyendo como incógnitas también los espesores de las capas.

6.3.1. Recuperación de las constantes dieléctricas de los materiales presentes en la estructura de multicapas del *Ceroglossus suturalis* verde a partir del espectro de reflectancia correspondiente a un ángulo de incidencia de 15°

En este ejemplo se considera como función objetivo la reflectancia especular de la muestra de *Ceroglossus suturalis* verde para un ángulo de incidencia de 15° y polarización *s*. Los detalles del dispositivo experimental para realizar esta medida fueron explicados en el Capítulo 3 (Figura 3.7), y la curva obtenida es la de la Figura 3.9 (a), la cual se repite en la Fig. 6.6 con línea continua. Se propone recuperar los valores de cuatro incógnitas: las partes real e imaginaria de las constantes dieléctricas de los medios que componen la estructura periódica bicapa presente en la exocutícula del escarabajo *Ceroglossus suturalis* verde. El modelo utilizado para el sistema es el mismo que el aplicado en los ejemplos de validación: se asume que la estructura de multicapas periódica consiste de un total de

9 períodos, cada uno de los cuales está formado por una capa de espesor d_1 y constante dieléctrica ϵ_1 , y otra capa de espesor d_2 y constante dieléctrica ϵ_2 . Para este primer ejemplo de aplicación, se asume $d_1 = 60$ nm y $d_2 = 100$ nm. Los tamaños de las poblaciones inicial y secundaria para todas las estrategias son los mismos que los utilizados en los ejemplos de validación. Se buscó la solución para 50 estados iniciales diferentes empleando las tres estrategias de optimización. El número de generaciones se fijó en $g = 200$, lo cual proveyó el criterio de finalización del ciclo iterativo.

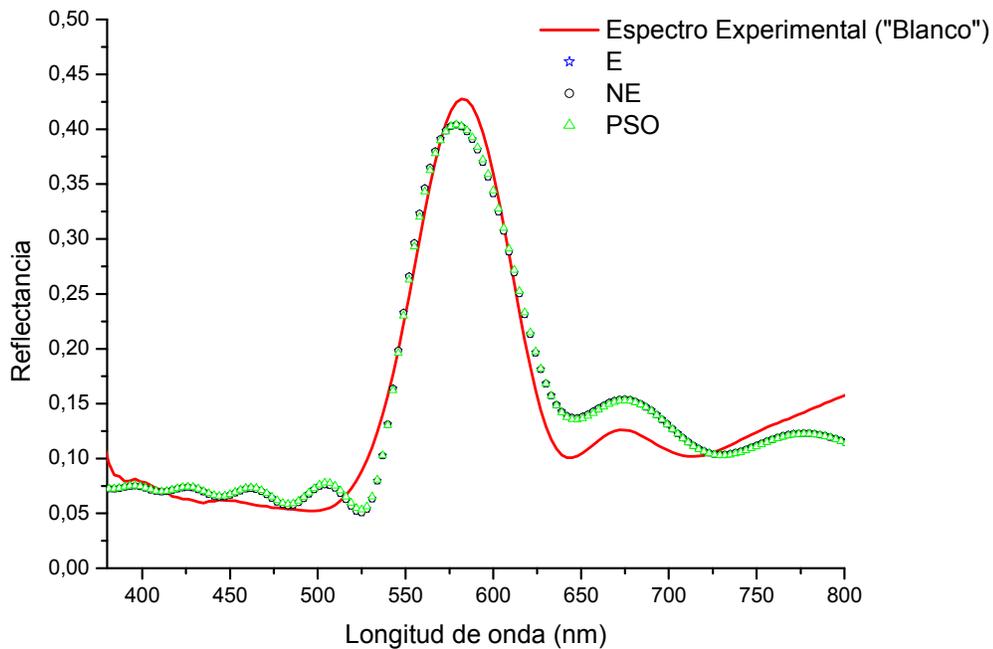


Figura 6.6: Espectro de reflectancia especular del escarabajo *Ceroglossus suturalis* para un ángulo de incidencia de 15° y polarización s . La línea roja continua corresponde a la medición experimental, las estrellas azules, los círculos negros, y los triángulos verdes corresponden a los espectros optimizados mediante las estrategias E, NE y PSO, respectivamente.

En el proceso de búsqueda de la solución optimizada usando las tres estrategias, se hallaron dos conjuntos de valores de ϵ_1 y ϵ_2 , como se muestra en el Cuadro 6.3. Estos dos conjuntos aparecen con diferentes frecuencias en las soluciones dadas para las diferentes estrategias, y además corresponden a diferentes valores de la función de ajuste: $\approx 0,96$

para el conjunto 1 y $\approx 1,2$ para el conjunto 2. En el Cuadro 6.4, se muestra el porcentaje de ocurrencia de los conjuntos 1 y 2, para cada una de las tres estrategias.

	$\Re\{\epsilon_1\}$	$\Im\{\epsilon_2\}$	$\Re\{\epsilon_2\}$	$\Im\{\epsilon_2\}$	<i>Función de ajuste</i>
Conjunto 1	2.85	0.008	3.530	0.24	0.96
Conjunto 2	4.1	$2 \cdot 10^{-7}$	2.138	0.39	1.2

Cuadro 6.3: Partes real e imaginaria de las constantes dieléctricas recuperadas de ambos materiales que componen el sistema de multicapas en la muestra verde del escarabajo *Ceroglossus suturalis*. En la última columna se dan los valores de la función de ajuste para cada uno de los conjuntos de parámetros optimizados.

	NE	E	PSO
Conjunto 1	62	100	96
Conjunto 2	12	0	4

Cuadro 6.4: Porcentaje de ocurrencia de cada solución para las diferentes estrategias.

Como se puede observar, el éxito relativo de la estrategia NE para la recuperación del conjunto 1 es significativamente menor que el alcanzado por la E y por el PSO (nótese que hay un porcentaje residual de soluciones dadas por la estrategia NE (26%) que no está incluido en el cuadro debido a que los respectivos valores de la función de ajuste son extremadamente altos). El primero de los conjuntos tiene el menor valor alcanzado por la función de ajuste, y por lo tanto parece ser el mejor candidato a ser el óptimo global que se busca. Por otro lado, como el valor de la función de ajuste del conjunto 2 es mayor que el del conjunto 1, parece ser que el conjunto 2 corresponde a un óptimo local, y debe ser descartado. Además, desde el punto de vista físico, el valor recuperado de $\Re\{\epsilon_1\}$ del conjunto 2 es mayor que los valores correspondientes a medios biológicos, y por lo tanto el conjunto 2 no constituye una solución aceptable para el problema en cuestión. Las estrategias E y PSO parecen ser las más exitosas en la recuperación de los valores

correctos de las constantes dieléctricas. Este hecho sugiere que de las estrategias evolutivas, la elitista es la que mejor se adapta en este contexto. En la Fig. 6.6, se compara el espectro experimental, que es nuestra función objetivo, con los correspondientes espectros generados numéricamente utilizando como datos de entrada los parámetros recuperados por cada estrategia. Dado que los valores de las constantes dieléctricas del conjunto 1 son prácticamente iguales para las tres estrategias (difieren en el tercer dígito significativo), las correspondientes curvas de reflectancia se solapan completamente. Se observa una muy buena concordancia entre el espectro experimental y el optimizado. El pico principal se reproduce muy bien tanto en ubicación como en el valor de la reflectancia, y las características generales de la curva experimental están también satisfactoriamente descritas por la reflectancia optimizada. Aunque los valores de las constantes dieléctricas de los materiales que conforman el sistema de multicapas del *Ceroglossus suturalis* no son conocidos con precisión, los valores recuperados de sus partes real e imaginaria se encuentran dentro de los rangos de valores típicos que aparecen en los materiales naturales [2].

Los resultados de este ejemplo muestran que las técnicas de optimización heurística constituyen una herramienta poderosa para recuperar, a partir de la reflectancia experimental, las constantes dieléctricas de los tejidos biológicos. En el siguiente ejemplo se muestra el desempeño de las estrategias tomando como función objetivo otra curva experimental, y también se evalúa el comportamiento de las mismas para el caso de seis incógnitas a recuperar, es decir, seis variables objeto.

6.3.2. Recuperación de parámetros relevantes de las muestras de *Ceroglossus suturalis* verde y dorado a partir del espectro de reflectancia correspondiente a un ángulo de incidencia de 30°

En este ejemplo se aplican técnicas de optimización heurística utilizando como función objetivo los espectros de reflectancia medidos en dos muestras del escarabajo *Ceroglossus*

suturalis, uno verde y uno dorado, correspondientes a un ángulo de incidencia de 30° y a polarización *s*. Los detalles del dispositivo experimental han sido explicados en el Capítulo 3, y las curvas que se utilizan corresponden a las mostradas en las Figuras 3.9 (a) y 3.9 (b). En la Fig. 6.7 se muestran en trazo de línea roja continua las curvas de reflectancia experimental obtenidas para ambas muestras para un ángulo de incidencia de 30° y una polarización *s*. A partir de las curvas experimentales se pretende estimar los parámetros relevantes de la estructura de multicapas de la epicutícula de dichos escarabajos. En el primer experimento se propone recuperar los índices de refracción de los materiales que componen la estructura, y en el segundo se propone incluir también los espesores de las capas como variables objeto, de manera de tener un total de seis incógnitas a recuperar.

En el caso de la muestra del escarabajo verde, el sistema de multicapas está compuesto por un promedio de 9 períodos, y los espesores de cada capa son aproximadamente de 60 y 100 nm, lo cual da un espesor total promedio de $\approx 1,4 \mu\text{m}$. Por otro lado, la muestra del escarabajo dorado posee una estructura completamente análoga, pero en este caso el sistema de multicapas consiste de 20 períodos, y el espesor de las capas es de aproximadamente 70 y 120 nm (el espesor total promedio del sistema de multicapas es de $\approx 3,8 \mu\text{m}$).

Tal como se mencionara en el Capítulo 3, en estas curvas se observa la respuesta típica del élitro del escarabajo: para la muestra verde (Fig. 6.7(a)) el pico de reflectancia está localizado en ≈ 560 nm, mientras que para la muestra dorada (Fig. 6.7(b)) el máximo está en ≈ 610 nm. En ambos casos, el ancho del pico es ≈ 100 nm, como ya se ha observado para otras especies en este tipo de mediciones [23, 35, 57, 60]. En este ejemplo, las curvas de reflectancia medidas que se muestran en la Fig. 6.7 juegan el rol de funciones objetivo para el esquema propuesto para estimar las constantes dieléctricas y los espesores de las capas.

