



**I
N
A
O
E**

**Instituto Nacional de Astrofísica,
Óptica y Electrónica**

**Espectroscopía Raman en un
arreglo de pinzas ópticas para
muestras biológicas**

Presenta:

Ricardo Landín Martínez

Tesis sometida como requisito para obtener el
grado de **MAESTRO EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE ÓPTICA** en el Instituto
Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica

Asesor

Dr. Jorge Castro Ramos

Profesor Investigador del Instituto de Astrofísica, Óptica y
Electrónica

Co asesor

Dr. Mauricio Ortiz Gutiérrez

Profesor investigador de la Facultad de Ciencias de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

©INAOE 2011

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de
reproducir y distribuir copias de esta tesis en su
totalidad o en partes.



Agradecimientos

Este trabajo involucra no a una sola persona, sino a un gran equipo de colaboradores.

Primera mente quisiera agradecer a mis asesores, que me tuvieron la paciencia, atención y apoyo para desarrollar este trabajo, así como transmitirme su conocimiento en el área.

También quiero agradecer el apoyo incondicional del Dr. Elder de la Rosa al proporcionar las nanopartículas que sirvieron en algunas de las pruebas.

Al hermano mayor adoptivo ya casi doctor Adrián Jufemio Villanueva Luna, por su apoyo al proporcionar el software para limpiar la señal de fluorescencia además de pasar unos momentos de relax muy amenos.

También agradecer a la Dra. Maricarmen Peña Gomar, por proporcionar las nanopartículas de látex, que fueron empleadas con gran éxito para calibrar el arreglo de pinzas ópticas.

A todos los quimiofarmacobiólogos y médicos involucrados en el trabajo, que si menciono a cada uno tendría que hacer otro capítulo.

A mis profesores de la maestría, quienes me transmitieron parte de sus conocimientos y experiencias.

A mis compañeros con los que pasé gratos momentos, y con quienes tuve su apoyo en momentos difíciles.

Pero un agradecimiento muy especial para mi equipo de trabajo que siempre ha estado ahí apoyándome, y con el cual nunca hubiera llegado hasta donde estoy, un equipo que tuve la suerte de formar parte de él desde mi primer día de vida, mi familia.

Índice

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Reseña histórica	2
1.3 Técnica propuesta	8

CAPÍTULO II

PINZAS ÓPTICAS	11
2.1 Conceptos preliminares	11
2.2 Saturación de la fuerza de esparcimiento en átomos	15
2.3 Fuerza gradiente en átomos	16
2.4 Tipos de trampas ópticas	18
2.4.1 Régimen de óptica de rayos	20
2.4.2 Régimen generalizado de Lorentz – Mie	23
2.4.3 Régimen de Rayleigh	28

CAPÍTULO III

ESPECTROSCOPIA RAMAN	33
3.1 Efecto Raman	33
3.2 Espectroscopía Raman	36
3.3 Tensor Raman	37
3.4 Resonancia de espectro Raman	39

3.5 Esparcimiento Raman de Superficie Mejorada (SERS)	41
3.5.1 Polarización en esferas	43
3.5.2 Polarización en moléculas	45

CAPÍTULO IV

ADQUISICIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS 46

4.1 Muestras biológicas y no biológicas	46
4.2 Muestras Biológicas	47
4.2.1 <i>Escherichia Coli</i>	47
4.2.2 <i>Staphylococcus Epidermidi</i>	48
4.2.3 <i>Staphylococcus Aureus</i>	49
4.2 Medios de cultivo	49
4.3 Inoculación de Muestras	50
4.4 Adquisición de nuevas muestras	51
4.5 Conteo de población en colonias bacterianas	56

CAPÍTULO V

TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS 59

5.1 Desarrollo del arreglo experimental	59
5.2 Atrapamiento de partículas	63
5.3 Acoplamiento de la punta de prueba y manejo de muestras biológicas ...	68
5.4 Espectros Obtenidos	72

CAPITULO VI

CONCLUSIONES 93

APÉNDICE A	
LEYES DE MAXWELL Y ECUACIÓN DE ONDA	95
REFERENCIAS	98

Resumen

Las pinzas ópticas son una herramienta de no contacto utilizada para el atrapamiento y la manipulación de partículas, con dimensiones cercanas o inferiores a unas decenas de micras. Este tipo de herramienta ha sido de interés de las ciencias biológicas para manipular microorganismos con el fin de no cambiar su estructura molecular como sucede al tocarlos físicamente con algún instrumento.

La espectroscopía Raman es una técnica que permite conocer la composición química y la estructura interna de una muestra al ser excitada con cierta longitud de onda, de tal manera que al haber intercambio de energía entre la fuente de excitación y las moléculas de la muestra se presenta un gráfico donde pueden localizarse las componentes de la muestra.

En este trabajo se presenta un arreglo de pinzas ópticas empleando un láser HeNe de 17mW de potencia. El arreglo experimental incorpora la técnica de espectroscopía Raman con el fin de estudiar organismos bacterianos a los que se les agregaron nanopartículas de oro de 200nm de diámetro, además de poder analizar su espectro Raman obtenido y, realizar atrapamientos mediante el mecanismo de pinzas ópticas con el objetivo de saber si es una técnica factible para el área de ciencias biológicas en la rama de microbiología.

En el trabajo también se presentan atrapamientos de nanopartículas de látex que fueron tomadas para la calibración de arreglo experimental tanto en la parte de pinzas ópticas como en la obtención de los espectros Raman.

Abstract

Optical tweezers are a non-contact tool used for trapping and manipulation of particles with dimensions near or below a few tens of microns. This type of tool has been interest in the biological sciences to manipulate microorganisms in order not to change its molecular structure as it is to physically touch an instrument.

Raman spectroscopy is a technique to determine the chemical composition and internal structure of a sample when excited with a certain wavelength, so that having exchange of energy between the excitation source and the sample molecules present a graph where components can be located in the sample.

This paper presents an array of optical tweezers using a HeNe laser power of 17mW. The experimental arrangement incorporates Raman spectroscopy technique to study the bacterial organisms were added to gold nanoparticles of 200nm in diameter, besides being able to analyze the Raman spectra obtained, and make the mechanism of trapping by optical tweezers with goal whether it is a feasible technique for the area of biological sciences in the field of microbiology.

The paper also presents entrapments latex nanoparticles were taken for calibration of experimental setup on both the optical tweezers as in obtaining the Raman spectra.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Este capítulo describe los trabajos previos de pinzas ópticas y de espectroscopía Raman, aunado a una breve introducción de la técnica que se propone en el trabajo. En esta primera parte también se hace mención de la reseña histórica de los fenómenos de atrapamiento óptico y efecto Raman, efectos que fueron aplicados en los experimentos de la tesis.

1.1 Generalidades

La espectroscopía es una herramienta utilizada en aplicaciones científicas para muestras que pueden ser líquidas, sólidas o gaseosas y se basa en la vibración de los átomos que componen cierto material al absorber una longitud de onda específica de una onda electromagnética incidente, pudiendo así conocer las moléculas que están presentes en la muestra que se analiza, y que pueden ser identificadas por sus espectros característicos. La espectroscopía permite observar modificaciones químicas que se pueden generar en la muestra por diversos aspectos físicos, químicos o una mezcla de ambos¹.

Por otro lado, el uso del láser desde su creación en 1960 ha tenido un sinnúmero de aplicaciones en muchas áreas del conocimiento siendo la manipulación de micropartículas con pinzas ópticas una de las más recientes. Las pinzas ópticas aprovechan propiedades intrínsecas del campo electromagnético como lo son el momento electromagnético, la presión de radiación y la fuerza gradiente de un haz enfocado fuertemente para atrapar partículas del orden de micras o nanómetros, dimensiones que son representativas de algunos microorganismos unicelulares y ello ha llevado a la aplicación de las pinzas ópticas al campo de la microbiología médica o de diagnóstico, pudiendo con esta herramienta

¹ Ewen Smith, Geoffrey Dent, “*Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*”, ed. Jhon Wiley & Son, England, 2005.

atrapar, aislar o manipular agentes biológicos sin tener que entrar en contacto directo con estos y, de esa manera perseverar todas las características que describen al organismo y que pudieran modificarse si algún elemento físico lo toca.

Cuando se mezclan las ventajas de la micro manipulación que caracteriza a las pinzas ópticas junto con la espectroscopía al detectar moléculas que se encuentran en una muestra, se tiene una herramienta que tiene el poder de identificar fisicoquímicamente muestras tanto biológicas como no biológicas y cuyos resultados pueden ser aplicados en otras ramas del conocimiento.

1.2 Reseña Histórica

Las pinzas ópticas fueron concebidas en 1969 por Arthur Ashkin al tratar de contestarse una pregunta simple, “¿Será posible observar movimiento significativo de partículas pequeñas usando las fuerza de presión de radiación de la luz láser?”, pregunta que contestaría un año mas tarde en dos artículos de la revista *PHYSICAL REVIEW LETTERS* en sus volúmenes 24² y 25³. En el primero de ellos describe que es posible generar aceleración de micro partículas aplicando la presión de radiación de un haz proveniente de un láser continuo, además menciona que al poder acelerar las micropartículas se puede generar una trampa óptica, como él la llama, para átomos y moléculas aplicando una luz láser sintonizada a determinadas transiciones ópticas, encontrando también que una de las implicaciones de este fenómeno es la de poder separar isótopos de materiales junto con otras aplicaciones⁴. En el segundo artículo de Ashkin referente a la desviación de un campo atómico por la presión de radiación resonante, propone que el uso del valor de saturación de la fuerza debida a la presión de radiación en átomos neutros, produce un campo constante de desviación central en las orbitas circulares y con ello realizar un analizador de alta

² A. Ashkin, Acceleration and trapping of particles by radiation pressure, *Phys. Rev. Lett.* **24**, 156 – 159 (1970).

³ A. Ashkin, Atomic – beam deflection by resonance – radiation pressure, *Phys. Rev. Lett.* **25**, 1321 – 1324 (1970).

⁴ Arthur Ashkin, “*Optical trapping and manipulation of Neural Particles using laser*”, ed. World Scientific, USA, 2006. page VII.

velocidad. Además menciona que estos aspectos son de gran utilidad en el estudio de la interacción de átomos con luz monocromática de alta intensidad y, para separar especies isotópicas determinadas de átomos neutros con una trampa óptica.

Ashkin tuvo su primer contacto con el concepto de presión de radiación en 1944 cuando trabajaba en el Laboratorio de Radiación de Columbia, ahí estudió el uso de pulsos con potencia de mega watts para la comunicación entre radares, y se dio cuenta que al generar pulsos en el orden de las microondas era posible mover objetos metálicos, como se veía claramente en el auricular de los teléfonos. Fue por esa idea que observó que al enviar una señal producida por un magnetrón con una potencia de un mega watt y una duración de un micro segundo con una frecuencia de 1000 Hz hacia un plato de un radar, la señal recibida en el radar y mostrada en un osciloscopio era muy clara y en ciclos de mil pulsos, efecto que interpretó como presión de radiación⁵.

La segunda vez que Ashkin tuvo un acercamiento al concepto de presión de radiación fue durante una conferencia de láser en la década de los 60's, impartida por Erick Rawson en la Universidad de Toronto. Rawson mencionaba que dentro de la cavidad del láser existían partículas pequeñas y brillantes flotando y moviéndose de manera muy peculiar, estas partículas podían moverse y cambiar rápidamente de la izquierda a la derecha del haz, girar en diferentes ángulos, detenerse, ir en reversa y mantenerse en un tránsito oscilatorio y, fue de estas mismas observaciones que el Dr. Rawson generó la siguiente pregunta, *¿Qué son estas extrañas partículas y que es lo que las mueve?*, pregunta a la cual ofreció muchas respuestas incluida la presión de radiación⁶.

Durante los siguientes años la idea de trampa óptica de Ashkin fue tomando el interés de la comunidad científica, en cierta medida debido a la gran cantidad de publicaciones respecto a este tema. No fue sino hasta 17 años después de su primer artículo cuando Ashkin, junto con otros investigadores en 1987 implementan las pinzas ópticas como una herramienta para la manipulación de material biológico en un artículo publicado por la

⁵ Microwave Magnetrons, ed. G. B. Collins, in MIT Radiation Series, Vol. 6, Sec. 19.13

⁶ E. G. Rawson and A. D. May, Propulsion and angular stabilization of dust particles in a laser cavity, App. Phys. Lett. 8, 93 – 95 (1966).

revista Nature⁷ y, fue a partir de este momento que se abre un nuevo campo de aplicación y estudio de las pinzas ópticas en el ambiente biológico, lo que generaría en un futuro gran interés de los científicos de las ciencias biológicas, lo cual se vio reflejado en la publicación de una gran cantidad de artículos en la década de los 90's y principios del siglo XXI por parte de otros investigadores y, cuyos temas principales son referentes a la micro manipulación de organismos celulares basados en la idea original de Ashkin. En estos Artículos también se incorporan otro tipo de instrumentos adicionales a las pinzas como lo es la espectroscopía, esto con el fin de poder analizar de una manera completa una muestra aislada gracias a las pinzas ópticas^[4].

En lo referente a la espectroscopía Raman esta inició con Adolf Smekal, un físico austriaco quien en 1923 mencionó de manera teórica la inexistencia de líneas con cambios de frecuencia⁸, además de que Kramers⁹, Dirac¹⁰, Schrödinger¹¹ y Heisenberg ya tenían trabajos que explicaban de manera teórica, específicamente aplicando la mecánica cuántica, el comportamiento molecular que predecían el efecto Raman, lo que fue observado de manera experimental en 1928 por Sir Chandrasekhra Venkata Raman que en su publicación de la revista número 121 en Nature de ese año reporta textualmente que:

"Si asumimos que la dispersión de rayos X del tipo "no modificado" observado por el profesor Compton corresponde a la normal o al estado medio de los átomos y las moléculas, mientras que la «modificación» de dispersión de longitud de onda alterada corresponde a las fluctuaciones de ese estado, en consecuencia debemos esperar que en el caso de la luz ordinaria existan dos tipos de dispersión, la primera determinada por las propiedades ópticas normales de los átomos o moléculas, y otra que representa el efecto de las fluctuaciones en su estado normal. En consecuencia, resulta necesario comprobar si este es realmente el caso. Los experimentos que hemos realizado han confirmado esta previsión y demostrado que en todos los casos en que la luz se esparce por las moléculas de líquidos libres de polvo o gases, la radiación difusa de la clase ordinaria, que tengan la

⁷ A. Ashkin, J. M. Dziedzic and T. Yamane, Optical trapping and manipulation of single cells used infrared laser beam, *Nature* **330**, 769 – 771 (1987).

⁸ A. Smekal, *Naturwissenschaften*, 43, 873 (1923).

⁹ HA Kramers, W Heisenberg. *Z Phys* 31:681, 1925.

¹⁰ PAM Dirac. *Proc Roy Soc London A* 114:710, 1927.

¹¹ E. Schrodinger. *Ann Phys* 81:109, 1926.

*misma longitud de onda como el haz incidente, se acompaña de una modificación de la radiación dispersa de frecuencias degradadas.*¹²

*El nuevo tipo de dispersión de la luz descubierta requiere una iluminación muy potente para su observación. En los experimentos, un haz de luz solar se hace converger por un objetivo del telescopio de 18 cm. de apertura y 230 cm. de distancia foca y, una segunda lente de 5 cm. la longitud focal sucesivamente. En el foco de la segunda lente se coloca el material de dispersión, que es un líquido (con cuidado se purifican por destilación repetida en el vacío) o su vapor libre de polvo. Para detectar una modificación en la radiación dispersada, fue utilizado el método de filtros complementarios de luz. Un filtro de color azul-violeta, cuando se combina con un filtro amarillo-verde y se coloca en la luz incidente, extinguen por completo el camino de la luz a través del líquido o vapor. La reaparición de la línea espectral cuando el filtro amarillo es trasladado a un lugar entre ella y el ojo del observador prueba la existencia de una radiación dispersa modificada. La confirmación espectroscópica también está disponible”.*¹³

El experimento llevado a cabo por Raman fue centrar un telescopio que condujera la luz solar a una muestra de un líquido purificado o vapor libre de polvo, acto seguido un segundo objetivo fue colocado para recoger la luz dispersada, para ello fueron utilizados varios filtros fotográficos que con el fin de demostrar la existencia de luz monocromática dispersada, tenían una frecuencia de alteración debido a las moléculas de la muestra, que es la característica básica del efecto Raman. Por estos descubrimientos se le otorga en 1930 el premio Nobel de física, además de que el efecto descrito teóricamente por Smekal es conocido como Efecto Raman de ese año en adelante.

La rama de espectroscopía Raman comienza tomando los primeros espectros que se excitan con una lámpara de arco de mercurio, utilizando un filtro para seleccionar la línea de Hg de interés y las muestras en un matraz esférico de gran tamaño. Durante este periodo los laboratorios del mundo basaban gran parte de sus investigaciones en el estudio de la dispersión de la luz⁶.

Bernhard Schrader revisó las primeras observaciones de los espectros de vibración que describe la absorción molecular en la parte infrarroja del espectro, así como dispersión Raman.

¹² A new type of secondary radiation, *Nature*, 1928, **121**, 501 (31 March 1928)

¹³ A change of wavelength in light scattering, *Nature*, 1928, **121**, 619 (21 April 1928)

Incluso a principios del siglo XX, por lo menos existían cuatro trabajos respecto a espectros de absorbancia que determinaban una molécula específica. En 1905, Coblentz¹⁴ publica en el atlas de espectros de absorción 120 compuestos orgánicos utilizando el equipo que él mismo construyó, también incluyó una descripción del papel desempeñado por los grupos moleculares funcionales. Sin embargo, se reconoce en general que la espectroscopía vibracional no se aplicó a la química analítica activa hasta después de la Segunda Guerra Mundial, cuando tanto los instrumentos Raman y de infrarrojo comenzaron a convertirse en herramientas comerciales más fáciles de usar. Hasta 1961, el efecto Raman se aplicó al estudio de los espectros de vibración de los gases, líquidos y sólidos y los espectros de rotación de los gases¹⁵. El estudio de estas excitaciones con la luz visible era mucho más fácil que a través de la absorción directa en la parte media del infrarrojo y del infrarrojo lejano del espectro. Sin embargo, se reconoció pronto que el esparcimiento Raman y la absorción en infrarrojo son bastante complementarias debido a las diferencias existentes entre dos fotones contra un solo fotón en los mecanismos de acoplamiento entre las moléculas y los fotones.

Al crearse en 1960 el láser, la espectroscopía Raman da un salto enorme en su evolución porque por naturaleza los espectros son débiles a causa de que se obtienen en minutos o segundos, es por ello que en el momento en que aparece el láser poco después de la mitad del siglo XX, la señal aumenta su intensidad a causa de que se cuenta con una fuente que produce un haz que no es dispersa ayudando con ello a obtener una señal más limpia y clara. Sin embargo, la fuente de láser intenso no fue el único desarrollo importante. Debido a que el efecto Raman es débil, a menudo hay una contribución muy intensa del haz disperso en la longitud de onda del láser, que acompaña a la señal Raman. Esta señal se refiere a menudo como la señal de Rayleigh, aunque, en rigor, la señal de Rayleigh es una señal intrínseca, no una señal que depende de las propiedades ópticas de la muestra. Hasta la reciente disponibilidad de filtros holográficos, monocromadores o espectrógrafos fue posible separar la señal Raman de la señal Rayleigh.

¹⁴ WW Coblentz. Investigations of Infrared Spectra. Washington, DC: Carnegie Institution, 1905. (republished by The Coblentz Society, Norwalk, CT, 1962).

¹⁵ A Jayaraman, AK Ramdas. Chandrasekhara Venkata Raman. Phys Today 57-64, 1988.

El desafío para el desarrollo de instrumentos Raman prácticos era permitir la colección de señales de alta dispersión de los sólidos, líquidos y gases en tiempos razonables. Los instrumentos que fueron utilizados más ampliamente entre mediados de los años 1960 y mediados de la década de 1980 fueron monocromadores con las fuentes de láser y fotomultiplicadores de bajo ruido (PMT)¹⁶.

Inmediatamente después de la invención del láser óptico en la década de 1960, todos los instrumentos utilizan un láser como fuente de luz. La adquisición de espectros de muestras con alta radiación "Rayleigh" requiere algunos desarrollos de espectrómetros, así como la implementación de detectores de bajo nivel de ruido.

Hasta la introducción de los láseres visibles, los espectros Raman se generaron con baja presión, lámparas de mercurio refrigerado por agua fría. Ya en 1961, Townes reconoció la utilidad de usar un láser para excitar espectros Raman¹⁷. Porto y Wood casi de inmediato aplicaron un láser de rubí pulsado para excitar los espectros Raman de líquidos en 1962¹⁸. La onda continua (CW) del láser HeNe se implementó en al menos dos laboratorios en los próximos dos años.

Weber y Porto fueron los primeros en utilizar un láser HeNe como fuente para los espectros Raman de los gases. Con el fin de compensar el bajo volumen de los gases que se iluminaban, se diseñó un esquema de intracavidad para tomar ventaja de la densidad de potencia mucho más alta en el resonador láser. Ellos fueron capaces de medir la dispersión de rotación pura (Stokes y anti-Stokes) cerca de la línea láser en un espectrógrafo *Echelle* equipado con una placa fotográfica.

¹⁶ A Yariv. Introduction to Optical Electronics. New York: Holt, Rinehart and Winston.

¹⁷ CH Townes. In: JR Singer, ed. Advances in Quantum Electronics. New York: Columbia University Press, 1961, pp 3-11.

¹⁸ SPS Porto, DL Wood. J Opt Soc Am 52:251, 1962.

1.3 Técnica propuesta

Desde que Anton Van Leeuwenhoke observó 1674 los primeros protozoarios en una gota de agua de lluvia¹⁹, la óptica y la microbiología han ido de la mano desarrollando nuevas técnicas y dispositivos para la observación, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Actualmente los especialistas en el área de la salud desean además de observar a los microorganismos, manipularlos y conocer su composición química o cambios morfológicos en diferentes estados del microorganismo, pero se enfrentaban al hecho de que algunos microorganismos al ser manipulados físicamente mutan con relativa rapidez, lo que ocasiona que su estudio no pueda llevarse a cabo a profundidad. Con estas ideas en mente algunos científicos optaron por aplicar las pinzas ópticas para manipular a los microorganismos, ya que al ser un mecanismo no invasivo y “de no contacto”, aquel organismo microscópico que era manipulado por esta técnica podría no presentar mutaciones por causa de contacto físico. Los primeros experimentos que se realizaron para manipular elementos biológicos por medio de pinzas ópticas se realizaron a finales de la década de los 1980's, donde el creador de las pinzas ópticas Arthur Ashkin junto con un grupo multidisciplinario de investigadores logran un arreglo de trampa óptica para manipular virus y/o bacterias reportado en el volumen 235 de la revista Science de 1987²⁰.

En el campo de la espectroscopía Raman las aplicaciones en el área de biología inició a fines de 1990's y principios del siglo XXI, siendo la bacteria mas estudiada la *e – coli*, a partir de ese momento el análisis de bacterias por espectroscopía Raman ha ido creciendo a partir de que la espectroscopía es otra prueba no invasiva y “de no contacto” con el elemento de estudio²¹. Es en ese momento cuando se combina la espectroscopía Raman con las pinzas ópticas para generar microespectroscopía Raman con fines microbiológicos, es

¹⁹ Tunnacliffe and J. Lapinski, Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 29 October 2003 vol. 358 no. 1438 1755-1771.

²⁰ A. Ashkin and J. M. Dziedzic, Optical Trapping and manipulation of viruses and bacteria, *Science* **235**, 1517 – 1520 (1987).

²¹ Changan Xie and Yong-qing Li, Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques, Appl. Physics, volume **93**, number 5, 2003.

decir, se tienen dos técnicas no invasivas y “de no contacto” que permiten manipular y caracterizar colonias de bacterias o aislar una bacteria para su estudio en profundidad.²²

En este trabajo se aplicó la técnica de microespectrometría Raman con el fin de conocer la composición bioquímica de muestras biológicas para casos de colonias bacterianas puras, como colonias dopadas con nanopartículas de oro de 200 nm de diámetro inmersas en SiNa. También se toman los espectros Raman de muestras microscópicas no biológicas, específicamente nanopartículas de látex de 214nm y 848nm de diámetro suspendidas en agua desionizada y adicionalmente se tomó el espectro Raman de las nanopartículas de oro.

Se cultivaron muestras microbiológicas de *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *estreptococo aureus*, *Gemella* y *micrococo Roseus*, proporcionadas por laboratorios clínicos SERVIMED y otras recolectadas en instalaciones de la Universidad Michoacana.

La tesis se compone de cuatro capítulos adicionales. En el capítulo II hace referencia a la teoría de las pinzas ópticas, así como los mecanismos físicos con los cuales estas trabajan y que servirán para entender y desarrollar el arreglo experimental que se desea montar.

El capítulo III abarca conceptos fundamentales de la teoría relacionada al efecto Raman y la aplicación de esta para el área de espectroscopia. Estos conceptos son necesarios para entender el proceso de obtención e interpretación de los gráficos arrojados por el espectrómetro empleado en la parte experimental. Además se mencionan algunas de las técnicas aplicadas en espectroscopía Raman para tener una señal de mayor intensidad o con menor ruido de fondo.

El capítulo IV abarca temas referente a las muestras tanto biológicas como no biológicas, donde se mencionan las características de cada una de las bacterias analizadas, su forma de manejo, el método de sembrado de las colonias y la preparación de los medios de cultivo. También se hace referencia a las muestras no biológicas utilizadas en los experimentos, además de detallar el proceso de dopaje de las bacterias con material no biológico para aumentar la señal Raman recolectada por el equipo.

²² ATANU SENGUPTA, MARY L. LAUCKS, and E. JAMES DAVIS, Surface – Enhanced Raman Spectroscopy of bacteria and pollen, App. spectroscopy vol. **59**, 2005.

El último capítulo describe los trabajos realizados para esta tesis, así como los resultados obtenidos de cada uno de ellos y la forma como fueron caracterizados y calibrados los arreglos experimentales, además de presentar algunas de las observaciones realizadas en el trabajo.

CAPÍTULO II

PINZAS ÓPTICAS

En este capítulo se mencionan los fundamentos matemáticos y físicos de las pinzas ópticas además, se presentan los tipos de pinzas ópticas que pueden desarrollarse así como los regímenes que describen el fenómeno de atrapamiento de partículas dependiendo de la longitud de onda utilizada y el tamaño de los objetos que se desean atrapar.

2.1 Conceptos preliminares

Las pinzas ópticas trata de un arreglo óptico que involucra un haz fuertemente enfocado en un plano, esto se realiza para poder obtener una presión de radiación alta en un área muy pequeña con el fin de poder atrapar o retener objetos cuyas dimensiones van desde nanómetros a unas cuantas micras, los cuales se encuentran ubicados en el plano focal del haz.

El atrapamiento del objeto se debe a dos fuerzas involucradas que actúan sobre él, la presión de radiación causada por el momento de los fotones y la fuerza gradiente, que es el resultado de la dispersión que presenta el haz en el plano focal. Otros factores que involucra el atrapamiento de un objeto son la potencia del láser empleado, el tamaño del objeto, índice de refracción del cuerpo a manipular, longitud de onda empleada y densidad del objeto.

El tamaño del objeto con respecto a la longitud de onda con la que se está trabajando es importante ya que eso definirá el tipo de régimen de interacción entre el objeto a manipular y la longitud de onda empleada en el experimento, e incluso se pueden tener diferentes experimentos con el mismo objeto a manipular, únicamente cambiando la longitud de onda de la fuente de iluminación coherente empleada.

Existe un fenómeno cuando un conjunto de fotones incide en una superficie o un cuerpo, llamado presión de radiación. Esta presión de radiación se genera a causa del momento que porta cada fotón debido a su energía, definida por:

$$E_{ph} = h\nu. \quad (2.1)$$

Esta energía también puede ser expresada en términos de la masa efectiva restante como:

$$E_{ph} = m_{eff}c^2. \quad (2.2)$$

Ahora bien la masa efectiva y el momento pueden relacionarse con la velocidad como:

$$P_{ph} = m_{eff}c = \frac{h\nu}{c} \quad (2.3)$$

La presión ejercida por el conjunto de fotones sobre el objeto generan una fuerza en dirección en la que los fotones inciden ya que el cuerpo presenta una aceleración dada por:

$$a = \frac{F_{max}}{m} \quad (2.4)$$

Si se radía un átomo con un haz de radiación resonante, para pasar del estado base al estado excitado la fuerza de presión de radiación que es ejercida en el átomo está dada por :

$$F = \left(\frac{h}{\lambda}\right)\tau_N^{-1}f, \quad (2.5)$$

donde τ_N es el tiempo de vida natural en el estado excitado mientras que f es la fracción de tiempo que pasa en el estado excitado. La ecuación (2.5) describe el momento lineal por segundo de esparcimiento isotrópico que sale del haz incidente debido a la resonancia de fluorescencia de la emisión espontánea del estado atómico superior. Aplicando la ecuación de Einstein (2.6) con A y B constantes se tiene entonces que:

$$f = \frac{n_2}{N} = \frac{x}{1 + Ax / BW(\nu)}, \quad (2.6)$$

siendo $x = (1 + g_1 / g_2)^{-1}$, donde g_1 y g_2 son los factores de degradación de un estado bajo a un estado alto. El estado de saturación ocurre cuando la emisión estimulada a una tasa de $Bw(\nu)$ es mucho más alta que la emisión espontánea a una tasa de Ax , entonces $f \cong x$.

La absorción seguida de la emisión estimulada por sí mismas contribuyen de manera insignificante en el movimiento del átomo. Ahora bien, la fuerza de campo que contiene átomos a una velocidad constante y que se presenta en dirección del haz de luz incidente es el resultado de la acumulación del efecto de absorción de cada fotón proveniente del haz lumínico.

Una alternativa a la radiación de resonancia dirigida estrictamente transversal es considerar un haz de luz cilíndrico dirigido radialmente como se muestra la figura 2.1

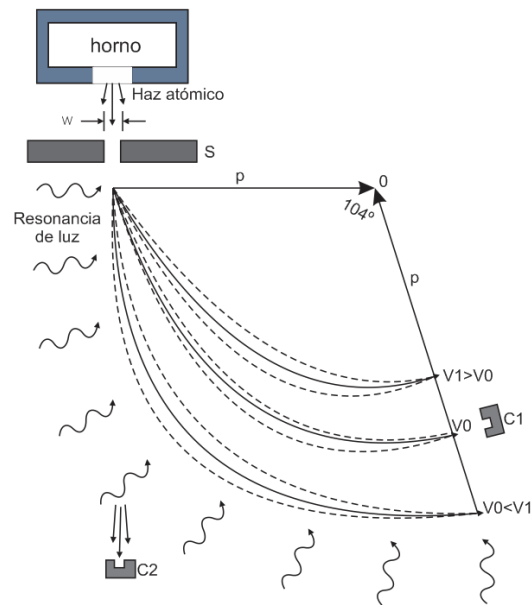


Fig 2.1 La luz de resonancia dirigida hacia el O cilíndrico eje es perpendicular a la órbita de equilibrio circular marcado W. los colectores detectan las partículas de diferente velocidad que llegan a los diferentes radios.

Si la intensidad de luz es alta entonces el átomo experimentará una resonancia radial constante en dirección al centro de la fuerza generada por el volumen iluminado, esto siempre y cuando se tome en cuenta la componente transversal de la velocidad de los átomos y que además es menos a la velocidad que se requiere para obtener una resonancia de cambio Doppler. Para tal fuerza de campo la velocidad de los átomos satisface que:

$$F_{sat} = (h / \lambda) \chi / \tau_N = mv_0^2 / \rho \quad (2.7)$$

Que seguirá una trayectoria circular con radio ρ y por lo tanto generará una desviación a lo largo de la trayectoria original. En dado caso que v_0 sea constante y perpendicular a la fuerza no se generará salto Doppler.

Si se tiene la potencia para la cual se tiene la fuerza de saturación, se puede reescribir la absorción estimulada a un ritmo en términos de la absorción de la sección transversal de la intensidad de luz monocromática incidente $I(\nu)$, y la forma de la línea Lorentziana $S(\nu)^{3,8}$ es:

$$Bw(\nu) = \frac{\lambda_0^2 g_2}{2\pi g_1} \frac{I(\nu) S(\nu)}{h\nu 4\tau_N} \quad (2.8)$$

donde $s(\nu) = \frac{\gamma_N}{2\pi[(\nu - \nu_0)^2 + \gamma_N^2/4]}$ siendo γ_N el ancho natural.

