



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES FOTÓNICAS  
COHERENTES DE SANGRE ENTERA EN COLOIDES DIELECTRICOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**PRESENTA:**

**ÁNGEL EDUARDO ESCÁRCEGA MENDICUTI**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. CRESCENCIO GARCÍA SEGUNDO  
INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. KAREN PATRICIA VOLKE SEPÚLVEDA  
INSTITUTO DE FÍSICA**

**DR. AUGUSTO GARCÍA VALENZUELA  
INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. ENERO DE 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

# Agradecimientos

Agradezco a mi familia por seguir apoyándome incondicionalmente a pesar de mi ausencia. Por impulsarme y motivarme para continuar con mis proyectos personales y profesionales.

Gracias también a mis amigos, por estar conmigo y pendientes de lo que sucede con mi vida, no importándoles que no les cuento mucho.

Agradezco en especial a mi comité tutor por el apoyo y tiempo dedicado al desarrollo de mi proyecto de investigación. Al Dr. Crescencio García Segundo por permitirme trabajar en su laboratorio, tratarme como un igual y guiarme en el desarrollo del proyecto, y por ayudarme a analizar cualquier situación desde diferentes puntos de vista. A la Dra. Karen Volke por la atención brindada cada vez que la solicité y por las largas charlas acerca de mi investigación, por sus consejos y motivación. Al Dr. Augusto García Valenzuela, también por sus consejos para desarrollar de la mejor forma este proyecto y por permitirme trabajar en su laboratorio cuando fue necesario.

Muchas gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, al Instituto de Investigaciones en Materiales y al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología por abrirme sus puertas durante mis estudios de Maestría.

Gracias también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado en mis estudios de posgrado.

---

# Resumen

En el presente trabajo se propone un método experimental para preparar y caracterizar coloides de cuya composición formen parte células sanguíneas, mismos que representan un volumen óptimo de medio desordenado capaz de generar el fenómeno láser aleatorio (RL, por sus siglas en inglés), al ser excitado adecuadamente. Cuando células sanguíneas (sangre entera) forman parte del sistema, las propiedades tanto del coloide base, así como las del campo de radiación esparcido, se modifican.

Nuestro medio base consiste en un coloide hecho de nanopartículas de  $SiO_2$  de 200nm de diámetro a una concentración de  $1.26 \times 10^{12} \frac{np}{ml}$  suspendidas en solución acuosa con una proporción 1:1 en volumen (1:1v) de agua tridestilada-metanol con Rodamina 6G, a una concentración de  $2.5 \times 10^{-3} M$ , como medio activo. Al añadir sangre entera ( $30\mu L$ ) observamos un corrimiento de 4 nm, hacia el azul, de la longitud de onda central característica del espectro del campo esparcido por el coloide. Al dar seguimiento a las células sanguíneas mediante microscopía óptica, observamos que las células sanguíneas habían sufrido hemólisis, por lo tanto, el contenido proteínico de las células fue lo que se combinó con el medio aleatorio, dando lugar a los resultados encontrados. Con el objetivo de preservar la forma y tamaño de las células sanguíneas, encontramos el solvente adecuado para formar parte del coloide y satisfacer las condiciones mencionadas. Más aún, identificamos la concentración de sangre a la cual, al formar parte del coloide y ser posteriormente excitado, las propiedades del espectro del campo esparcido, tales como intensidad y longitud de onda, se mantienen estables por, al menos, un intervalo de tiempo de 30 minutos. Una vez conocidas estas características, decidimos prescindir de la rodamina 6G. De esta forma, consideramos únicamente a la sangre como el pigmento (medio activo)

de nuestro coloide. En conjunto, la identificación de todas estas propiedades nos permitieron construir un coloide sanguíneo que al ser excitado adecuadamente emite en 2 longitudes de onda:  $\lambda_1 = 437nm$  y  $\lambda_2 = 968nm$ . En ambos casos se tiene un ancho espectral de aproximadamente 2 nm, además de que ambas exhiben un perfil que se ajusta a una curva tipo Lorentz.

Logramos diseñar y fabricar un coloide en donde células sanguíneas representan el medio activo. Identificamos el umbral de excitación al cual este coloide representa un medio óptimo de medio aleatorio que emite un campo de radiación con dos líneas careacterísticas y que ambas satisfacen los criterios de la emisión RL.

---

# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>II</b>
<b>Resumen</b>	<b>III</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes . . . . .	3
1.2. Descripción y justificación del problema . . . . .	6
1.3. Hipótesis . . . . .	7
1.4. Objetivos . . . . .	7
1.5. Estructura de la tesis . . . . .	8
<b>2. Marco teórico</b>	<b>11</b>
2.1. Esparcimiento de la luz . . . . .	12
2.2. Láseres aleatorios . . . . .	14
2.3. Células sanguíneas . . . . .	16
2.4. Eritrocitos: su importancia en la salud . . . . .	16
2.5. Esparcimiento de la luz por células sanguíneas . . . . .	17
2.6. Fluorescencia . . . . .	20
2.7. Coherencia . . . . .	23
<b>3. Desarrollo experimental</b>	<b>25</b>
3.1. Diseño y preparación de coloides . . . . .	25
3.2. Caracterización del campo emitido . . . . .	26
3.3. Coloides con sangre . . . . .	27
3.4. Láser aleatorio con sangre . . . . .	28

---

<b>4. Fabricación del coloide: caracterización del medio aleatorio y del campo de radiación emitido. Resultados y análisis.</b>	<b>30</b>
4.1. Medio esparcidor . . . . .	30
4.2. Comportamiento de eritrocitos en diferentes solventes . . . . .	34
4.3. Medio Aleatorio . . . . .	39
4.4. Fluorescencia de sangre . . . . .	40
4.4.1. Espectro de fluorescencia en sangre entera . . . . .	40
4.5. Caracterización del campo de radiación emitido . . . . .	41
<b>5. Síntesis de resultados y conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>50</b>
<b>A. Láser aleatorio de sangre entera y Rodamina 6G</b>	<b>56</b>
<b>B. Espectroscopía Raman</b>	<b>59</b>
B.1. Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS) . . . . .	61
B.2. Stimulated Raman Scattering (SRS) . . . . .	63
<b>C. Participaciones en Congresos</b>	<b>65</b>

---

# Índice de figuras

1.1. Estudio angular del espectro de emisión de un láser aleatorio. a) Espectro de esparcimiento por coloides compuestos por nanopartículas de SiO <sub>2</sub> a diferentes concentraciones, Rodamina 6G como medio activo (a una concentración de $2.5 \times 10^{-3} M$ en una solución agua-metanol (proporción 1:1 en volumen). b) Cuando la concentración de nanopartículas en a) es de $1.26 \times 10^{12} \frac{np}{ml}$ el espectro de esparcimiento mantiene una longitud de onda única e independiente de la dirección de observación. En ambos casos se excitan los coloides con pulsos de un láser Nd:YAG a 532 nm a una tasa de repetición de 10 pulsos por segundo. <i>Modificado de [15]</i> . . . . .	5
1.2. Propiedades de coherencia de un láser aleatorio. Se analizó con un interferómetro tipo Michelson la luz emitida en una dirección arbitraria por el coloide correspondiente a la Fig. 1.1.b, se formó un patrón de interferencia con luz aleatoria. <i>Tomado de [16]</i> . . . . .	5
2.1. Un haz de luz no es visible cuando pasa a través de una solución (a) pero sí cuando lo hace a través de un coloide (b). Una propiedad más de los coloides es que dan lugar al esparcimiento de la luz. . . . .	12
2.2. Esparcimiento de la luz. Cuando un campo de radiación incide sobre una partícula se presenta el fenómeno de esparcimiento. Existen diferentes aproximaciones teóricas para la descripción de este fenómeno.	13

2.3. Interacción radiación-materia: absorción y emisiones radiativas. Cuando una porción de materia (átomo, molécula, partícula) es irradiada con energía adecuada, pasa de estar en un estado energético fundamental $E_0$ a un estado excitado $E_1$ . Después de cierto tiempo la partícula decaerá espontáneamente a su estado fundamental, liberando un fotón (proceso radiativo). Si la partícula excitada recibe fotones cuya energía es igual a la diferencia $E_1 - E_0$ entonces el proceso radiativo consistirá en la emisión de un fotón con las mismas propiedades que aquel que indujo el decaimiento. A este proceso se le conoce como emisión estimulada. En un sistema tipo láser se busca maximizar las emisiones estimuladas. En general, la longitud de onda de emisión es mayor que la longitud de onda de excitación. . . . .	14
2.4. Condición de Letokhov para láseres aleatorios en el régimen difuso. . .	15
2.5. Forma y dimensiones de un eritrocito sano. . . . .	17
2.6. El esparcimiento de la luz depende de la sección transversal de esparcimiento de los eritrocitos: a) eritrocito sano. b) Eritrocito esférico. c) Microcito (disminución de volumen). d) Macrocito (aumento de volumen). e) Eritrocito alargado con el mismo volumen de eritrocito sano. . . . .	20
2.7. Diagrama de Jablonsky. Una partícula en su estado base $S_0$ es capaz de, al absorber energía de un campo incidente, alcanzar estados excitados $S_2, S'_2, \dots$ los cuales se relajan hacia estados excitados menos energéticos $S_1, S'_1, \dots$ para después decaer el estado base por medio de un proceso radiativo o no radiativo. . . . .	21
2.8. Espectro de fluorescencia de la sangre con un láser de argón (de onda continua y baja intensidad, a $\lambda = 457.9nm$ ). Al aislar eritrocitos y excitarlos, el espectro que emiten es prácticamente el mismo que emite la sangre entera. Las longitudes de onda donde se presentan los máximos de intensidad son iguales en ambos casos [37]. . . . .	23
3.1. Coloides empleados en los experimentos. . . . .	26

---

3.2. Arreglo experimental para medir propiedades espectroscópicas del campo emitido por el coloide. Por medio de un espectrómetro de alta resolución se obtuvieron perfiles espectrales que permitieron medir algunas propiedades del campo de esparcimiento . . . . .	27
4.1. Estabilidad temporal de la intensidad del campo esparcido por nanopartículas de SiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> en diferentes direcciones de observación: a) 30°, b) 60°, c) 90°, d) 120°. El campo de esparcimiento presentó una mayor estabilidad en su intensidad para el caso en el que el medio esparcidor fue de nanopartículas de SiO <sub>2</sub> . . . . .	31
4.2. Estabilidad temporal del factor de calidad Q para diferentes direcciones de observación: a) 30°, b) 60°, c) 90°, d) 120°. El factor de calidad tiene, en general, un comportamiento más estable para el campo de esparcimiento por nanopartículas de SiO <sub>2</sub> , presenta menos fluctuaciones que en el caso correspondiente a nanopartículas de SiO <sub>2</sub> . . . . .	32
4.3. Intensidad del campo de esparcimiento como función del ángulo de medición. Para ambos tipos de nanopartículas se observa un comportamiento similar. Sin embargo, la intensidad del campo esparcido por nanopartículas de SiO <sub>2</sub> es mayor que la intensidad correspondiente al caso de TiO <sub>2</sub> en todas las direcciones medidas. . . . .	33
4.4. Eritrocitos en solución 50:50v agua destilada-metanol. En esta concentración podemos observar una baja densidad de eritrocitos, muchos de ellos lisados. . . . .	34
4.5. Eritrocitos en solución agua destilada-metanol-solución salina (40:40:20v). Bajo esta concentración, no se observan cambios significativos en la densidad de eritrocitos con respecto a la solución agua destilada-metanol. . . . .	35
4.6. El agua destilada propicia un rápido proceso de lisado, en las imágenes se muestran eritrocitos en t= 1 min (a) y t= 5 min (b), a partir del momento en que entran en contacto con agua. . . . .	36
4.7. En solución salina-metanol, observamos que los eritrocitos se deforman después de 30 minutos de observación, sin embargo, la hemólisis no se presenta como en los casos anteriores. . . . .	36

- 
- 4.8. Comportamiento de los eritrocitos en metanol. Pudimos observar que el metanol también promueve un rápido proceso de lisado (hay hemólisis). Se muestran imágenes de eritrocitos en a)  $t= 3$  min y b)  $t= 8$  min de observación. . . . . 37
- 4.9. Eritrocitos en solución salina: a)  $t= 4$  min, b)  $t= 9$  min, c)  $t= 12$  min,  $t= 30$  min. . . . . 38
- 4.10. Espectro de fluorescencia de la sangre al ser excitada con pulsos láser ( $E= 17.96$  mJ. Los coloides se hicieron con diferentes concentraciones de sangre sin nanopartículas: 5 %, 10 %, 15 %. En el espectro correspondiente al 5 % de concentración se definen mejor los máximos de intensidad, en  $\lambda = 437nm$  y  $\lambda = 970nm$  respectivamente. . . . . 40
- 4.11. Al excitar la sangre con pulsos láser, se tienen máximos de emisión en: a)  $\lambda = 437nm$ , b)  $\lambda = 970nm$  . . . . . 41
- 4.12. Espectros de emisión de coloides cuyo medio esparcidor consiste en nanopartículas de 600 nm de diámetro a distintas energías: a)  $E= 15.12$  mJ, b)  $E= 17.96$  mJ, c)  $E= 22.80$  mJ, d)  $E= 23.48$  mJ, e)  $E= 22.80$  mJ, f) Comparación entre los espectros cuando el coloide contiene nanopartículas y cuando no las contiene. . . . . 42
- 4.13. Espectro de emisión del coloide con nanopartículas de 200 nm para distintas energías: a partir de  $E= 17.96$  mJ (b) se detecta una respuesta del coloide, en  $E= 22.17$  mJ (e) la intensidad de los máximos de emisión decae. Al volver a excitar con  $E= 19.39$  mJ no se obtiene la misma respuesta que cuando se excitó por primera vez con esa energía (g). Se muestra el espectro del coloide al iluminar con luz blanca (h). 43

4.14. Efecto anti-Stokes. En este fenómeno están involucrados 4 fotones: un fotón ( $\omega_{pump}$ ) es absorbido por una partícula que se encuentra en su estado base, después se emite un fotón debido a un decaimiento tipo Stokes ( $\omega_{stokes}$ ), la partícula no vuelve a su estado base sino a uno pre-excitado el cual vuelve a absorber un fotón de bombeo ( $\omega_{pump}$ ), de tal forma que la partícula logra alcanzar un estado excitado por absorción de 2 fotones, finalmente se emite un fotón ( $\omega_{CARS}$ ) el cual es más energético que el fotón de bombeo. Dado el ancho espectral de las emisiones que generamos con nuestros coloides, estas corresponden al proceso denominado Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS).	46
A.1. Comparación entre el perfil de intensidades del campo de radiación emitido por un coloide que contiene únicamente Rodamina 6G como medio activo (círculos) y otro al que se le ha añadido sangre entera de paciente diabético. En el primer caso, la longitud de onda central de emisión es de 568 nm, mientras que en el segundo es de 564 nm aproximadamente.	57
A.2. Hemólisis presentada en los eritrocitos cuando se encuentran en un solvente de agua tridestilada-metanol-solución salina (40:40:20). Dentro del círculo negro se puede observar cómo se libera el contenido de las células.	58
B.1. Transiciones moleculares que dan lugar a diferentes procesos radiativos: a) esparcimiento Rayleigh. b) Esparcimiento Raman tipo Stokes. c) Esparcimiento Raman tipo anti-Stokes. Modificado de [51].	60
B.2. Efecto CARS como proceso multifotónico: estados vibracionales excitados son alcanzados por la absorción de dos fotones, uno de bombeo y otro Stokes. Cuando la diferencia entre las frecuencias de estos fotones iguala a la de un estado excitado, se produce una emisión anti-Stokes. Modificado de [51].	62
B.3. La imagenología por CARS es útil para identificar el contenido químico de una muestra [52].	63
B.4. Imagen SRS de lípidos en melanocitos humanos [53].	64

---

# Capítulo 1

## Introducción

El Láser Aleatorio es un fenómeno físico que ha despertado un gran interés entre la comunidad científica durante los últimos 30 años como consecuencia de los mecanismos que lo producen, así como de sus propiedades y potenciales aplicaciones científicas y tecnológicas.