A continuación se proponen dos experimentos numéricos diferentes a partir de la aplicación de las estrategias de optimización. En el primero de ellos se pretende recuperar cuatro variables objeto, correspondientes a las partes real e imaginaria de los dos materiales que constituyen el sistema de multicapas, y los espesores de las capas se toman de

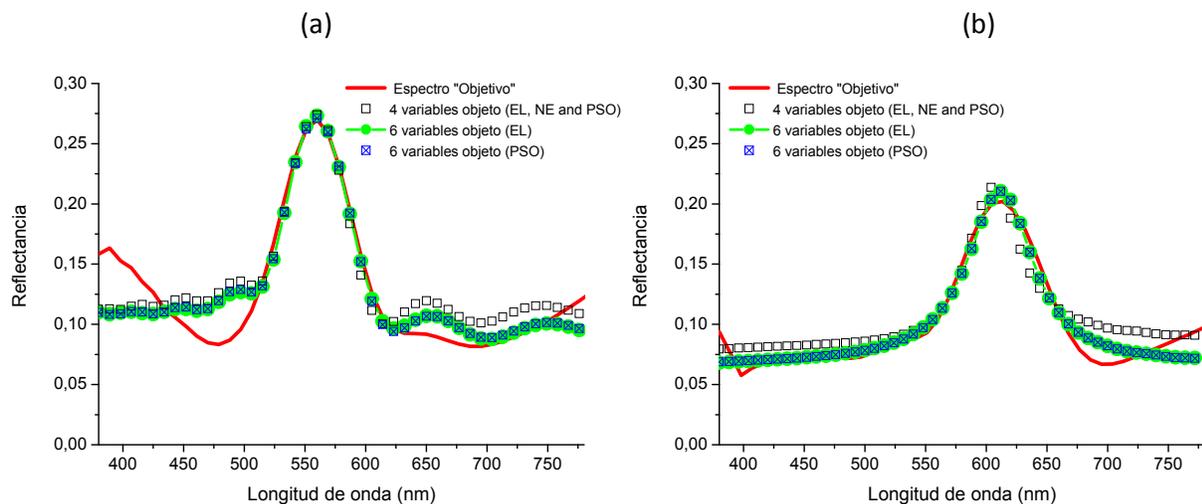


Figura 6.7: Espectro de reflectancia especular del escarabajo *Ceroglossus suturalis* para un ángulo de incidencia de 30° y polarización *s*. La línea roja continua corresponde a la medición experimental, y los diferentes símbolos corresponden a los espectros optimizados mediante las estrategias E, NE y PSO. (a) Muestra verde; (b) muestra dorada.

las imágenes analizadas. Dado que el espesor depende fuertemente de la muestra observada y además varía a lo largo de un mismo élitro, en el segundo experimento se propone recuperar seis variables objeto, es decir, incluir, además de las constantes dieléctricas, los espesores de cada capa. En ambos casos se utilizan las tres estrategias de optimización.

Primer experimento: espesores de las capas fijos (4 variables objeto)

En este caso se pretende recuperar las constantes dieléctricas complejas de los materiales que componen el sistema de multicapas responsable de la iridiscencia en la especie *Ceroglossus suturalis*. Tal como se hizo en los ejemplos anteriores, se asume una estructura periódica de multicapas planas, y los valores de los espesores de las capas se asignan de acuerdo a la caracterización de las muestras descrita en el Capítulo 2. En el caso de la muestra verde, se asume $d_1 = 60$ nm y $d_2 = 100$ nm, y para la muestra dorada $d_1 = 70$ nm y $d_2 = 120$ nm. El número total de períodos (compuesto por dos capas de materiales

diferentes) se fijó en 9 para el escarabajo verde y en 20 para el dorado. La constante dieléctrica del sustrato se toma como el promedio de las constantes dieléctricas de los materiales de las capas.

En lo que respecta a las estrategias E y NE, se fijaron los tamaños de las poblaciones inicial y secundaria en 14 y 100, respectivamente, y se fijó el número de elementos a ser recombinados en 2. El número de estados iniciales desde los cuales se buscan los óptimos (realizaciones) fue de 200 y el número de generaciones en cada ciclo evolutivo se fijó en 200, siendo este parámetro el que provee el criterio de finalización del proceso.

Cada elemento de la población es un conjunto de valores complejos de las constantes dieléctricas ϵ_1 y ϵ_2 generados al azar. En el caso del PSO, se fijó el tamaño del enjambre en 114 para poder comparar objetivamente sus resultados con los obtenidos mediante las estrategias evolutivas. Se considera el mismo número de iteraciones para el ciclo de optimización para las tres estrategias, del tal manera que la función de ajuste es evaluada por el PSO la misma cantidad de veces que en los esquemas E y NE. Para definir el espacio de búsqueda, en todos los casos se fijaron los límites inferior y superior: $0 \leq \Re\{\epsilon_1\}, \Re\{\epsilon_2\} \leq 5$, $0 \leq \Im\{\epsilon_1\}, \Im\{\epsilon_2\} \leq 1$, que corresponden a rangos razonables para las constantes dieléctricas halladas en tejidos naturales. Como función objetivo se consideró la reflectancia especular medida para un ángulo de incidencia de 30° y polarización s , y se restringió el espectro al rango visible.

En la búsqueda de la solución optimizada para el espécimen verde, en el caso de la estrategia E y del PSO, el 100 % de las realizaciones convergieron a los valores $\epsilon_1 = (3,164+i0,2492)$ y $\epsilon_2 = (3,422+i0,0740)$, con un valor de la función de ajuste de $\approx 0,21$. Sin embargo, la estrategia NE convergió a dicha solución sólo en un 74 % de las realizaciones. Un 8 % de las realizaciones convergió a otro conjunto de constantes dieléctricas, los cuales fueron descartados por tener algunos valores fuera de los límites del espacio de búsqueda, y esto sugiere que tales valores no corresponden a un óptimo global sino a uno local. El resto de las soluciones (18 %) dieron valores extremadamente altos de la función de ajuste, lo que significa que no corresponden a soluciones optimizadas. Según estos resultados, la E y el PSO parecen ser estrategias más exitosas comparadas con la NE, para este ejemplo

en particular.

El espectro de reflectancia calculado introduciendo en el modelo electromagnético los valores optimizados, se representa en la Fig. 6.7 (a) por medio de cuadrados huecos. Puede observarse que la posición espectral, la amplitud, el ancho y la forma del pico se ajustan muy bien a la curva experimental (línea continua). Las diferencias más significativas aparecen a ambos lados del pico. Si bien los valores optimizados de las constantes dieléctricas están contenidos dentro de los valores esperados para tejidos naturales presentes en las multicapas de la cutícula de escarabajos [2], sus partes reales parecen un poco altas si uno las compara con especies similares tales como *Chrysochroa raja*, para la cual se han reportado valores de 2.3829 y 2.8215 [35], o *Chrysochroa fulgidissima*, cuyos valores son 2.8213 y 2.4336 para el ϵ más alto y para el más bajo, respectivamente [37]. Por otro lado, las partes imaginarias se sitúan muy bien dentro del rango reportado para las multicapas de los escarabajos.

Para la muestra dorada, la estrategia E convergió a los siguientes valores para todas las realizaciones: $\epsilon_1 = (2,5872 + i0,2254)$ y $\epsilon_2 = (2,8536 + i0,1690)$, con un valor de la función de ajuste de 0.08. El PSO aportó las mismas soluciones en un 88 % de las realizaciones, y la NE sólo en un 74 %. El resto de las soluciones encontradas por el PSO (12 %) corresponden a otro conjunto de soluciones, el cual da un valor de la función de ajuste ligeramente mayor (0.09): $\epsilon_1 = (3,1675 + i0,1068)$ y $\epsilon_2 = (2,0385 + i0,2288)$, lo cual sugiere que esta solución podría corresponder a un óptimo local. En el caso de la NE, el resto de las realizaciones no convergieron a soluciones aceptables desde el punto de vista del valor de la función de ajuste. Por lo tanto, también en este caso la E y el PSO parecen ser las estrategias más exitosas comparadas con la NE. La curva de reflectancia calculada introduciendo en el modelo electromagnético los valores de las constantes dieléctricas recuperadas se muestra en la Fig. 6.7(b). También en este caso, las características principales de la reflectancia experimental (línea continua) se reprodujeron muy bien por medio de las curvas optimizadas (cuadrados huecos). Estos valores de las constantes dieléctricas también están contenidos dentro de los rangos reportados para especies similares.

Segundo experimento: espesores de las capas variables (6 variables objeto)

Si bien los valores de las constantes dieléctricas recuperados en el experimento previo son aceptables desde el punto de vista de los tejidos biológicos presentes en la cutícula de los escarabajos, las curvas optimizadas y el espectro objetivo no se superponen completamente, y esto sugiere que es posible obtener un conjunto de soluciones (valores de las partes real e imaginaria de las constantes dieléctricas) más apropiadas. Con el objeto de mejorar estas estimaciones, en este apartado se extiende el dominio de las incógnitas de cuatro a seis, es decir, se incluyen también los espesores de las dos capas como variables incógnita a ser recuperadas. Es bien sabido que los espesores de las capas varían de una muestra a otra, y aún en diferentes regiones dentro de la misma muestra, y por lo tanto no es posible conocer verdaderamente los espesores por debajo del foco iluminado durante la medición de la reflectancia [60]. Por lo tanto, la inclusión de los espesores como variables incógnita resulta ser una alternativa natural para mejorar la búsqueda de los valores correctos de las constantes dieléctricas.

Teniendo en cuenta que en el caso de cuatro incógnitas la estrategia E y el PSO resultaron ser más exitosos que la estrategia NE para la recuperación de las constantes dieléctricas, este estudio ampliado se restringirá a estas técnicas. Para estos cálculos se fijó el número de estados iniciales (realizaciones) en 50, y el resto de los parámetros fueron los mismos que los usados en el experimento precedente, a excepción de los espesores de las capas, que en este caso son variables.

La diferencia sustancial entre los resultados obtenidos para cuatro y para seis incógnitas es que en este último caso, ambos esquemas de inversión dan soluciones diferentes para cada una de las realizaciones consideradas, es decir, que todos los conjuntos de seis variables recuperadas son esencialmente diferentes entre sí. Por consiguiente, cada uno de los conjuntos de soluciones dan diferentes valores de la función de ajuste. Como el número de incógnitas es mayor que en el experimento anterior, la topología de la función de ajuste se vuelve más compleja, y esto produce que los algoritmos tengan una probabilidad mayor de converger a un óptimo local (solución no deseada) en lugar de converger a

un óptimo global (solución buscada). Por lo tanto, dado que en los esquemas de inversión propuestos la medida de la proximidad a los valores objetivo está dada por el funcional de la ecuación (5.1), el conjunto de valores que minimizan la función de ajuste resulta ser el mejor candidato para los parámetros buscados.

