



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Física

Tesis:

**Diseño y calibración de un espectrómetro
tipo Czerny-Turner para el estudio de
glóbulos rojos atrapados por pinzas ópticas**

Presenta:

Aurea Nictcha Sánchez Espín

Para obtener el grado de :

Maestra en Ciencias (Física)

Asesores:

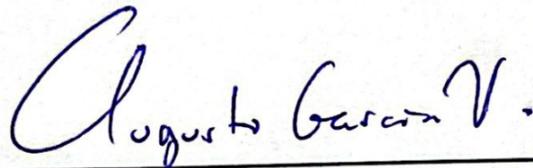
Dr. José Luis Hernández Pozos

Dr. Luis Guillermo Mendoza Luna

Iztapalapa, Ciudad de México

27 de Septiembre 2024

Sinodales



Presidente : Dr. Augusto García Valenzuela



Secretario: Dr. José Luis Hernández Pozos



Vocal: Dr. José Rafael Godínez Fernández

Dedicatoria

A mi papá, siempre te llevo conmigo.

Agradecimientos

Debo mi entera gratitud a mis asesores el **Dr. José Luis Hernández Pozos** y el **Dr. Luis Guillermo Mendoza Luna** por guiarme con paciencia y perseverancia a lo largo de esta investigación.

Al **Dr. César Augusto Guarín Duran** por siempre hacerse un espacio en su ocupada agenda para resolver mis dudas. De igual manera gracias al **Dr. Emmanuel Haro Poniatowski** por los buenos deseos y prestarnos su láser para poder continuar con este trabajo.

A mi mamá **Aurea Andriana Espín Romero** que me enseña cada día sobre la responsabilidad y la compasión. Tu fortaleza es lo que me ha permitido llegar a donde estoy. A mi papá **Armando Sánchez Márquez** por tener siempre el consejo adecuado, no tienes idea de la falta que me haces. Gracias a ambos por siempre creer en mí, por apoyarme en cada paso del camino, pero sobre todo por su amor y comprensión.

Agradezco de todo corazón el apoyo que me brindaste, **Ivan**. Gracias por tu amistad y por compartir conmigo tus conocimientos y tus invaluable consejos.

A mis compañeros de laboratorio: **Cris, Juan, Neri** y **Liz** por que con su amistad las tardes de trabajo extenuante se hacían más amenas.

A **Pedro Ángel**, siempre estaré profundamente agradecida por tu dulce amor y tu apoyo incondicional. Gracias por hacerme parte de tus días y venir a llenar de alegría los míos.

Abstract

Laser Tweezers Raman Spectroscopy (LTRS) is a novel technique that combines the power of Raman spectroscopy with the precision of optical tweezers for the analysis and characterization of biological micro-particles. This work presents the design and calibration of a Czerny-Turner spectrometer that could be assembled onto an existing optical tweezers system, to subsequently carry out simultaneous elasticity and Raman tests on red blood cells. Two versions of the same type of spectrometer were built. From the calibration in the initial stage of the project we obtained Raman spectra using an excitation wavelength of 532 nm. In a second phase, we employed optimized near-infrared optical components to improve resolution and be able to work with a wavelength closer to the infrared region.

Índice general

1	Introducción	15
2	Vibraciones Moleculares	23
2.1	Vibración de una molécula diatómica	23
2.2	Vibraciones de una molécula poliatómica	26
3	Espectroscopía Raman	30
3.1	Introducción	30
3.2	Teoría clásica del efecto Raman	31
3.2.1	Absorción	31
3.2.2	Dispersión	31
3.3	Polarizabilidad	35
3.4	Teoría cuántica del efecto Raman	39
3.4.1	Leyes de selección del Raman	40
3.5	Espectros Raman	41
3.5.1	Introducción	41
3.5.2	Espectro Raman del tetracloruro de carbono	41
3.6	Aplicaciones en Biomédica	44
3.6.1	Espectroscopía de glóbulos rojos	44
4	Pinzas ópticas	46
4.1	Introducción	46
4.2	Fuerzas de atrapamiento	47
4.2.1	Régimen de Rayleigh	48
5	Arreglo Experimental	53
5.1	Espectrómetro de Czerny-Turner	53
5.2	Componentes	55
5.2.1	Fuente de excitación	55

5.2.2	Sistema de detección	56
5.2.3	Fibra óptica	57
5.2.4	Ecuación de la rejilla de difracción	60
5.3	Consideraciones de la calibración	65
5.4	Evaluación del láser de $\lambda 1064$ nm	
Utilizando una cavidad Fabry-Pérot		67
5.4.1	Cavidad Fabry-Perot	67
5.5	Preparación de muestras	73
5.6	Detección sensible a la fase	75
5.7	Aberraciones ópticas	77
5.7.1	Introducción	77
5.7.2	Aberración esférica	77
5.7.3	Aberración comática	79
5.7.4	Astigmatismo	80
5.8	Caracterización del Spot	81
6	Resultados	87
6.1	Caracterización del Láser	87
6.2	Análisis de aberraciones	90
6.3	Obtención de espectros Raman	94
6.3.1	Conversión a número de onda	94
6.4	Resultados teóricos de la resolución	95
6.5	Resultados de la calibración	96
6.5.1	Calibración con tetracloruro de carbono	96
6.5.2	Calibración con Calcita	98
6.5.3	Calibración con niobato de litio	101
6.5.4	Calibración con alcohol isopropílico	102
6.6	Raman en glóbulos	105
7	Conclusiones	107
7.1	Perspectivas	110
8	Apéndices	111
8.1	Apéndice A: Cálculo de resolución teórica	111
8.2	Apéndice B: Detalles técnicos: Elementos Ópticos	113
8.2.1	Espejos	113
8.2.2	Rejilla de difracción	115
8.2.3	Montura de rotación	116

8.2.4	Tubo fotomultiplicador	117
8.3	Apéndice C: Código para obtención de espectros	120
8.4	Apéndice D: Tamaño de Spot del láser	122
9	Bibliografía	134

Índice de figuras

1.1	Cociente de estiramiento o deformación (D/d) en función de la potencia, el grupo de control se muestra en rojo y el grupo diabéticos en gris. [7]	20
1.2	Intervalos de confianza (IC), los valores para el grupo de control se muestran en gris, mientras que los valores para diabéticos se encuentran en rojo. [7]	21
2.1	Diagrama de molécula diatómica donde r_1 y r_2 son las distancias desde el centro de masa hasta el centro de las masas m_1 y m_2 respectivamente, con el sistema en reposo. El coeficiente de restitución del resorte es k .	23
2.2	Esquema de ejes de movimiento de una molécula poliatómica.	26
2.3	Izquierda: molécula lineal : hidruro de berilio (BeH_2). Derecha: molécula no lineal : trifluoruro de boro (BF_3)	27
3.1	Diagrama de dispersión Raman: La luz incidente (flecha azul) interactúa con una molécula (átomo central rojo y átomos pequeños naranjas), generando luz de frecuencia igual a la incidente (azul), además de frecuencias Raman-Stokes (verde) y Raman anti-Stokes (rojo) debido a las vibraciones moleculares.	32
3.2	Energías de la dispersión Raman.	33
3.3	Esquema del cambio de la relación entre la intensidad y la frecuencia en la dispersión Raman.	34
3.4	Ángulos de enlace: molécula de tetracloruro de carbono	42
3.5	Modos de vibración para una molécula de CCl_4	42
3.6	Espectro Raman experimental de tetracloruro de carbono tomado de [20] que muestra las intensidades (en unidades arbitrarias) de las cuatro vibraciones moleculares de la molécula de CCl_4 .	43

3.7	(a) En rojo tenemos el espectro Raman promedio de glóbulos rojos (RBCs) de diabéticos y el espectro de los no diabéticos en azul; Curva verde: el espectro de diferencia (diabético menos normal). Curvas negras: los componentes principales primero y segundo (PC1 y PC2), respectivamente, que son más significativos para la detección de la diabetes (escalados por un factor de 0.1). [24]	45
4.1	Esfera atrapada (gris) de radio R , en un potencial (rojo). El flujo a su alrededor se mueve con una velocidad ν , la distancia a la pared más cercana se representa con h	48
4.2	Esquema del proceso de reflexión y refracción de un rayo sobre la superficie de una esfera dieléctrica. Donde n_0 es el coeficiente de refracción del medio y n_i el coeficiente de refracción de la esfera.	50
4.3	Q_{grad} , Q_{scat} y Q_{tot} para un solo rayo respecto al ángulo de incidencia θ , con $n_0 = 1.33$ y $n_1=1.44$. Gráfica extraída de: [36]	52
5.1	Arreglo experimental : Espectrómetro de Czerny-Turner simétrico	54
5.2	Esquema del funcionamiento de un tubo fotomultiplicador. [42]	56
5.3	Esquema de las ranuras triangulares de una rejilla reglada	58
5.4	Esquema de las ranuras sinusoidales de una rejilla holográfica	58
5.5	Mecanismo de barra senoidal para un monocromador.	59
5.6	Diagrama que muestra los ángulos: incidente (θ_i) y reflejado (θ_r) y la distancia entre centro de los surcos (d)	60
5.7	Diagrama del funcionamiento de un espejo parabólico fuera de eje. A y C son los espesores del espejo, B es la distancia sobre el mismo eje desde el inicio del espejo hasta el punto focal y E es la longitud en paralelo del centro del espejo al foco.	64
5.8	Transmisiones y reflexiones múltiples dentro de una cavidad Fabry-Pérot	68
5.9	Función de Airy F_1 para una reflectividad de $R = 0.3$ (azul) y F_2 para $R = 0.9$ (rojo), el ancho a la mitad del máximo de cada pico se muestra como FWHM, la distancia entre dos máximos es FRS.	69

5.10 Materiales utilizados: 1: Tetraclouro de carbono en estado líquido con un a pureza del 90 %, 2: filtro Syringe, 3: guantes de látex, 4: pipeta micrométrica, 5: caja de cubre objetos, 6: porta-objetos con estampa de vinil, 7: celda de cuarzo, 8: esmalte transparente	74
5.11 Prisma de calcita	74
5.12 Comparación entre un espejo parabólico que presenta aberración esférica y un espejo parabólico.	78
5.13 Esquema de aberración comática [54]	79
5.14 Esquema: Astigmatismo, los rayos sagitales se presentan en azul, mientras que los tangenciales se presentan en guinda. . .	80
6.1 Resultado obtenido para el arreglo Int1	88
6.2 Resultado obtenido para el arreglo Int2	89
6.3 Spots obtenidos para $m = 1$, de izquierda a derecha tenemos $\lambda = 532nm$, $\lambda = 660nm$ y $\lambda = 1064nm$. Se muestran los perfiles de las intensidades en el eje horizontal y vertical . . .	92
6.4 Espectro Raman obtenido con una longitud de onda de 532 nm, potencia de 50 mW con velocidad de giro de la rejilla $v = 0,025^\circ/s$	97
6.5 Espectro Raman obtenido con una longitud de onda de 660nm 35 mW de potencia y velocidad de giro de la rejilla $v = 0,025^\circ/s$	98
6.6 Espectro Raman de una muestra de cuarzo de calcita obtenido con una longitud de onda de 532nm, potencia de 50 mW velocidad de giro de la rejilla $v = 0,01^\circ/s$	99
6.7 Acercamiento: Pico a 712 cm^{-1} espectro de calcita	100
6.8 Extraída de la referencia [60] esta tabla compara las frecuencias vibracionales del niobato de litio encontradas teórica y experimentalmente por Nogueira Bernardo, et al, con lo encontrado por P. Herme, et al en un trabajo previo.	101
6.9 Espectro Raman del Niobatio de Litio, obtenido con una longitud de onda de 532nm , con una intensidad de 150 mW, a una velocidad de giro de la rejilla de $0.025^\circ/s$	102
6.11 a) espectro suavizado con 500 puntos, b) espectro suavizado con 300 puntos, c) espectro suavizado con 100 puntos, d)espectro sin suavizar.	104
6.12 Raman en sangre completa, láser a 15 mW, $v = 0.025^\circ/s$. . .	105
6.13 Raman en glóbulos rojos, láser a 15 mW, $v = 0.025^\circ/s$	106

8.1	Espejo parabólico fuera de eje modelo MPD2151-P01	113
8.2	Gráfica de reflectancia de espejos parabólicos con recubrimien- tos metálicos	113
8.3	Espejo parabólico fuera de eje modelo:EFL 15° Bare Gold 100Å Off-Axis Parabolic Mirror	114
8.4	Curva de reflectancia de espejos parabólicos con recubrimiento de oro	114
8.5	Rejilla holográfica reflectante en el espectro visible Thorlabs modelo GH50-24V	115
8.6	Gráfica de la eficiencia absoluta de la rejilla holográfica 2400 líneas para el visible (longitudes de onda de entre 200 y 900 nm).	115
8.7	Gráfica de la eficiencia absoluta de la rejilla holográfica modelo GH50-27V de 1200 líneas (para longitudes de onda de entre 200 y 1600 nm).	116
8.8	Montura motorizada de alta precisión continua a 360 °/s (PRM1Z8)	116
8.9	Curva de eficiencia: tubo fotomultiplicador Hamamatsu R12896	117
8.10	Izquierda : Especificaciones. Derecha: Curva de eficiencia tubo fotomultiplicador Hamamatsu R5108	118
8.11	Especificaciones y curva de eficiencia.	119
8.12	Spot del láser para una longitud de onda de 532 nm, m= 0, espejos parabólicos.	122
8.13	Spot del láser para una longitud de onda de 532 nm, m= 1, espejos parabólicos.	123
8.14	Spot del láser para una longitud de onda de 660 nm, m= 0, espejos parabólicos.	124
8.15	Spot del láser para una longitud de onda de 660 nm, m= 1, espejos parabólicos.	125
8.16	Spot del láser para una longitud de onda de 1064 nm,m= 0, espejos parabólicos.	126
8.17	Spot del láser para una longitud de onda de 1064 nm, m= 1, espejos parabólicos.	127
8.18	Spot del láser para una longitud de onda de 532 nm, m= 0, espejo esférico.	128
8.19	Spot del láser para una longitud de onda de 532 nm, m= 1, espejo esférico.	129

8.20 Spot del láser para una longitud de onda de 660 nm, m= 0, espejo esférico.	130
8.21 Spot del láser para una longitud de onda de 660 nm, m= 1, espejo esférico.	131
8.22 Spot del láser para una longitud de onda de 1064 nm, m= 0, espejo esférico.	132
8.23 Spot del láser para una longitud de onda de 1064 nm, m= 1, espejo esférico.	133

Resumen

Este trabajo aborda los fundamentos teóricos de la espectroscopía Raman y el atrapamiento con pinzas ópticas. Se detalla minuciosamente el proceso experimental de construcción de un espectrómetro tipo Czerny-Turner, describiendo cada uno de sus componentes y las decisiones técnicas que guiaron su ensamblaje. Posteriormente, se presentan y analizan los resultados obtenidos durante la calibración del sistema. Por último, se exponen las conclusiones derivadas de este trabajo, junto con las posibles aplicaciones y perspectivas futuras que podrían derivarse de esta investigación, subrayando su impacto potencial en el campo de la caracterización de glóbulos rojos. Su contenido por capítulos es el que se detalla a continuación.

- Capítulo 1** : En la introducción se expone la motivación principal para llevar a cabo estudios en glóbulos rojos de personas con diabetes, se detallan los objetivos del trabajo y se hace una breve revisión estudios previos relevantes sobre este tema.
- Capítulo 2** : Es el primero de los capítulos dedicados a los fundamentos teóricos, en el se describen las soluciones clásicas para el movimiento de moléculas monoatómicas y poliatómicas.
- Capítulo 3** : En este capítulo se ofrece una descripción general de la teoría de la espectroscopía Raman. Se explica a detalle la naturaleza del espectro Raman para la molécula de tetracloruro de carbono.
- Capítulo 4** : En el cuarto capítulo se muestran los principios físicos básicos de las pinzas ópticas. Se demuestra el gran potencial que tiene esta técnica experimental para un adecuado manejo de células o tejidos *in vitro*.

- Capítulo 5** : Se dan detalles la configuración experimental del espectrómetro desarrollado, junto con la descripción de cada componente óptico.
- Capítulo 6** : Se presentan los resultados de la calibración del espectrómetro, se compara con lo obtenido con la técnica de detección sensitiva a la fase.
- Capítulo 7** : Se exponen las conclusiones derivadas del desarrollo del trabajo.
- Capítulo 8** : Contiene información complementaria del trabajo.

Capítulo 1

Introducción

A pesar de que el fenómeno físico de la dispersión Raman fue observado por primera vez en 1928 no fue hasta 1953 que el primer espectrómetro Raman comercial fue desarrollado, contaba con un monocromador que usaba una lámpara de mercurio como fuente de excitación, posteriormente, la invención del láser en 1960 y su implementación en 1962 en el diseño del espectrómetro representó otro gran avance para este tipo de espectroscopía, permitiendo su aplicación de manera más rápida y reproducible [1].

En nuestros días los espectrómetros son ampliamente utilizados en laboratorios de todo el mundo, pues la espectroscopia Raman es una técnica precisa, sensible, no destructiva y no invasiva que proporciona información molecular basada en la composición química de una muestra analizada, permite una implementación rápida y sin etiquetas para estudios in vitro, es ideal para el análisis de muestras acuosas, por lo que es perfecta para el tratamiento de de materiales biológicos, como tejidos, células y sangre. [2]

En el presente trabajo planteamos el diseño y la calibración de un espectrómetro que sea de menor coste que uno comercial pero con una resolución comparable, compacto y que pueda ser fácilmente ensamblado y acoplado a un sistema de pinzas ópticas. A continuación se presentan con más detalle los objetivos de esta tesis.

Objetivos

Objetivo General

El objetivo de esta tesis es diseñar y calibrar un espectrómetro tipo Czerny-Turner para el estudio detallado de glóbulos rojos atrapados mediante la técnica de pinzas ópticas. Esto implica desarrollar un sistema óptico preciso, confiable, versátil y de alta resolución, que cuente con un amplio rango espectral. Validaremos todo esto mediante el proceso de obtención de espectros reproducibles, exactos y consistentes.

Objetivos Específicos

Selección de elementos ópticos

- Identificar y seleccionar cuidadosamente los componentes ópticos óptimos para construir el espectrómetro más eficiente, dadas sus eficiencias y costos.

Obtención de espectros Raman confiables

- Adquirir sistemáticamente espectros Raman de diversos compuestos utilizando diferentes longitudes de onda, asegurando la confiabilidad de los datos.

Mejorar la relación señal-ruido

- Aplicar la técnica de detección sensible a la fase para optimizar la relación señal-ruido en la adquisición de espectros Raman.

Lograr alta resolución espectral:

- Obtener espectros Raman con una resolución cercana a 1 cm^{-1}

Antecedentes

La espectroscopía Raman comenzó a utilizarse en investigaciones relacionadas con la sangre a principios de la década de 1970, cuando se realizaron los primeros estudios sobre la estructura de la hemoglobina. A medida que los instrumentos y las técnicas de espectroscopía Raman fueron mejorando y evolucionando, las aplicaciones en este campo se expandieron considerablemente, permitiendo un análisis más detallado de componentes sanguíneos y procesos biológicos, lo que abrió nuevas posibilidades en el diagnóstico y la investigación biomédica.

Inicialmente, su uso se enfocó en el estudio de la estructura de la hemoglobina, pero con el tiempo, las aplicaciones y técnicas expandieron y se perfeccionaron tanto los instrumentos como las técnicas de esta metodología. Actualmente el análisis de los cambios en la química sanguínea mediante espectroscopía Raman ha demostrado ser una herramienta valiosa para evaluar el estado de salud de un individuo. [3]

Estudios previos sugieren que la espectroscopia Raman tiene el potencial de ser una herramienta diagnóstica no invasiva, de alta sensibilidad y especificidad para la detección de diabetes tipo 2. El procedimiento no requiere una laboriosa preparación de muestras y proporciona información objetiva y resultados rápidos [4], [5].

A comienzos del año 2020, en el laboratorio de fotónica y procesos ultrarápidos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa se llevaron a cabo pruebas de espectroscopía Raman en sangre de individuos que padecen diabetes tipo 2, las muestras se procesaron en un espectrómetro

comercial y se compararon con muestras de personas sanas. Los espectros arrojaron notables diferencias en la intensidad y posición de los picos a 747, 996, 1125, 1342 y 1588 cm^{-1} , lo que permite proponerlos como marcadores para distinguir entre muestras de sujetos con y sin la enfermedad. [6] Un punto importante sobre este estudio previo es que el espectrómetro que diseñemos, deberá contar con una resolución mínima de 1 cm^{-1} no sólo para ser comparable con un espectrómetro comercial, sino para poder medir con claridad el cambio en la posición de los picos antes mencionados, especialmente el que se encuentra a 747 cm^{-1} .

Los glóbulos rojos tienen una capacidad única de deformarse, lo que les permite cambiar de forma de manera reversible cuando se ven sometidos a una fuerza externa. Esta flexibilidad es indispensable para poder fluir a través de microvasos sanguíneos mientras transportan oxígeno y dióxido de carbono por todo el cuerpo. Hay diferentes técnicas que permiten medir esta flexibilidad, entre las que se encuentran: aspiración con micropipeta, por filtración, filtración microfluídica, imaginología de fase cuantitativa y uso de pinzas ópticas por mencionar algunas. Existen varios factores que se sabe influyen en la deformabilidad de los glóbulos rojos, como la geometría celular, la viscosidad interna, las propiedades reológicas de la membrana, la presión osmótica, la concentración de: iones de calcio, y óxido nítrico; y la temperatura entre otros. Diversos estudios sugieren que, además de los factores ya mencionados, la diabetes mellitus tipo 2 afecta la elasticidad de los glóbulos rojos, reduciendo significativamente su capacidad de deformación.

Como se mencionó, una de las técnicas, tal vez la más novedosa, para estudios de deformación de glóbulos son las pinzas ópticas, una de las maneras en que se realiza la medición es aplicar la fuerza óptica a microesferas adheridas a los glóbulos, otra forma es utilizar dos haces paralelos, que atrapan a la célula de forma individual entre dos haces separados una distancia fija, para posteriormente separarlos, creando una elongación del glóbulo rojo. Esta última técnica fue utilizada en el laboratorio de fotónica y procesos ultrarrápidos de la UAM-I para llevar a cabo un estudio mecánico en glóbulos rojos con el propósito de determinar posibles diferencias en la elasticidad entre aquellos provenientes de personas con diabetes y un grupo de control conformado por personas sanas, cada uno de ocho personas, por cada donador se seleccionaron aproximadamente 200 células. Se obtuvieron dos medidas: un tamaño inicial (d) y uno en respuesta al estiramiento (D). La capacidad

de deformación de los glóbulos se evalúa mediante el cociente entre los tamaños final e inicial, lo que se definió como: *cociente de deformación* $= \frac{D}{d}$. Este parámetro varía en función de la potencia del láser de la trampa. [3] [4] [5] [6].

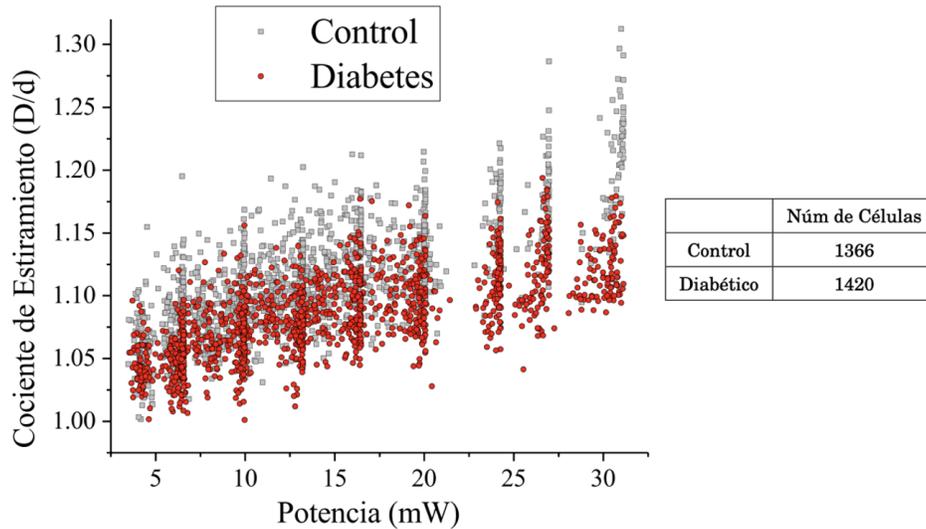


Figura 1.1: Cociente de estiramiento o deformación (D/d) en función de la potencia, el grupo de control se muestra en rojo y el grupo diabéticos en gris. [7]

Los resultados arrojan que el *cociente de deformación* $\frac{D}{d}$ es menor en personas que presentan diabetes no controlada, lo que es indicativo de pérdida de flexibilidad de los glóbulos rojos.

El intervalo de confianza predicho de las pruebas sugiere que a mayores potencias (por arriba de 30 mW) habría una mayor diferencia más clara entre el grupo de personas con diabetes tipo 2 y el grupo de control. Resultados de estudios muestran que en ese rango de potencias es más probable dañar los glóbulos, este daño se incrementaría entre menor es la longitud de onda. El siguiente paso es estudiar este daño, para determinar si los glóbulos rojos de personas con diabetes tipo 2 sufren mayor daño, que los glóbulos rojos de control. Esto podría significar otro método de caracterización.

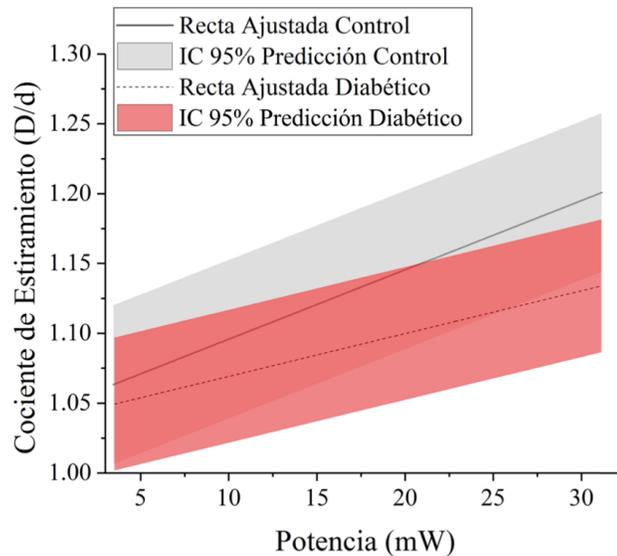


Figura 1.2: Intervalos de confianza (IC), los valores para el grupo de control se muestran en gris, mientras que los valores para diabéticos se encuentran en rojo. [7]

El integrar el sistema de pinzas ópticas existente con nuestro espectrómetro, abrirá la puerta al uso de una novedosa técnica: *Laser Tweezers Raman Spectroscopy* que combina el poder de la espectroscopía Raman con la precisión de las pinzas ópticas para el análisis y caracterización de micro partículas biológicas individuales.

Fundamentos Teóricos

Capítulo 2

Vibraciones Moleculares

2.1. Vibración de una molécula diatómica

La mejor manera de comenzar a estudiar vibraciones moleculares es empezar por entender el ejemplo más simple derivado de la mecánica clásica: un sistema de dos masas unidas por un resorte. [\[8\]](#) El sistema consiste en par de masas m_1 y m_2 unidas por un resorte de constante k , solamente hay desplazamiento en el eje x , como se muestra en Fig. [2.1](#). Nombraremos a los desplazamientos de las masas a partir de sus puntos de equilibrio: x_1 y x_2 .

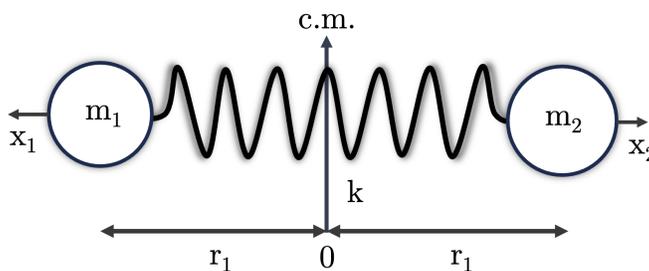


Figura 2.1: Diagrama de molécula diatómica donde r_1 y r_2 son las distancias desde el centro de masa hasta el centro de las masas m_1 y m_2 respectivamente, con el sistema en reposo. El coeficiente de restitución del resorte es k .

r_1 y r_2 son las distancias desde el centro de la molécula hasta el centro de masa (*c.m.*) que se encuentra fijo en el origen. Tenemos entonces que :

$$x_1 m_1 + x_2 m_2 = 0 \quad (2.1)$$

$$m_1(r_1 + x_1) + m_2(r_2 + x_2) = 0 \quad (2.2)$$

de [2.1](#) y [2.2](#) obtenemos dos relaciones que involucran únicamente a las variables (x_1, m_2, x_2, m_2)

$$x_1 = \left(\frac{m_2}{m_1}\right)x_2, \quad x_2 = \left(\frac{m_1}{m_2}\right)x_1 \quad (2.3)$$

De la ley de Hooke para las dos masas unidas por un resorte de constante de elasticidad k tenemos:

$$F = -k(x_1 + x_2) \quad (2.4)$$

Si hacemos uso de [2.3](#) obtenemos una expresión para la fuerza de todo el sistema:

$$F = -k\left(\frac{m_1 + m_2}{m_1}\right)x_2 = -k\left(\frac{m_1 + m_2}{m_2}\right)x_1 \quad (2.5)$$

Para obtener las ecuaciones de movimiento de cada una de las masas, recordamos que por segunda ley de Newton, la fuerza que obtuvimos, es igual a la masa por su aceleración.

$$m_1 \frac{d^2 x_1}{dt^2} + k \left(\frac{m_1 + m_1}{m_2}\right) x_1 = 0 \quad (2.6a)$$

$$m_2 \frac{d^2 x_2}{dt^2} + k \left(\frac{m_1 + m_1}{m_1}\right) x_2 = 0 \quad (2.6b)$$

Las ecuaciones, acopladas entre sí, describen el movimiento de cada masa individual.

Al igual que en el caso del oscilador armónico simple, las soluciones a las ecuaciones de movimiento del sistema son periódicas y senoidales o cosenoidales. Si bien cada masa se desplaza hasta una amplitud máxima diferente comparten la misma frecuencia de movimiento.

Para encontrar una sola función para todo el sistema primero sumamos las ecuaciones en [2.6](#)

$$\frac{m_1 + m_2}{m_1 m_2} \left(\frac{d^2 x_1}{dt^2} + \frac{d^2 x_2}{dt^2} \right) + k(x_1 + x_2) = 0 \quad (2.7)$$

Posteriormente, introducimos la definición de *masa reducida* μ o *masa efectiva*

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.8)$$

y renombramos una variable de posición q que será la distancia entre masas : $q = x_1 + x_2$. Lo anterior nos ayuda a simplificar [2.7](#) y obtener:

$$\mu \frac{d^2 q}{dt^2} - kq = 0 \quad (2.9)$$

Tenemos una ecuación diferencial estilo oscilador armónico, cuya solución es ampliamente conocida, para la condición inicial $q(0) = 0$, [2.9](#) tiene la siguiente forma:

$$q = q_0 \sin(2\pi\nu_0 t) \quad (2.10)$$

Donde q_0 es el desplazamiento máximo y ν_0 es la frecuencia de vibración del sistema:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.11)$$

Para analizar la energía del sistema de molécula diatómica retomamos la relación entre la fuerza y la energía potencial en mecánica clásica $U(q)$. [9](#)

$$U(q) = - \int F dq = \frac{1}{2} kq^2 \quad (2.12)$$

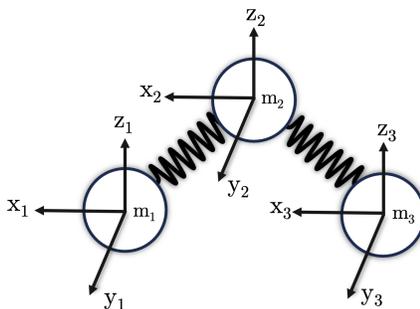


Figura 2.2: Esquema de ejes de movimiento de una molécula poliatómica

Una vez que sustituimos [2.10](#) encontramos que la energía potencial (U) depende del cuadrado de la frecuencia vibracional como:

$$U = 2\nu_0^2 \pi^2 \mu q_0^2 \sin^2(2\pi\nu_0 t) \quad (2.13)$$

La expresión para la energía cinética (T) también es función del cuadrado de la frecuencia y el desplazamiento máximo.

$$T = 2\nu_0^2 \pi^2 \mu q_0^2 \cos^2(2\pi\nu_0 t) \quad (2.14)$$

La energía total es una constante $E = V + T = 2\nu_0^2 \pi^2 \mu q_0^2$.