A la amplificación de radiación dentro de un material sin estructura definida (medio aleatorio) que presenta actividad óptica (produce emisiones estimuladas de luz) se le conoce como Láser Aleatorio. Cuando un medio aleatorio es estimulado con un campo de radiación debe ser capaz de promover el esparcimiento múltiple de dicha radiación. De esta manera, el camino óptico recorrido por la radiación se incrementa y, como consecuencia, se presenta la posibilidad de amplificarse.

El fenómeno láser aleatorio ha merecido estudios tanto teóricos como experimentales con la finalidad de caracterizar sus propiedades e identificar similitudes y diferencias entre los campos de radiación característicos de estos sistemas y de la emisión láser [1, 2]. El interés e importancia de los láseres aleatorios radica en la complejidad de su caracterización:

*La caracterización completa de un Láser Aleatorio tiene dos vertientes: la caracterización del medio aleatorio y la caracterización del campo de radiación emitido.*

La caracterización completa de este tipo de sistemas tiene potenciales aplicaciones en áreas de investigación tales como la Biomédica, Fotónica y la Imagenología, pues se podrían establecer relaciones entre las propiedades del medio aleatorio y del campo de radiación que produce. La amplia variedad de sistemas que pueden actuar como medios aleatorios (cristales fotónicos, coloides, biofluidos, tejidos biológicos, etc.) hacen de su caracterización un problema con muchas variables a considerar. La investigación presentada en esta tesis propone una metodología para diseñar, fabricar y caracterizar un láser aleatorio cuyo medio es muy particular: coloides sanguíneos.

En el método presentado en este trabajo se identifican las condiciones bajo las cuales una muestra biológica (sangre entera) puede formar parte de un medio aleatorio. Esto con la finalidad de ser una potencial aplicación en el campo de la Medicina. Así mismo, se analizaron las propiedades de la luz esparcida por dicho medio aleatorio cuando es estimulado ópticamente. Es decir, se realizó una caracterización completa de un láser aleatorio a base de coloides sanguíneos.

El proceso de caracterización del medio aleatorio consistió en la identificación de las condiciones de tonicidad adecuadas para que los eritrocitos (glóbulos rojos) contenidos en sangre entera no presentaran un proceso de hemólisis (liberación de hemoglobina). Para el esparcimiento múltiple, se analizó la estabilidad espacial y temporal del espectro de un campo de radiación esparcido por nanopátículas de diferentes materiales (partículas esparcidoras o esparzoras), de tamaños y concentraciones conocidas. La caracterización del campo de radiación consistió en la medición de diferentes parámetros del campo resultante de la interacción de un estímulo óptico con el medio aleatorio: intensidad, longitud de onda, ancho espectral y factor de calidad del campo de esparcimiento. En este caso, la única variable independiente fue la energía de excitación. Las características de los diferentes componentes del medio aleatorio, así como de la excitación óptica, se explican en el capítulo 3 de este trabajo.

Cuando un medio material de microescala (o menor) es iluminado por luz coherente o parcialmente coherente, el campo de radiación es esparcido espacialmente. Este esparcimiento se debe a varios fenómenos, que dependen de las propiedades ópticas y geométricas del sistema en interacción. En particular, si el sistema es un medio

celular, el esparcimiento tiene varias causas, tales como [3–5]:

- a. Difracción producida en las paredes celulares, el núcleo y otros organelos dentro de la misma célula.
- b. Refracción debida a la diferencia de índices de refracción entre el núcleo, citoplasma y el medio que rodea a la célula.
- c. Reflexión, que se presenta entre las diferentes fronteras ópticas dentro y fuera de la célula.
- d. Absorción y emisión de radiación dentro de la célula.

## 1.1. Antecedentes

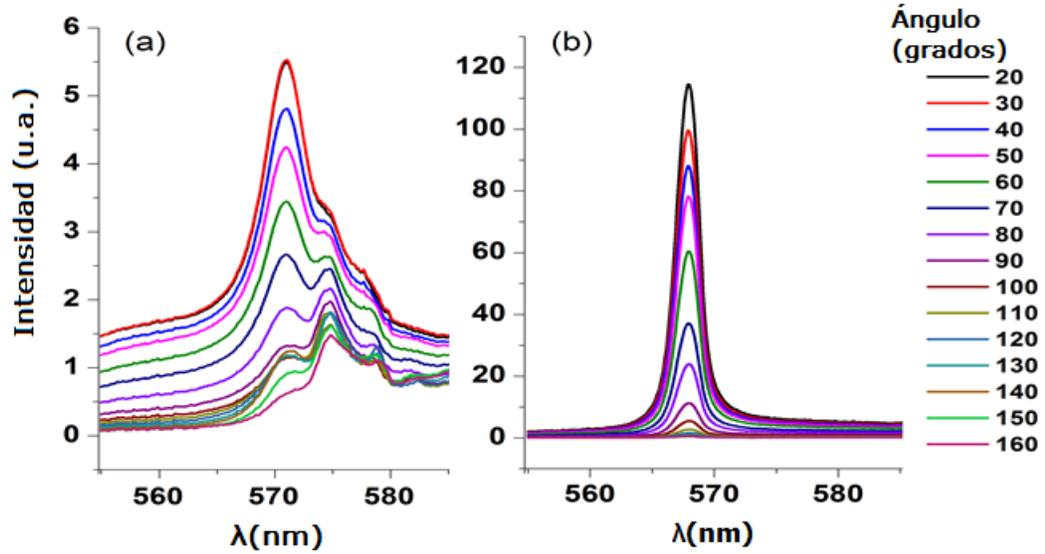
El esparcimiento de la radiación ha sido considerado un fenómeno que perjudica las propiedades características de un haz láser, pues altera la dirección de propagación y la coherencia espacial de los fotones del haz. Sin embargo, el esparcimiento también puede ser empleado para dar lugar a emisiones tipo láser. Fue V.S. Letokhov [6], quien en la década de 1960 predijo teóricamente este efecto al estudiar las propiedades ópticas de medios aleatorios: es posible obtener emisiones tipo láser cuando la luz se propaga a través de un medio que es capaz de amplificar y esparcir simultáneamente dicha luz. La primera confirmación experimental de la predicción de Letokhov se dio por V.M. Markushev en 1986 [7]. Sin embargo, en 1994 Lawandy *et al.* [8] logró obtener una emisión tipo láser al excitar ópticamente una solución de Rodamina 640 con partículas esparcidoras de  $TiO_2$  contenidos en una solución de metanol. Esta observación fue el punto de inicio en la investigación sobre el fenómeno conocido como Láser Aleatorio.

Los estudios posteriores a los de Lawandy se han enfocado en la descripción física detallada de las emisiones tipo láser aleatorio, así como en sus características y propiedades. Dichas observaciones han demostrado que las partículas esparcidoras tienen un papel equivalente al de la cavidad resonante en un láser convencional. Esto

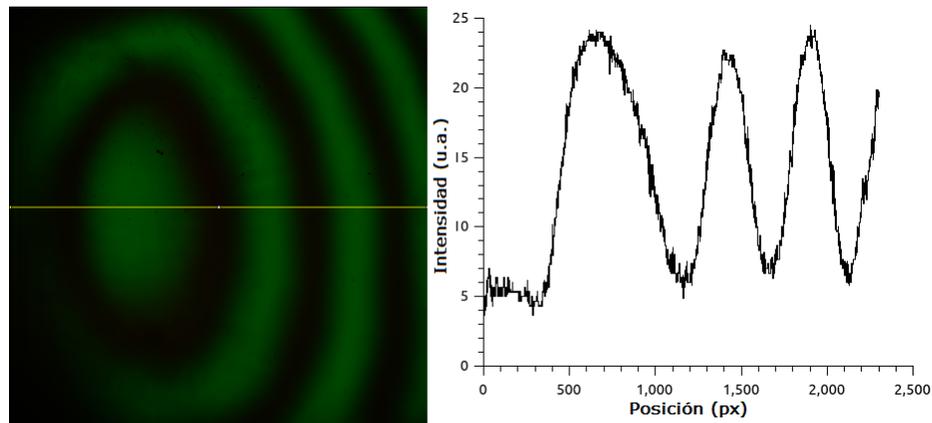
debido a que promueven la retroalimentación necesaria para estimular un medio activo. También se han logrado emisiones láser aleatorio con propiedades de coherencia al estimular ópticamente medios aleatorios consistentes en nanopartículas dieléctricas ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , poliméricas) disueltas en soluciones con pigmentos orgánicos (principalmente Rodamina 6G) [9–13].

Por otro lado, el esparcimiento de la luz también ha sido utilizado en la implementación de la técnica biofísica que se conoce como citometría de flujo. Su uso primario ha sido discriminar entre distintos tipos de células con base en sus tamaños, formas, índices de refracción y la presencia de estructuras internas. La aproximación de dipolos acoplados modela el esparcimiento por células de forma irregular, además considera que las partes de una partícula son tan importantes como su composición al determinar las propiedades de esparcimiento [14].

Dentro de los antecedentes existen 2 trabajos [15, 16] que hemos realizado en el Laboratorio de Imagenología Biomédica del ICAT. Dichos estudios son sobre el análisis de coloides con nanopartículas dieléctricas y se analizaron las propiedades de luz esparcida por coloides en régimen difuso. Dentro de los resultados más importantes, y que son base para el desarrollo de esta tesis, se identificó que debe existir un balance entre las concentraciones de nanopartículas, la densidad del absorbente saturable (medio activo) y la energía de excitación, para dar lugar a un campo de esparcimiento con estabilidad espectral, es decir, las propiedades del campo no dependen de la dirección de observación. La intensidad del campo depende de la distancia radial, y en general dicho desempeño es invariante en el tiempo. Con base en este estudio, se realizó un segundo análisis experimental sobre las propiedades de coherencia de la luz emitida por los mismos coloides empleados en el primer estudio. Entre los resultados encontrados en dicho estudio, encontramos que existe un umbral de energía de excitación al cual la luz esparcida adquiere propiedades de laseo, es decir, se alcanzan las condiciones de inversión de población y la luz emitida es tipo láser: posee propiedades de coherencia además de ser monocromática [15–19] (véanse Fig. 1.1, 1.2).



**Figura 1.1:** Estudio angular del espectro de emisión de un láser aleatorio. a) Espectro de esparcimiento por coloides compuestos por nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  a diferentes concentraciones, Rodamina 6G como medio activo (a una concentración de  $2.5 \times 10^{-3} M$  en una solución agua-metanol (proporción 1:1 en volumen). b) Cuando la concentración de nanopartículas en a) es de  $1.26 \times 10^{12} \frac{np}{ml}$  el espectro de esparcimiento mantiene una longitud de onda única e independiente de la dirección de observación. En ambos casos se excitan los coloides con pulsos de un láser Nd:YAG a 532 nm a una tasa de repetición de 10 pulsos por segundo. *Modificado de [15]*



**Figura 1.2:** Propiedades de coherencia de un láser aleatorio. Se analizó con un interferómetro tipo Michelson la luz emitida en una dirección arbitraria por el coloide correspondiente a la Fig. 1.1.b, se formó un patrón de interferencia con luz aleatoria. *Tomado de [16]*

Con los coloides empleados en estos estudios se obtienen emisiones con un ancho espectral mínimo de  $3.1 \pm 0.2nm$  y una longitud de coherencia máxima de  $110 \pm 5\mu m$ .

## 1.2. Descripción y justificación del problema

El fenómeno láser aleatorio es resultado del esparcimiento múltiple producido en un medio desordenado. Sin embargo, las condiciones de dicho medio son muy específicas pues debe existir un balance entre los esparcidores (nanopartículas), el absorbente saturable (medio activo) y la energía con la que se excita el medio [6, 7, 9, 18?, 19]. La mayoría de los estudios referentes al fenómeno láser aleatorio utilizan nanopartículas dieléctricas inorgánicas como medio esparcisor pero también existen reportes de estudios y caracterización de células por esparcimiento múltiple. De hecho, para poder analizar el esparcimiento por células se supone que son partículas dieléctricas; como resultado, las observaciones experimentales coinciden con las teorías de Mie y de aproximación dipolar [20]. Existen diversos estudios de caracterización de propiedades mecánicas de células sanguíneas (eritrocitos) a partir de los cuales es posible determinar las repercusiones que tienen, por ejemplo, enfermedades como la diabetes a nivel celular [21, 22]. En nuestro caso, queremos analizar células sanguíneas a partir de sus propiedades ópticas.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios acerca del fenómeno láser aleatorio están en concordancia tanto con lo establecido por la teoría de Mie como con la aproximación dipolar. De hecho, complementan estos resultados, pues la estabilidad de la luz en el plano de esparcimiento no se refiere únicamente a propiedades de intensidad sino también a las propiedades espectrales y a las de coherencia.

El siguiente paso en nuestra investigación es analizar las propiedades de la luz esparcida en coloides genéricos (que contienen nanopartículas y medio activo) y compararlas con las propiedades de la luz esparcida en coloides con inserciones de medio biológico, en particular con sangre entera. La teoría de Mie y la aproximación dipolar también sirven para modelar algunas características de este fenómeno. Aunado a los resultados que hemos encontrado, tenemos las bases para suponer que es posible diseñar

un coloide híbrido o biológico, es decir, que contenga partes de naturaleza biológica y que además cumpla con las condiciones de balance entre absorbentes, esparcidos y campo de excitación para lograr esparcimiento de luz manteniendo algunas de sus propiedades fotónicas coherentes y con estabilidad espectral.

### 1.3. Hipótesis

Cuando las biomoléculas se deterioran, ya sea de manera natural o por agentes externos, sus propiedades se modifican. Entonces uno se pregunta: ¿estas modificaciones afectan al coloide que las contiene? ¿Con qué magnitud y cuáles son los parámetros dominantes del cambio? La caracterización espectroscópica nos permitirá determinar cambios fisico-químicos y biológicos tanto de las biomoléculas como del coloide.

En este proyecto, buscamos cuantificar la interacción de las células sanguíneas con un campo de radiación coherente, identificar las condiciones bajo las cuales dichas células pueden formar parte de un coloide que al ser excitado da lugar al fenómeno láser aleatorio. Más aún, buscamos identificar los cambios en las propiedades de un sistema conocido (láser aleatorio) cuando las células sanguíneas forman parte del mismo sistema. Además, queremos identificar los cambios en las propiedades del campo de radiación esparcido por dicho sistema en función de la energía de excitación. Por último, determinar si a partir de estos cambios podemos establecer las condiciones en las que se encuentran las células, es decir, identificar si han sufrido algún tipo de degradación.

### 1.4. Objetivos

#### Objetivo general

Investigar si existen condiciones para producir láser aleatorio en coloides con sangre entera como medio activo. Caracterizar el campo de radiación esparcido por estos coloides al ser excitado con pulsos láser y cuantificar los cambios en las propiedades de dicho campo en función de la energía de excitación. Algunos de los parámetros de

interés, del campo de esparcimiento, son: longitud de onda de emisión, intensidad y ancho espectral.

## **Objetivos particulares**

- Identificar las condiciones a las cuales la luz esparcida por un coloide genérico posee propiedades de coherencia.
- Identificar las condiciones bajo las cuales las componentes del medio aleatorio en los coloides genéricos son compatibles con sangre entera, de tal forma que sea posible preparar un coloide biológico en el cual las células sanguíneas (en particular, eritrocitos) no presenten hemólisis durante el análisis experimental de nuestra investigación.
- Identificar y caracterizar las propiedades de coherencia de la luz esparcida por coloides biológicos.

## **1.5. Estructura de la tesis**

La estructura de esta tesis es la siguiente:

- Capítulo 1: Descripción general del problema que se aborda en este trabajo, se mencionan los antecedentes más importantes sobre los cuales basamos nuestro desarrollo experimental, en particular, se destacan como antecedentes los estudios que hemos realizado en el Laboratorio de Imagenología Biomédica del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la UNAM y cómo, al tomar como base dichos estudios, podemos plantear la hipótesis y objetivos de esta investigación.
- Capítulo 2: Se presentan los principios teóricos de los fenómenos involucrados en nuestra investigación: esparcimiento múltiple, láser aleatorio, esparcimiento por células sanguíneas y coherencia. Así mismo, se presentan los resultados experimentales más representativos reportados en la literatura respecto a los láseres aleatorios y al esparcimiento de la luz por células sanguíneas y cómo, con base en estos resultados, decidimos realizar esta investigación.