	Muestra verde			Muestra dorada		
	E (6vo)	PSO (6vo)	E/PSO (4vo)	EL (6vo)	PSO (6vo)	E/PSO (4vo)
$\Re\{\epsilon_1\}$	2.734932	2.817672	3.1635	2.27506	2.2664	2.5872
$\Im\{\epsilon_1\}$	0.092624	0.124246	0.2492	0.21442	0.2049	0.2254
$\Re\{\epsilon_2\}$	3.143568	3.168361	3.4221	2.575755	2.569095	2.854
$\Im\{\epsilon_2\}$	0.422926	0.21372	0.074	0.189508	0.195688	0.169
d_1 (nm)	139.30	115.51	–	98.87	102.04	–
d_2 (nm)	36.50	56.74	–	108.10	105.49	–
f	0.154	0.158	0.21	0.031	0.031	0.08

Cuadro 6.5: Valores recuperados de las partes real e imaginaria de las constantes dieléctricas y los espesores de las capas (d_1 y d_2), y los correspondientes valores de la función de ajuste (f) utilizando las estrategias E y PSO, para las muestras verde y dorada del escarabajo *Ceroglossus suturalis*.

En el Cuadro 6.5 se muestra el mejor conjunto de variables (partes real e imaginaria de las constantes dieléctricas y ambos espesores) obtenidas para las muestras verde y dorada usando las estrategias E y PSO, y los valores correspondientes de la función de ajuste (f). Para facilitar la comparación, también se incluye en el cuadro la constante dieléctrica recuperada considerando sólo cuatro incógnitas (primer experimento).

La primera indicación de que las nuevas soluciones son mejores que las previas, es la disminución del valor de la función de ajuste. En todos los casos el valor de f disminuyó en comparación con el experimento de las cuatro variables objeto, y esto confirma que introduciendo en el modelo electromagnético el nuevo conjunto de valores recuperados, incluyendo los espesores de las capas, la función objetivo se reproduce mejor. Otro resul-

tado alentador es el hecho de que el mejor conjunto obtenido por medio de los algoritmos E y PSO, que son estrategias completamente diferentes e independientes, aportan valores muy similares de las constantes dieléctricas. El hecho de que ambos esquemas converjan a resultados cercanos brinda más confianza a las soluciones, y sugiere que son adecuados para este análisis. También puede notarse que las partes reales de las constantes dieléctricas son menores que las obtenidas en el caso de cuatro variables incógnitas, y están más cercanas a los valores de las constantes dieléctricas recientemente reportadas para sistemas biológicos similares [35,37]. En consecuencia, los valores recuperados de los espesores parecen aproximarse mejor a los valores reales involucrados en la medición de la reflectancia de la muestra (zona iluminada) que los usados en el primer experimento (valores fijos obtenidos de diferentes imágenes del microscopio). Esto también evidencia que los valores de los espesores usados en la recuperación de las cuatro variables incógnita condicionan fuertemente los valores de las constantes dieléctricas recuperadas, y entonces, el experimento de las seis incógnitas parece ser más apropiado para encarar el estudio de esta estructura de multicapas. En la Fig. 6.7 también se grafica la reflectancia calculada introduciendo en el modelo electromagnético las constantes dieléctricas y los espesores recuperados en este segundo experimento, para la muestra verde (Fig. 6.7(a)) y la dorada (Fig. 6.7(b)). Es evidente que las curvas obtenidas constituyen una mejor aproximación al espectro objetivo.

Este resultado sugiere que el uso de estrategias de optimización como la E y el PSO para la recuperación de las constantes dieléctricas de estructuras biológicas es una tarea muy delicada que debe llevarse a cabo cuidadosamente, y en el caso de estructuras de multicapas, la inclusión de los espesores de las capas como incógnita mejora en forma significativa la calidad de la solución.

Con el fin de explorar el comportamiento del conjunto de valores recuperados desde el punto de vista de la iridiscencia que exhiben las muestras del escarabajo estudiadas, en la Fig. 6.8 se grafica la reflectancia y la absorbancia en función de la longitud de onda para diferentes ángulos de incidencia y para ambas muestras consideradas. Tal como se esperaba, a medida que aumenta el ángulo de incidencia, el pico de reflectancia se

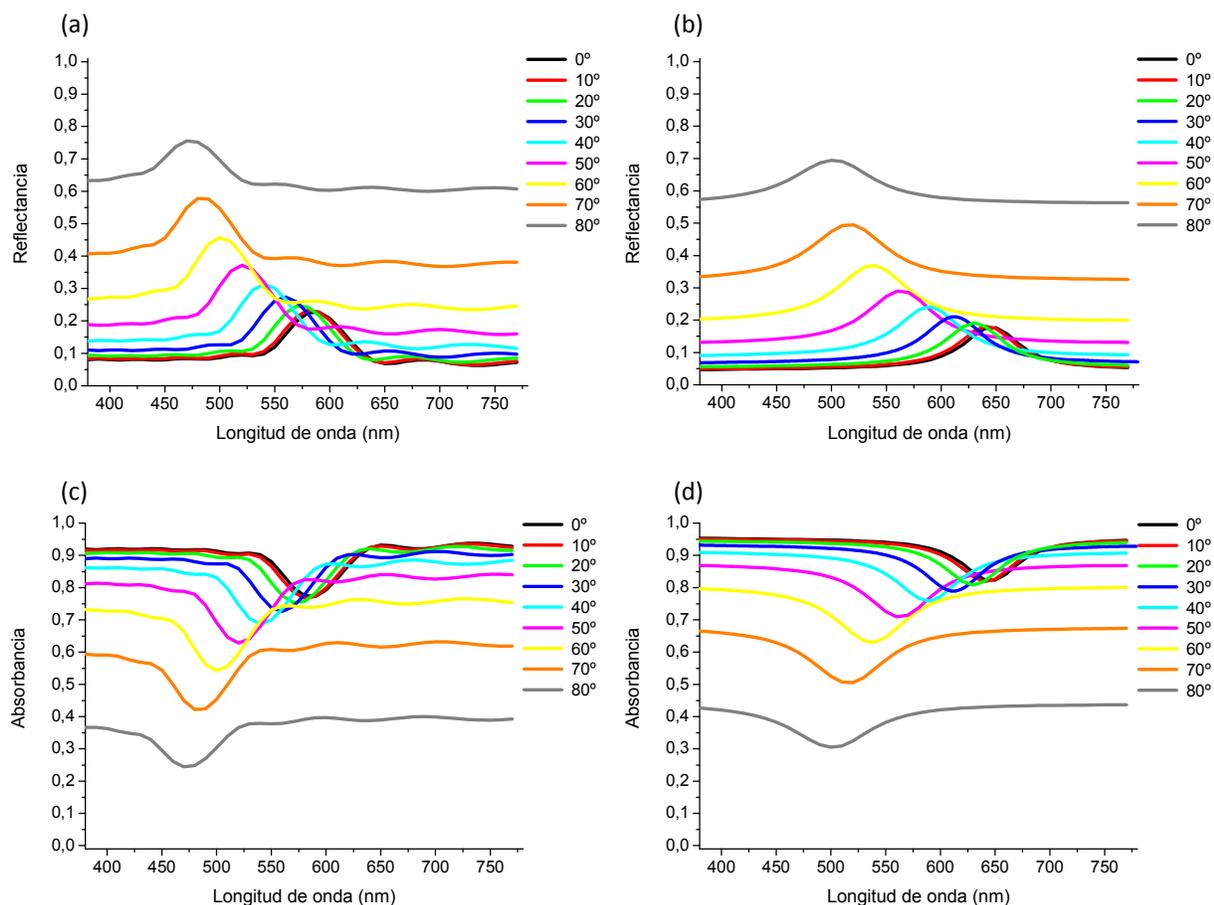


Figura 6.8: Espectros de reflectancia y absorbancia calculados utilizando los parámetros recuperados mediante el algoritmo PSO para diferentes ángulos de incidencia y polarización s . (a) Reflectancia de la muestra verde; (b) reflectancia de la muestra dorada; (c) absorbancia de la muestra verde; (d) absorbancia de la muestra dorada.

desplaza hacia longitudes de onda menores y también se observa un incremento general de los valores de intensidad reflejada. El pico de reflectancia es más suave para la muestra dorada que para la verde, y este comportamiento ya ha sido reportado en escarabajos similares que presentan regiones de tonos verdes y púrpuras en sus élitros [60]. En el caso de la muestra verde (Fig. 6.8 (a)), la estructura de multicapas produce un pico de reflectancia de casi un 23% en 590 nm para incidencia normal, y a medida que el ángulo aumenta el pico se mueve hacia longitudes de onda menores, de manera tal que para 60° se encuentra en 500 nm alcanzando un valor de reflectancia de un 46%. Para el caso

del escarabajo dorado (Fig. 6.8 (b)), el pico de reflectancia, que es de casi un 18 % para incidencia normal y aparece en 650 nm, también se corre hacia longitudes de onda menores cuando el ángulo de incidencia aumenta.

Tal como se expresó en el Capítulo 4, los escarabajos *Ceroglossus suturalis* exhiben color iridiscente, es decir, que el tono observado va cambiando a medida que el ángulo de observación varía desde la dirección normal hasta rasante. Justamente, el cambio de la ubicación espectral del pico de reflectancia con el ángulo de incidencia es una evidencia del efecto de iridiscencia observado en las muestras. Por lo tanto, resulta interesante investigar si los parámetros recuperados dan cuenta de tal fenómeno, y en particular, de los colores observados en la especie bajo estudio. Teniendo en cuenta los espectros de reflectancia de la Fig. 6.8 (a) y (b), se calcularon las coordenadas de cromaticidad obtenidas como se describe en el Capítulo 4, para el iluminante A estándar de la CIE y para un campo visual de 10° . En la Fig. 6.9 se grafican dichas coordenadas en los respectivos diagramas de cromaticidad para cada una de las muestras, para varios ángulos de incidencia. En ambos casos puede observarse que a medida que aumenta el ángulo de incidencia, la posición del color en el diagrama describe una trayectoria curva en sentido antihorario. Sin embargo, en el caso del espécimen verde el color alcanza la zona verde del diagrama, mientras que para la muestra dorada siempre permanece dentro de la región marrón-anaranjada. Es importante resaltar que el diagrama de cromaticidad es un gráfico 2D que no permite representar el brillo real del color. El brillo es tenido en cuenta por la coordenada z , que no se muestra en este tipo de gráficos.

Usando las coordenadas de cromaticidad x e y dadas por la ecuación 4.1 del Capítulo 4, se obtuvieron las correspondientes coordenadas RGB, que permiten visualizar la secuencia de colores para cada escarabajo al variar el ángulo de incidencia. Los colores obtenidos se muestran en los cuadros debajo de cada uno de los diagramas de cromaticidad de la Fig. 6.9. Es evidente que el color cambia con el ángulo de incidencia para ambas muestras. El escarabajo verde exhibe una tonalidad verde hasta los 50° , y luego cambia a anaranjada. La muestra dorada también preserva la coloración marrón hasta un ángulo de incidencia de 50° .