El parámetro de saturación $\wp(\nu)$ puede definirse como

$$Bw(\nu) = \wp(\nu) Ax \quad (2.9)$$

Con frecuencias de saturación específicas ν . De $\wp(\nu)$ se obtienen f y por lo tanto el valor de la fuerza de saturación F . $\wp(\nu)$ también da la fuerza de los átomos del campo completo a diferentes ángulos con respecto de la órbita de equilibrio ya que en virtud del efecto Doppler tales átomos absorben a un cierto cambio de frecuencia. Explícitamente resulta

$$\wp(\nu) = \frac{\lambda_0^2 (1 + g_2/g_1) I(\nu) S(\nu)}{8\pi h\nu} = \wp(0) \frac{S(\nu)}{4\tau_N} \quad (2.10)$$

donde $\wp(0)$ es el grado de saturación logrado con una intensidad $I(\nu) = I_0$ al centro de la línea.

2.2 Saturación de la fuerza de esparcimiento en átomos

Haciendo uso de la teoría de Einstein con A y B siendo coeficientes de la tasa de emisión espontánea y de la tasa de emisión espontánea respectivamente, el principio de dicha teoría trata del equilibrio de dos niveles de un sistema, siendo estos dos niveles el nivel base o bajo y el nivel excitado o nivel de emisión estimulada en equilibrio térmico con presencia de radiación. El equilibrio térmico del número de átomos excitados N_2 está relacionado con el número de átomos en el nivel base N_1 por la relación de Boltzmann $N_1 / N_2 = e^{(-h\nu_{21}/kT)}$, donde $h\nu_{21}$ es la diferencia de energías entre los dos niveles. El equilibrio dinámico está expresado por:

$$W(\nu)B_{12}N_1 = AN_2 + W(\nu)B_{21}N_2 \quad (2.11)$$

Esto indica que la tasa de absorción estimulada para la formación de átomos excitados 1 a 2 de la izquierda es igual a la desintegración espontánea mas la tasa de emisión estimulada a partir de átomos en el estado 2 a 1 a la derecha. Estos términos de emisión estimulada contienen el factor $W(\nu)$ que es la densidad de energía por unidad de intervalo de frecuencia. Por argumentos que intervienen en la radiación de cuerpo negro, Einstein concluye que $B_{21} = B_{12} = B$. Llamando al número total de átomos como $N = N_1 + N_2$, con lo que se puede representar la fracción de átomos excitados en una fracción de tiempo en la que un átomo se mantiene en el estado excitado.

Se tiene que:

$$\frac{N_2}{N} = f = \frac{1}{[2 + A/W(\nu)B]} \quad (2.12)$$

A radiaciones de alta intensidad $W(\nu)B \gg A$ y f se satura a $1/2$. Aplicando la conservación de momento, la fuerza de esparcimiento en los átomos F_{scat} puede escribirse en términos de f como

$$F_{scat} = (h/\lambda)(1/\tau_n) f \quad (2.13)$$

y el valor máximo de F_{scat} puede representarse algebraicamente como:

$$F_{max} = (h/\lambda)(1/2\tau_n) \quad (2.14)$$

La fracción f puede ser expresada en términos del parámetro de saturación $\rho(\nu)$.

2.3 Fuerza gradiente en átomos

En lo que se refiere a cualquier entidad polarizable, el dipolo inducido ópticamente presenta una polarización o momento dipolar expresado como:

$$d = \alpha \vec{E} \quad (2.15)$$

donde α es la polarizabilidad de la partícula. En el gradiente del campo eléctrico se tiene que la fuerza del dipolo está establecida como:

$$F_{dip} = d \cdot \nabla \vec{E} \quad (2.16)$$

solo para una partícula con un momento dipolar permanente.

La fuerza dipolar induce ópticamente un dipolo que no presenta cambios en presencia de un campo eléctrico oscilante hacia atrás y adelante ya que el dipolo inducido por el gradiente del campo eléctrico a causa del cambio del signo en sincronía, dando como resultado una fuerza cuyo signo depende solamente del signo de la polarizabilidad α . La polarizabilidad α es dispersiva por naturaleza y cambia de signo a ambos lados con una frecuencia de resonancia ν_0 . Para $\nu > \nu_0$ y $\alpha > 0$, el signo de la fuerza dipolar jala al átomo a la región de mayor intensidad de la luz. Para $\nu < \nu_0$, los átomos son empujados a la zona de mayor intensidad de la luz. Estos comportamientos ligados a las frecuencias pueden observarse en el gráfico de la figura 2.2.

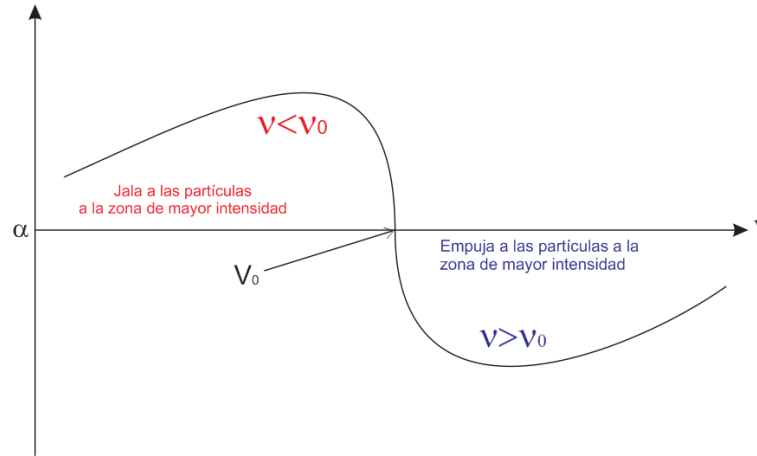


Fig. 2.2 Gráfico de la fuerza de dipolos en átomos. Mostrando la polarizabilidad como función de la frecuencia.

El análisis del comportamiento atómico es análogo a partículas macroscópicas con índices altos y bajos, y se estudia aplicando los conceptos del oscilador armónico.

Imagínese un electrón puntual de masa m y carga $-e$ obligado a estar fijo en un punto del espacio por un resorte con constante de fuerza k y una velocidad dependiente de la constante de amortiguamiento γ . Si se tiene la presencia de un campo eléctrico que es la parte real de $Ee^{i\omega t}$ mientras que la amplitud del movimiento se describe como la parte real de $\chi e^{i\omega t}$, entonces la ecuación de movimiento para el electrón está dada como:

$$m \left(\frac{d^2 x}{dt^2} \right) + m\gamma \left(\frac{dx}{dt} \right) + kx = -eEe^{i\omega t} \quad (2.17)$$

Si se resuelve por medio de las derivadas $d^2 x / dt^2$ y dx / dt y definimos $\omega_0^2 \equiv k / m$, donde ω_0 es la frecuencia de resonancia del oscilador.

En dado caso de buscar la frecuencia en dependencia de la amplitud de la oscilación se tiene que:

$$\chi(\omega) = \frac{-(e/m)E}{\omega_0^2 - \omega^2 + i\omega\gamma} \quad (2.18)$$

Se puede escribir la polarización compleja del oscilador como:

$$P = -ex = \alpha E \quad (2.19)$$

siendo $\alpha = -ex$ la polarizabilidad compleja. En cuanto a encontrar la parte real de la polarización $\text{Re}[P]$, es necesario encontrar la parte real de $\text{Re}[\alpha E] = \text{Re}[-ex]$. Si se consideran frecuencias cerradas para ω_0 se puede escribir $\omega_0^2 - \omega^2$ como $2\omega_0(\omega_0 - \omega)$ en la ecuación 2.18. Ahora bien, aplicando racionalización y usando la notación $\Delta\nu = \gamma / 2\pi$ y $\omega = 2\pi\gamma$, la ecuación de la frecuencia puede reescribirse como:

$$-ex = \frac{e^2}{m\omega_0\gamma} \left[\frac{(\nu_0 - \nu)}{(\nu_0 - \nu)^2 + (\Delta\nu/2)^2} - i \frac{\Delta\nu}{(\nu_0 - \nu)^2 + (\Delta\nu/2)^2} \right] \quad (2.20)$$

Entonces la parte real de $-ex$ está dada por la polarizabilidad α como $P = \alpha E$.

2.4 Tipos de trampas ópticas

En el caso de las pinzas ópticas se aplican diferentes principios para el atrapamiento y la manipulación de micropartículas ($<100\mu\text{m}$). El comportamiento de la micropartícula que se desea atrapar puede ser predicho por diferentes modelos, en los cuales intervienen aspectos como el tamaño de la partícula con respecto a la longitud de onda utilizada, la densidad de la partícula, el índice de refracción que presenta, la potencia del haz que se emplea para el atrapamiento así como la apertura numérica y la distancia focal del objetivo de microscopio que enfoca el haz. Existen dos tipos de pinzas ópticas dependiendo si empujan o jalan a la partícula que se quiere confinar. El tipo de trampa que jala la partícula recibe el nombre de pinza óptica tipo trampa, mientras que el arreglo de pinzas ópticas que ejerce una fuerza de empuje sobre el micro objeto se le denomina pinzas ópticas de levitación. La imagen que se presenta a continuación muestra los dos tipos de trampa según el mecanismo de confinamiento que presente.

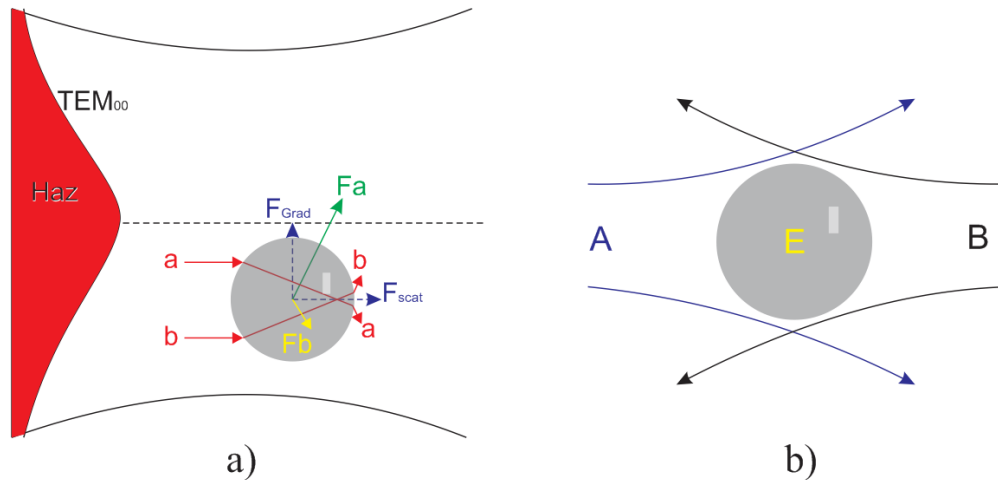


Fig. 2.3 El caso a) presenta una trapa por presión de radiación, mientras que el caso b) ilustra una trapa por levitación.

La acción de la trapa en una esfera dieléctrica es descrita por la fuerza total de un par de rayos a y b convergentes del haz incidente, suponiendo por simplicidad que la reflexión sea cero. En esta aproximación las fuerzas F_a y F_b se muestran apuntando en dirección al cambio de momento a causa de la refracción. Se observa que para desplazamientos arbitrarios de la esfera medidos desde su centro hasta el punto de convergencia de los haces (suma vectorial de F_a y F_b) la fuerza de restauración neta F se dirige hacia un punto detrás del foco, en este caso, la trapa es estable como lo muestra la figura 2.4.

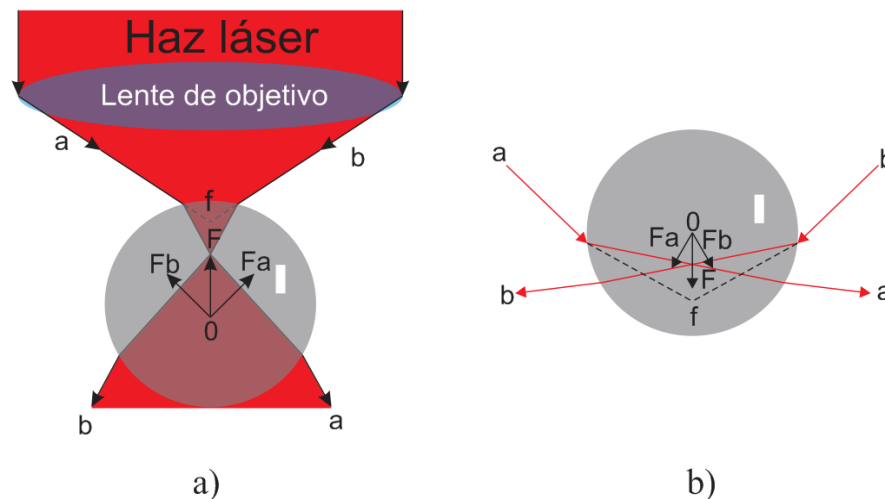


Fig. 2.4 La figura a) presenta el fenómeno de pinzas ópticas al jalar la partícula, y la imagen b) es el caso donde empuja a la partícula por presión de radiación siendo ambos casos estables.

Existen tres tipos de teorías que explican el atrapamiento óptico, y las cuales se rigen principalmente por el tamaño de la partícula con respecto a la longitud de onda utilizada en la pinza óptica. La primera teoría se basa en el trazo de rayos se emplea cuando la partícula que se desea atrapar y manipular tiene dimensiones mucho mayores que la longitud de onda ocupada en el arreglo experimental. La segunda Teoría se debe a Mie²³ y se analizan casos en los que la partícula es del orden o muy cercana a la longitud de onda con la que se está haciendo el arreglo de pinzas ópticas, esta es principalmente una teoría para partículas esféricas que permanecen en un medio con índice de refracción diferente a la partícula, aunque con algunos ajustes se pudiese hacer la teoría para partículas elípticas. La tercer teoría se basa en el Esparcimiento de Rayleigh; esta se refiere a analizar el atrapamiento de micropartículas cuyas dimensiones son mucho menores que la longitud de onda aplicando para ello la fuerza de Lorentz y por lo tanto las leyes de Maxwell.

2.4.1 Régimen de óptica de rayos

El régimen de trazo de rayos se aplica cuando el objeto a confinar por la pinza óptica presenta dimensiones mucho mayores que la longitud de onda con la que se está realizando el atrapamiento y, el mecanismo de captura puede explicarse aplicando conceptos de la óptica geométrica describiendo el fenómeno desde un punto de vista cualitativo.

En las pinzas ópticas el principio básico es la transferencia de momento del grupo de fotones que impactan sobre el microobjeto. Este razonamiento descompone el haz incidente en rayos individuales con su propia dirección y potencia, que al cambiar la dirección de su trayectoria a causa de pasar por medios dieléctricos transfieren momento a la partícula en procesos ya sea de reflexión o de refracción. Hay que considerar que en este tipo de razonamiento los efectos difractivos debido a la longitud de onda empleada resultan despreciables.

²³ Gerard Gouesbet, Gérard Gréhan, "Generalized Lorenz-Mie Theories", Ed. Springer.

La trampa óptica consiste en un haz paralelo de estructura y polarización arbitrarias que entra por completo en la pupila de entrada de un objetivo de microscopio y es enfocado rayo por rayo a un punto focal adimensional.

En la figura 2.5 se muestra el caso donde f está localizado a lo largo del eje z de propagación del haz. El máximo ángulo de convergencia de los rayos se debe a la apertura numérica del objetivo por lo que es conveniente utilizar objetivos de microscopio con apertura numérica grande para que los rayos converjan rápido.

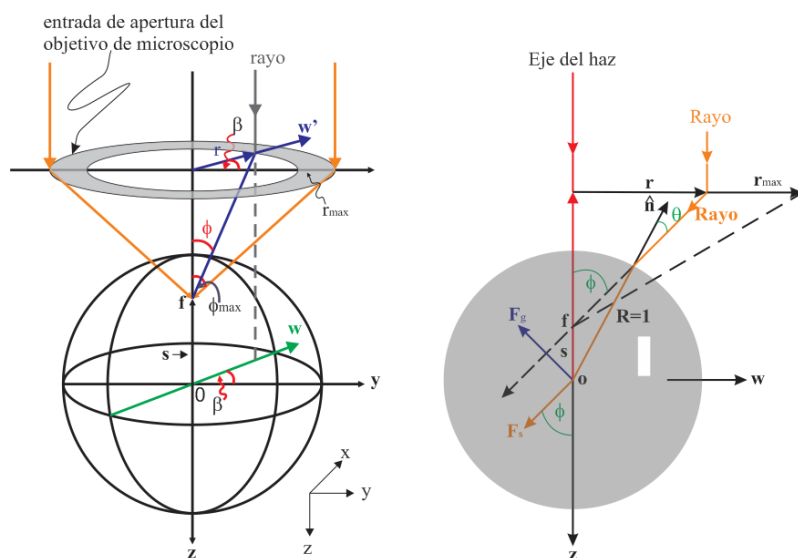


Fig. 2.5 Trampa de fuerza gradiente por un haz simple en el régimen de rayos con el foco del haz f localizado a lo largo del eje Z de la esfera. Geometría del haz incidente conteniendo las contribuciones de fuerzas gradiente F_g y de esparcimiento F_s .

Para poder encontrar la fuerza sobre la partícula es necesario hacer la suma de todas las contribuciones de los rayos del haz que entran en el objetivo de microscopio con apertura de radio r y que viajan con un ángulo β entre la dirección del eje z y el eje y , mostrada en la figura 2.6.

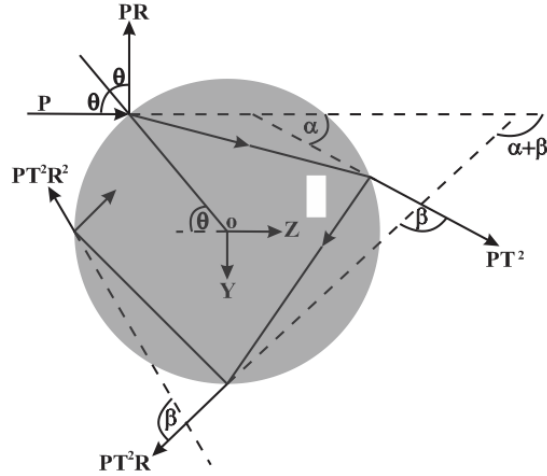


Fig. 2.6 Geometría para el cálculo de la fuerza debido al espereamiento de un solo rayo con potencia P por una esfera dieléctrica, mostrando el rayo reflejado PR y el conjunto infinito de rayos refractados PT^2R^n .

Estos haces inciden sobre la partícula formando un ángulo θ respecto a la normal de la superficie lo que da como resultado una fuerza que depende de la potencia PR y una cantidad infinita de rayos refractados y reflejados que decrecen en potencia dados por $PT^2, PT^2R, \dots, PT^2R^n, \dots$, donde las cantidades R y T son la reflectancia y la transmitancia relacionados con los coeficientes de Fresnel respectivamente. La fuerza neta que actúa en el centro de la partícula puede ser descompuesta en sus componentes F_z y F_y según lo expresado por Roosen²⁴ e Inbert²⁵ quienes encontraron que para la fuerza de espereamiento sus componentes eran:

$$F_z = F_s = \frac{n_1 P}{c} \left\{ 1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2r) + R \cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right\} \quad (2.21)$$

$$F_y = F_g = \frac{n_1 P}{c} \left\{ R \sin 2\theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2r) + R \sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right\} \quad (2.22)$$

siendo θ y r los ángulos de incidencia y refracción, mientras que $n_1 P / c$ es el momento incidente por segundo del rayo con potencia P en un medio de índice de refracción n_1 .

²⁴ G. Roosen, Optical levitation of spheres, *Can. J. Phys.* **57**, 1260 – 1279 (1970).

²⁵ G. Roosen and C. Inbert, Optical levitation by means of two horizontal lasers beams: Theoretical and experimental study, *Phys. Lett. A.* **59**, 6 – 8 (1976).

Estas ecuaciones son sumas sobre todos los rayos esparcidos y por lo tanto son exactas. Las fuerzas de polarización dependen siempre de R y T ya que son rayos polarizados de manera diferente paralelos o perpendiculares al plano de incidencia.

En la ecuación 2.21 se expresa a F_z , la componente que apunta en la dirección del rayo incidente, como la componente de la fuerza de esparcimiento por este ángulo individual. Similarmente en la ecuación 2.22 se señala a F_y como la componente que apunta en la dirección perpendicular a la componente de la fuerza gradiente del haz.

Ahora bien, si se realiza la suma de las expresiones 2.21 y 2.22 se obtiene la magnitud de la fuerza originada por un solo rayo con una potencia P , quedando expresada como:

$$F_T = \frac{n_1 P}{c} [1 + R \cos 2\theta] + i \frac{n_1 P}{c} R \sin 2\theta - \frac{n_1 P}{c} T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n e^{i(\alpha+n\beta)} \quad (2.23)$$

siendo $n = n_2 / n_1$, que al realizar la suma por serie geométrica da como resultado:

$$F_T = \frac{n_1 P}{c} [1 + R \cos 2\theta] + i \frac{n_1 P}{c} R \sin 2\theta - \frac{n_1 P}{c} T^2 e^{i\alpha} \left[\frac{1}{1 - R e^{i\beta}} \right] \quad (2.24)$$

Estas condiciones son en el caso en que el índice de refracción de la partícula sea mayor que el índice del medio donde se encuentra inmersa, de lo contrario se realiza un análisis semejante y se obtiene que la fuerza sobre la micropartícula no es de atracción sino de repulsión, por lo que el arreglo de pinzas empuja el objeto en las zonas donde la intensidad del haz es mayor.

2.4.2 Régimen generalizado de Lorentz – Mie

Este es uno de los criterios de esparcimiento elástico, es decir involucra una transferencia de energía. La teoría de Lorentz – Mie se aplica estrictamente para micropartículas de geometría esférica que se encuentran inmersas en un medio con índice

de refracción diferente, aunque con algunos ajustes esto puede aplicarse a geometrías esféricas o elipsoidales.

En este régimen se toma en cuenta que la propagación del momento siempre va ligada a la propagación de una onda electromagnética, es decir, es una relación entre la energía E y el momento p que puede expresarse como

$$E = pc \tag{2.25}$$

Esta expresión resulta en la mecánica cuántica, donde c representa la velocidad de la luz.

Es posible con la densidad volumétrica establecer que el momento del campo es proporcional al vector de Poynting S , y puede escribirse algebraicamente como:

$$\frac{dp_i}{dV} = \epsilon_0 [E_j \wedge B_k]_i = \epsilon_0 \mu_0 S_i \tag{2.26}$$

donde E_j y B_k son los campos eléctrico y magnético respectivamente.

Ahora bien, considere una onda electromagnética en cuya dirección de propagación se encuentra el vector de Poynting S_i , puede escribirse el flujo del momento que pasa a través de una superficie infinitesimal dS con un ángulo θ que forman S_i y la normal a la superficie como lo muestra la figura 2.7.

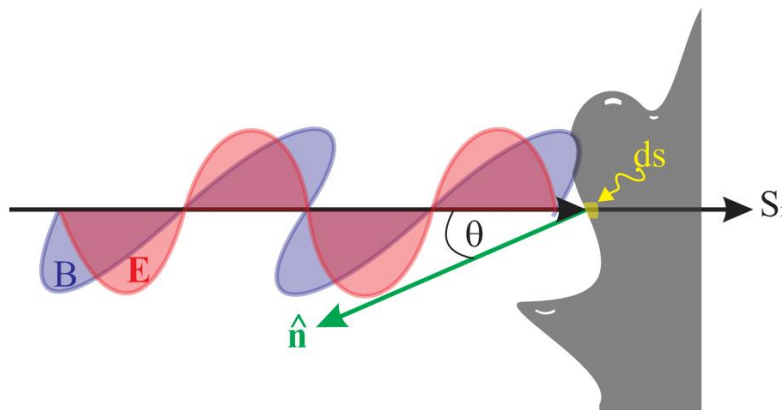


Fig. 2.7 Flujo de momento a través de un diferencial de superficie.

En el espacio libre, el momento fluye durante un tiempo muy corto dt , que es el momento del campo que se encuentra dentro de un cilindro oblicuo, con base dS y longitud $cdt = (\epsilon_0 \mu_0)^{-\frac{1}{2}} dt$, como se presenta en la figura 2.8.

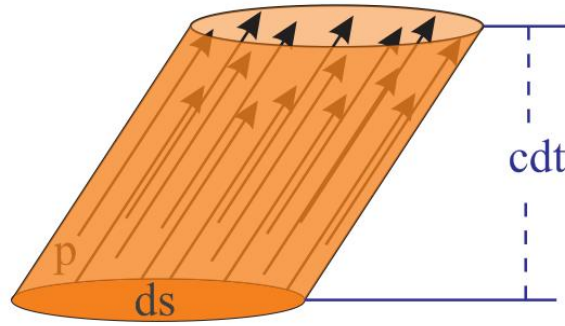


Fig. 2.8 Flujo del momento dentro de un cilindro oblicuo en un tiempo dt .

esto puede reescribirse de la siguiente forma:

$$dp_i = \sqrt{\varepsilon_0 \mu_0} S_i \cos \theta dS dt \quad (2.27)$$

Lo que puede observarse que este resultado es similar al expresado 2.26 y puede relacionarse con la ecuación 2.25 por medio de la mecánica cuántica considerando un espacio continuo.

En el caso de que solo se consideren campos armónicos, la parte real de la representación compleja dará el promedio sobre un número entero, n , de periodo T de la ecuación 2.27; entonces puede ser escrita como:

$$\frac{1}{nT} \int_0^{nT} dp_i = \sqrt{\varepsilon_0 \mu_0} \text{Re}(\bar{S}_i) \cos \theta dS \quad (2.28)$$

Tomando en cuenta que la relación 2.28 es de tipo vectorial, y se refiere al promedio temporal del flujo del momento de un campo por unidad de tiempo que atraviesa una superficie infinitesimal dS . Esta es la relación que se aplica al calcular la presión de radiación en la sección transversal cuando el momento está en equilibrio ($dp = 0$).

Con lo anterior en mente, considérese la formulación electromagnética como resultado de una formulación cuántica que asocia el momento $h\nu/c$ con la energía de un fotón $h\nu$, con ello se tiene la relación:

$$P_i^+ = S_i^+ / c \quad (2.29)$$

Cuando la luz es absorbida por la partícula el momento transferido es asociado a la energía transferida por la presión de radiación. Comúnmente se emplea el vector de la sección transversal de la presión de radiación $C_{pr,i}$ en vez de sus componentes, por lo que es más común observar la expresión matemática $C_{pr,i} = cF_i^+$.

A lo largo de la dirección longitudinal en la dirección z , la presión de radiación de la sección transversal de la componente $C_{pr,z}$ es expresada por la siguiente relación algebraica:

$$C_{pr,z} = cF_z^+ = -\int_{(s)}^+ \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left[E_j^i \wedge H_n^{8*} + E_j^8 \wedge H_n^{i*} \right] r dS \cos \theta - \int_{(s)}^+ \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left[E_j^8 \wedge H_n^{8*} \right]_r dS \cos \theta \quad (2.30)$$

en donde el símbolo $+$ en la integral hace recordar la condición de normalización para medios no absorbentes dada por:

$$\frac{E_0 H_0^*}{2} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} |E_0|^2 = 1 \quad (2.31)$$

En el caso de la ecuación (2.30) el primer término se refiere a la transferencia de momento a la partícula debido al haz incidente y, el segundo es el cambio momento debido a la onda esparcida por la partícula, siguiendo la misma geometría de una superficie S de forma esférica con radio $r \gg \lambda$ alrededor del centro de esparcimiento.

Similar a la componente en z , las componentes de la presión de radiación en la sección transversal $C_{pr,x}$ y $C_{pr,y}$ están dadas por:

$$C_{pr,x} = cF_x^+ = -\int_{(s)}^+ \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left[E_j^i \wedge H_n^{8*} + E_j^8 \wedge H_n^{i*} \right]_r dS \sin \theta \cos \varphi - \int_{(s)}^+ \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left[E_j^i \wedge H_n^{8*} \right]_r dS \sin \theta \cos \varphi \quad (2.32)$$

$$C_{pr,y} = cF_y^+ = -\int_{(s)}^+ \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left[E_j^i \wedge H_n^{8*} + E_j^8 \wedge H_n^{i*} \right]_r dS \sin \theta \sin \varphi - \int_{(s)}^+ \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left[E_j^i \wedge H_n^{8*} \right]_r dS \sin \theta \sin \varphi \quad (2.33)$$

Estas últimas expresiones pueden reescribirse de una manera corta como:

$$C_{pr,x} = \overline{\sin \theta \cos \varphi} C_{ext} - \overline{\sin \theta \cos \varphi} C_{sca} \quad (2.34)$$

$$C_{pr,y} = \overline{\sin \theta \sin \varphi} C_{ext} - \overline{\sin \theta \sin \varphi} C_{sca} \quad (2.35)$$

donde C_{ext} y C_{sca} están dadas por:

cada término puede ser expresado en términos de la ecuación esférica de Bessel y del campo eléctrico radial de la siguiente forma:

$$\overline{\sin \theta \cos \varphi C_{sca}} = \int_0^\pi \int_0^{2\pi} (I_\theta^+ + I_\varphi^+) r^2 \sin^2 \theta \cos \varphi d\theta d\varphi \quad (2.36)$$

Esto requiere hacer el cálculo de una nueva integral la cual es:

$$\int_0^{2\pi} \cos \varphi e^{ik\varphi} e^{-ik'\varphi} d\varphi = \pi (\delta_{k',k+1} + \delta_{k,k'+1}) \quad (2.37)$$

puediendo entonces expresar la ecuación (2.37) como:

$$\overline{\sin \theta \cos \varphi C_{sca}} = \frac{\lambda^2}{4\pi} \sum_{p=-\infty}^{+\infty} \sum_{n=|p| \neq 0}^{+\infty} \sum_{m=|p+1| \neq 0}^{+\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \frac{2m+1}{m(m+1)} [I_5 \operatorname{Re}(U_{nm}^p) + I_6 \operatorname{Re}(V_{nm}^p)] \quad (2.38)$$

siendo

$$U_{nm}^p = a_n a_m^* g_{n, TM}^p g_{m, TM}^{p+1*} + b_n b_m^* g_{n, TE}^p g_{m, TE}^{p+1*} \quad (2.39)$$

$$V_{nm}^p = i b_n a_m^* g_{n, TE}^p g_{m, TM}^{p+1*} - i a_n b_m^* g_{n, TM}^p g_{m, TE}^{p+1*} \quad (2.40)$$

donde I_6 y I_5 son integrales de θ calculadas de la siguiente manera:

$$I_5 = \int_0^\pi (\tau_n^{p|} \tau_m^{p+1|} + p(p+1) \pi_n^{p|} \pi_m^{p+1|}) \sin^2 \theta d\theta \quad (2.41)$$

$$I_6 = \int_0^\pi (p \tau_n^{p|} \tau_m^{p+1|} + (p+1) \pi_m^{p+1|} \tau_n^{p|}) \sin^2 \theta d\theta \quad (2.42)$$

de manera similar se obtienen 2 términos más provenientes de las integrales no analizadas en esta tesis, estos dos términos son²⁶:

$$S_{nm}^p = (a_n + a_m^*) g_{n, TM}^p g_{m, TM}^{p+1} + (b_n + b_m^*) g_{n, TE}^p g_{m, TE}^{p+1*} \quad (2.43)$$

$$T_{nm}^p = -i(a_n + b_m^*) g_{n, TM}^p g_{m, TE}^{p+1*} + i(b_n + a_m^*) g_{n, TE}^p g_{m, TE}^{p+1*} \quad (2.44)$$

Llamamos ε^+ la reducción geométrica de la potencia incidente de la partícula. La relación de los factores de eficiencia empleados por el régimen de Lorentz – Mie pueden definirse matemáticamente como:

$$Q_i = \frac{C_i}{\varepsilon^+} \quad (2.45)$$

i representa *sca*, *abs*, *ext* o *pr*, además de que junto con Q_i son factores adimensionales. Para una onda plana ε^+ es simplemente $\pi d^2 / 4$ en donde d es el diámetro de la partícula

²⁶ Gérard Gousebet, Gérard Gréhan, “*Generalized Lorenz – Mie Theories*”, ed. Springer, Berlin, 2011, pp 73.

ya que la intensidad reducida incidente por unidad de área se establece con una norma de optimización (2.31), por ello la expresión (2.45) simplemente está dada como:

$$Q_i = \frac{C_i}{\pi d^2 / 4} \quad (2.46)$$

Los factores de eficiencia más útiles son:

Q_{sca} : Factor de eficiencia de esparcimiento

Q_{abs} : Factor de eficiencia de absorción

Q_{ext} : Factor de eficiencia de extinción

En el caso de ondas que no son planas, ε^+ es más compleja de analizar pero puede emplearse el Teorema de Poynting. Ello depende de la naturaleza del rayo incidente y la ubicación del centro de esparcimiento del haz, aunque ello implica evaluar integrales de intensidades incidentes.