- Capítulo 3: Se describe la metodología empleada para el desarrollo de los diferentes experimentos realizados y para el análisis de los datos correspondientes. La caracterización del medio aleatorio consistió en fabricar coloides cuyos componentes no indujeran un proceso de hemólisis en las muestras sanguíneas y que, al ser estimulados ópticamente, dieran lugar al esparcimiento de un campo de radiación con intensidad y longitud de onda de emisión estables (durante la duración de los experimentos). La caracterización del campo de esparcimiento consistió en la medición de parámetros tales como intensidad, longitud de onda, ancho espectral y factor de calidad. Estas variables se midieron para diferentes valores de energía de excitación del coloide sanguíneo.
- Capítulo 4: Se presentan y discuten los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados para la caracterización del medio aleatorio y del campo de esparcimiento correspondiente a los diferentes coloides empleados. Dentro de los resultados más importantes, encontramos que el medio aleatorio debe tener propiedades isotónicas. De esta manera, los eritrocitos contenidos en la sangre entera no modifican su morfología. Por otro lado, se observó que el campo de esparcimiento de los coloides sanguíneos tiene dos longitudes de onda características: una emisión de tipo Stokes y otra de tipo anti-Stokes. Ambas satisfacen las condiciones para ser consideradas emisiones láser aleatorio.
- Capítulo 5: En este capítulo se presentan los resultados más importantes encontrados en este trabajo a manera de conclusiones y se discuten el alcance de este trabajo. En particular, se mencionan las posibles aplicaciones en el área Biomédica así como los proyectos a futuro sobre esta misma línea de investigación, así como las colaboraciones obtenidas en el desarrollo de este trabajo.

Se añadieron apéndices dar más contexto a la hipótesis planteada como explicación a algunos de los resultados inesperados que se encontraron en esta tesis.

- Apéndice A: En este apartado se explica, de manera general, la espectroscopía Raman y algunas técnicas de Imagenología que la toman como base. En particular, se menciona el método de espectroscopía Raman por emisiones anti-Stokes coherentes (CARS, por sus siglas en inglés), ya que nuestro resultado satisface algunas de las condiciones propias de CARS.

- Apéndice B: Contiene los eventos, nacionales e internacionales, en los cuales se han presentado resultados parciales de este trabajo de tesis.

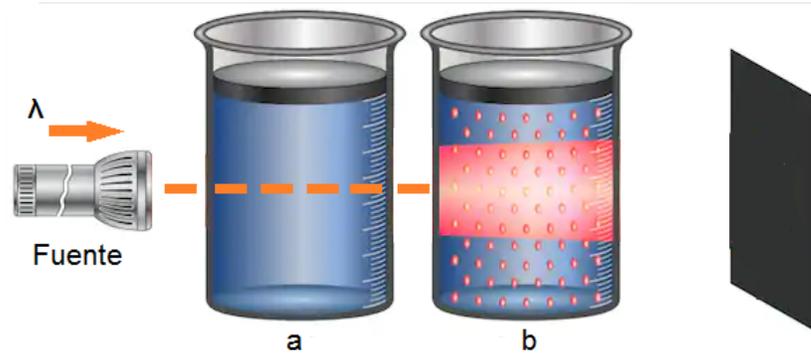
---

## Capítulo 2

### Marco teórico

Los sistemas coloidales de partículas de oro eran conocidos desde la antigüedad. El año 1861 marcó el inicio de la investigación sistemática sobre sistemas coloidales a partir de las publicaciones de Thomas Graham. Graham hizo una distinción entre dos tipos de soluciones: soluciones en las cuales las especies disueltas son capaces de pasar a través de una membrana, y soluciones en las cuales no existe tal difusión de las especies disueltas. Graham nombró al segundo tipo de soluciones como “coloides”. Los coloides no se difunden a través de una membrana, esto es debido a que las especies disueltas son demasiado grandes, es decir, sus dimensiones son mayores a las de la membrana. Las partículas que satisfacen tal condición se conocen ahora como “partículas coloidales”. Previo a las publicaciones de Graham, en 1827, el botánico Robert Brown observó movimiento irregular en granos de polen sobre agua. Tales granos parecen tener un tamaño coloidal. El movimiento observado por Brown es ahora referido como “movimiento browniano”. A diferencia de las soluciones (acuosos), los coloides hacen visible a un haz de luz que pasa a través de ellos y también presentan el fenómeno de esparcimiento de la luz (Véase Fig. 2.1) [23].

A lo largo de los últimos 30 años los sistemas coloidales han sido objeto de gran interés, en particular aquellos que son capaces de, bajo condiciones muy específicas, emitir un campo de radiación con propiedades tipo láser. Estos coloides dan lugar al fenómeno Láser Aleatorio.



**Figura 2.1:** Un haz de luz no es visible cuando pasa a través de una solución (a) pero sí cuando lo hace a través de un coloide (b). Una propiedad más de los coloides es que dan lugar al espesamiento de la luz.

## 2.1. Espesamiento de la luz

El fenómeno de espesamiento de ondas electromagnéticas se debe a la excitación de un medio material. A diferencia de los decaimientos radiativos, las cargas eléctricas del material oscilan de acuerdo al campo de excitación para, posteriormente, re-emitir la radiación cuando el medio se desexcita (véase Fig. 2.2). Para excitar al medio material, es necesario que éste presente el fenómeno de absorción de la radiación, es decir, el espesamiento es la combinación de los fenómenos de absorción y emisión de la radiación.

Cuando un campo de radiación incide sobre un material, la relación entre las intensidades transmitida  $I(x)$  y la intensidad incidente  $I_0$  está dada por la Ley de Beer-Lambert:

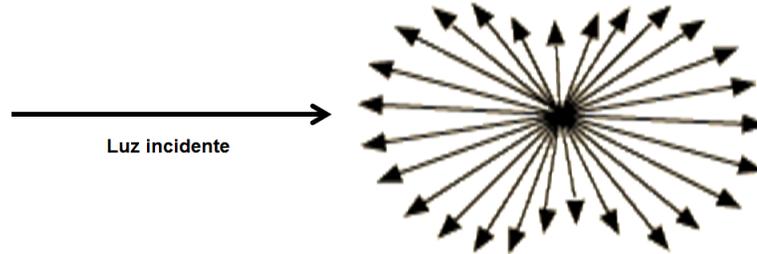
$$I(x) = I_0 e^{-\sigma_{ext} x} \quad (2.1)$$

Las secciones transversales de absorción y espesamiento, en conjunto, dan lugar a la sección transversal de extinción

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{esp}$$

Este parámetro representa la eficiencia con la cual una partícula desvía fotones de un

haz de radiación que incide sobre ésta. Depende de propiedades tanto de la partícula (composición química, tamaño, forma), así como del medio que la rodea y características del haz incidente (polarización, frecuencia).



**Figura 2.2:** Espacimamiento de la luz. Cuando un campo de radiación incide sobre una partícula se presenta el fenómeno de espacimamiento. Existen diferentes aproximaciones teóricas para la descripción de este fenómeno.

Existen dos aproximaciones principales que describen el fenómeno de espacimamiento, dependiendo de las propiedades de las partículas espacidoras: el régimen de Rayleigh y el régimen de Mie.

## Régimen de Rayleigh

En esta aproximación se consideran partículas espacidoras cuyas dimensiones son muy pequeñas en comparación con la longitud de onda de un campo de radiación que se le hace incidir. De esta manera, las interacciones entre el campo incidente y la superficie de la partícula son despreciables. Como consecuencia, se puede considerar a los espacidores como pequeños dipolos eléctricos.

## Régimen de Mie

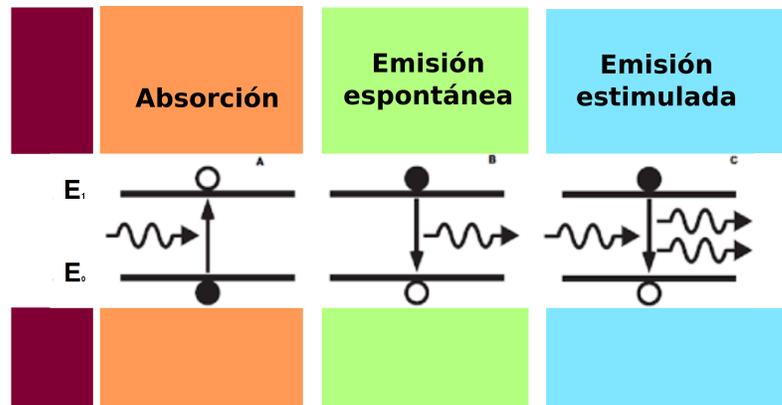
La aproximación de Mie es la más rigurosa para describir el espacimamiento de radiación por partículas esféricas cuyas dimensiones son comparables con la longitud de onda del campo incidente. Esta aproximación permite conocer la distribución angular de espacimamiento en un medio diluido, es decir, un medio en el que la luz espacida no interactúa de manera significativa con otra partícula del mismo medio.

Durante el desarrollo de este trabajo (véase Capítulo 3), las dimensiones de las nanopartículas espacidoras no es despreciable en comparación con la longitud de onda del

campo de radiación que las estimula. Es por ello que un estudio teórico del fenómeno presentado en este trabajo requeriría el empleo de la aproximación de Mie.

## 2.2. Láseres aleatorios

Las interacciones de la radiación con la materia dan lugar al mecanismo que hace posible generar emisiones láser. En particular los procesos de absorción y emisión de la radiación dan lugar a este fenómeno (véase Fig. 2.3).



**Figura 2.3:** Interacción radiación-materia: absorción y emisiones radiativas. Cuando una porción de materia (átomo, molécula, partícula) es irradiada con energía adecuada, pasa de estar en un estado energético fundamental  $E_0$  a un estado excitado  $E_1$ . Después de cierto tiempo la partícula decaerá espontáneamente a su estado fundamental, liberando un fotón (proceso radiativo). Si la partícula excitada recibe fotones cuya energía es igual a la diferencia  $E_1 - E_0$  entonces el proceso radiativo consistirá en la emisión de un fotón con las mismas propiedades que aquel que indujo el decaimiento. A este proceso se le conoce como emisión estimulada. En un sistema tipo láser se busca maximizar las emisiones estimuladas. En general, la longitud de onda de emisión es mayor que la longitud de onda de excitación.

Las cavidades resonantes logran una muy alta eficiencia en los procesos de absorción y emisión estimulada para dar lugar a las emisiones láser. Sin embargo, la interacción radiación-materia no es exclusiva de dichas cavidades. Desde la invención del láser, diversos estudios fueron realizados para hacer más eficientes estos dispositivos pero también se investigaron otros mecanismos para generarlo.

Los Láseres Aleatorios son sistemas ópticos o fotónicos, predichos por primera vez por V.S. Letokhov en la década de 1960, capaces de generar una emisión tipo láser



La emisión resultante, si las condiciones planteadas han sido satisfechas, posee propiedades tales como coherencia y monocromaticidad. Experimentalmente, se han encontrado longitudes de coherencia del orden de  $200 \mu m$  para este tipo de sistemas. A diferencia de los láseres, la emisión mencionada carece de direccionalidad dado que no existe una dirección preferencial para el esparcimiento de la luz.

### 2.3. Células sanguíneas

La sangre es un tipo de tejido conjuntivo fluido especializado, con una matriz coloidal líquida, una constitución compleja y de un color rojo característico. Tiene una fase sólida (que incluye a los leucocitos, eritrocitos, plaquetas) y una fase líquida, representada por el plasma sanguíneo.

Las células sanguíneas son de varios tipos: los glóbulos rojos o eritrocitos, los glóbulos blancos o leucocitos están relacionados con el sistema de defensa contra agentes infecciosos, y las plaquetas o trombocitos necesarios para el proceso de coagulación.

### 2.4. Eritrocitos: su importancia en la salud

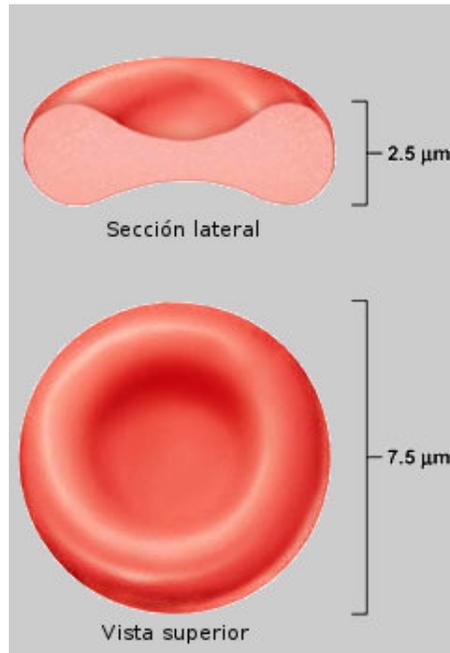
Los eritrocitos son células presentes en la sangre dedicadas exclusivamente al transporte de gases de la respiración: la hemoglobina, proteína presente en los eritrocitos, se une fácil y reversiblemente con el oxígeno. La mayor parte del oxígeno se distribuye por todo el cuerpo a través de esa proteína.

En una persona sana, la cantidad de eritrocitos presentes en la sangre es la siguiente:

- Mujeres:  $4 - 5 \times 10^6 \frac{\text{eritrocitos}}{\mu L}$
- Hombres:  $4.5 - 5.5 \times 10^6 \frac{\text{eritrocitos}}{\mu L}$

La forma y tamaño del eritrocito sano se muestran en la Fig. 2.5:

Los eritrocitos son de gran interés en análisis con técnicas espectroscópicas debido a que carecen de estructura interna, lo cual permite implementar diversos métodos



**Figura 2.5:** Forma y dimensiones de un eritrocito sano.

para analizar la luz que esparcen.

Al ser parte de un tejido biológico, los eritrocitos realizan sus funciones dentro de un intervalo de tiempo conocido como esperanza de vida, la cual en este caso es de 120 días. Durante este tiempo, se encuentran en un proceso natural de envejecimiento mientras circulan por el cuerpo. La reducción en sus funciones ocurre en la etapa final de este periodo, después son removidos del flujo sanguíneo por el sistema inmunológico. Un proceso similar ocurre mientras los eritrocitos son congelados en bancos de sangre, algunos reportes indican que bajo estas condiciones el proceso de envejecimiento es incluso más rápido [27].

## 2.5. Esparcimiento de la luz por células sanguíneas

Cuando una célula es iluminada, esparce luz en todas direcciones. La distribución espacial de la intensidad de la luz esparcida no es del todo aleatoria pues se forma un complejo patrón espacial de intensidades que depende de varias características

de la célula, tales como tamaño, forma, índice de refracción y morfología [28, 29]. El esparcimiento de la luz es una técnica experimental bien establecida y que ha ganado popularidad en el campo de la Biología debido a que se puede implementar como una técnica no invasiva de imagenología y detección.

El esparcimiento de la luz es comúnmente usado en los campos de materia condensada y Biología con el propósito de investigar la estructura y dinámica de los diferentes componentes que constituyen un determinado material: suspensiones de micro y nanopartículas, suspensiones de agentes biológicos tales como virus y bacterias, suspensiones de células sanguíneas (eritrocitos). Las células cuya membrana ha sido dañada esparcen mucho menos luz en comparación con las células sanas, esta propiedad se utiliza para diferenciar células vivas de muertas [14, 28].

En el ámbito biomédico, el esparcimiento de la luz es un prospecto prometedor en cuanto a imagenología no invasiva y monitoreo de ciertos padecimientos médicos sin la necesidad de aplicar, por ejemplo, dosis de radiación. Sin embargo, la interpretación de señales de esparcimiento es, con frecuencia, complicada, debido a la compleja naturaleza de los sistemas biológicos, en particular a la distribución y tamaño de organelos, así como al contenido de citoplasma pues los organelos y las fluctuaciones en el índice de refracción dentro de las células dan lugar a centros de esparcimiento. El citoplasma en los eritrocitos consiste en una solución de Hemoglobina (Hb) que se encuentra protegida por una membrana lipídica de 2 capas. Para el esparcimiento de la luz en eritrocitos es empleado para medir su tamaño y concentración de Hb [28, 30, 31].