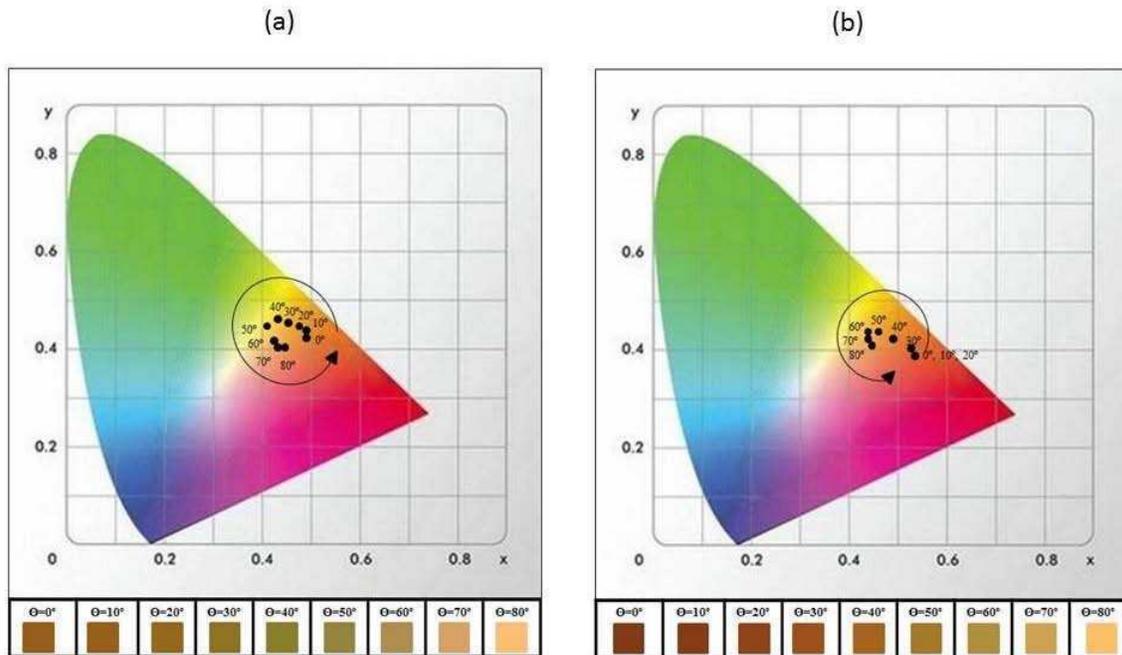


Figura 6.9: Coordenadas de color obtenidas a partir de los espectros de reflectancia calculados utilizando los parámetros de la estructura de multicapas recuperados mediante las estrategias de optimización, para diferentes ángulos de incidencia. (a) Muestra verde; (b) muestra dorada.

Resumiendo, en este capítulo se mostraron varios ejemplos que ilustran el desempeño de las estrategias de optimización propuestas para la recuperación de parámetros relevantes de estructuras biológicas. En particular, se estudió el caso de dos muestras de escarabajos de la especie *Ceroglossus suturalis* de diferentes colores, los cuales exhiben color iridiscente debido a la estructura periódica de multicapas presente en su cutícula. Los resultados obtenidos han demostrado que tanto las estrategias evolutivas, en sus variantes elitista (E) y no elitista (NE), como el método de optimización de enjambre de partículas (PSO) son eficientes para recuperar los valores de las constantes dieléctricas de los tejidos biológicos involucrados. En particular, las estrategias E y PSO han demostrado ser mejores que la NE para este caso. Los valores de las constantes dieléctricas obtenidos reproducen muy bien los espectros de reflectancia medidos para ambas muestras, y dan cuenta de su color iridiscente.

Sin embargo, hay varios aspectos que deben ser tomados en cuenta cuando se aplican estas herramientas para obtener los valores de parámetros que no son conocidos con precisión en las estructuras biológicas. Las estructuras fotónicas encontradas en la naturaleza son esencialmente complejas y tridimensionales. Si bien los coleópteros tienen en su exocutícula una de las estructuras fotónicas más simples encontradas en la naturaleza, ya que está compuesta por multicapas alternadas de diferentes materiales, éstas son muy difíciles de caracterizar, no sólo debido al alto grado de precisión de los cortes que se requieren para obtener imágenes de microscopía electrónica (por ejemplo, los espesores de las capas son alterados si el corte no es perfectamente perpendicular a la superficie del caparazón), sino también debido a la variación de la estructura en diferentes muestras o aún en diferentes secciones de la misma muestra. Si bien el promedio de los parámetros, como los espesores de las capas, puede ser estimado con diferentes imágenes, no es posible asegurar con precisión los parámetros de la muestra sobre la cual se realiza la medida de reflectancia.

Otro aspecto importante que debe tenerse en cuenta a la hora de plantear un algoritmo de inversión, es la capacidad del modelo electromagnético propuesto para reproducir la respuesta de los sistemas naturales en estudio, ya que generalmente se considera ideal en uno o varios aspectos. En este ejemplo se consideró como modelo una estructura ideal perfectamente periódica de multicapas planas. Sin embargo, la periodicidad perfecta o el cambio abrupto en el índice de refracción entre capas adyacentes puede resultar en el fracaso de las técnicas de optimización para encontrar la solución buscada, es decir, en la imposibilidad de encontrar valores razonables de las constantes dieléctricas. Por lo tanto, es importante remarcar que el modelo electromagnético utilizado como parte de los algoritmos de optimización podría mejorarse incluyendo otras características del sistema natural real, tales como la rugosidad de la superficie, la curvatura, y la inhomogeneidad en los espesores de las capas a lo largo del apilamiento de multicapas. También se podrían obtener mejores estimaciones de los índices incluyendo la constante dieléctrica del sustrato como una más de las variables a determinar. Es de esperar que la sensibilidad de los valores recuperados a las suposiciones del modelo vaya disminuyendo a medida que la descripción

del sistema natural se hace más precisa.

Capítulo 7

Conclusiones y perspectivas

En esta Tesis se investigó la respuesta electromagnética de escarabajos endémicos de Latinoamérica que exhiben características de color estructural. Se identificaron varias especies, *Ceroglossus suturalis*, *Desmonota variolosa*, *Entimus imperialis* y *Megaphanaeus bonariensis*, y se realizaron sus respectivas caracterizaciones por medio de diferentes técnicas de microscopía, empleándose un microscopio óptico y microscopios electrónicos de barrido y de transmisión. En particular, el análisis y la caracterización de las muestras de los escarabajos de la especie *Ceroglossus suturalis* revelaron la estructura periódica de multicapas alternadas que compone la cutícula, la cual es responsable de la generación del color metálico y de la iridiscencia.

En general, el modelado de estructuras naturales es una tarea compleja debido a la irregularidad de las muestras, tanto en su topografía (alvéolos, curvatura global, etc.) como en la geometría interna (espesores variables, variaciones locales de las formas, inclusiones, etc.). Además, los materiales que las constituyen dependen de la especie, y en algunos casos contienen pigmentos absorbentes. Esto dificulta también la determinación precisa de la estructura a modelar, y en particular, la obtención de las constantes dieléctricas a través de técnicas de medición directa, y es por eso que generalmente sus valores no se conocen con exactitud. Por consiguiente, la determinación de las constantes dieléctricas de tejidos biológicos constituye un desafío en sí mismo, y el desarrollo de algoritmos que permitan lograr este objetivo a partir de medidas de reflectancia de las muestras fue uno

de los principales objetivos de este trabajo de Tesis.

Para poder llevarlo a cabo, el primer paso fundamental fue lograr mediciones confiables de la reflectancia de las estructuras biológicas estudiadas. Se ensayaron diferentes montajes experimentales y se pudieron obtener espectros de reflectancia de las muestras para diferentes ángulos de incidencia y para diferentes modos de polarización. Una vez logrado este objetivo, fue posible pasar a la etapa siguiente del trabajo, es decir, a la estimación de los parámetros relevantes de estas microestructuras.

En este trabajo se aplicaron por primera vez diferentes estrategias de optimización para el estudio de microestructuras naturales. En particular, se propuso estimar las constantes dieléctricas de los materiales que componen las capas presentes en la cutícula del escarabajo *Ceroglossus suturalis*, así como también sus respectivos espesores. Para tal fin, se usaron los principios operacionales de dos técnicas bio-inspiradas diferentes: las estrategias evolutivas, a través de sus variantes elitista y no elitista, y la optimización del enjambre de partículas. Ambas incorporaron el método 4x4 basado en un modelo de multicapas planas para la resolución del problema directo. En primer lugar, se analizó la aplicabilidad de estos métodos de recuperación a estructuras de multicapas, utilizando como curva objetivo el espectro de reflectancia calculado mediante un método electromagnético, para luego aplicarlos a las mediciones de reflectancia experimentales de las muestras bajo estudio.

Para ir estudiando gradualmente la capacidad de las estrategias de optimización para recuperar los parámetros relevantes de estructuras biológicas, se propusieron diferentes ejemplos. En el primero de ellos, el objetivo fue recuperar las partes real e imaginaria de las constantes dieléctricas de los dos materiales que componen el sistema de multicapas de la muestra verde del escarabajo *Ceroglossus suturalis*, es decir, que se propuso recuperar cuatro incógnitas simultáneamente. Los valores de los espesores de las capas se tomaron como dato conocido a partir del análisis de las imágenes de microscopía. Se consideró como modelo una estructura periódica de multicapas y se investigó y comparó el desempeño de las tres estrategias de optimización. Se mostró que las tres técnicas bio-inspiradas exploradas en este estudio proveen una muy buena estimación de las cuatro variables

objeto que se buscaban.

El segundo ejemplo consistió en la estimación, a través de las técnicas de optimización heurística implementadas, de las constantes dieléctricas complejas de dos ejemplares de *Ceroglossus suturalis* de diferentes coloraciones, uno verde y otro dorado. En un primer experimento numérico, el número total de capas y los espesores de las mismas fueron fijados a partir de la información provista por la caracterización de cada una de las muestras. Pero dada la variación que sufren estos parámetros entre muestras, y aún a lo largo de una misma muestra, en un segundo experimento numérico se incluyeron también los espesores de las capas como variables a ser determinadas, dando un total de seis variables incógnita en lugar de cuatro. Los valores de las constantes dieléctricas hallados se encuentran dentro de los intervalos de valores reportados en la literatura para los materiales encontrados en las multicapas de especies de escarabajos similares. Estos valores fueron luego introducidos como datos de entrada en el modelo de multicapas planas para computar la respuesta electromagnética de la estructura. Se observó que este nuevo análisis mejora el desempeño de los métodos de recuperación propuestos y aportó soluciones más precisas al problema, ya que con los parámetros recuperados el modelo electromagnético reproduce muy bien tanto la intensidad del pico de reflectancia como su posición espectral. De esta manera, es posible afirmar que el modelo es capaz de explicar el mecanismo de generación de color estructural en las muestras biológicas analizadas.

También se realizó un estudio del efecto visual de iridiscencia en los dos ejemplares estudiados, introduciendo en el cálculo numérico los parámetros de las seis variables objeto recuperados previamente. Se obtuvieron los espectros de reflectancia para diferentes ángulos de incidencia y se verificó que el pico de reflectancia se desplaza hacia longitudes de onda menores a medida que el ángulo de incidencia aumenta. A partir de estas curvas se calcularon y se graficaron las coordenadas de color para cada caso, lo cual permitió concluir que la interferencia generada en las multicapas de la cutícula es el mecanismo subyacente responsable de la iridiscencia observada. En conclusión, este estudio revela más detalles acerca de la generación del color estructural en los escarabajos *Ceroglossus suturalis*, y también provee nuevas e innovadoras herramientas para el análisis de estructuras

fotónicas naturales.