2.2. Vibraciones de una molécula poliatómica

El análisis de las vibraciones de una molécula diatómica puede generalizarse para obtener resultados para una molécula poliatómica (que cuenta con más de dos átomos). Sin embargo, este análisis se complica, ya que la interacción no se limita únicamente al eje de conexión entre átomos, cada uno de estos puede moverse en tres direcciones (x, y, z), por lo tanto, cada molécula de N átomos tiene $3N$ grados de libertad.

Las moléculas se clasifican en dos grandes grupos dependiendo de su geometría (como se muestra en Fig. 2.3). Si los átomos se disponen en una red en línea recta, con un ángulo de enlace de 180° se tiene una molécula lineal. El resto de las moléculas, con ángulos de enlace ($\theta \neq 180^\circ$) se conocen como moléculas no lineales.

Una molécula en su conjunto puede trasladarse o rotar libremente en el espacio, lo que implica 6 grados de libertad que no deben considerarse al analizar las vibraciones internas de la molécula. En el caso de moléculas no lineales, esto deja $3N - 6$ grados de libertad, donde N es el número de átomos en la molécula. Por otro lado, para las moléculas lineales, la rotación al rededor del eje intermolecular no se cuenta, por lo que el número de grados de libertad para las vibraciones es $3N - 5$ [9]

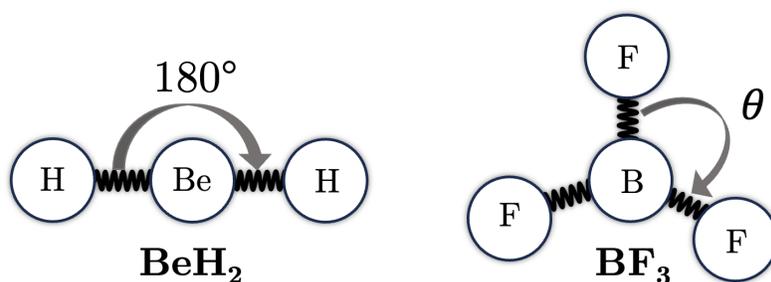


Figura 2.3: Izquierda: molécula lineal : hidruro de berilio (BeH_2). Derecha: molécula no lineal : trifluoruro de boro (BF_3)

La energía cinética para un sistema de muchas partículas es

$$T = \frac{1}{2} \sum_{n=i}^N m_i \left[\left(\frac{dx_i}{dt} \right)^2 + \left(\frac{dy_i}{dt} \right)^2 + \left(\frac{dz_i}{dt} \right)^2 \right] \quad (2.15)$$

Al igual que en caso de una molécula diatómica, elegimos usar nuevas coordenadas de desplazamiento de las masas, de nuevo nombraremos a este coordenada q , en este caso $q_1 = m^{1/2}(x_i - x_0)$, $q_2 = m^{1/2}(y_i - y_0)$, el subíndice 0 denota las posiciones en equilibrio. Con lo que podemos simplificar [2.15] a

$$T = \frac{1}{2} \sum_{n=i}^{3N} \left(\frac{dq_i}{dt} \right)^2 \quad (2.16)$$

Para la energía potencial $U(q_1, q_2 \dots q_{3N})$, consideramos, al igual que en [2.12](#), el caso clásico de un potencial, para oscilaciones pequeñas, haciendo un desarrollo en serie de Taylor tenemos:

$$U(q_1 \dots q_{3N}) = U_0 + \sum_{i=1}^{3N} \left(\frac{\partial U}{\partial q_i} \right)_0 q_i + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 U}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j \dots \quad (2.17)$$

Por elección definimos que en el equilibrio $U_0 = 0$. En el punto de equilibrio, la fuerza neta del sistema es cero. Dado que esta fuerza se define como el negativo de la derivada de la energía potencial con respecto a la coordenada de posición, esto implica que dicha derivada, es decir, el segundo término de la ecuación anterior [2.17](#), es cero: es $\left(\frac{\partial U}{\partial q_i} \right)_0 \approx 0$.

Dicho lo anterior, tomamos solamente el tercer término de la expansión, al considerar que términos superiores no contribuyen significativamente al potencial.

Por lo tanto

$$U(q_1 \dots q_{3N}) \simeq \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 U}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j \quad (2.18)$$

La ecuación de movimiento para este sistema es :

$$\frac{d^2 q_j}{dt^2} + \sum_{k=1}^{3N} U_{j,k} \cdot q_k = 0 \quad (2.19)$$

Para simplificar el manejo de la ecuación anterior, se define una nueva variable Q_i que no es más que una combinación lineal de los desplazamientos q_i , definida como

$$Q_k \equiv \sum_{k=i}^{3N} c_{ik} q_k \quad (2.20)$$

Es posible demostrar [10](#) que podemos reescribir [2.19](#) como

$$\frac{\partial Q_k}{dt^2} + \lambda_k Q_k = 0 \quad (2.21)$$

El cambio de variable ($q_i \rightarrow Q_i$) nos permite obtener de manera más directa la solución a [2.21](#):

$$Q_k = A_k \sin(\lambda_k^{1/2} t + \phi_k) \quad (2.22)$$

Con

$$\lambda_k^{1/2} \propto \nu_k \propto \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.23)$$

Donde finalmente podemos extraer un resultado de mucho interés: $w_k = \sqrt{\lambda_k}$ la frecuencia de resonancia, que es aquella frecuencia dónde se obtiene la respuesta máxima de la vibración.

Capítulo 3

Espectroscopía Raman

3.1. Introducción

La espectroscopía es una técnica de análisis que estudia el espectro electromagnético resultante de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. A través esta es posible examinar la composición, estructura y propiedades de las sustancias. [\[11\]](#)

Es una técnica de estudio excepcional ampliamente usada en física, química, astronomía, biología y metalurgia, entre otras ciencias. Las ventajas de la espectroscopía Raman sobre otros métodos de análisis residen en su practicidad, puesto que es una técnica donde se manejan pocas variables, la manipulación espectral es mínima, el manejo y preparación de muestras que se requiere son ínfimos y la interpretación de resultados suele ser sencilla.

[\[11\]](#) [\[12\]](#)

3.2. Teoría clásica del efecto Raman

Existen dos fenómenos físicos que surgen de la interacción de la luz con la materia: la absorción y la dispersión.

3.2.1. Absorción

Cuando los fotones incidentes poseen una energía que coincide exactamente con la brecha energética entre el estado fundamental de una molécula y uno de sus estados excitados, ocurre un fenómeno conocido como *absorción resonante*. En este proceso, el fotón transfiere toda su energía a la molécula, lo que provoca la excitación de un electrón desde su estado de menor energía a un estado de mayor energía o estado excitado. Este tipo de absorción es altamente selectiva, ya que solo fotones con una energía específica, correspondiente a la diferencia de energía entre los dos estados cuánticos, pueden inducir este tipo de transición. La molécula, ahora en un estado excitado, puede posteriormente relajarse de diversas maneras, como emitiendo un fotón a través de fluorescencia, o transfiriendo energía a otras moléculas en su entorno. Este proceso es fundamental en fenómenos como la espectroscopía y es crucial para entender las propiedades ópticas y electrónicas de las moléculas. [13]

3.2.2. Dispersión

Por otro lado, el proceso de dispersión puede ocurrir ya sea que exista o no un par adecuado de niveles de energía para absorber la radiación, y la interacción entre la luz y la molécula que causa esto requiere un enfoque diferente. [13]

Cuando la luz se dispersa, la mayor parte lo hace de forma elástica, es decir, sin cambio en la frecuencia de la onda incidente, este fenómeno se conoce como dispersión de Rayleigh [9]. Una pequeña fracción de la intensidad (1 fotón de cada $10^5 - 10^7$) se dispersará inelásticamente, dando como

resultado un cambio en la frecuencia de la luz dispersada. Al cambio en la longitud de onda del fotón dispersado se le denomina *Desplazamiento Raman*. El fenómeno de dispersión Raman reportado por primera vez por el físico Chandrasekhara Venkata Raman en 1928 de donde obtiene su nombre. [14]

En este caso la interacción del fotón incidente con una molécula da como resultado un intercambio de energía, como se muestra en el esquema 3.1. La energía del fotón dispersado puede ser mayor o menor que la energía del fotón incidente. La energía del fotón está ligado con el cambio en las energías rotacionales o vibracionales de la molécula con la que ha interactuado. Debido a que estas energías son específicas para cada enlace químico, se obtiene un sello distintivo de esa molécula. [15] [16] [17]

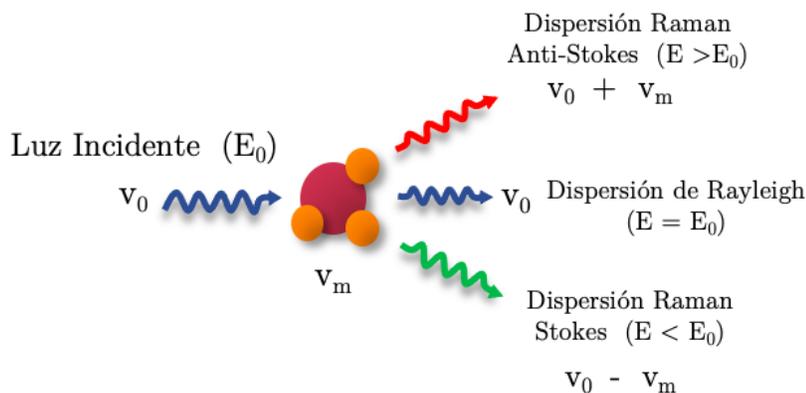


Figura 3.1: Diagrama de dispersión Raman: La luz incidente (flecha azul) interactúa con una molécula (átomo central rojo y átomos pequeños naranjas), generando luz de frecuencia igual a la incidente (azul), además de frecuencias Raman-Stokes (verde) y Raman anti-Stokes (rojo) debido a las vibraciones moleculares.

Por conservación de la energía, la diferencia de las frecuencias entre la luz incidente y la dispersada da la energía de la transición molecular:

$$|\Delta E| = hc|\Delta\nu| \quad (3.1)$$

Donde: $|\Delta\nu| = |\nu_0 - \nu_m|$.

En la dispersión Raman, si la luz dispersada tiene una frecuencia menor que la de la onda incidente, esto indica que el fotón ha perdido energía al excitar un modo vibracional o rotacional en la molécula. Este fenómeno se denomina transición Stokes. Por el contrario, si el estado rotacional o vibracional final tiene una energía más baja que el estado inicial, el fotón dispersado gana energía, resultando en una luz con una frecuencia mayor que la de la luz incidente. Este fenómeno se conoce como transición anti-Stokes. En las transiciones Stokes, el fotón dispersado tiene menos energía que el fotón incidente, mientras que en las transiciones anti-Stokes, el fotón dispersado tiene más energía debido a la disminución de la energía interna de la molécula, como se muestra esquemáticamente en Fig. 3.2 [12]

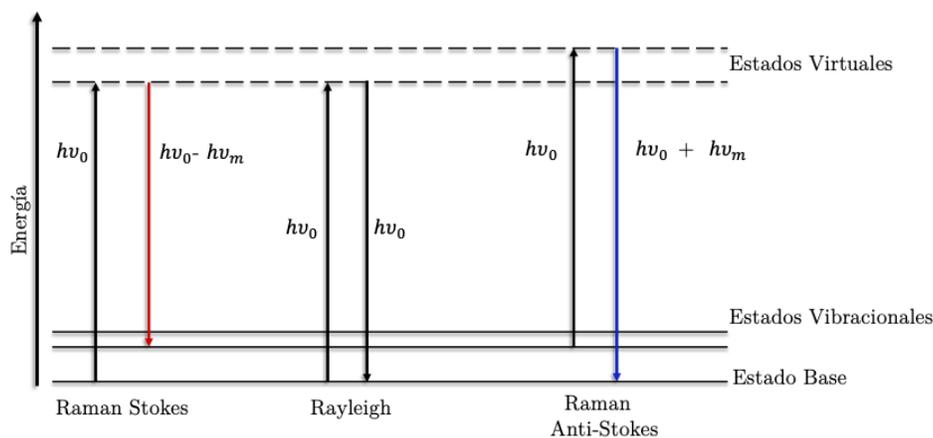


Figura 3.2: Energías de la dispersión Raman.

La dispersión de Rayleigh es el proceso más probable, con una intensidad que es aproximadamente 10^{-3} menor que la intensidad de la radiación incidente. El efecto Raman por su parte, suele tener intensidades hasta 10^{-6} veces menores a la intensidad original.

La interacción entre la molécula y fotón incidente dura un período de tiempo muy corto, del orden de los femtosegundos. [12]

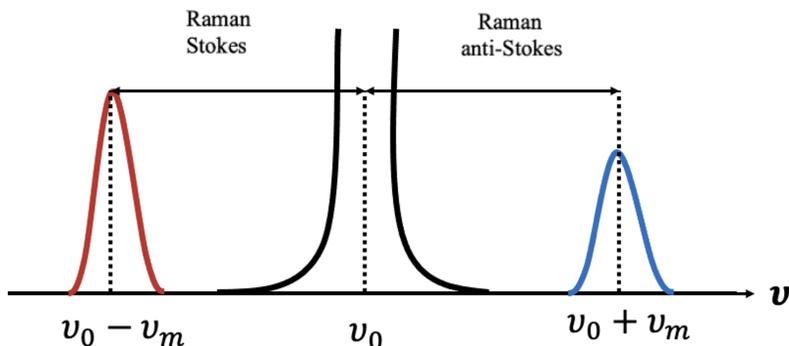


Figura 3.3: Esquema del cambio de la relación entre la intensidad y la frecuencia en la dispersión Raman.

Las posiciones de los picos Stokes y anti-Stokes en el espectro son simétricas entre sí, con respecto al pico de la dispersión Rayleigh como se muestra en 3.3. Las diferencias de energía entre ellos son pequeñas en comparación con la energía de la radiación incidente y son resultado de la distribución energética de la molécula, la cuál discutiremos a continuación.

La mayoría de las moléculas, a temperatura ambiente y en reposo, es decir, sin haber sido excitadas previamente por una fuente externa de energía, se encuentran en su estado fundamental de energía vibracional antes de interactuar con la luz, este estado es típicamente el más poblado debido a que, según la distribución de Boltzmann, a temperatura ambiente, las moléculas tienen una mayor probabilidad de encontrarse en su estado de menor energía. Como resultado la mayor parte de la dispersión Raman observada corresponde a la dispersión Raman Stokes, sin embargo, si la temperatura aumenta, una fracción mayor de moléculas adquiere suficiente energía térmica para ocupar estados vibracionales excitados. Esto incrementaría la probabilidad de que ocurra dispersión anti-Stokes, donde las moléculas en estados excitados transfieren energía al fotón incidente, resultando en una luz dispersada con mayor energía que la luz incidente. Por lo tanto, la intensidad de la señal Raman anti-Stokes se incrementa con la temperatura, reflejando el aumento de la población de moléculas en los estados vibracionales excitados. [13]

Similar a lo obtenido en [2.10](#), si la molécula vibra con una frecuencia ν_m el desplazamiento nuclear q se escribe como:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_m t), \quad (3.2)$$

donde q_0 es la amplitud vibracional [\[9\]](#)

Las longitudes de onda de excitación utilizadas en esta técnica varían desde el ultravioleta, con $\lambda = 325$, nm, hasta el infrarrojo cercano, con $\lambda = 1064$, nm. Dentro de este rango de longitudes de onda, se logra un equilibrio entre la intensidad de la señal Raman, que disminuye a medida que aumenta la longitud de onda; la minimización de interferencias como la fluorescencia, que es más intensa en longitudes de onda más cortas; la preservación de la muestra, dado que a longitudes de onda pequeñas se tienen más energía aumentando el riesgo de degradación de la muestra, utilizar longitudes de onda más grandes reduce este riesgo, lo que es especialmente importante cuando se analiza material biológico y por último se toma en cuenta la disponibilidad de tecnologías de detección y fuentes láser adecuadas, ya que los láseres y detectores para estas longitudes de onda suelen ser más accesibles.

3.3. Polarizabilidad

Una molécula colocada en un campo eléctrico sufre un efecto de polarización, ya que los núcleos cargados positivamente serán atraídos hacia el polo negativo, mientras que los electrones serán atraídos hacia el polo positivo. Este efecto inducirá un momento dipolar por unidad de volumen:

$$p(t) = \alpha E(t) \quad (3.3)$$

Dónde α es la polarizabilidad y E es el campo eléctrico, de una onda electromagnética fluctuante en el tiempo (t): $E(t) = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ siempre y cuando la intensidad del campo eléctrico no sea muy elevada, la dependencia con el campo será lineal.

Explícitamente α es un tensor de la forma

$$\alpha = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (3.4)$$

Así que la ecuación [3.3](#) en realidad se escribe como

$$\begin{pmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} \quad (3.5)$$

Para vibraciones pequeñas, α es función lineal de $Q(t)$ [3.2](#), por lo que podemos aproximar:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 Q + \dots \quad (3.6)$$

Dónde $Q(t)$ es la vibración molecular, $Q(t) = Q \cos(\omega_m t)$ con $\omega_m = 2\pi\nu_m$ siendo ν_m la frecuencia de la vibración. El primer término en [3.6](#) corresponde a la polarizabilidad de la molécula cuando se encuentra en su posición de equilibrio, no contribuye en el efecto de dispersión Raman, pero es importante para la descripción de la dispersión total; el segundo término representa el cambio de la polarizabilidad en función del desplazamiento desde su posición de equilibrio a consecuencia de la vibración; términos superiores se desprecian debido a su poca contribución al momento dipolar inducido, agregarlos en el cálculo implicaría aumentar la dificultad matemática sin obtener una mejor significativa de los resultados.

Al introducir [3.6](#) en [3.3](#) encontramos la siguiente expresión.

$$p(t) = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.7)$$

Al sustituir [3.2](#) en [3.7](#)

$$p(t) = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_m t) \quad (3.8)$$

$$p(t) = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q_0 E_0 \left[\cos \left(2\pi(\nu_0 + \nu_m)t \right) + \cos \left(2\pi(\nu_0 - \nu_m)t \right) \right] \quad (3.9)$$

El primer término en [3.9](#) representa un dipolo oscilante que irradia luz de frecuencia ν_0 (dispersión de Rayleigh), el segundo término corresponde a la dispersión Raman de frecuencia $\nu_0 + \nu_m$ (anti-Stokes) y $\nu_0 - \nu_m$ (Stokes). [12](#)

Para que el efecto de dispersión Raman sea visible, las vibraciones moleculares deben causar un cambio de polarizabilidad, esta es una regla de selección que se enunciará posteriormente.

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right) > 0 \quad (3.10)$$

Para obtener la intensidad de la dispersión Raman hacemos uso de la definición del campo eléctrico producido por un dipolo oscilante:

$$E_{dip} = \frac{\ddot{p}(t)}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (3.11)$$

Al obtener la segunda derivada temporal de [3.9](#) e introducirla en [3.11](#) obtenemos el campo eléctrico radiado

$$E_R(t) = \frac{-1}{4\pi\epsilon_0 r} \left[\alpha_0 E_0 \omega_0^2 \cos(\omega_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q_0 E_0 \omega_0^2 (\cos((\omega_0 - \omega_m)t) + \cos((\omega_0 + \omega_m)t)) \right] \quad (3.12)$$

La intensidad Raman se define finalmente como el promedio del cuadrado del campo irradiado.

$$I_R = \frac{\langle E_R^2 \rangle}{2\mu_0 c} \quad (3.13)$$

La intensidad de la dispersión Raman I_R es proporcional a la intensidad de la radiación incidente I_0 , la frecuencia de excitación del láser ν_0 , la polarizabilidad de las moléculas α y la amplitud vibracional Q_0 :

$$I_R \propto I_0 \nu_0^4 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2 \quad (3.14)$$

Es de gran importancia tener en cuenta la relación de la intensidad Raman con la frecuencia de la fuente de excitación, sobre todo en este trabajo. Si excitamos con una longitud de onda de 1064 nm, estaremos viendo una intensidad que será por un factor de $1/\lambda^4$ menos intensa que lo que obtenemos al trabajar con 532 nm. Como veremos en el capítulo 5, los resultados están condicionados, en gran parte por la capacidad de detección de esa intensidad en nuestro espectrómetro.

3.4. Teoría cuántica del efecto Raman

En el marco de la mecánica cuántica, el efecto de dispersión Raman es considerado como una excitación hacia un estado virtual de una molécula, este estado es de menor energía que el de una transición electrónica y existe un cambio en la energía vibracional molecular. [18] La energía individual por vibración está dada por la misma expresión que se utiliza para conocer la energía en el caso de un oscilador armónico cuántico:

$$E_\nu = h\nu \left(n_\nu + \frac{1}{2} \right) \quad (3.15)$$

donde h es la constante de Planck, ν es la frecuencia vibracional, n_ν es el número cuántico vibracional asociado, que toma valores de números enteros $0, 1, 2, 3, \dots$, por lo tanto, la diferencia energía para una transición Raman es de $\pm h\nu$ como se mostró previamente en [3.1]

E_ν se caracteriza por un número cuántico, lo cual nos habla de estados energéticos permitidos. La energía dependiente de estos estados permitidos cada uno, con un valor muy específico, proporcional a h , la constante de Planck. [8]

En tratamiento cuántico las funciones de onda propias correspondientes son

$$\psi_\nu = \frac{(\beta/\pi)^{\frac{1}{4}}}{\sqrt{2^\nu \nu!}} e^{-\frac{\beta q^2}{2}} H_\nu(\sqrt{\beta}q) \quad (3.16)$$

donde H_ν es un polinomio de Hermite y $\beta = 4\pi^2\mu\nu/h$.

La frecuencia del sistema en el tratamiento cuántico es exactamente la misma que la frecuencia clásica, sin embargo, existen varias diferencias marcadas que se deben tomar en cuenta entre las dos soluciones, clásicamente no tenemos E cuando la distancia $q = 0$, cuánticamente, el estado de energía

más bajo $v = 0$ tiene la energía $\frac{1}{2}h\nu$. Otra notoria diferencia es que la energía puede cambiar continuamente en la mecánica clásica mientras que visto desde el caso cuántico, la energía puede cambiar solo en unidades de $h\nu$, esto sucede porque en el caso de un oscilador armónico cuántico, la separación entre los dos niveles vibratorios sucesivos es siempre el mismo $h\nu$. [9]

3.4.1. Leyes de selección del Raman

Para conocer si una vibración es activa en el espectro Raman se cuenta con una serie de leyes de selección.

- **Cambio en la polarizabilidad.** Como podemos observar de [3.14] si la polarizabilidad de la molécula cambia durante la vibración entonces obtendremos una señal Raman.
- **Principio de exclusión mutua.** Si la vibración es simétrica respecto al centro de simetría de la molécula entonces es activa en Raman, si por el contrario la vibración es asimétrica entonces se dice que es activa en Infrarrojo (IR). Las vibraciones totalmente simétricas son siempre activas en Raman.
- **Tipo de enlace.** En general, se dice que las vibraciones son fuertes en Raman si el enlace es covalente, y de nuevo comparando con IR, estas serán fuertes si el enlace es iónico.
- **Simetría.** Esta regla de selección está determinada por las siguientes integrales, que involucran a los coeficientes del tensor de polarizabilidad mostrado en la Ec. [3.5].

$$[\alpha_{xx}]_{\nu',\nu''} = \int \psi_{\nu'}^*(Q_a) \alpha_{xx} \psi_{\nu''}(Q_a) dQ_a \quad (3.17a)$$

$$[\alpha_{xy}]_{\nu',\nu''} = \int \psi_{\nu'}^*(Q_a) \alpha_{xy} \psi_{\nu''}(Q_a) dQ_a \quad (3.17b)$$

⋮

$$[\alpha_{ij}]_{\nu',\nu''} = \int \psi_{\nu'}^*(Q_a) \alpha_{ij} \psi_{\nu''}(Q_a) dQ_a \quad (3.17c)$$

Donde α_{ij} son los elementos del tensor de polarización [3.5](#), $\psi_{\nu'}$ y $\psi_{\nu''}$ representan las funciones de onda vibracionales, ν' y ν'' son los números cuánticos vibratorios antes y después de la transición, respectivamente y Q_a es la coordenada normal de la vibración normal.

Si alguna de estas integrales es diferente de cero, entonces se dice que tenemos una vibración activa en Raman. Si se llegara a dar el caso en que todas son cero, la vibración no es activa en Raman. [9](#)

3.5. Espectros Raman

3.5.1. Introducción

El espectro Raman es la representación gráfica de la intensidad óptica dispersada en función del número de onda (normalizado) que lo produce, se expresa en unidades de (cm^{-1}) y su valor es inversamente proporcional a la longitud de onda. Por lo general en los espectros se muestra solamente la dispersión Raman-Stokes, pues como discutimos en la sección anterior, esta señal es la más intensa. Puede venir o no acompañada de la intensidad de dispersión de la longitud de onda con que se llevó a cabo la medición (dispersión Rayleigh). Cada material tiene un conjunto de frecuencias vibracionales características, intrínsecas de su estructura y la naturaleza de sus enlaces químicos, por lo que se espera que cada material cuente con un espectro Raman único.

3.5.2. Espectro Raman del tetracloruro de carbono

El tetracloruro de carbono es una molécula penta-atómica de estructura tetraédrica, ampliamente usado para realizar calibraciones en espectroscopía Raman. Por lo general es usado en estado líquido, donde es incoloro y su

fórmula química es : CCl_4 . Además de obtener una señal Raman fuerte, esta molécula se usa de referencia porque su estructura y simetría facilitan la representación de todas las oscilaciones y simplifica el análisis de los resultados.

[16]

Respecto a sus características electrónicas, cuenta con 32 electrones de valencia, sus ángulos de enlace $ClCCl$ son todos: $109,5^\circ$ [19]

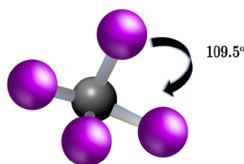


Figura 3.4: Ángulos de enlace: molécula de tetracloruro de carbono

El CCl_4 posee cuatro principales modos normales de vibración ν_1, ν_2, ν_3 y ν_4 , [20] todos estos modos permitidos en el espectro Raman. Los modos normales, correspondiente línea espectral y tipo de vibración se muestran en la tabla siguiente [3.5].

Tetracloruro de Carbono (CCl_4)		
ν_n	cm^{-1}	Tipo de vibración
ν_1	459	
ν_2	218	
ν_3	774	
ν_4	314	

Figura 3.5: Modos de vibración para una molécula de CCl_4

A continuación se presenta el espectro Raman del tetracloruro de carbono (Fig. 3.6), dada la naturaleza de sus enlaces y con el equipo adecuado es posible obtener tanto la medición para la dispersión Raman Stokes, como dispersión la Raman anti-Stokes. El cero se toma como el centro del pico correspondiente a la dispersión de Rayleigh. La intensidad está normalizada y se presenta en unidades arbitrarias (u.a.). Cuando no se tiene la contribución de la dispersión Raman-AntiStokes, es normal ver que el cero sigue cumpliendo la misma condición de referencia y los valores de las posiciones de los picos de la dispersión Raman-Stokes en el eje x pasan a ser positivas.

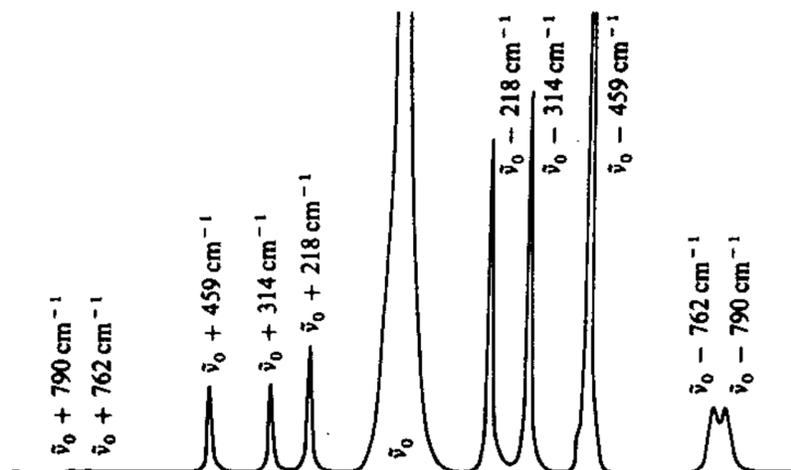


Figura 3.6: Espectro Raman experimental de tetracloruro de carbono tomado de [20] que muestra las intensidades (en unidades arbitrarias) de las cuatro vibraciones moleculares de la molécula de CCl_4 .

3.6. Aplicaciones en Biomédica

Como se adelantó en la sección de antecedentes de este trabajo, existen en la actualidad una serie de aplicaciones para la espectroscopía Raman enfocadas en la biología y biomédica. Aplicada a tejidos, la espectroscopía Raman puede detectar los principales componentes de la matriz extra celular y sus estructuras secundarias, además se utiliza para la caracterización no invasiva de tejidos sanos y patológicos. Los espectros Raman pueden reflejar la constitución molecular general, incluyendo señales específicas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y clorhidratos por mencionar algunos. [2].