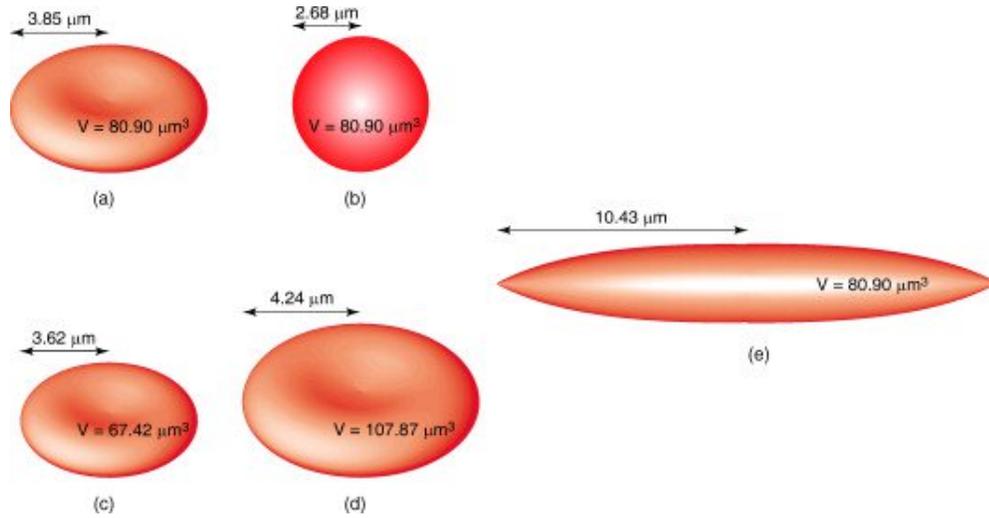
La sangre representa uno de los sistemas biológicos más interesantes para ser estudiado por medio de esparcimiento de luz. Esto debido a que está compuesta principalmente por glóbulos rojos (eritrocitos), los cuales representan aproximadamente el 45% de la sangre en volumen. Los eritrocitos contienen una densa solución de hemoglobina, la cual se cree es el componente principal para el esparcimiento y absorción de longitudes de onda en el rango espectral UV, azul y verde.

Diferentes técnicas han sido empleadas para medir propiedades de eritrocitos individuales, tales como esparcimiento de luz estático (SLS) para medir cambios en la forma del eritrocito en malaria. El esparcimiento de luz dinámico (DLS) se ha empleado para monitorear fluctuaciones en la membrana de los eritrocitos, cuyas propiedades elásticas y dinámicas se pueden relacionar con propiedades mecánicas y actividad metabólica. En la mayoría de las mediciones los eritrocitos permanecen en una posición fija.

Desde el punto de vista teórico, para el análisis del esparcimiento por eritrocitos se emplea diferentes tipos de análisis, principalmente teoría de Mie y aproximación Rayleigh-Gans Debye [29, 32–35]. De manera general, se asume un esparcimiento elástico tal que la longitud de onda no se modifica en el proceso de esparcimiento.

El esparcimiento de la luz por eritrocitos es de gran interés en áreas tales como la médica y biomédica debido a que la sección transversal de esparcimiento de estas células da información sobre la morfología y propiedades de la célula misma. Entonces, la medición de la sección transversal de esparcimiento puede ser usada para diagnosticar enfermedades que involucren la deformación de los eritrocitos. Algunos estudios para medir la sección transversal de esparcimiento en eritrocitos han mostrado que este fenómeno se presenta principalmente en backscattering [36]. Por otra parte, dado que los eritrocitos tienen forma de discos bicóncavos, las teorías de esparcimiento de la radiación, tal como la teoría de Mie, resultan insuficientes pues requieren de valores específicos correspondientes a partículas esféricas. Se ha reportado que la sección transversal de esparcimiento de los eritrocitos tiene valores muy próximos a los predichos por la teoría de Mie, en la que se suponen esparcidores esféricos de volumen idéntico a los eritrocitos y con índice de refracción homogéneo [35, 39–44].

Las deformaciones en los eritrocitos no sólo modifican su sección transversal de esparcimiento sino que, al verse modificados su volumen, su contenido proteínico también se ve afectado. Como consecuencia sus propiedades de fluorescencia también se podrían



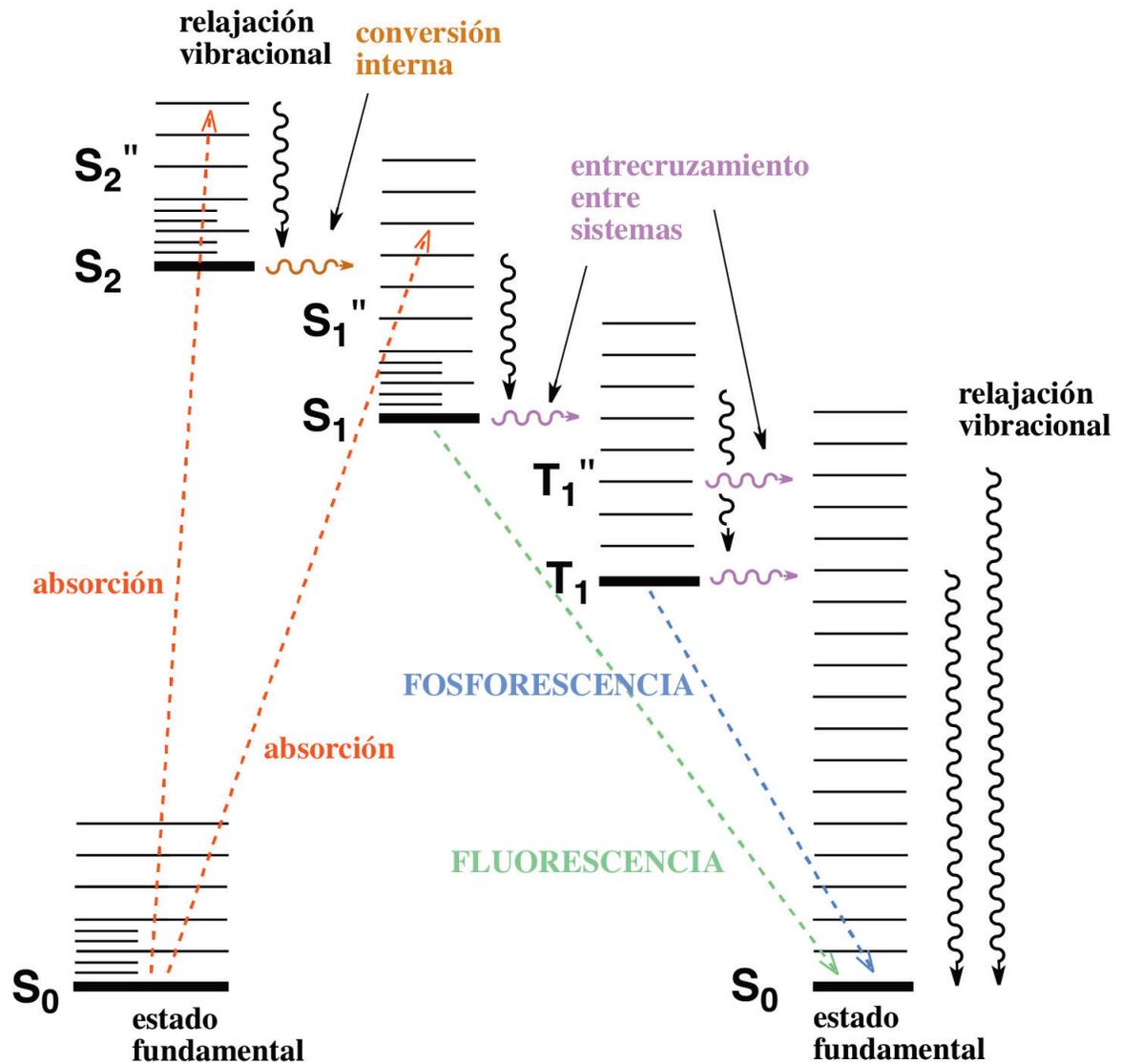
**Figura 2.6:** El esparcimiento de la luz depende de la sección transversal de esparcimiento de los eritrocitos: a) eritrocito sano. b) Eritrocito esférico. c) Microcito (disminución de volumen). d) Macrocito (aumento de volumen). e) Eritrocito alargado con el mismo volumen de eritrocito sano.

modificar.

## 2.6. Fluorescencia

Si un campo de radiación electromagnética incide sobre un sistema de partículas, o material, parte de la energía del campo puede ser absorbida. Como consecuencia, las partículas del sistema son capaces de alcanzar estados energéticos excitados. Cuando una partícula, o conjunto de partículas, logran alcanzar estados excitados permanecen en estos durante un intervalo de tiempo específico. Una vez transcurrido este tiempo, decaerán a su estado base. Si en el proceso de decaimiento se emite un fotón, entonces se le llama decaimiento radiativo y da lugar a un proceso de emisión de radiación.

Existen diversos procesos radiativos, uno de ellos es la fluorescencia. Este proceso tiene dos propiedades características: la longitud de onda emitida es mayor a la longitud de onda del campo de excitación y el tiempo de duración del proceso es del orden de nanosegundos (Fig. 2.7):



**Figura 2.7:** Diagrama de Jablonsky. Una partícula en su estado base  $S_0$  es capaz de, al absorber energía de un campo incidente, alcanzar estados excitados  $S_2, S_2', \dots$  los cuales se relajan hacia estados excitados menos energéticos  $S_1, S_1', \dots$  para después decaer el estado base por medio de un proceso radiativo o no radiativo.

En general, en un material la población de partículas en estados energéticos excitados es menor que en el estado base. Para lograr generar fenómenos como el láser es necesario satisfacer ciertas condiciones:

- i) La población de partículas excitadas debe ser mayor que aquellas que no lo

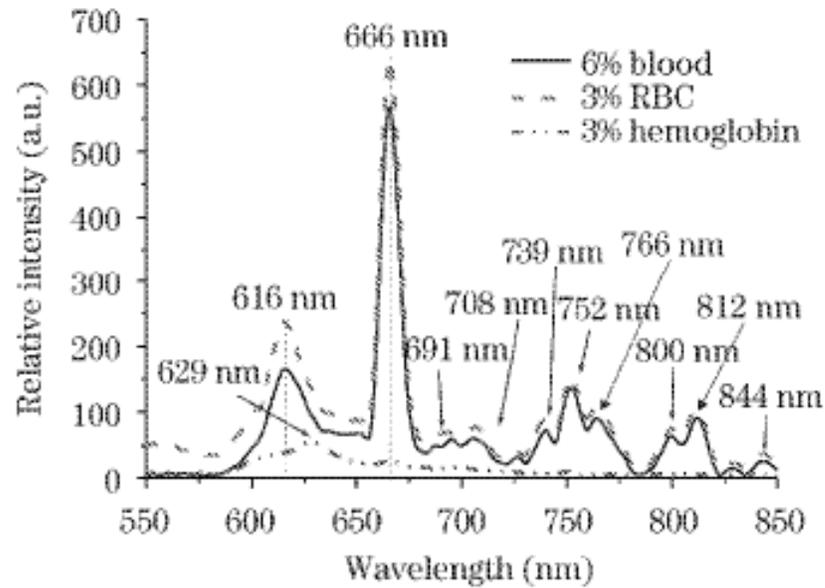
están.

- ii) Una vez satisfecha la condición anterior, los decaimientos hacia el estado base deben ser procesos radiativos estimulados.

En otras palabras, las condiciones mencionadas se refieren a que debe existir una inversión de población (i) para después, una vez alcanzado una energía umbral de laseo, sea posible generar una amplificación de la radiación vía emisiones estimuladas (ii).

Las cavidades resonantes maximizan la eficiencia de los procesos requeridos y, como consecuencia, generar láseres. Sin embargo, no son el único mecanismo. En este trabajo nos enfocamos en la generación de emisiones tipo láser sin necesidad de cavidades ópticas resonantes (láser aleatorio) en donde empleamos las propiedades de fluorescencia de un medio biológico: sangre entera.

En la Fig. 2.8 se muestran los espectros de fluorescencia característicos de la sangre entera y de los eritrocitos, se indican también las concentraciones empleadas para cada muestra:



**Figura 2.8:** Espectro de fluorescencia de la sangre con un láser de argón (de onda continua y baja intensidad, a  $\lambda = 457.9nm$ ). Al aislar eritrocitos y excitarlos, el espectro que emiten es prácticamente el mismo que emite la sangre entera. Las longitudes de onda donde se presentan los máximos de intensidad son iguales en ambos casos [37].

Este resultado nos muestra que los espectros emitidos por sangre entera y por eritrocitos únicamente son equivalentes.

## 2.7. Coherencia

Los procesos que dan lugar a emisiones estimuladas dan lugar a una propiedad del campo de radiación emitido conocida como Coherencia. Como se mencionó anteriormente, los fotones emitidos por procesos estimulados adquieren las mismas propiedades que los fotones incidentes, en particular el campo de radiación  $\hat{E}_i$ , que en conjunto generan un campo de radiación coherente  $\hat{E}$ .

De manera general, si un campo de radiación es coherente, significa que, una vez conocido un valor del campo  $\hat{E}$  en una región del espacio, entonces es posible determinar su valor en otros puntos del espacio. En la práctica, se estudia la coherencia

de los campos de radiación al analizar sus propiedades en dos diferentes direcciones: perpendicular a la dirección del frente de onda y en dirección paralela al mismo. En el primer caso se tiene coherencia espacial y en el segundo coherencia temporal [24].

Los láseres aleatorios son dispositivos que emiten radiación parcialmente coherente. En particular, la coherencia de los láseres aleatorios es temporal [15–17].

En un campo de radiación temporalmente coherente, los planos de fase se mueven a la velocidad de propagación del mismo campo y si se observan desde un punto del espacio a un tiempo  $t_0$ , se verá que el campo  $\hat{E}$  oscila uniformemente en el tiempo sin interrupción ni cambios de fase. De esta forma, un observador podrá determinar el valor del campo para un tiempo posterior  $t + \delta t$ . De aquí que esta propiedad se conozca como coherencia temporal.

El grado de coherencia temporal está determinado por la duración finita de la emisión o por cambios de fase. Los parámetros correspondientes a la coherencia temporal son los siguientes:

- Tiempo de coherencia  $\tau_c$ . Se refiere al tiempo promedio en el que ocurren dos cambios de fase continuos.
- Longitud de coherencia  $l_c$ . Es la distancia recorrida entre 2 cambios de fase continuos.

En el vacío, la relación de coherencia es:

$$l_c = c_0 t_c, \quad (2.4)$$

en donde  $c_0$  es la velocidad de la luz en el vacío. El tiempo de coherencia  $\tau_c$  está relacionado con la frecuencia del campo como se muestra a continuación:

$$\tau_c \sim \frac{1}{\Delta\nu}, \quad (2.5)$$

siendo  $\Delta\nu$  el ancho de banda de la emisión. De manera general, la coherencia temporal depende del perfil espacial del campo.

---

# Capítulo 3

## Desarrollo experimental

En este capítulo se describen los experimentos realizados, los dispositivos empleados y las configuraciones bajo las cuales operaron. El desarrollo experimental consistió en: diseño y preparación de coloides con nanopartículas de diferentes materiales dieléctricos como medio esparcidor, caracterización de la estabilidad espacial y temporal del campo de radiación esparcido por los coloides fabricados al ser excitados ópticamente, adición de células sanguíneas a los coloides para determinar cómo cambian las propiedades ya conocidas y caracterización de las propiedades del campo de radiación emitido por los coloides con sangre.

### 3.1. Diseño y preparación de coloides

Los coloides deben tener una composición tal que les permita representar un volumen óptimo de medio desordenado, es decir, que al ser excitados generen el fenómeno láser aleatorio. En primer lugar, preparamos coloides formados por nanopartículas dieléctricas como medio esparcidor,  $SiO_2$  y  $TiO_2$ , con las características que se muestran en la tabla 3.1

**Tabla 3.1:** Nanopartículas empleadas como medio esparcidor.

Material	Diámetro (nm)	Concentración ( $\frac{np}{ml}$ )
$SiO_2$	203	$1.26 \pm 0.18 \times 10^{12}$
$TiO_2$	430	$1.0 \pm 0.1 \times 10^{12}$

*Nota: la dispersión en tamaño de las nanopartículas empleadas fue del 16%*

En los 3 casos utilizamos rodamina 6G como medio activo a una concentración de  $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ , tal como se muestra en la Fig. 3.1. Para determinar si estos coloides funcionaban como láseres aleatorios fue necesario medir las propiedades espaciales y temporales del campo de radiación que emiten al ser excitados ópticamente (descripción en la siguiente sección).