2.4.3 Régimen de Rayleigh.

Este Régimen se establece para explicar el esparcimiento cuando la longitud de onda es mucho mayor que las partículas en las que incide, además se considera que la partícula que se está analizado está colocada dentro de un campo eléctrico homogéneo E_0 . El campo propio de la partícula causa una polarización en ella misma al mismo tiempo que modifica su campo interno y de las partículas vecinas. Al campo que resulta de la combinación de estas interacciones es representado simplemente como E .

Si se considera a p como el momento dipolar inducido, entonces se puede aplicar la electrostática dada por:

$$p = \alpha E_0 \quad (2.47)$$

Siendo nuevamente α la polarizabilidad de la partícula. Hay que enfatizar que E tiene unidades de carga por unidad de área mientras que las unidades de p son carga por unidad de longitud, y α tiene unidades de volumen, es por ello que en el caso de tener cuerpos homogéneos con volumen V se tendrá una polarizabilidad homogénea denotada por α' , la cual presenta la siguiente relación:

$$\alpha = \alpha' V \quad (2.48)$$

donde α' es adimensional y es claro que α representa un tensor, en una única dirección donde ambos medios coinciden y por lo que es necesario describir a \mathbf{p} y E_0 como tensores de 2º grado para considerar las coordenadas direccionales, estas representaciones tensoriales son:

$$E_0 = E_1 n_1 + E_2 n_2 + E_3 n_3 \quad (2.49)$$

$$p = \alpha_1 E_1 n_1 + \alpha_2 E_2 n_2 + \alpha_3 E_3 n_3 \quad (2.50)$$

Esta formulación es conocida como la teoría electrostática para el caso en que un campo constante se hace incidir sobre un campo variable de una onda polarizada, dada por:

$$\vec{E}_0 e^{i\omega t} \quad (2.51)$$

este campo induce un momento dipolar descrito por la siguiente ecuación:

$$p e^{i\omega t} \quad (2.52)$$

por estas dos componentes que el tensor α puede ser complejo como depender de ω , y es con ello que podemos explicar el fenómeno de esparcimiento de Rayleigh (Rayleigh scattering).

Considérese un punto p a una distancia tal que $r \gg \lambda$ de la partícula y en una dirección tal que describa un ángulo γ con p . El campo eléctrico de la onda esparcida es

$$E = \frac{k^2 p \sin \gamma}{r} e^{-ikr} \quad (2.53)$$

y apunta en la dirección perpendicular al radio vector, como lo muestra la figura 2.9.

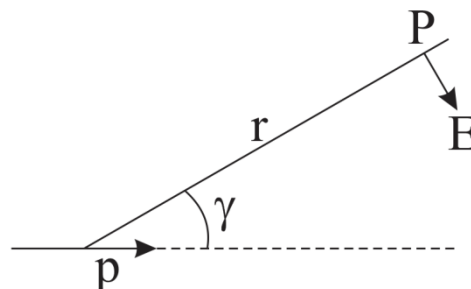


Fig. 2.9 Dipolo eléctrico de esparcimiento

Las intensidades correspondientes a la radiación incidente y esparcida son:

$$I_0 = \frac{c}{8\pi} |E_0|^2, \quad I = \frac{c}{8\pi} |E|^2$$

que al momento de integrar sobre una esfera da como resultado el total de la energía esparcida en todas direcciones por unidad de tiempo que es:

$$W = \frac{1}{3} k^4 c |p|^2 \quad (2.54)$$

que al dividir por I_0 se obtiene el esparcimiento de la sección transversal, que resulta estar dada como:

$$C_{sca} = \frac{8}{3} \pi k^4 |\alpha|^2 \quad (2.55)$$

donde $|\alpha|^2$ se define como se muestra en la ecuación siguiente

$$|\alpha|^2 = l^2 |\alpha_1|^2 + m^2 |\alpha_2|^2 + n^2 |\alpha_3|^2 \quad (2.56)$$

siendo l, m y n los cosenos directores de E_0 con respecto a los tres ejes del tensor de polarizabilidad (2.50), el valor de $|\alpha|$ está determinado por la orientación de E_0 con respecto a la partícula, mientras que la dirección de la luz incidente resulta irrelevante. Por otra parte, la distribución angular de la luz esparcida está establecida por el ángulo formado con el tensor de polarizabilidad \mathbf{p} .

Para partículas con índices de refracción cercanos a 1 tenemos que el momento dipolar \mathbf{p} para una partícula sólida en un campo eléctrico es igual a:

$$\mathbf{p} = \int \mathbf{P} dV \quad (2.57)$$

donde dV es el elemento de volumen de la partícula mientras que \mathbf{P} es la polarización por unidad de volumen, que para cualquier punto contenido dentro de la partícula está dado como:

$$\mathbf{P} = (m^2 - 1)(\mathbf{E} / 4\pi) \quad (2.58)$$

donde E es el campo eléctrico y m es el índice de refracción complejo en el elemento de volumen considerado.

El campo E puede ser igualado al campo aplicado E_0 dando como resultado:

$$\alpha = \frac{1}{4\pi} \int (m^2 - 1) dV \quad (2.59)$$

y si además la partícula es homogénea se tiene que:

$$\alpha = (m^2 - 1)(V / 4\pi) \quad (2.60)$$

pero estos resultados son independientes de la dirección y se mantiene para partículas de forma arbitraria. En este caso los resultados para la sección transversal son:

$$C_{sca} = \frac{k^4 V^2}{6\pi} |m^2 - 1|^2 \quad (2.61)$$

$$C_{abs} = -kV \operatorname{Im}(m^2 - 1) \quad (2.62)$$

La ecuación $m^2 = \varepsilon - 4\pi i\sigma / \omega$, donde $\omega = kc$, $\varepsilon \approx 1$ y $\gamma = 4\pi\sigma / \omega$ bajo las condiciones de índice de refracción cercano a 1 reduce la expresión (2.62) a:

$$C_{abs} = 4\pi\sigma V / c = \gamma V$$

Con la geometría de la partícula, podemos tener los siguientes resultados en cuanto a los términos de polarizabilidad y volumen.

Esféricas	Elipsoidales
$\alpha = \frac{3(m^2 - 1)}{4\pi(m^2 + 2)}$	$\alpha_{j=1,2,3} = pE_0 = PV$
$V = \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} a^3$	$V = \left(L_{j=1,2,3} + \frac{1}{m^2 - 1} \right) 4\pi\alpha_{j=1,2,3}$

Ahora bien, en el caso de que se tengan partículas compuestas anisotrópicamente la ecuación fundamental será:

$$E = E_0 - L4\pi P \quad (2.63)$$

si $4\pi P = (\varepsilon - 1)E$. En el caso de los materiales anisotrópicos, p es una constante dada como $p = PV = \alpha E_0$, donde α nuevamente es un tensor.

Si en dado caso se desea eliminar p se tiene que:

$$E_0 = \{1 + L(\varepsilon - 1)\} E \quad (2.64)$$

CAPÍTULO III

ESPECTROSCOPIA RAMAN

En esta parte se abarcan los conceptos tanto del efecto Raman como de la espectroscopía Raman, también se abarcan los efectos de polarización que se generan en moléculas y en objetos con geometría esférica, además de describir el mecanismo de mejoramiento de superficie por partículas metálicas para mejorar la señal detectada.

3.1 Efecto Raman

La espectroscopía aprovecha el fenómeno del esparcimiento de la luz para conocer la forma estructural de materiales, además de saber cuál es su organización intermolecular al detectar el tipo de vibración que genera el bombardeo del material con cierta longitud de onda, siempre aplicando el Régimen de Rayleigh para su análisis teórico.

La descripción teórica de la luz se puede tratar de dos formas completamente diferentes, la teoría corpuscular (fotones) y la teoría ondulatoria (ondas). En la teoría corpuscular el comportamiento de los fotones y en especial en la interacción de la materia con estos definen las leyes que rigen a la óptica cuántica. Para el caso de ondas, se emplea la teoría electromagnética y explica la interacción de las ondas con la materia a través de las ecuaciones de Maxwell.

En el caso del análisis corpuscular, la energía de los fotones es:

$$E = h\nu \quad (3.1)$$

donde h es la constante de Planck ($h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ Js}$) y ν representa la frecuencia de la luz. La velocidad de la luz en el vacío c y la longitud de onda λ pueden relacionarse como se muestra a continuación:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (3.2)$$

Por lo tanto, la energía electromagnética de las ondas es inversamente proporcional a la longitud de onda. De manera particular en la espectroscopía vibracional el inverso de la longitud de onda es empleado para denotar el número de onda k y se expresa en cm^{-1} .

En el caso de la teoría referente a ondas electromagnéticas, la propagación de estas puede representarse con la siguiente ecuación

$$A(\varphi) = A_0(\varphi)e^{i(\omega t - \delta)} \quad (3.3)$$

Siendo A_0 el vector de amplitud de la onda, ω su frecuencia angular, t el tiempo, δ el ángulo de fase o simplemente la fase y φ el ángulo de polarización o la polarización sencillamente. La frecuencia angular a su vez puede representarse como una relación entre el índice de refracción y la longitud de onda por lo que su representación algebraica queda dada como:

$$\omega = 2\pi \frac{c}{\lambda n} \quad (3.4)$$

Esta ecuación se aplica en el caso que la propagación de la luz sea en medios no absorbentes, en caso contrario si el medio absorbe la ecuación de propagación se modifica a causa de que se emplean índices complejos n^* en vez de n , estos índices se relacionan de la siguiente manera:

$$n^* = n + ik \quad (3.5)$$

donde n y k son siempre no negativos. Siguiendo con el análisis en medios absorbentes, el coeficiente de absorción empleado a se presenta como:

$$a = \frac{4\pi k}{\lambda} \quad (3.6)$$

Cuando un haz de luz incide en un material absorbente, se puede describir la Intensidad I como:

$$I = I_0 e^{-\alpha l} \quad (3.7)$$

siendo l la longitud de camino óptico de la luz en el medio absorbente; esta expresión de donde surge la ley de Lambert - Beer :

$$I = I_0 e^{-\epsilon c l} \quad (3.8)$$

siendo ϵ el coeficiente de absorción del medio mientras que c es la concentración de la absorción compuesta. La ley de Lambert – Beer es más comúnmente encontrada en su representación logarítmica como:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = A = \epsilon cl \quad (3.9)$$

En el medio, la absorción de la luz causa una transición del nivel energético base a un estado excitado en particular. Dependiendo de la energía de la luz y de la naturaleza química del compuesto en interacción, el estado excitado puede diferenciarse de muchas maneras como se muestra en la Figura 3.1.

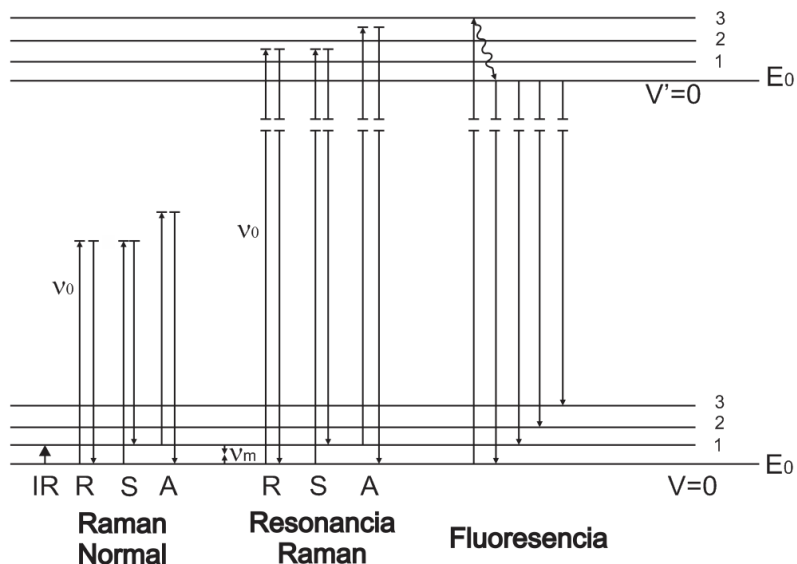


Fig. 3.1 Comparación de los niveles de energía de Raman normal, resonancia Raman y el espectro de fluorescencia para los casos de esparcimiento Rayleigh “R”, esparcimiento Raman tipo Stoke “S” y esparcimiento Raman Anti Stokes “A”.

Las rotaciones y vibraciones son estimuladas en el rango espectral del infrarrojo. En el rango del UV – Vis la absorción de la luz causa excitaciones electrónicas y vibracionales. La relajación de los estados excitados al estado basal puede causar emisión de radiación o luminiscencia, ambos aspectos también son evaluados espectroscópicamente. Los cambios electrónicos y vibracionales pueden ser excitados al mismo tiempo, pero se analizan por separado ya que presentan diferentes transiciones de energía en los diferentes tipos de

excitación óptica. Los parámetros espectrales de las bandas que se consideran en los análisis son:

- Posición de la línea máxima
- Intensidad de la línea
- Forma de la línea

3.2 Espectroscopía Raman

El efecto Raman es un efecto de esparcimiento de la luz. El rayo monocromático que se emplea para generar la excitación del material a analizar debe ser de alta intensidad, esto con el fin de generar en la molécula un estado de energía virtual como se mostró en la figura 3.1. La mayoría de las moléculas que se relajan y descienden al estado base $S_{0,0}$, emiten luz con una longitud de onda similar a la empleada para su excitación, solamente un pequeño porcentaje de las moléculas excitadas permanece en un estado vibracional excitado, lo que genera que los fotones emitidos por este pequeño grupo de partículas sean más pequeños energéticamente que los fotones para excitarlas, a causa de esto el efecto de esparcimiento Raman presenta una baja intensidad por lo que la instrumentación empleada necesita ser de gran calidad y precisión. El esparcimiento Raman puede ser generado tanto en el espectro del ultravioleta como el visible o el infrarrojo.

En el caso del esparcimiento de radiación Raman la magnitud del vector de campo eléctrico E de la radiación de excitación está modulada por vibraciones moleculares. En este caso el momento dipolar inducido μ' es^[29]:

$$\mu' = \alpha E + \frac{1}{2} \beta E^2 + \frac{1}{6} \gamma E^3 + \dots \quad (3.10)$$

Siendo α la polarizabilidad molecular el término tridimensional (tensor de 2° grado), mientras que el momento dipolar es un término bidimensional, aunque es expresado en términos de la intensidad del campo, por lo que la ecuación (3.10) puede expresarse en una forma lineal. Basado en este hecho, el efecto Raman convencional es conocido como “*efecto lineal Raman*”, en contraste en el “*efecto Raman no lineal*” se observa una excitación láser muy fuerte y, es en este último caso donde se pueden encontrar efectos

como; el efecto híper Raman, Efecto Raman Estimulado o la espectroscopía coherente Raman anti Stokes (CARS).

El método Raman es complementario al método de espectroscopía en IR, donde el estado vibracional excitado es completamente aprovechado. El espectro Raman consiste en una gráfica de la intensidad Raman contra el cambio Raman.

La complementariedad de los espectros Raman e IR se basa en las condiciones en las que estos son excitados, mientras que para el IR se hace un cambio en el momento dipolar, para el caso de Raman se genera un cambio de la polarización (tensor de cantidad). Como el tensor es una cantidad tridimensional, el radio de despolarización ρ puede obtenerse al medir el espectro Raman con luz polarizada en dirección paralela o perpendicular al plano de incidencia, es decir:

$$\rho = \frac{I_{//}}{I_{\perp}} \quad (3.11)$$

Un problema de la espectroscopía Raman es el fenómeno de fluorescencia, ya es 10^7 veces el esparcimiento Raman, incluso impurezas en la muestra pueden presentar una fluorescencia tan fuerte que es imposible observar el efecto Raman de manera analítica, por lo que es necesario que entre el estado de energía virtual y el estado electrónico excitado S_1 exista un gap suficientemente grande. La excitación NIR es la preferida porque se generan muy pocas transiciones electrónicas en el NIR, aunque existe el inconveniente de que en este tipo de excitación la intensidad de esparcimiento Raman se reduce drásticamente en un factor de λ_{ex}^{-4} .

3.3 Tensor Raman

Una de las propiedades esenciales asociada con el esparcimiento Raman en moléculas es el estado de polarización de la luz. Cambios en el estado de polarización afectan la naturaleza y la información contenida por la luz esparcida. Como se afirmó en la sección 3.1, la intensidad de la luz esparcida como resultado de algún experimento puede ser

expresada en términos de la polarizabilidad $\tilde{\alpha}_{\alpha\beta}$ y de los vectores de polarización de la radiación incidente y esparcida, \tilde{e}_α^i y \tilde{e}_α^d respectivamente teniendo como resultado:

$$I(\tilde{e}^d, \tilde{e}^i) = 90K \left\langle \left| \tilde{e}_\alpha^{d*} \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} \tilde{e}_\beta^i \right|^2 \right\rangle \quad (3.12)$$

En la ecuación (3.12) los brackets angulares determinan todos los ángulos de orientación de la molécula en el sistema de referencia del laboratorio. Esto es necesario para líquidos, soluciones y gases simples donde las moléculas no mantienen una orientación única en relación a un eje relativo o a ejes del marco de referencia del laboratorio. Los vectores de polarización tienen un subíndice mientras que el tensor de esparcimiento presenta dos. Para el caso en que los subíndices se repiten la suma de las direcciones cartesianas x , y y z está implícita, es por ello que la ecuación (3.14) tiene en realidad nueve términos dentro de los brackets, y estos brackets con dos superíndices establecen el cuadrado absoluto de las cantidades complejas de los brackets. En el caso del asterisco con superíndice representa el complejo conjugado del vector de polarización de la luz esparcida, además, se toma en cuenta la constante K que se establece como²⁷:

$$K = \frac{1}{90} \left(\frac{\omega^2 \mu_0 \tilde{E}^{(0)}}{4\pi R} \right)^2 \quad (3.13)$$

donde ω es la frecuencia angular de la luz esparcida, μ_0 es la permeabilidad magnética, $\tilde{E}^{(0)}$ es la intensidad del campo eléctrico de la radiación del láser incidente y R es la distancia de esparcimiento desde origen al detector.

Con todo lo anterior, se tiene que el tensor de polarizabilidad Raman está dado por^[29]:

$$\tilde{\alpha}_{\alpha\beta} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left(\frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega_0 + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega_0 + i\Gamma_j} \right) \quad (3.14)$$

Donde \hbar la constante de Planck dividida entre 2π y la suma es sobre todos los estados electrónicos excitados de las j – moléculas. Los estados n y m son distintos por vibraciones cuánticas de energía. Los denominadores contienen términos de frecuencia, y ω_{jn} es la

²⁷ Howell G. M. Edwards, “*Handbook of Raman Spectroscopy from the research laboratory to the process lines*”, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.

diferencia de frecuencias angulares entre los estados j y n . Los términos $i\Gamma_j$ son términos imaginarios proporcionales al ancho del estado de vibración j , por lo que el inverso de este es proporcional al tiempo de vida. El primero de los dos términos de la ecuación (3.14) es conocido como el término de resonancia. Las cantidades en los brackets son elementos matriciales de mecánica cuántica con operadores de momento dipolar eléctrico dados como:

$$\mu_\alpha = \sum_k e_k r_{k\alpha} \quad (3.15)$$

que es simplemente la suma sobre todas las cargas y posiciones en la dirección α -ésima de todas las k partículas, en la molécula, electrones y los núcleos. Para el esparcimiento Raman todos los electrones de la molécula necesitan ser incluidos en la suma a causa de que el núcleo no contribuye con la polarizabilidad.

3.4 Resonancia de espectro Raman

Para obtener resonancia de esparcimiento Raman el láser que se aplica debe tener una frecuencia corta de excitación a una transición electrónica. Idealmente, se aplicaría un láser sintonizable para la excitación, mientras que la frecuencia tendría que corresponder a la diferencia de energía fundamental de vibración al primer o segundo estado de vibración del estado excitado. Afortunadamente la máxima resonancia de esparcimiento Raman no requiere que se observe el efecto u obtener algún comportamiento.

En la figura 3.2 se muestra una transición desde el estado base al estado excitado, la diferencia radica en el tiempo en que la partícula permanece en el estado excitado. El proceso de esparcimiento es rápido en el caso del esparcimiento que ocurre antes de llegar a posiciones donde los núcleos se equilibran en el estado excitado, mientras que para la absorción también es muy rápida pero el electrón es absorbido por la molécula mientras los núcleos se relajan en las geometrías del estado excitado. Es por ello que los casos de absorción y esparcimiento Raman están separados por tiempo.

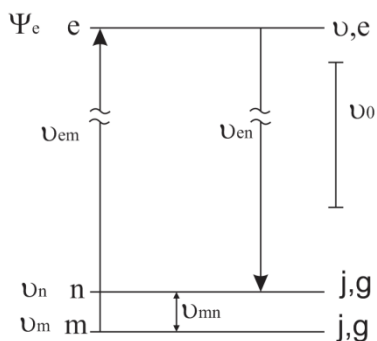


Fig. 3.2 Diagrama del nivel de energía para la transición en Resonancia Raman

Normalmente las fuentes que son empleadas en el fenómeno de absorción espectroscópica son policromáticas, es decir, contienen un amplio rango de frecuencias, y bajo estas circunstancias un gran número de transiciones están involucradas. Comúnmente la transición más intensa es uno de los niveles vibracionales más altos. La teoría predice que la resonancia de esparcimiento Raman más intensa en algunos casos proceden principalmente de los primeros niveles vibracionales.

El aumento de la intensidad de realce de la resonancia puede ser comprendida mediante el estudio de la ecuación de Kramer Heisenberg Dirac (3.14). La condición de resonancia se cumple cuando la diferencia de energías entre el estado basal y el primer estado vibracional y el estado vibracional tienen la misma energía que la luz de excitación ω_L . Esto significa que el denominador del primer término se reduce a $i\Gamma_I$, que es un pequeño factor de correlación, aunque hay que considerar el tiempo de vida en el estado excitado de la molécula, es por ello que en condiciones de resonancia el denominador es muy pequeño dando lugar a un primer término muy grande, incrementando la polarizabilidad y dando un mayor esparcimiento Raman. Por fortuna el segundo término de la ecuación (3.14), ω_{IF} y ω_L son sumadas y en consecuencia el término puede ser despreciado.

Es difícil obtener cualquier información electrónica a partir del espectro, sin embargo en la resonancia de esparcimiento Raman un estado vibracional en específico es tomado para proporcionar mucha información del comportamiento de esparcimiento además de

encontrarse cerca del punto de resonancia, y siempre tomando en cuenta que el tipo de esparcimiento depende del estado en el que se encuentra la molécula.

Otra diferencia importante entre la intensidad Raman y el esparcimiento de resonancia Raman es que en ambos casos la intensidad depende de la frecuencia a la cuarta potencia, aunque en la resonancia Raman la intensidad también depende en gran parte de la cercanía de esta con la frecuencia empleada para la excitación para que se genere alguna transición electrónica. En el caso de la ecuación (3.14) si la diferencia entre la frecuencia de excitación del láser y la frecuencia de excitación aumenta, el realce de la resonancia disminuirá drásticamente, además de que la mejora en el realce Raman está dado como el inverso de los números de onda aplicados, entre mas números de onda el realce será menor conforme se aleja del punto de resonancia máxima. Es por todo lo anterior que la dependencia de la frecuencia y la fuente de excitación en el infrarrojo es muy importante. Se pueden obtener mejoras en el espectro con un factor de 5 o mayores si se emplean moléculas con cromóforos visibles esto es porque el color de la molécula podría fácilmente ser 5 veces mas intenso como se esperaría en una corriente Raman.

3.5 Esparcimiento Raman de Superficie Mejorada (SERS)

La interpretación que se tiene del espectro SERS en muchos casos ha sido una experiencia frustrante cuando se aplica la técnica sin saber muchos detalles de ella, debido a que el espectro SERS observado es una función multivariable de factores los cuales la mayoría no pueden ser controlados o se desconocen por lo que es necesario analizar dichas variables. Las componentes involucradas en este caso son la molécula y la radiación incidente.

Para poder describir los espectros Raman observados deben de considerarse las siguientes medidas:

1. Los estados de energía vibracionales de la molécula están determinados.
2. La radiación incidente es descrita mediante su monocromaticidad, su polarización y su intensidad.

3. Se conoce la interacción entre la molécula y el campo radiante incidente, además de que la energía de interacción y las reglas de selección que establecerá un patrón del espectro observado son establecidos

En contraste, las componentes básicas involucradas en SERS son la molécula, la nanoestructura metálica y la radiación electromagnética.

Actualmente el SERS se conoce como un fenómeno asociado a la mejora del campo magnético que rodea pequeños objetos metálicos excitados cercanos a una resonancia intensa y violenta, como por ejemplo la resonancia dipolar como polarización de plasmones en la superficie. La mayoría de los campos dipolares reirradiados excitan a los absorbidos, y en el caso de que la radiación molecular resultante permanezca cerca de la resonancia del objeto a mejorar, se obtendrá como resultado una radiación esparcida mayor.

En condiciones apropiadas el campo resultante aumentará a una escala de E^4 , donde E es el campo óptico local.

La absorción y el esparcimiento de la luz por las nanopartículas metálicas son consideradas las propiedades más importantes para que se dé el fenómeno de SERS. Una condición necesaria para observar SERS es la resonancia de plasmones en nanoestructuras, por lo que si no se garantiza la existencia de resonancia de plasmones, los resultados no tienen por qué clasificarse como SERS.

En el caso de la extinción y el esparcimiento de esferas, estos fenómenos pueden ser explicados de manera exacta por la teoría de Mie sin hacer aproximaciones, sin embargo una aproximación proveniente de esta teoría puede ayudar a entender la física involucrada en el fenómeno de SERS. Por lo que, restringir la expansión de los coeficientes de esparcimiento a los primeros términos en el caso de partículas metálicas cuyas dimensiones son menores que la longitud de onda, la extinción y el esparcimiento se encuentran en el factor de proporción g , que es descrito como²⁸:

²⁸ Ricardo Aorca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, ed. Jhon Wiley & Son, Ltd., Ontario, Canada, 2006.

$$g = \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} \quad (3.16)$$

Este cálculo se realiza con la función dieléctrica del metal en función de la frecuencia ω en un medio con constante dieléctrica ε_m y donde el factor g presenta una singularidad a causa de la condición de resonancia de los plasmones $\varepsilon(\omega) = -2\varepsilon_m$.

El factor g es el mismo que en teoría electromagnética cuando se considera el problema de una pequeña esfera de radio a inmersa en un campo eléctrico uniforme y estático, donde la polarización de la esfera tiene un dipolo ideal que se presenta en términos de g como $p_0 = 4\pi\varepsilon_0 g a^3 E_0$. Por lo tanto, una frecuencia ω_0 que cumple la condición de resonancia $\varepsilon(\omega_0) = -2$ en el vacío, donde $\varepsilon_m = 1$ conduce al siguiente factor importante:

$$g_0 = \frac{\varepsilon(\omega_0) - 1}{\varepsilon(\omega_0) + 2} \quad (3.17)$$

Como $\varepsilon(\omega)$ es complejo, las condiciones de resonancia se cumplen para el caso en que $\text{Re}[\varepsilon(\omega_0)] = -2$, y la parte imaginaria se determina por un factor de calidad de resonancia.

Las siguientes dos secciones del capítulo se analizan porque cuando se dopan las muestras con partículas metálicas, al ser iluminadas con la longitud de onda del Raman se genera plasmones en la interfaz vidrio partículas metálicas, polarizándose las nanoesferas metálicas y por ende las partículas con las que se dopa la muestra.

3.5.1 Polarización en esferas

En el problema electrostático de una esfera de radio a con función dieléctrica característica $\varepsilon(\omega)$ inmersa en un medio con constante dieléctrica ε_m dentro de un campo uniforme a lo largo del eje z , donde el centro de la esfera está ubicado en el origen del

centro de coordenadas y el potencial Φ dentro y fuera de la esfera es solución de la ecuación de Laplace $\nabla^2\varphi=0$ cuya expresión general es^[28]:

$$\nabla^2\varphi=\nabla^2C_1\varphi_1+\nabla^2C_2\varphi_2+\dots+\nabla^2C_n\varphi_n=0 \quad (3.18)$$

Aplicando las condiciones de frontera para el caso de la expresión general, el potencial escalar a la salida de la esfera está dado como:

$$\Phi_{OUT}=-E_0r\cos\theta+g\frac{a^3}{r^2}E_0\cos\theta \quad (3.19)$$

El primer término es debido al campo incidente E_0 y es el resultado de las condiciones de frontera $(\Phi_{out})_{r\rightarrow\infty}=-E_0r\cos\theta$. El segundo término es equivalente al potencial proporcionado por un dipolo ideal en el centro de la esfera y que es el resultado de la polarización de la esfera con polarizabilidad α . El campo inducido por el dipolo en una esfera metálica expresado en unidades del sistema internacional es $p_0=\alpha E_0=4\pi\epsilon_0ga^3E_0$, cuya polarizabilidad general es:

$$\alpha=4\pi\epsilon_0\frac{\epsilon(\omega)-\epsilon_m}{\epsilon(\omega)+2\epsilon_m}a^3=4\pi\epsilon_0ga^3 \quad (3.20)$$

El factor g determinará el comportamiento de la polarizabilidad y del dipolo inducido además, el mejor comportamiento del campo dipolar ocurre en la condición de resonancia del plasmón. Para un campo externo con una frecuencia ω_0 en el vacío el factor g es simplemente:

$$g_0=\frac{\epsilon(\omega_0)-1}{\epsilon(\omega_0)+2} \quad (3.21)$$

El campo local es proveído por el gradiente $E=\nabla\Phi$ en coordenadas polares.

El esparcimiento depende del valor absoluto del cuadrado del campo, y E_r^2 con $r=a$ es:

$$E_r^2=(1+4g_0^2+4g_0)E_0^2\cos^2\theta=(1+2g_0)^2E_0^2\cos^2\theta \quad (3.22)$$

Como θ es el ángulo entre la dirección del campo aplicado y el vector \mathbf{r} localizado en la superficie de la esfera, el máximo comportamiento es alcanzado cuando $\theta=0$ o 180 . El esparcimiento recolectado en la región cercana al campo es proporcional a g_0^2 que es comúnmente llamado esparcimiento de Rayleigh.

3.5.2 Polarización en moléculas

Para una molécula aislada, el esparcimiento del campo Raman es dado por la inducción del dipolo $p_M = \alpha_M E_0$ donde α_M es la polarizabilidad molecular correspondiente. En Raman espontáneo, es decir cuando la teoría de Placzek de polarizabilidad es empleada, la variación de probabilidad α_M junto con las variaciones puede expresarse mediante cada componente del tensor de α en una serie de Taylor con respecto a la coordenada normal^[28]:

$$\alpha_M = \alpha_0 + \alpha_0^1 Q_1 + \frac{1}{2} \alpha_0^{11} Q_1^2 + \dots + \alpha_0^{12} Q_1 Q_2 + \dots \quad (3.23)$$

con

$$\alpha_0^1 = \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_1} \right)_0; \quad \alpha_0^{12} = \left(\frac{\partial^2 \alpha}{\partial Q_1 \partial Q_2} \right)_0$$

y donde $Q_1 = Q_{10} \cos(\omega_1 t + \delta_1)$ es la coordenada normal. El primer término corresponde al esparcimiento de Rayleigh y, el segundo se deriva de las derivadas dadas por el esparcimiento Raman de las vibraciones fundamentales y las demás corresponden a matices y combinaciones de estas.

En este capítulo se estableció el marco teórico del efecto y del espectro Raman que se implementará en el estudio de las muestras biológicas que se analizaron en este trabajo, además de comprender el tipo de señales que el espectrómetro genera a la salida del equipo. En el siguiente capítulo se describen detalladamente el proceso de adquisición de muestras,

los análisis bioquímicos que se les realizaron, mientras que en el capítulo cinco se describe el procedimiento de dopaje de las muestras estudiadas.

CAPÍTULO IV

ADQUISICIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

En este capítulo se describen los procedimientos para adquirir, manejar y mantener cepas bacterianas, además se tratan los procedimientos para la preparación de medio de cultivo con base de agar Muller Hinton. En otra sección del capítulo se describe el procedimiento que se llevó a cabo para adquirir nuevas cepas. Adicionalmente se muestra la técnica para conteo de colonias bacterianas empleando la celda de conteo Neubauer.

4.1 Muestras biológicas y no biológicas

En la naturaleza encontramos elementos a escala microscópica que al igual que en la escala macroscópica puede ser tanto biológicos como no biológicos. Para el caso del estudio que se lleva a cabo en esta tesis se tomarán ambos tipos de muestras. Las muestras no biológicas sirven para la etapa en la que se está desarrollando el arreglo experimental, ya que el tiempo de vida de este tipo de muestras es significativamente mayor que las biológicas además, como las muestras no biológicas tienen un tamaño promedio con poca variación son mejores para la caracterización del arreglo experimental. En el caso de que se desee analizar el arreglo experimental al interactuar con material vivo se hace uso de las muestras biológicas, en esta etapa se analizan los efectos que generan en el microorganismo la fuente de iluminación que se esté empleando, así como también se verifica que el sistema óptico tenga suficiente poder de resolución para observar este tipo de objetos.