3.6.1. Espectroscopía de glóbulos rojos

Recientemente la percepción que se tenía de los glóbulos rojos como transportadores de gases ha cambiado, ahora se conoce que mediante su estudio podemos reconocer la progresión de muchas patologías, lo que los convierte en un objeto de interés para realizar la detección de enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular. [21] [22]

Los glóbulos rojos constituyen hasta el 98 % de todas las células presentes en la sangre. Para estudiarlos, la mayoría de las investigaciones los aíslan del resto de componentes sanguíneos mediante la centrifugación de la sangre, para su conservación y almacenamiento se utiliza una solución conocida como Buffer. [2]. Hasta ahora los métodos clásicos son insuficientes para la caracterización precisa de las eritropatías. Las técnicas basadas en Raman ofrecen una visión de las alteraciones de los glóbulos rojos a nivel molecular. Los enfoques microscópicos y espectroscópicos mejorarán el potencial diagnóstico preciso de las alteraciones de los glóbulos rojos. [2] Un estudio realizado en el 2015, utilizó espectroscopía Raman, para obtener los espectros de los glóbulos rojos de cinco grupos, estos eran: ratas saludables, humanos saludables, ratas diabéticas inducidas por la administración de estreptozotocina, ratas diabéticas inducidas por aloxano y humanos con diabetes tipo 2. Los resultados revelaron diferencias significativas en los espectros Raman entre glóbulos rojos diabéticos y sanos, indicando un aumento en la permeabilidad de la membrana celular en glóbulos rojos diabéticos. Se demostró además,

que la precisión de la clasificación alcanza hasta un 100 %concluyendo que la espectroscopía Raman es una herramienta viable para el diagnóstico de la diabetes. [22]

Trabajos realizados en el año 2018 en Fujian China, donde se combinan la espectroscopía Raman con el atrapamiento con pinzas ópticas para estudio en glóbulos rojos afirman que las bandas Raman asignadas al glutati6n a 661 y 1404cm^{-1} , tript6fano en 545cm^{-1} , fenilalanina 605cm^{-1} , polisac6ridos 714cm^{-1} , fosfol6pidos 742cm^{-1} y prote6na amida III $1230 - 1282\text{cm}^{-1}$ muestran marcadas diferencias mientras que en la regi6n de 897 a 955cm^{-1} los picos de espectros correspondientes a individuos diab6ticos son claramente m6s intensos, lo que sugiere que estas caracter6sticas pueden jugar un papel en la detecci6n de la diabetes tipo II. [23] [24]

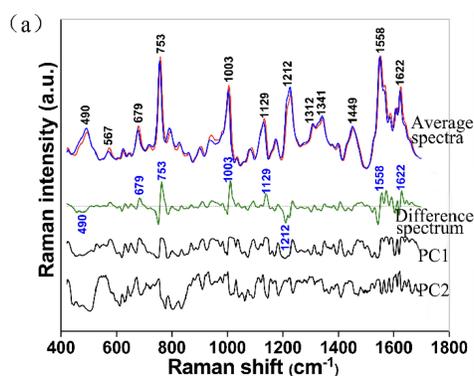


Figura 3.7: (a) En rojo tenemos el espectro Raman promedio de gl6bulos rojos (RBCs) de diab6ticos y el espectro de los no diab6ticos en azul; Curva verde: el espectro de diferencia (diab6tico menos normal). Curvas negras: los componentes principales primero y segundo (PC1 y PC2), respectivamente, que son m6s significativos para la detecci6n de la diabetes (escalados por un factor de 0.1). [24]

Capítulo 4

Pinzas ópticas

4.1. Introducción

El uso de trampas ópticas ha cobrado gran relevancia en las últimas tres décadas, consolidándose como una herramienta poderosa, estéril y no invasiva para la manipulación de partículas que varían en tamaño desde nanómetros hasta milímetros. Con el tiempo, estos instrumentos han evolucionado de simples herramientas para manipular objetos diminutos a dispositivos sofisticados controlados por computadora, capaces de medir desplazamientos y fuerzas con resoluciones de nanómetros y piconewtons. Actualmente se emplean en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo el sondeo de interacciones coloidales, el transporte y clasificación de microorganismos. En el campo de la biología, las pinzas ópticas se utilizan para estudiar problemas biofísicos, por ejemplo en análisis las propiedades mecánicas de membranas celulares. [25](#) [26](#) [27](#) [28](#) [29](#)

4.2. Fuerzas de atrapamiento

Una trampa óptica se forma enfocando estrechamente un rayo láser con una lente objetivo de alta apertura numérica (NA). [3] La fuerza óptica resultante del arreglo tradicionalmente se ha descompuesto en dos componentes: una fuerza de dispersión, en la dirección de propagación de la luz y una fuerza de gradiente, en la dirección del gradiente de luz espacial. [30]

La presión de radiación es la fuerza por unidad de área ejercida sobre un objeto debido al cambio en el momento de la luz.

Dado un sólo fotón, con una longitud de onda asociada λ la magnitud de momento lineal asociado es:

$$P = \frac{h}{\lambda} \quad (4.1)$$

La intensidad de la luz está determinada por el número de fotones que pasan a través de un área determinada por unidad de tiempo. [31]

El momento de un flujo continuo de fotones está determinado por su vector de Poynting

$$d\left(\frac{dP}{dt}\right) = \left(\frac{n}{c}\right) S da \quad (4.2)$$

donde P es el momento total de los fotones, n es el índice de refracción, c es la velocidad de la luz y da es un elemento de área normal a S .

$$F = \frac{n}{c} \int \int S da \quad (4.3)$$

Tradicionalmente la medición numérica o experimental de la fuerza asume a los componentes biológicos como esferas ideales ignorando sus estructuras

internas complicadas o membranas ásperas, esto con el fin de poder despreciar la inercia de la esfera. [32]. La fuerza de arrastre sobre la esfera por el flujo se puede calcular de acuerdo con la ley de Stokes de la siguiente manera:

$$F_{arrastre} = \frac{6\pi\mu Rv}{1 - \left(\frac{9}{16}\right)\left(\frac{R}{h}\right) + \left(\frac{1}{8}\right)\left(\frac{R}{h}\right)^3 - \left(\frac{45}{256}\right)\left(\frac{R}{h}\right)^4 - \left(\frac{1}{16}\right)\left(\frac{R}{h}\right)^5} = bv \quad (4.4)$$

En la expresión anterior la cantidad : $\Gamma = 6\pi\nu R$ es conocida como el coeficiente de arrastre. Donde ν es la viscosidad del medio, v es la velocidad del medio que rodea a la esfera atrapada, esta expresión toma en cuenta efectos de arrastre por las paredes ya que h es la distancia entre la esfera de radio R y la pared más próxima a esta.

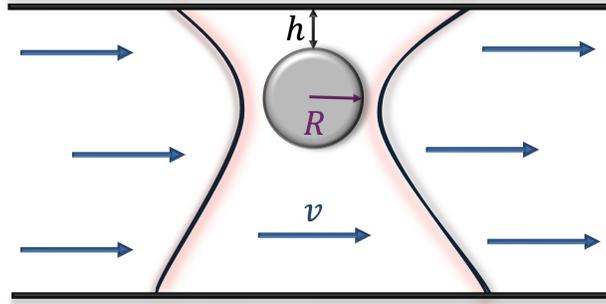


Figura 4.1: Esfera atrapada (gris) de radio R , en un potencial (rojo). El flujo a su alrededor se mueve con una velocidad ν , la distancia a la pared más cercana se representa con h .

4.2.1. Régimen de Rayleigh

Cuando la longitud de onda de la trampa láser es mucho menor que el diámetro de una partícula $d \gg \lambda$ las fuerzas sobre una partícula se pueden describir utilizando la óptica de rayos. Cuando un rayo de luz, viajando en un medio con índice de refracción n_1 incide sobre una esfera dieléctrica con índice de refracción n_2 , el rayo de luz se refracta según la ley de Snell

para posteriormente refractarse nuevamente cuando sale de la partícula. El momento lineal del rayo de luz cambia debido a la refracción, este cambio en la cantidad de movimiento se transfiere a la partícula debido a la ley de conservación de momento. [33]

Bajo la misma aproximación un haz de luz con potencia P incidiendo sobre la superficie de una esfera de diámetro d experimenta un cambio en su momento debido a la refracción, lo que genera una fuerza óptica F_{Opt} causada por la presión de radiación. Dicha fuerza se expresa mediante la ecuación [34]

$$F_{Opt} = \frac{n_m}{c} P Q \quad (4.5)$$

Donde se tiene c es una constante (la velocidad de la luz), n_m es el índice de refracción del medio en que se tiene sumergida a la esfera, y Q es el llamado *coeficiente de calidad* de la trampa óptica, una cantidad adimensional que representa la luz efectivamente reflejada por la partícula, cuando esta es transparente se tiene que $Q = 0$.

Podemos extender este razonamiento, para ya no considerar la fuerza producida en la esfera por un rayo, sino por número infinito de estos, la fuerza entonces será la suma de la contribución de cada rayo individual. Se puede demostrar que la fuerza resultante tiene la siguiente forma [35]:

$$F_{grad} = \frac{P n_m}{c} Q_{Grad} \quad (4.6)$$

Con

$$Q_{Grad} = \left[R \sin \theta - \frac{T^2 \sin 2(\theta - r) + R \sin(2\theta)}{1 + R^2 + 2R \cos(2r)} \right] \quad (4.7)$$

Dónde Q_{Grad} depende fuertemente de los coeficientes de transmisión y reflexión de Fresnel y los ángulos con los que se incide, como se muestra en Fig. 4.2

De igual forma se encuentra una expresión para la fuerza de dispersión F_{Scat}

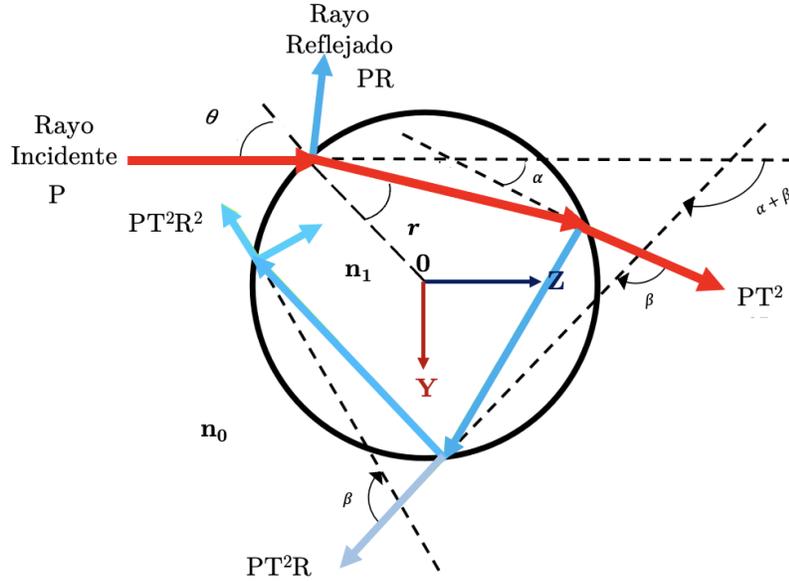


Figura 4.2: Esquema del proceso de reflexión y refracción de un rayo sobre la superficie de una esfera dieléctrica. Donde n_0 es el coeficiente de refracción del medio y n_i el coeficiente de refracción de la esfera.

$$F_{Scat} = \frac{P n_m}{c} Q_{Scat} \quad (4.8)$$

Donde

$$Q_{Scat} = \left[R \cos(2\theta) + 1 - \frac{T^2 \cos 2(\theta - r) + R \cos(2\theta)}{1 + R^2 + 2R \cos(2r)} \right] \quad (4.9)$$

Para encontrar la contribución total de las fuerzas que actúan debemos realizar dos integrales en coordenadas esféricas, ya que la integración se lleva a cabo sobre la superficie de la esfera.

Retomando que la potencia P es la irradiancia I entre el área iluminada A donde a su vez I en términos del campo E_0 es $I = \frac{E_0^2}{2\mu_0 c}$

$$F_z = - \int_{\pi/2}^0 d\theta \int_{2\pi}^0 d\varphi \left[\frac{E^2 \rho^2}{\mu_0 c^2} \sin \theta \cos \theta \right] \times Q_{Grad} \quad (4.10)$$

$$F_y = - \int_{\pi/2}^0 d\theta \int_{2\pi}^0 d\varphi \left[\frac{E^2 \rho^2}{\mu_0 c^2} \sin^2 \theta \sin \varphi \theta \right] \times Q_{Scat} \quad (4.11)$$

Una vez calculadas las contribuciones de las fuerzas en ambos ejes, es posible obtener la magnitud de la fuerza óptica en la trampa, de la siguiente manera :

$$F_{OptTotal} = \sqrt{(F_x)^2 + (F_y)^2} = \frac{n_m P_T}{c} Q \quad (4.12)$$

Donde Q vuelve a ser el coeficiente del que hablamos anteriormente. [\[34\]](#)

En resumen, las ecuaciones [4.7](#) y [4.9](#) demuestran que las fuerzas de atrapamiento dependen del radio del objeto atrapado. Esto indica que la potencia efectiva para el atrapamiento está relacionada con el área iluminada, es decir, con la cantidad de rayos que contribuyen al cambio de momento lineal total. Aunque en la práctica la fuerza óptica F_{Opt} no depende explícitamente del tamaño del objeto atrapado ni del ángulo del haz incidente, sí existe una dependencia a través del factor Q.

A continuación se presenta una gráfica que muestra la dependencia del factor Q en relación con el ángulo θ de incidencia.

La fuerza de gradiente máxima se genera en un ángulo aproximado de $\theta \approx 80^\circ$. El atrapamiento es más estable cuando los rayos convergen rápidamente. [\[36\]](#)

En comparación, todas las partículas no esféricas se vuelven poco prácticas cuando el parámetro de tamaño supera un cierto umbral. Esto hace que la óptica de rayos sea un enfoque extremadamente útil y efectivo cuando se trata de partículas grandes (en relación con la longitud de onda) y que además por su geometría podamos asumir esféricas. [\[37\]](#)

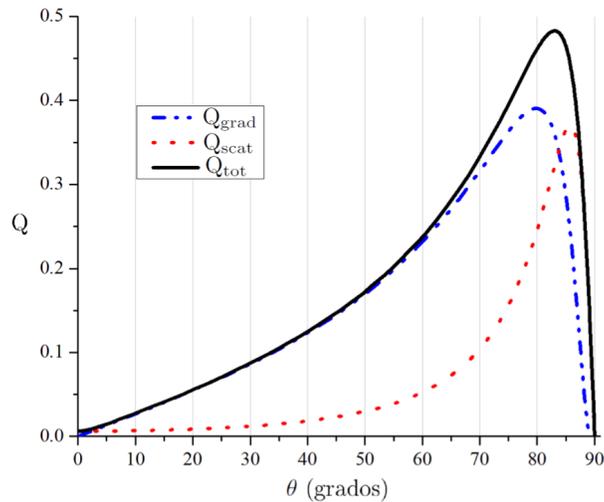


Figura 4.3: Q_{grad} , Q_{scat} y Q_{tot} para un solo rayo respecto al ángulo de incidencia θ , con $n_0 = 1.33$ y $n_1=1.44$. Gráfica extraída de: [36]

Numerosos desafíos se presentan en la aplicación de pinzas ópticas al estudio de sistemas biológicos. [38] [37] Algunos implicarán mejoras en las capacidades del instrumento, elaboración de microfluidos controlados y un mejor control de las condiciones ambientales moleculares. Sin lugar a dudas es una técnica que veremos combinarse con otros métodos de investigación para su mejoramiento en los próximos años. [39]

Capítulo 5

Arreglo Experimental

5.1. Espectrómetro de Czerny-Turner

Un espectrómetro óptico cumple con tres funciones específicas. Estos dispositivos irradian una muestra para producir un espectro, lo dispersan y miden las intensidades de sus líneas. La medida de cada sustancia es única y crea distintos patrones de luz que sirven como marcadores de identificación. El espectrómetro lee la longitud de onda y transmite la información a una computadora. [\[11\]](#)

La razón de escoger la configuración de un espectrómetro de Czerny-Turner para este trabajo por sobre otras es su sencillez y excepcional funcionalidad. Un espectrómetro Raman está compuesto por cuatro componentes principales: [\[40\]](#)

- Fuente de excitación, que generalmente es un láser de onda continua.
- Selector de longitud de onda.
- Sistema de captación de luz de la muestra.
- Sistemas de detección y control/procesamiento computarizado.

El sistema seleccionador de longitud de onda es un monocromador. Nuestra configuración tipo Czerny-Turner utiliza dos espejos parabólicos fuera de eje idénticos (M_1 y M_2) como elementos de colimación, una rejilla de difracción plana y un sistema de detección, arreglados como se muestra en Fig. 5.1

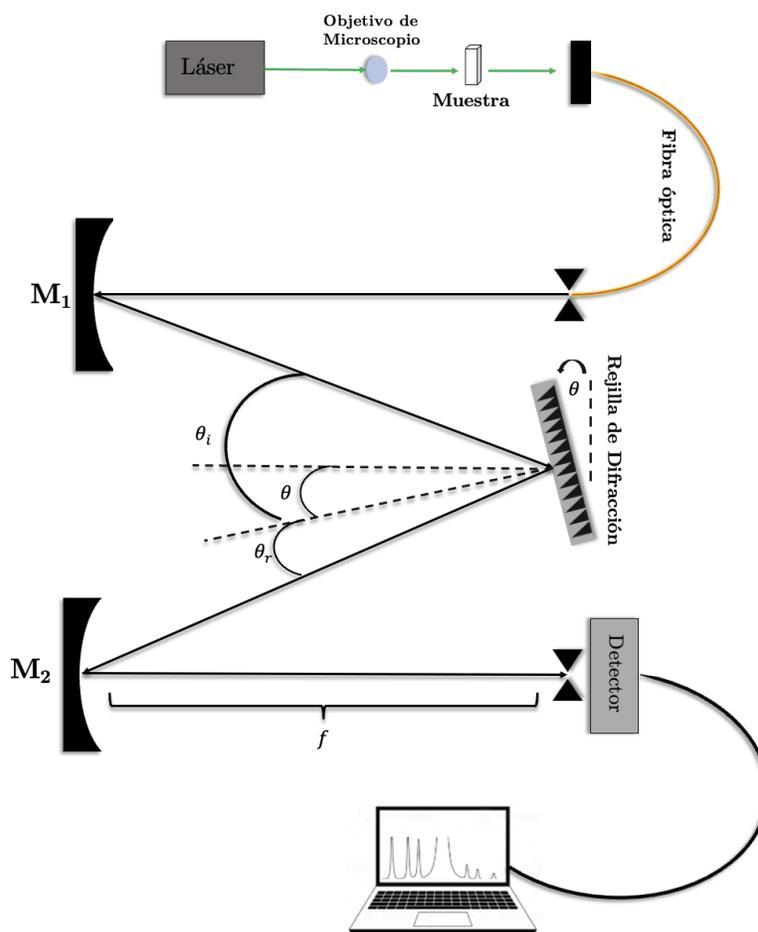


Figura 5.1: Arreglo experimental : Espectrómetro de Czerny-Turner simétrico

5.2. Componentes

5.2.1. Fuente de excitación

La fuente luminosa empleada en la espectroscopia Raman es una emisión láser. El láser fue elegido desde su desarrolló en el uso de esta técnica por ser monocromático (tener una sola frecuencia de emisión) y contar con alta coherencia espacial (la diferencia de fase entre dos puntos en el espacio es constante en el tiempo) lo que nos permite la concentración de una gran cantidad de energía en una superficie relativamente pequeña, generando el suficiente esparcimiento Raman para ser cuantificado con una intensidad razonable por encima del ruido no deseado que se pueda presentar en el proceso.

41

Para propósitos de este estudio se utilizaron tres diferentes fuentes de emisión láser:

Rango Visible

- En una primera etapa se utilizó una láser Nd-YAG doblado en frecuencia con una longitud de onda de **532** nm.
- Posteriormente se calibró una segunda versión del espectrómetro con un láser de estado sólido que emite en una longitud de onda de **660** nm.

Infrarrojo Cercano

- Se realizaron pruebas con un láser Nd-YAG en su modo fundamental, con una longitud de onda de **1064** nm

5.2.2. Sistema de detección

Para el sistema de detección utilizamos un tubo fotomultiplicador. Los tubos fotomultiplicadores detectan luz haciendo uso del efecto fotoeléctrico, un fenómeno físico en el cual electrones se desprenden cuando la luz golpea un metal o semiconductor. Consta de tres partes principales :

- **Fotocátodo:** Es una capa de material que emite electrones al ser impactada por fotones, a través del efecto fotoeléctrico.
- **Dínodos:** Es una serie de electrodos donde los electrones liberados de la interacción de la luz con un fotocátodo son acelerados por un voltaje aplicado generando electrones secundarios, este proceso se repite en cada dínodo como se muestra en Fig. 5.2, típicamente después de pasar por todos los dínodos el número de electrones se ha multiplicado exponencialmente.
- **Ánodo:** Es el último electrodo, este recoge los electrones amplificados por la serie de dínodos y genera una señal de corriente eléctrica.

La eficiencia en la conversión o sensibilidad del cátodo varía en función de la longitud de onda de la luz incidente, la señal puede ser amplificada más de un millón de veces. [42]

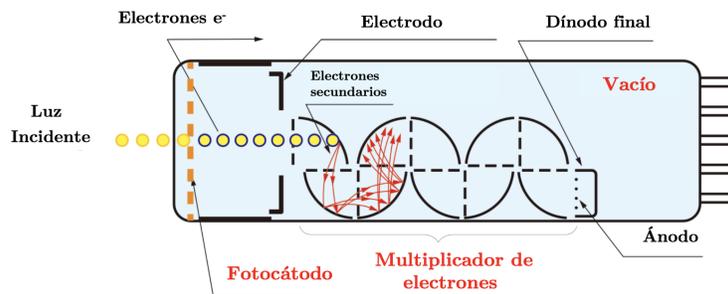


Figura 5.2: Esquema del funcionamiento de un tubo fotomultiplicador. [42]

En nuestro arreglo experimental implementamos un fototubo de la marca Hamamatsu modelo R12896, para longitudes de onda entre 200 - 800 nm. Para más detalles se puede consultar el apéndice B [8.2]

5.2.3. Fibra óptica

La espectroscopía Raman tiene la gran ventaja de la detección remota cuando se utiliza con fibras ópticas. Las fibras ópticas son responsables de transportar las señales Raman mediante la recolección de los fotones dispersados. [9] Las fibras ópticas son parte de una clase más amplia de componentes ópticos conocidos como *guías de onda* que utilizan la reflexión interna total para confinar y guiar la luz dentro de una estructura. En nuestro arreglo experimental utilizamos una fibra óptica, marca Thorlabs modelo M45L01, para direccionar la luz de la muestra irradiada hacia la entrada del monocromador.

Rejilla de difracción

La rejilla de difracción es un elemento óptico utilizado para el análisis de radiación electromagnética. Una rejilla de difracción es en general una colección de elementos reflectantes (o transmisores) separados por una distancia comparable a la longitud de onda de la luz en estudio. Puede estar compuesta por un conjunto de elementos de difracción, como un patrón de rendijas (o aberturas) transparentes en una pantalla opaca, o una colección de ranuras reflectantes en un sustrato. Su característica física fundamental es la modulación espacial del índice de refracción. [11] Tras la difracción, la amplitud de campo eléctrico, o fase, o ambas de una onda electromagnética se verán modificadas de manera predecible, debido a la variación (a menudo, pero no siempre periódica) en el índice de refracción en la región cercana a la superficie de la rejilla. [11] La difracción desde o a través de una rejilla genera uno o más conjuntos discretos de ondas difractadas, creadas a través de interferencia constructiva. Es importante conocer los tipos de rejilla y sus limitaciones para hacer la elección correcta.

Rejilla Reglada

Las rejillas regladas constan de ranuras triangulares que permiten una alta eficiencia de difracción, con la desventaja que en su proceso de cortado se producen pequeñas protuberancias e irregularidades en la superficie, pro-

vocando la presencia de dispersión relativamente alta comparada con otro tipo de rejillas. La dispersión limita las rejillas de difracción regladas a tener un máximo práctico de 1800 líneas/mm. [43]



Figura 5.3: Esquema de las ranuras triangulares de una rejilla reglada

Rejilla Holográfica Las rejillas holográficas están constituidas de franjas de interferencia fijas, creadas al iluminar un sustrato recubierto con una fotoresina con dos haces láser de muy alta calidad. Si la capa de resina es delgada y se desarrolla después de la exposición (es decir, la resina no expuesta es lavada), se obtiene una rejilla superficial. Esta rejilla se transfiere luego a una superficie metálica duradera mediante un proceso de plateado, para posteriormente unir la superficie a un soporte estable, (por ejemplo un vidrio), por último la resina se elimina químicamente o mecánicamente dejando su imagen en el metal. Las ranuras creadas en las rejillas holográficas son idealmente sinusoidales. [43]

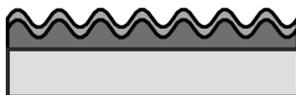


Figura 5.4: Esquema de las ranuras sinusoidales de una rejilla holográfica

Para trabajar en el rango espectral visible ($\lambda = 532nm$) se utilizó una rejilla holográfica de difracción que cuenta con 2400 ranuras por milímetro, de la marca Thorlabs modelo GH50-24V, especial para trabajar en el espectro visible de 200 nm y hasta ≈ 900 nm. Para trabajar con la longitud de onda en el infrarrojo cercano (1064 nm) se utilizó una rejilla de difracción holográfica también de la marca Thorlabs, modelo GH50-26V con 1200 líneas por milímetro. Para conocer a detalle las curvas de eficiencia de los modelos utilizados puede consultar el apéndice B : [8.2] de este trabajo.

En monocromadores comerciales se utiliza un mecanismo de barra senoidal para girar la rejilla de difracción de manera que se obtenga un cambio lineal

de longitud de onda, usualmente consta de una varilla empujada por un tornillo, la cual descansa sobre un brazo que sostiene la rejilla y puede girar en torno a un pivote como se muestra en la siguiente figura.

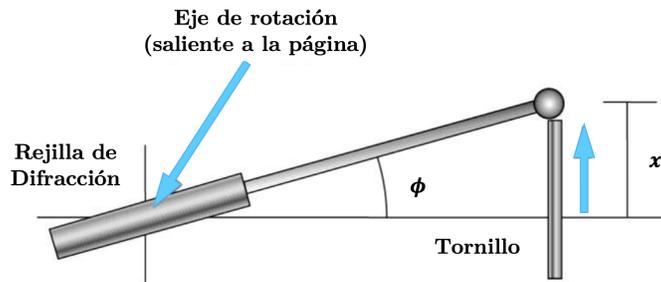


Figura 5.5: Mecanismo de barra senoidal para un monocromador.

A medida que el tornillo se extiende linealmente por la distancia x , la rejilla gira a través de un ángulo ϕ de tal forma que $\sin \phi$ es proporcional a x

Nosotros no implementamos este mecanismo, en su lugar la rejilla fue posicionada sobre una montura motorizada de rotación marca Thorlabs modelo PRM1Z8, la rejilla gira sobre su propio eje y la corrección a la longitud de onda se hace mediante el software utilizado que linealiza al hacer la lectura.

Fantasmas de Rowland

Las irregularidades en el espaciado de las franjas en una rejilla de difracción afectan la fiabilidad del espectro difractado, llegando a provocar un fondo difuso de luz dispersada. Incluso variaciones en la temperatura durante el proceso de grabado de las franjas en las rejillas producen bandas laterales cercanas en el espectro de difracción, provocando un efecto que es conocido como *fantasmas de Rowland* este problema es más complejo de tratar que la luz dispersada, ya que siguen la trayectoria normal de la luz a través de la rendija de salida, para corregir este problema se usa el arreglo de doble monocromador, que consiste en usar una rejilla de difracción extra. [43]

5.2.4. Ecuación de la rejilla de difracción

Para conocer cantidades relevantes, tales como la *dispersión angular* y la *resolución óptica* hacemos uso de la ecuación fundamental de la rejilla de difracción.

$$m\lambda = d[\text{sen}(\theta_i) + \text{sen}(\theta_r)] \quad (5.1)$$

Esta expresión cuantifica la desviación de la luz como función de la orientación angular de la rejilla de difracción dentro del monocromador, donde m es el orden de la rejilla, λ es la longitud de onda incidente en (nm), d es el espaciamiento entre surcos de la rejilla (nm), θ_i es el ángulo de incidencia y θ_r es el ángulo de reflexión. 44

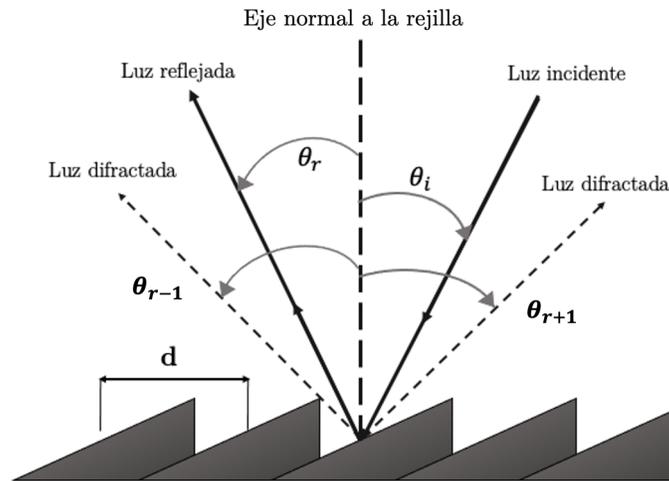


Figura 5.6: Diagrama que muestra los ángulos: incidente (θ_i) y reflejado (θ_r) y la distancia entre centro de los surcos (d)

Los ángulos θ_{r+1} y θ_{r-1} también son ángulos de difracción. Por convención estos se miden a partir del eje normal a la rejilla.

Tomamos en cuenta la existencia de una relación entre los ángulos de incidencia y de reflexión para nuestro espectrómetro en particular:

$$\theta_r = \alpha + \beta \quad (5.2a)$$

$$\theta_i = \alpha - \beta \quad (5.2b)$$

Es posible conocer α de manera experimental, pues es el ángulo que rota la rejilla medido desde la posición de orden 0. Para calcular β tenemos que

$$\beta = \tan^{-1} \left(\frac{L}{2f} \right) \quad (5.3)$$

Donde f es la distancia focal de los espejos y L es la longitud que existe entre las rejillas de entrada y salida del espectrómetro. Al reescribir la ecuación fundamental de la rejilla en función de α y β obtenemos

$$m\lambda = d[\sin(\alpha - \beta) + \sin(\alpha + \beta)] \quad (5.4)$$

Si hacemos uso de la identidad: $\sin(a + b) + \sin(a - b) = 2 \sin(a) \cos(b)$

Encontramos que es posible expresar Ec. 5.4 como

$$m\lambda = 2d \sin(\alpha) \cos(\beta) \quad (5.5)$$

La reflexibilidad máxima de la rejilla se tiene cuando: $\beta = 0$. Al retomar la ecuación para la longitud de onda:

$$\lambda = \frac{d}{m} (\sin(\theta_i) + \sin(\theta_r)) \quad (5.6)$$

Dispersión Angular

Para un espectrómetro tipo Czerny-Turner, la dispersión angular es una cantidad que indica cuánto varía el ángulo de difracción θ con respecto al cambio en λ .

Encontramos que la dispersión angular es:

$$\frac{d\theta_r}{d\lambda} = \frac{m}{d \cos(\theta_r)} \quad (5.7)$$

Substituyendo $\frac{m}{d} = \frac{\sin(\theta_i) + \sin(\theta_r)}{\lambda}$ obtenemos la siguiente expresión:

$$\frac{d\theta_r}{d\lambda} = \frac{\sin(\theta_i) \pm \sin(\theta_r)}{\lambda \cos \theta_r} \quad (5.8)$$

La dispersión angular está determinada únicamente por los ángulos de entrada y salida y no por el número de rejillas. A medida que el ángulo θ_r se acerque 90° la dispersión angular disminuye, en la práctica este no llega a ser 90° , antes de que eso suceda la luz ya no puede ser recogida eficientemente por el sistema óptico. [12].

Resolución Espectral

Otra cantidad importante que podemos conocer a partir de la ecuación [5.7] es la resolución espectral, que se define como la medida de la capacidad de un espectrómetro para distinguir dos picos en un espectro que están cerca uno del otro. Es importante comprender primero que esta cantidad dependerá fuertemente del número de líneas iluminadas en la rejilla de difracción, es por eso que en el diseño y durante la alineación se busca que la rejilla tenga la mayor área iluminada posible en todo momento, si ℓ es la longitud iluminada en la rejilla, N se define como : $N = \frac{\ell}{d}$.

$$\int d \cos \theta_r d(\cos \theta_r) = \int m d\lambda \quad (5.9)$$

$$\Delta\theta_r = \frac{\lambda}{Nd \cos \theta_r} \quad (5.10)$$

$$\frac{d\theta_r}{d\lambda} \Delta\lambda = \frac{\lambda}{Nd \cos \theta_r} \quad (5.11)$$

$$\frac{\lambda}{\Delta\lambda} = \frac{Nd(\sin \theta_i \pm \sin \theta_r)}{\lambda} \quad (5.12)$$

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mN \quad (5.13)$$

La resolución espectral es crucial en espectroscopía, donde es muy común tener que distinguir entre picos muy cercanos entre sí, entre mayor sea la resolución espectral hay una mayor precisión en las mediciones.