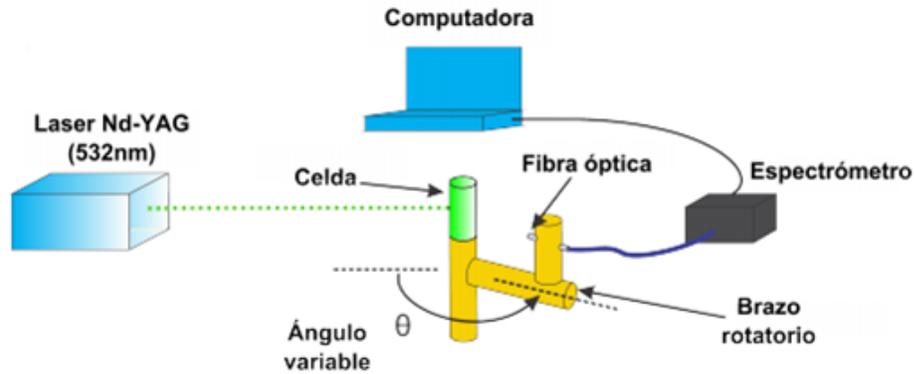


**Figura 3.1:** Coloides empleados en los experimentos.

## 3.2. Caracterización del campo emitido

La fuente de excitación fue un láser Nd:YAG en su segundo armónico ( $\lambda = 532 \text{nm}$ ,  $P = 1.5 \text{W}$ ), de 7 ns de ancho temporal a una tasa de repetición de 10 pulsos por segundo. Se montó un brazo rotatorio con la finalidad de sostener y desplazar una fibra óptica de 1 mm de diámetro de apertura colocada a una distancia de 150 mm de la superficie del medio aleatorio y sobre el plano que contenía a los pulsos incidentes (Fig. 3.2). La fibra óptica se conectó a un espectrómetro Ocean Optics HR2000, el cual, a su vez, estaba conectado a una computadora con el software de análisis espectroscópico *Overture* (perteneciente a Ocean Optics). La resolución en longitud de onda del espectrómetro fue de 0.13 nm, dentro de un rango espectral que va de los 200 a los 1200 nm. Se midieron las propiedades espectrales del campo emitido por el coloide: longitud de onda central de emisión  $\lambda_0$ , ancho espectral a media altura  $\Delta\lambda$

(FWHMM, por sus siglas en inglés), factor de calidad  $Q$  e Intensidad del campo de esparcimiento  $I$ . De esta forma se caracterizó la estabilidad espacial y temporal del campo de radiación emitido por los coloides.



**Figura 3.2:** Arreglo experimental para medir propiedades espectroscópicas del campo emitido por el coloide. Por medio de un espectrómetro de alta resolución se obtuvieron perfiles espectrales que permitieron medir algunas propiedades del campo de esparcimiento

### 3.3. Coloides con sangre

El siguiente paso es añadir sangre entera a los coloides fabricados así como identificar los cambios en las propiedades del espectro de radiación emitido. Cuando a los coloides se les añaden células sanguíneas, en particular eritrocitos, se vuelven sistemas dinámicos, es decir, sus propiedades cambian con el tiempo debido a que los eritrocitos se van degradando, debido a la hemólisis.

Debido al efecto de hemólisis que presentan los eritrocitos, fue necesario diseñar coloides tales que mantuvieran estables a los eritrocitos, en otras palabras, que retardaran el efecto de hemólisis. En consecuencia, fue necesario encontrar un solvente que retrase el proceso mencionado. Utilizamos diferentes proporciones de agua destilada, metanol y solución salina con tal propósito (véase Tabla 3.2).

Analizamos la interacción de la sangre con cada uno de los elementos que componen el medio. En primer lugar, se observó cómo se comportan las células sanguíneas en la solución 1:1v agua-metanol. Es de particular interés observar el proceso de hemólisis y, de acuerdo a la literatura, el agua destilada disminuye el intervalo de tiempo en que este proceso ocurre. Por este motivo, se decidió hacer coloides de solución salina y metanol a diferentes concentraciones, esto para identificar la solución adecuada para llevar a cabo los experimentos. La solución buscada debe permitir el proceso de hemólisis en intervalos de tiempo de, al menos, 10 minutos. Se hicieron observaciones de microscopía óptica para identificar la solución adecuada para los experimentos. Las concentraciones de solución salina-metanol que hemos utilizado, en volumen, son: 50:50, 80:20, 90:10.

**Tabla 3.2:** Solventes para eritrocitos.

Solvente	Agua destilada	Metanol	Solución Salina
Proporción	50	50	0
Tiempo de hemólisis (min)	5	1	30

### 3.4. Láser aleatorio con sangre

Una vez identificadas las condiciones bajo las cuales los eritrocitos permanecen estables durante un intervalo de tiempo suficiente para analizarlos, procedimos a excitar los coloides. En primer lugar iluminamos con una fuente de luz blanca, obtuvimos el espectro de fluorescencia cuando la sangre representa el 5 %, 10 % y 15 % del volumen total del coloide. Después, añadimos nanopartículas de  $SiO_2$  como medio esparcidor al coloide, excitamos con pulsos láser a distintas energías con la finalidad de identificar cuando se produce laseo y, también, si el campo emitido representa una emisión de tipo láser aleatorio.

En todos los coloides analizados, para evitar capturar luz proveniente de reflexiones de los pulsos incidentes sobre la celda que contenía al medio aleatorio (no proveniente por el esparcimiento dentro del mismo medio) se inclinó la fibra óptica para que la luz reflejada no fuera capturada directamente.

Para el caso del análisis de los coloides con nanopartículas y Rodamina 6G sin sangre, se hicieron mediciones en cuatro direcciones distintas:  $30^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$  y  $120^\circ$ . Pues de acuerdo a los antecedentes, las propiedades de los láseres aleatorios no dependen de la dirección de observación (excepto la intensidad el campo de esparcimiento). En cuanto a los coloides sanguíneos, las mediciones se hicieron a una dirección de  $10^\circ$ , pues en direcciones mayores la intensidad de los espectros era muy similar al ruido que tiene de fondo el espectrómetro usado. Los datos de cada espectro registrado se obtuvieron con 50 promedios de la integración de la señal del espectrómetro durante 100 ms. Es decir, se promedió 50 veces la señal registrada por el espectrómetro de la luz proveniente de un único pulso del láser de excitación.

---

## Capítulo 4

# Fabricación del coloide: caracterización del medio aleatorio y del campo de radiación emitido. Resultados y análisis.

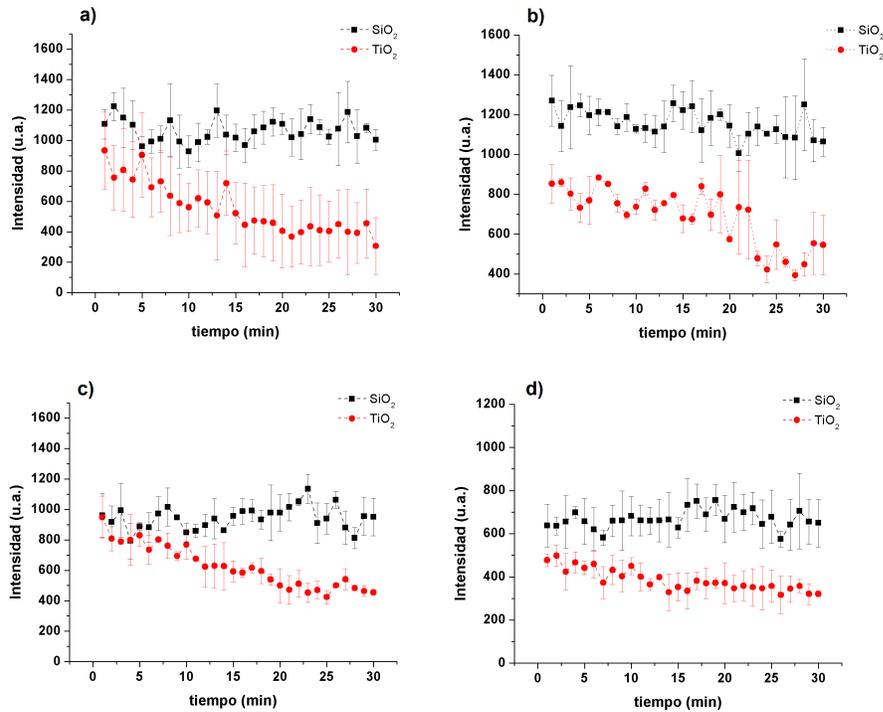
En este capítulo se explica el proceso de fabricación y diseño de un coloide. La finalidad de los experimentos realizados fue obtener un medio aleatorio que represente un volumen óptimo de tal forma que al ser excitado, adecuadamente, de lugar a un láser aleatorio.

Una característica importante del medio aleatorio buscado es que permita a células sanguíneas, en particular, a eritrocitos, ser parte del volumen óptimo sin degradarse, al menos durante el tiempo de caracterización del coloide.

### 4.1. Medio esparcidor

El primer paso para diseñar nuestros coloides consistió en identificar qué tipo de nanopartícula, al ser utilizada como medio esparcidor, da lugar a un campo de esparcimiento estable (longitud de onda central, ancho espectral, intensidad, etc.).

Excitamos ópticamente los coloides con un láser Nd:YAG, en su segundo armónico ( $\lambda = 532$  nm, ancho temporal de 7 ns, 10 pulsos por segundo) con una energía de 19.39 mJ por pulso. Dado que las propiedades del campo esparcido no dependen de la dirección de observación [? ], con el espectrómetro medimos las propiedades de la luz emitida en direcciones comprendidas entre  $30^\circ$  y  $120^\circ$ , respecto a la dirección de propagación del haz de excitación. Al analizar la porción de la emisión en las direcciones señaladas, para las nanopartículas de  $SiO_2$   $TiO_2$  encontramos lo siguiente:



**Figura 4.1:** Estabilidad temporal de la intensidad del campo esparcido por nanopartículas de  $SiO_2$  y  $TiO_2$  en diferentes direcciones de observación: a)  $30^\circ$ , b)  $60^\circ$ , c)  $90^\circ$ , d)  $120^\circ$ . El campo de esparcimiento presentó una mayor estabilidad en su intensidad para el caso en el que el medio esparcidor fue de nanopartículas de  $SiO_2$ .

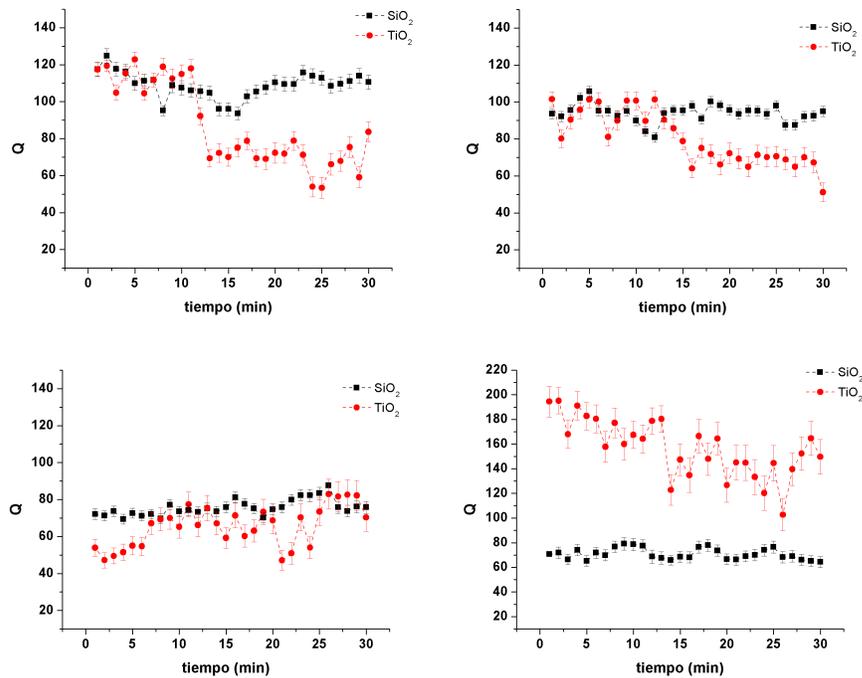
En la Fig. 4.1 se observa una mayor estabilidad en el valor de la intensidad para el campo esparcido por nanopartículas de  $SiO_2$ . En el caso de las nanoártículas de  $TiO_2$  se obtuvo una disminución en la intensidad del campo a lo largo de las observaciones. Esto puede deberse al un depósito de nanopartículas de  $TiO_2$  en la celda

que las contenía, no así en el caso de  $\text{SiO}_2$ .

El análisis del comportamiento de la longitud de onda central  $\lambda$  del campo de esparcimiento así como del ancho espectral  $\Delta\lambda$  nos permitieron cuantificar un factor de calidad  $Q$  (Eq. 4.1):

$$Q \approx \frac{\lambda}{\Delta\lambda}, \quad (4.1)$$

así como los cambios de este factor durante un periodo de 30 minutos tanto para nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  como para las de  $\text{TiO}_2$ . los resultados se muestran en la Fig. 4.2.

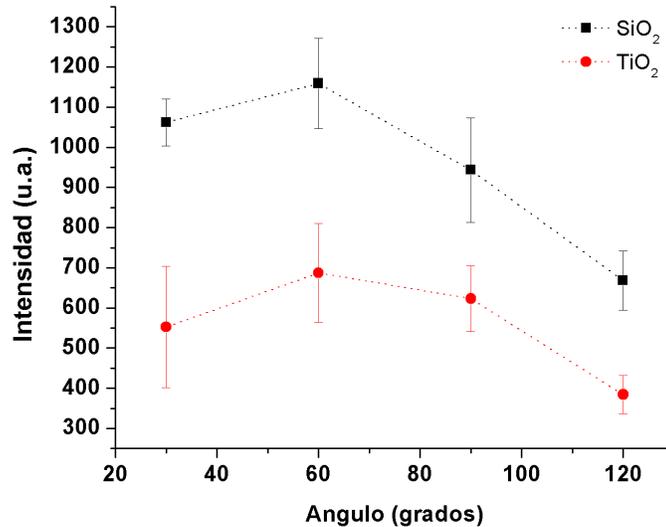


**Figura 4.2:** Estabilidad temporal del factor de calidad  $Q$  para diferentes direcciones de observación: a)  $30^\circ$ , b)  $60^\circ$ , c)  $90^\circ$ , d)  $120^\circ$ . El factor de calidad tiene, en general, un comportamiento más estable para el campo de esparcimiento por nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ , presenta menos fluctuaciones que en el caso correspondiente a nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ .

El factor de calidad es un parámetro importante pues nos indica la estabilidad tanto

de la longitud de onda característica del campo esparcido por diferentes materiales, en este caso nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  y  $\text{TiO}_2$ . El factor Q presenta mayor estabilidad cuando el medio esparcidor está compuesto de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  pues la longitud de onda característica se encuentra en  $\lambda_{\text{SiO}_2} = 668.36 \pm 0.51\text{nm}$ , mientras que en el caso de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  se tiene  $\lambda_{\text{TiO}_2} = 568 \pm 1.39\text{nm}$ . De igual forma los anchos espectrales son  $\Delta\lambda_{\text{SiO}_2} = 4.88 \pm 1.84\text{nm}$  y  $\Delta\lambda_{\text{TiO}_2} = 5.63 \pm 2.57\text{nm}$ , respectivamente.

Se hizo una comparación del comportamiento de la intensidad del campo de esparcimiento como función del ángulo de medición, y no del tiempo. Los resultados para ambos casos se muestran en 4.3.



**Figura 4.3:** Intensidad del campo de esparcimiento como función del ángulo de medición. Para ambos tipos de nanopartículas se observa un comportamiento similar. Sin embargo, la intensidad del campo esparcido por nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  es mayor que la intensidad correspondiente al caso de  $\text{TiO}_2$  en todas las direcciones medidas.