Es importante destacar que la elección de los ejemplos ilustrativos en este trabajo de investigación no es restrictiva, ya que las estrategias de optimización aplicadas aquí podrían también aplicarse para recuperar los parámetros relevantes de microestructuras biológicas más complejas, siempre y cuando se utilice un modelo electromagnético apropiado. Sin ir más lejos, es sabido que las capas de medios estratificadas naturales no son perfectamente planas y ni siquiera sus espesores son constantes, sino que poseen una rugosidad aleatoria. Además, la distribución de los espesores de las capas no es perfectamente periódica, y entonces, flexibilizar estas hipótesis (periodicidad perfecta, capas planas, espesores constantes a lo largo de cada capa) también contribuiría a una mejor representación del sistema natural, lo cual, a su vez, daría lugar a una estimación más precisa de los parámetros desconocidos. Para ello sería necesario el empleo de modelos electromagnéticos más complejos. También podrían aplicarse las herramientas propuestas a otro tipo de estructuras naturales que presenten efectos electromagnéticos basados en otros fenómenos ópticos como difracción, scattering, etc. Este hecho es de gran relevancia a la hora de evaluar el posible alcance de los algoritmos implementados.

Si bien se han obtenido resultados muy prometedores utilizando las herramientas de inversión heurística para recuperar parámetros de estructuras fotónicas naturales, aún quedan varios aspectos de los esquemas de inversión propuestos que deben ser mejorados para garantizar, en todos los casos, la unicidad de la solución y la convergencia a un óptimo global. A veces, especialmente cuando se utiliza información proveniente de un espectro sin tener en cuenta la fase, como es el caso de la reflectancia de cada una de las muestras empleadas en este trabajo, es probable obtener una solución que satisface las restricciones de optimización, pero que tiene características geométricas o de materiales diferentes a las de la estructura que ha generado el espectro original. Es decir, que diferentes estructuras generan el mismo patrón de dispersión o el mismo espectro. Esta falta de unicidad indeseable es una consecuencia del hecho de que ningún método de optimización puede garantizar la convergencia hacia el óptimo global. Sin embargo, dependiendo de la clase de problema inverso que uno esté resolviendo, esta situación no es necesariamente

indeseable. Por ejemplo, si el objetivo es diseñar un material artificial para imitar el comportamiento de un sistema natural y la solución obtenida a partir del procedimiento de inversión es factible y se encuentra dentro del espacio de búsqueda, podría ser tomada como una solución alternativa al problema. Sin embargo, si el objetivo es recuperar los parámetros experimentales, una manera de hacer frente a esta falta de unicidad podría ser la inclusión de nuevas limitaciones en el espacio de búsqueda y/o la redefinición de la función de ajuste, a fin de proporcionarle más información al procedimiento de inversión incluyendo, por ejemplo, ambas polarizaciones, varios ángulos de incidencia, etc., lo cual podría guiar a la cercanía del óptimo buscado. Entonces, un óptimo local podría ser empleado para refinar la solución encontrada y así perfeccionar la búsqueda de la solución.

La naturaleza iterativa de estas estrategias conduce a otro de los aspectos importantes que debe ser tenido en cuenta: el desempeño de cada estrategia con respecto al tiempo de cómputo, ya que el número de realizaciones y de generaciones debe ajustarse para minimizar el tiempo requerido para converger a la solución correcta. Una alternativa posible es el empleo de la predicción del valor de la función de ajuste, que permitiría, además, disminuir el tiempo de búsqueda y así evitar evaluaciones costosas del modelo electromagnético [73]. También se podrían implementar los métodos de multi-arranque, que funcionan muy bien en los procedimientos iterativos, los cuales serían una alternativa a los métodos evolutivos disponibles [74].

Los primeros intentos para determinar la constante dieléctrica de estructuras multicapas de escarabajos se basaron en la suposición de que los medios son no dispersivos en las longitudes de onda de interés [35]. Más recientemente, se ha demostrado que la ecuación de Cauchy podría ser utilizada para describir la parte real del índice de refracción como función de la frecuencia, mientras que una función exponencial podría ser empleada para el ajuste de la parte imaginaria [37]. Sin embargo, tales funciones no aportan ninguna idea acerca de cómo se podrían construir estructuras artificiales con las mismas propiedades ópticas. Por lo tanto, resulta interesante explorar más a fondo la posibilidad de incluir dentro del ciclo de optimización una descripción de la permitividad dieléctrica de las capas más realista y útil para la recuperación de parámetros relevantes de estructuras biológicas.

La meta no es en este caso obtener la función dieléctrica directamente del espectro, sino optimizar los parámetros del modelo de la función dieléctrica. Esto abriría el camino para un nuevo esquema de inversión basado en la recuperación de los parámetros del modelo para todas las longitudes de onda simultáneamente.

Por otro lado, es bien sabido que las estructuras naturales presentan propiedades anisótropas. Por ejemplo, los escarabajos *Plusiotis* tienen la capacidad de reflejar selectivamente la luz circularmente polarizada. El élitro de estos escarabajos contiene quitina y posee un arreglo análogo a la microestructura helicoidal de un cristal líquido colestérico, que está compuesto por moléculas en forma de cilindros parcialmente ordenados [30, 38, 75]. Por lo tanto, la inclusión de relaciones constitutivas más generales para los materiales involucrados podría contribuir al conocimiento de las propiedades ópticas de materiales naturales. Además, estos medios son interesantes para el control de la respuesta electromagnética debido a su capacidad para producir cambios en la polarización de la luz. En los últimos años, se han hallado numerosas aplicaciones de los materiales ópticamente anisótropos, incluyendo su uso como filtros birrefringentes, filtros electro-ópticos sintonizables, dispositivos de grabación magneto-ópticos, entre otros. Sería interesante entonces aplicar las técnicas estocásticas empleadas en este trabajo al diseño y optimización de dispositivos fotónicos que involucren materiales anisótropos. En síntesis, el trabajo presentado en esta Tesis constituye un avance tanto para el estudio de las estructuras fotónicas naturales como para el aprovechamiento de dichas estructuras como inspiración para el diseño de dispositivos artificiales con fines específicos.

Aportes de la Tesis

Como fruto de los estudios realizados en esta Tesis, se han publicado cuatro artículos en revistas internacionales:

- A. Luna, D. Skigin, M. Inchaussandague and Arturo Roig Alsina, “Structural color in beetles of South America”, Proc. SPIE **7782**, 778205 (2010).

- D. Macías, A. Luna, D. C. Skigin, A. Vial and M. Inchaussandague, “Retrieval of the relevant parameters of natural multilayer systems,” in *Proceedings of the Advanced Electromagnetics Symposium 2012 (AES '12)*, Abril 16 - 19 2012, París, Francia, p. 335 – 340.
- D. Macías, A. Luna, D. C. Skigin, M. Inchaussandague, A. Vial, and D. Schinca, “Retrieval of relevant parameters of natural multilayer systems by means of bio-inspired optimization strategies,” *Appl. Opt.* **52** 2511 – 2520 (2013).
- A. Luna, D. Macías, D. Skigin, M. Inchaussandague, D. Schinca, M. Gigli, and A. Vial, “Characterization of the iridescence-causing multilayer structure of the *Ceroglossus suturalis* beetle using bio-inspired optimization strategies,” *Opt. Express* **21** 19189 – 19201 (2013).

Los últimos dos trabajos han sido seleccionados por el Virtual Journal for Biomedical Optics.

También se han presentado en forma oral algunos de los resultados obtenidos en los siguientes congresos internacionales:

- “Retrieval of the relevant parameters of natural multilayer systems,” D. Macías, A. Luna, D. C. Skigin, A. Vial and M. Inchaussandague, *Advanced Electromagnetics Symposium 2012*, 16 de abril de 2012, París, Francia;
- “Structural color,” Lecture III (Part I) and IV (Part II), D. C. Skigin, M. Inchaussandague, A. Luna, y A. Dolinko, *Congreso ICAMP11 - Uruguay - Argentina* (2011);
- “Structural color in beetles of South America,” A. Luna, D. C. Skigin, M. Inchaussandague, A. Roig Alsina, *Congreso de la SPIE Optics + Photonics 2010*, “The Nature of Light: Light in Nature III,” 2 de Agosto de 2010, San Diego, USA;

y en un taller nacional:

- “Microestructuras fotónicas en escarabajos,” A. Luna, D. C. Skigin, M. Inchaussandague, A. Roig Alsina; V. Taller de Óptica y Fotofísica (V TOPFOT), Fotónica y nuevos materiales, 19 y 20 de noviembre de 2009, Mar del Plata, Argentina.

Además se han presentado pósters en los siguientes encuentros nacionales:

- “Comparación de color estructural entre dos ejemplares de *Ceroglossus suturalis*,” A. Luna, D. C. Skigin, M. Inchaussandague, A. Roig Alsina, 95 Reunión Nacional de Física, Asociación de Física Argentina, 28 de septiembre al 1 de octubre de 2010; Malargüe, Provincia de Mendoza, Argentina.
- “Microestructuras fotónicas en escarabajos,” A. Luna, D. C. Skigin, M. Inchaussandague, A. Roig Alsina, 94 Reunión Nacional de Física, Asociación de Física Argentina, septiembre de 2009, Rosario, Provincia de Santa Fe, Argentina.

Por otra parte, en este trabajo de investigación se han aplicado por primera vez diferentes estrategias de optimización heurística a sistemas naturales, específicamente al caso del escarabajo *Ceroglossus suturalis*. Estas herramientas permitieron recuperar con un alto grado de confianza los parámetros más relevantes de la estructura biológica estudiada, como son los espesores de las capas y las constantes dieléctricas de los materiales que constituyen sus élitros. Esto abre las puertas a numerosas aplicaciones de este método para dilucidar los parámetros relevantes de las complejas estructuras biológicas. Es importante destacar que el conocimiento y la información brindada a través de estos algoritmos son también de gran interés por entomólogos, ya que brindan nuevos datos para complementar la clasificación de las especies.

A nivel práctico, esta Tesis también ha dado importantes aportes al Grupo de Electromagnetismo Aplicado de la FCEyN - UBA, en el cual llevé a cabo este trabajo de investigación, pues para poder realizar las mediciones sobre estructuras biológicas se inició el armado de un laboratorio nuevo dentro de la Facultad, el cual fue equipado con microscopios ópticos (uno de ellos con cámara digital incorporada), con un espectrómetro

acoplado a fibra óptica, y otros dispositivos ópticos. Como consecuencia, se han abierto nuevas líneas de investigación experimentales para un grupo que históricamente era puramente teórico, y ya se han conformado colaboraciones con diferentes grupos de investigación de biólogos.