En el caso de las muestras no biológicas utilizadas en este trabajo, se emplearon partículas de látex de 200 y 800 nanómetros de diámetro, suspendidos en una sustancia exopolimérica (EPS) positiva que no les permite formar aglomeraciones de partículas además de mantenerlas con carga positiva.

4.2 Muestras Biológicas

En el caso de las muestras biológicas se obtuvieron por parte del laboratorio clínico SERVIMED tres cepas con agentes biológicos, específicamente se obtuvieron colonias de las siguientes bacterias:

- ✚ *Escherichia Coli (E – coli)*
- ✚ *Staphylococcus Epidermidis*
- ✚ *Staphylococcus Aureus*

4.2.1 *Escherichia Coli*

La *E. coli* es la bacteria más estudiada por la humanidad desde su descubrimiento en 1885 por el bacteriólogo alemán Theodore Von Escherich²⁹, generalmente tiene presencia en los intestinos de animales y, por ende en aguas negras. Esta bacteria es la causa más común de infección en el tracto urinario y también es causante de diarreas alrededor del mundo. Estas se clasifican por las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa la enfermedad por diferentes mecanismos, entre este tipo de bacteria existen algunos tipos muy agresivos que causan diarreas hemorrágicas. El proceso de infección se inicia al ingerir alimentos contaminados y que no han sido cocinados a temperaturas mayores de 70°C. Los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia, como el embarazo, hipertrofia benigna o maligna de próstata y, en muchos casos el evento inicial de la infección es desconocido.

Como ya se mencionó la *E.- coli* puede causar infecciones del aparato excretor, además puede provocar cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa.

²⁹ J. Schulze, M. Schiemann, U. Sonnenborn, Jahre, E. Coli. Bedeutung in Forschung und Medizin, 2006 *Alfred-Nissle-Gesellschaft*.

4.2.2 *Staphylococcus Epidermidis*

Esta bacteria es la causa más frecuente de las infecciones en cuerpos extraños implantados, heridas o laceraciones cutáneas que en casos severos deriva en septicemia (presencia de bacterias en sangre a causa de su multiplicación no controlada) o endocarditis (inflamación del revestimiento interno de las cámaras y válvulas cardíacas). Las cepas que provocan infecciones asociadas a cuerpos extraños, suelen proceder de la flora interna del paciente. Sin embargo, también se producen infecciones hospitalarias externas. En cuanto a la patogenicidad, se sabe que las cepas de *S. epidermidis* poseen la capacidad de adherirse a polímeros y de generar biopelículas que surgen de la multiplicación y formación de una capa mucosa (glucocalix) del patógeno. Las biopelículas son focos infecciosos a partir de los cuales las bacterias entran en el torrente circulatorio y pueden causar una sepsis en pacientes inmunodeprimidos.

4.2.3 *Staphylococcus Aureus*

El *Staphylococcus aureus*, conocido comúnmente como estafilococo áureo o dorado, es una bacteria anaerobia facultativa grampositiva productora de coagulasa (proteína que interviene en el proceso de coagulación de la sangre) y catalasa (proteína que permite descomponer los residuos del metabolismo celular como el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua) que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas por ella.

Puede producir una amplia gama de enfermedades que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

En la actualidad, este microorganismo se erige como el principal causante de las infecciones hospitalarias. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado, o incluso, con otro paciente.

Morfológicamente el *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micras de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo.

4.3 Medios de cultivo

Para poder conservar con vida las muestras biológicas por dos o cinco semanas es necesario tener sustancias que contengan nutrientes para las bacterias a una temperatura adecuada, estas sustancias son conocidas como medios de cultivo y pueden ser líquidas, semilíquidas o sólidas. La preparación de los medios de cultivo en cualquiera de sus tres estados sino es idéntica es muy similar, esta preparación para el caso de agar Muller Hinton que tiene la característica de preservar las muestras por un mes aproximadamente y fue el empleado en las muestras obtenidas.

Para la elaboración de medio de cultivo con base de agar Muller Hinton lo primero que se debe hacer es medir en un matraz o vaso de precipitados la cantidad de agua destilada con la que se va a preparar el medio de cultivo, a una proporción de un litro de agua destilada por cada 38 gramos de agar Muller Hinton, se pesa la cantidad de agar equivalente a la cantidad de agua destilada que se tenga y se agrega a ella, dejando reposar la mezcla de 10 a 15 minutos para que se hidrate por completo. Ya con la mezcla rehidratada se procede

a calentar hasta el punto de ebullición, estado por el cual debe de permanecer durante uno o dos minutos con el fin de saturar la mezcla. Ya con la mezcla saturada y con un aspecto transparente se procede a esterilizar en un autoclave durante 15 minutos, a una presión de 100KPa y una temperatura de 120°C. Con el medio ya esterilizado, se extrae del autoclave y se deja enfriar hasta que tenga una temperatura aproximada a los 40°C, que es el punto donde se vacía a cajas de Petri estériles. En dado caso de que se desee preparar agar chocolate, será necesario agregar sangre de carnero antes del proceso de esterilización, calentando la mezcla a 80°C a baño maría durante 10 minutos sin que se sobrecaliente.

En el caso de necesitar microorganismos en suspensión para los experimentos con pinzas ópticas, será necesario preparar medios de cultivo líquidos uno de los cuales es conocido como caldo RMS nombre que proviene de sus creadores Man, Rogosa y Sharpe, este tipo de medio proporciona un medio no tan viscoso y donde los microorganismos pueden moverse con facilidad además de mantenerse con vida.

En el caso que el medio de cultivo no sea utilizado en el mismo día de elaboración debe mantenerse en refrigeración en un recipiente cerrado, esto con el fin de prevenir la contaminación del medio y la proliferación de bacterias.

4.4 Inoculación de Muestras

En el momento que se va a contaminar el medio de cultivo con alguna bacteria en específico, se deben de tomar las siguientes medidas de salubridad con el fin de no contaminar la muestra que se desea sembrar. El personal que efectúe la manipulación e inoculación de las cepas debe de portar guantes, tapaboca, bata y en algunos casos lentes protectores, además la zona en donde se realiza la manipulación de las muestras debe de ser desinfectada y esterilizada, limpiando con alcohol etílico toda la superficie alrededor de la zona donde se va a trabajar y manteniendo mecheros encendidos en la zona de trabajo. La llama de los mecheros proporcionan una zona salubre, libre de cualquier agente biológico que pudiese contaminar las muestras en un radio de 35 a 40 centímetros, por lo que se

recomienda que si se trabaja con un gran número de muestras se coloque más de un mechero para obtener un área de trabajo mayor.

Ya con la zona sanitizada, lo que se sigue es esterilizar el asa bacteriológica en la llama de un mechero hasta que llegue al rojo vivo durante un minuto para asegurar que no contenga ningún tipo de contaminante. El asa bacteriológica es un instrumento de laboratorio tipo pinza que consta de una base que puede estar hecha de platino, acero o aluminio y un filamento que puede ser de nicromo, tungsteno o platino que termina en aro o en punta, esta última parte es la que se esteriliza.

Ya con el asa esterilizada se procede a tomar una muestra de la bacteria que se va a sembrar en la caja de Petri que contiene el medio de cultivo estéril, se toma la caja de Petri y se hace un movimiento de zigzag conocido en el medio como estriado, este sirve para identificar alguna contaminación de la sepa si se observan bacterias fuera del área de estriado. En el momento en el que el medio de cultivo tiene la bacteria inoculada se tapa la caja de Petri y se sella con cinta adhesiva para posteriormente colocarse dentro de una incubadora a 37°C que es la temperatura promedio que necesitan las bacterias para sobrevivir. El proceso de incubación tarda dependiendo de la bacteria de 12 a 48 horas, donde si el proceso se hizo de manera adecuada y sin contaminación de ningún tipo se observará la colonia bacteriana a simple vista.

Para el caso de los medios de cultivo líquidos, se toma la muestra de bacterias con el asa esterilizada y se sumerge en el medio agitando muy poco, con ello se tienen bacterias suspendidas en un medio acuoso ideal para manipulación con pinzas ópticas. Este tipo de muestras también es necesario mantenerlas en incubación a 37°C e incluso en este tipo de medio es necesario agregar nutrientes para mantener viva la colonia, o cambiar cada 3 o 4 días el medio con la misma finalidad.

4.5 Adquisición de nuevas muestras

Para poder adquirir cepas nuevas en lo que se refiere a obtener el espectro Raman de microorganismos, se ideó el colocar cajas de Petri con medio de cultivo a base de agar

Muller Hinton en lugares normalmente contaminados como los sanitarios públicos. Se seleccionó la zona de donde se iban a obtener las muestras, siendo el lugar elegido una parte de Ciudad Universitaria de la Universidad Michoacana en la ciudad de Morelia, en un grupo de 10 edificios de la Universidad en donde se colocaron las cajas de Petri, pasando dos horas después de haber dejado las cajas de Petri se recogieron y fueron llevadas a la incubadora para ver que colonias aparecían, como lo muestra la figura 4.1.

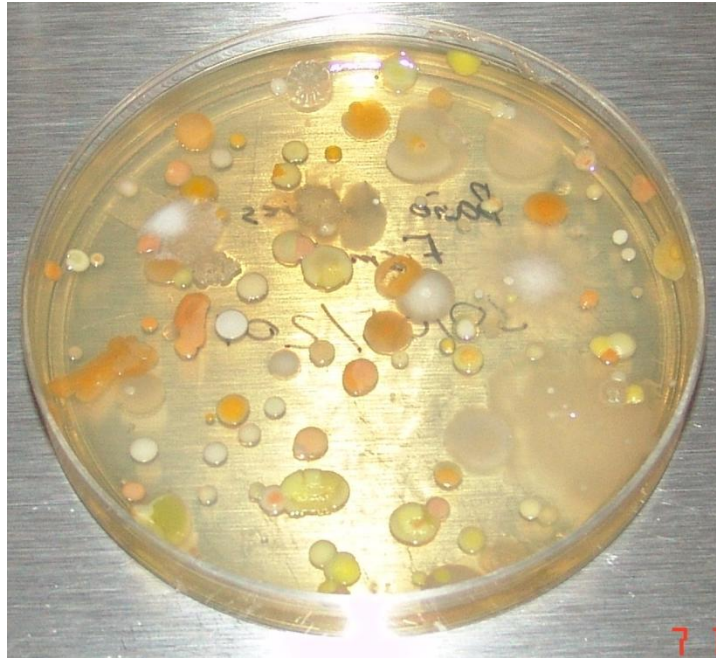


Fig. 4.1 Caja de Petri con colonias de bacterias colectadas en el campus de la Universidad Michoacana.

Las muestras fueron incubadas por un periodo de 48hrs. Posteriormente y ya habiéndose cumplido el tiempo de incubación se decidió tomar 2 colonias que a simple vista parecieron diferentes a las ya poseídas; las nuevas cepas fueron enviadas a los laboratorios clínicos Servimed en Morelia con el fin de identificar las nuevas muestras. Los resultados fueron entregados 2 días después aunque no reportaban el genotipo ya que las bacterias no son comunes, posteriormente y después de una semana se entregaron los resultados completos, estas muestras resultaron ser *Gemella* y *Micrococo Roseus* cuyas características se describen a continuación.

La bacteria *Gemella* es de reciente clasificación observada en 1992. Las células de *Gemella* son cocos dispuestos en pares, tétradas o pequeños grupos irregulares y, en algunas veces como cadenas largas, pequeñas o en forma de bastón. Prefieren una atmósfera rica en CO₂ aunque la colonia crece en condiciones aerobias como anaerobias.

El hábitat de la *Gemella* es en las mucosas de las membranas internas de humanos y otros animales de sangre caliente, e incluso algunas de las especies se encuentran en la cavidad oral y la parte superior del aparato respiratorio de personas sanas. La sepa encontrada en el área de ciudad universitaria no fue identificada por completo a causa de la gran variedad de tipos de bacteria *Gemella* que existen, además de que en la actualidad los métodos de diagnóstico bioquímicos son poco efectivos para diferenciar entre los diferentes tipos de *Gemella* e incluso llegan a ser confundidas con estreptococos en los diagnósticos, ocasionando con ello un mayor riesgo al paciente que la porta.

La *Gemella haemolysans* y *G. morbilorum* se encuentran como bacterias comensales en el humano además de ser patógenos oportunistas, ya que estas bacterias pueden generar infecciones localizadas o generalizadas en pacientes inmunocomprometidos, además de tener la capacidad de causar meningitis, tonsilitis, peritonitis, endocarditis en estos pacientes.

La figura 4.2 muestra el árbol genético de todas las especies de *Gemella* que es uno de los impedimentos por el cual no fue identificada la cepa en concreto por los procedimientos actuales de diagnóstico bioquímico.

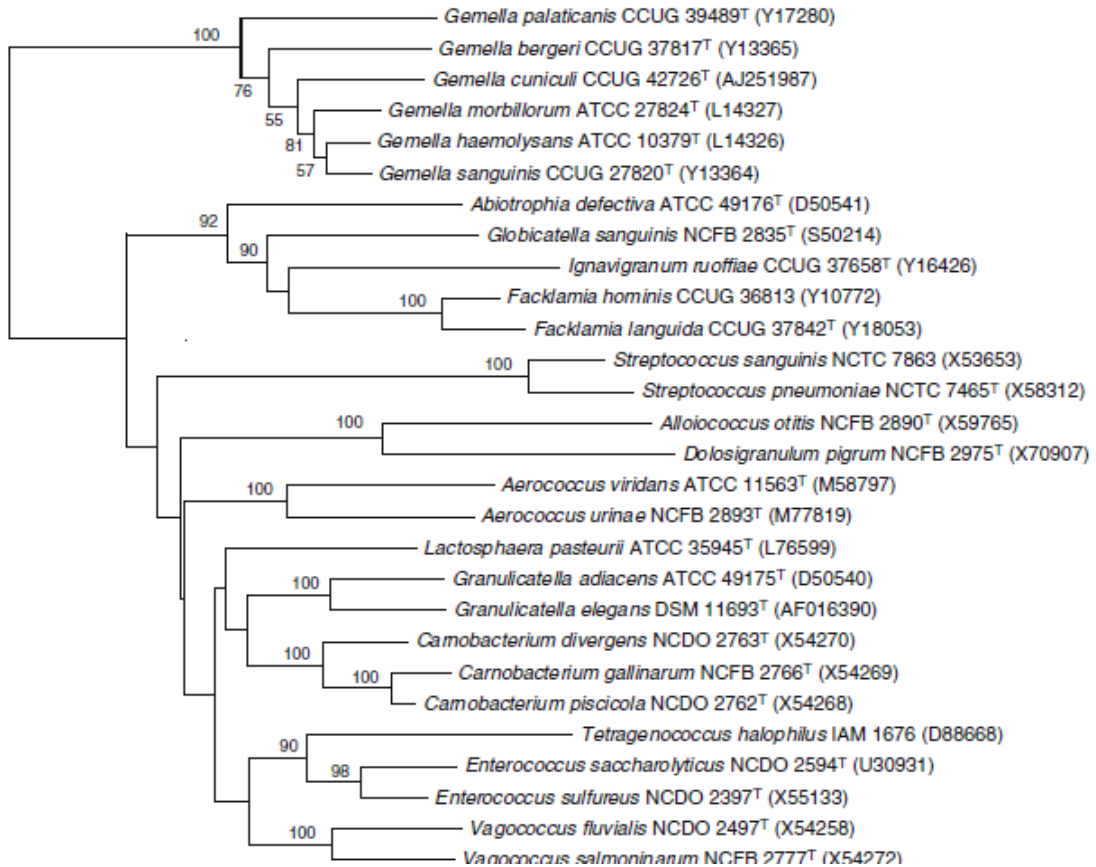


Fig. 4.2 Dendrograma mostrando las relaciones filogenéticas de las especies *Gemella* en base a secuencias de ARNr³⁰

Por otro lado, la bacteria *Micrococo roseus* es una bacteria que presenta crecimiento en grupos de tétradas y es identificada por el color rosado de las colonias que forma como lo muestra la figura 4.3. Las bacterias pueden tener un tamaño entre 0.5 a las 3 micras. El hábitat donde se puede encontrar esta bacteria es la piel, el agua y el suelo. En la actualidad se tiene la idea que el microorganismo *Micrococo roseus* solo afecta a la población inmunocomprometida portadoras del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), sin embargo las infecciones por esta bacteria en este tipo de pacientes son detonadas por el ataque de algún otro microorganismo más agresivo.

³⁰ Dworkin, *The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria*, 3rd edition, vol 4, Springer, 2006.

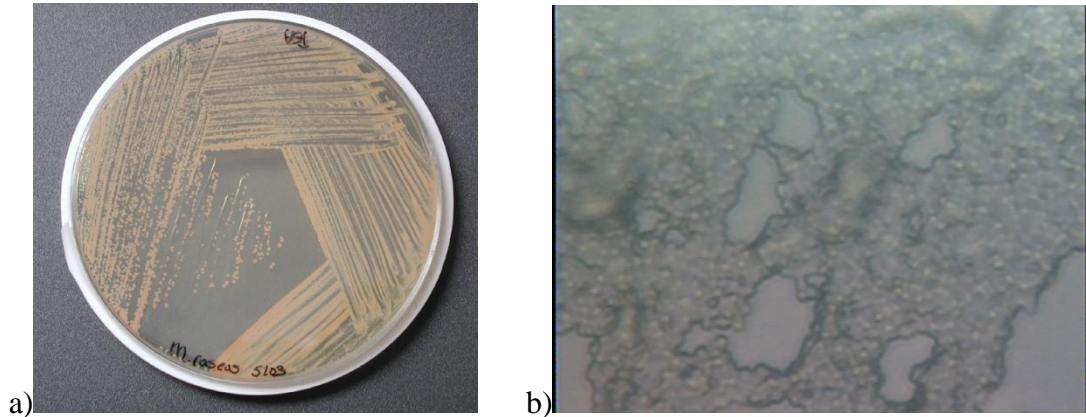


Fig. 4.3 a) Cepa de Micrococo Roseus, b) Cepa de Micrococo Roseus vista bajo un objetivo de 100X

En la figura 4.4 se presentan los dos reportes de microbiología entregados por el laboratorio clínico SERVIMED de la ciudad de Morelia, Michoacán.

Informe de microbiología
LABORATORIO SERVI-MED

Miguel Silva 64
Morelia Michoacan (443) 3 12 32 34
(443) 3 12 35 30

Nombre	ROJA, COLONIA	Muestra	4126	Estado	Final
ID del paciente	4128	Origen	SECRETACION	Fecha Esta.	28/03/2011
Fecha de naci..		Servicio	BIS	F. muestra	23/03/2011
Méd resp				Méd sol	

1 Gemella especies *Catalana -* Estado: Final 28/03/2011

1 Gemella especies
Antimicrobiano *Catalana -*
Gram +

5 Bacteria N/R No informado Bacterio = Datos no disponibles, si antimicrobiano no informado o no probado
6 Gramado = No probado SBL = Bata lactamasa de espectro ampliado
8 Bacterio TFG = Capa Tindori dependiente BAC = Bata lactamasa positiva

5 Bacteria N/R No informado Bacterio = Datos no disponibles, si antimicrobiano no informado o no probado
6 Gramado = No probado SBL = Bata lactamasa de espectro ampliado
8 Bacterio TFG = Capa Tindori dependiente BAC = Bata lactamasa positiva

Impresión 28/03/2011 09:49 a.m. Página 1 de 1 ATENTAMENTE

Informe de microbiología
LABORATORIO SERVI-MED

Miguel Silva 64
Morelia Michoacan (443) 3 12 32 34
(443) 3 12 35 30

Nombre	BLANCA, COLONIA	Muestra	4127	Estado	Final
ID del paciente	4127	Origen	SECRETACION	Fecha Esta.	28/03/2011
Fecha de naci..		Servicio	ais	F. muestra	25/03/2011
Méd resp				Méd sol	

1 Micrococcus y especies relacionadas Estado: Final 28/03/2011

1 Micro/Rel spp.
Antimicrobiano *Catalana +*
Gram +

Amoxiclav	N/R
Ampicilina	N/R
Cefazolina	N/R
Ciprofloxacina	N/R
Cloxacina	N/R
Cloramfenicol	N/R
Eritromicina	N/R
Gentamicina	N/R
Imipenem	N/R
Levofloxacina	N/R
Linezolid	N/R
Nitrofurantoina	N/R
Oxacilina	N/R
Penicilina	N/R
Pip/Tazo	N/R
Ritampicina	N/R
Synecdico	N/R
Tetraciclina	N/R
Trimet/Sulfa	N/R
Vancomicina	N/R

5 Bacteria N/R No informado Bacterio = Datos no disponibles, si antimicrobiano no informado o no probado
6 Gramado = No probado SBL = Bata lactamasa de espectro ampliado
8 Bacterio TFG = Capa Tindori dependiente BAC = Bata lactamasa positiva

5 Bacteria N/R No informado Bacterio = Datos no disponibles, si antimicrobiano no informado o no probado
6 Gramado = No probado SBL = Bata lactamasa de espectro ampliado
8 Bacterio TFG = Capa Tindori dependiente BAC = Bata lactamasa positiva

Impresión 28/03/2011 09:49 a.m. Página 1 de 1 ATENTAMENTE

Fig. 4.4 Diagnóstico reportado por el laboratorio clínico SRVIMED de las bacterias recolectadas en el campus de la Universidad Michoacana.

4.6 Conteo de población en colonias bacterianas

Para poder caracterizar la población de las muestras microbiológicas con las que se contaban se utilizó una Cámara Neubauer que se presenta en la figura 4.5.



Fig 4.5 Cámara de conteo neubauer utilizada.

El primer paso para el proceso de conteo es limpiar perfectamente la cámara y la laminilla de cuarzo con alcohol, ya limpias se procede a colocar la laminilla de cuarzo de manera vertical de tal forma que quede centrada, a continuación se llena la cámara con una gota del fluido que contiene a los microorganismos ocupando una micropipeta pequeña o una jeringa. El proceso de llenado debe de hacerse de forma continua y en un solo intento y teniendo en cuenta que la cámara no puede quedar seca ni sobrellenada.

El proceso de conteo inicia colocando la cámara en un microscopio bajo un objetivo de 5X de potencia donde se observará la siguiente imagen.

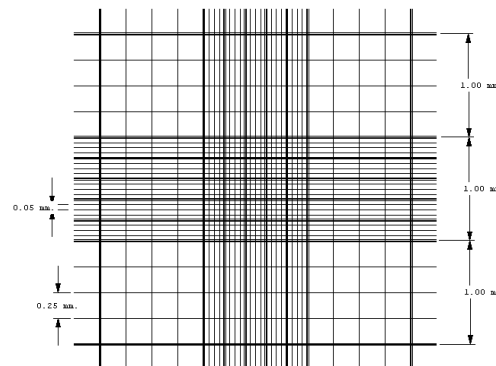


Figura 4.6 Cámara Neubauer bajo un objetivo de 5X potencia

Si los elementos son de pequeñas dimensiones como levaduras o bacterias, la cámara se colocará bajo un objetivo de 10X donde se verá un arreglo matricial de 25×25 cuadros como se muestra en la siguiente imagen.

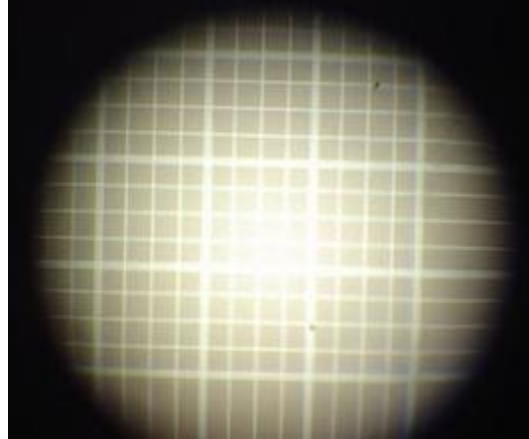


Fig. 4.7 Cámara Neubauer bajo un objetivo de 10X

Observando la imagen mostrada en la figura 4.7 se cambia el objetivo por uno de 40X pudiendo visualizar cada uno de los cuadros con mayor detalle como en la figura 4.8, y se procede a realizar el conteo, desplazando la cámara con ayuda de la platina del microscopio.

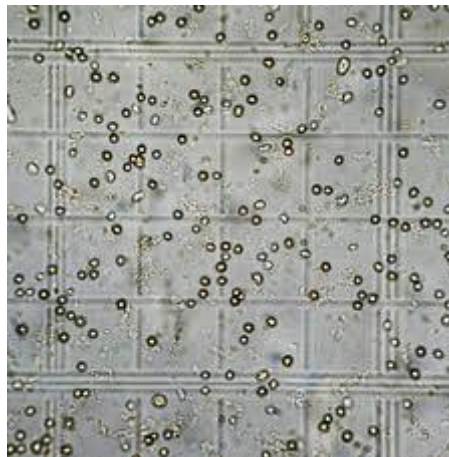


Fig. 4.8 Cámara Neubauer bajo objetivo de 40X

Las células se cuentan cuadro por cuadro y se hace un total. Se recomienda realizar el conteo en zigzag para evitar que se cuenten las células dos veces o que no se cuenten. Alrededor de cada cuadrícula se observa que hay tres líneas que delimitan el cuadro, que son fundamentales en el momento del conteo ya que definen cuales células son contables o cuales están fuera del campo de conteo. Las células que no tocan la segunda línea son contables, si la tocan o están encima de ella no se incluyen. En la figura 4.9 se muestra gráficamente la forma correcta de conteo, las células que tiene una X son las que no se consideran.

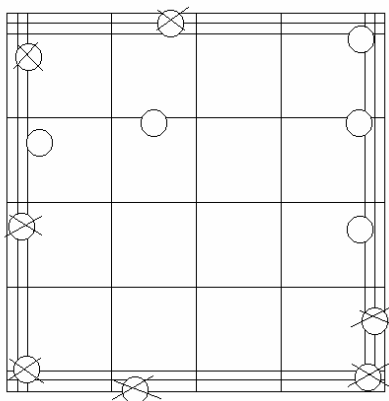


Fig. 4.9 Las células tachadas son las no consideradas en el conteo.

Después de contar las células se procede a calcular el número de células por unidad de volumen. Para esto se utiliza el área de cada cuadro, el espacio ocupado por el líquido en el que están las células que es el mismo espacio que hay entre la cuadrícula de la cámara y la laminilla de cuarzo.

Se promedia el número de microorganismos de la cámara, se multiplica por el factor de dilución y por un factor F igual a 106 si se contó el cuadro central o 104 si se contaron los cuadros de los extremos, obteniendo el valor X, posteriormente este valor se multiplica por la cantidad de mililitros del medio en el que va a desarrollarse el microorganismo, esta cantidad se aproxima y se expresa en μl .

CAPÍTULO V

TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

En este capítulo se presentan los experimentos realizados para obtener los espectros Raman de las bacterias colectadas y de interés de estudio, así como el arreglo experimental con respecto al atrapamiento de los microorganismos por medio de pinzas ópticas. También se presentan los resultados obtenidos por la micromanipulación óptica y la obtención de los espectros Raman de las muestras con las que se contaban, todo ello haciendo uso de los conceptos de los capítulos anteriores.

5.1 Desarrollo del arreglo experimental

Para el arreglo de pizas ópticas se simuló el microscopio óptico compuesto usando un objetivo de microscopio de inmersión de 100X/1.25, con el software Zemax. Esta simulación permite conocer de manera teórica las distancias aproximadas donde el sistema de lentes tiene el punto donde la imagen resultante presenta la mayor amplificación posible. En la tabla 5.1 presenta los datos ingresados al paquete Zemax para la simulación del objetivo de microscopio.

Tabla. 5.1 Elementos que componen un objetivo de microscopio 100X/1.25 simulado en Zemax.

Surf	Type	Comment	Radius	Thickness	Glass	Semi-Diameter	Conic
OBJ	Standard		Infinity	Infinity		0.000000	0.000000
ST0	Standard		-425.914812	29.866179	EK1	34.102350	0.000000
2	Standard		-609.515187	3.246546		34.927961	0.000000
3	Standard		2091.015867	29.866179	SSK4	34.981573	0.000000
4	Standard		-1374.153901	10.320000		35.005577	0.000000
5	Standard		-102.843219	19.607502	KZFS4	34.937678	0.000000
6	Standard		81.677238	32.463416	1.78,26.1	39.529887	0.000000
7	Standard		-1851.257062	20.600000		40.730036	0.000000
8	Standard		235.811796	59.732359	1.43,94.9	42.900055	0.000000
9	Standard		-77.781383	15.582058	1.78,26.1	43.075145	0.000000
10	Standard		-286.221247	0.649309		46.247041	0.000000
11	Standard		104.310303	62.328914	1.43,94.9	47.849281	0.000000
12	Standard		-104.310303	15.582058	1.78,26.1	44.312251	0.000000
13	Standard		-179.585843	20.646261		44.757974	0.000000
14	Standard		81.677238	25.970324	1.79,47.5	38.961349	0.000000
15	Standard		184.520457	0.259860		32.845611	0.000000
16	Standard		32.112162	34.800111	1.88,40.8	27.290176	0.000000
17	Standard		13.803278	7.401580	1.54,51.1	8.031591	0.000000
18	Standard		Infinity	1.155389	1.52,44.5	3.747141	0.000000
19	Standard		Infinity	2.337977	K3	2.692322	0.000000
20	Standard		Infinity	-0.613052	1.52,44.5	0.610335	0.000000
IMA	Standard		Infinity			1.121033	0.000000

Procesando estos datos, el diseño simulado con el software es el que se presenta en la figura 5.1.

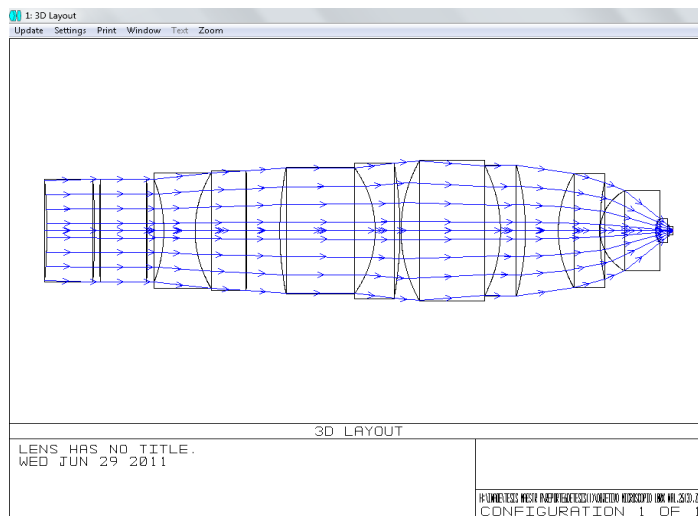


Fig. 5.1 Simulación gráfica de Zemax del objetivo de microscopio de 100x/1.25

Finalmente el software genera un reporte técnico donde además del diseño y sus características presenta las aberraciones del sistema. Este reporte se muestra en la figura 5.2.

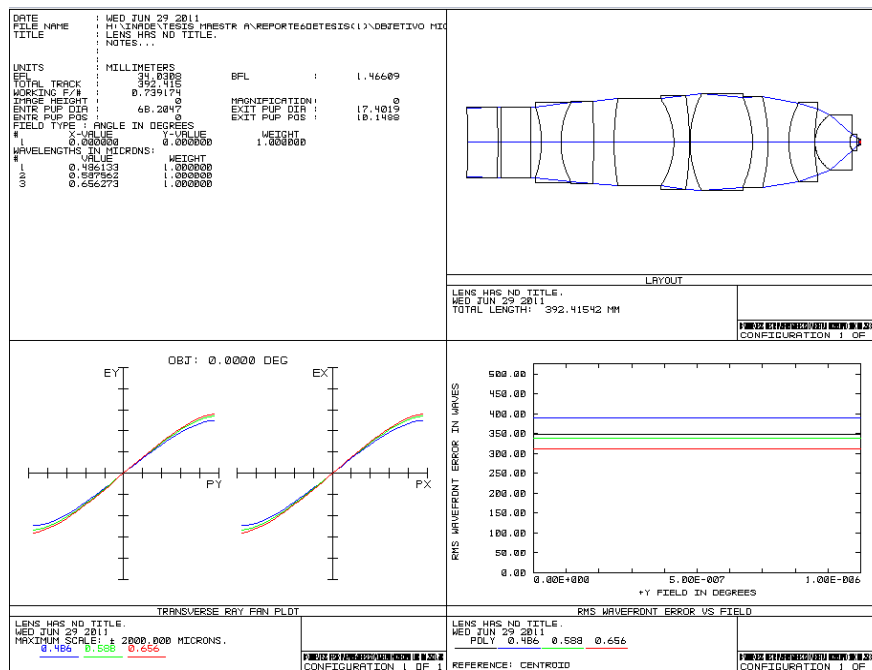


Fig. 5.2 Reporte técnico del objetivo de microscopio generado por el software Zemax

Con los datos técnicos reportados por Zemax se procedió a elaborar el arreglo experimental de pinzas ópticas aplicando las distancias que teóricamente generan la imagen de mayor amplificación a la salida del objetivo. Este arreglo experimental se montó en el laboratorio óptica de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la Universidad Michoacana, el esquema de este montaje se presenta en la figura 5.3 y en la figura 5.4 se muestra su fotografía.