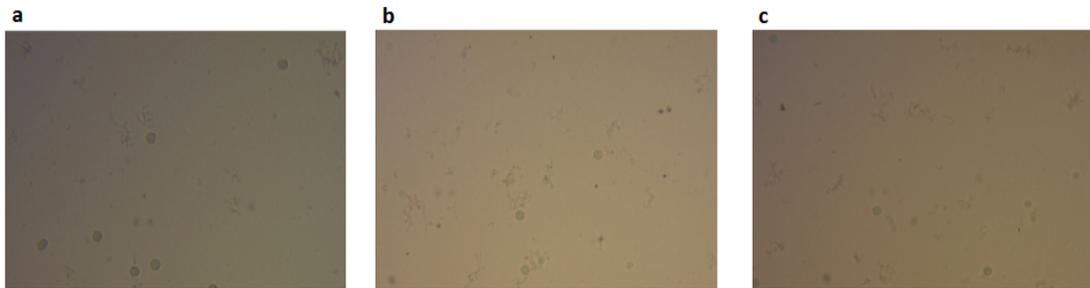
De los resultados mostrados en las Fig. 4.1 - 4.3 se tiene que el campo esparcido por nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  presenta mayor estabilidad tanto en intensidad como en el factor de calidad Q. Además no se presentó un depósito de nanopartículas durante el desarrollo de los experimentos, lo cual sí ocurrió cuando en el caso de

nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . Por lo tanto, las nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  se emplearán como medio esparcidor de los coloides sanguíneos que se busca fabricar.

## 4.2. Comportamiento de eritrocitos en diferentes solventes

En el Laboratorio de Imagenología Biomédica hemos caracterizado previamente coloides capaces de producir láser aleatorio. Sin embargo, ahora necesitamos que el solvente mantenga a las células sanguíneas estables. Es por ello que, en primer lugar, analizamos el comportamiento de las células sanguíneas en una solución 50:50v agua destilada - metanol, vía microscopía óptica (Fig. 4.4).

*Nota: las imágenes obtenidas por microscopía óptica corresponden a un área de  $0.05\text{mm}^2$*

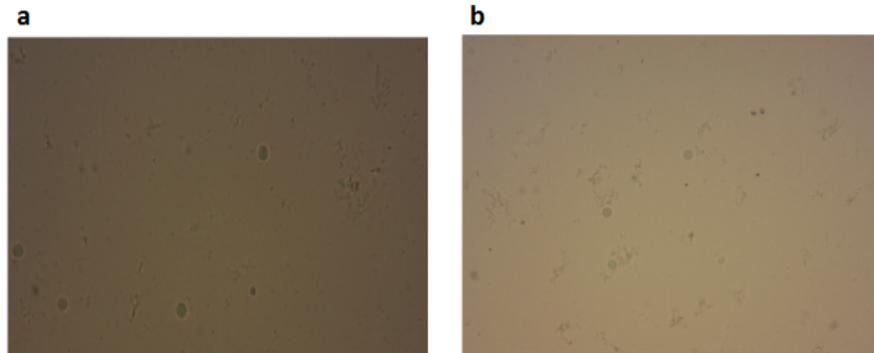


**Figura 4.4:** Eritrocitos en solución 50:50v agua destilada-metanol. En esta concentración podemos observar una baja densidad de eritrocitos, muchos de ellos lisados.

Notamos que la concentración 50:50v agua-metanol produce en los eritrocitos el proceso de hemólisis, es decir, esta solución no es adecuada para mantener eritrocitos estables, ya que promueve la liberación del contenido proteínico de dichas células. Dado que es de nuestro interés mantener a los eritrocitos como parte del medio aleatorio, es necesario modificar tanto los solventes empleados así como las concentraciones relativas entre ellos.

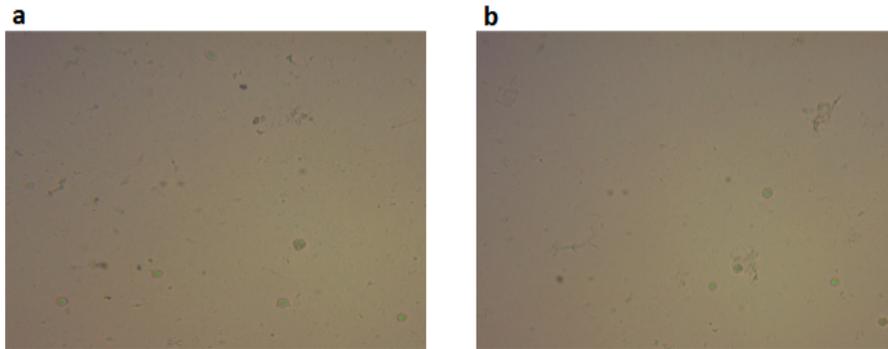
En general, para estudiar eritrocitos, las sustancias más comunes para mantener-

los estables son anticoagulantes y soluciones isotónicas. Al añadir solución salina ( $NaCl$ ), a una concentración de  $0.009 \frac{g}{ml}$ , como parte del solvente, encontramos los siguientes resultados:



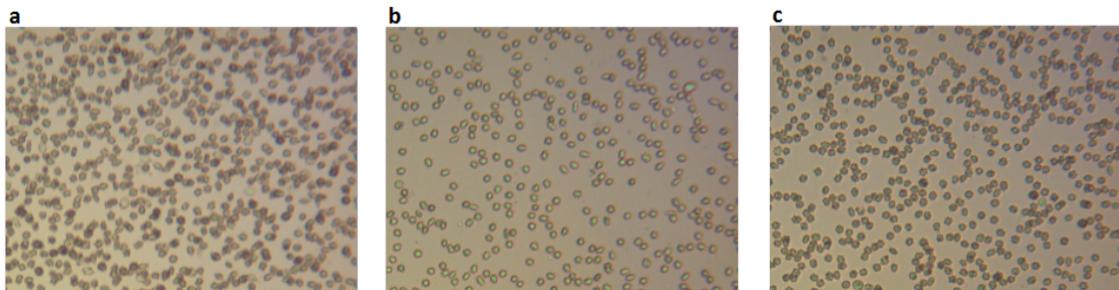
**Figura 4.5:** Eritrocitos en solución agua destilada-metanol-solución salina (40:40:20v). Bajo esta concentración, no se observan cambios significativos en la densidad de eritrocitos con respecto a la solución agua destilada-metanol.

Se observó también hemólisis en este caso (Fig. 4.5). Sin embargo, dado que la solución salina es prácticamente sólo agua, prescindimos del agua destilada como parte del solvente. Pero primero observamos el comportamiento de los eritrocitos cuando se encuentran únicamente en agua destilada:



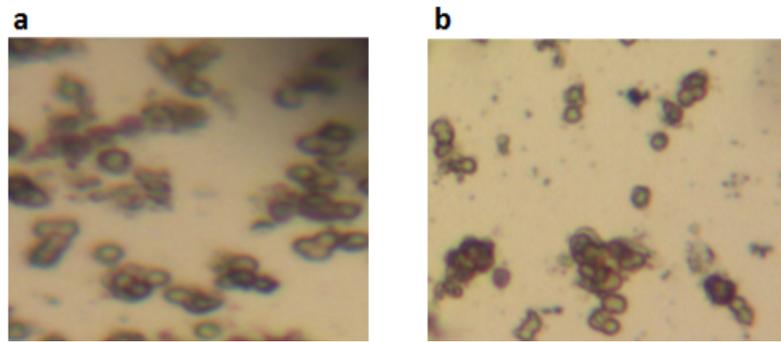
**Figura 4.6:** El agua destilada propicia un rápido proceso de lisado, en las imágenes se muestran eritrocitos en  $t= 1$  min (a) y  $t= 5$  min (b), a partir del momento en que entran en contacto con agua.

Una vez observado el comportamiento de los eritrocitos en agua destilada (Fig. 4.6), notamos que, efectivamente, podemos sustituirla por solución salina. Los eritrocitos tienden a romperse en este medio debido a la diferencia de concentración de sales dentro y fuera de la célula. El agua destilada no contiene sales, por lo cual el eritrocito tiende a absorberla para disminuir la concentración de sal que contiene, sin embargo, al absorber agua se infla y termina por romperse, es decir, el agua destilada representa una solución hipotónica. La hipótesis a partir de estas observaciones, es que la solución salina, al ser una solución isotónica, mantendrá a los eritrocitos con una estabilidad comparablemente mayor en relación a las soluciones previas que se han empleado. En primer lugar, se presentan las observaciones realizadas para eritrocitos en solución salina-metanol en una proporción 90:10, respectivamente.



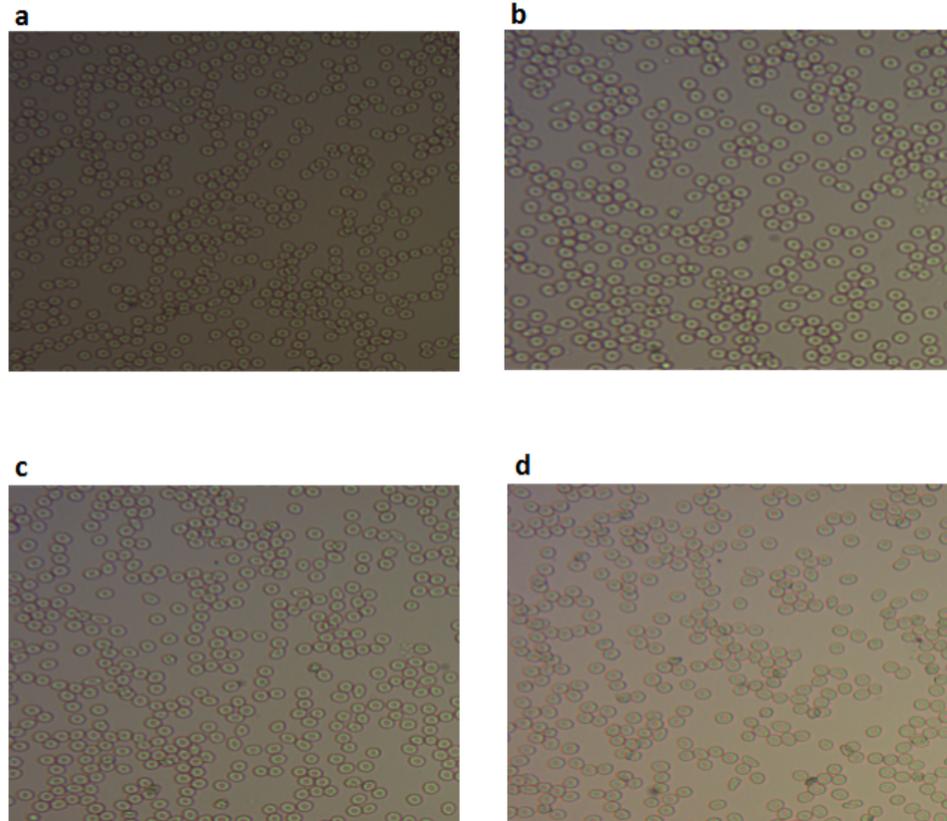
**Figura 4.7:** En solución salina-metanol, observamos que los eritrocitos se deforman después de 30 minutos de observación, sin embargo, la hemólisis no se presenta como en los casos anteriores.

Cuando los eritrocitos se encuentran en solución salina-metanol (Fig. 4.7), el proceso de hemólisis no se presenta de manera inmediata como en los casos anteriores. Esta solución nos permite tener eritrocitos hasta por 30 minutos, sin embargo, se encuentran degradados. Debido a que nos interesa mantener a los eritrocitos estables el mayor tiempo posible, consideramos emplear solución salina como único solvente. En este caso también decidimos observar qué es lo que ocurre cuando los eritrocitos se encuentran disueltos únicamente en metanol:



**Figura 4.8:** Comportamiento de los eritrocitos en metanol. Pudimos observar que el metanol también promueve un rápido proceso de lisado (hay hemólisis). Se muestran imágenes de eritrocitos en a)  $t= 3$  min y b)  $t= 8$  min de observación.

Después de observar el comportamiento de eritrocitos en agua destilada y metanol (Fig. 4.8), concluimos que lo más adecuado sería emplear una solución isotónica como solvente.



**Figura 4.9:** Eritrocitos en solución salina: a)  $t = 4$  min, b)  $t = 9$  min, c)  $t = 12$  min,  $t = 30$  min.

De las figuras 4.7 y 4.9, se puede observar un comportamiento de los eritrocitos es similar en ambas soluciones. Sin embargo, en solución salina-metanol, los eritrocitos parecen disminuir su volumen y se pueden observar con irregularidades en su superficie, no así cuando se encuentran en solución salina únicamente. Esta diferencia se debe a que la solución salina representa una solución isotónica, es decir, la concentración de soluto dentro y fuera de la célula es la misma, por lo que el volumen y la forma de estas no se ve alterada. En el caso de la figura 4.7 tenemos una solución hipertónica, es decir, existe mayor concentración de soluto fuera de la célula. En este caso, la célula libera agua y se contrae hasta alcanzar una concentración de soluto igual a la que hay en el medio que la rodea. Es común que en este segundo caso las células mueran por deshidratación. En el caso de la Fig. 4.6, se tiene una solución hipotónica, es decir, la concentración de soluto fuera de la célula es mayor que dentro

de la misma, en este caso la célula absorbe agua para disminuir su concentración de soluto, por lo que aumenta su volumen y, en este caso, se rompe la pared celular liberando el contenido de la célula.

De la caracterización del solvente se concluye lo siguiente: no se presentan cambios en el volumen celular, por al menos 30 minutos, cuando los eritrocitos se encuentran en solución isotónica de NaCl al 0.9% ( $C = 0.154M$ ). Si empleamos mezclas de agua destilada y metanol, se presenta disminución en el volumen celular, además de hemólisis incompleta. Por otro lado, en el agua destilada se presenta una hemólisis completa debido a que este solvente presenta propiedades hipotónicas ??.

### 4.3. Medio Aleatorio

Con base en los resultados obtenidos hasta ahora, el medio aleatorio en el cual los eritrocitos formarán parte, debe tener las siguientes características:

- El medio esparcidor debe estar compuesto por nanopartículas de  $SiO_2$  para lograr una emisión de radiación estable.
- El solvente debe ser solución salina, esto con la finalidad de mantener a los eritrocitos estables la mayor cantidad de tiempo posible.

La solución agua destilada-metanol se emplea principalmente porque favorece una distribución homogénea de las nanopartículas en el coloide. Al emplear solución salina, que es prácticamente agua, como único solvente, surgió la tarea de asegurar una disolución completa de las nanopartículas, de tal forma que su distribución fuera homogénea. Para ello, una vez preparádos los coloides, los sometimos a un baño ultrasónico (Limpiador ultrasónico Branson 200, a una frecuencia de 40 kHz) para destruir cualquier cúmulo de nanopartículas que pudiera estar presente. No se presentaron cúmulos mientras realizamos los experimentos ni tampoco se presentó un depósito de nanopartículas.

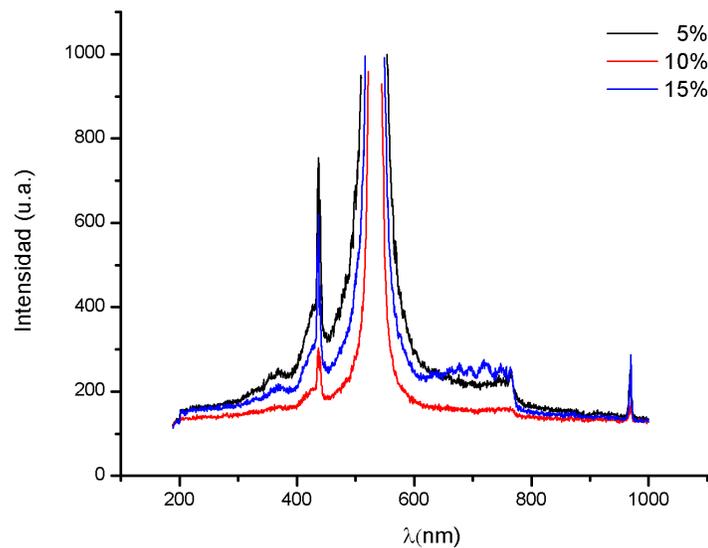
De esta forma, las nanopartículas estaban disueltas y distribuidas uniformemente en el coloide. No hubo depósitos de nanopartículas durante el tiempo que duraron los experimentos.