Apéndice A

Procesado de imágenes y caracterización estructural

Los resultados de los parámetros geométricos de la topografía y de la estructura interna de las especies *Desmonota variolosa*, *Entimus imperialis* y *Megaphanaeus bonariensis* se muestran en las Figuras A.1 - A.4. La descripción detallada del procesamiento y del análisis de todas las imágenes digitales de estas especies adquiridas con un microscopio electrónico de barrido y con uno de transmisión es análoga a la que se especifica en el Capítulo 2 para la especie *Ceroglossus suturalis*.

Como se muestra en la Figura A.1, la topografía de los élitros del escarabajo *Desmonota variolosa* consta de alvéolos de aproximadamente 400 μm de diámetro, distribuidos en forma uniforme y regular. Además en las micrografías de la sección transversal de su ala se observa un arreglo periódico de bicapas superficiales cuyo espesor es de cientos de nanómetros y que conforman 22 períodos.

En el caso del escarabajo de la especie *Entimus imperialis*, los cortes transversales que se observan en la Figura A.2 revelan la existencia de dos conjuntos de multicapas cuya cantidad de períodos es aproximadamente igual. Sin embargo, el primero de los sistemas posee capas de espesores del orden de las decenas y centenas de nanómetros, mientras que el conjunto de multicapas más profundo tiene aproximadamente 34 períodos, siendo cada

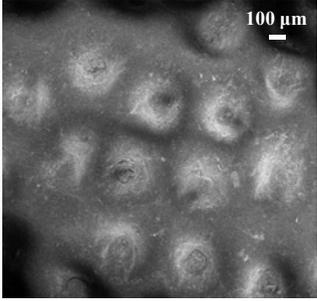
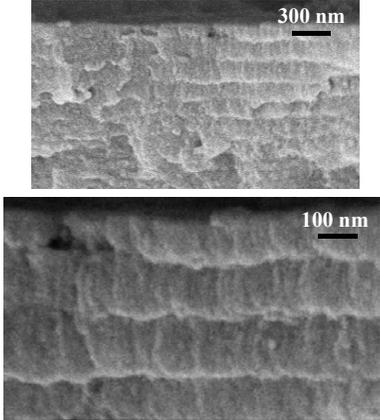
CORTE ELEGIDO del <i>Desmonota variolosa</i> 	IMAGENES REFERENCIALES	ESPESORES (nm)
Alvéolos		Diámetro de un alvéolo: 404100 ± 11100
Multicapas superiores (bicapa compuesta por 22 periodos)		e_1 : espesor de las capas “negras”: 40 ± 14 e_2 : espesor de las capas “grises”: 121 ± 2

Figura A.1: Síntesis de los parámetros medidos para el caparazón del escarabajo *Desmonota variolosa*.

uno de sus espesores de un orden superior al sistema de multicapas más superficial.

La topografía de esta especie consta no sólo de alvéolos de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de diámetro (Figura A.3 e) - f)), sino que además se observan, como se ve en la Figura A.3 a)- b), pequeños huecos rodeados por escamas cuya estructura es laminar (Figura (A.3) c) - d)).

Finalmente, en la última de las especies estudiadas, el escarabajo *Megaphanaeus bonariensis* (Figura A.4), la parte superior del caparazón posee tanto micro-alvéolos, cuyo diámetro alcanza los $16 \mu\text{m}$, como alvéolos, siendo en este caso su diámetro de aproxi-

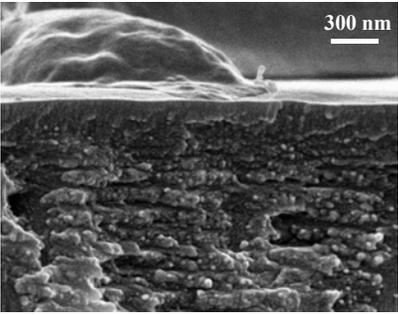
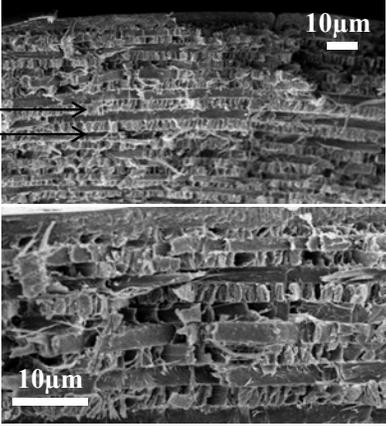
<p>CORTE ELEGIDO del <i>Entimus imperialis</i></p> 	<p>IMAGENES REFERENCIALES</p>	<p>ESPESORES (nm)</p>
<p>Espesor de las multicapas superficiales (bicapa compuesta por 32 períodos)</p>		<p>e_1: espesor de las capas “negras”: 45 ± 5 e_2: espesor de las capas “grises”: 112 ± 22</p>
<p>Espesor de las multicapas más profundas (bicapa compuesta por 34 períodos)</p>		<p>e_3: 2230 ± 80 e_4: 1030 ± 35</p>

Figura A.2: Síntesis de los parámetros medidos para el caparazón del escarabajo *Entimus imperialis*.

madamente $130 \mu\text{m}$. Esta estructura particular cubre todas las alas del escarabajo y se encuentran distribuidas en forma uniforme. Los períodos de las multicapas superiores, que son aproximadamente 132, superan los cientos de nanómetros cada uno.

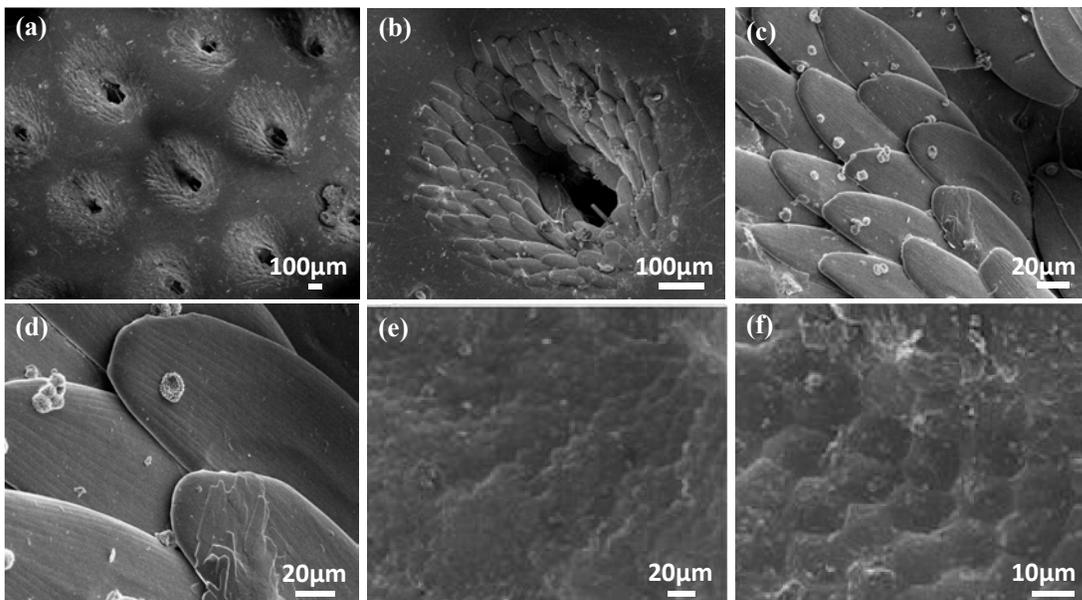


Figura A.3: Imágenes SEM de la topografía del *Entimus imperialis*. a) El caparazón está cubierto por huecos con escamas. b) Detalle de un hueco y de sus respectivas escamas. c) Imagen de un conjunto de escamas. d) Escamas con estructura laminar. e)- f) Vista de los alvéolos.

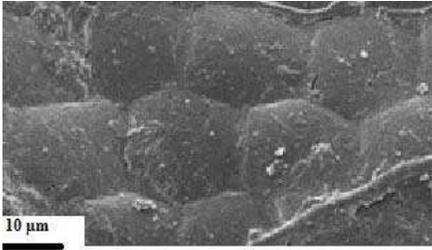
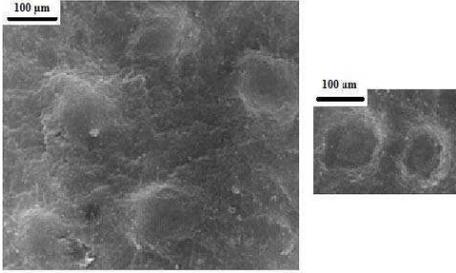
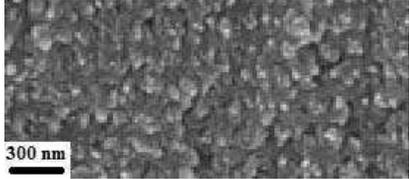
<p>CORTE ELEGIDO del <i>Megaphanaeus bonariensis</i></p> 	<p>IMAGENES REFERENCIALES</p>	<p>ESPEORES (nm)</p>
<p>Micro-alvéolos del caparazón</p>		<p>Diámetro de un micro-alvéolo: 16250 ± 450</p>
<p>Alvéolos del caparazón</p>		<p>Diámetro de un alvéolo: 128100 ± 3100</p>
<p>Multicapas superiores (bicapa compuesta por 132 periodos)</p>		<p>e_1: espesor de las capas “negras”: 41 ± 1 e_2: espesor de las capas “grises”: 92 ± 2</p>

Figura A.4: Síntesis de los parámetros medidos para el caparazón del escarabajo *Megaphanaeus bonariensis*.

Apéndice B

Microscopios Electrónicos de Barrido

Microscopio Electrónico Zeiss DSM 982 Gemini FE-SEM:

Las características del Microscopio Electrónico de Barrido FE-SEM (Field Emission, Scanning Electron Microscope) se pueden observar en el Cuadro B.1.

<i>Modelo</i>	DSM 982 GEMINI
<i>Cañón de electrones</i>	Cátodo de Emisión de Campo por efecto Schottky
<i>Pot. Aceleración</i>	200 V a 30 KeV
<i>Aumentos</i>	20 a 800000
<i>Resolución máxima</i>	a 20 KeV 1.2 nm (distancia de trabajo = 6 mm) a 1 KeV 2.8 nm (distancia de trabajo = 3 mm)

Cuadro B.1: *Características principales del microscopio electrónico de barrido.*

El FE-SEM incorpora un cátodo de efecto campo tipo Schottky que consta de un monocristal de wolframio cuya cara $\langle 100 \rangle$ (en la que se produce la emisión de electrones), al calentarse se recubre de una capa de ZrO. Esta fuente es la que presenta mayor estabilidad dentro de la emisión de campo, caracterizándose por su gran resolución y por su capacidad para trabajar a grandes aumentos incluso a bajos potenciales de aceleración. La configuración de este FE-SEM incluye dos detectores de electrones secundarios, uno

en la cámara y otro sobre la lente objetivo, C. Z. GEMINI, sistema dual. Para la obtención de imágenes de electrones retrodispersados se utiliza un detector de electrones retrodispersados retráctil K+E, que permite formar imágenes a partir de 2 keV. El sistema también cuenta con una cámara de infrarrojos, que permite visualizar en un monitor, los movimientos de la muestra en el interior de la cámara porta-muestras. El sistema de vacío está compuesto por bombas turbomoleculares para el vacío previo y de trabajo en la cámara; y de una bomba iónica para mantener el vacío en la zona del cañón de electrones en el rango de 10 – 9 hPa. Para el microanálisis de las muestras se utiliza un detector de rayos X de dispersión de energías. Está equipado con un cristal de germanio (10 mm² de área efectiva) y una ventana ultra delgada, ATW2, fabricada por un polímero de plástico de 0.4 μm de espesor. Esta configuración permite la detección simultánea de cualquier elemento con número atómico mayor a 4 (a partir del boro) con una resolución máxima mejor de 115 eV para la línea Ka del Mn, a 5.90 keV y mejor de 65 eV para la línea Ka del F, a 667 eV. Los sistemas de microanálisis (análisis químico de imágenes) están controlados por el sistema microanizador marca OXFORD, modelo LINK ISIS L 300.