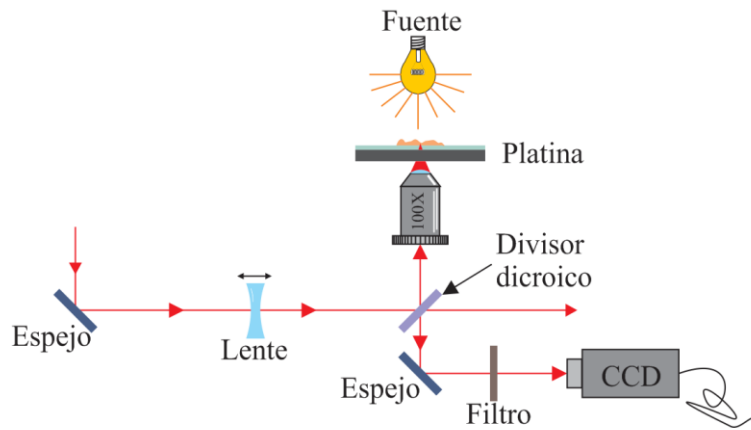


Fig. 5.3 Esquema del arreglo experimental de pinzas ópticas

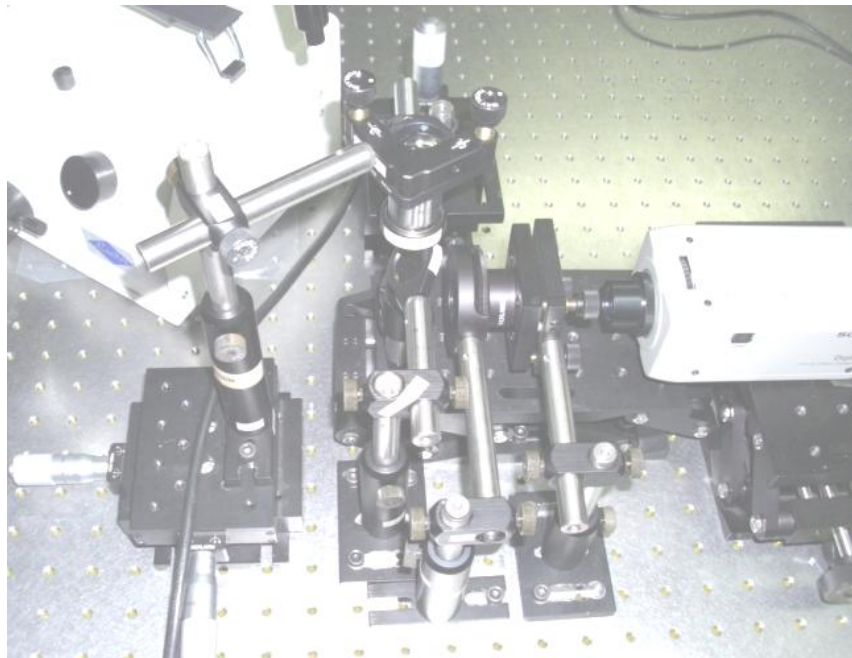


Fig. 5.4 Arreglo experimental de pinzas ópticas.

La lente negativa que aparece en el esquema de la figura 5.3 puede ser cambiada de posición así como sus radios de curvatura, ya que solo es empleada para alargar o acortar la distancia focal del objetivo de microscopio esto con el fin de que el plano focal del objetivo esté en la misma posición que el punto de mayor enfoque del haz. La fuente de iluminación es una fuente de 150Watts de halógeno con dos fibras ópticas que pueden ser dirigidas cubiertas con materiales para obtener fuentes de iluminación lambertiana que no tienen una dirección preferencial de iluminación y con esto lograr una iluminación uniforme sin importar la dirección de incidencia sobre la muestra.

Para el funcionamiento del arreglo de trampa óptica fue empleado un láser HeNe (632.8nm) de 17mW de potencia. El haz presenta un perfil gaussiano que fue caracterizado mediante la prueba de la navaja. El resultado de dicha prueba se muestra en la figura 5.5 en donde el ancho del haz fue medido quitando el 5% de incertidumbre³¹.

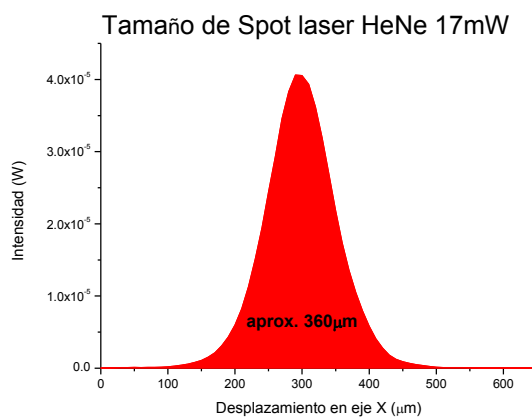


Fig. 5.5 Perfil del spot obtenido mediante la prueba de la navaja

Además, también se midió el tamaño de campo de visión del microscopio, para ello fue empleada la cámara de conteo Neubauer ya que esta cuenta con una retícula bien caracterizada por el fabricante. El proceso fue el de colocar la cámara de conteo en la platina del arreglo experimental y observar una gota de nanopartículas de oro de 200nm de diámetro suspendidas en Silisuro de Sodio SiNa. Las nanopartículas fueron proporcionadas por el Dr. Elder de la Rosa Cruz del Centro de Investigaciones en Óptica de la ciudad de León, Guanajuato.

³¹ Murray R. Spiegel, Probabilidad y estadística, Cap. 7, 211 – 257, ed. Mc Graw Hill.

Se procedió colocando la gota de nanopartículas de oro en la cámara de conteo, la cual fue desplazándose hasta que se encontró un rectángulo que ocupaba todo el campo de visión del microscopio del arreglo experimental, resultando ser un área de $50 \times 50 \mu\text{m}$ como lo demuestra la imagen que se muestra a continuación, y que fue capturada por la CCD del arreglo experimental, también se muestra el frasco que contiene las nanopartículas de oro.

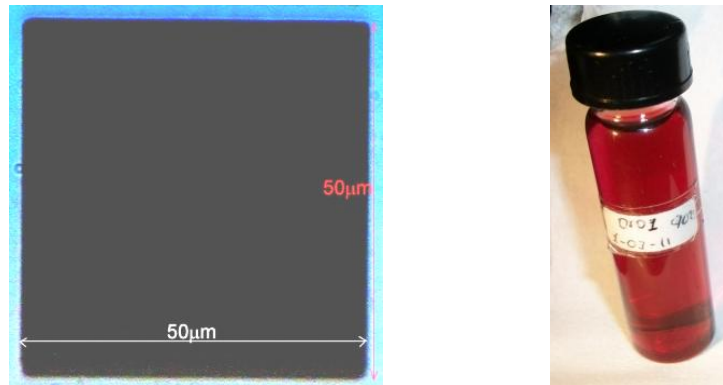


Fig. 5.6 Campo de visión del arreglo experimental con un objetivo de 100X(izquierda) y el recipiente con nanopartículas de oro de 200nm inmersas en una solución de SiNa empleadas en el proceso de dopaje de las bacterias(derecha)

5.2 Atrapamiento de partículas

El primer atrapamiento realizado con el arreglo experimental fué bacteria del tipo diplococo, que es una bacteria que puede tener desde 0.5 a 5 micras de diámetro y que pertenecen a la familia bacteriana de los cocos, llamados así a causa de su forma esférica. En cuanto se localizó esta bacteria con el microscopio se comenzó a enfocar la cintura mínima del haz que emergía del objetivo de microscopio en el plano en donde la bacteria se localizó, al momento de coincidir claramente se percibió una atracción de esta por el haz quedando atrapada a través del mecanismo de trampa donde $\nu > \nu_0$ y $\alpha > 0$, mencionado en el capítulo 2, por lo que las pinzas jalan a las partículas, y se con esta evidencia se concluyó que al menos el arreglo óptico si era capaz de mantener en una posición estática a este tipo de bacterias como lo muestran las siguientes figuras.

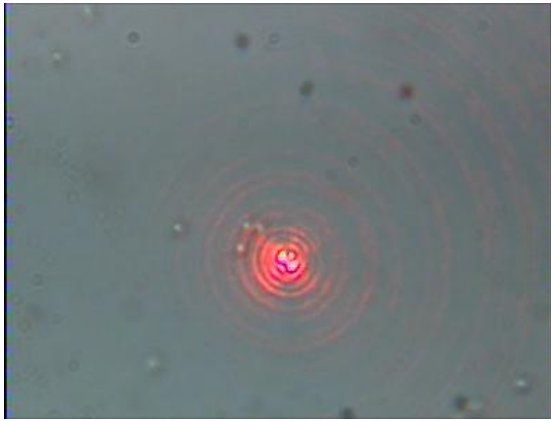


Fig. 5.7 Partículas de látex atrapadas por las pinzas ópticas

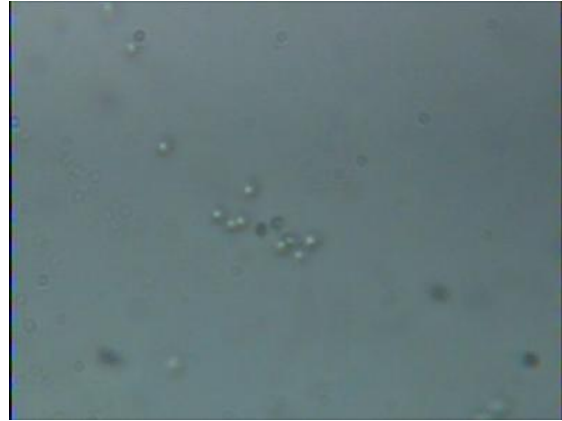


Fig. 5.8 Partículas liberadas después del atrapamiento con pinzas ópticas.

Posteriormente y con el único fin de probar si el arreglo de pinzas ópticas funcionaba como estaba planeado, con ayuda de tornillos micrométricos se desplazó la platina una distancia no mayor al diámetro de la bacteria, y se percibió de manera clara un movimiento de la bacteria a la posición en la que se encontraba el haz, después de ese momento se manipuló la bacteria moviéndola a través del medio donde se encontraba es decir por gran parte de la caja de Petri, siempre moviendo la platina a posiciones específicos con el fin de ver que realmente se estaba manipulando a la bacteria con el haz. Los resultados del experimento fueron concluyentes a causa de que la bacteria presentaba un movimiento bien definido siguiendo la ubicación del spot del láser, y se puede afirmar que las pinzas ópticas estaban en funcionamiento y presentaban gran eficiencia de atrapamiento.

La siguiente muestra que fue empleada con las pinzas ópticas fue una muestra de agua estancada en donde se detectaron bacterias, algas, minerales, entre otros microorganismos. La muestra fue obtenida de un charco que se encontraba en el patio de la Facultad de Físico Matemáticas de la Universidad Michoacana, y fue recolectada en una caja de Petri llenada a un nivel de unos 2mm aproximadamente. Posteriormente la caja de Petri fue colocada en la palatina del arreglo experimental.

Ya con la muestra colocada en la platina, se ajustó la distancia del arreglo experimental para poder observar la imagen definida en la CCD y el atrapamiento, que puede estudiarse aplicando la teoría de régimen de rayos [ver capítulo 2]. La imagen obtenida es capturada con una CCD conectada a una PC donde se observaba la imagen.

En esta etapa se observó que algunos microorganismos se alejaban de la zona donde el haz era fuertemente enfocado y, el resultado más significativo de dicho experimento fue cuando se seleccionó una alga de las tantas contenidas por la muestra de agua estancada y se intentó atraparla, ocasionando la misma reacción que otros microorganismos de alejarse de la zona donde se encontraba el spot enfocado fuertemente, observándose que al enfocar el haz directamente sobre el alga y dejarla por uno o dos minutos en ese estado el alga comenzaba a perder movilidad además de que su color verde característico se iba perdiendo y se volvía completamente transparente o blancuzca en el área donde el spot incidía sobre ella, o si el alga era de un tamaño similar al spot esta perdía todo el color

La hipótesis que se tiene de la pérdida de color de las algas es que el láser de HeNe ocasiona que los cloroplastos del alga se destruyan a causa de una descomposición química de sus enlaces en las proteínas y los aminoácidos que los conforman, es decir, que el láser con longitud de onda de 632.8nm con potencia de 17mW ocasiona que los aminoácidos del alga se separen y estos a su vez ocasionan que su ADN del alga se modifique o desintegre fundiendo literalmente a los cloroplastos, lo que se refleja en una pérdida de color verde del alga seleccionada. Este mismo experimento se realizó con varias algas de la muestra obteniendo los mismos resultados como lo muestran las siguientes figuras.

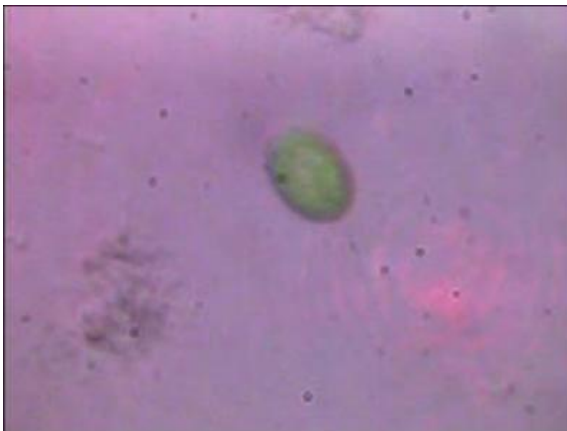


Fig. 5.9 Alga antes de que el spot de láser de HeNe con potencia de 17mW incida sobre ella por un tiempo de un minuto.

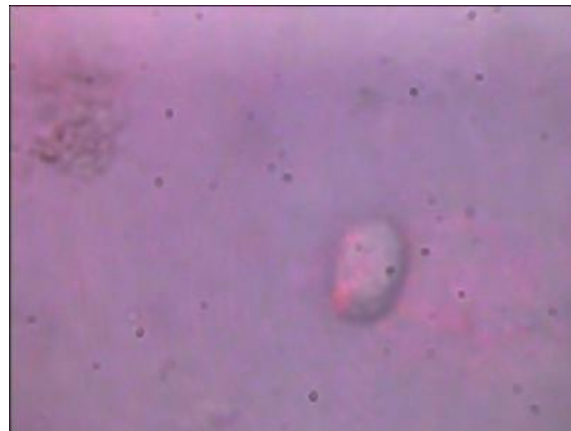


Fig. 5.10 Alga transparente después de exponerla al Spot de láser HeNe de 17mW de potencia durante un minuto.

Este cambio de color en las algas es producido por el aumento de la temperatura debido al láser. Se sabe que los orgánulos celulares presentan diferentes cambios morfológicos

dependiendo de la temperatura a la que estos están expuestos, estos cambios se presentan en la tabla 5.2 y que ilustra cada rango de temperatura con el efecto que esta causa en la mayoría de los microorganismos³².

Tabla 5.2 Estados morfológicos de orgánulos celulares dependiendo de la temperatura

TEMPERATURA	EFEECTO
42°C – 45°C	Hipertermia transitoria
>65°C	Desnaturalización proteínica, coagulación y desecación
70°C – 90°C	Vaporización
>100°C	Carbonización

Para poder calcular la temperatura, es necesario conocer su intensidad I y su frecuencia ν . La siguiente ecuación es utilizada para calcular el incremento de temperatura ΔT .

$$\Delta T = \frac{h\nu}{k \cdot \ln\left(\frac{2h\nu^3}{c^2 I} + 1\right)} \quad (5.1)$$

donde $k = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J / K}$ y $h = 6.62 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$. Considerando que $\lambda = 632.8 \text{ nm}$ y que la intensidad $I = 17 \text{ mW}$ se obtiene que la temperatura es 0.039°K/s , lo que refleja un incremento de temperatura muy bajo.

Otras pruebas se realizaron con partículas de látex de 848.46 nm y 214 nm de diámetro aproximadamente y que presentaban carga positiva, estas partículas fueron las que se emplearon en la calibración del arreglo experimental para que el punto de enfoque y el plano donde se deseaba hacer el atrapamiento coincidiera. En este caso las partículas fueron transportadas de manera sencilla y rápida con las pinzas ópticas.

³² Jawetz, Melnick y Adelberg, *Microbiología médica*, ed. Manual Moderno, 21ª ed., México 1999.

Con el fin de saber algunas características de las pinzas ópticas montadas, se procedió a calcular la fuerza debida a la presión de radiación, que tomando la potencia de 17mW se tiene que la presión de radiación es de 189.29pN, en donde se consideró la ecuación 5.2^[4].

$$F_{rad} = \frac{2P}{c} \quad (5.2)$$

Con esta fuerza, se calculó de manera teórica mediante la segunda Ley de Newton, que este arreglo de pinzas puede desplazar 1.18×10^{-4} Kg tomando una aceleración mínima de 9.81m/s.

Con estas observaciones, se pudo encontrar la relación entre masa y fuerza gradiente para un arreglo de pinzas ópticas, esta relación está dada como;

$$F_{grad} = (\vec{P} \cdot \vec{\nabla}) \vec{E} = \frac{1}{2} \alpha \nabla E^2 \quad (5.3)$$

siendo α la polarizabilidad del medio dada por

$$\alpha = n_b \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) r^3 = n_b \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (5.4)$$

donde n_b es el índice de refracción del medio y .

$$m = \frac{n_a}{n_b} = \frac{\text{índice de refracción de la esfera o partícula}}{\text{índice de refracción del medio}} \quad (5.5)$$

La relación que existe entre la fuerza de esparcimiento, la masa y la longitud de onda está dada por:

$$F_{scat} = \frac{P_{scat}}{C} = \frac{I_0}{C} \frac{128\pi^5}{3\lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \quad (5.6)$$

I_0 se refiere a la intensidad del haz incidente y realizando una sustitución de variables puede escribirse como

$$F_{scat} = \frac{\vec{I}_0}{C} \frac{128\pi^5}{3\lambda^4} r^6 n_t \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (5.7)$$

Supóngase entonces que se tiene una partícula con 5micras de diámetro, con índice de refracción 0.68 y cuya masa es de 5×10^{-12} gramos. Dicha partícula se desea atrapar aplicando una longitud de onda de 633nm que presenta una intensidad de 10mW, si se aplica la ecuación 5.7 se tiene que:

$$\begin{aligned} F_{scat} &= \frac{10mW}{3 \times 10^8 m/s} \cdot \frac{128\pi^5}{3(633 \times 10^{-9} m)^4} (5 \times 10^{-6} m)^6 (0.68) \left(\frac{(5 \times 10^{-12} gr)^2 - 1}{(5 \times 10^{-12} gr)^2 + 2} \right)^2 \\ &= 1.95801 \times 10^{-47} N \end{aligned}$$

5.3 Acoplamiento de la punta de prueba y manejo de muestras biológicas

El espectrómetro que se utilizó fue el equipo comercial QE65000 de Ocean Optics que se presenta en la imagen a continuación³³.

³³ QE65000 Operation manual, Ocean Optics, 2010.



Fig. 5.11 Espectrómetro Raman QE65000 de Ocean Optics empleado en la pruebas.

El equipo tiene diferentes componentes para su funcionamiento, a continuación se mencionan las partes principales junto con el corte superior que las exhibe.

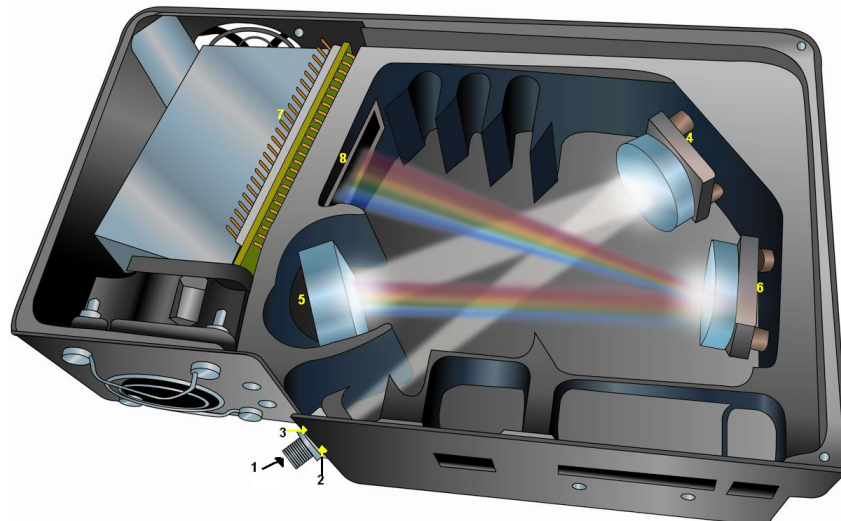


Fig. 5.12 Esquema de corte superior del espectrómetro Raman QE65000 ejemplificando el funcionamiento del equipo.

1. Conector SMA para acoplar la fibra óptica de la punta de prueba.
2. Apertura de acoplamiento para la punta de prueba.
3. Filtro restrictor de radiación, aplicado como un pasa bajas o pasa altas.

4. Espejo colimador que enfoca toda la luz en la rejilla difractiva.
5. Rejilla difractiva, difracta la luz colectada y enfocada por el espejo colimador.
6. Espejo de enfoque, redirige la luz difractada hacia el grupo de detectores.
7. Detector cuántico con enfriamiento, este solo aparece en algunos modelos.
8. Detector con filtro OFLV, detector óptico cuyo filtro elimina segundos ordenes de la longitud de onda.

El equipo consta de un láser con una longitud de onda de 785nm, además la fibra está compuesta en realidad de siete fibras ópticas acopladas, una central que sirve para colectar la señal mientras que las otras seis ubicadas a su alrededor emiten la iluminación que excitará la muestra. El arreglo se muestra en la figura presentada enseguida.

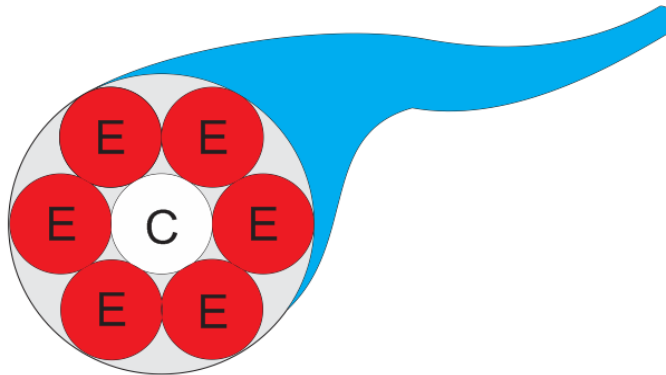


Fig. 5.13 Punta de prueba del equipo QE65000 siendo E las fibras de emisión y c la del colector.

La adquisición de datos se hace por medio del software SpectraSuite proporcionado por Ocean Optics. Este programa está elaborado en java y puede instalarse en las plataformas de sistemas operativos más conocidas en el mercado.

La siguiente etapa que se realizó fue incorporar la punta de prueba del espectrómetro Raman al arreglo de pinzas ópticas, esto se realizó colocando la punta de prueba en la parte superior del arreglo desplazando la fuente de iluminación; el siguiente diagrama muestra la posición de la punta de prueba en el arreglo experimental.

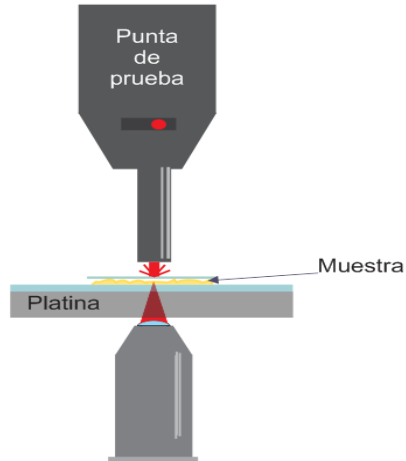


Fig. 5.14 Esquema de la posición de la punta de prueba en el arreglo experimental utilizado para las muestras biológicas y, donde aparece el objetivo de microscopio de 100X modelado con anterioridad en la parte inferior que es el elemento que enfoca el haz en un área pequeña ejerciendo así la presión de radiación y la fuerza gradiente

Ya colocada la punta de prueba en el arreglo de pinzas ópticas, se procedió a calibrar el montaje haciendo pruebas con las nano partículas de látex de 800nm de diámetro facilitadas por la Dra. Maricarmen Peña Gomar. Al mismo tiempo, fueron proporcionadas tres cepas bacterianas puras por parte del laboratorio clínico SERVIMED ubicado en la ciudad de Morelia.

A continuación se presentan las imágenes de las cepas proporcionadas por el laboratorio clínico y, con las cuales sirvieron para calibrar tanto el arreglo pinzas ópticas como el espectrómetro Raman, ya que de estas bacterias es bien conocido su espectro por lo que servirán como muestras patrón.

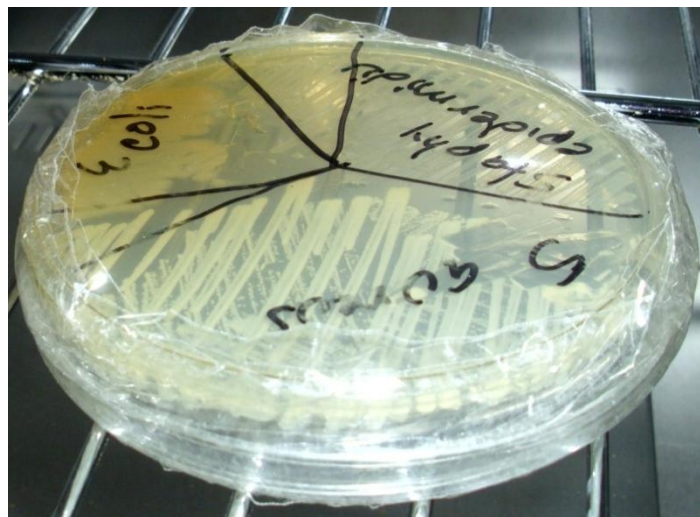


Fig. 5.15 Cepas bacterianas proporcionadas por el laboratorio clínico SERVIMED

Con las muestras adquiridas, se procedió a sembrar las bacterias en cajas de Petri con medio de cultivo a base de Agar Muller Hinton [Ver Capítulo 4] hasta obtener colonias que cubrieran gran parte de la superficie de la caja de Petri, ya que con esta se procedería a generar muestras bacteriológicas en suspensión.

Ya con las bacterias cultivadas en la caja de Petri se toma una pequeña muestra de estas para ser colocadas en caldo de cultivo, este caldo es un líquido que contiene nutrientes con los que se alimenta la bacteria. Para poder colocar la bacteria en este medio líquido el caldo se tibia con un mechero para que sea un ambiente confortable para las bacterias, posteriormente se esteriliza el asa de cultivo colocándola sobre el mechero hasta que tenga un color rojo vivo y se deja enfriar, al mismo tiempo se saca la sepa de la bacteria de la incubadora para tomar una pequeña muestra de ella con ayuda del asa bacteriológica, se agita dentro del caldo de cultivo, se cierra, se etiqueta y se coloca en la incubadora a 37°C para preservar las muestras aproximadamente un mes, todo el proceso se hizo en un área esterilizada y trabajando siempre cerca del mechero con el fin de mantener estéril el ambiente donde se manipuló la bacteria.

5.4 Espectros Obtenidos

Para poder obtener el espectro de las bacterias era necesario obtener el espectro Raman de los medios donde estas se encontraban como lo eran; el agar, el cubre objetos, el porta objetos, el caldo de cultivo y el acrílico de la caja de Petri con el fin de poder descartar señales que se detecten a causa de estos elementos. Teniendo los espectros anteriores se procedió a tomar el espectro de las bacterias usando una pequeña muestra de cepa y colocándola en un portaobjeto, que sería colocado en la platina del arreglo para tomar el espectro Raman de la bacteria de manera directa.

El primer grupo de espectros obtenidos fue de la bacteria *Escherichia Coli* (cólera). Cada uno de los Espectros corresponde a diferentes tiempos de exposición que van desde 1s

hasta 35s, con incrementos de 5s entre un tiempo de exposición y otro. El grupo de espectros obtenidos sin procesamiento se presenta en la figura 5.16.

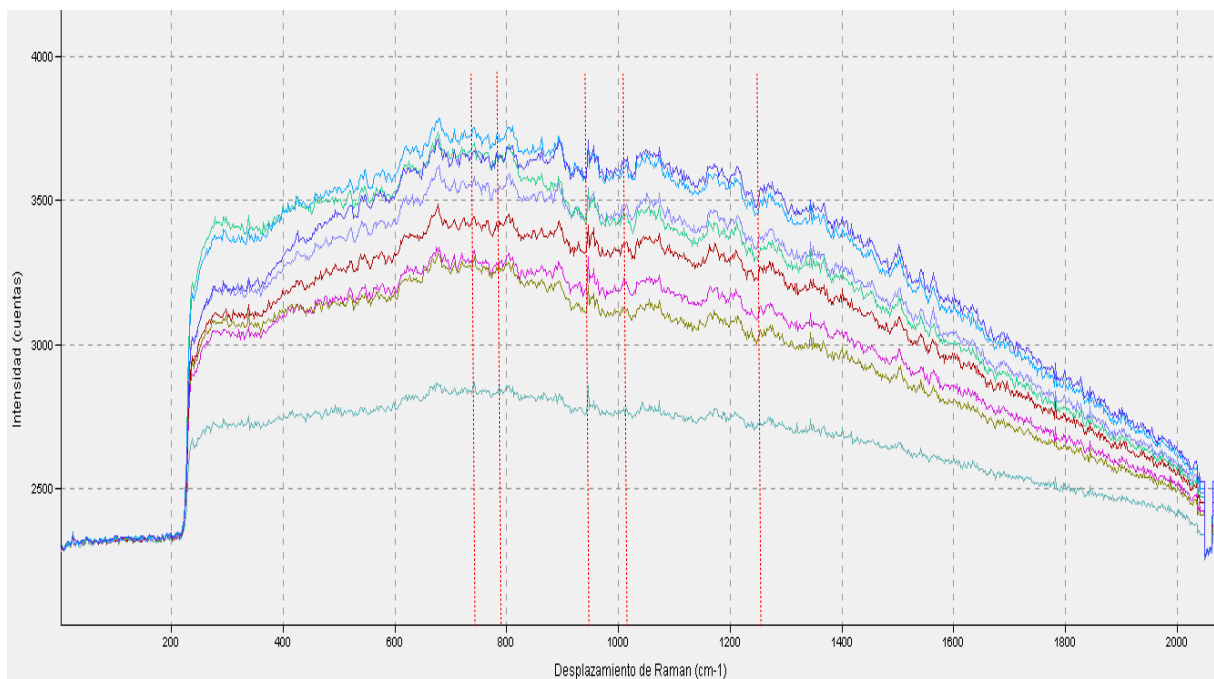


Fig. 5.16 Espectros Raman característico de *Escherichia Coli* con picos en 728, 783, 936, 1024 y 1257 reportados en la literatura^[21].

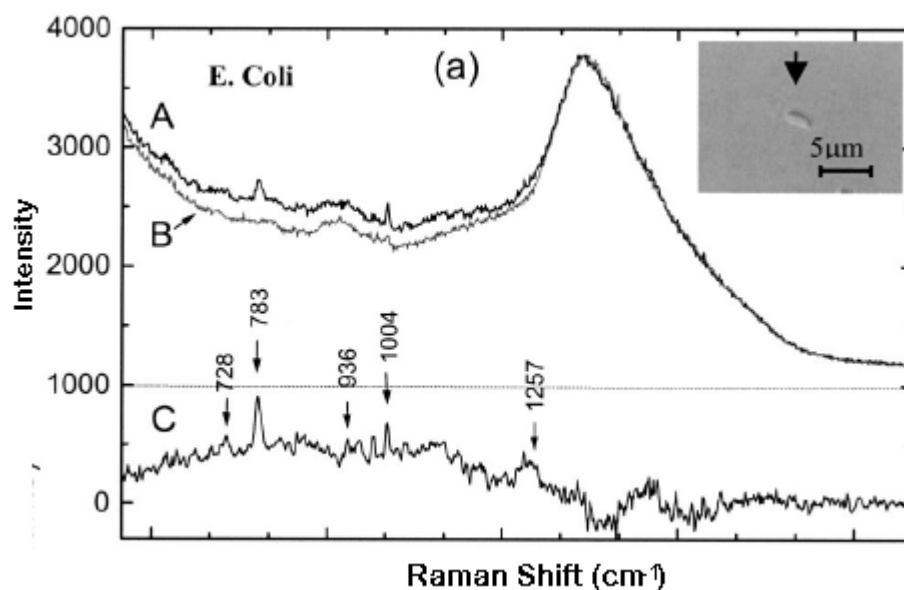


Fig. 5.17 Espectro Raman típico de una cepa de *Escherichia Coli* reportado en la literatura^[21].