## 4.4. Fluorescencia de sangre

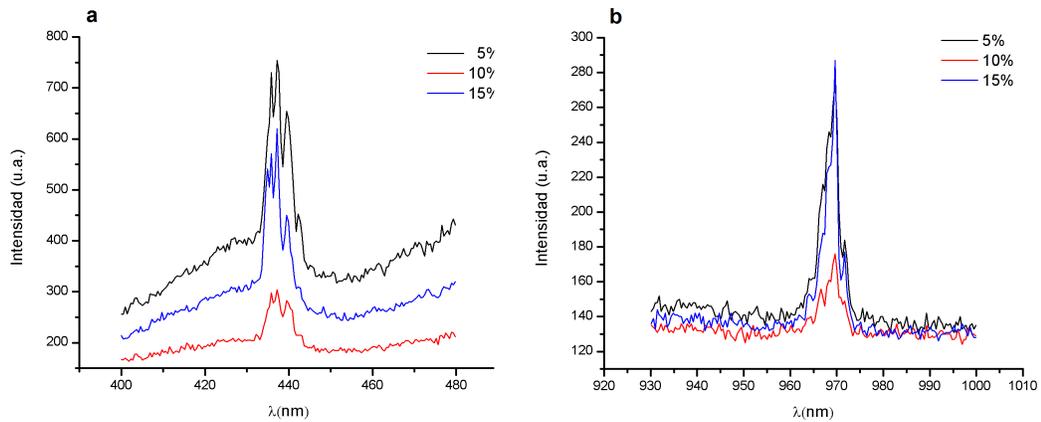
El papel de la sangre en nuestros coloides consiste en ser el medio activo, es decir, la sangre es el absorbente saturable que, debido a sus propiedades de fluorescencia, dará lugar a procesos radiativos. Por lo tanto, debemos identificar las condiciones a las cuales estas propiedades son observables y cuantificables.

### 4.4.1. Espectro de fluorescencia en sangre entera

Una vez encontrado el solvente más conveniente para realizar nuestros experimentos, medimos el espectro de fluorescencia de coloides con diferentes concentraciones de sangre, esto para determinar la concentración en la cual se puede identificar el espectro de fluorescencia y medir sus propiedades.



**Figura 4.10:** Espectro de fluorescencia de la sangre al ser excitada con pulsos láser ( $E= 17.96$  mJ. Los coloides se hicieron con diferentes concentraciones de sangre sin nanopartículas: 5 %, 10 %, 15 %. En el espectro correspondiente al 5 % de concentración se definen mejor los máximos de intensidad, en  $\lambda = 437nm$  y  $\lambda = 970nm$  respectivamente.



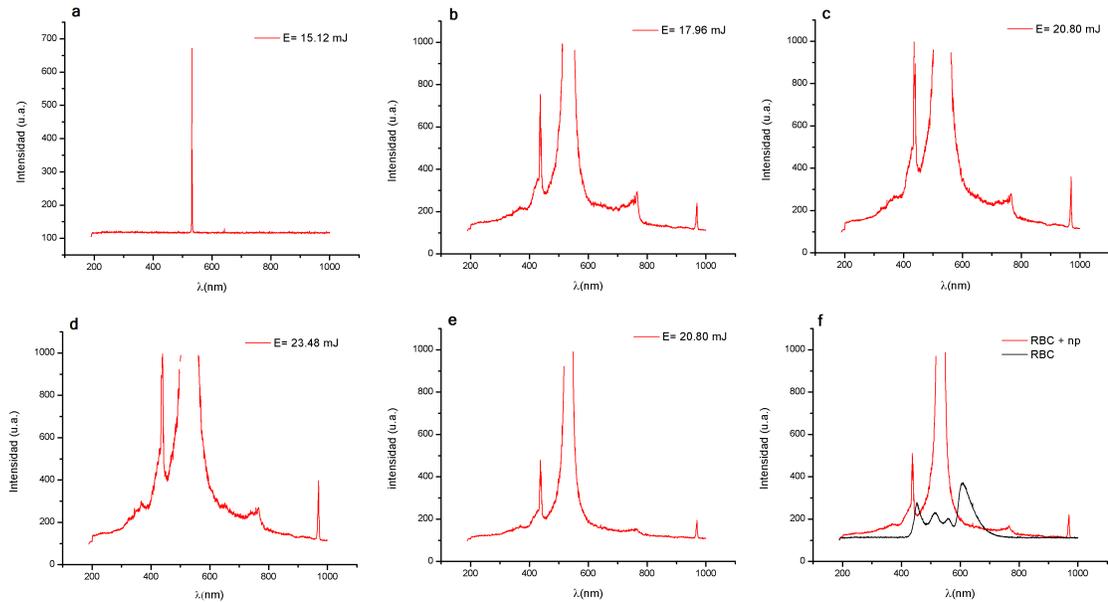
**Figura 4.11:** Al excitar la sangre con pulsos láser, se tienen máximos de emisión en: a)  $\lambda = 437nm$ , b)  $\lambda = 970nm$

Al excitar los coloides con pulsos láser notamos que los máximos de fluorescencia característicos de la sangre reducen su ancho espectral y aumenta su intensidad de emisión. Además, la concentración de sangre, en la cual estos máximos de intensidad se aprecian mejor, es del 5%. Pudimos observar también un máximo de intensidad en la región del infrarrojo que no se presenta cuando hacemos fluorescer la sangre con una fuente de luz blanca (Fig. 4.10 y 4.11).

## 4.5. Caracterización del campo de radiación emitido

Una vez concluido el diseño del medio aleatorio, queda pendiente identificar, si existe, un umbral de energía al cual el campo de radiación emitido adquiere propiedades tipo láser. De esta manera comprobaremos si nuestro coloide representa un volumen óptimo de medio aleatorio capaz de generar un láser aleatorio. Para ello excitamos el coloide con pulsos láser, como se describe en la sección anterior, y medimos el espectro de emisión.

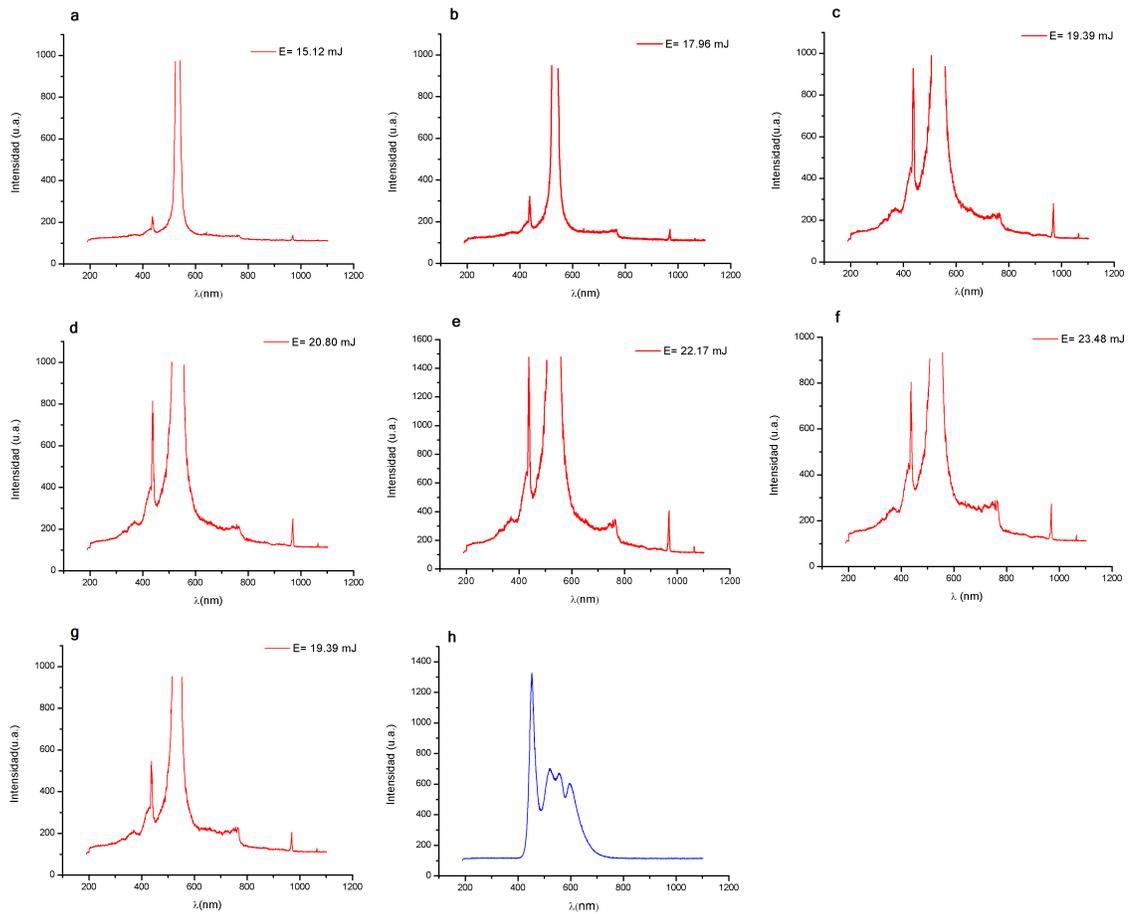
## Campo de radiación emitido por coloides con nanopartículas de 600 nm de diámetro



**Figura 4.12:** Espectros de emisión de coloides cuyo medio esparcidor consiste en nanopartículas de 600 nm de diámetro a distintas energías: a)  $E = 15.12$  mJ, b)  $E = 17.96$  mJ, c)  $E = 22.80$  mJ, d)  $E = 23.48$  mJ, e)  $E = 22.80$  mJ, f) Comparación entre los espectros cuando el coloide contiene nanopartículas y cuando no las contiene.

En este caso se pudo observar la presencia de dos máximos de intensidad cuando el coloide se estimula con pulsos de energía  $E = 17.86$  mJ o mayores. Esta energía representa un umbral de respuesta para este coloide sanguíneo.

## Campo de radiación emitido por coloides con nanopartículas de 200 nm de diámetro



**Figura 4.13:** Espectro de emisión del coloide con nanopartículas de 200 nm para distintas energías: a partir de  $E = 17.96$  mJ (b) se detecta una respuesta del coloide, en  $E = 22.17$  mJ (e) la intensidad de los máximos de emisión decae. Al volver a excitar con  $E = 19.39$  mJ no se obtiene la misma respuesta que cuando se excitó por primera vez con esa energía (g). Se muestra el espectro del coloide al iluminar con luz blanca (h).

Al comparar los espectros característicos de los coloides con nanopartículas de 600 nm y 200 nm (Figs. 4.12 y 4.13), se puede notar que, en el segundo caso, la respuesta de las nanopartículas permite la formación de dos picos de emisión característicos. Esto se consigue con energías por pulso desde los 17.96 mJ. Notamos también que si pulsos de 23.48 mJ inciden al excitar nuevamente con pulsos de 22.80 mJ y 19.39 mJ por segunda ocasión, los picos característicos, si bien se forman, no tienen la misma intensidad inicial. Esto nos conduce a la idea de que los eritrocitos en los coloides se degradan, pierden sus propiedades y es por ello que no obtenemos los mismos máximos de intensidad.

Los resultados obtenidos a lo largo de estos experimentos han arrojado información tanto de los eritrocitos como del medio en el que se encuentran: solución y medio esparcidor. A continuación se resumen los resultados más importantes obtenidos hasta ahora.

Los eritrocitos, al ser un medio biológico, requieren de un medio con condiciones específicas para mantenerlos sin degradarse, o al menos que no lo hagan durante su análisis. Una de las características que debe tener el medio es que sea una solución isotónica es decir, que la concentración de sal que contiene sea igual a la que contiene el eritrocito. Es por ello que el disolvente adecuado para nuestros coloides es la solución salina. Encontramos también que las nanopartículas de  $SiO_2$ , como medio esparcidor, permiten una emisión de campo de radiación más estable, tanto espacial como temporalmente, que el emitido cuando los esparcidores son nanopartículas de  $TiO_2$ . La concentración óptima de sangre es del 5 %, de esta manera logramos producir un volumen óptimo de medio aleatorio que al ser excitado con pulsos láser emite radiación, la cual posee 2 máximos de intensidad muy característicos. Trabajamos con 2 tamaños de nanopartícula pero en ambos casos ambos picos característicos resultaron ser los mismos, sin embargo, las nanopartículas de 200 nm hacen observable este fenómeno a energías de excitación menores que en el caso de nanopartículas de 600 nm. En ambos casos notamos que después de excitar con pulsos de energía  $E=23.48$  mJ, los máximos de intensidad característicos pierden intensidad y además se ensanchan. Este último resultado nos indica que los eritrocitos han sido dañados, en

particular, su potencia de esparcimiento se ha modificado y es por ello que la intensidad de emisión disminuye. Esta energía límite es consistente con la máxima energía recomendada para el uso de láseres en tejidos, es decir, se encuentra en el límite de lo recomendado ( $\approx 20 - 30mJ$ ) [45, 46]. Este resultado nos indica lo siguiente:

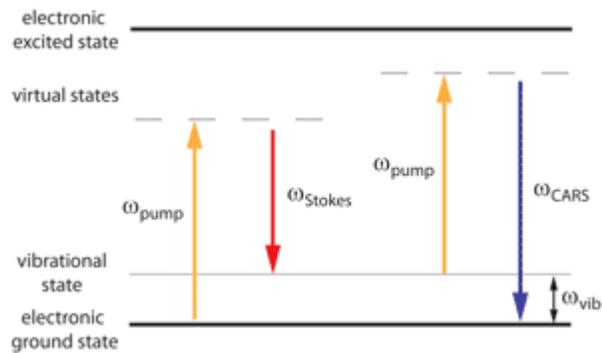
*La energía  $E= 23.48 mJ$  representa un umbral de daño a los eritrocitos. Como consecuencia el espectro esparcido por el coloide sanguíneo, en particular sus máximos de emisión, disminuye su intensidad.*

Un resultado que nos llama particularmente la atención es precisamente la región del espectro en la cual se emite uno de los máximos de intensidad de nuestro coloide. Como se ha mencionado a lo largo de la discusión, obtenemos un máximo de intensidad alrededor de los  $437nm$ , sin embargo, dado que la longitud de onda de excitación es de  $532nm$ , la emisión obtenida es inesperada.

El hecho de obtener una emisión cuya longitud de onda es menor que la de excitación, indica que la emisión es más energética. Esto, en primera instancia, supone una contradicción al principio de conservación de la energía. Pero eso no es posible. Existe un mecanismo que justifica la emisión radiación que obtuvimos en nuestros experimentos, el cual se conoce como efecto anti-Stokes.

Las emisiones anti-Stokes pueden encontrarse como consecuencia de procesos multifotónicos, en este caso se podría estar teniendo un proceso de absorción de 2 fotones y emisión también de 2 fotones (uno Stokes y otro anti-Stokes) debido a la interacción de los pulsos de excitación con la hemoglobina en la sangre, la cual es la responsable de las propiedades de fluorescencia [47–49]. Este resultado encontrado podría indicarnos que tenemos una componente tipo Raman. Este proceso ocurre cuando los átomos o moléculas que componen un material se encuentran en estados energéticos excitados, en ese caso la energía de la emisión es la suma de las energías del estado pre-excitado y de la radiación con la cual se está excitando (4.14):

El determinar si efectivamente obtuvimos una componente tipo Raman está más allá de los objetivos de esta tesis, sin embargo, este resultado satisface algunas características propias de el proceso Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS),



**Figura 4.14:** Efecto anti-Stokes. En este fenómeno están involucrados 4 fotones: un fotón ( $\omega_{pump}$ ) es absorbido por una partícula que se encuentra en su estado base, después se emite un fotón debido a un decaimiento tipo Stokes ( $\omega_{stokes}$ ), la partícula no vuelve a su estado base sino a uno pre-excitado el cual vuelve a absorber un fotón de bombeo ( $\omega_{pump}$ ), de tal forma que la partícula logra alcanzar un estado excitado por absorción de 2 fotones, finalmente se emite un fotón ( $\omega_{CARS}$ ) el cual es más energético que el fotón de bombeo. Dado el ancho espectral de las emisiones que generamos con nuestros coloides, estas corresponden al proceso denominado Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS).

del cual se habla de manera general en el Apéndice B.