Dispersión lineal

La dispersión lineal describe cómo cambia la posición de las distintas longitudes de onda específicamente en el plano focal del detector en un espectrómetro, en función de su longitud de onda. Es una propiedad importante de los espectrómetros porque determina cuán separadas están las diferentes longitudes de onda en el espectro producido. [11]

La dispersión lineal tiene la siguiente forma

$$\frac{dx}{d\lambda} = \frac{fm}{d \cos(\theta_r)} \quad (5.14)$$

Y su recíproco:

$$\frac{d\lambda}{dx} = \frac{d \cos(\theta_r)}{fm} \quad (5.15)$$

Cuanto mayor sea la dispersión lineal, mayor será la separación entre diferentes longitudes de onda, lo que en principio facilitaría distinguir entre picos cercanos en un espectro. Como se muestra en [5.14] Esta propiedad depende de la distancia focal de los espejos f , el orden de difracción de la rejilla en el que se esté trabajando m , y la distancia d entre las ranuras en la rejilla.

Espejos parabólicos fuera de eje

Un espejo parabólico toma luz de una fuente puntual ubicada en el foco y crea un haz colimado. La superficie única de un espejo parabólico fuera de eje puede producir una imagen de difracción limitada sin efectos cromáticos. Un espejo parabólico completo enfocaría un haz colimado en su punto focal, lo que a menudo no es útil porque se superpone con parte del haz entrante. Acceder al punto focal puede ser difícil e incluso imposible sin obstruir parte del haz incidente. Sin embargo, si sólo se utiliza una parte de la superficie parabólica, el haz se enfocará fuera del eje en una ubicación más accesible, como se muestra en la Fig 5.7. [45]

Para trabajar con $\lambda = 532\text{nm}$ se utilizaron dos espejos parabólicos fuera de eje de la marca Thorlabs con recubrimiento de plata, con un diámetro de 50,8 mm, con una distancia focal de 381 mm. Para trabajar con $\lambda = 660\text{ nm}$ los espejos se cambiaron por el modelo 76.2 x 646mm EFL 15° Bare Gold 100Å Off-Axis Parabolic Mirror de Edmund Optics. (Ver 8.2)

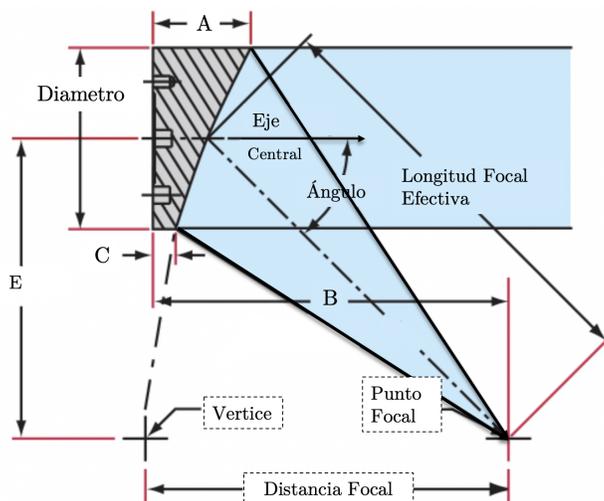


Figura 5.7: Diagrama del funcionamiento de un espejo parabólico fuera de eje. A y C son los espesores del espejo, B es la distancia sobre el mismo eje desde el inicio del espejo hasta el punto focal y E es la longitud en paralelo del centro del espejo al foco.

5.3. Consideraciones de la calibración

Un sistema bien alineado da los resultados más precisos, una de las maneras que tenemos para cuantificar la correcta alineación es obtener la máxima intensidad luz llegando a nuestro detector.

El proceso de alineación comienza con asegurarnos que el láser esté incidiendo en la muestra de manera correcta, esto quiere decir que el haz interactúe con la mayor cantidad de volumen de la muestra.

El primer error muy común es que la captación de la luz del paso anterior sea deficiente, primero se debe verificar que la lente esté correctamente alineada, buscando que por este atravesase la mayor cantidad de luz, posteriormente se debe confirmar que esta eficiencia se mantenga al acoplar la fibra óptica.

Una vez que la luz entre en el monocromador podemos aumentar la intensidad del láser tanto como nos sea cómodo para poder ver el láser pasar por los elementos ópticos y así facilitar el resto de la alineación.

La superficie total del primer espejo debe quedar completamente iluminada, al igual que la rejilla, la cual tenemos en un principio ubicada en el orden $m = 0$, en esta posición, es que verificamos que la luz proveniente de esta se encuentre centrada en el siguiente espejo, el cuál alineamos para que la luz enfocada de éste llegue directamente al centro de la entrada del detector.

Un último paso que es recomendable hacer es verificar que en los siguientes ordenes de la rejilla ($m = 1, 2$) también se tenga la mayor captación de luz y el haz se encuentre alineado correctamente con el detector.

La calibración comienza con la lectura del espectro del láser (en este paso podemos o no tener muestra). Se busca obtener dos datos clave: primero, el ángulo de giro de la rejilla que corresponde al centro de la intensidad del láser, y segundo, la medida de la intensidad misma, asegurando que sea máxima. Durante este paso se pueden notar otras características que nos ayudan a mejorar la alineación, como el perfil del láser, que debe de ser simétrico.

La intensidad del efecto Raman guarda una relación de proporcionalidad con la intensidad inicial con la que se irradia la muestra, sin embargo usar el láser con intensidades muy elevadas no necesariamente se traduce en mejores espectros, hay que tomar en cuenta la preservación del sistema de detección, si se usan intensidades muy altas esto podría saturar el sistema de detección y degradar la muestra. Es por eso que las pruebas se tuvieron que repetir hasta encontrar un buen balance entre intensidad del láser, la velocidad de barrido y la potencia del detector.

5.4. Evaluación del láser de $\lambda 1064$ nm Utilizando una cavidad Fabry-Pérot

Para obtener espectros Raman se requiere de un láser que cumpla con ser altamente coherente, monocromático y estable, lo ideal es que se trate de lo que se conoce como láser unimodo, es decir que posea un único modo transversal y longitudinal, con esto se asegura un haz con coherencia, un perfil de intensidad gaussiano, y una longitud de onda de emisión constante. [46] Para evaluar cuán cerca está el láser que se desea utilizar en el estudio de glóbulos rojos de cumplir con estas características, realizamos un análisis mediante interferometría utilizando un arreglo de Fabry-Pérot.

5.4.1. Cavidad Fabry-Perot

Desarrollada por Charles Fabry y Alfred Perot a finales del siglo XIX, la cavidad Fabry-Perot es un dispositivo espectroscópico que consta de dos superficies paralelas, con reflectividades R_1 y R_2 , separadas entre si una distancia L , donde se encuentra un medio con un índice de refracción n (como se muestra en Fig. [5.8]). Cuando esta distancia se mantiene fija a este instrumento se le llama *etalón*, sí por otro lado podemos variar L mecánicamente tenemos un *Interferómetro de Fabry-Perot*. [47]

La luz láser incidiendo sobre la primera superficie (representada por un campo E_0) se reflejará y transmitirá varias veces dentro del espacio L , lo que genera un patrón de interferencia constructiva o destructiva.

Calculamos la suma de todos los campos (E_i^+), que contribuyen al total de la luz transmitida E_t .

$$E^+ = E_1^+ + E_2^+ + E_3^+ + \dots \quad (5.16)$$

$$E_t = E_0 t_1 t_2 \left(1 + r_1 r_2 e^{i\phi} + r_1^2 r_2^2 e^{i2\phi} + \dots \right) \quad (5.17)$$

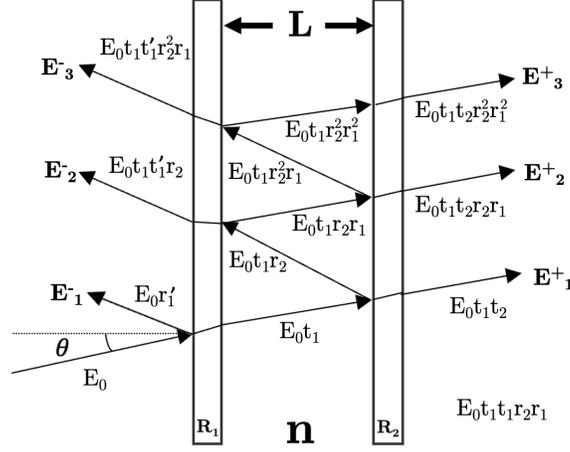


Figura 5.8: Transmisiones y reflexiones múltiples dentro de una cavidad Fabry-Pérot

Para espejos con la misma reflectividad, el resultado de la suma geométrica es:

$$E^+ = E_0 \frac{t^2}{1 - r^2 e^{i\phi}} \quad (5.18)$$

Para obtener finalmente la intensidad de transmisión, que se escribe como:

$$I_t = |E^+|^2 = |E_0|^2 \frac{t^4}{|1 - r^2 e^{i\phi}|^2} \quad (5.19)$$

Teniendo que: $|1 - r^2 e^{i\phi}|^2 = (1 - |r|^2)^2 (1 + F \sin^2(\frac{\phi}{2}))$ donde $F = \frac{4|r|^2}{(1 - |r|^2)^2}$ y haciendo uso de las definiciones $|r|^2 = R$ la reflexión total y $|t|^2 = T$ la transmisión, podemos escribir [5.19](#) como:

$$I_t = |E_0|^2 \frac{T}{(1 - R)^2} \frac{1}{1 + F \sin^2(\frac{\phi}{2})} \quad (5.20)$$

Conocida como *Función de Airy*, la ecuación [5.20](#) proporciona información sobre el comportamiento de la transmisión de la luz en función de

parámetros de la cavidad, tales como la reflectancia R y la transmitancia T , ϕ es el desfase provocado por el cambio de camino óptico durante el recorrido, que depende del índice de refracción del medio n , la longitud del sistema L y la longitud de onda de la luz λ . La transmisión máxima se obtiene cuando ϕ es un múltiplo entero de 2π (interferencia constructiva), por el contrario, un mínimo en la transmisión sucede cuando ϕ es un múltiplo impar de π (interferencia destructiva).

Cada modo longitudinal se representa como una onda estacionaria. El punto máximo de esta onda estacionaria corresponde a una frecuencia específica de la luz, como se muestra a continuación.

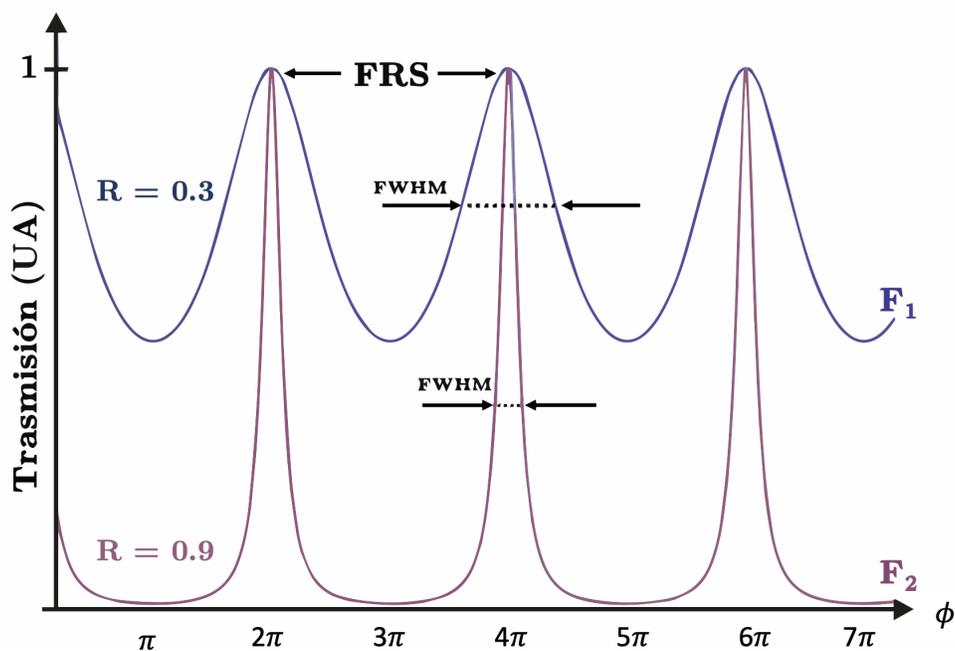


Figura 5.9: Función de Airy F_1 para una reflectividad de $R = 0.3$ (azul) y F_2 para $R = 0.9$ (rojo), el ancho a la mitad del máximo de cada pico se muestra como FWHM, la distancia entre dos máximos es FRS.

La condición de interferencia constructiva es:

$$L = a \frac{\lambda}{2n} \quad (5.21)$$

Donde a debe ser un número entero, para los fines de este trabajo, consideraremos que el medio (aire) tiene un índice de refracción $n=1$. Para conocer los modos dentro de la cavidad recurrimos a la siguiente relación: $\lambda = c/\nu$ donde c es el valor de la velocidad de la luz en el vacío. [48] [46] Cuando sustituimos en [5.21] obtenemos:

$$\nu = \frac{ac}{2L} \quad (5.22)$$

Como mencionamos anteriormente cada modo se encuentra separado del siguiente por un intervalo de frecuencia $\delta\nu$.

$$\delta\nu = \frac{c}{2L} \quad (5.23)$$

Esta cantidad se denota como *rango espectral libre*, su valor es la distancia en frecuencias entre dos máximos, para expresar esta separación en términos de longitudes de onda suponemos que $\nu \gg \delta\nu$, y retomamos la relación entre λ y ν para obtener :

$$\delta\lambda = \lambda \frac{\delta\nu}{\nu} = \frac{\lambda^2}{c} \delta\nu \quad (5.24)$$

al sustituir [5.23] obtenemos:

$$\delta\lambda = \frac{\lambda^2}{2L} \quad (5.25)$$

La distancia entre dos frecuencias consecutivas es lo que se conoce como *rango espectral libre* (FRS) de la cavidad y se define como:

$$FSR = \frac{c}{2nL} \quad (5.26)$$

Otros valores que nos interesan conocer es la finura (F) y el ancho completo a la mitad del máximo (FWHM) mostradas en 5.9. La finura es una medida definida como:

$$F = \frac{\pi\sqrt{R}}{(1-R)} \quad (5.27)$$

Que es una medida aproximada del número de longitudes de onda que se pueden tener en la cavidad. Entre más grande sea la finura los picos de transmisión producidos por el interferómetro serán más estrechos, esto representa una mayor resolución que nos permite distinguir de manera más certera máximos de intensidad. Por su parte, la anchura a mitad del máximo (FWHM) es una medida de resolución del instrumento, que nos indica la distancia mínima permitida entre dos máximos que pueden ser resueltos. Definida en términos de F y FSR como:

$$FWHM = \frac{FSR}{F} = \frac{c}{4\pi nL} \left(\frac{1-R}{\sqrt{R}} \right) \quad (5.28)$$

Como se puede observar de esta última expresión entre más cercana a uno sea la reflectividad de las superficies y la longitud entre ellos sea más pequeña tendremos un mayor poder de resolución de nuestro interferómetro.

49

Construimos un interferómetro Fabry-Perot, con el objetivo de caracterizar únicamente el láser con una longitud de onda de 1064 nm. En lugar de emplear espejos como comúnmente se hace, utilizamos dos divisores de haz optimizados para un rango de longitudes de onda que va de los 700 a los 1100 nm, de la marca Thorlabs, con un diámetro de 25 mm y una reflectancia experimental de $0,91 \pm 0,01$. Entre ellos hay una distancia inicial de $L = 40,6\text{mm}$. Uno de los divisores de haz se encuentra colocado sobre una

montura equipada con un piezoeléctrico que permite el cambio de la distancia entre ellos, de manera que se provoque interferencia, para llevar a cabo el análisis espectral del láser.

La finesa, el valor de $FWHM$ y el rango espectral libre teóricos para una L fija se muestran en la siguientes tablas.

L = 40.6 mm		
Reflectividad	0.93	0.99
FRS	3.55 GHz	3.55 GHz
FWHM	41.1 MHz	5.7 MHz
Finesa	43.3	312.6

L = 64 mm		
Reflectividad	0.93	0.99
FRS	2.34 GHz	3.55 GHz
FWHM	36.1 MHz	5.7 MHz
Finesa	43.3	312.6

5.5. Preparación de muestras

Para llevar a cabo la calibración del espectrómetro con tetracloruro de carbono se vertieron 3 ml del compuesto en estado líquido, previamente filtrado utilizando un filtro Syringe con un poro de $0.22 \mu m$ para remover partículas que pudieran interferir con los resultados de los análisis, en una celda de cuarzo que fue sellada con parafina para evitar evaporación. Una preparación equivalente a la anterior se realizó para muestras con alcohol isopropílico, utilizando los mismos elementos y la misma cantidad de compuesto.

En una segunda versión de calibración utilizamos un porta objetos para microscopio marca VVWR Internacional de 76×26 mm, donde colocamos una capa adhesiva de vinil de 0.1 mm de grosor que tiene un círculo hueco de 16 mm de diámetro, en donde depositamos $20 \mu l$ de tetracloruro con una micropipeta, procedimos a posicionar cuidadosamente un cubre objetos para microscopio marca AmLabs de 22×22 mm que tiene un espesor de 0.17 mm encima de la capa de vinil. Para fijar el cubre objetos al porta objetos, colocamos esmalte transparente en las orillas de este último, al secarse se mantendrán unidos y el tetracloruro permanecerá encapsulado dentro.

El motivo de este cambio en la preparación de muestras se debe a que esta segunda manera es la forma que son utilizadas en las pinzas ópticas, al querer hacer las técnicas compatibles necesitamos trabajar con un estilo de muestras que sea similar.

El manejo de muestras se llevó acabo utilizando guantes y bata de laboratorio para evitar cualquier contacto de las sustancias con la piel.



Figura 5.10: Materiales utilizados: 1: Tetracloruro de carbono en estado líquido con un a pureza del 90 %, 2: filtro Syringe, 3: guantes de látex, 4: pipeta micrométrica, 5: caja de cubre objetos, 6: porta-objetos con estampa de vinil, 7: celda de cuarzo, 8: esmalte transparente

Para la obtención de espectros con calcita, se utilizó un prisma de 2.5 cm \times 2.5 cm \times 1 cm. El haz del láser se hizo incidir en una de las caras de 2.5 cm, se utilizó la luz captada a 90° con respecto a la dirección de incidencia.



Figura 5.11: Prisma de calcita

Para el espectro de niobatio de litio se utilizó un cristal de este material con dimensiones de 0.7 cm x 0.7 cm x 2.5 cm .

5.6. Detección sensible a la fase

La detección sensible a fase es un método poderoso para observar señales muy pequeñas en presencia de ruido abundante. Desarrollada en la década de 1960 se ha convertido en una técnica experimental muy empleada y el amplificador de bloqueo es el instrumento que hace posible este método. 50

Un amplificador de bloqueo, también conocido como amplificador sensible a la fase, es un voltímetro de corriente alterna sofisticado. Junto con la entrada de la señal que queremos filtrar, se le proporciona una señal de referencia periódica. El amplificador responde solo a la porción de la señal de entrada que ocurre a la frecuencia de referencia con una relación de fase fija. Diseñando para experimentos que aprovechen esta característica, es factible medir magnitudes que, de lo contrario, quedarían ocultas por el ruido.

El amplificador de Lock-In opera de la siguiente manera:

Primero comenzamos por ingresar la señal proveniente de nuestro experimento ($V(t)$), esta debe encontrarse oscilando a una frecuencia ω_{en} .

$$V(t) = V_{ent} \sin(\omega_{en}t + \phi_{en}) \quad (5.29)$$

Se debe ingresar a la vez una señal de referencia que se encuentre oscilando, preferentemente a la misma frecuencia que ($V(t)$).

$$V_{ref}(t) = V_{ref} \sin(\omega_{ref}t + \phi_{ref}) \quad (5.30)$$

El amplificador mezcla (multiplica) estas dos señales,

$$V(t)V_{ref}(t) = V_{ref}V_{ent} \left(\sin(\omega_{en}t + \phi_{en}) \sin(\omega_{ref}t + \phi_{ref}) \right) \quad (5.31)$$

Gracias a la siguiente propiedad trigonométrica:

$$\sin(a) \sin(b) = \frac{1}{2} [\cos(a - b) - \cos(a + b)] \quad (5.32)$$

La expresión anterior se puede reescribir como :

$$V(t)V_{ref}(t) = \frac{V_{ref}V_{ent}}{2} \left[\cos \left((\omega_{en} - \omega_{ref})t + \Delta\phi \right) - \cos \left((\omega_{en} + \omega_{ref})t + \phi_{en} + \phi_{ref} \right) \right] \quad (5.33)$$

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, si tenemos que $\omega_{ref} = \omega_{ent} \equiv \omega$ obtenemos:

$$V_{res} = \frac{V_{ref}V_{ent}}{2} \left[\cos(\Delta\phi) - \cos \left((2\omega)t + \phi_{en} + \phi_{ref} \right) \right] \quad (5.34)$$

Donde $\Delta\phi = \phi_{en} - \phi_{ref}$. La señal se dirige entonces a un filtro paso bajo, donde se integrará en el tiempo, de esa integración la componente variable en el tiempo de la señal se volverá cero, este filtro también retira la componente de alta frecuencia $\phi_{en} + \phi_{ref}$ dejándonos con una señal filtrada

$$V_{res} = \frac{V_{ref}V_{ent}}{2} \cos(\Delta\phi) \quad (5.35)$$

El amplificador nos permite modular ϕ_{ref} para que la diferencia $\Delta\phi$ sea lo más pequeña posible, lo que amplifica la señal resultante, también podemos ajustar la sensibilidad, para detectar cambios más pequeños en amplitud, siempre tomando en cuenta que una mayor sensibilidad puede traducirse en aumentar a su vez la señal del ruido.

Una ventaja de los amplificadores de bloqueo es que la señal de referencia puede no ser sinusoidal en principio, el equipo toma la señal de referencia, la pasa por un desfasador y luego crea su propia referencia interna *bloqueada* a la referencia externa. Esto permite una mayor flexibilidad en su funcionamiento.

50

5.7. Aberraciones ópticas

5.7.1. Introducción

La aproximación paraxial de los sistemas ópticos es un primer acercamiento a la óptica geométrica, donde se asume que todos los rayos que inciden en un elemento óptico, por ejemplo; un lente o un espejo, lo harán con un ángulo muy pequeño, muchas veces despreciable con respecto al eje óptico. El eje óptico es una línea imaginaria que define la dirección de propagación de la luz, este atraviesa exactamente el centro de curvatura y coincide con el eje de simetría rotacional de la superficie del componente óptico. Bajo esta aproximación los sistemas ópticos ideales formarían imágenes perfectas. Lamentablemente, en la realidad no siempre podemos operar bajo la aproximación paraxial, lo que implica que las imágenes obtenidas carecen de perfección. [51] [47]

Al obtener una imagen a través de un elemento o un arreglo óptico, esta podría evidenciar una disminución en la calidad en comparación con el objeto original. A estos defectos y deformaciones se les conoce como *aberraciones ópticas*. Generalmente se dividen en dos categorías: las aberraciones cromáticas, presentes principalmente cuando se utiliza luz no monocromática y son fuertemente dependientes de los materiales del sistema óptico; y las aberraciones monocromáticas, o geométricas, que se asocian con las formas del sistema. El segundo grupo es especialmente relevante para nosotros, por lo que se presentan más a detalle a continuación. [52]

5.7.2. Aberración esférica

Tal y como su nombre sugiere este tipo de aberración se da debido a la simetría esférica con la que se diseñan lentes y espejos. Los rayos que impactan en las zonas más distantes del centro convergen en un punto distinto al foco, en donde se concentran los rayos que inciden en el centro, esto provoca que la imagen pierda nitidez. Las soluciones ante esta problemática son diversas y van desde delimitar los rayos para que pasen solo por la zona donde la apro-

ximación paraxial se cumple, hasta el uso de un complejo arreglo de lentes con aberraciones esféricas opuestas, que se compensan entre ellas para dar lugar a una aberración esférica neta cero. Sin embargo, cuando se trata de espejos, como es nuestro caso, la manera más eficaz afrontar este problema, es con el uso de espejos parabólicos. [52]

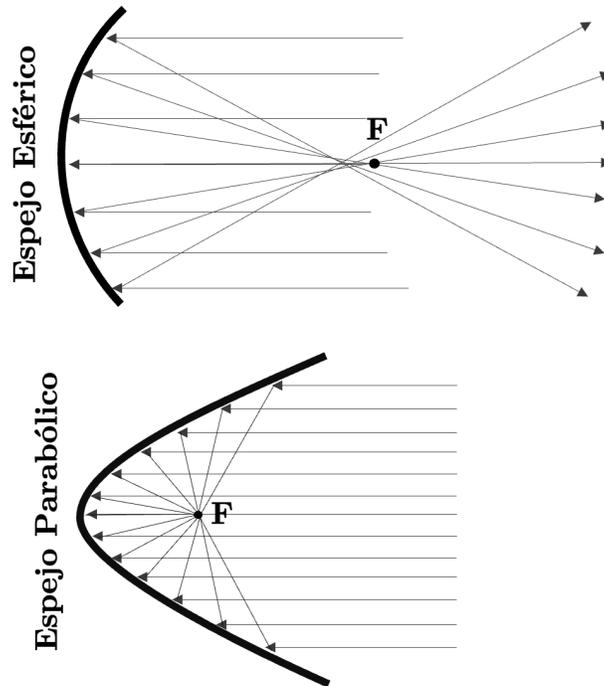


Figura 5.12: Comparación entre un espejo parabólico que presenta aberración esférica y un espejo parabólico.

5.7.3. Aberración comática

La coma se define como la variación de la magnificación debido a una apertura. [53] Al igual que la aberración esférica, la aberración comática, o coma, se da debido a que fuera de la aproximación paraxial, los rayos inciden con cierto ángulo a la superficie del espejo provocando que el reflejo se dé a distintas alturas, como consecuencia de lo anterior, la distancia focal efectiva para cada rayo que impacte la zona fuera del eje óptico será un poco distinta, (como se muestra en Fig. [5.13]) Debido a la simetría de revolución de un espejo parabólico, la imagen que se obtiene tiene forma de *cola de cometa*, de donde esta aberración obtiene su nombre, dicha forma puede apuntar hacia el centro del campo de visión o hacia afuera, dependiendo si la aberración tiene un valor positivo o negativo. Se habla de *coma positiva* cuando la imagen sufre una disminución, mientras que en el caso de *coma negativa* los rayos que se enfocan más allá del eje generan una imagen magnificada. La corrección

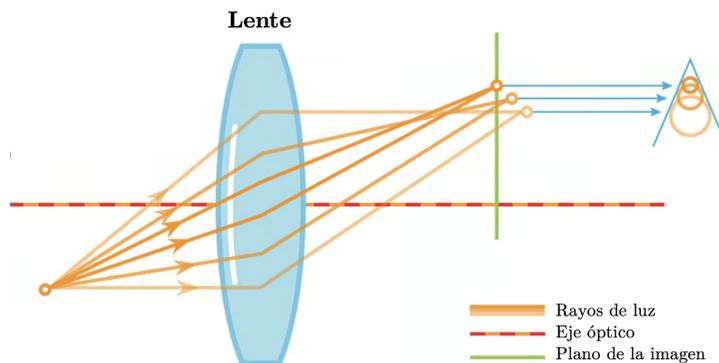


Figura 5.13: Esquema de aberración comática [54]

de este efecto se da en gran parte gracias a una correcta alineación, pues la aberración comática disminuye entre más rayos se tengan sobre el eje óptico.

[47] [55]

5.7.4. Astigmatismo

El astigmatismo es uno de los defectos más comunes de la generación de imágenes, tiene lugar cuando la luz incide en una lente o espejo con un ángulo respecto el eje óptico. El astigmatismo es una aberración óptica que hace que los rayos se propaguen en dos planos perpendiculares con dos focos diferentes. Dado que la longitud focal del elemento óptico depende esencialmente de la dirección, veremos una reducción en el plano tangencial y un incremento en el plano sagital. Como resultado, la focalización perfecta de un haz láser, por ejemplo, no será posible: el radio más pequeño del haz para la dirección tangencial se alcanza antes que para la dirección sagital. Existe una zona, justo a la mitad de los dos radios que es conocida como *círculo de mínima confusión* donde se tendrá la imagen más precisa que se puede alcanzar teniendo esta aberración. [56] [57]

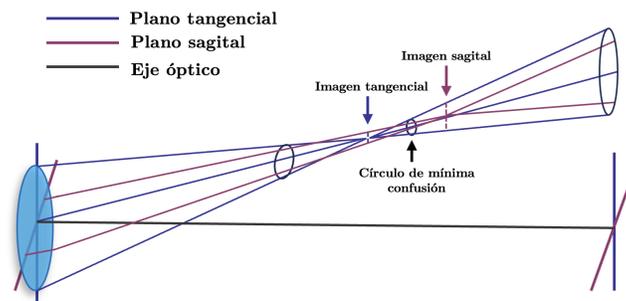


Figura 5.14: Esquema: Astigmatismo, los rayos sagitales se presentan en azul, mientras que los tangenciales se presentan en guinda.

La presencia de las aberraciones mencionadas en esta sección puede variar en nuestro arreglo, dependiendo de la correcta alineación y la selección adecuada de elementos con características que permitan corregirlas. En la sección de resultados, proporcionamos una descripción cualitativa de las aberraciones presentes.

5.8. Caracterización del Spot

En óptica se le conoce como *spot del láser* al área donde el haz se enfoca o se proyecta, es en esta región donde tenemos la máxima intensidad. En esta tesis nos interesa conocer las características (tamaño, forma, posición) del spot del láser en la entrada del detector del espectrómetro. La forma y tamaño de este proporcionan información sobre posibles aberraciones ópticas presentes en el sistema, a su vez es imprescindible conocer su posición exacta, para tener la mayor densidad de luz entrando en el detector. Determinamos la longitud horizontal y vertical del spot de cada láser para los ordenes de la rejilla $m = 0$ y $m = 1$. No se puede hablar del *radio* del spot porque en general no se tiene un círculo perfecto, hay una variación de unas cuantas micras entre la longitud vertical y horizontal. En la siguiente gráfica se muestran los resultados para los dos tipos de espejos utilizados de las dimensiones del Spot del láser.

Nuestros resultados arrojan que en general se cumple la relación entre el tamaño del spot y la longitud de onda dadas por el límite de difracción.

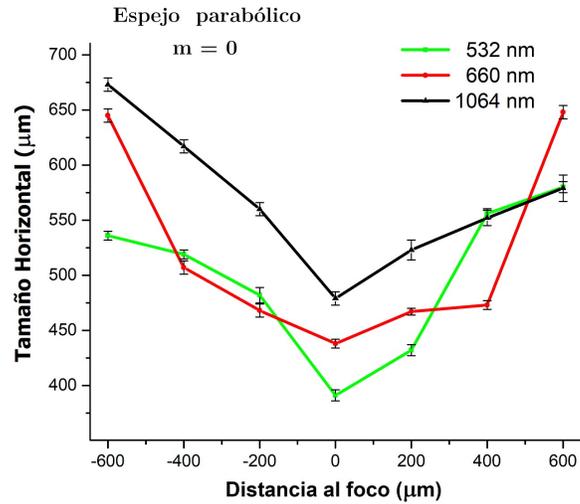
Teóricamente, el tamaño del spot está dado por:

$$Radio = \frac{2f}{\pi D} \lambda \quad (5.36)$$

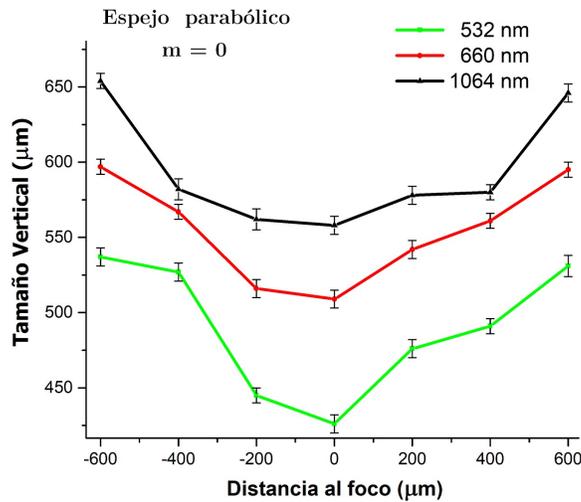
Cómo se utilizan los mismos espejos tanto, el diámetro (D) como el foco (f) se mantienen fijos, se puede definir entonces una constante α ; $\alpha = \frac{2f}{\pi D}$.

$$Radio = \alpha \lambda \quad (5.37)$$

Esta relación de proporcionalidad con λ , nos indica que entre mayor sea la longitud de onda el tamaño del spot del láser será mayor.