El espectro que se obtuvo sin ningún tipo de procesamiento para el *Estafilococo Epidermidis* se presenta en la figura 5.18.

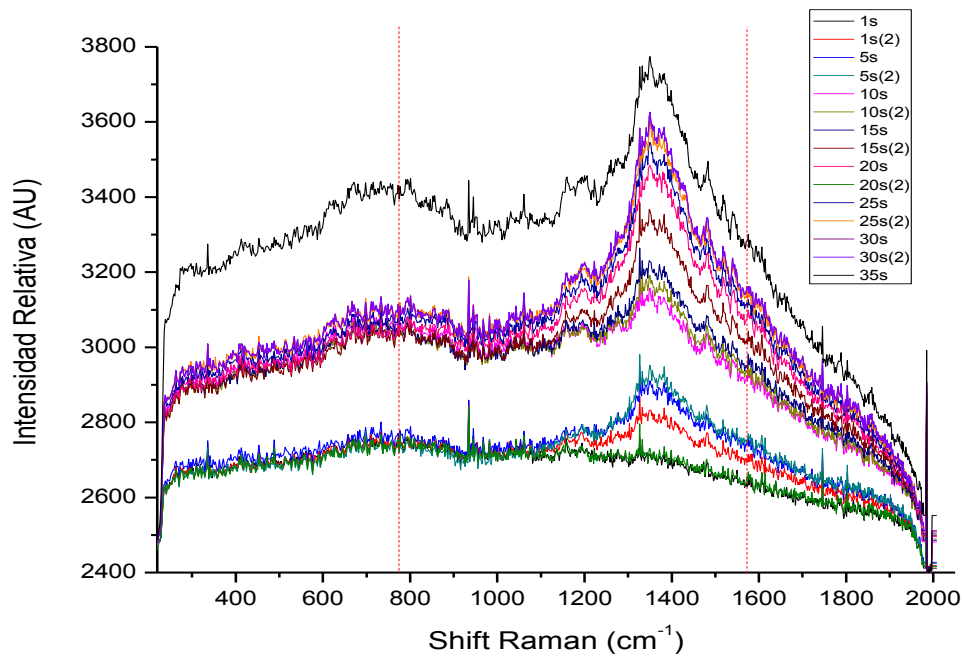


Fig. 5.18 Espectro Raman típico de una muestra de *Estafilococo Epidermidis* obtenido por la técnica de micro espectroscopía Raman acoplado a pinzas ópticas.

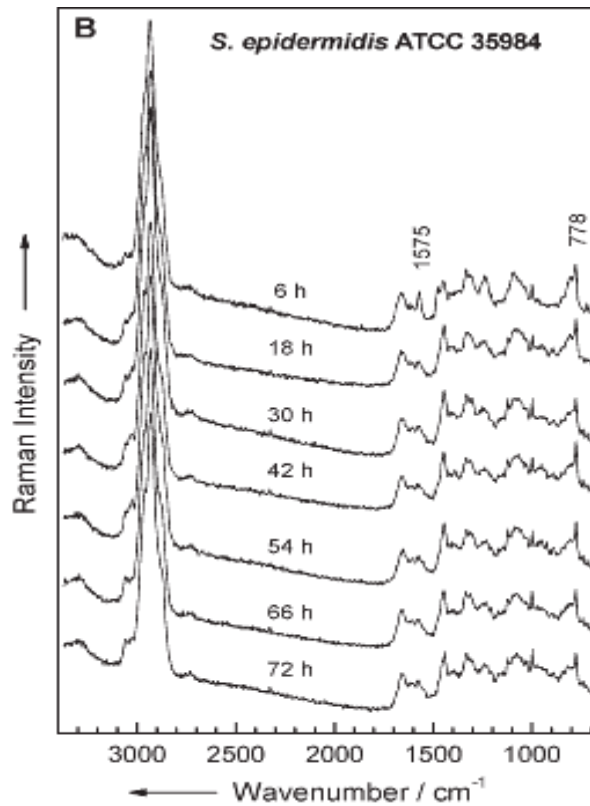


Fig. 5.19. Espectro Raman típico de una cepa de *Estafilococo Epidermidis* reportado en la literatura, con picos en 1575 y 778 nm.

En el caso del *Streptococo Aureus* el espectro Raman sin procesar es el mostrado en la figura 5.20.

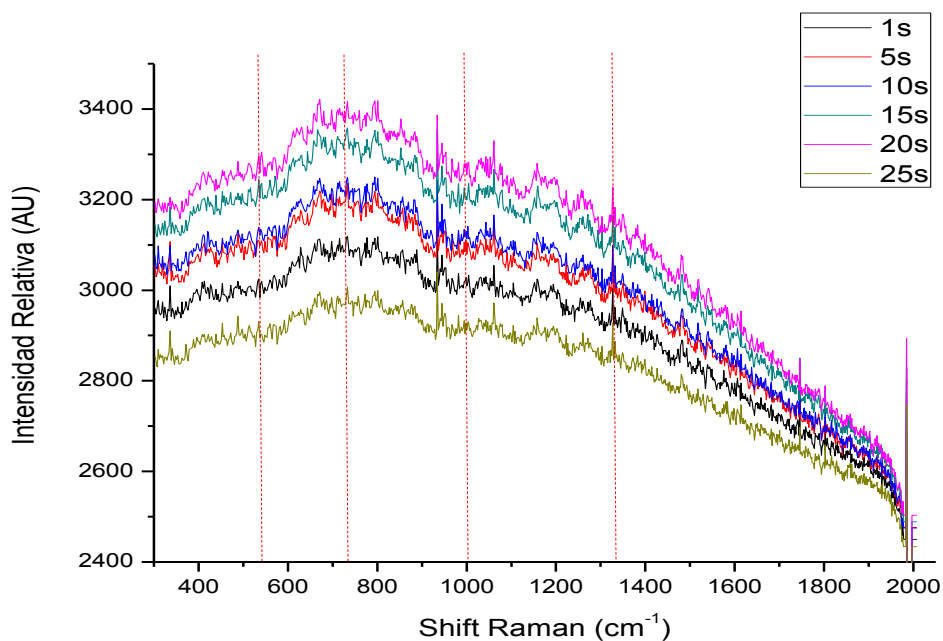


Fig. 5.20 Espectro Raman típico del *Streptococo Aureus* obtenido por la técnica de micro espectroscopía Raman acoplado a pinzas ópticas cuyos picos característicos reportados en la literatura se encuentran en 537, 733, 982 y 1325³⁴.

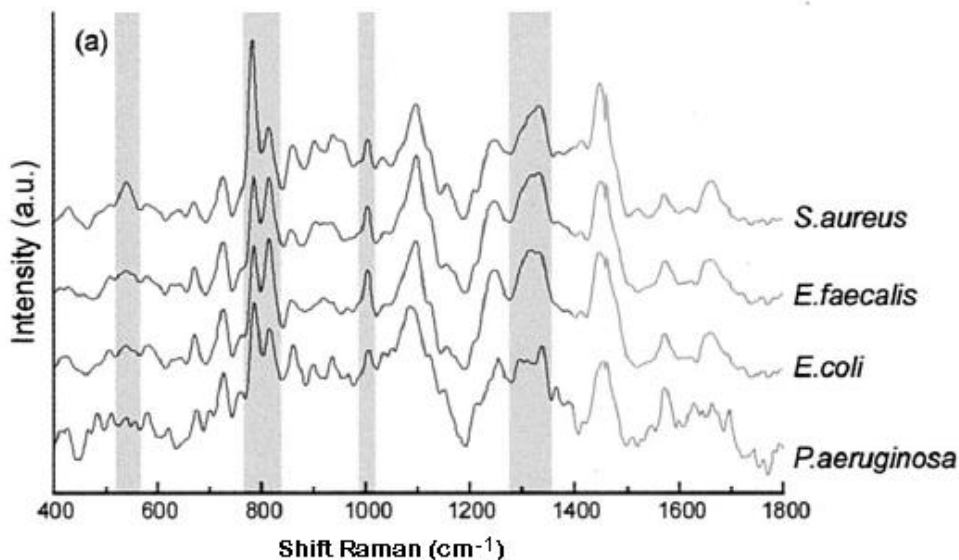


Fig. 5.21 Espectro Raman típico del *Streptococo Aureus* y otros microorganismos reportados en la literatura³⁴.

³⁴ K. Maquelin,1,2 C. Kirschner,3 L.-P. Choo-Smith,1† N. A. Ngo-Thi,3 T. van Vreeswijk,1‡ M. Staˆmmler,3 H. P. Endtz,2 H. A. Bruining,1 D. Naumann,3 and G. J. Puppels1, Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures, **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, Jan. 2003, p. 324–329.

Estos espectros al ser procesados con ayuda de un programa elaborado en Matlab que filtra la fluorescencia generada por el mismo proceso de espectroscopia Raman³⁵, se obtienen gráficos como lo muestran las figuras 5.22, 5.23 y 5.24.

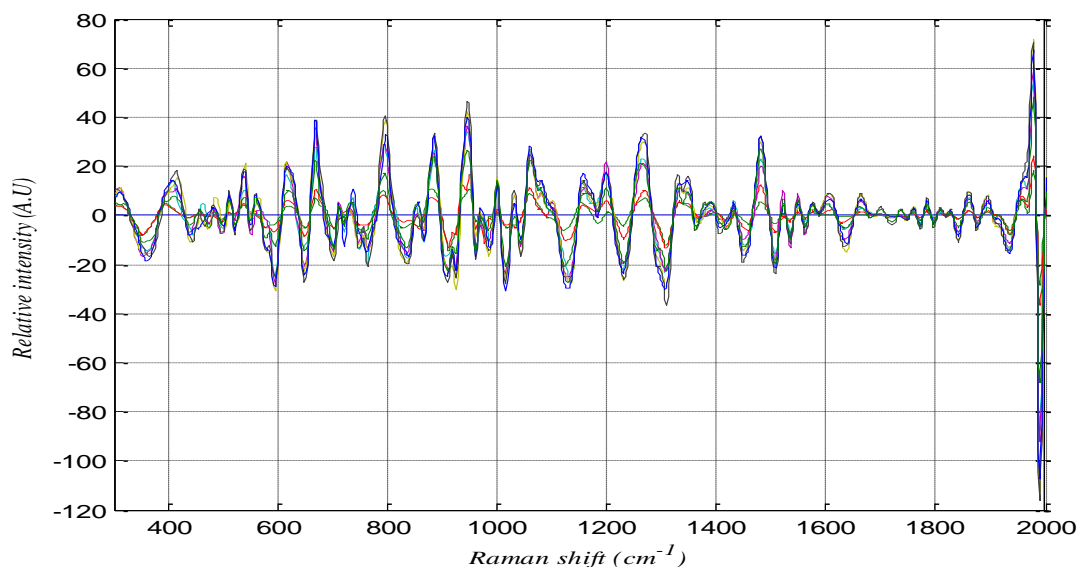


Fig. 5.22 Espectro Raman de *Escherichia Coli* con procesamiento con exposiciones desde 1 hasta 35 segundos de emisión y un grado de integración de 2.

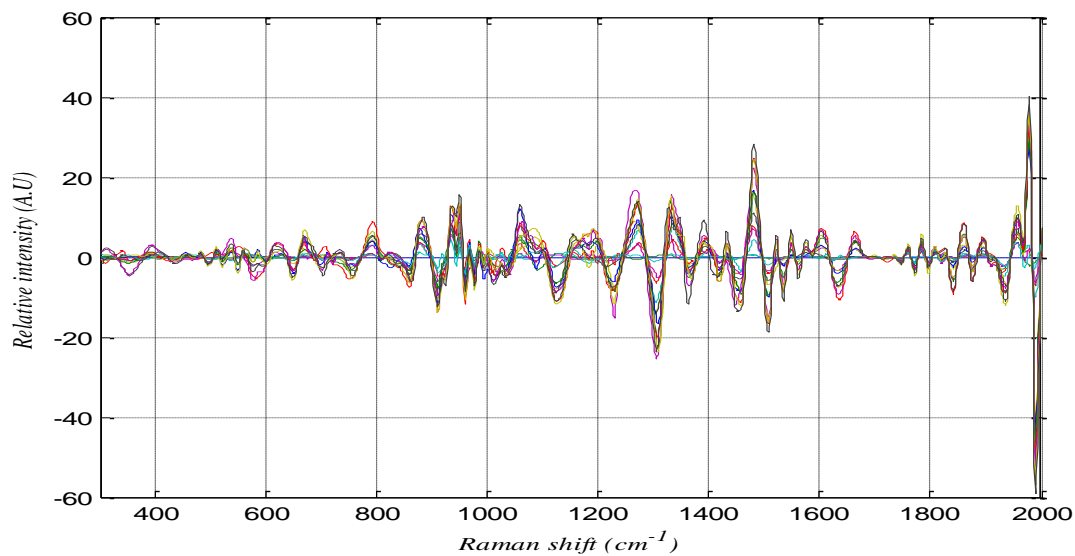


Fig. 5.23 Espectro Raman de *Staphylococo Epidermidis* con procesamiento con exposiciones desde 1 hasta 35 segundos de emisión y un grado de integración de 2.

³⁵ A. E. Villanueva Luna, J. Castro Ramosa, S. Vazquez Montiel, A. Flores Gilb, J. A. Delgado Atencia, and E. E. Orozco Guillenc, *Fluorescence and Noise Subtraction from Raman Spectra by Using Wavelets, Optical Memory and Neural Networks (Information Optics)*, 2010, Vol. 19, No. 4, pp. 310–317, 2010

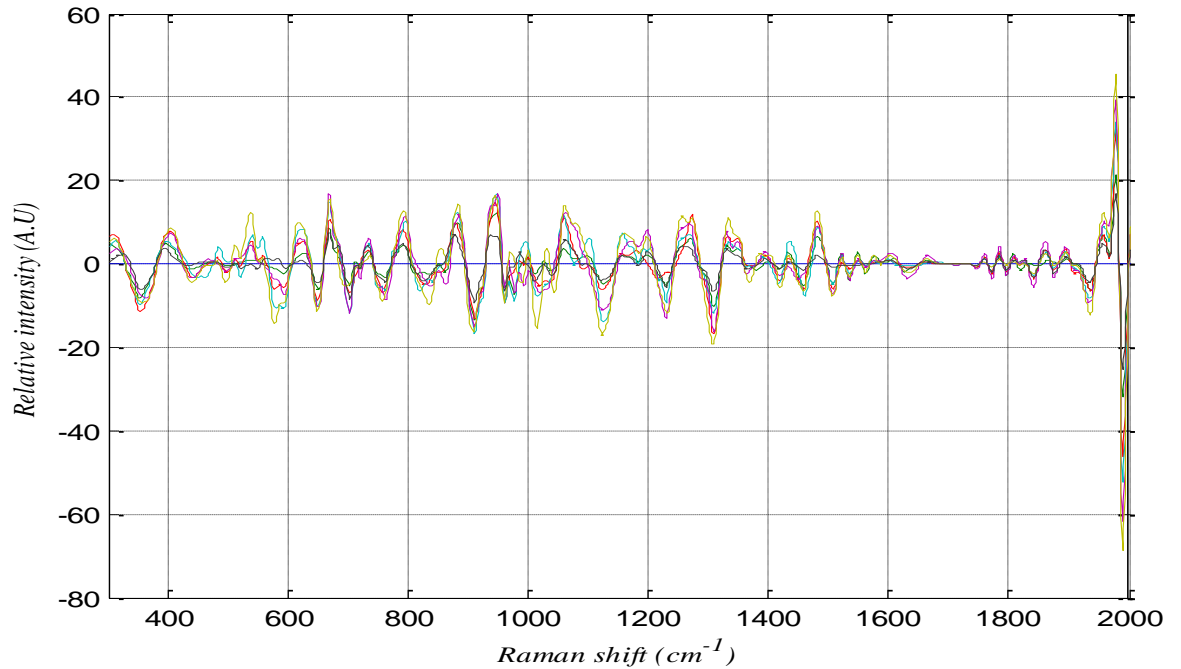


Fig. 5.24 Espectro Raman de *Streptococo Aureus* con procesamiento con exposiciones desde 1 hasta 35 segundos de emisión y un grado de integración de 2.

Con estos espectros, se procedió a obtener el espectro de las nanopartículas de látex de 218nm y 848nm de diámetro aprox. suspendidas en agua desionizada con el fin de corroborar que el equipo estuviese bien calibrado. Los espectros obtenidos por estas pruebas son los que se muestran en las figuras 5.25, 5.26 y 5.27.

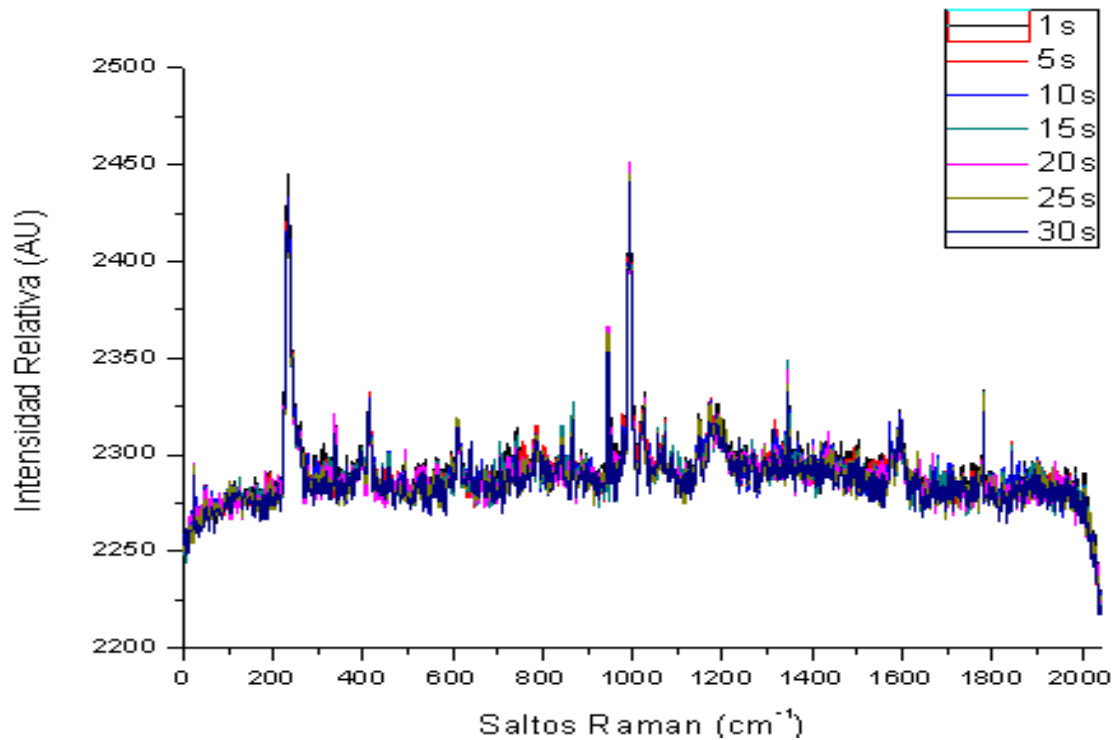


Fig. 5.25 Espectro Raman no procesado, obtenido par una muestra de partículas de látex de 218nm, con exposiciones de estimulación Raman desde 1 hasta 30 segundos. En el espectro se observa el pico característico del látex en 990 desplazamientos Raman reportado en la literatura.

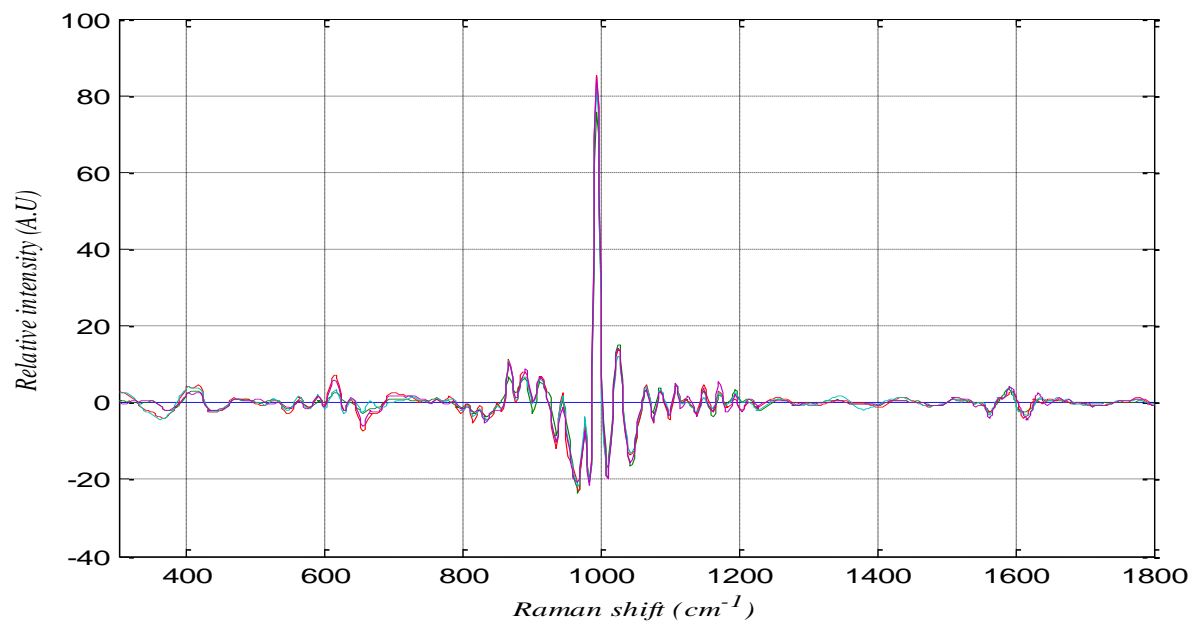


Fig. 5.26 Espectro Raman con procesamiento adquirido con el espectrómetro QE65000 de una muestra de partículas de látex de 218nm de diámetro con exposición de estimulación de 1 hasta 30 segundos

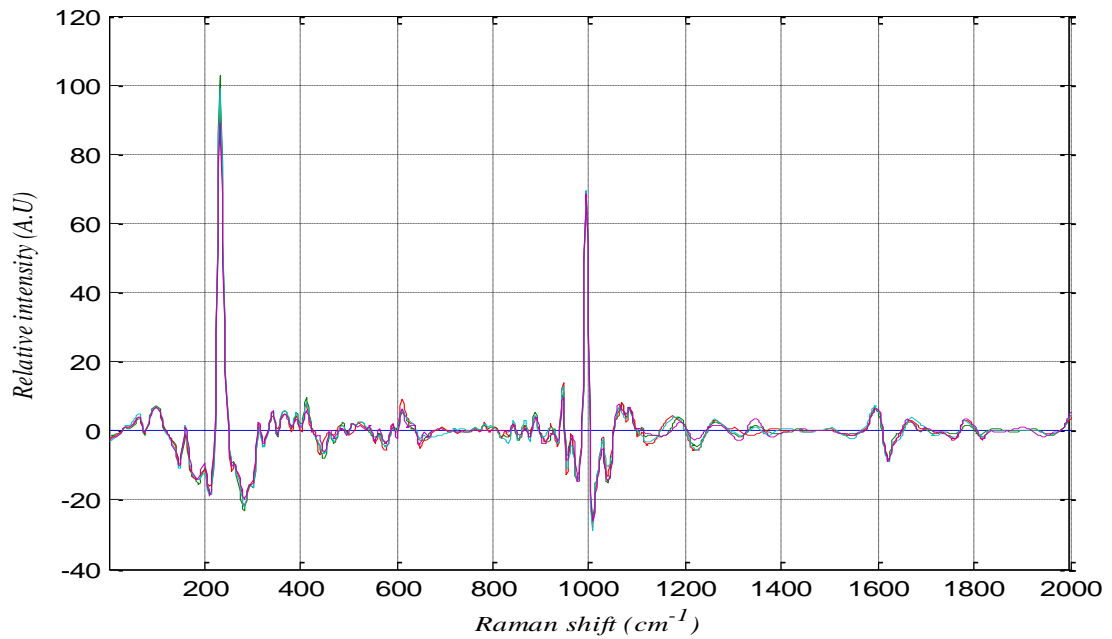


Fig. 5.27 Espectro Raman de con procesamiento adquirido con el espectrómetro QE65000 de una muestra de partículas de látex de 848nm de diámetro con exposición de estimulación de 1 hasta 30 segundos

El espectro que se tomo como referencia se muestra en la figura 5.28

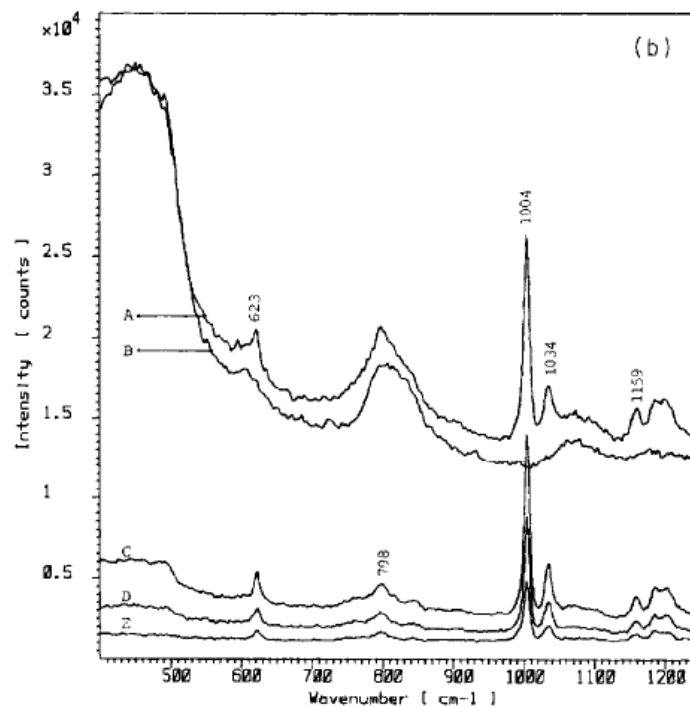


Fig. 5.28. Espectro Raman típico de partículas de látex reportado en la literatura.³⁶

³⁶ G. J. Puppels, W. Colier, J. H. F. Olminkhof, C. Otto, F. F. M. de Mul and J. Greve, *Description and Performance of a Highly Sensitive Confocal Raman Microspectrometer*, **JOURNAL OF RAMAN SPECTROSCOPY**, VOL. 22, 217-225 (1991).

Además de estos espectros, se obtuvieron espectros de las bacterias e-coli, estafilococo epidermidis y estreptococo aureus con diferentes tiempos de dopaje con las nanopartículas de oro, pero siempre manteniendo el dopaje de dos gotas de la solución de NaSi con oro por día a cada muestra. Los espectros obtenidos y filtrados a partir de estas pruebas se muestran a continuación.

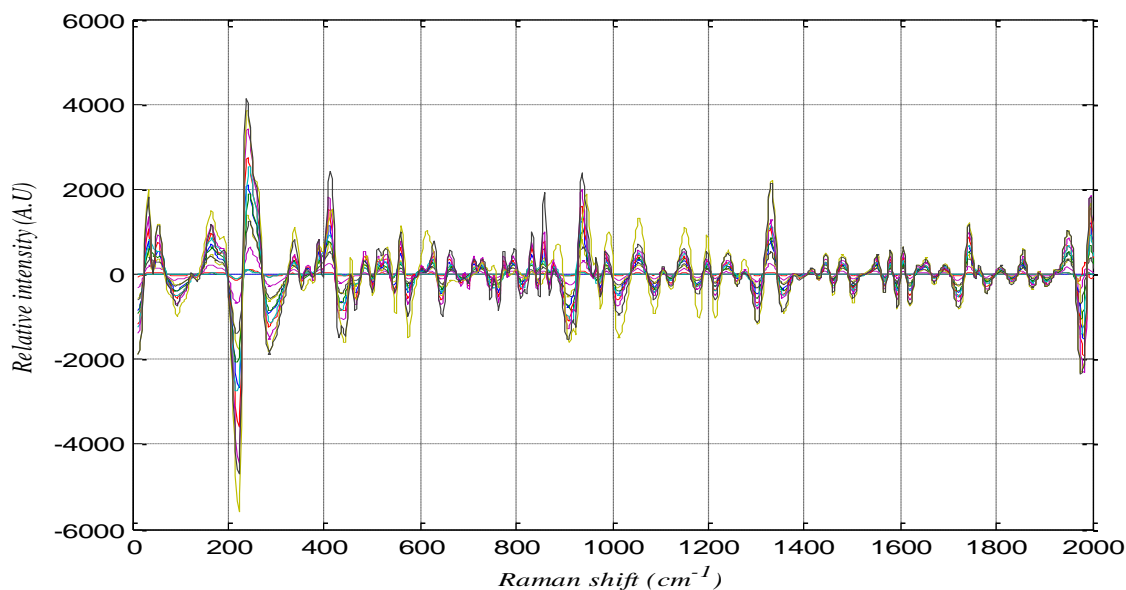


Fig. 5.29 Espectro de *e-coli* con 1 día de dopaje.

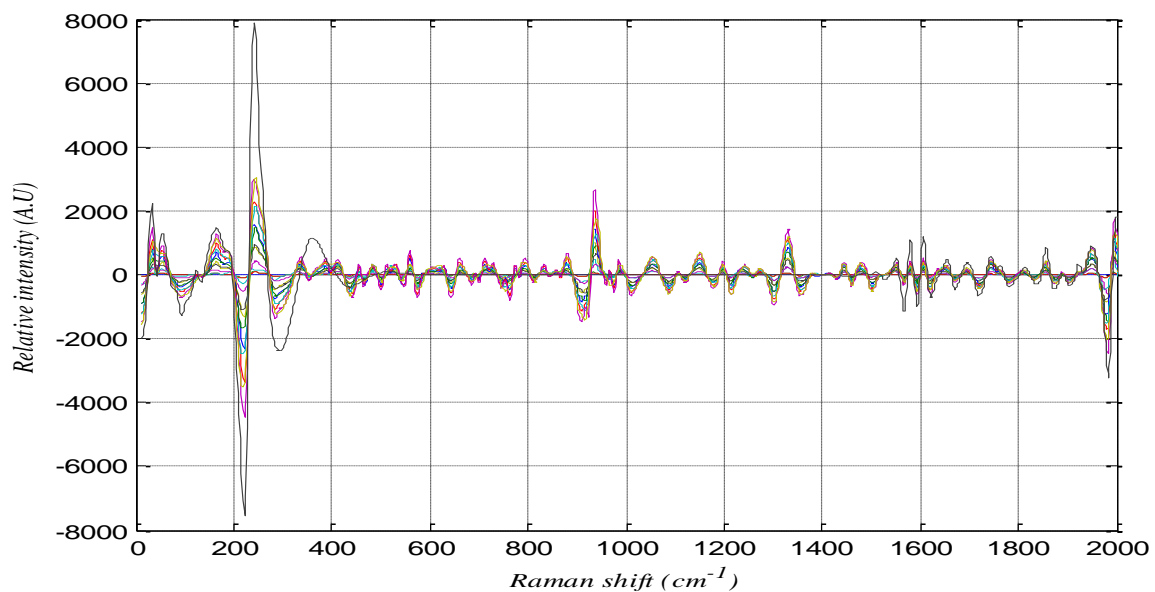


Fig. 5.30 Espectro de *e-coli* con 2 días de dopaje.