Microscopio Electrónico Zeiss Supra 40 FESEM:

<i>Modelo</i>	Supra 40 FESEM
<i>Pot. Aceleración</i>	0.1 a 30 KeV
<i>Aumentos</i>	12 a 900000
<i>Resolución máxima</i>	a 15 KeV 1.3 nm a 1 KeV 2.1 nm a 0.2 KeV 5.0 nm

Cuadro B.2: *Características principales del microscopio electrónico de barrido.*

El modelo SUPRA 40 cuenta con un cañón de electrones por emisión de campo que ofrece brillo y estabilidad. Esta nueva herramienta está basada en la última versión (3ra

generación) de la columna Zeiss Gemini FESEM que permite obtener imágenes de altísima resolución, que puede alcanzar los 1.5nm. Otra ventaja, respecto al modelo anterior es que su modo de operación es muy simple y se lleva a cabo desde una PC con requerimientos mínimos. Además, todas las imágenes están digitalizadas.

Su alta resolución y la calidad de la imagen se obtienen operando a bajos valores de voltajes. Por otro lado, la corta distancia de trabajo de 8.5 mm es la requerida para obtener, en forma simultánea, alta resolución en las imágenes y el análisis de rayos X. Las características del Microscopio Electrónico de Barrido Zeiss Supra 40 FESEM se pueden observar en el Cuadro B.2.

Apéndice C

ImageJ

ImageJ es un programa que permite el procesamiento y el análisis de imágenes digitales usando su editor y un compilador Java. Fue desarrollado en el National Institutes of Health (NIH), situado en Bethesda, Maryland, USA. Entre otras características, *ImageJ* muestra, guarda e imprime imágenes de 8 bits (256 colores), de 16 bits (miles de colores) y de 32 bits (millones de colores). Puede leer varios formatos: TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, etc. Entre las funciones más destacables que posee este programa se encuentran, el cálculo del área y las estadísticas de valor de pixel de selecciones definidas por el usuario y la intensidad de objetos umbral. Puede además medir distancias y ángulos, crear histogramas de densidad y gráficos de línea de perfil. Es compatible con las funciones estándar de procesamiento de imágenes tales como operaciones lógicas y aritméticas entre imágenes, manipulación de contraste, convolución, análisis de Fourier, nitidez, suavizado, detección de bordes y filtrado de mediana. Hace transformaciones geométricas como ampliar, rotación y flips. El programa permite manejar varias imágenes al mismo tiempo, limitado solamente por la memoria disponible. La calibración espacial permite obtener dimensiones “reales” en unidades tales como el milímetro, además de disponer también de la calibración de la escala de grises.

Por último, la gran ventaja es que el *ImageJ* es de dominio público, de fácil entendimiento y operación y corre en una amplia variedad de sistemas operativos (Windows, Mac OS, Mac OS X y Linux); y sus actualizaciones frecuentemente se aportan en forma

gratuita.

Apéndice D

Prisma de Glan-Thompson

Es un prisma óptico que se emplea como polarizador y consiste en dos prismas triangulares rectos de calcita pegados a través de la hipotenusa. La luz incidente en el polarizador es dividida en dos haces que experimentan distintos índices de reflexión por efecto de la birrefringencia. Debido al fenómeno físico de reflexión total, el haz ordinario polarizado p se refleja mientras que el haz extraordinario polarizado s se transmite. En la Fig. D.1 se muestra un esquema de un polarizador Glan-Thompson.

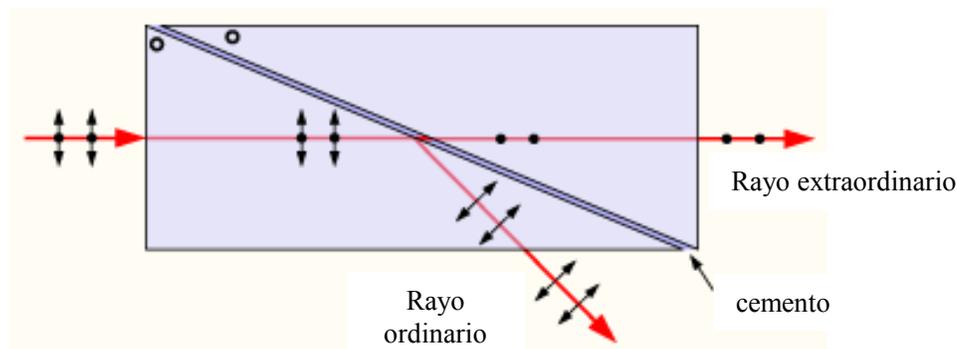


Figura D.1: Esquema y funcionamiento del polarizador Glan-Thompson.

Este tipo de polarizadores tienen mejores prestaciones ópticas con respecto a otro

tipo de polarizadores. En particular, se emplean cuando se requiere un amplio campo de visión y simultáneamente una alta tasa de extinción. Se los usa para aplicaciones dentro del espectro visible y próximo al infrarrojo debido a las longitudes de onda que permite, y además, cuando se requiere un grado de polarización muy elevado para todas las longitudes de onda que se transmiten. Su principal ventaja consiste en que el eje óptico es perpendicular al eje del prisma, con lo cual la diferencia entre los índices de refracción de los rayos ordinario y extraordinario es máxima, lo que permite que los prismas de tipo Glan tengan un mayor ángulo de aceptación que los de tipo Nicol.

Bibliografía

- [1] T. F. Anderson, A. G. Richards, “An electron microscope study of some structural colors of insects,” *J. Appl. Phys.* **13** 748 – 58 (1942).
- [2] S. Berthier, *Iridescences, the Physical Colours of Insects* (Springer Science + Business Media, LLC, 2007).
- [3] S. Kinoshita, *Structural colors in the realm of nature* (World Scientific Publishing Co., 2008).
- [4] A. A. Michelson, “On metallic colouring in birds and insects,” *Phil. Mag.* **21** 554 – 567 (1911).
- [5] A. C. Neville and S. Caveney, “Scarabeid beetle exocuticle as an optical analogue of cholesteric liquid crystals,” *Biol. Rev.* **44** 531 - 562 (1969).
- [6] H. Kosaka, T. Kawashima, A. Tomita, M. Notomi, T. Tamamura, T. Sato, S. Kawakami, “Self- collimating phenomena in photonic crystals,” *Appl. Phys. Lett.* **74** 1212 – 1214 (1999).
- [7] M. Srinivasarao, “Nano-optics in the biological world: beetles, butterflies, birds, and moths,” *Chem. Rev.* **99** 1935 - 1961 (1999).
- [8] P. Vukusic and J. R. Sambles, “Photonic structures in biology,” *Nature* **424**, 852 - 855 (2003).
- [9] P. Resnick, W. Buck, *Teflon*[®] AF amorphous fluoropolymers. In: Scheirs, J. (ed.) *Modern Fluoropolymers*, pp. 397 – 419 (Wiley, New York, 2000).

- [10] L. P. Biró, Zs. Bálint, K. Kertész, Z. Vértessy, G. I. Márk, Z. E. Horváth, J. Balázs, D. Méhn, I. Kiricsi, V. Lousse, J. -P. Vigneron, “Role of photonic-crystal-type structures in the thermal regulation of a Lycaenid butterfly sister species pair,” *Phys. Rev. E* **67** 021907.1 – 021907.7 (2003).
- [11] H. Ghiradella, “Light and color on the wing: structural colors in butterflies and moths,” *Appl. Opt.* **30** 3492 – 3500 (1991).
- [12] B. Gralak, G. Tayeb and S. Enoch, “Morpho butterflies wings color modeled with lamellar grating theory,” *Opt. Express* **9** 567 – 578 (2001).
- [13] A. Parker, “515 million years of structural colour,” *J. Opt. A, Pure Appl. Opt.* **2** R15 – R28 (2000).
- [14] P. Vukusic and D.G. Stavenga. “Physical methods for investigating structural colours in biological systems,” *J. R. Soc. Interface* **6** S133 - S148 (2009).
- [15] A. R. Parker, R. C. McPhedran, D. R. McKenzie, L. C. Botten and N. A. Nicorovici, “Photonic engineering: Aphrodite’s iridescence,” *Nature* **409** 36 – 37 (2001).
- [16] M. Inchaussandague, D. Skigin, C. Carmaran and S. Rosenfeldt, “Structural color in *Myxomycetes*,” *Opt. Express* **18** 16055 – 16063 (2010).
- [17] A. Dolinko, D. Skigin, M. Inchaussandague and C. Carmaran, “Photonic simulation method applied to the study of structural color in *Myxomycetes*,” *Opt. Express* **20** 15139 – 15148 (2012).
- [18] S. M. Doucet and M. G. Meadows, “Iridescence: a functional perspective,” *J. R. Soc. Interface* **6** S115 – S132 (2009).
- [19] S. Yoshioka and S. Kinoshita, “Single-scale spectroscopy of structurally colored butterflies: measurements of quantified reflectance and transmittance,” *J. Opt. Soc. Am A* **23** 134 – 141 (2006).