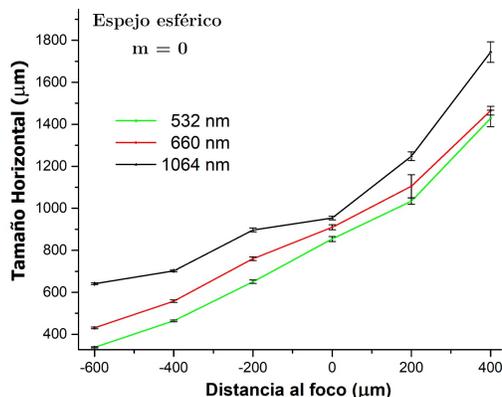
(a) Tamaño horizontal del spot del láser en función de la distancia al foco, para diferentes longitudes de onda: 532 nm (verde), 660 nm (rojo), 1064 nm (negro), con $m = 0$.



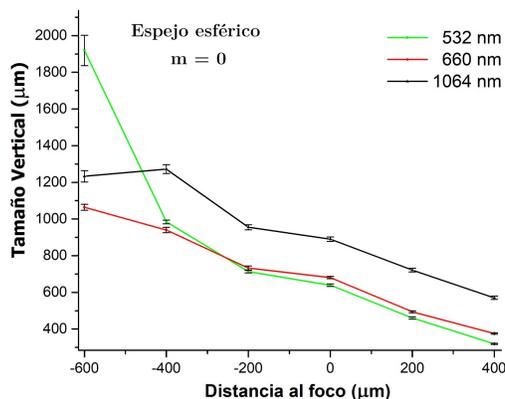
(b) Tamaño vertical del spot del láser en función de la distancia al foco, para diferentes longitudes de onda: 532 nm (verde), 660 nm (rojo), 1064 nm (negro), con $m = 0$.

Como se aprecia en las gráficas, para todas las longitudes de onda se obtiene un tamaño menor para el foco de los espejos. Entre la longitud vertical y la horizontal hay una diferencia de entre 30 – 80 micras .

En comparación con lo obtenido para los espejos parabólicos, las gráficas siguientes muestran que el tamaño mínimo en cualquiera de las direcciones no corresponde con el foco. Esto debido a efectos de aberración de coma y posiblemente astigmatismo presentes en el orden 1 y 0 para espejos esféricos. Para ver con más detalle los tamaños del Spot puede dirigirse a la sección de apéndices de este trabajo. [8.4](#)



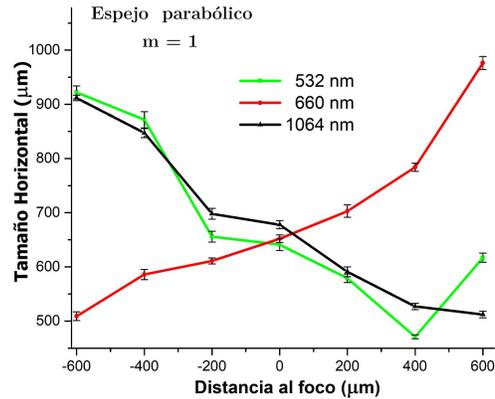
(a) Tamaño horizontal del spot del láser en función de la distancia al foco, para diferentes longitudes de onda: 532 nm (verde), 660 nm (rojo), 1064 nm (negro), con $m = 0$. Para el caso de una lente esférica.



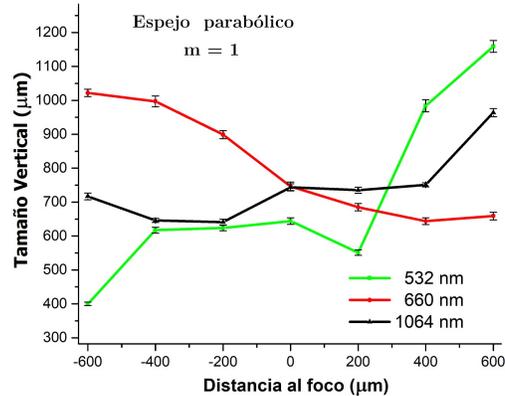
(b) Tamaño vertical del spot del láser en función de la distancia al foco, para diferentes longitudes de onda: 532 nm (verde), 660 nm (rojo), 1064 nm (negro), con $m = 0$. Para el caso de una lente esférica

Cuando trabajamos en el orden 1 de las rejillas, la relación entre los tamaños cambia, al presentar coma hay una clara afectación, los spots pasan tener formas de elipses horizontales, a elipses verticales entre más nos alejamos del foco para los casos de $\lambda = 532\text{nm}$ y $\lambda = 1064\text{nm}$, ocurre lo contrario

para $\lambda = 660nm$.

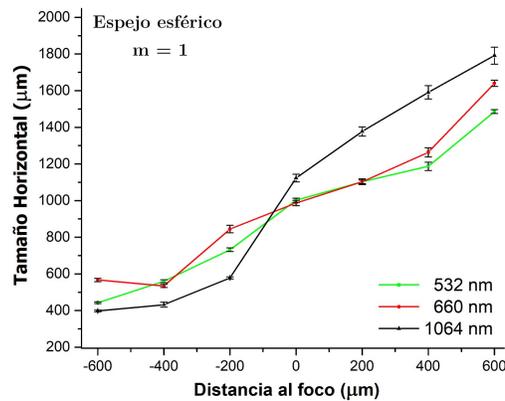


(a) Tamaño horizontal del spot del láser en función de la distancia al foco, para diferentes longitudes de onda: 532 nm (verde), 660 nm (rojo), 1064 nm (negro), con $m = 0$. Para el caso de ambas lentes parabólicas fuera de eje

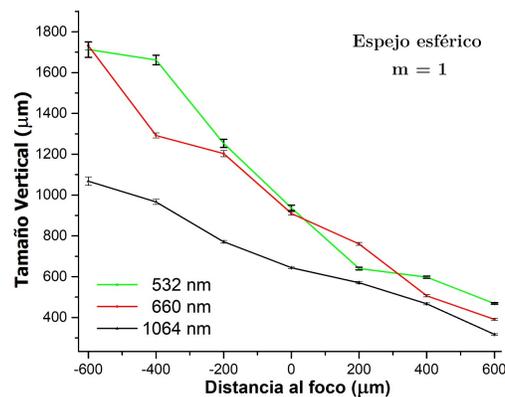


(b) Tamaño vertical del spot del láser en función de la distancia al foco, para diferentes longitudes de onda: 532 nm (verde), 660 nm (rojo), 1064 nm (negro), con $m = 0$. Para el caso de ambas lentes parabólicas fuera de eje.

El efecto de cambio de eje mayor en las elipses está más presente en el caso de los espejos esféricos. Esto debido a mayor presencia de aberraciones.



(a) Tamaño horizontal del spot del láser en función de la distancia al foco, para diferentes longitudes de onda: 532 nm (verde), 660 nm (rojo), 1064 nm (negro), con $m = 0$. Para el caso de una lente esférica.



(b) Tamaño vertical del spot del láser en función de la distancia al foco, para diferentes longitudes de onda: 532 nm (verde), 660 nm (rojo), 1064 nm (negro), con $m = 0$. Para el caso de una lente esférica.

Capítulo 6

Resultados

6.1. Caracterización del Láser

Para la obtención de espectros Raman con una longitud de onda de excitación de 532 nm no hubo inconvenientes relacionados con la fuente, en contraste cuando se comenzaron las pruebas para el láser en infrarrojo notamos una considerable presencia de ruido proveniente solamente de la lectura de este. Se entiende por ruido a toda señal aleatoria y no deseada detectada que no corresponde a las características reales de la muestra y que imposibilita una lectura correcta del espectro.

Como se mostró en la sección [5.4.1](#) es posible conocer la cantidad de modos longitudinales de un láser usando un interferómetro de Fabry-Perot, por lo que después de no obtener espectros fiables con el láser infrarrojo $\lambda = 1064$ nm, nos dimos a la tarea de probarlo a través de dos arreglos de este tipo. El primer arreglo, al que llamaremos *Int1* consta de dos divisores de haz como superficies reflejantes, a una distancia $L = 40,6$ mm. El segundo, al que nos referiremos como *Int2* se trató de los mismos divisores de haz, separados una longitud $L = 64$ mm, con la diferencia de que en el centro utilizamos un etalón comercial, que en su interior también tenía aire, por lo que el coeficiente de refracción sigue siendo uno, la implementación del segundo etalón se da con el fin de mejorar la resolución.

Los resultados obtenidos para ambos casos se muestran a continuación.

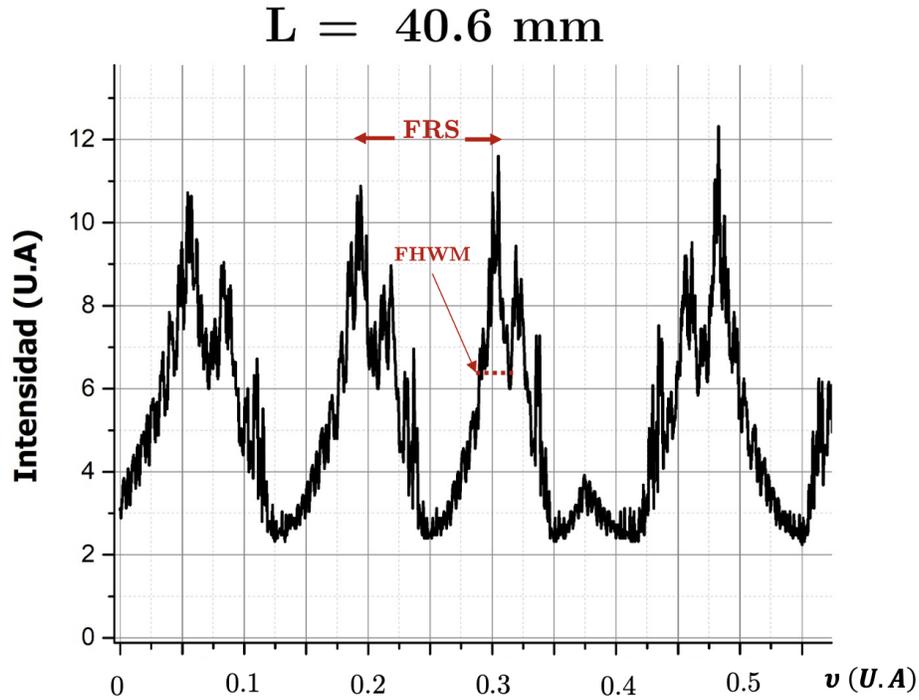


Figura 6.1: Resultado obtenido para el arreglo Int1

Se observan claramente la presencia de dos frecuencias, lo que nos indica la presencia de dos modos longitudinales del láser. Para la frecuencia más prominente que obtenemos para $L = 40,6\text{mm}$ tenemos una *FHMW* experimental de 68.42 MHz y *FRS* de 370 MHz que contrastan con los valores teóricos de 41.1 MHz y 3.55 GHz respectivamente.

Para el segundo arreglo Int2, también es evidente la presencia de dos frecuencias, esta vez los máximos no se encuentran tan cerca uno del otro por lo que es más sencillo diferenciarlas y con esto afirmar, que efectivamente, el láser tiene dos modos longitudinales haciéndolo no apto para realizar espectrometría Raman.

En cuanto a los valores experimentales encontramos que se tiene 41,85 MHz para la *FHWM* y 234,4 MHz para *FRS*.

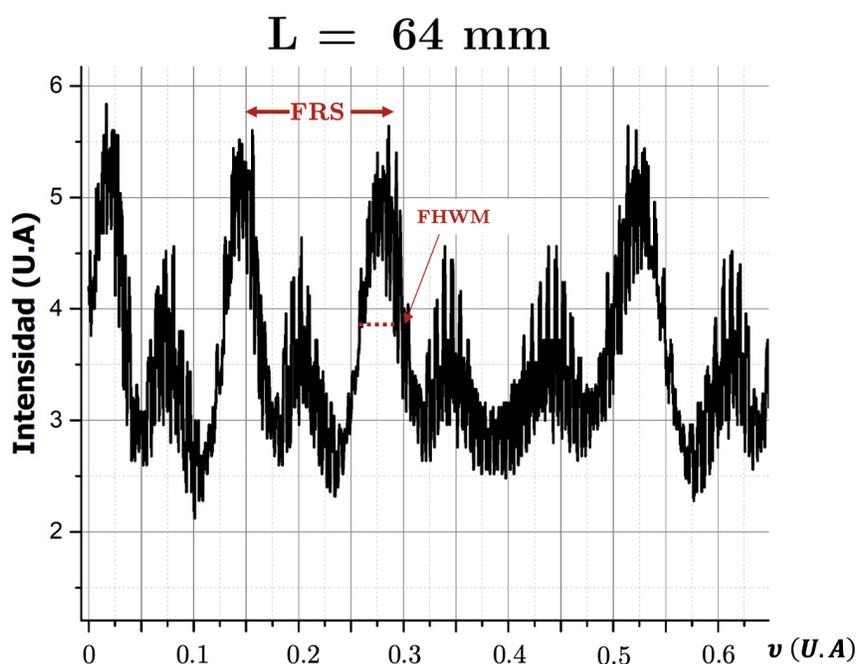


Figura 6.2: Resultado obtenido para el arreglo Int2

Para el segundo arreglo, obtenemos un valor experimental de 41,85 MHz para la *FHWM* y 234,4 MHz para *FRS*

Se observan picos dobles en ambos resultados, lo que nos habla de la presencia de dos modos longitudinales, que claramente afectan la adquisición de los espectros.

Una vez que determinamos que el láser con una longitud de onda $\lambda = 1064$ nm no cumpliría con el requerimiento de ser unimodo es que tomamos la decisión de sustituirlo por un láser de diodo con una longitud de onda de 660 nm, si bien está lejos de la zona de infrarrojo cercano con la que trabajan las pinzas ópticas lo hicimos con la intención de probar la nueva óptica con una longitud de onda diferente a la primera.

6.2. Análisis de aberraciones

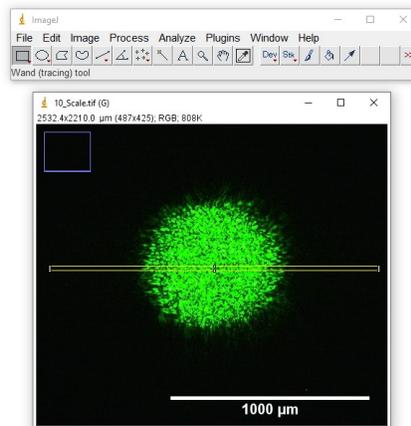
Como se mencionó en el cuarto capítulo de este trabajo, nuestro espectrómetro es susceptible a la aparición de diversos tipos de aberraciones. Para corregir de raíz la aberración esférica se optó por usar espejos parabólicos en lugar de espejos esféricos.

Los espejos elegidos, además de corregir aberración esférica nos ayudaron a disminuir el tamaño del haz. Para tener un punto de comparación, se hizo una prueba donde se utilizó un espejo esférico, con una menor distancia focal.

Con el fin de detectar aberraciones presentes en nuestro sistema óptico, realizamos la caracterización de los perfiles del haz en el plano focal en la salida del monocromador, es decir donde el haz entra al detector. Este procedimiento nos permitió, a su vez, conocer los radios del haz del láser.

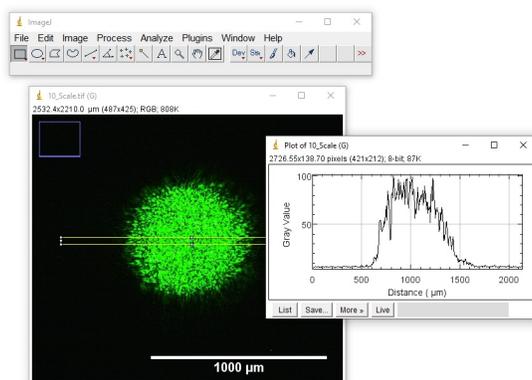
Todos las fuentes láser con las que trabajamos tiene un perfil Gaussiano, queremos conocer sus modificaciones al pasar por nuestro sistema óptico. Se obtuvieron los perfiles para el haz para dos modos de la rejilla $m = 0, 1$ el orden 0 porque es el orden en que alineamos el sistema y para el orden 1 que es el que tomamos la lectura de los espectros. El análisis se llevó a cabo montando una cámara COMS marca Thorlabs modelo DCC1645C en un riel que cuenta con un tornillo micrométrico, con una resolución mínima de 1 micrómetro. El riel recorrió hasta 600 micras fuera del foco en ambas direcciones para observar como se modifica el tamaño del Spot del láser. La cámara toma una foto cada 200 micras, esta foto se examina con el programa *ImageJ* de la manera que se describe a continuación.

- Comenzamos por abrir el programa ImageJ con la imagen obtenida por la cámara del spot del láser.
- En el menú *Analizar*, en la opción de *Establecer escala* vamos a introducir el dato del tamaño de pixel de nuestra cámara, mismo que encontramos en su manual de usuario, en este caso cada pixel mide $3.6 \mu\text{m}$. Esto con la finalidad de obtener las mediciones directas del programa con las medidas correctas.
- Procedemos a utilizar la herramienta de *Selección rectangular*, que nos permitirá realizar la selección a lo largo de los ejes, como se muestra en la figura.



- Para obtener el perfil de intensidades basta con presionar Ctrl+K. Podemos notar de la imagen, que tenemos presencia de moteado, *speckle*, que es ruido de alta frecuencia presente en imágenes generadas por sistemas láser y surge debido a la interferencia de las ondas electromagnéticas que regresan dispersadas desde múltiples superficies. El método más común para suprimir este problema son modelos matemáticos para filtrar los puntos brillantes y oscuros que se generan como resultado de la interferencia, permitiendo una mejor interpretación de la imagen.
- Debido a lo mencionado anteriormente el perfil resultante deberá de pasar por un proceso de suavizado antes de poder ajustarle una curva

Gaussiana para conocer el diámetro del Spot. Nosotros realizamos el suavizado mediante las herramientas predeterminadas en Origin.



Cada foco se presenta con su gráfica de distribución de intensidad horizontal y vertical, encontrando FWHM para su perfil gaussiano es que conocemos su tamaño en ambos ejes.

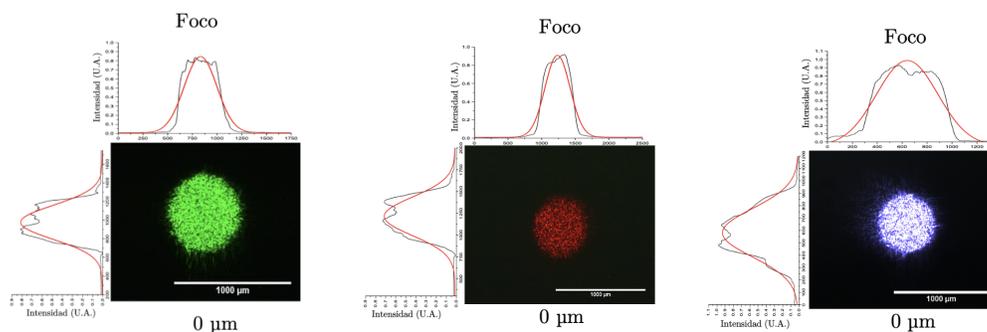
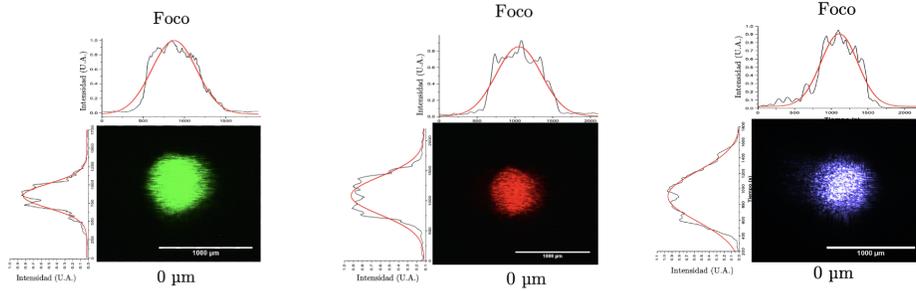


Figura 6.3: Spots obtenidos para $m = 1$, de izquierda a derecha tenemos $\lambda = 532nm$, $\lambda = 660nm$ y $\lambda = 1064nm$. Se muestran los perfiles de las intensidades en el eje horizontal y vertical

Los focos corresponden al modo 0 de la rejilla de difracción. Dónde se realiza la alineación del espectrómetro, como era de esperarse en este punto los spots son más uniformes.

A continuación se muestran las gráficas de los Spots en el modo 1 de la rejilla, donde se adquieren los espectros. Se puede distinguir astigmatismo en cada uno de los casos, mientras que la coma se muestra más pronunciada para el caso de $\lambda = 532 \text{ nm}$ y $\lambda = 660 \text{ nm}$.



Como podemos observar tenemos presencia de astigmatismo, que hace la imagen borrosa en los bordes en todos los casos. Esta clase de aberración se hace mucho más evidente entre más nos alejamos del foco, como podemos observar la sección [8.1](#), donde también notamos que la coma es más prominente si nos encontramos fuera del foco y en el primer orden de la rejilla.

6.3. Obtención de espectros Raman

6.3.1. Conversión a número de onda

Es muy común que los espectros Raman se presenten en términos de número de onda $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) en lugar de longitud de onda (nm), para realizar la conversión de unidades debemos tomar en cuenta que la relación entre la resolución espectral y la longitud de onda es el inverso del cuadrado.

En función de la longitud de onda una resolución espectral será $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$, donde $\lambda_1 = \frac{1}{\nu_1}$ y $\lambda_2 = \frac{1}{\nu_2}$, por tanto tenemos que:

$$\Delta\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_2 - \tilde{\nu}_1 = \frac{1}{\lambda_2} - \frac{1}{\lambda_1} \quad (6.1)$$

Tomando en cuenta que $\lambda_2 = \lambda_1 + \Delta\lambda$

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda_1 + \Delta\lambda} - \frac{1}{\lambda_1} \quad (6.2)$$

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda_1 + \Delta\lambda} - \frac{1}{\lambda_1} = \frac{-\Delta\lambda}{\lambda_1^2 + \lambda_1\Delta\lambda} \quad (6.3)$$

Cuando $\Delta\lambda$ es pequeña se desprecia el término $\lambda_1\Delta\lambda$ que se encuentra en el denominador. Otro detalle importante es toma el valor absoluto de esta cantidad, es por esto que la expresión que se puede encontrar comúnmente es:

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{\Delta\lambda}{\lambda_1^2} \quad (6.4)$$

El paso de banda $\Delta\tilde{\nu}$ no es constante cuando el espectro es grabado con resolución de longitud de onda constante, como es habitual en monocromadores de rejilla, como es nuestro caso. Por ejemplo, a 532 nm un paso de

banda $\Delta\lambda$ de 2 nm equivale a

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{2nm}{(532nm)^2} = \frac{2 \times 10^{-7}cm^{-1}}{(5,32 \times 10^{-5}cm^{-1})^2} = 70,67cm^{-1} \quad (6.5)$$

Pero si se trabaja con 600 nm entonces:

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{2nm}{(660nm)^2} = \frac{2 \times 10^{-7}cm^{-1}}{(6,6 \times 10^{-5}cm^{-1})^2} = 46cm^{-1} \quad (6.6)$$

A medida que aumenta la longitud de onda, el paso de banda en cm^{-1} disminuye como el cuadrado de la longitud de onda de excitación. Ya que nuestros resultados son adquiridos en términos de longitudes de onda, la conversión a la escala de número de onda requiere que cada intensidad obtenida se multiplique por λ^2 , con esto se asegura que el espectro refleje correctamente las propiedades del espectro en el dominio del número de onda. [\[58\]](#)

6.4. Resultados teóricos de la resolución

Como lo planteamos con anterioridad, se requieren resoluciones altas para detectar diferencias pequeñas en desplazamientos de Raman, lo que permite identificar sustancias con mayor precisión. Se llevaron a cabo los cálculos (Apendice A [\[8.1\]](#)) para conocer las resoluciones teóricas de dos configuraciones del mismo espectrómetro, uno utilizando una rejilla con 2400 *surcos/mm* y otro con 1200 *surcos/mm* para dos diferentes distancias focales f de los espejos parabólicos fuera de eje y diferentes dimensiones de la abertura de entrada del detector *Slit*.

Obtenemos la mejor resolución teórica para una distancia focal de 508mm y una rejilla de difracción con 2400 *surcos/mm*. La calibración del espectrómetro de Czerny-Turner se realizó con una rejilla de 240 *surcos/mm* y ambos lentes utilizados contaban con una distancia focal de 375mm

Resolución para: rejilla de difracción 2400 líneas/mm y $\lambda = 532$ nm		
Slit (μm)	f = 375 (mm)	f = 646 (mm)
50	1.70 cm^{-1}	1.00 cm^{-1}
40	1.36 cm^{-1}	0.80 cm^{-1}
30	1.02 cm^{-1}	0.60 cm^{-1}

Resolución para: rejilla de difracción 1200 líneas/mm y $\lambda = 660$ nm		
Slit (μm)	f = 375 (mm)	f = 646 (mm)
50	2.20 cm^{-1}	1.30 cm^{-1}
40	1.77 cm^{-1}	1.00 cm^{-1}
30	1.33 cm^{-1}	0.80 cm^{-1}

Resolución: rejilla de difracción 1200 líneas /mm , $\lambda = 1064$ nm		
Slit (μm)	f = 375 (mm)	f = 646 (mm)
50	0.85 cm^{-1}	0.50 cm^{-1}
40	0.68 cm^{-1}	0.40 cm^{-1}
30	0.51 cm^{-1}	0.30 cm^{-1}

6.5. Resultados de la calibración

6.5.1. Calibración con tetracloruro de carbono

A continuación se presentan los resultados para la calibración del espectrómetro con una longitud de onda de excitación de 532nm y utilizando una potencia de 50 mW. En la primera gráfica (Fig 6.4) podemos observar el espectro obtenido de la lectura de una muestra de 3 ml de tetracloruro de carbono (CCl_4) en el que podemos apreciar sus 4 bandas, correspondientes a sus 4 frecuencias vibracionales, como lo vimos en 3.6, lo obtenido concuerda con lo previamente reportado en la literatura.

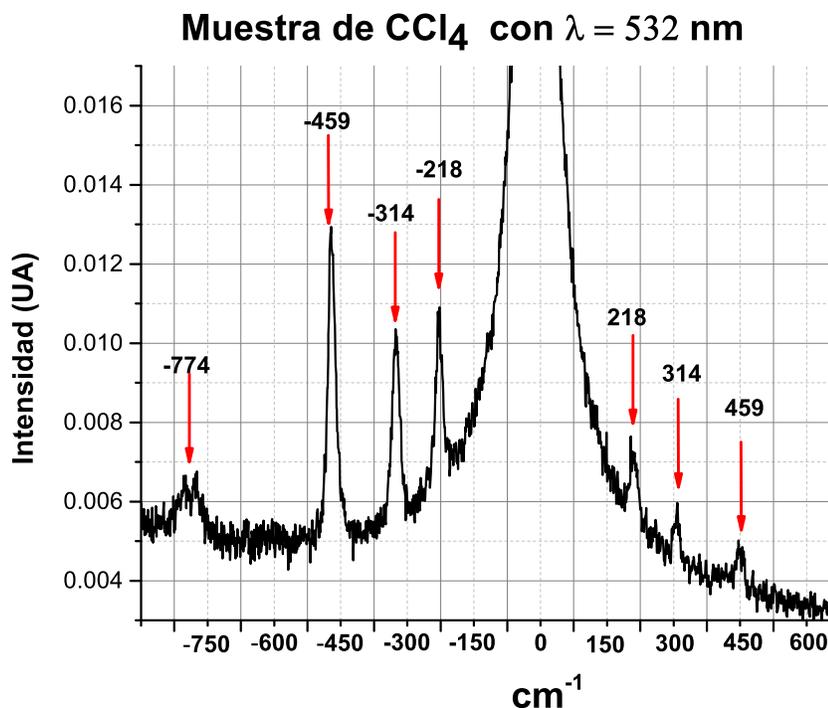


Figura 6.4: Espectro Raman obtenido con una longitud de onda de 532 nm, potencia de 50 mW con velocidad de giro de la rejilla $v = 0,025^\circ/\text{s}$

Se obtuvo un espectro Raman de tetracloruro de carbono con la técnica de detección sensible a la fase que nos permitió observar todos los picos Raman y disminuyó el ruido considerablemente en la medición, la muestra es la correspondiente a la versión 2 para el tetracloruro de carbono.

No nos fue posible obtener los picos correspondientes a la dispersión Raman anti-Stokes (a causa probablemente de la disminución de la eficiencia del detector fotomultiplicador para esta longitud de onda) sí obtuvimos los cuatro modos de vibración para la dispersión Raman-Stokes.

Haciendo uso de la misma configuración Czerny-Turner, pero cambiando los elementos ópticos por aquellos optimizados para longitudes más cercanas al infrarrojo, con una fuente de excitación láser de 660 nanómetros obtuvimos

el espectro para CCl_4 que se muestra a continuación.