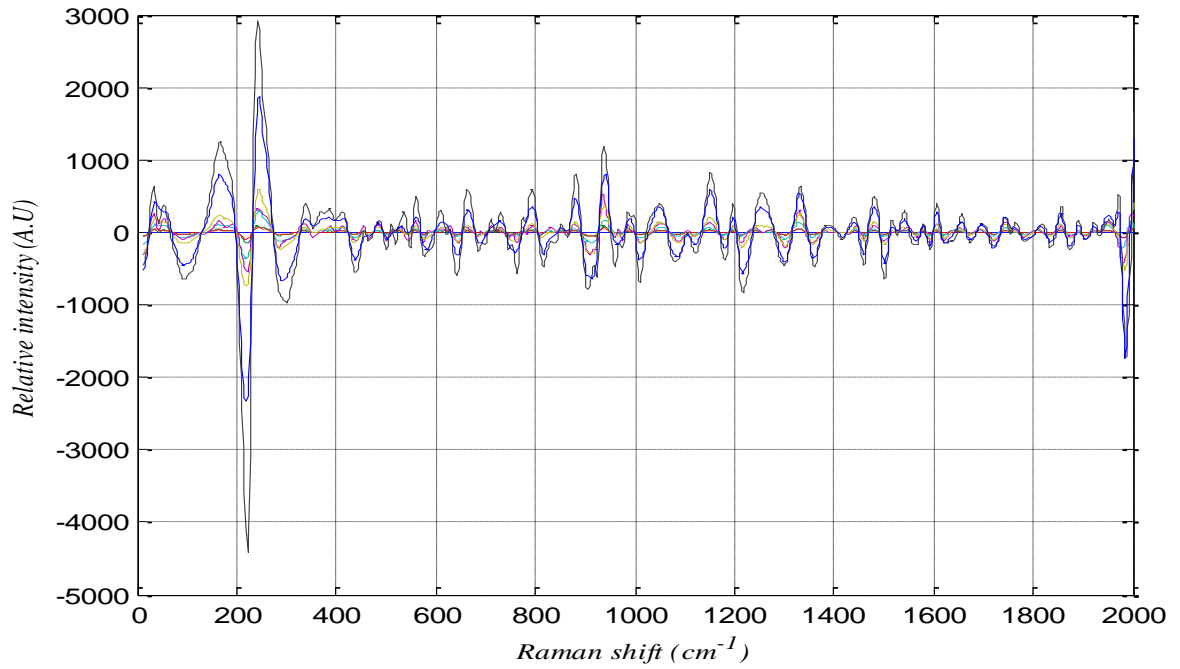


Fig. 5.31 Espectro de *e-coli* con 3 días de dopaje.

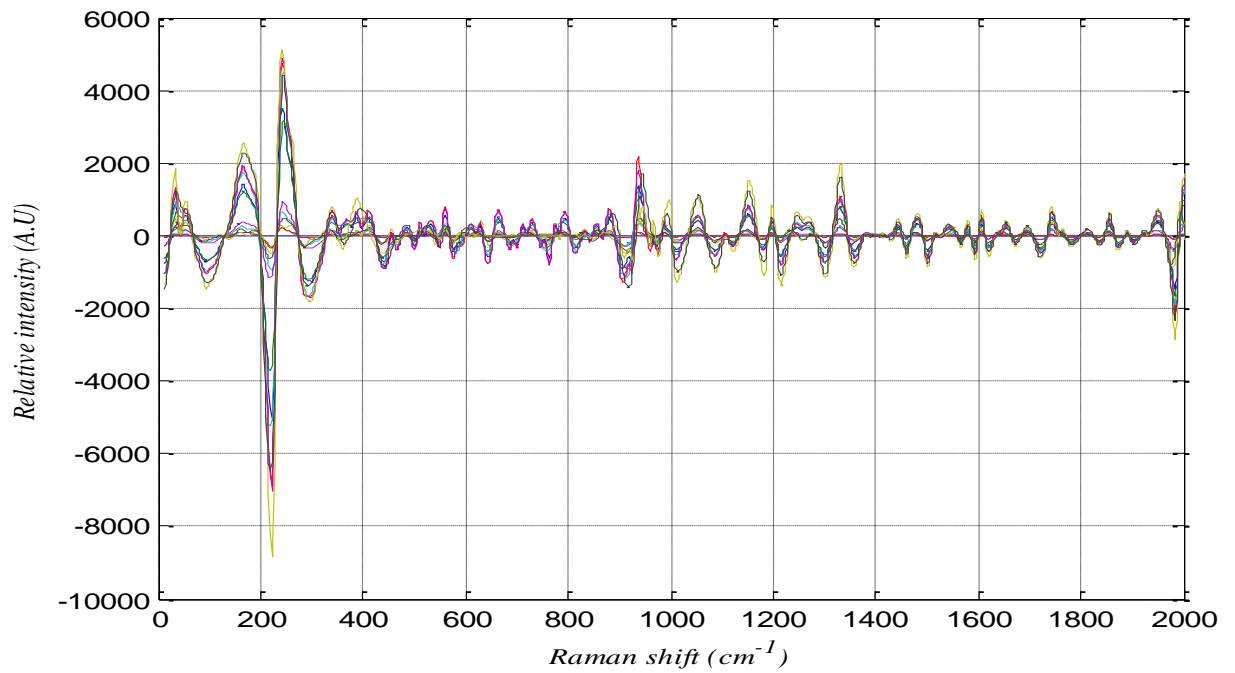


Fig. 5.32 Espectro de *e-coli* con 4 días de dopaje.

En las figuras 5.33 y 5.34 se presentan algunos de los espectros reportados para cepas de *e-coli* dopadas con nanopartículas diversas.

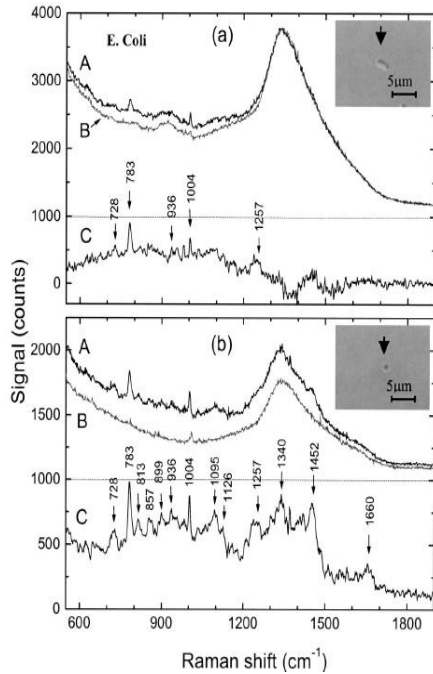


Fig. 5.33 Espectro en infrarrojo cercano de la bacteria *e – coli* simple sobre una cubierta plana de vidrio absorbente.

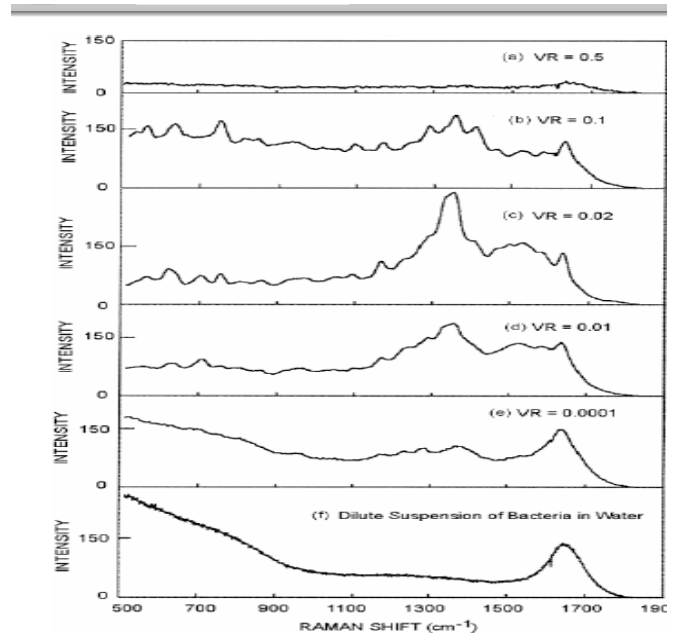


Fig. 5.34 Espectro de bacterias *e – coli* dopadas con nanopartículas de plata a diferentes volúmenes.³⁷

En la figura 5.35 se muestra el espectro en el caso de la bacteria *Estafilococo Aurus*. En este caso la bacteria no soportó el dopaje con oro, muriendo la colonia a las 24hrs. de haber hecho el dopaje.

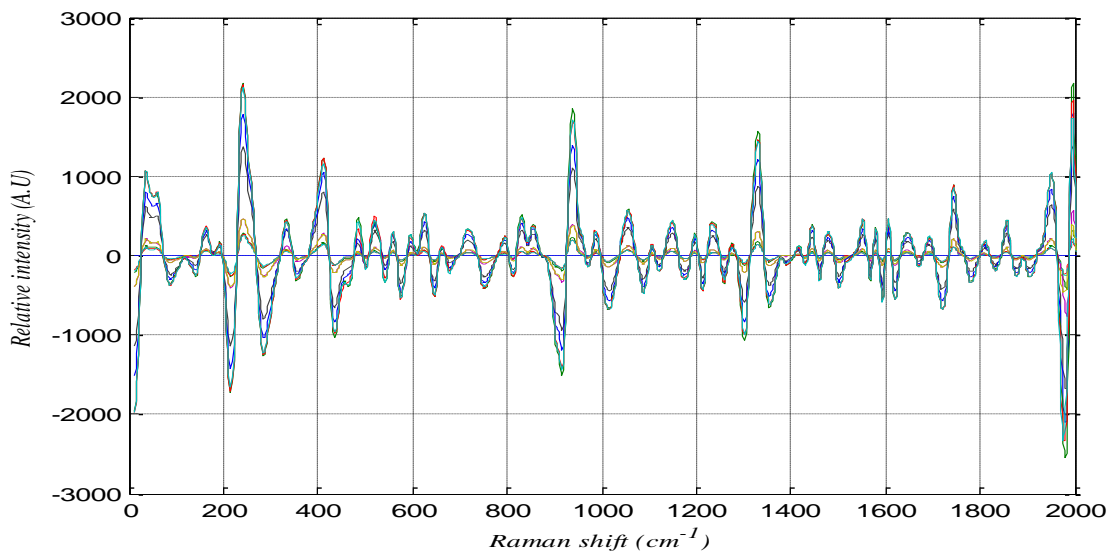


Fig. 5.35 Espectro de *Estafilococo Aurus* con 1 día de dopaje

37

Atanu Sengupta, Mary L. Laucks, And E. James Davis, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Bacteria and Pollen, **Appl. Phys.**, Volume 59, Number 8, 1016 – 1023, 2005.

Finalmente para el caso de la bacteria *Streptococo Epidermidids* se tienen los espectros obtenidos con excitaciones que van desde uno hasta 35 segundos, mostrados en las figuras 5.36, 5.37, 5.38 y 5.39.

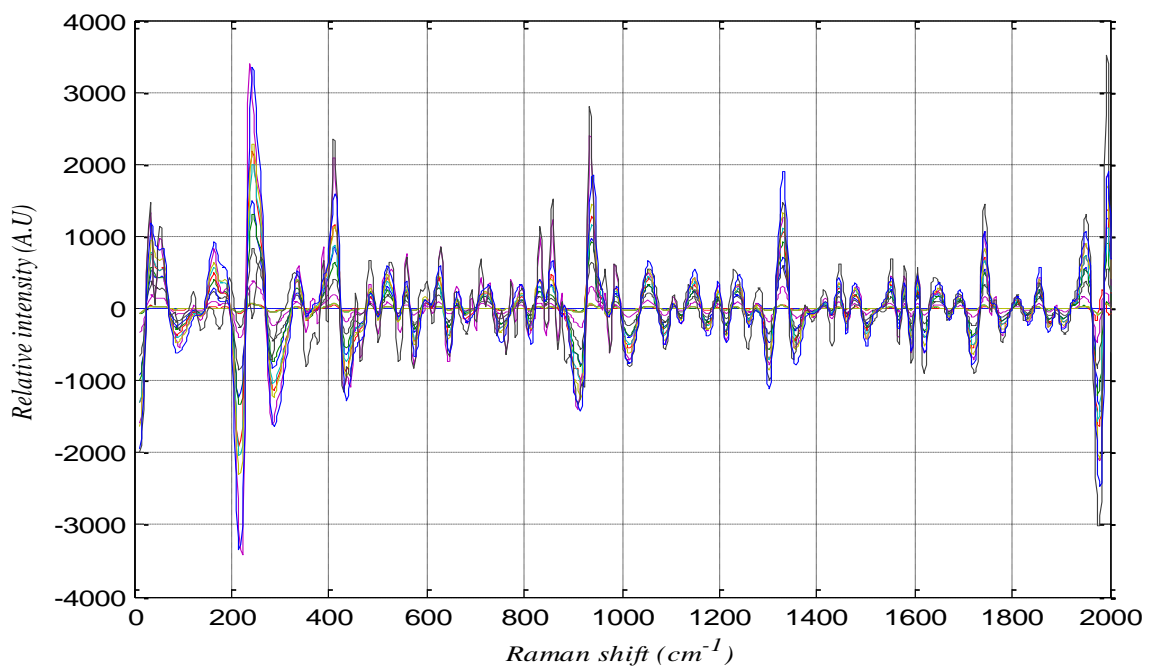


Fig. 5.36 Espectro de *Streptococo Epidermidids* con 1 día de dopaje.

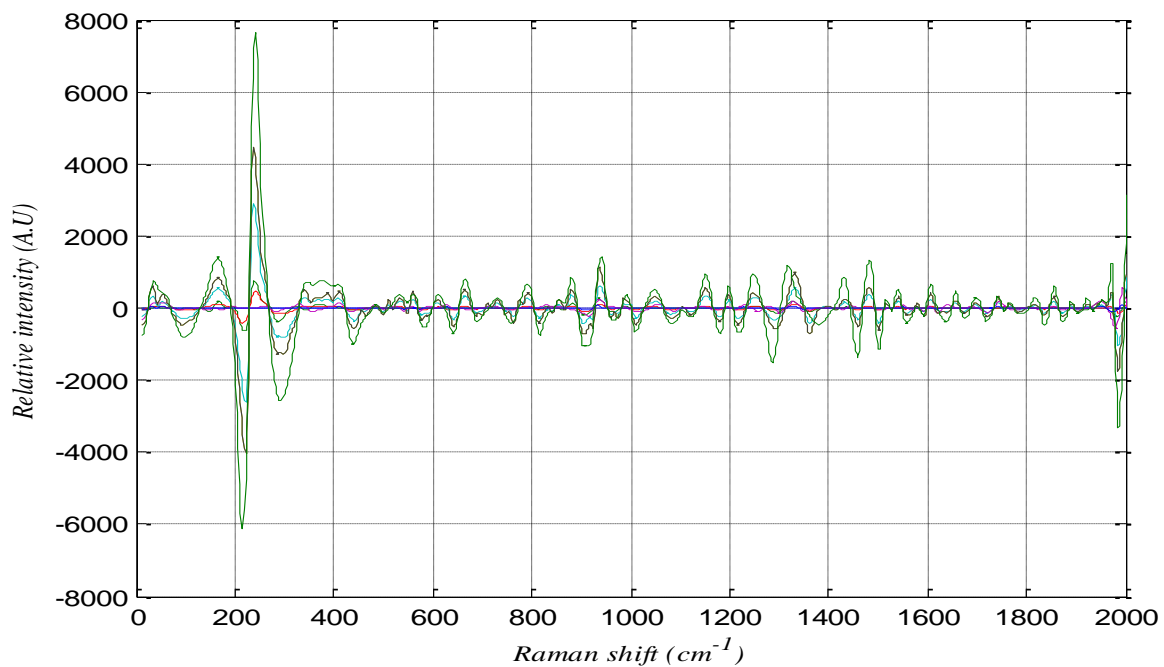


Fig. 5.37 Espectro de *Streptococo Epidermidids* con 2 días de dopaje.

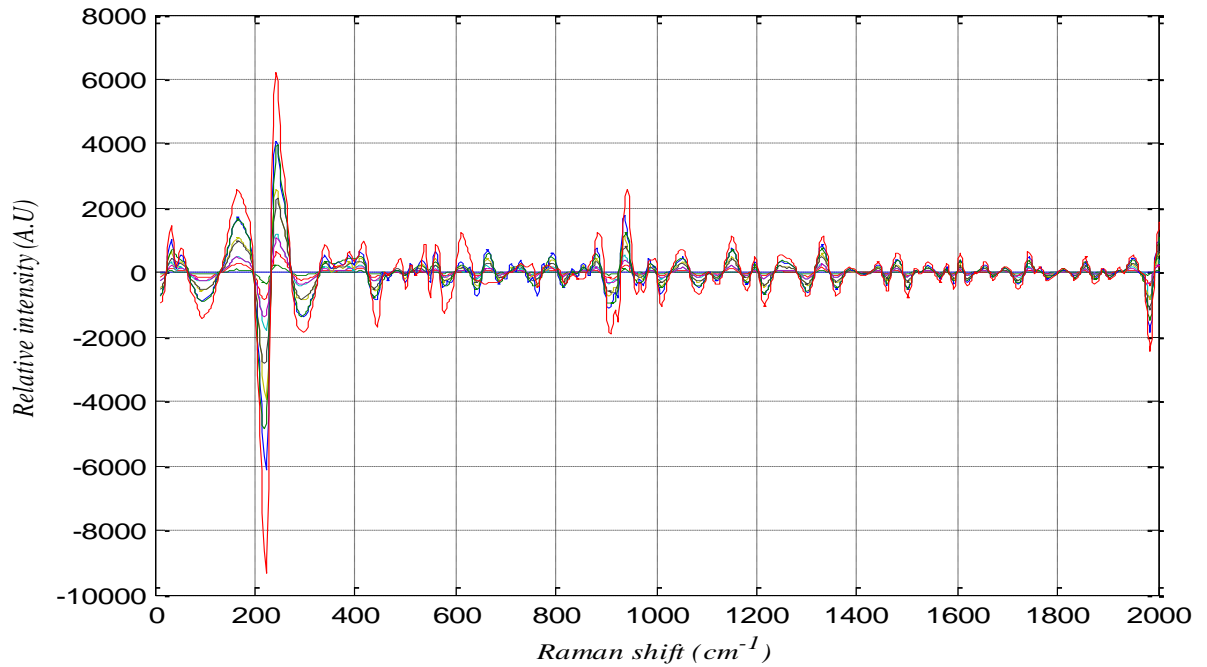


Fig. 5.38 Espectro de *Streptococo Epidermidis* con 3 días de dopaje.

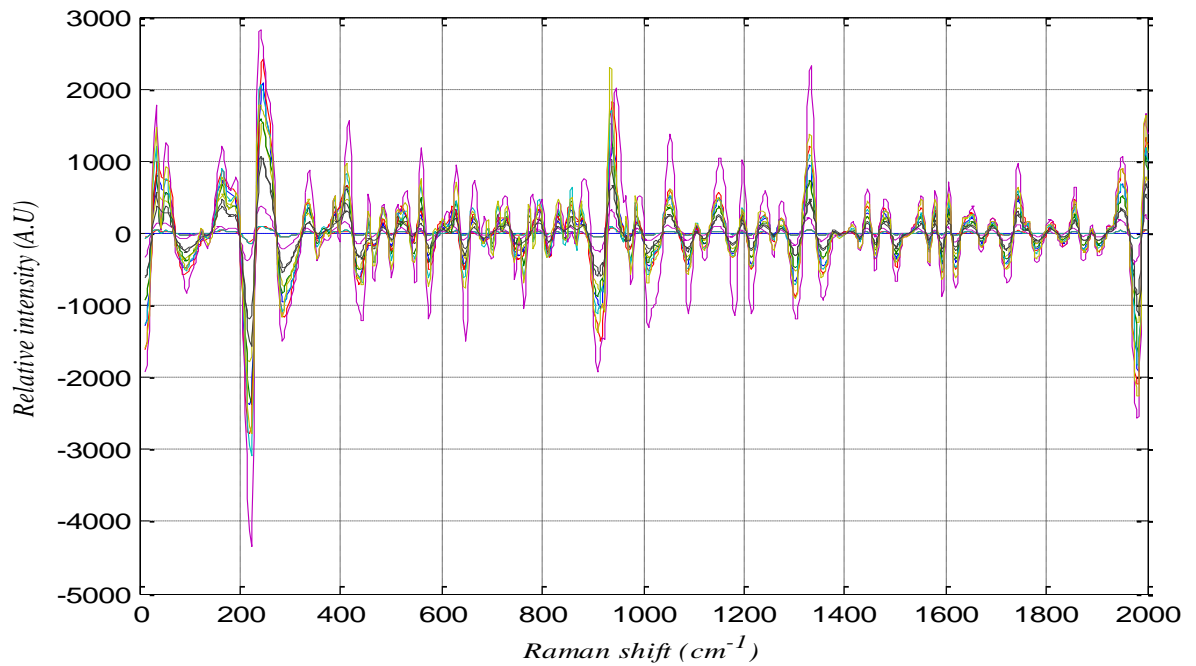


Fig. 5.39 Espectro de *Streptococo Epidermidis* con 4 días de dopaje.

Uno de los espectros reportados en la literatura para *Streptococo Epidermidis* se presenta en la figura 5.40.

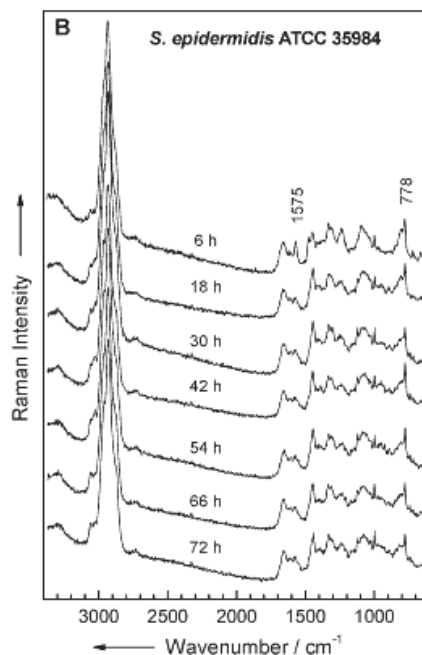


Fig. 2.40 Espectro Raman de *Streptococo Epidermidids* reportado en la literatura.³⁸

Además de las pruebas anteriores, también se tomaron los espectros Raman de la bacteria *Gemella* recolectada en la Universidad Michoacana como se mencionó en el capítulo IV. Las pruebas que se realizaron a estas muestras fueron las de tomar los espectros con y sin dopaje, y con tiempos de exposición que iban desde 1 hasta que el equipo presentara saturación de los receptores esto con dos fines en particular, el primero era el de obtener el espectro Raman de la bacteria *Gemella*, además de tratar de encontrar diferencias entre esta con la de algún *estreptococo* que es algo que hasta el momento no puede diferenciarse por pruebas bioquímicas, ocasionando con ello diagnósticos erróneos en el tratamiento de la bacteria sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, es decir, pacientes que tienen enfermedades que bajan sus defensas como VIH o cáncer por mencionar algunas.

En estas pruebas se obtuvo para la bacteria *Gemella* el siguiente grupo de espectros (figuras 5.41 – 5.44) para el caso de la bacteria sin dopaje.

³⁸ M. Harz,^a P. Rösch,^a K.-D. Peschke,^b O. Ronneberger,^b H. Burkhardt^b and J. Popp, Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions, *The Royal Society of Chemistry* 2005 *Analyst*, 2005, *Analyst*, 2005, 130, 1543–1550.

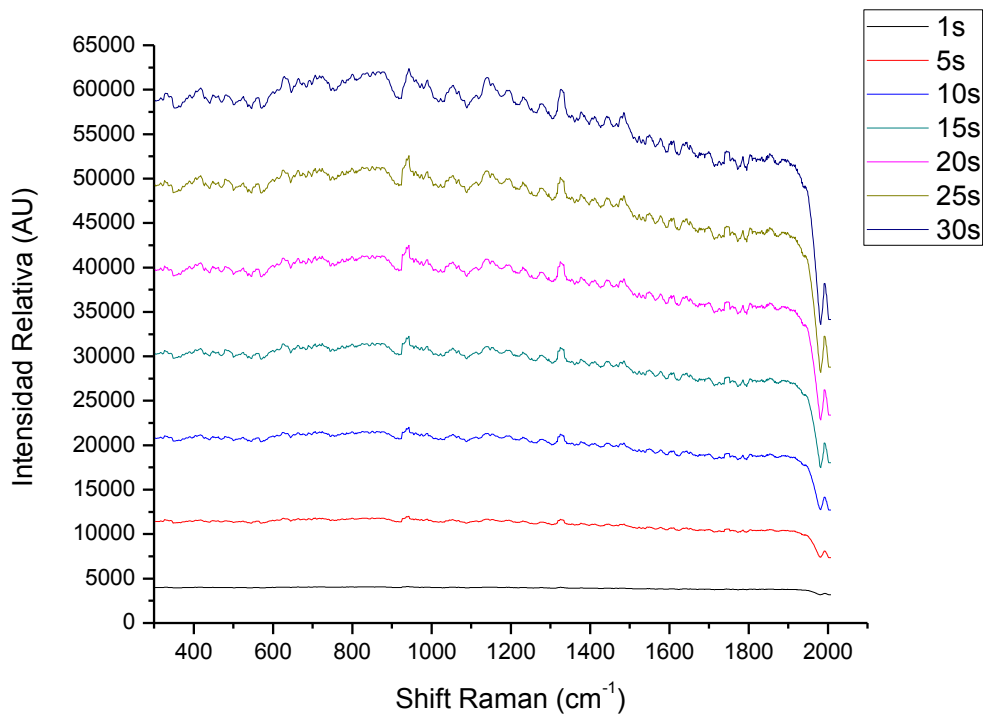


Fig. 5.41 Espectros Raman típicos de la bacteria *Gemella* sin dopaje obtenida por el espectrómetro Raman QE65000 de Ocean Optics empleado, tomando diferentes tiempos de excitación Raman desde 1s hasta 30s en intervalos de 5 segundos

Espectros que al ser procesados quedan como lo muestra la imagen 5.42.

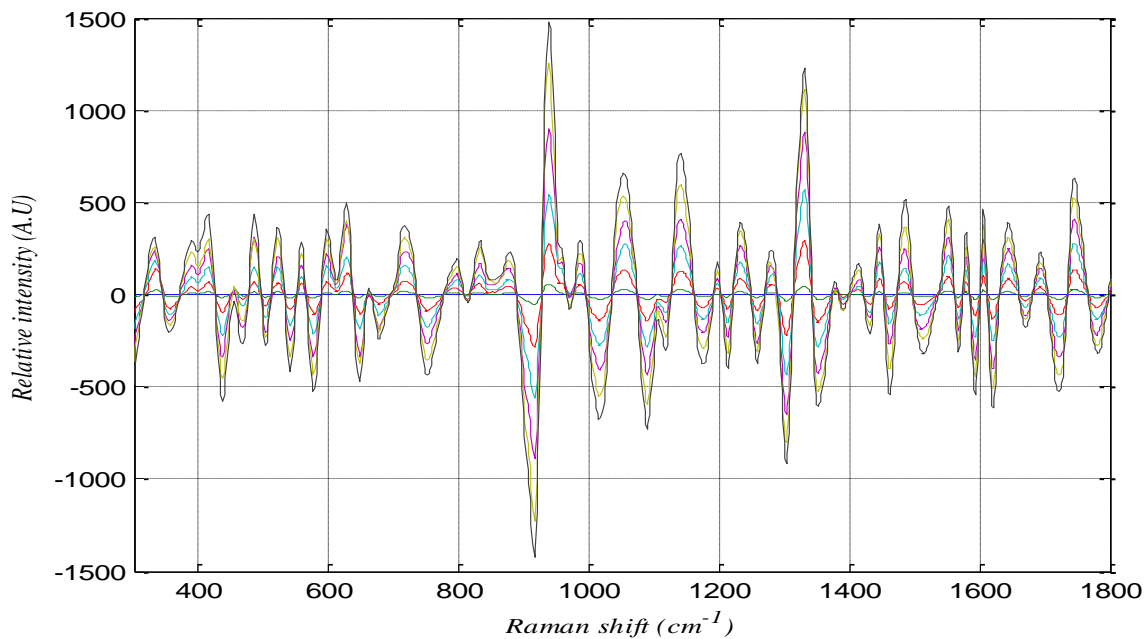


Fig. 5.42 Espectros Raman de una cepa de *Gemella* a diferentes tiempos de exposición de Excitación Raman. Datos procesados para eliminar la fluorescencia.

Ahora si se toma los espectros Raman de la bacteria *Gemella* con uno, dos y tres días de dopajes se obtienen los espectros mostrados en las figuras 4.53 y 4.54.

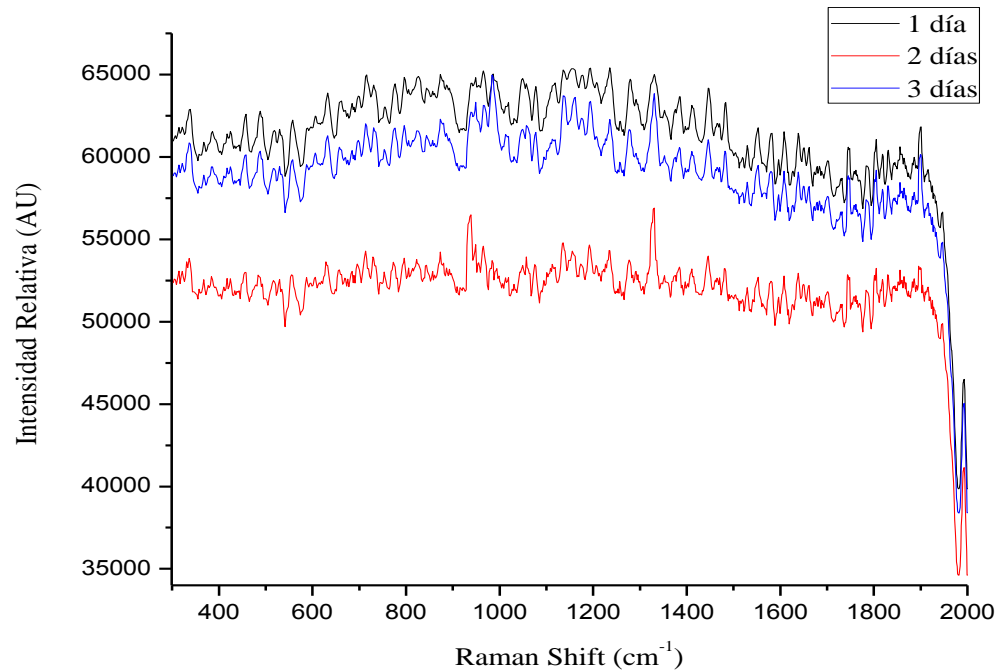


Fig. 5.43 Espectros Raman sin procesamiento, obtenidos de una cepa de *Gemella* con diferentes concentraciones de dopaje con partículas de oro de 200nm diámetro, agregando 100 micro litros por día a la cepa. Datos obtenidos con un tiempo de excitación Raman de 25 segundos.

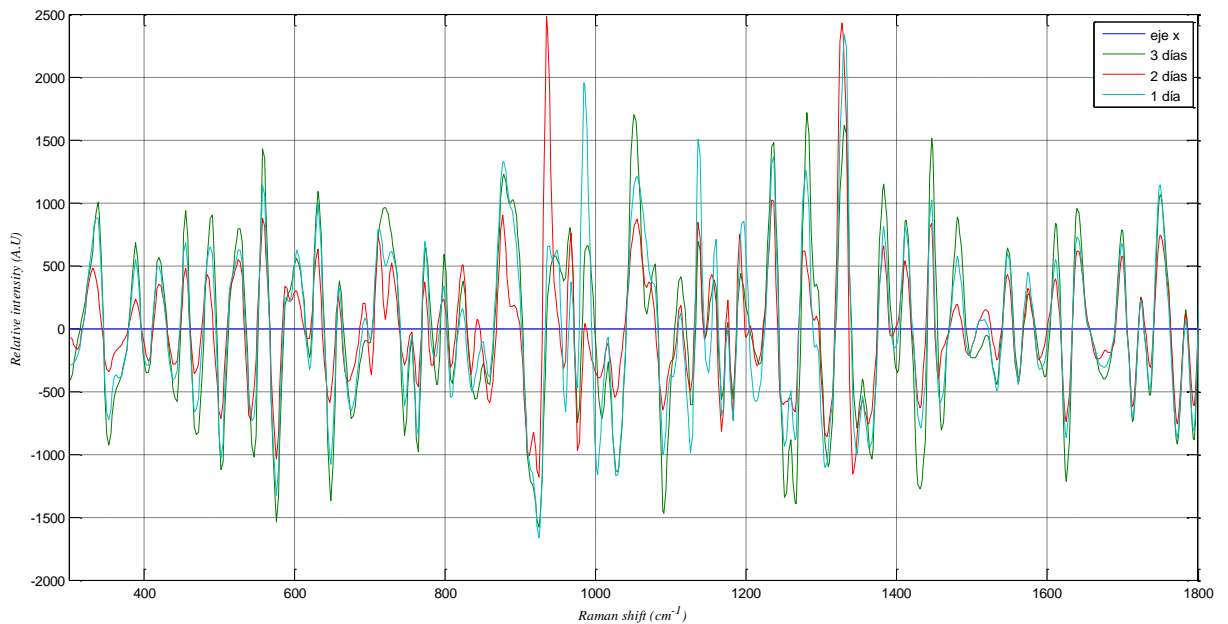


Fig. 5.44 Espectros Raman con procesamiento para eliminar fluorescencia. Espectros obtenidos de una cepa de *Gemella* con diferentes grados de dopaje con partículas de oro de 200nm de diámetro, agregando 100 micro litros por día la cepa. Datos obtenidos con un tiempo de excitación Raman de 25 segundos.