- [20] W. Zhang, D. Zhang, T. Fan, J. Ding, J. Gu, Q. Guo, and H. Ogawa, “Biomimetic zinc oxide replica with structural color using butterfly (*Ideopsis similis*) wings as templates,” *Bioinsp. Biomim.* **1** 89 – 95 (2006).
- [21] R. J. Martín-Palma, C. G. Pantano and A. Lakhtakia, “Biomimetization of butterfly wings by the conformal-evaporated-film-by-rotation technique for photonics,” *Appl. Phys. Lett.* **93** 083901-1-3 (2008).
- [22] R. J. Martín-Palma and A. Lakhtakia, “Biomimetics and bioinspiration,” *Proc. SPIE* **7401**, 1 – 196 (2009).
- [23] J. P. Vigneron, M. Rassart, C. Vandembem, V. Lousse, O. Deparis, L. P. Biró, D. Dedouaire, A. Cornet and P. Defrance, “Spectral filtering of visible light by the cuticle of metallic woodboring beetles and microfabrication of a matching bioinspired material,” *Phys. Rev. E* **73** 041905 – 041913 (2006).
- [24] E. Stern, Z. Kalman, A. Lewis, K. Lieberman, “Simple method for focusing x rays using tapered capillaries,” *Appl. Opt.* **27** 5135 – 5139 (1988).
- [25] M. T. Gale, “Diffraction, Beauty and Commerce,” *Physics World* 24 – 28 (1989).
- [26] M.T. Gale, “Zero-Order Grating Microstructures,” Chapter 12 in *Optical Document Security*, R. L. van Renesse, 2nd ed. (Artech House, 1998), pp. 267 – 287.
- [27] S. Berthier, J. Boulenguez, and Z. Blint, “Multiscaled polarization effects in *Sun-eve coronata*; (Lepidoptera) and other insects: application to anti-counterfeiting of banknotes,” *Appl Phys A-Mater* **86**, 123 – 130 (2007).
- [28] J. Hwang, M. H. Song, B. Park, S. Nishimura, T. Toyooka, J. W. Wu, Y. Takanishi, K. Ishikawa and H. Takezoe, “Electro-tuneable optical diode based on photonic bandgap liquid-crystal heterojunctions,” *Nat. Mater.* **4** 383 - 387 (2005).
- [29] M. Mitov and N. Dessaud, “Going beyond the reflectance limit of cholesteric liquid crystals,” *Nat. Mater.* **5** 361-364 (2006).

- [30] S. A. Jewell, P. Vukusic and N. W. Roberts, “Circularly polarized colour reflection from helicoidal structures in the beetle *Plusiotis boucardi*,” *New J. Phys.* **9** 1 – 10 (2007).
- [31] A. Luna, D. Skigin, M. Inchaussandague and Arturo Roig Alsina, “Structural color in beetles of South America,” *Proc. SPIE* **7782**, 778205 (2010).
- [32] T. van Kamp and H. Greven, “On the architecture of beetle elytra,” *Entomologie Heute* **22**, 191 – 204 (2010).
- [33] S. Berthier, E. Charron and A. Da Silva, “Determination of the cuticle index of the scales of the iridescent butterfly *Morpho menelaus*,” *Opt. Commun.* **228**, 349 - 356 (2003).
- [34] P. Vukusic, J. R. Sambles, C. R. Lawrence, and R. J. Wootton, “Quantified interference and diffraction in single *Morpho* butterfly scales,” *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 1403 – 1411 (1999).
- [35] J. A. Noyes, P. Vukusic and I. R. Hooper “Experimental method for reliably establishing the refractive index of buprestid beetle exocutice,” *Opt. Express* **15** 4351 – 4358 (2007).
- [36] H. L. Leertouwer, B. D. Wilts and D. G. Stavenga, “Refractive index and dispersion of butterfly chitin and bird keratin measured by polarizing interference microscopy,” *Opt. Express* **19** 24061 - 24066 (2011).
- [37] S. Yoshioka and S. Kinoshita, “Direct determination of the refractive index of natural multilayer systems,” *Phys. Rev. E* **83** 051917 (2011).
- [38] H. Arwin, R. Magnusson, J. Landin, and K. Jarrendahl, “Chirality-induced polarization effects in the cuticle of scarab beetles: 100 years after Michelson,” *Philos. Mag.* **92** 1583 - 1599 (2012).

- [39] D. Macías, A. Luna, D. C. Skigin, M. Inchaussandague, A. Vial, and D. Schinca, “Retrieval of relevant parameters of natural multilayer systems by means of bio-inspired optimization strategies,” *Appl. Opt.* **52** 2511 – 2520 (2013).
- [40] D. Macías, A. Vial, and D. Barchiesi, “Application of evolution strategies for the solution of an inverse problem in near-field optics,” *J. Opt. Soc. Am. A* **21** 1465 - 1471 (2004).
- [41] D. Macías, G. Olague, and E. R. Méndez, “Inverse scattering with far-field intensity data: random surfaces that belong to a well-defined statistical class,” *Waves Random Complex Media* **16** 545 - 560 (2006).
- [42] A. B. Djurišić, J. M. Elazar, and A. D. Rakic, “Modeling the optical constants of solids using acceptance-probability controlled simulated annealing with adaptive move generation procedure,” *Phys. Rev. E* **55** 4797 - 4803 (1997).
- [43] A. Vial, A. S. Grimault, D. Macías, D. Barchiesi, and M. Lamy de la Chapelle, “Improved analytical fit of gold dispersion: application to the modelling of extinction spectra with the FDTD method,” *Phys. Rev. B* **71** 085416 - 085422 (2005).
- [44] D. Macías and A. Vial, “Optimal design of plasmonic nanostructures for plasmon-interference assisted lithography,” *Phys. Rev. B* **93** 159 – 163 (2008).
- [45] D. Barchiesi, D. Macías, L. Belmar-Letellier, D. van Labeke, M. Lamy de la Chapelle, T. Toury, E. Kremer, L. Moreau and T. Grosjes, “Plasmonics: influence of the intermediate (or stick) layer on the efficiency of sensors,” *Appl. Phys. B* **93** 177 – 181 (2008).
- [46] A. Tassadit, D. Macías, J. A. Sánchez-Gil, P. M. Adam and R. Rodriguez-Oliveros, “Metal nanostars: Stochastic optimization of resonant scattering properties,” *Superlattices and Microstructures* **49** 288 – 293 (2011).

- [47] D. Macías, P. M. Adam, V. Ruiz-Cortés, R. Rodríguez-Oliveros, and J. A. Sánchez-Gil, “Heuristic optimization for the design of plasmonic nanowires with specific resonant and scattering properties,” *Opt. Express* **20** 13146 – 13163 (2012).
- [48] *ImageJ* es un programa de dominio público que procesa imagenes basado en Java, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- [49] P. Vukusic and D. G. Stavenga, “Physical methods for investigating structural colours in biological systems,” *J. Roy. Soc. Interface* **6** S133–S148 (2009).
- [50] J. C. Stover, S. A. Serati, and C. H. Gillespie, “Calculation of surface statistics from light scatter,” *Opt. Eng.* **23** 406 – 412 (1984).
- [51] D. Macías, G. Olague, and E. R. Méndez, “Hybrid evolution strategy-downhill simplex algorithm for inverse light scattering problems,” In: S. Cagnoni *et al.* (Eds) *EvoWorkshops*, LNCS 2611 (Berlin: Springer), pp. 339 – 409 (2003).
- [52] C. R. Lawrence, P. Vukusic and J. R. Sambles, “Grazing-Incidence Iridescence from a Butterfly Wing,” *Appl. Opt.* **41** 437 – 441 (2002).
- [53] <http://www.oceanoptics.com/technical/USB4000operatinginstructions.pdf>
- [54] E. Hecht, *Óptica*, 4ta ed., Adelphi University, San Francisco, USA, 2002.
- [55] <http://oceanopticsfaq.com/products/spectrometers/adquisicion-de-datos-con-el-software-spectrasuite/>
- [56] http://www.oceanoptics.com/Products/fiber_bifserieslabgrade.asp
- [57] D. Mossakowski, “Reflection measurements used in the analysis of structural colours of beteles,” *J. Microsc.* **116 part 3** 351 – 364 (1979).
- [58] T. Hariyama, M. Hironaka, H. Horiguchi and D. G. Stavenga, *Structural Colors in Biological Systems*, edited by S. Kinoshita and S. Yoshioka, (Osaka University Press, 2004) p153 – 176.

- [59] I. R. Hooper, P. Vukusic and R. J. Wootton, “A detail optical study of the transparent wing membranes of the dragonfly *Aeshnacyanea*,” *Opt. Express* **14** 4891 – 4897 (2006).
- [60] D. G. Stavenga, B. D. Wilts, H. L. Leertouwer and T. Hariyama, “Polarized iridescence of the multilayered elytra of the Japanese jewel beetle, *Chrysochroa fulgidissima*,” *Phil. Trans. R. Soc. B* **366** 709 – 723 (2011).
- [61] R. Lozano, *El color y su Medición* (Américaalee Ed., 1978).
- [62] El sitio web “EasyRGB”, <http://www.easyrgb.com>, posee la aplicación *Color calculator* que convierte los datos de color a diferentes estándares de color.
- [63] P. Henríquez, D. S. Donoso, and A. A. Grez, “Population density, sex ratio, body size and fluctuating asymmetry of *Ceroglossus chilensis* (Carabidae) in the fragmented Maulino forest and surrounding pine plantations,” *Acta Oecologica* **35** 811 – 818 (2009).
- [64] H. G. Beyer, *The Theory of Evolution Strategies* (Springer-Verlag, 2001).
- [65] R. C. Eberhart and J. Kennedy, “A new optimizer using particle swarm theory,” in *Proceedings of the Sixth International Symposium on Micro Machine and Human Science* (IEEE, 1995), p. 39.
- [66] J. H. Holland, *Adaptation in Natural and Artificial Systems* (University of Michigan, 1975).
- [67] H.-P. Schwefel, *Evolution and Optimum Seeking* (New York, Wiley Interscience, 1995).
- [68] J. Robinson and Y. Rahmat-Samii, “Particle swarm optimization in electromagnetics,” *IEEE Trans. Antennas Propag.* **52** 397 - 407 (2004).
- [69] R. Poli, J. Kennedy, and T. Blackwell, “Particle swarm optimization: an overview,” *Swarm Intelligence* **1** 33 - 57 (2007).

- [70] R. Depine , *Apuntes del Curso Optativo y de Postgrado de Ondas en medios anisótropos*, Segundo Cuatrimestre de 2001, Dep. de Física, FCEN, UBA.
- [71] D. Macías, A. Luna, D. C. Skigin, A. Vial and M. Inchaussandague, “Retrieval of the relevant parameters of natural multilayer systems,” in *Proceeding of the Advanced Electromagnetics Symposium 2012* (AES '12), Abril 16 - 19 2012, Pars, Francia, p. 335 – 340.
- [72] A. Luna, D. Macías, D. Skigin, M. Inchaussandague, D. Schinca, M. Gigli, and A. Vial, “Characterization of the iridescence-causing multilayer structure of the *Ceroglossus suturalis* beetle using bio-inspired optimization strategies,” *Opt. Express* **21** 19189 – 19201 (2013)
- [73] M. Tanaka, M. Mizoguchi and I. Takami, “Improvement of search performance in genetic algorithms with fitness prediction,” *Electrical Engineering in Japan* **158** 60 - 68 (2007).
- [74] R. Martí, “Multi-Start Methods,” in *International Series in Operations Research & Management Science Handbook of Metaheuristics* **57** F. Glover and G. Kochenberger, eds. (2003) pp.355 – 368.
- [75] M. W. Mc Call and I. Hodgkinson, “Properties of partially polarized light remitted from lossless polarizing elements,” *Eur. J. Phys.* **30** S63 – S80 (2009).