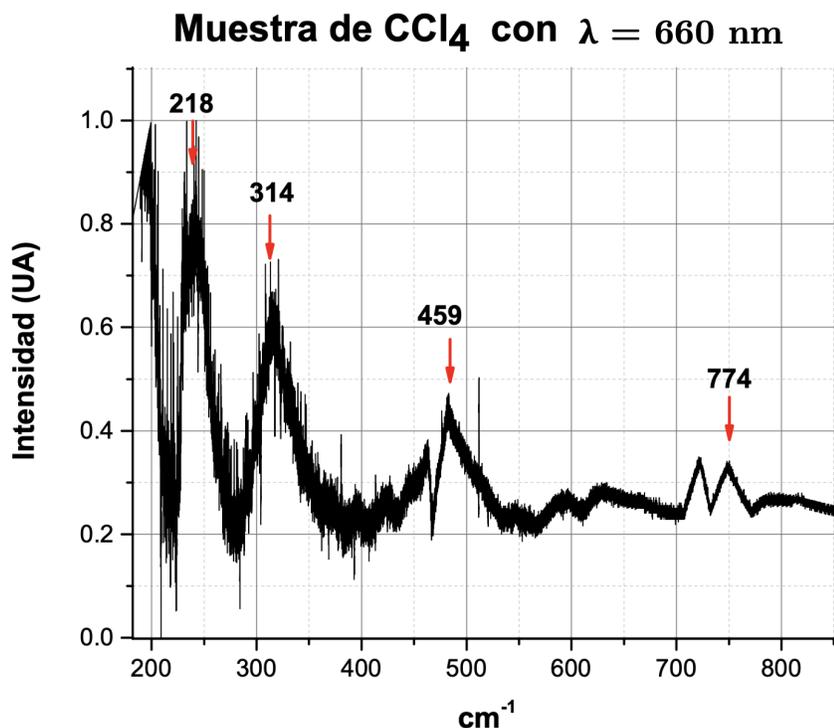


Figura 6.5: Espectro Raman obtenido con una longitud de onda de 660 nm 35 mW de potencia y velocidad de giro de la rejilla $v = 0,025^\circ/s$

6.5.2. Calibración con Calcita

La Calcita ($CaCO_3$) es un mineral cristalino, que se encuentra de forma natural en la corteza terrestre, una de sus cualidades más notables es su birrefringencia, una propiedad óptica que describe la diferencia en el índice de refracción según la dirección de propagación de la luz a través del cristal, dicha característica tiene aplicaciones importantes en óptica y puede influir en la obtención del espectro Raman, pues la intensidad de los picos Raman puede variar dependiendo de la orientación del cristal. En algunos casos, si el rayo de luz pasa a través de una región birrefringente de la calcita, las líneas Raman pueden aparecer más anchas o desplazadas, debido a los efectos de

dispersión en los diferentes índices de refracción. Las posiciones típicas de los picos Raman para los modos vibracionales de la calcita son: 1085 cm^{-1} , 713 cm^{-1} , 282 cm^{-1} , 157 cm^{-1} . [59]

Para el caso de la calibración con Calcita la muestra fue un trozo de cuarzo de calcita, el cual posicionamos frente a la fuente de excitación haciéndolo incidir en el centro de una de sus caras, lo obtenido se muestra a continuación.

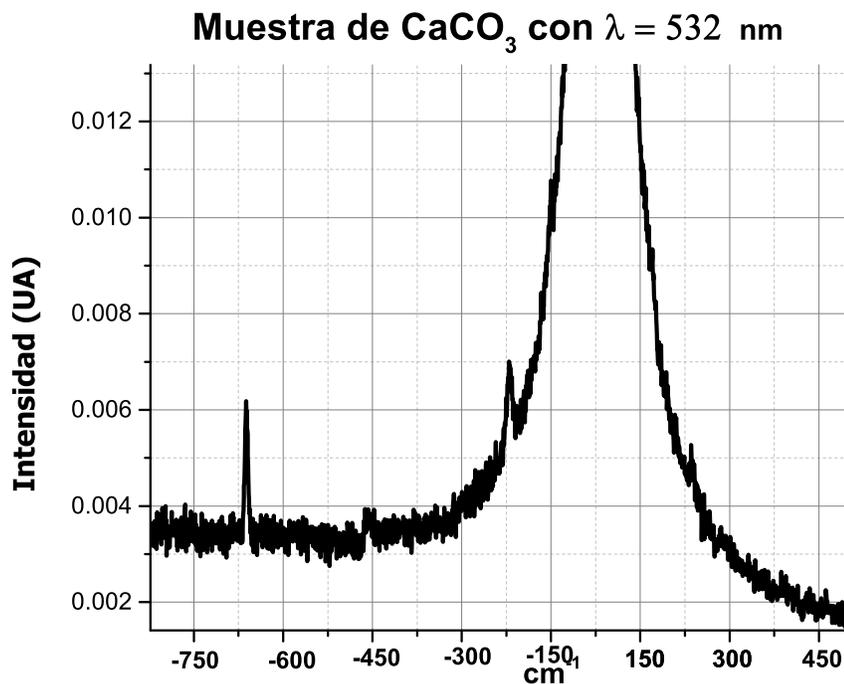


Figura 6.6: Espectro Raman de una muestra de cuarzo de calcita obtenido con una longitud de onda de 532 nm , potencia de 50 mW velocidad de giro de la rejilla $v = 0,01^\circ/s$

En la figura [6.6] se pueden apreciar, dos de las bandas correspondientes a las frecuencias de excitación para el CaCO_3

Tomamos el pico a 712 cm^{-1} para analizar la resolución experimental del espectrómetro.

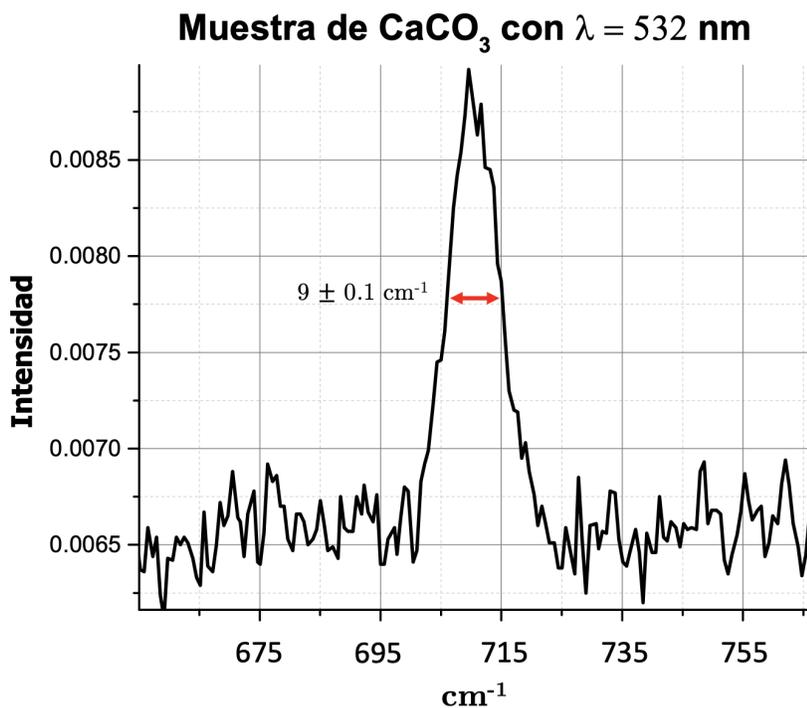


Figura 6.7: Acercamiento: Pico a 712 cm^{-1} espectro de calcita

Tomando el *FWHM* de este pico, tenemos una resolución experimental de $\approx 9.0 \pm 0.1 \text{ cm}^{-1}$. El *FWHM* de todos los picos en el espectro Raman de la calcita puede variar dependiendo de factores como la pureza, la presencia de defectos y como se mencionó anteriormente, su cualidad birrefringente. Los valores reportados para el pico Raman a 712 están en el rango de 2 a 6 cm^{-1} . 59

6.5.3. Calibración con niobato de litio

El niobato de litio ($LiNbO_3$) es un cristal con estructura trigonométrica que no se encuentra en la naturaleza a diferencia de la calcita, sino que tiene que ser obtenido por métodos de crecimiento cristalino, presenta propiedades ópticas y piezoeléctricas excepcionales, es un material ampliamente estudiado y utilizado para la creación de dispositivos ópticos, moduladores electroópticos y guías de ondas. Debido a su estructura las posiciones de los átomos en la celda unitaria generan diferentes modos vibracionales que podemos observar mediante espectroscopía Raman, estos modos vibracionales están asociados a diferentes simetrías en el cristal por lo tanto, las posiciones exactas de los picos Raman pueden variar ligeramente dependiendo de la orientación del cristal y las condiciones de la muestra. Una tabla muy completa con las frecuencias experimentales y teóricas encontradas por Nogueira Bernardo et al. se muestra a continuación. [\[60\]](#)

a. TO MODES				b. LO MODES				
Mode	Theory	Theory (Hermet et al. ^[30])	Exp	Mode	Theory	Theory (Hermet et al. ^[30])	Exp	Exp (Fontana & Bourson ^[36])
irrep	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	irrep (#TO)	ν (cm ⁻¹) ($\Delta\nu_{LO-TO}$)	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹) (#mode)
1E	159	155	152	1E (1)	195 (+36)	197	191	194 (2)
2E	240	218	237	2E (2)	242 (+2)	224	236	238 (3)
1A ₁	256	243	252	1A ₁ (2;1)	276 (-3; 2)	287	273	
3E	266	264	261	3E(3;4)	296 (+30; -24)	298	295	295 (4)
2A ₁	279	288	274	2A ₁ (3)	342 (0)	348	333	332 (2)
4E	320	330	320	3A ₁ (1;4)	434 (+178; -201)	413	426	419 (3)
3A ₁	342	355	331	4E (4;5)	344 (+44; -8)	349	332	?
5E	352	372	359	5E (6)	368 (-1)	384	369	366 (5)
6E	369	384	369	6E (7)	431 (-14)	423	424	425 (6)
7E	445	428	432	7E (7;8)	466 (+21; -107)	452	465	456 (7)
8E	588	585	579	8 E (9)	663 (-3)	675	683	625 (8)
4A ₁	635	617	632	4A ₁ (4;1)	883 (+248; +627)	855	872	871 (4)
9 E	666	677	670	9E (8)	892 (+304)	863	880	880 (9)

Figura 6.8: Extraída de la referencia [\[60\]](#) esta tabla compara las frecuencias vibracionales del niobato de litio encontradas teórica y experimentalmente por Nogueira Bernardo, et al, con lo encontrado por P. Herme, et al en un trabajo previo.

Obtuvimos tres picos representativos del espectro Raman del Niobato de Litio.

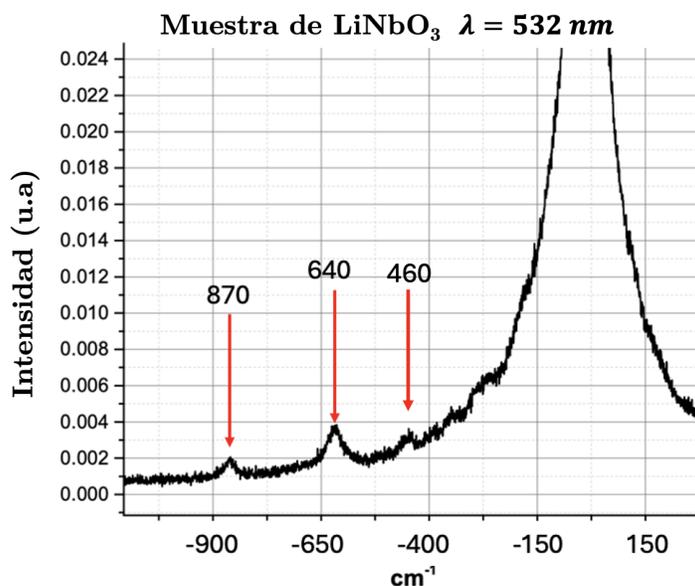


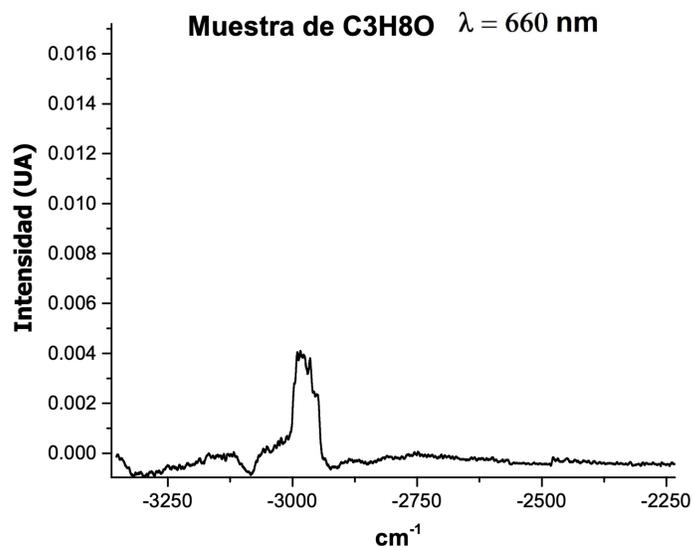
Figura 6.9: Espectro Raman del Niobato de Litio, obtenido con una longitud de onda de 532nm , con una intensidad de 150 mW, a una velocidad de giro de la rejilla de $0.025^\circ/\text{s}$

6.5.4. Calibración con alcohol isopropílico

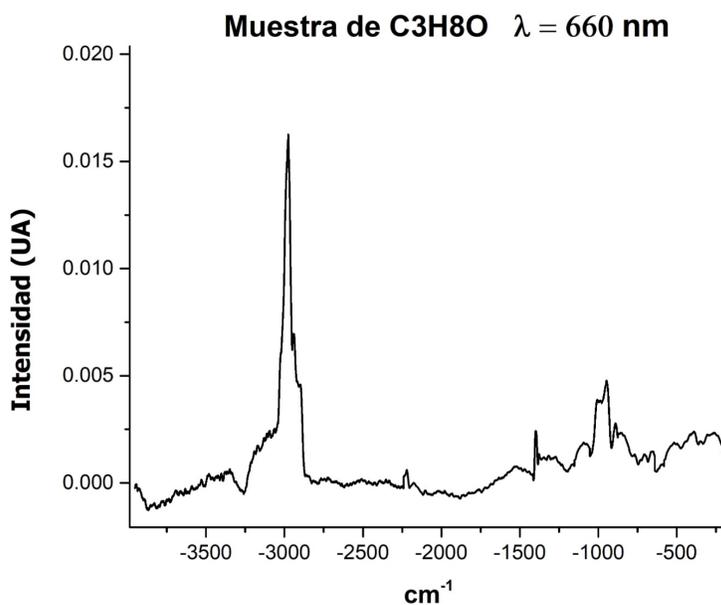
Realizamos pruebas de calibración usando alcohol isopropílico ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) con una longitud de onda $\lambda = 660 \text{ nm}$. Posteriormente con este mismo compuesto verificamos la utilidad de usar la técnica de detección sensible a la fase. Sin detección sensible a la fase, se obtuvo la señal de los picos Raman ubicados a 3000 cm^{-1} característicos del alcohol isopropílico.

Detección sensible a la fase

Implementando la detección sensible en la obtención de espectros se obtuvo una mejoría del 300% en la intensidad de la señal obtenida. Se observa la presencia, no sólo de los picos a 3000 cm^{-1} sino también a los ubicados a una distancia de 1300 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} que no eran visibles anteriormente.



(a) Espectro Raman del isopropanol; longitud de onda de 660nm velocidad de giro de la rejilla $v = 0,025^\circ/s$



(b) Espectro Raman del isopropanol utilizando detección sensitiva; longitud de onda de 660 nm velocidad de giro de la rejilla $v = 0,025^\circ/s$

Suavizado de espectros

Se llevó a cabo el suavizado de los espectros utilizando la función de suavizado predeterminada en Origin. Después de probar con diferentes puntos de suavizado, se determinó que el número óptimo, que nos permite visualizar el espectro sin perder detalles, es de 300.

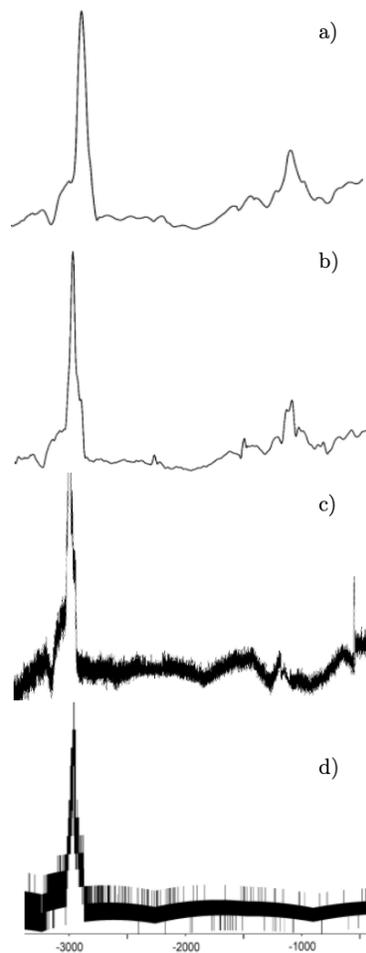


Figura 6.11: a) espectro suavizado con 500 puntos, b) espectro suavizado con 300 puntos, c) espectro suavizado con 100 puntos, d)espectro sin suavizar.

6.6. Raman en glóbulos

Actualmente, a pesar de sus ventajas y potencial, la espectroscopia Raman no se utiliza ampliamente en la práctica clínica. Esto se debe mayoritariamente a que la dispersión Raman es un proceso inherentemente débil. Tradicionalmente esto ha resultado en tiempos de adquisición largos y una alta intensidad láser que combinados son perjudiciales para examinar muestras biológicas pues conducen a la degradación, sobre todo si no se utiliza la longitud de onda adecuado. [61] Esto es lo que sucedió al realizar unos estudios preliminares en sangre. Los resultados revelan que se presenta un deterioro en la muestra de sangre completa debido al empleo de la longitud de onda de 660 nm.

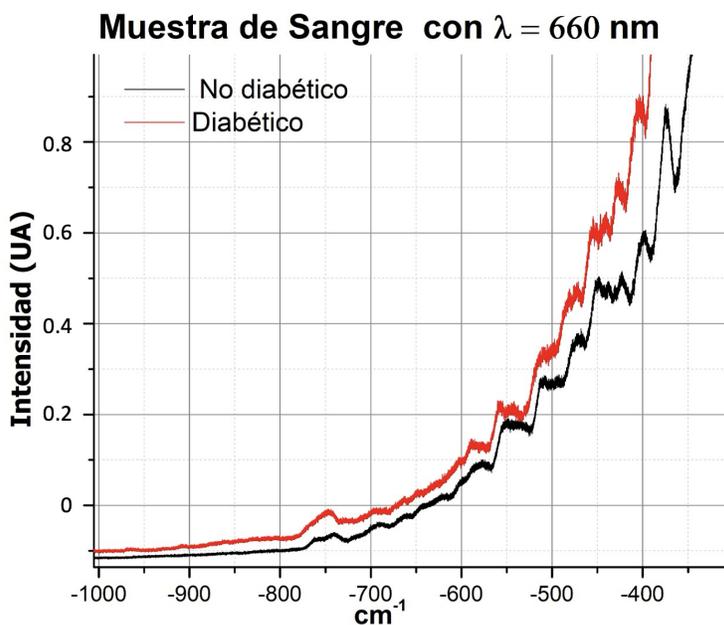


Figura 6.12: Raman en sangre completa, láser a 15 mW, $v = 0.025^\circ/\text{s}$

Se realizaron repeticiones consecutivas del Raman en glóbulos rojos bajo los mismos parámetros. Los resultados difieren entre ellos, sugiriendo que los glóbulos sufren de daño durante el proceso de medición.

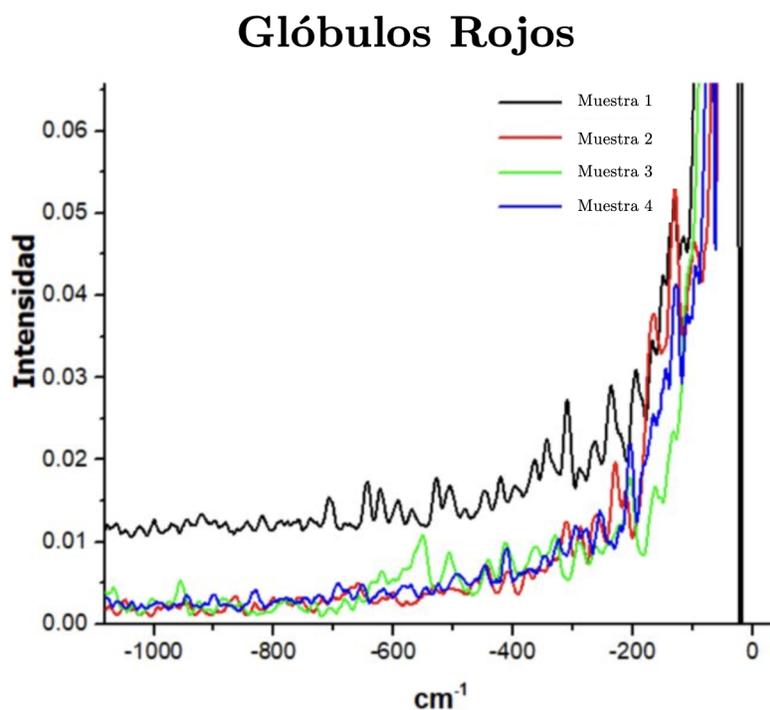


Figura 6.13: Raman en glóbulos rojos, láser a 15 mW, $\nu = 0.025^\circ/\text{s}$

A pesar de que las pruebas en material biológico no son reportables, el espectrómetro construido será útil para caracterizar otros compuestos mientras se adquiere un láser y, posiblemente, un detector de mayor rango espectral. Se consiguió desarrollar un instrumento de espectroscopía de alta precisión y confiabilidad, además de ser desmontable y de alineación accesible, a una fracción del costo de uno comercial.

Capítulo 7

Conclusiones

Armar un espectrómetro desde cero nos presentó la oportunidad de diseñar y adaptar el instrumento según necesidades específicas de una futura investigación con glóbulos rojos. Durante este trabajo se desarrollaron habilidades en las áreas de óptica, electrónica, programación y análisis de datos. El proceso de construcción y optimización de un espectrómetro Raman permite una comprensión exhaustiva del funcionamiento y los principios teóricos subyacentes tanto del instrumento como del fenómeno físico que es la dispersión Raman.

Los objetivos alcanzados durante este trabajo de investigación experimental se mencionan a continuación.

Se realizó el diseño de un espectrómetro tipo Czerny-Turner simétrico funcional para dos longitudes de onda diferentes, las especificaciones de cada uno se muestran a continuación.

De la primera fase de calibración, trabajando con 532 nm se llega a las siguientes conclusiones:

- Bajo la calibración de la primera versión del espectrómetro, se obtuvo una resolución experimental de orden de $9.0 \pm 0.1 \text{ cm}^{-1}$.

Especificaciones Espectrómetro I	
Longitud de onda	532 nm
Potencia Láser (máx)	500 mW
Rejilla de difracción	Holográfica. 50.0 mm x 50.0 mm x 9.5 mm
Líneas/mm	2400
Apertura (mín.)	30 mm
Rango Espectral	150 cm ⁻¹ - 4000 cm ⁻¹
Resolución	9 ± 1 cm ⁻¹ <

Especificaciones Espectrómetro II	
Longitud de onda	660 nm
Potencia Láser (Máx)	500 mW
Rejilla de difracción	Holográfica. 50.0 mm x 50.0 mm x 9.5 mm
Líneas/mm	1200
Apertura (mín.)	30 mm
Rango Espectral	200 cm ⁻¹ - 4000 cm ⁻¹
Resolución	19 ± 1 cm ⁻¹ <

- Se detectó la señal Raman anti-Stokes para los espectros del tetracloruro de carbono. Es común que la señal Raman anti-Stokes no se reporte, debido a que es más débil por su naturaleza que la señal Raman Stokes. Esto habla de una correcta alineación óptica y una buena optimización de la relación señal-ruido, pues ambas se requieren para obtener resultados como los presentados.

Se concluyó que el láser de 1064 nm que se pretendía utilizar en una primera instancia para la versión optimizada del sistema, no es idóneo para la obtención de espectros Raman, pues presenta dos modos longitudinales, no es altamente monocromático.

En una segunda fase del trabajo se calibró usando una fuente de excitación de 660 nm y durante esta fase se concluyó que:

- La técnica de detección sensitiva a la fase consigue reducir el ruido de la medición de espectros.

- Los resultados sugieren que todos los espectros deberán de suavizarse para lograr observar picos que de otra manera lo lograríamos apreciar.

Con la implementación de lentes parabólicos fuera de eje se logra corregir considerablemente el efecto de aberración esférica en el arreglo óptico del espectrómetro. El tamaño del Spot del láser varía con la longitud de onda: con longitudes de onda más pequeñas tenemos spots más pequeños y viceversa. Se tiene un régimen de apenas unos cientos de micras fuera de la posición del foco exacto donde no se muestran aberraciones en el spot del láser. En el primer orden de la rejilla de difracción (que es donde tomamos los espectros) se observa presencia de aberración comática y astigmatismo.

7.1. Perspectivas

Para que el espectrómetro pueda operar para su propósito original de estudiar muestras biológicas, bastará incorporar una nueva fuente de excitación y un detector que tenga la capacidad de abarcar un rango más amplio de longitudes de onda. La actualización de estos componentes ópticos maximizará la funcionalidad del instrumento. Con una fuente de excitación adecuada, el espectrómetro será capaz de interactuar con los glóbulos rojos sin producir mayor daño, cumpliendo con los objetivos de caracterización y análisis con los que fue diseñado.

Es por esto que se propone se implemente el uso de un tubo fotomultiplicador recientemente adquirido marca Hamamatsu, modelo R5108 que tiene una resolución espectral de hasta 1200 nm [8.10](#) y utilizar una fuente de excitación de 785 nm o mayor para disminuir el daño al realizar pruebas en células. Idealmente nos gustaría utilizar un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R5509-73; que es específico para trabajar en longitudes de onda por arriba de 1064 nm, sin embargo, no es posible debido a restricciones presupuestales [8.11](#). Una vez modificado el espectrómetro se deberá de repetir la calibración con tetracloruro de carbono, usando detección sensitiva a la fase. La última versión del dispositivo presentada en esta investigación tiene las dimensiones adecuadas para ser ensamblado sin problemas en el mismo espacio que las pinzas ópticas, su acoplamiento deberá tomar en cuenta la optimización en la captación de luz proveniente de las pinzas. Se espera que al unir ambos sistemas se puedan realizar estudios sistemáticos combinando ambas técnicas, dichos estudios permitirán caracterizar mecánica y molecularmente glóbulos rojos de personas sanas y diferenciarlos de aquellos pertenecientes a personas que padecen diabetes.

Capítulo 8

Apéndices

8.1. Apéndice A: Cálculo de resolución teórica

Variable	Valor	Unidades
Longitud de onda de excitación	$\lambda_1 = 532$ $\lambda_2 = 660$ $\lambda_3 = 1064$	nm
Distancia focal	$f_1 = 375$ $f_2 = 646$	mm
Orden de la rejilla	m=1	-
Ángulo de difracción	$\theta_r = 30$	grados (°)
Distancia entre líneas	$d_1 = 416.67$ $d_2 = 816.67$	nm
Tamaño de rendija	$w_1 = 50$ $w_2 = 40$ $w_3 = 30$	μm

Tabla de valores relevantes para llevar a cabo el cálculo de la resolución teórica del espectrómetro.

```

import math
import itertools
#Variables
Long_onda =[532.0, 660.0, 1064.0]      #Longitud de onda (nm)
Foco = [3.75e8, 6.47e8]                #Foco de los espejos (nm)
D_lineas = [416.67, 833.67]           #Espacio entre lineas (nm)
W_slit = [5.0e4, 4.0e4, 3.0e4]        #Apertura de rendija
m = 1.0                                #Orden de dispersion
Angulo_r = 30.0                        #Angulo de difraccion

for a in Long_onda:
    for b in Foco:
        for c in D_lineas:
            for d in W_slit:
                Disp_linealr = ((c*math.cos(math.radians(Angulo_r)))
                                / (b*m))*d
                Disp_linealr_cm = Disp_linealr * 1.0e-7
                LongOnd_cm = a*1e-7
print (f"Para:L.o={a}nm,Foco={b}nm,
d={c}nm,w={d}nm,resolucion:{Resolucion}")

```

```

Para: L.o.=532.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 1.6999585665049002
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 1.35996685320392
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 1.01997513990294
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 3.40126348942362
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 2.721010791538896
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 2.0407580936541723
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 0.985292832209177
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 0.7882342657673416
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 0.5911756993255061
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 1.9713660100986978
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 1.5770928080789584
Para: L.o.=532.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 1.1828196060592187
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 1.1045203703546442
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 0.8836162962837153
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 0.6627122222127865
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 2.2099155138444235
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 1.7679324110755388
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 1.3259493083066543
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 0.6401779580880858
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 0.5121423664704686
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 0.38410677485285144
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 1.228062933062842
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 1.0246903464502737
Para: L.o.=660.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 0.7685177598377053
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 0.42498964162622505
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 0.33999171330098
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=416.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 0.254993784975735
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 0.850315872355905
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 0.680252697884724
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=375000000.0 nm, d=833.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 0.5101895234135431
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 0.24632320805229424
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 0.1970585664418354
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=416.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 0.14779392483137652
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =50000.0 nm, resolucion: 0.49284150252467446
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =40000.0 nm, resolucion: 0.3942732020197396
Para: L.o.=1064.0 nm, Foco=647000000.0 nm, d=833.67 nm, w =30000.0 nm, resolucion: 0.29570490151480466

```

8.2. Apéndice B: Detalles técnicos: Elementos Ópticos

En este apéndice profundizamos en las características de los elementos ópticos que empleamos en el armado del espectrómetro Czerny-Turner.

8.2.1. Espejos



Figura 8.1: Espejo parabólico fuera de eje modelo MPD2151-P01

A continuación se muestra la gráfica del porcentaje de reflectancia de nuestros espejos parabólicos en comparación con otros con un recubrimientos diferentes. Como se muestra (verde) el recubrimiento de plata nos brinda una reflectancia para la longitud de onda usada 532 nm de cerca del 100 %

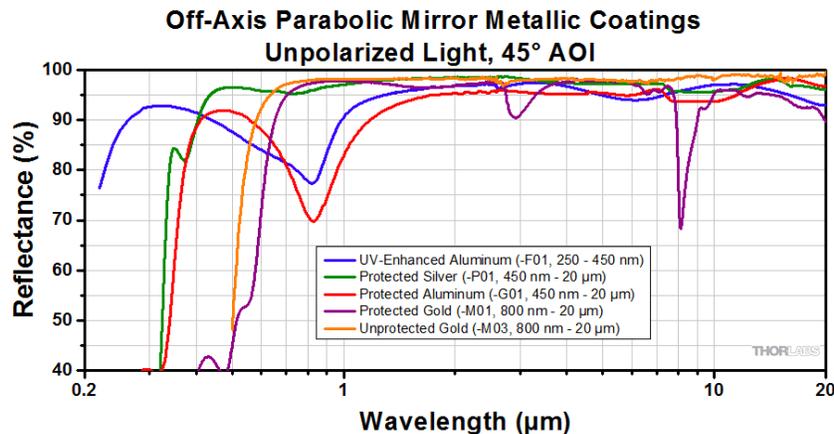


Figura 8.2: Gráfica de reflectancia de espejos parabólicos con recubrimientos metálicos

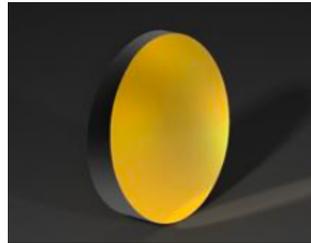


Figura 8.3: Espejo parabólico fuera de eje modelo: EFL 15° Bare Gold 100Å
Off-Axis Parabolic Mirror

Al igual que los espejos con recubrimiento de plata, estos se encuentran 15° fuera de eje, son utilizados para longitudes de onda que van desde los 500 hasta los 12000 nm y tienen un diámetro de $76,20 \pm 0,38$ mm. Este modelo de espejos nos ofrece una reflectividad mayor al 97% para longitudes de onda de entre 700 y 800 nm.