Con estos datos se puede observar que los picos de los espectros se hacen más agudos conforme aumenta el nivel de dopaje en las muestras. Estas mismas pruebas se hicieron con el *estreptococo aureus* obteniendo los espectros mostrados en las figuras 5.45 y 5.46.

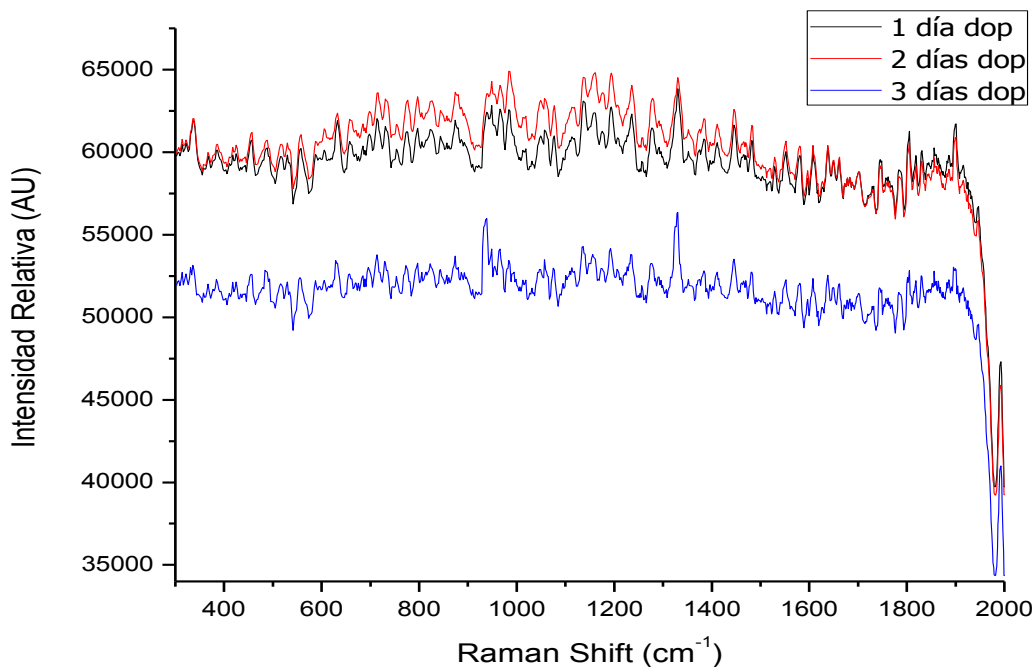


Fig. 5.45 Espectros Raman sin procesamiento de una cepa de *estreptococo aureus* con diferentes grados de dopaje con partículas de oro de 200 nm de diámetro, agregando 100 micro litros por día a la muestra. Datos obtenidos con un tiempo de excitación Raman de 25 segundos.

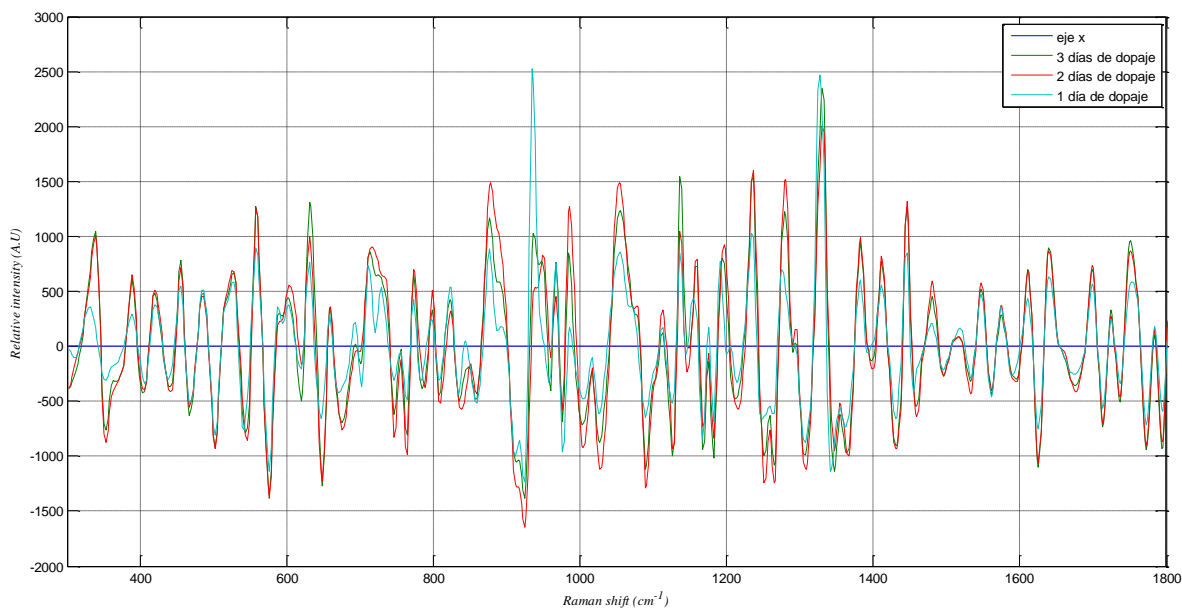


Fig. 5.46 Espectros Raman con procesamiento para eliminar fluorescencia. Datos de una cepa de *estreptococo aureus* con diferentes grados de dopaje con partículas de oro de 200 nm de diámetro, agregando 100 micro litros por día a la muestra. Datos obtenidos con un tiempo de excitación Raman de 25 segundos.

Con los datos ya adquiridos y procesados fueron comparados los espectros de la *Gemella* junto con los del *estreptococo aureus* para tratar de identificar diferencias en sus espectros. Los resultados de estas comparaciones se muestran en la figuras 5.47 – 5.50.

Casos sin dopaje

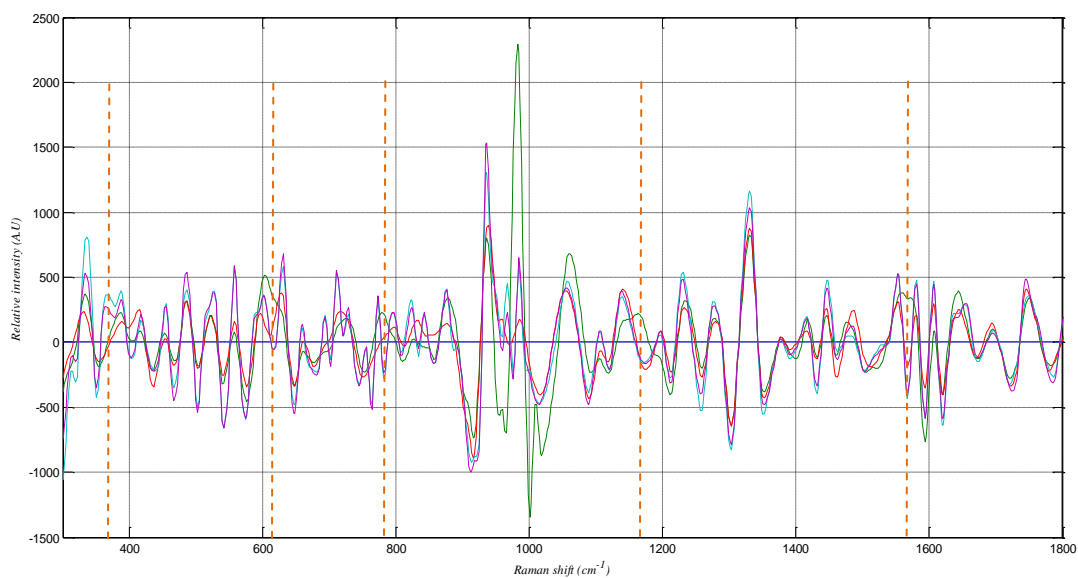


Fig. 5.47 Espectros de *Gemella* y *estreptococo aureus* con exposición de 15s mostrando diferencias en los puntos señalados por las líneas punteadas color naranja.

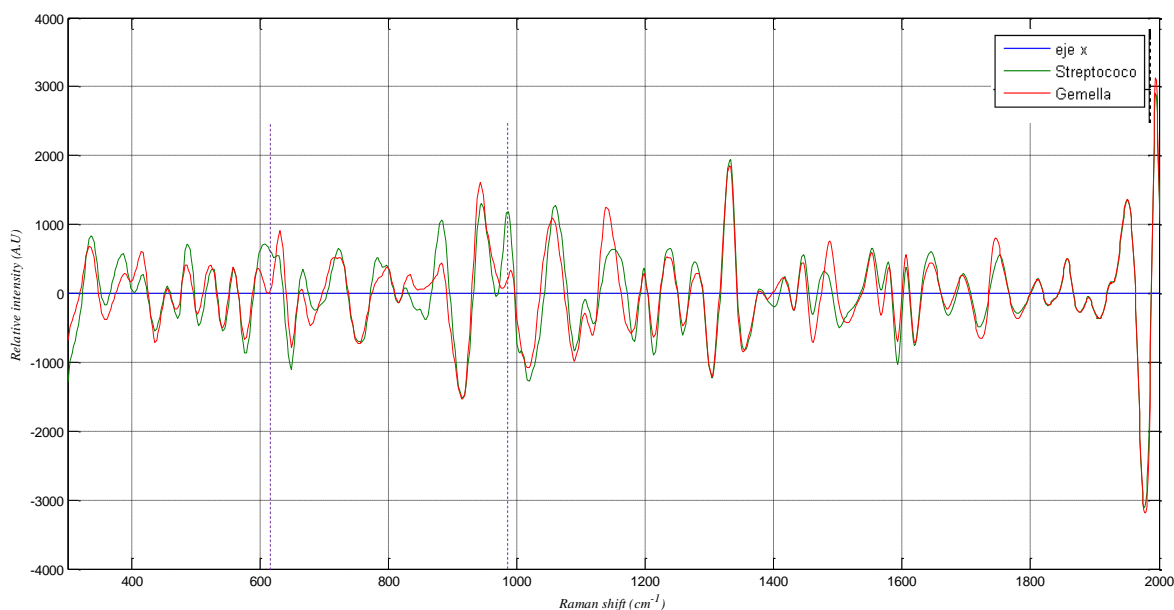


Fig. 5.48 Espectros de *Gemella* y *estreptococo aureus* con exposición de 25s y un día de dopaje

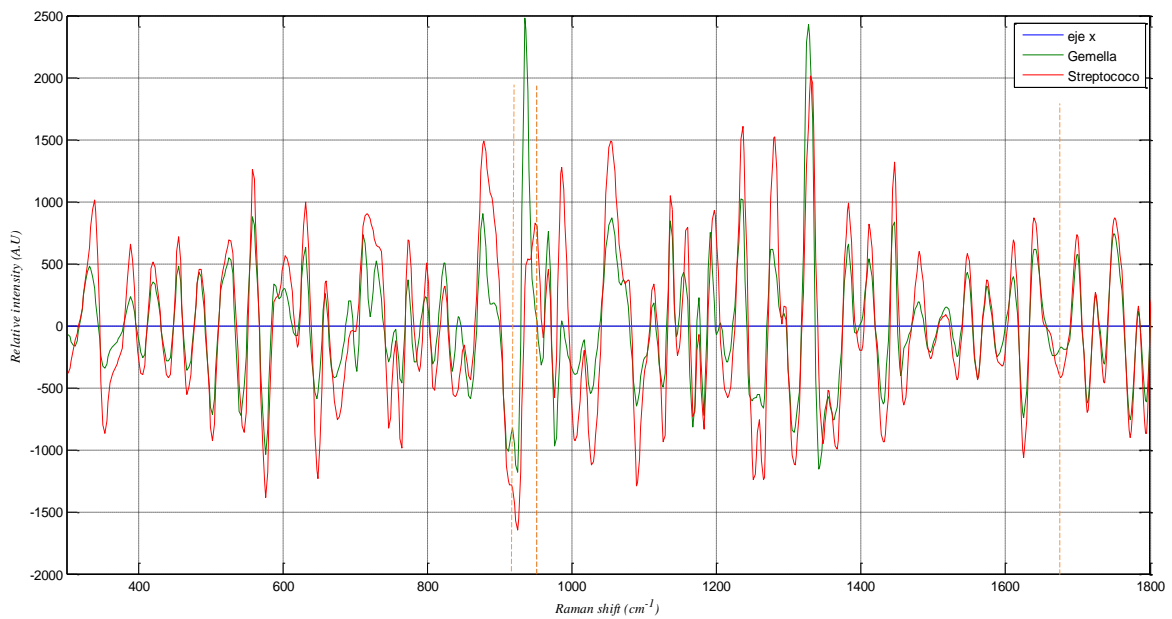


Fig. 5.49 Espectros de *Gemella* y *estreptococo aureus* con exposición de 25s y dos días de dopaje

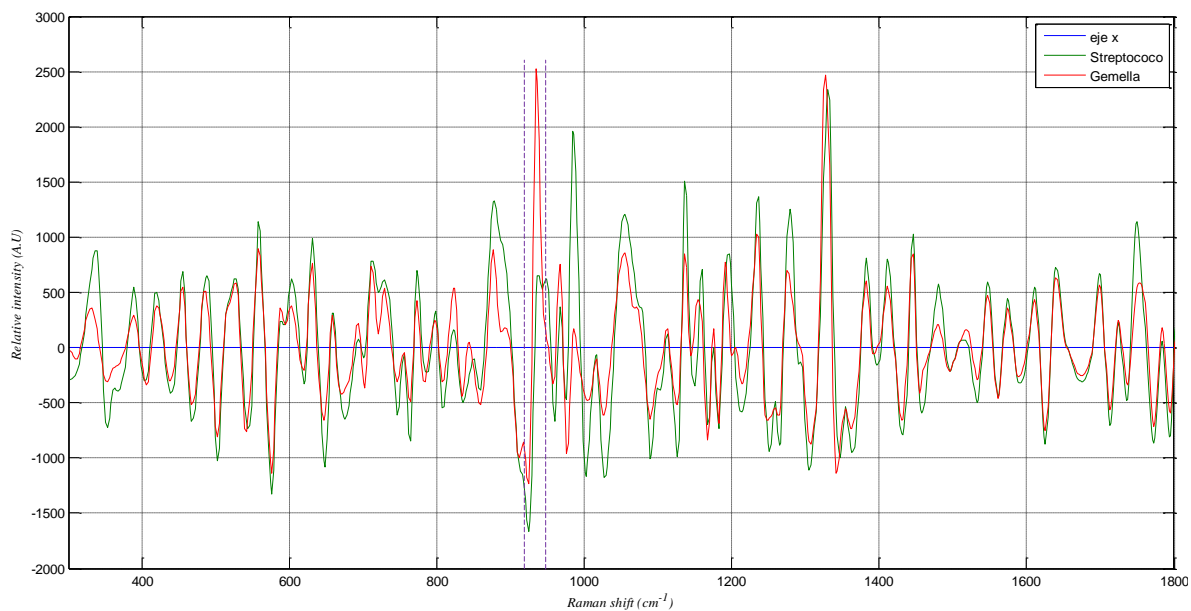


Fig. 5.50 Espectros de *Gemella* y *estreptococo aureus* con exposición de 25s y tres días de dopaje

En estos grupos de espectros se obtuvieron zonas en las que existe un valle en un espectro mientras en el otro se observa un pico, esto puede ser por diferencia de los

espectros o por ruido al hacer la prueba. Por otro lado, se obtuvo el espectro Raman de las nanopartículas de oro inmersas en NaSi con el fin de ubicar sus picos y no confundirlos con los propios de la bacteria analizada. El grupo de espectros Raman referentes a las nanopartículas se muestran a continuación para el caso ya procesado.

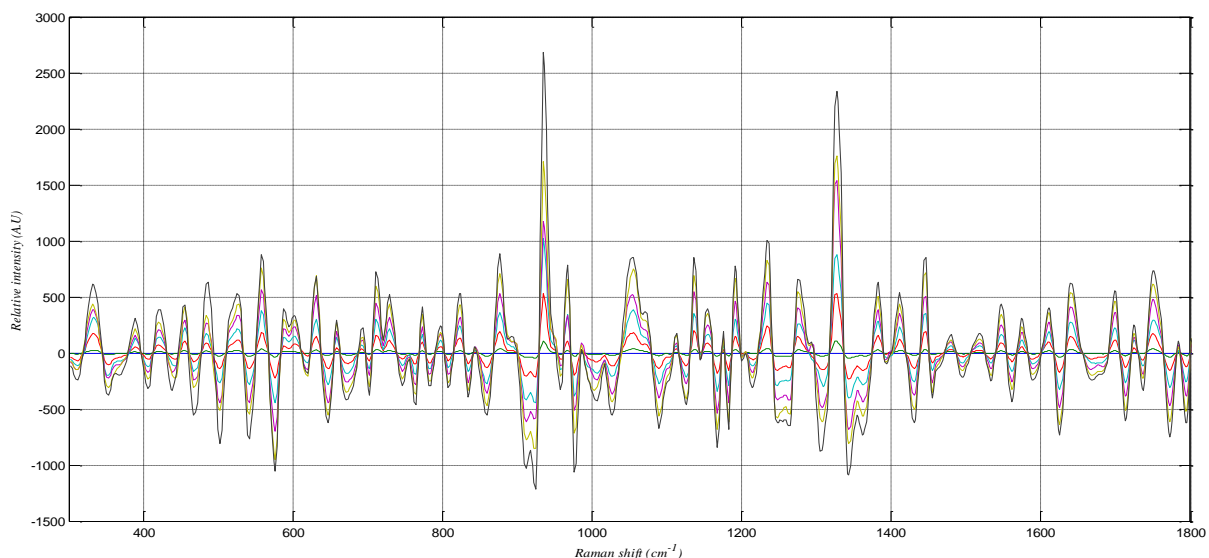


Fig. 5.52 Espectros Raman obtenidos y procesados de una muestra de las nanopartículas de oro de 200nm de diámetro con picos en 934 y 1330 unidades en desplazamiento Raman.

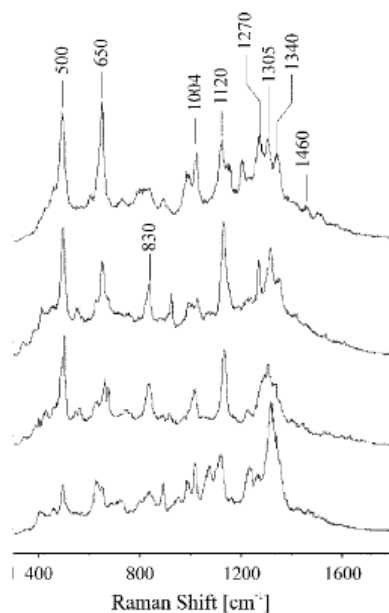


Fig. 5.53 Espectro Raman típico reportado en la literatura de nanopartículas coloides de oro de 1 micra de diámetro.³⁹

³⁹ Katrin Kneipp,* Abigail S. Haka, Harald Kneipp, Kamran Badizadegan, Noriko Yoshizawa, Charles Boone, Karen E. Shafer-Peltier, Jason T. Motz, Amachandra R. Dasari, And Michael S. Feld, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Single Living Cells Using Gold Nanoparticles*, *APPLIED SPECTROSCOPY*, Volume 56, Number 2, 150 – 154, 2002.

Se obtuvieron los espectros Raman de los microorganismos con los que se poseía, pudiendo detectar algunos picos significativos y consistentes en cada uno de ellos.

Al comparar el espectro generado por la bacteria Gemella con el obtenido de la bacteria Aureus pudieron observar algunas zonas donde se presentan diferencias considerables.

Se observó que aplicando la técnica de SERS en las muestras censadas, la señal adquirida aumentó su calidad y los picos característicos se hicieron más distinguibles.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Se estableció un grupo de trabajo multidisciplinario entre profesionales de la salud y físicos, con el fin de estudiar características fisicoquímicas de las bacterias colectadas a través de la técnica propuesta, que demostró ser no invasiva y de no contacto.
2. Se desarrolló un arreglo de pinzas ópticas de baja potencia, baja temperatura, con una potencia de 1.5mW por partícula aproximadamente, además de ser un arreglo compacto y muy robusto en cuanto a vibraciones. Adicionalmente se analizó mediante simulaciones generadas con el software Zemax el objetivo de microscopio utilizado en el arreglo de trampa óptica diseñado.
3. Se realizaron atrapamientos de muestras biológicas y no biológicas con el arreglo de pinzas ópticas diseñado.
4. Se observó que en el caso de las algas, si estas coincide con la zona de Rayleigh del láser se generan cambios en su morfología lo que se refleja en una pérdida de color.
5. Se obtuvieron los espectros Raman de las bacterias colectadas para los casos de cepas puras y cepas dopadas con nanopartículas de oro, resultando el espectro de la bacteria *Gemella* un espectro no reportado en la literatura hasta el momento.
6. Se propuso una técnica alternativa para diferenciar a la bacteria *Gemella* con el grupo de los estreptococos, aplicando la comparación de los espectros Raman de ambas bacterias. En dichos espectros se observó que ambos grupos bacterianos presentan una gran similitud en su composición, pero presentan sutiles variaciones que pudiesen aplicarse para detectar rápidamente su diferenciación bioquímica.

7. El trabajo desarrollado permite conocer los espectros de las bacterias de lo cual se puede conocer composición química. Esto puede ser aprovechado en el área farmacéutica para elaborar medicamentos específicos para tratamientos médicos.
8. Además se puede diferenciar dos muestras biológicas que presenten características bioquímicas similares, que con otros métodos como la tinción Gram es difícil de lograr.

APÉNDICE A

Ecuaciones de Maxwell y ecuación de onda

Antes de entrar en el tema formal la tesis y todo el análisis que este conlleva, es necesario recordar la formulación de la ecuación de onda a partir de las ecuaciones de Maxwell, las cuales son la parte medular de todo el estudio del espectro electromagnético.

Las ecuaciones de Maxwell consisten en 4 ecuaciones fundamentales que describen el comportamiento de cualquier onda electromagnética, además de poder predecir de manera teórica el comportamiento que tiene un campo electromagnético con ciertas características al interactuar con un objeto. Las cuatro ecuaciones fundamentales en su forma diferencial e integral son⁴⁰:

Tabla A.1 Ecuaciones de Maxwell

	Forma diferencial	Forma integral
Ley de Gauss eléctrica	$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \rho$	$\oint_s \vec{D} \cdot dA = \int_v \rho dV$
Ley de Gauss Magnética	$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0$	$\oint_s \vec{B} \cdot dA = 0$
Ley de Ámpere	$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$	$\oint_c \vec{E} \cdot dl = -\frac{d}{dt} \int_s \vec{B} \cdot dA$
Ley de Faraday	$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$	$\oint_c \vec{H} \cdot dl = \int_s \vec{J} \cdot dA + \frac{d}{dt} \int_s \vec{D} \cdot dA$

Estas cuatro ecuaciones en sus dos formas matemáticas son el resultado de procesos experimentales por lo que no son demostrables en un enfoque matemáticamente estricto. Estas ecuaciones son aplicables a casi todas las situaciones a nivel macroscópico y son aplicadas como principios físicos.

⁴⁰ Reitz Milford, *Fundamentos de teoría electromagnética*, ed. Addison Wesley, 4ª edición, Barcelona, 1998.

Una de las consecuencias más importantes de las ecuaciones de Maxwell es la deducción de las ecuaciones de propagación de ondas electromagnéticas en medios lineales. Tómese el caso de la ecuación de onda para \vec{H} en donde se toma el rotacional del campo magnético, con lo que se tiene considerando la ley de Ampere:

$$\nabla \times \nabla \times \vec{H} = \nabla \times \vec{J} + \nabla \times \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (6.1)$$

que al poner $\vec{D} = \varepsilon \vec{E}$ y $\vec{J} = g \vec{E}$ y suponiendo que g y ε son constantes se tiene que

$$\nabla \times \nabla \times \vec{H} = g \nabla \times \vec{E} + \varepsilon \frac{\partial}{\partial t} \nabla \times \vec{E} \quad (6.2)$$

El orden de las derivadas con respecto al tiempo y al espacio pueden intercambiarse si \vec{E} es una función que se comporta lo suficientemente bien, que es el caso que se analizará. Se puede aplicar la ley de Faraday para obtener la siguiente expresión derivada de la ecuación (1.2)

$$\nabla \times \nabla \times \vec{H} = -g \mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} - \varepsilon \mu \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} \quad (6.3)$$

donde se ha aplicado que $\vec{B} = \mu \vec{H}$, siendo μ una constante. Ahora aplicando la identidad vectorial de:

$$\vec{\nabla} \times \vec{\nabla} \times \vec{H} = \vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot \vec{H}) - \vec{\nabla}^2 \vec{H} \quad (6.4)$$

se obtiene la expresión

$$\vec{\nabla} \vec{\nabla} \cdot \vec{H} - \vec{\nabla}^2 \vec{H} = -g \mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} - \varepsilon \mu \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} \quad (6.5)$$

al tener a μ como una constante se obtiene

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{H} = \frac{1}{\mu} \vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (6.6)$$

Por lo que el lado izquierdo de la ecuación 1.5 se elimina dando como resultado la ecuación de onda final:

$$\bar{\nabla}^2 \bar{H} - \varepsilon\mu \frac{\partial^2 \bar{H}}{\partial t^2} - g\mu \frac{\partial \bar{H}}{\partial t} = 0 \quad (6.7)$$

Aplicando el mismo procedimiento se tiene que para el caso eléctrico la ecuación de onda está dada como⁴¹:

$$\bar{\nabla}^2 \bar{E} - \varepsilon\mu \frac{\partial^2 \bar{E}}{\partial t^2} - g\mu \frac{\partial \bar{E}}{\partial t} = 0 \quad (6.8)$$

⁴¹ John R. Reitz : Research Laboratory : Ford Motor Company - Frederick J. Milford : Battelle Memorial Institute - Robert W. Christy : Dartmouth College, *Fundamentos De La Teoria Electromagnetica*, ed. Addison Wesley, 1996.

REFERENCIAS

- [1] Ewen Smith, Geoffrey Dent, “Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach”, ed. Jhon Wiley & Son, England, 2005.
- [2] Ashkin, Acceleration and trapping of particles by radiation pressure, *Phys. Rev. Lett.* 24, 156 – 159 (1970).
- [3] Ashkin, Atomic – beam deflection by resonance – radiation pressure, *Phys. Rev. Lett.* 25, 1321 – 1324 (1970).
- [4] Arthur Ashkin, “Optical trapping and manipulation of Neural Particles using laser”, ed. World Scientific, USA, 2006. page VII.
- [5] Microwave Magnetrons, ed. G. B. Collins, in MIT Radiation Series, Vol. 6 , Sec. 19.13.
- [6] E. G. Rawson and A. D. May, Propulsion and angular stabilization of dust particles in a laser cavity, *App. Phys. Lett.* 8, 93 – 95 (1966).
- [7] Ashkin, J. M. Dziedzic and T. Yamane, Optical trapping and manipulation of single cells used infrared laser beam, *Nature* 330, 769 – 771 (1987).
- [8] Smekal, *Naturwissenschaften*, 43, 873 (1923).
- [9] HA Kramers, W Heisenberg. *Z Phys* 31:681, 1925.
- [10] PAM Dirac. *Proc Roy Soc London A* 114:710, 1927.
- [11] E. Schrodinger. *Ann Phys* 81:109, 1926.
- [12] A new type of secondary radiation, *Nature* , 1928, 121 , 501 (31 March 1928).
- [13] A change of wavelength in light scattering, *Nature* , 1928, 121 , 619 (21 April 1928).

- [14] WW Coblenz. *Investigations of Infrared Spectra*. Washington, DC: Carnegie Institution, 1905. (republished by The Coblenz Society, Norwalk, CT, 1962).
- [15] A Jayaraman, AK Ramdas. Chandrasekhara Venkata Raman. *Phys Today* 57-64, 1988.
- [16] A Yariv. *Introduction to Optical Electronics*. New York: Holt, Rinehart and Winston.
- [17] CH Townes. In: JR Singer, ed. *Advances in Quantum Electronics*. New York: Columbia University Press, 1961, pp 3-11.
- [18] SPS Porto, DL Wood. *J Opt Soc Am* 52:251, 1962.
- [19] Tunnacliffe and J. Lapinski, Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 29 October 2003 vol. 358 no. 1438 1755-1771.
- [20] Ashkin and J. M. Dziedzic, Optical Trapping and manipulation of viruses and bacteria, *Science* 235, 1517 – 1520 (1987).
- [21] Changan Xie and Yong-qing Li, Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques, *Appl. Physics*, volume 93, number 5, 2003.
- [22] ATANU SENGUPTA, MARY L. LAUCKS, and E. JAMES DAVIS, Surface – Enhanced Raman Spectroscopy of bacteria and pollen, *App. spectroscopy* vol. 59, 2005.
- [23] Gerard Gouesbet, Gérard Gréhan, "Generalized Lorenz-Mie Theories", Ed. Springer.
- [24] G. Roosen, Optical levitation of spheres, *Can. J. Phys.* 57, 1260 – 1279 (1970).
- [25] G. Roosen and C. Imbert, Optical levitation by means of two horizontal lasers beams: Theoretical and experimental study, *Phys. Lett. A.* 59, 6 – 8 (1976).

- [26] Gérard Gousebet, Gérard Gréhan, “*Generalized Lorenz – Mie Theories*”, ed. Springer, Berlin, 2011, pp 73.
- [27] J. Schulze, M. Schiemann, U. Sonnenborn, Jahre, E. Coli. Bedeutung in Forschung und Medizin, 2006 Alfred-Nissle-Gesellschaft.
- [28] Ricardo Aorca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, ed. Jhon Wiley & Son, Ltd., Ontario, Canada, 2006.
- [29] Howell G. M. Edwards, “*Handbook of Raman Spectroscopy from the research laboratory to the process lines*”, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
- [30] Dworkin, The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria, 3rd edition, vol 4, Springer, 2006.
- [31] Murray R. Spiegel, Probabilidad y estadística, Cap. 7, 211 – 257, ed. Mc Graw Hill.
- [32] Jawetz, Melnick y Adelberg, Microbiología médica”, ed. Manual Moderno, 21ª ed., México 1999.
- [33] QE65000 Operation manual, Ocean Optics, 2010.
- [34] K. Maquelin,^{1,2} C. Kirschner,³ L.-P. Choo-Smith,^{1†} N. A. Ngo-Thi,³ T. van Vreeswijk,^{1‡} M. Stammmler,³ H. P. Endtz,² H. A. Bruining,¹ D. Naumann,³ and G. J. Puppels¹, Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Jan. 2003, p. 324–329.
- [35] E. Villanueva Luna^a, J. Castro Ramosa, S. Vazquez Montiel^a, A. Flores Gilb, J. A. Delgado Atencio^a, and E. E. Orozco Guillenc, Fluorescence and Noise Subtraction from Raman Spectra by Using Wavelets, *Optical Memory and Neural Networks (Information Optics)*, 2010, Vol. 19, No. 4, pp. 310–317, 2010.
- [36] G. J. Puppels,¹ W. Colier, J. H. F. Olminkhof, C. Otto, F. F. M. de Mu¹ and J. Greve, Description and Performance of a Highly Sensitive Confocal Raman

- Microspectrometer, JOURNAL OF RAMAN SPECTROSCOPY, VOL. 22, 217-225 (1991).
- [37] Atanu Sengupta, Mary L. Laucks, And E. James Davis, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Bacteria and Pollen, Appl. Phys., Volume 59, Number 8, 1016 – 1023, 2005.
- [38] Dhriti Nepal, Shankar Balasubramanian, Aleksandr L. Simonian, and Virginia A. Davis. Strong, Antimicrobial Coatings: Single-Walled Carbon Nanotubes Armored with Biopolymers, Phys. Lett. vol 8, 1896 – 1901, 2008.
- [39] Katrin Kneipp,* Abigail S. Haka, Harald Kneipp, Kamran Badizadegan, Noriko Yoshizawa, Charles Boone, Karen E. Shafer-Peltier, Jason T. Motz, Amachandra R. Dasari, And Michael S. Feld, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Single Living Cells Using Gold Nanoparticles, APPLIED SPECTROSCOPY, Volume 56, Number 2, 150 – 154, 2002.
- [40] Reitz Milford, Fundamentos de teoría electromagnética, ed. Addison Wesley, 4ª edición, Barcelona, 1998.
- [41] M. Harz,^a P. Roßsch,^a K.-D. Peschke,^b O. Ronneberger,^b H. Burkhardt^b and J. Popp, Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus Staphylococcus and dependence on their cultivation conditions, The Royal Society of Chemistry 2005 Analyst, 2005, Analyst, 2005, 130, 1543–1550.
- [42] John R. Reitz : Research Laboratory : Ford Motor Company - Frederick J. Milford : Battelle Memorial Institute - Robert W. Christy : Dartmouth College, Fundamentos De La Teoria Electromagnetica, ed. Addison Wesley, 1996.