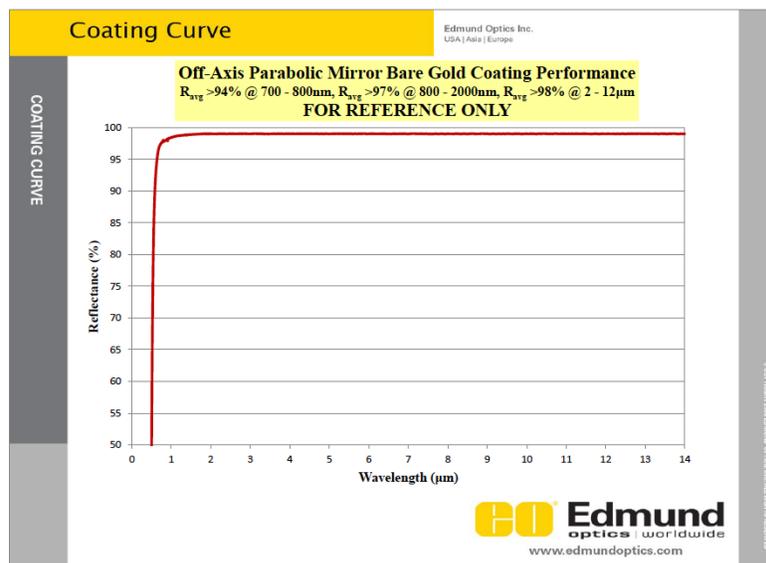


Figura 8.4: Curva de reflectancia de espejos parabólicos con recubrimiento de oro

8.2.2. Rejilla de difracción



Figura 8.5: Rejilla holográfica reflectante en el espectro visible Thorlabs modelo GH50-24V

A continuación se muestra la gráfica de la eficiencia de la rejilla proporcionada por el fabricante, como podemos notar al trabajar con una longitud de onda de 532 nm obtenemos una eficiencia absoluta promedio de 60% .

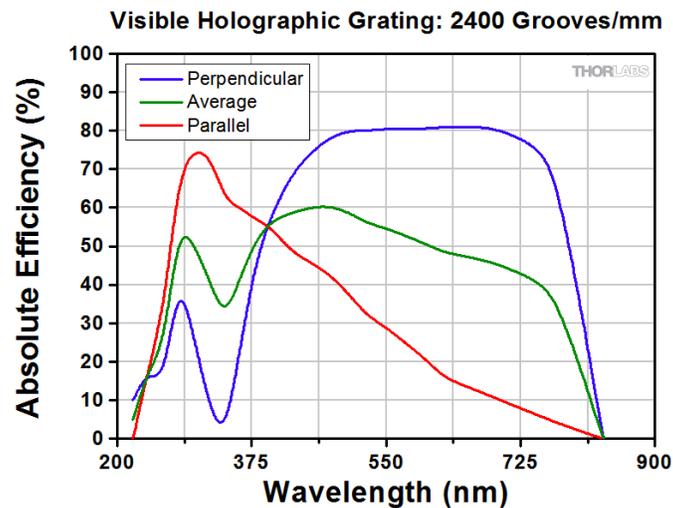


Figura 8.6: Gráfica de la eficiencia absoluta de la rejilla holográfica 2400 líneas para el visible (longitudes de onda de entre 200 y 900 nm).

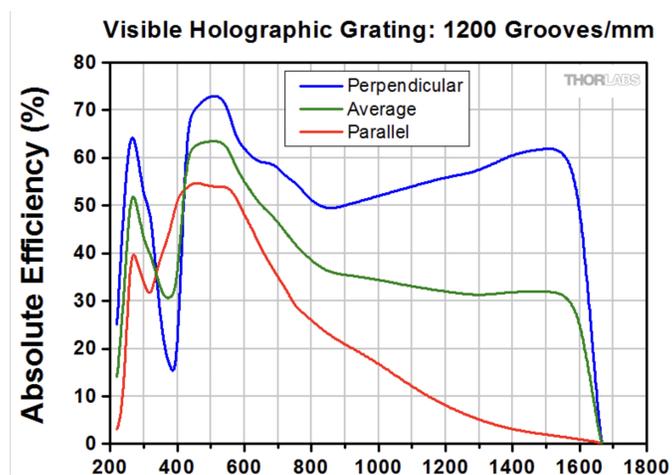


Figura 8.7: Gráfica de la eficiencia absoluta de la rejilla holográfica modelo GH50-27V de 1200 líneas (para longitudes de onda de entre 200 y 1600 nm).

8.2.3. Montura de rotación

Para controlar el movimiento de la rejilla de difracción se utilizó una montura PRM1Z8 de Thorlabs con una capacidad máxima de giro de $25^\circ/s$ y mínima de 25 segundos de arco. Con un porcentaje de error del 0.1 % es una herramienta que nos permitirá mediciones de alta precisión.



Figura 8.8: Montura motorizada de alta precisión continua a $360^\circ/s$ (PRM1Z8)

8.2.4. Tubo fotomultiplicador

Tubo fotomultiplicador Hamamatsu R12896

El detector de nuestra elección fue un tubo fotomultiplicador cuya longitud de onda de máxima respuesta es de 450 nm y su respuesta espectral va desde los 160 hasta los 900 nm. La foto así como su curva de eficiencia se muestran a continuación.

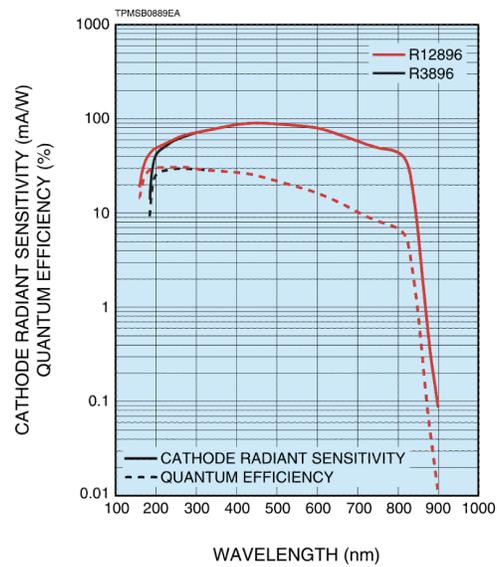


Figura 8.9: Curva de eficiencia: tubo fotomultiplicador Hamamatsu R12896

Tubo fotomultiplicador Hamamatsu R5108

Detector que se propone usar y se menciona en la sección de perspectivas.

SPECIFICATIONS

GENERAL

Parameter	Description / Value	Unit
Spectral response	400 to 1200	nm
Wavelength of maximum response	800	nm
Photocathode	Material	Ag-O-Cs
	Minimum effective area (H x W)	16 x 18
Window material	Borosilicate glass	—
Dynode	Structure	Circular-cage
	Number of stages	9
Direct interelectrode capacitances	Anode to last dynode	4 pF
	Anode to all other electrodes	6 pF
Base	11-pin base	—
Weight	Approx. 40.5	g
Operating ambient temperature	-30 to +50	°C
Storage temperature	-30 to +50	°C
Suitable socket	E678-11A (sold separately)	—
Applicable socket assembly	E717-63 (sold separately)	—

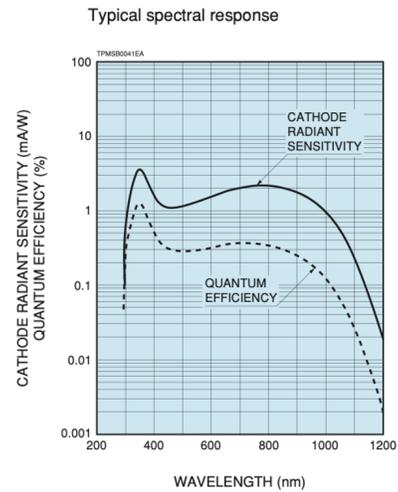


Figura 8.10: Izquierda : Especificaciones. Derecha: Curva de eficiencia tubo fotomultiplicador Hamamatsu R5108

Tubo fotomultiplicador Hamamatsu R5509-73

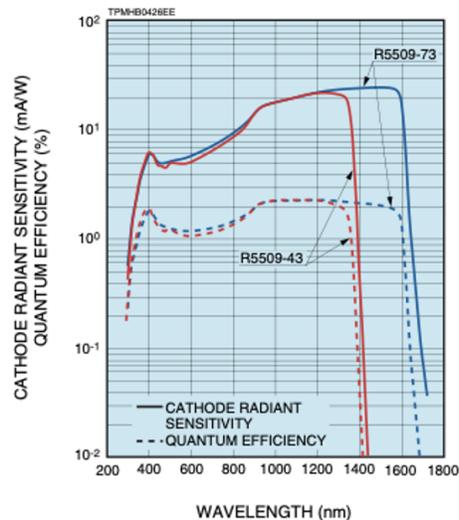
Tubo fotomultiplicador ideal para obtención de espectros Raman de glóbulos rojos.

SPECIFICATIONS

●GENERAL

Parameter		R5509-43	R5509-73	Unit
Spectral response		300 to 1400	300 to 1700	nm
Photocathode	Material	InP / InGaAsP		—
	Minimum effective area	3 × 8		mm
Window	Material	Borosilicate glass		—
	Secondary emitting surface	Cu-BeO		—
Dynode	Structure	Line focused		—
	Number of stage	10		—
Socket		C9940-01, -02		—
Operating temperature		-90 to -70		°C
Recommended operating temperature		-80		°C
Storage temperature		-90 to +50		°C

●Spectral response



* Spectral response characteristics when used with the dedicated cooler

Figura 8.11: Especificaciones y curva de eficiencia.

8.3. Apéndice C: Código para obtención de espectros

```

import math
import pandas as pd
import datetime

#Variables iniciales

m = 1.0 #Orden de dispersion
d = 2500.0/3.0 #Espacio entre lineas
l_laser = 660.0 #Longitud de onda laser
Ang_max = 360.0 - 335.45 #Angulo del laser
Ang_in = 360.0 - 333.0 #Angulo inicio
vel = math.radians(0.0025) #Velocidad de barrido
f = 5.85e8 #Focod del lente
Width = 30000 #Slit de salida

#Variables resultantes

G = ( (m * l_laser ) / d )
A = math.sin( math.radians(Ang_max + 15.0) )
R = math.asin(G - A)
Dv = math.radians(Ang_max + 15.0) - R
N = (d/f)
NW = N*Width
Resolucion = ((d)/f)*Width
ResCm = 1/NW
#Obtenemos algunos valores para verificarlos
print(G, A, R, Dv,N,NW,ResCm)

fecha = datetime.datetime.now()
fecha_f = fecha.strftime("%d-%m-%Y")

```

```
#Extraer los datos
tiempo = pd.read_csv("tiempo.txt", sep="\t", header=2)
t = tiempo['time(seconds)']
theta = math.radians(Ang_in) - (t * vel)
incidencia = math.radians(15.0) + theta
rejilla = -Dv + incidencia
longitud = d * ( rejilla.apply(math.sin) + incidencia.apply(math.sin) )
longitud_laser = 1e7 / l_laser
cm = 1e7 / longitud

for i in [1,2,3,4,5]:
    voltage = pd.read_csv(f"{i}.csv", sep=",", header=6)
    vol = voltage['A']

datos_finales = pd.DataFrame({'lambda':cm, 'voltaje':vol, 'lambda_rel':...})
datos_finales.to_csv(f'{{fecha_f}}-{{i}}.csv')
```

8.4. Apéndice D: Tamaño de Spot del láser

A continuación se hace el despliegue de todas las imágenes obtenidas para hacer la comparación entre el uso de espejos parabólicos fuera de eje y espejos esféricos. Cada una de las imágenes cuenta con dos perfiles de intensidades; en el eje horizontal y en vertical. Al ajustarles una curva Gaussiana obtuvimos el valor de la anchura a media altura de los picos de emisión, que corresponde al valor del tamaño del spot del láser en esa dirección.

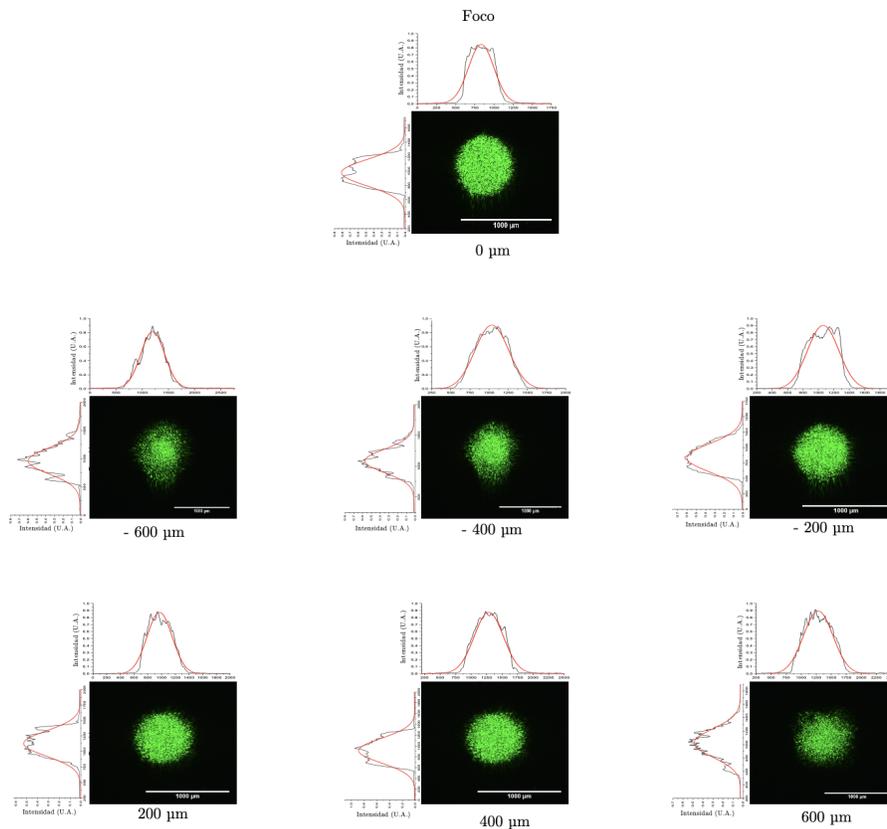


Figura 8.12: Spot del láser para una longitud de onda de 532 nm, $m=0$, espejos parabólicos.

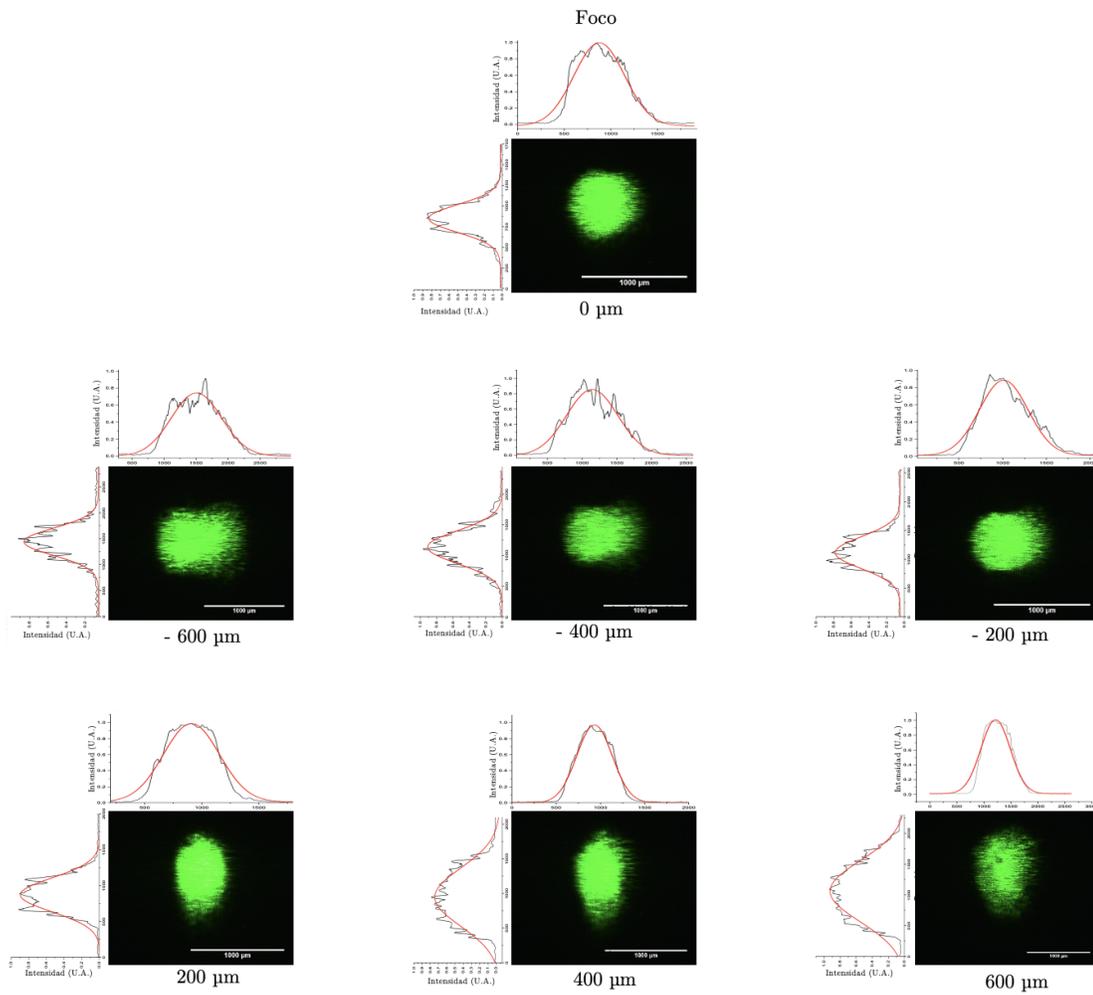


Figura 8.13: Spot del láser para una longitud de onda de 532 nm, $m=1$, espejos parabólicos.

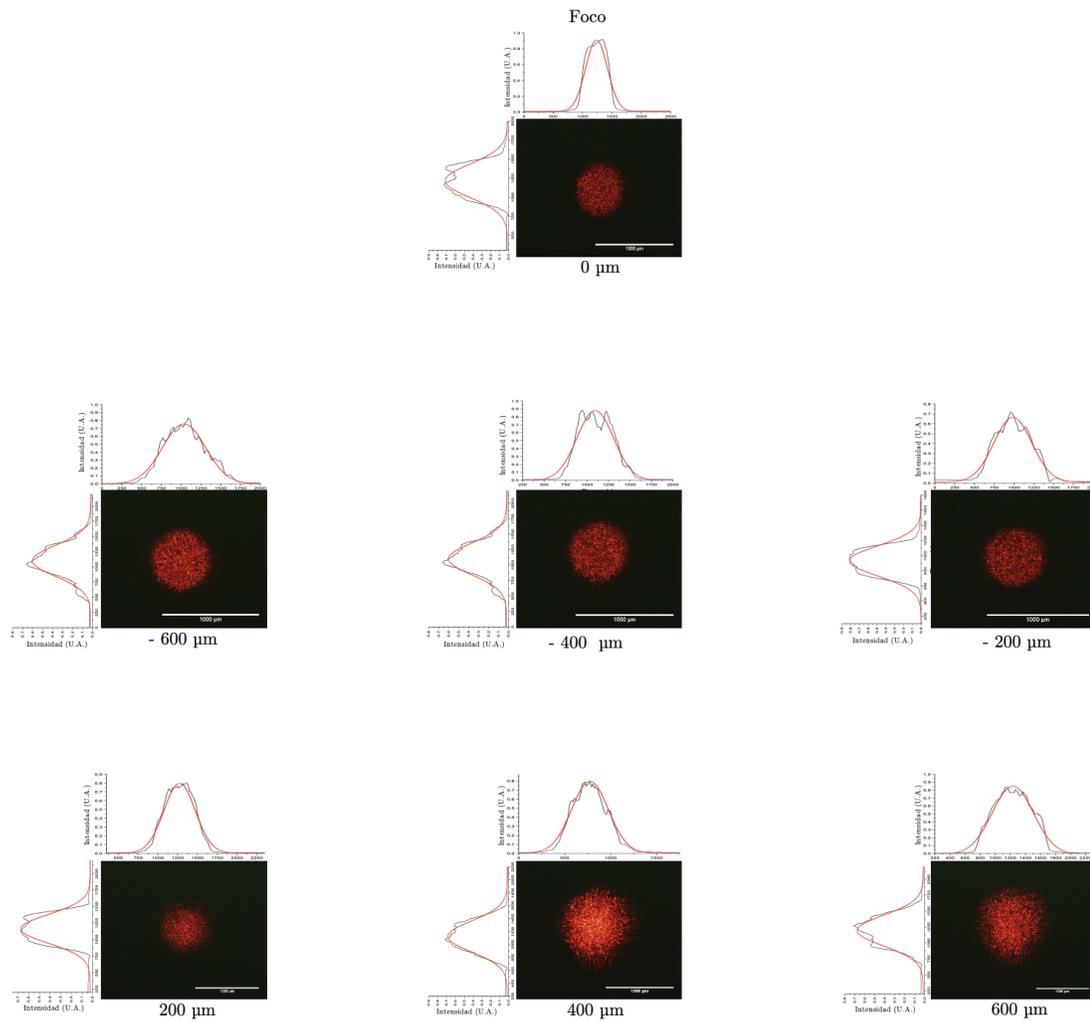


Figura 8.14: Spot del láser para una longitud de onda de 660 nm, $m=0$, espejos parabólicos.

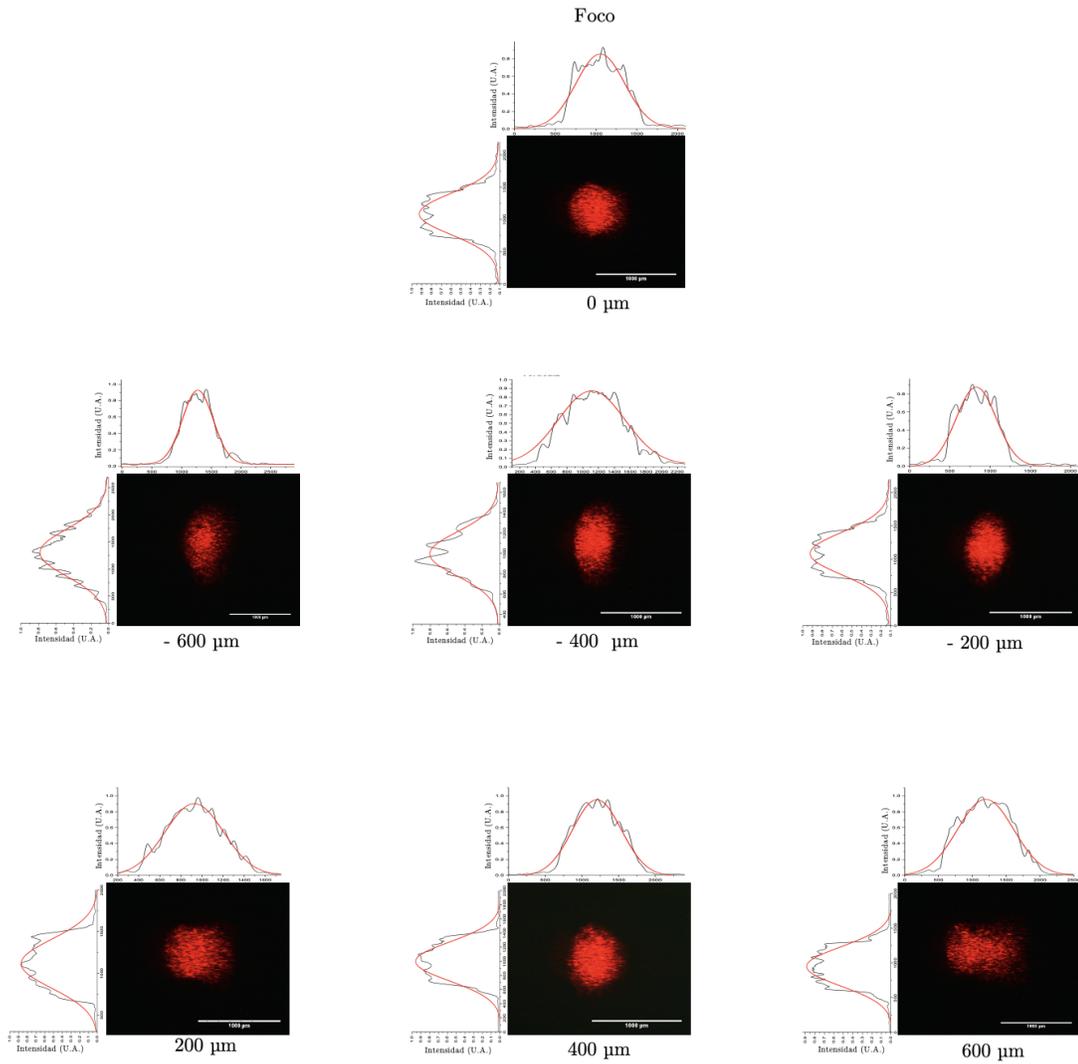


Figura 8.15: Spot del láser para una longitud de onda de 660 nm, $m=1$, espejos parabólicos.

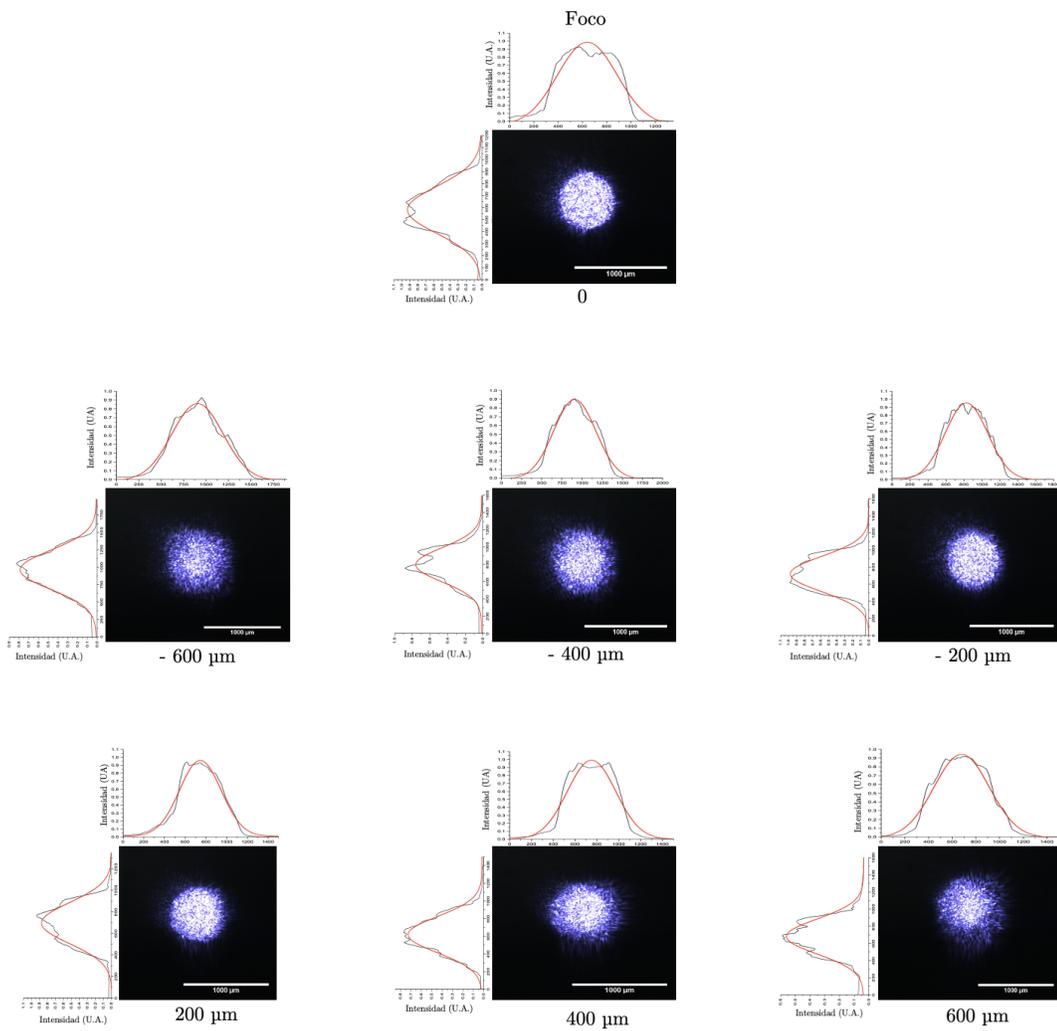


Figura 8.16: Spot del láser para una longitud de onda de 1064 nm, $m = 0$, espejos parabólicos.

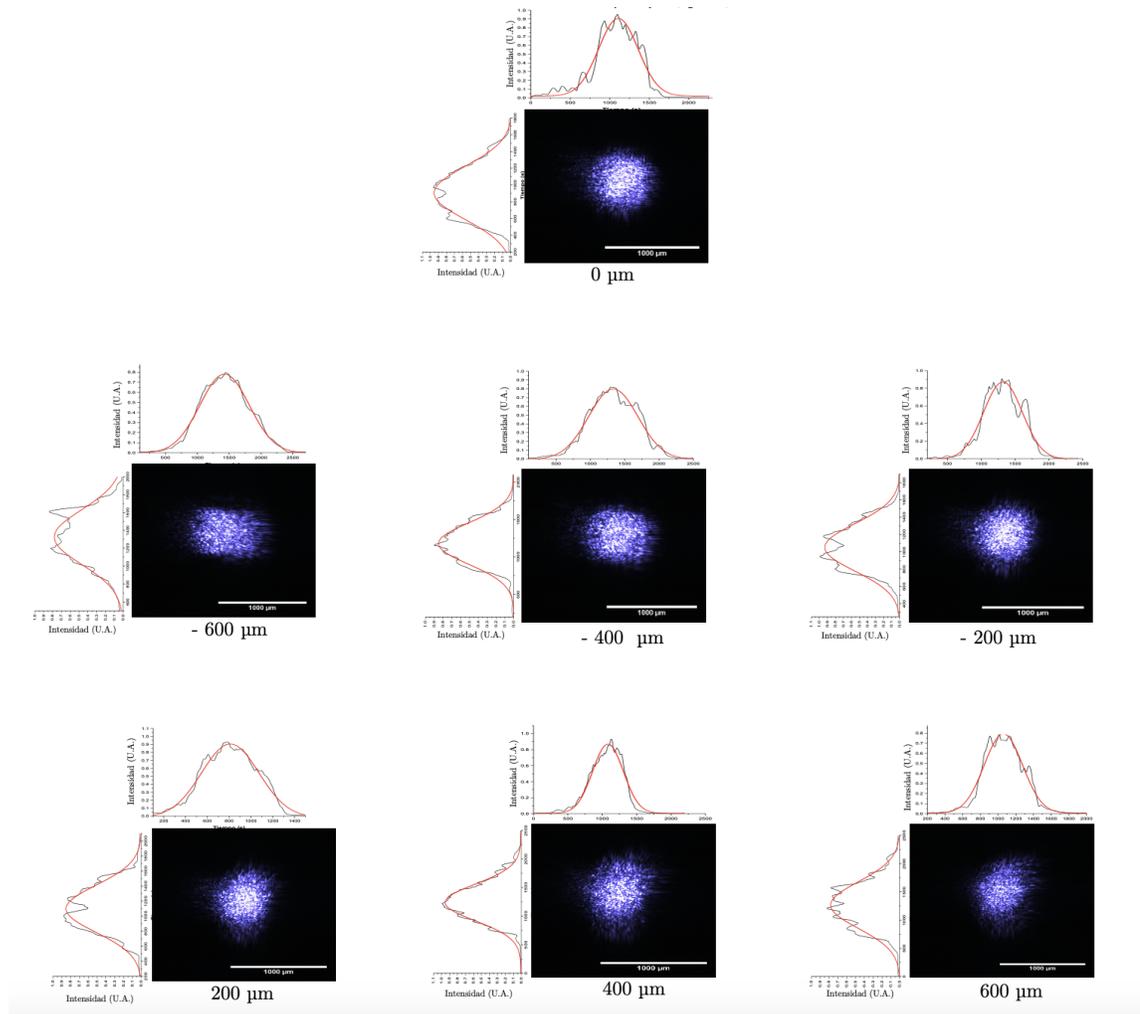


Figura 8.17: Spot del láser para una longitud de onda de 1064 nm, $m=1$, espejos parabólicos.

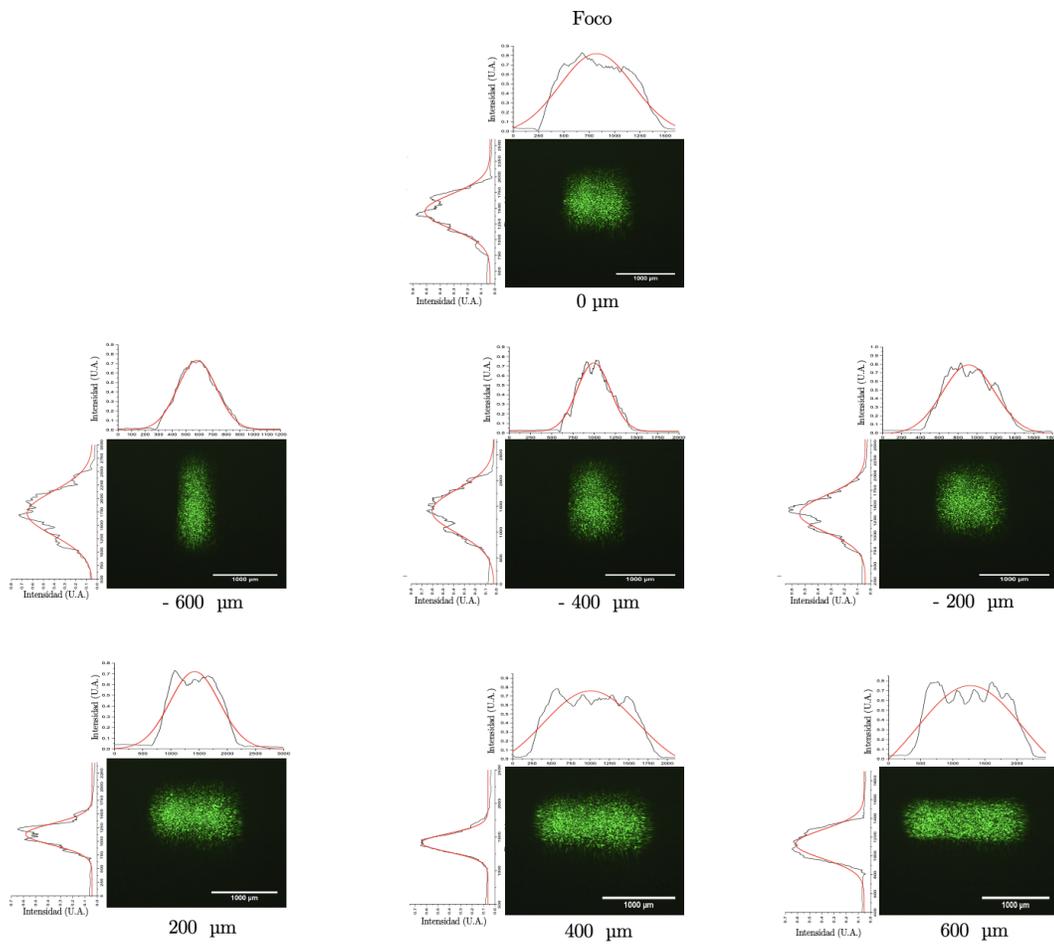


Figura 8.18: Spot del láser para una longitud de onda de 532 nm, $m=0$, espejo esférico.

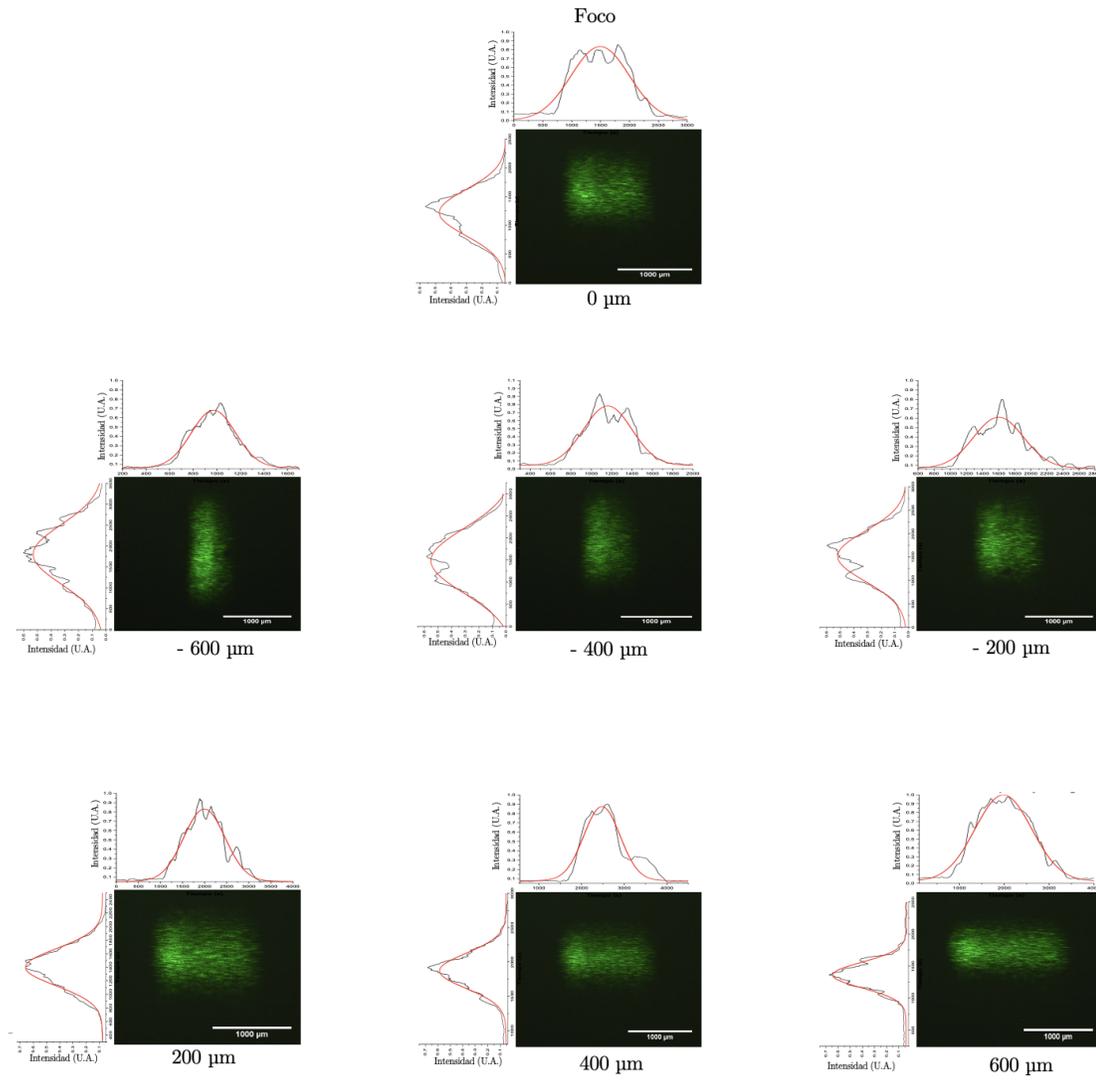


Figura 8.19: Spot del láser para una longitud de onda de 532 nm, $m=1$, espejo esférico.

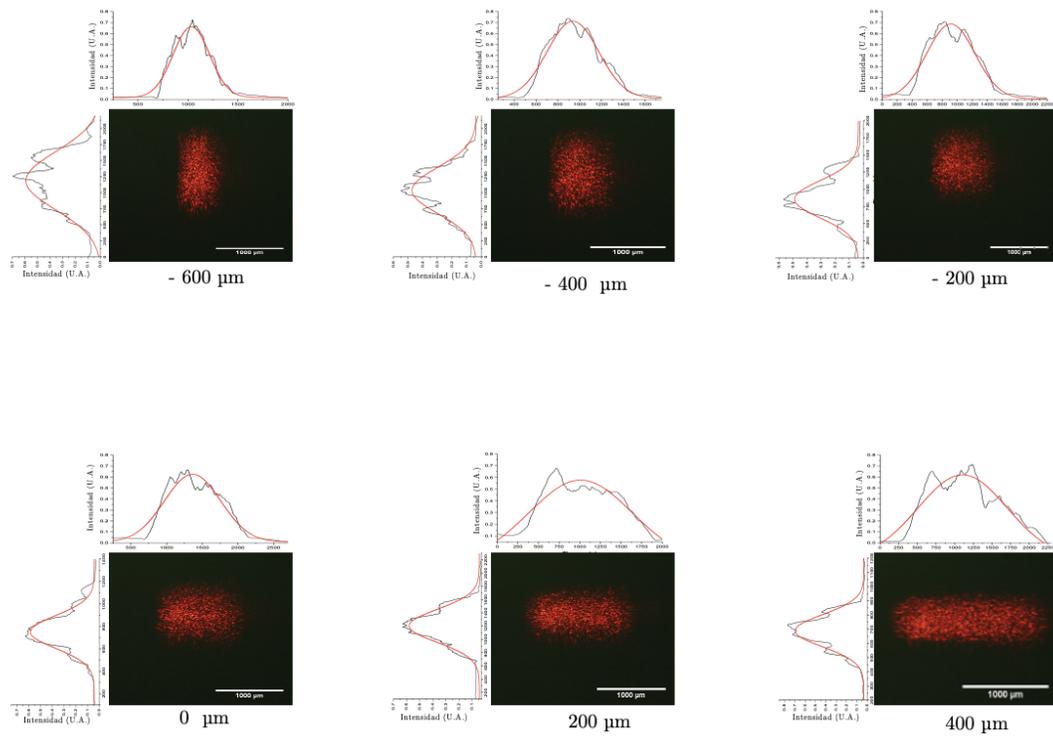


Figura 8.20: Spot del láser para una longitud de onda de 660 nm, $m=0$, espejo esférico.

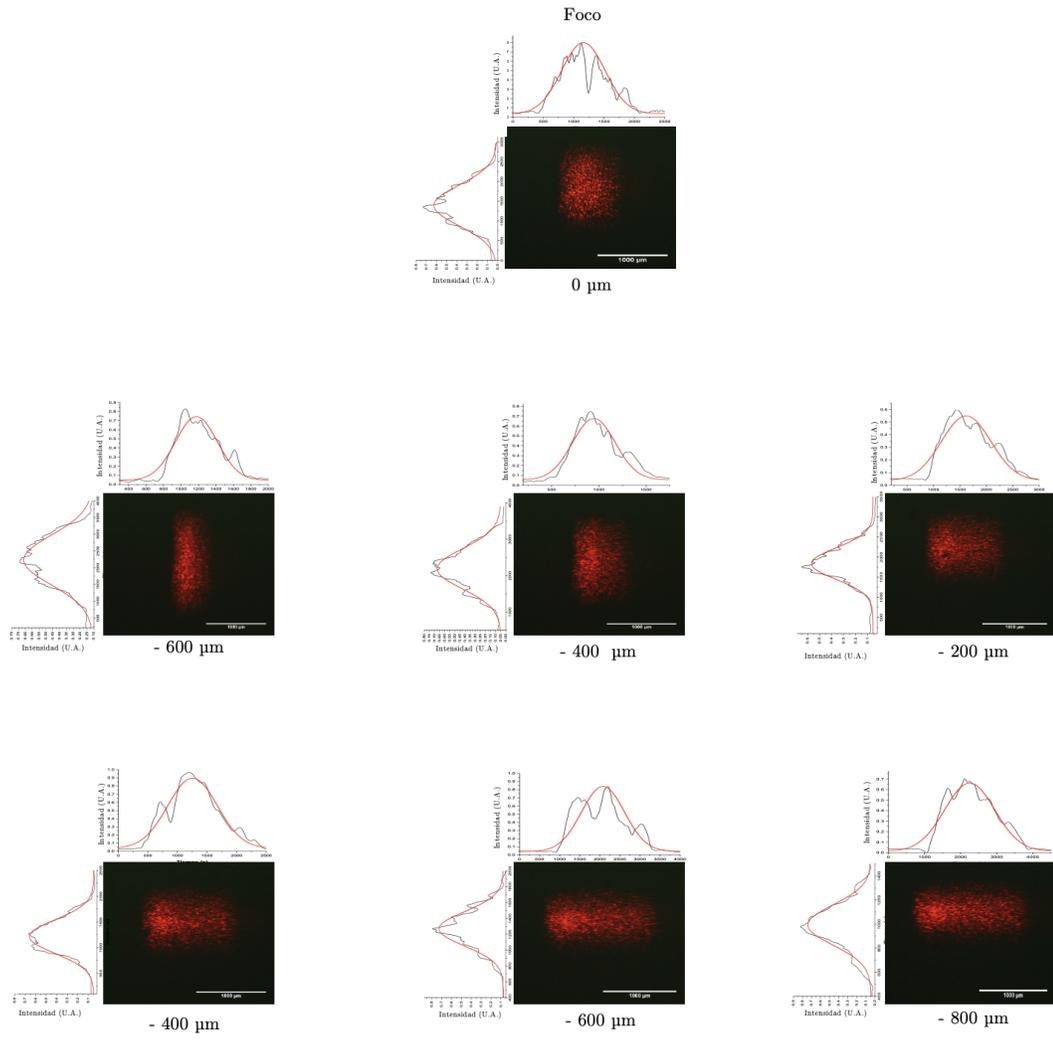


Figura 8.21: Spot del láser para una longitud de onda de 660 nm, $m=1$, espejo esférico.

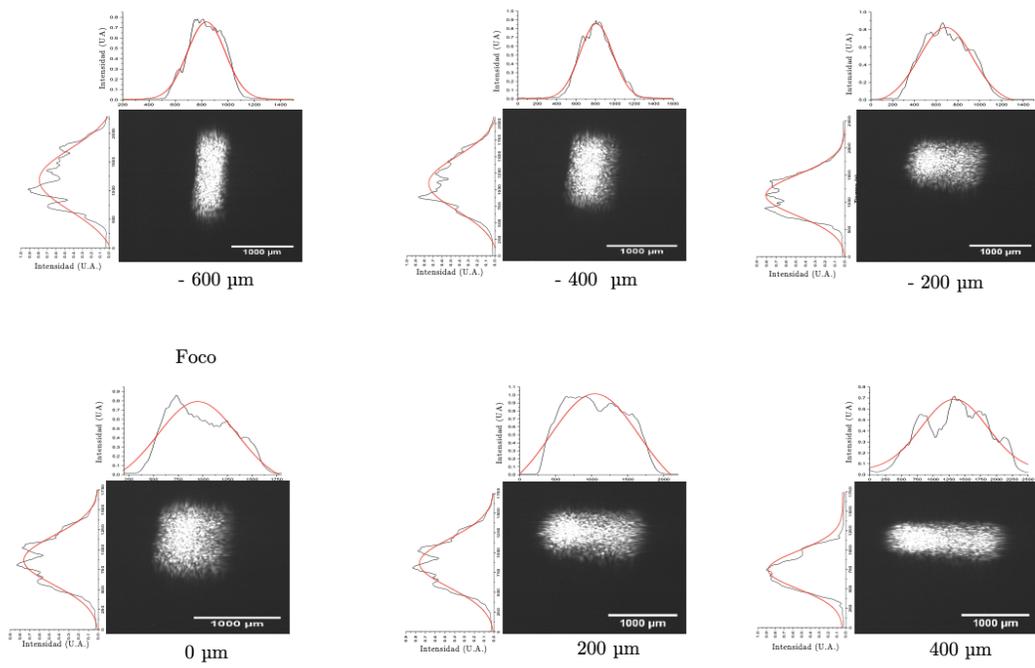


Figura 8.22: Spot del láser para una longitud de onda de 1064 nm, $m=0$, espejo esférico.

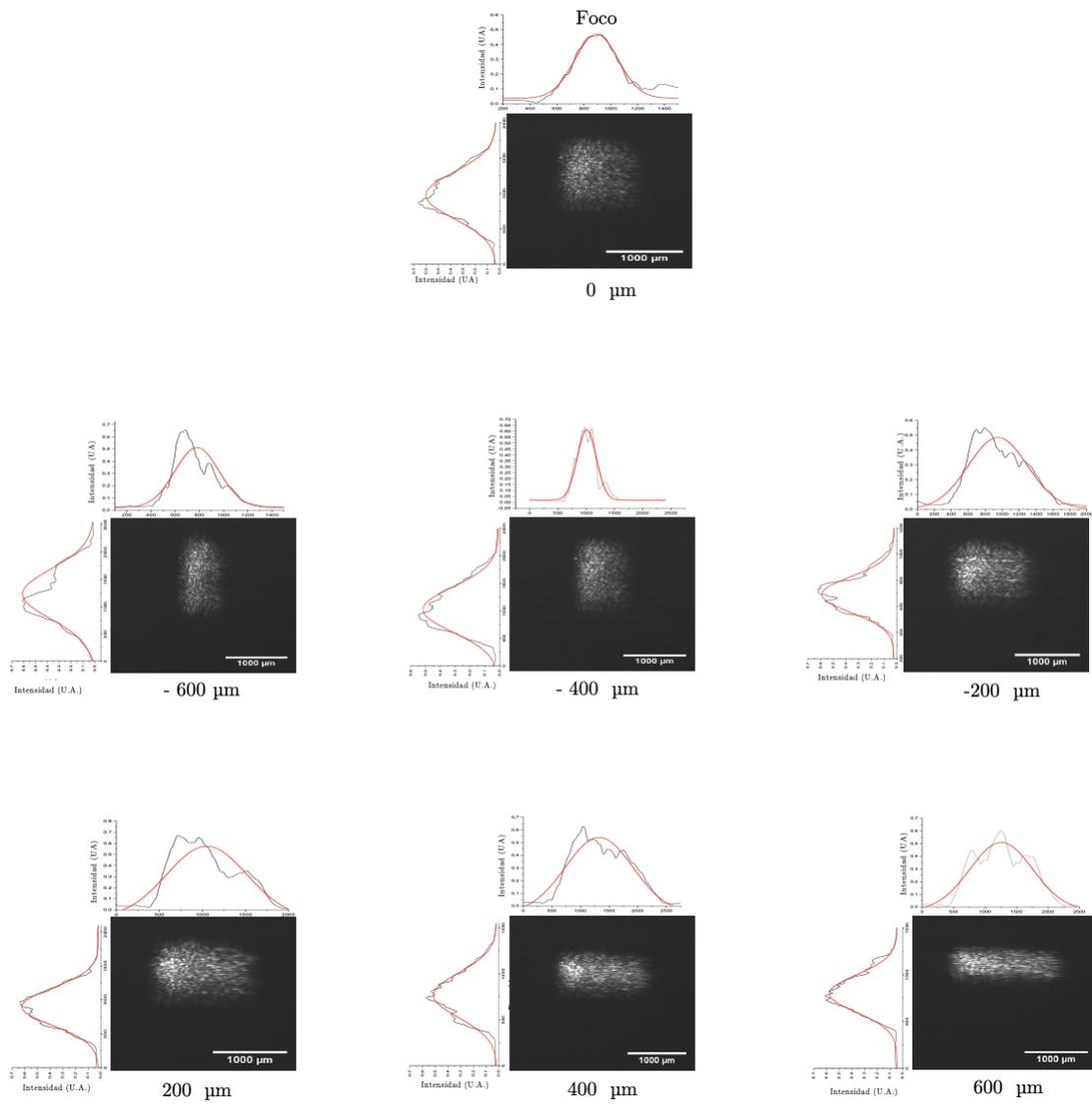


Figura 8.23: Spot del láser para una longitud de onda de 1064 nm, $m=1$, espejo esférico.

Capítulo 9

Bibliografía

- ¹H. Mitsutake y M. C. Breitreitz, «Raman imaging spectroscopy: history, fundamentals and current scenario of the technique», *Journal of the Brazilian Chemical Society*, [10.21577/0103-5053.20190116](#) (2019).
- ²J. Dybas, F. C. Alcicek, A. Wajda, M. Kaczmarska, A. Zimna, K. Bulat, A. Blat, T. Stepanenko, T. Mohaissen, E. Szczesny-Malysiak, D. Perez-Guaita, B. R. Wood y K. M. Marzec, «Trends in biomedical analysis of red blood cells – Raman spectroscopy against other spectroscopic, microscopic and classical techniques», *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **146**, 116481 (2022).
- ³C. G. Atkins, K. Buckley, M. W. Blades y R. F. Turner, «Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components», *Applied Spectroscopy* **71**, 767-793 (2017).
- ⁴J. L. González-Solís, J. R. Villafan-Bernal, B. E. Martínez-Zérega y S. Sánchez-Enríquez, «Type 2 diabetes detection based on serum sample Raman spectroscopy», *Lasers in Medical Science* **33**, 1791-1797 (2018).
- ⁵T. Sakurai, H. Takahashi y S. Tsuchiya, «New fluorescence of nonenzymatically glucosylated human serum albumin», *FEBS Letters* **176**, 27-31 (1984).
- ⁶J. H. A. M. Barrios, «Revisión bibliográfica de espectroscopia Raman en glóbulos rojos, así como el análisis y comparación de espectros Raman de sangre en individuos sanos y diabéticos», (2021).

- ⁷N. M. Alba, «Deformación de la membrana celular asistida por pinzas ópticas: evaluación de la elasticidad de eritrocitos en individuos diabéticos», Tesis doct. (Universidad Autónoma Metropolitana, 2020).
- ⁸G.M.Barrow, *Introduction to Molecular Spectroscopy*, 1.^a ed. (McGram Hill, Tokio, Japon, 1962).
- ⁹C. W. B. John R. Ferraro Kazuo Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*, 2.^a ed. (Academic Press, 2003).
- ¹⁰M. Weichman, *Vibrations of Polyatomic Molecules*, Class Notes, Princeton University, 2022.
- ¹¹C. Palmer, *L^AT_EX: Diffraction Grating Handbook*, 8.^a ed. (MKS Instruments, New York, 2020).
- ¹²P. (J. Larkin, «Infrared and Raman spectroscopy : principles and spectral interpretation»,
- ¹³G. D. Ewen Smith, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, 1.^a ed. (WILEY, England, 2005).
- ¹⁴K. S. K. C. V. Raman, «A New Type of Secondary Radiation», *Nature* **121** (1928).
- ¹⁵A. K. Adya y E. Canetta, *Nanotechnology and its applications to animal biotechnology* (Elsevier, ene. de 2020), págs. 309-326.
- ¹⁶L. Lamport, *RAM Raman Effect*, 2.^a ed. (University of Toronto, Toronto, Cánada, 2020).
- ¹⁷C. Raman, «The Raman effect Investigation of molecular structure by light scattering», Royal Society of Chemistry (1929).
- ¹⁸R. Loudon, *The Quantum Theory of Light* (Oxford University Press, 2001).
- ¹⁹C. R. Orza, *Dinámica Vibracional del CCL₄* (Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 1994).
- ²⁰C. R. ORZA, *L^AT_EX: DINÁMICA VIBRACIONAL DEL CC1₄*, 2.^a ed. (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Madrid, 1994).
- ²¹R. Liu, Z. Mao, D. L. Matthews, C.-S. Li, J. W. Chan y N. Satake, «Novel single-cell functional analysis of red blood cells using laser tweezers Raman spectroscopy: Application for sickle cell disease», *Experimental Hematology* **41**, 656-661.e1 (2013).

- ²²L. Wang, G. Liu, X. Mu, H.-B. Xiao, C. Qi, S.-Q. Zhang, W.-Y. Niu, G.-K. Jiang, Y.-N. Feng y J.-Q. Bian, «Red Blood Cells Raman Spectroscopy Comparison of Type Two Diabetes Patients and Rats», [Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu](#) **35**, 2776-2780 (2015).
- ²³N. Li, H. Zang, H. Sun, X. Jiao, K. Wang, T. C. Y. Liu e Y. Meng, «A noninvasive accurate measurement of blood glucose levels with Raman spectroscopy of blood in microvessels», [Molecules](#) **24**, 10.3390/molecules24081500 (2019).
- ²⁴J. Lin, L. Shao, S. Qiu, X. Huang, M. Liu, Z. Zheng, D. Lin, Y. Xu, Z. Li, Y. Lin, R. Chen y S. Feng, «Application of a near-infrared laser tweezers Raman spectroscopy system for label-free analysis and differentiation of diabetic red blood cells», [Biomedical Optics Express](#) **9**, 984 (2018).
- ²⁵K. D. Woei Ming Lee Peter J Reece Robert F Marchington Nikolaus K Metzger, «Construction and calibration of an optical trap on a fluorescence optical microscope», [Nature Protocols](#) **72**, 3226-3238 (2007).
- ²⁶A. Bankapur, E. Zachariah, S. Chidangil, M. Valiathan y D. Mathur, «Raman tweezers spectroscopy of live, single red and white blood cells», [PloS one](#) **5**, 10.1371/JOURNAL.PONE.0010427 (2010).
- ²⁷R. R. Brau, J. M. Ferrer, H. Lee, C. E. Castro, B. K. Tam, P. B. Tarsa, P. Matsudaira, M. C. Boyce, R. D. Kamm y M. J. Lang, «Passive and active microrheology with optical tweezers», [Journal of Optics A: Pure and Applied Optics](#) **9**, S103 (2007).
- ²⁸Y. Shen, D. A. Weitz, N. R. Forde y M. Shayegan, «Line optical tweezers as controllable micromachines: techniques and emerging trends», [Soft Matter](#) **18**, 5359-5365 (2022).
- ²⁹T. Jähnke y P. Rauch, «Optical tweezers for single-cell, multicellular investigations in the life sciences», **47** (2015).
- ³⁰H. J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N. J. Fullwood, B. Gardner, P. L. Martin-Hirsch, M. J. Walsh, M. R. McAinsh, N. Stone y F. L. Martin, «Using Raman spectroscopy to characterize biological materials», [Nature Protocols](#) **11**, 664-687 (2016).
- ³¹A. Ashkin, «Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime», [Biophys. J.](#) **61**, 569-582 (1992).

- ³²H. Oertel, *Essentials of Fluid Mechanics*, 2.^a ed. (Springer, New York, 2004).
- ³³A. C. D. Luca, *Phase-sensitive detection in Raman Tweezers: biological applications*, 2.^a ed. (UNIVERSITÀ DI NAPOLI FEDERICO II Dipartimento di Scienze Fisiche, Italy, 2008).
- ³⁴J. P. S. d. L. J. A. H. Hwang A. Byun, «Optical tweezers throw and catch single atoms», <https://doi.org/10.48550/arXiv.2212.01037> (2022).
- ³⁵G. Roosen y C. Imbert, «Optical levitation by means of two horizontal laser beams: A theoretical and experimental study», *Physics Letters A* **59**, 6-8 (1976).
- ³⁶N. M. Alba, «Construcción y calibración de un sistema de pinzas ópticas», Tesis doct. (Universidad Autónoma Metropolitana, 2014).
- ³⁷O. M. M. G. V. Giuseppe Pesce Philip H. Jones, «Optical tweezers: theory and practice», *The European Physical Journal Plus* volume **135**, <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-020-00843-5> (2020).
- ³⁸A. S. P.B Ermolinskiy A.E. Luugovtsov, «Red blood cell in the field of a beam of Optical tweezers», *Quantum Electronics* **52**, 22-27 (2022).
- ³⁹Bustamante, «Optical tweezers in single-molecule biophysics», *Nature*, **10**. [1038/s43586-021-00021-6](https://doi.org/10.1038/s43586-021-00021-6) (2021).
- ⁴⁰M. Czerny y A. F. Turner, «Über den Astigmatismus bei Spiegelspektrometern», *Zeitschrift für Physik* **61**, 792-797 (1930).
- ⁴¹C. M. O. J. Castro R. A. E. Villanueva L., «Espectroscopia Raman y sus aplicaciones», *ÓPTICA PURA Y APLICADA* (2013).
- ⁴²H. P. K. E. Committe, *Photomultiplier Tubes: Basics and Applications* (Hamamatsu Photonics K.K, 2017).
- ⁴³P. C.D.Hobbs, *Building Electro-Optical Systems: Making it All Work*, 2.^a ed. (John Wiley y Sons, Inc., United States, 2000).
- ⁴⁴H. Mohammadi y E. Eslami, «Investigation of spectral resolution in a Czerny Turner spectrograph», *Instruments and Experimental Techniques* **2010 53:4 53**, 549-552 (2010).
- ⁴⁵A. L. R. Yu. V. Sheldakova y A. V. Kudryashov, «Off-axis parabolic mirrors: A method of adjusting them and of measuring and correcting their aberrations», *Journal of Optical Technology* **72**, 20-27 (2005).

- ⁴⁶O. Svelto, *Principles of Lasers*, 5.^a ed. (Springer, Italia, 2016).
- ⁴⁷E. Hecht, *Óptica*, 5.^a ed. (Pearson, Inglaterra, 2016).
- ⁴⁸J. S. P. E. L. Corregidor, «Análisis de una cavidad Fabry-Perot en sensores ópticos basados en redes de difracción de Bragg», Tesis doct. (Universidad Distrital Francisco José De Caldas Facultad de Ingeniería, 2018).
- ⁴⁹W. Demtröder, *Laser Spectroscopy: Basic Principles*, 4.^a ed. (Springer, Alemania, 2008).
- ⁵⁰G. B. Armen, *Phase sensitive detection: the lock-in amplifier* (Department of Physics y Astronomy 401 Nielsen Physics Building The University of Tennessee Knoxville, Tennessee, 2008).
- ⁵¹J. E. Greivenkamp, *Field Guide to Geometrical Optics* (SPIE-The International Society for Optical Engineering, 2004).
- ⁵²A. Marzoa, «Aberraciones ópticas I: La aberración esférica.», *Astronomía* **255**, 24-31 (2020).
- ⁵³T. S. Tkaczyk, *Field Guide to Microscopy* (SPIE-The International Society for Optical Engineering, 2010).
- ⁵⁴Horizontal.foto, *Entendiendo el coma*, <https://www.horizontalfoto.cl/entendiendo-el-coma>, Consultado: 26 abril, 2024, 2020.
- ⁵⁵A. Marzoa, «Aberraciones ópticas III: Coma», *Astronomía* **257**, 33-37 (2020).
- ⁵⁶R. Paschotta, «Astigmatism», [10.61835/o8q](https://doi.org/10.61835/o8q) (2019).
- ⁵⁷W. Welford, *Aberrations of Optical Systems* (Adam Hilger, 1991).
- ⁵⁸J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3.^a ed. (Springer, Baltimore, Maryland, USA, 2006).
- ⁵⁹A. Á. G. Michael B. Toffolo Iddo Pinkas y E. Boaretto, «Crystallinity assessment of anthropogenic calcites using Raman micro-spectroscopy.», *Nature* (2023).
- ⁶⁰R. F. C. C. Bernardo A. Nogueira Michel Rérat y R. Dovesi, «Raman activity of the longitudinal optical phonons of the LiNbO₃ crystal: Experimental determination and quantum mechanical simulation», *Journal of Raman Spectroscopy*, 1904-1914x (2022).
- ⁶¹L. Ashton, K. Wright y R. Smith, «Raman Spectroscopy: An evolving technique for live cell studies», *The Analyst* **141**, [10.1039/C6AN00152A](https://doi.org/10.1039/C6AN00152A) (2016).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00142

Matrícula: 2202800308

Diseño y calibración de un espectrómetro tipo Czerny-Turner para el estudio de glóbulos rojos atrapados por pinzas ópticas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 27 del mes de septiembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. AUGUSTO GARCIA VALENZUELA
DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ
DR. JOSE LUIS HERNANDEZ POZOS



AUREA NICTEHA SANCHEZ ESPIN
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICA)

DE: AUREA NICTEHA SANCHEZ ESPIN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

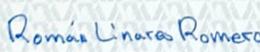
REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI



DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE



DR. AUGUSTO GARCIA VALENZUELA

VOCAL



DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

SECRETARIO



DR. JOSE LUIS HERNANDEZ POZOS