---

## Capítulo 5

# Síntesis de resultados y conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que la generación del láser aleatorio requiere la solución de 2 problemas: caracterización del medio aleatorio y caracterización del campo de esparcimiento del coloide.

En primer lugar, la caracterización del medio se subdividió en las siguientes caracterizaciones:

- Identificación del solvente: el medio que mejor conserva a los eritrocitos, tanto forma, tamaño y propiedades, es la solución salina, que resulta ser una solución isotónica. Al estar inmersos en este medio, la presión sobre la membrana celular de los eritrocitos es la misma tanto dentro como fuera de la célula. De aquí que los eritrocitos no disminuyan ni aumenten su tamaño ni modifiquen su forma. En otras palabras, con la solución isotónica retrasamos el proceso de hemólisis.
- Medio esparcidor: las nanopartículas de  $SiO_2$  empleadas en los experimentos garantizaban el fenómeno de esparcimiento múltiple. Más aún, el tamaño y concentración de las nanopartículas dan lugar a que el camino libre medio dentro del coloide influya de tal forma sobre el campo de radiación que la intensidad de éste permanezca estable en el tiempo.
- Concentración de sangre: los eritrocitos, empleados como absorbente satura-

ble, exhiben un patrón de intensidades y máximos de emisión mejor definidos cuando la concentración de sangre entera es del 5% en volumen.

En cuanto a la caracterización del campo emitido, se obtuvieron los siguientes resultados:

- La intensidad del campo emitido depende de la dirección de medición en el caso de coloides sanguíneos. Notamos que en backscattering se aprecian mejor lo máximos de intensidad del campo emitido al excitar el coloide.
- El espectro emitido por el coloide presenta dos máximos de intensidad:  $\lambda_s = 970nm$  y  $\lambda_{as} = 437nm$ , en donde  $\lambda_s$  representa una emisión de tipo Stokes, mientras que  $\lambda_{as}$  es una emisión anti-Stokes.
- La intensidad del campo de radiación emitido por el coloide incrementa con la energía de bombeo. Además, la dependencia del campo emitido con la energía de bombeo no es lineal: encontramos un umbral a partir del cual ambos máximos de intensidad se hacen presentes  $E= 17.76$  mJ. Un umbral al cual el medio se satura y alcanza su máxima intensidad: 22.80 mJ. También encontramos el umbral al cual los pulsos de excitación dañan al medio activo (sangre entera):  $E= 23.48$  mJ.

Ambas caracterizaciones son importantes. La caracterización del medio es un diseño de coloide que debe satisfacer ciertas propiedades muy específicas para conservar sangre entera y poder analizarla, específicamente, se encontraron las condiciones a las cuales las propiedades de fluorescencia y esparcimiento de los eritrocitos no se alteran significativamente. De esta manera se provee un procedimiento que da lugar a la reproducibilidad de estos coloides para generar un láser aleatorio sanguíneo con propiedades muy particulares.

En cuanto a la caracterización del campo. La identificación de umbrales energéticos nos permite establecer intervalos de energía en los cuales se pueden hacer diferentes estudios como laseo y daño a las células, por ejemplo. Las emisiones Stokes y anti-Stokes son características observables muy propias de nuestros coloides sanguíneos, ambas satisfacen los requerimientos reportados para ser

considerados emisión láser aleatorio. Por otro lado, la identificación de una componente tipo Raman da lugar a estudios más minuciosos y específicos para identificarla y caracterizarla adecuadamente.

De los resultados obtenidos, la sangre entera es capaz de formar parte de un medio desordenado que da lugar a un volumen óptimo que, a su vez, genera el fenómeno láser aleatorio. Más aún, los coloides sanguíneos presentan dos tipos de emisiones, Stokes y anti-Stokes, ambas pueden ser consideradas como emisiones láser aleatorio. Estas emisiones son resultado del efecto CARS que se presenta en el medio aleatorio. Este último resultado merece ser estudiado con análisis más detallados.

En este trabajo hemos desarrollado un método de caracterización de coloides en el cual la sangre entera actúa como medio activo. En primer lugar, la caracterización del medio nos permitió identificar las condiciones bajo las cuales la sangre en conjunto con las nanopartículas y el solvente dan lugar a un volumen óptimo de medio aleatorio que, en segundo lugar, nos permite caracterizar el campo de radiación emitido cuando el coloide es excitado. La caracterización del campo nos ha permitido identificar umbrales de energía de excitación en los cuales se presentan fenómenos tales como laseo, saturación y daño del coloide. Además, encontramos que nuestros coloides sanguíneos presentan emisión de fotones por decaimientos tipo Stokes y anti-Stokes, en ambos casos se satisfacen las condiciones de emisión láser aleatorio.

---

# Bibliografía

- [1] A. E. Siegman. *Lasers*. University Science Books. Mill Valley, California, 1986.
- [2] Diederik S. Wiersma and Ad Lagendijk. *Light diffusion with gain and random lasers*. *Phys. Rev. E*, 54(4). 4256-4265 (1996)
- [3] R. A. Meyer, A. Brunsting. Light scattering from nucleated biological cells. *Biophysical Journal*, 15(3). 191-203 (1975)
- [4] H. Frölich, F. Kremer. *Coherent Excitations in Biological Systems*. Springer-Verlag, 1983.
- [5] Herbert Fröhlich. *Biological Coherence and Response to External Stimuli*. Springer-Verlag, 1988.
- [6] V. S. Letokhov. Generation of light by a scattering medium with negative resonance absorption. *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* 53. 1442–1447, 1967. *Sov. Phys. JETP*, 26. 835–840 (1968)
- [7] V. M. Markushev, V. F. Solin, and Ch. M. Broskina. *Luminiscence and stimulated emission of neodymium in sodium lanthanum molybdate powders*. *Kv. Elek.* 13. 427-430, (1986)
- [8] N. M. Lawandy, R. M. Balachandran, A. S. L. Gomes and E. Sauvain. *Laser action in strongly scattering media*. *Nature (London)* 368(436), 199.
- [9] M. A. Noginov, S. U. Egarievwe, N. Noginova, H. J. Caulfield, J. C. Wang. *Interferometric studies of coherence in a powder laser*. *Optical Materials* 12. 127-134 (1999)

- 
- [10] B. Redding, M. A. Choma, and H. Cao. *Spatial coherence of random laser emission*. *Opt. Lett.* 36(17). 3404-3406 (2011)
- [11] Vassillis M. Papadakis, Andreas Stassinopoulos, Demetrios Anglos, Spiros H. Anastasiadis, Emmanuel P. Giannelis, and Dimitris G. Papazoglou. *Single-shot temporal coherence measurements of random lasing media*. *J. Opt. Soc. Am. B* 24(1). 31-36 (2007)
- [12] Giannis Zacharakis, Nektarios A. Papadogiannis, George Filippidis, and Theodore G. Papazoglou, *Photon statistics of laserlike emission from polymeric scattering gain media*. *Opt. Lett.* 25. 923-925 (2000)
- [13] Diederik Weirisma. *The smallest random laser*. *Nature* **406**, 132-135 (2000)
- [14] Salzman G.C., Singham S.B., Johnston R.G., Bohren C.F. *Light Scattering Properties of Cells*. In: Demers S. (eds) *Particle Analysis in Oceanography*. NATO ASI Series (Series G: Ecological Sciences), vol 27. Springer, 1991.
- [15] F. Tenopala-Carmona, C. García-Segundo, Natanael Cuando-Espitia, and Juan Hernández-Cordero. Angular distribution of random laser emission. *Opt. Lett.*, 39(3). 2779-2795 (2014)
- [16] A.E. Escárcega Mendicuti. *Sobre la coherencia temporal de un láser aleatorio*. Universidad Nacional Autónoma de México (2017)
- [17] F. Tenopala-Carmona. *Estudio angular del espectro de emisión de un láser aleatorio*. Universidad Nacional Autónoma de México (2013)
- [18] Diederik Wiersma. *Random lasers as fascinating new light sources*. *Proc. SPIE* 6320, Complex Photonic Media, 632007 (2006)
- [19] Diederik S. Wiersma. *The physics and applications of random lasers*. *Nature Physics*. **4** p.p. 359-367 (2008)
- [20] Martin Hammer, Dietrich Schweitzer, Bernhard Michel, Eike Thamm, and Achim Kolb. Single scattering by red blood cells. *Appl. Opt.* 37(31). 7410-7418, 1998.

- 
- [21] Donald E. McMillan, Nyle G. Utterback, John La Puma. Reduced Erythrocyte Deformability in Diabetes. *Diabetes*, 27(9). 895-901, 1978.
- [22] Kosuke Tsukada, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, Haruyuki Minamitani. Direct measurement of erythrocyte deformability diabetes mellitus with a transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system. *Microvascular Research*, 61(3). 231-239, 2001.
- [23] Jan. K. G. Dhont. *An Introduction to Dynamics of Colloids*. Elsevier (1996)
- [24] J. W. Goodman. *Statistical Optics*. John Wiley & sons, Inc. (2000).
- [25] A. Ishimaru. *Wave propagation and scattering in random media. Single scattering and transport theory*. Academic Press, New York (1978).
- [26] C. F. Bohren, D. R. Huffmann. *Absorption and Scattering of Light by Small particles*. John Wiley & Sons (2009)
- [27] Ariel Orbach, Orly Zelig, Saul Yedgar, Gregory Barshtein. Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cells Fragility. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 44(3). 183-187, 2017.
- [28] Dakota Watson, Norbert Hagen, Jonathan Diver, Philippe Marchand, Mirianas Chachisvilis. Elastic Light Scattering from Single Cells: Orientational Dynamics in Optical Trap. *Biophysical Journal*, 87(2). 1298-1306, 2004.
- [29] Johannes Mauer, Matti Peltomäki, Simón Poblete, Gerhard Gompper, Dmitry A. Fedosov. Static and dynamic light scattering by red blood cells: A numerical study. *PLOS ONE*, 12(5). 1-19, 2017.
- [30] Rebekah Drezek, Andrew Dunn, Rebekah Richards-Kortum. Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements. *Applied Optics*, 38(16). 3651-3661, 1999.
- [31] YongKeun PArk, Catherine A. Best-Popescu, Ramachandra R. Dasari, Gabriel Popescu. Light scattering of human red blood cells during metabolic remodeling of the membrane. *Journal of Biomedical Optics*, 16(1). 011013-1 - 011013-7, 2011.

- [32] Ruben G. Barrera, Augusto García-Valenzuela. Coherent reflectance in a system of random Mie scatterers and its relation to the effective-medium approach. *J.Opt.Soc.Am. A*, 20(2). 296-311, 2003.
- [33] Jeremy D. Wilson, Thomas H. Foster. Mie theory interpretations of light scattering from intact cells. *Optics Letters*, 30(18). 2442-2444, 2005.
- [34] Qiang Fu, Wenbo Sun. Mie theory for light scattering by a spherical particle in an absorbing medium. *Applied Optics*, 40(9). 1354-1361, 2001.
- [35] John M. Steinke, A. P. Shepherd. Comparison of Mie theory and the light scattering of red blood cells. *Applied Optics*, 27(19). 4027-4033, 1988.
- [36] A. H. Gandjnakche, P. Mills, P. Snabre. Light-scattering technique for the study of orientation and deformation of red blood cells in a concentrated suspension. *Applied Optics*, 33(6). 1070-1078, 1994.
- [37] Shumei Gao, Xiufeng Lan, Ying Liu, Zhonghua Shen, Jian Lu, Xiaowu Ni. Characteristics of blood fluorescence spectra using low-level, 457.9-nm excitation from Ar<sup>+</sup> laser. *Chinese Optic Letters*, 2(3). 160-161, 2004.
- [38] Lauren K. Goodhead, Frances M. MacMillan. Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Adv. Physiol. Educ.*, 41(2). 298-305, 2017.
- [39] Gesuri Morales-Luna, Humberto Contreras-Tello, Augusto García-Valenzuela, Rubén G. Barrera. Experimental Test of Reflectivity Formulas for Turbid Colloids: Beyond the Fresnel Reflection Amplitudes. *J. Phys. Chem. B*, 120(3). 583-595, 2016.
- [40] Moritz Friebe, Martina Meinke. Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250-1100 nm dependent on concentration. *Applied Optics*, 45(12). 2838-2842, 2006.
- [41] Alexander Nahmad-Rohen, Humberto Contreras-Tello, Gesuri Morales-Luna, Augusto García-Valenzuela. On the effective refractive index of blood. *Phys. Scr.* 91(1). 1-8, 2016.

- 
- [42] H. Contreras-Tello, A. García-Valenzuela. Experimental evidence of an effective medium seen by diffuse light in turbid colloids. *Journal of Physics: conference series*, 274 . 1-7, 2011.
- [43] Philip W. Kuchel, Edward D. Fackerell. Parametric-Equation Representation of Biconcave Erythrocytes. *Bulletin of Mathematical Biology*, 61(2). 209-220, 1999.
- [44] Shyam Singh. Refractive Index Measurement and its Applications. *Phys. Scr.*, 65(2). 167-180, 2002.
- [45] International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. *ICNIRP Guidelines on limites of exposure to laser radiation of wavelenghts between 180 nm and 1,000  $\mu$ m*. Health Physics 105(3): 271-295; 2013
- [46] H. Ly. *Laser safety manual*. The University of Western Ontario, Human Resources, Occupational Health and Safety (2006)
- [47] Alexander L. Burin, Hui Cao, M. A. Ratner. Two-Photon Pumping of a Random Laser. *IEEE Journal of selected topics in Quantum Electronics*, 9(1). 124-127, 2003.
- [48] Richard K.P. Benninger, David W. Piston. Two-Photon Excitation Microscopy for the study of Living Cells and Tissues. *Current Protocols in Cell Biology*, 4.11.1 - 4.11.24. 2013.
- [49] Mikhail Drobizhev, Nikolay S. Makarov, Shane E. Tillo, Thomas E. Hughes, Aleksander Rebane. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8(5). 393-399, 2011.
- [50] Kenny Kong, Catherine Kendall, Nicholas Stone, Ioan Notinger. Raman spectroscopy for medical diagnostics- From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89 . 121-134, 2015.
- [51] Catarina Costa Moura, Rahul S. Tare, Richard O. C. Oreffo, Sumeet Mahajan. Raman spectroscopy and coherent anti-Stokes Raman scattering imaging: prospective tools for monitoring skeletal cells and skeletal regeneration. *J. R. Soc. Interface*, 13. 1-12, 2016.

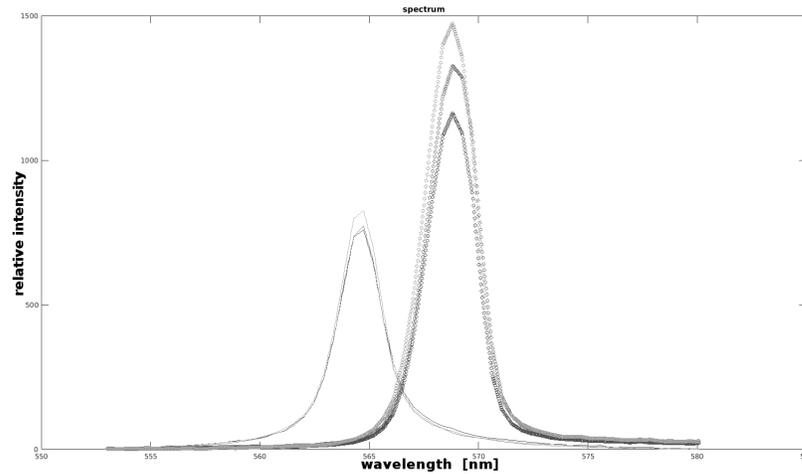
- [52] Stephen A. Boppart. Laboratory. Multiphoton Microscopy. Biophotonics Imaging.  
[https:// biophotonics.illinois.edu](https://biophotonics.illinois.edu)
- [53] Semrock. IDEX, health & science. Stimulated Raman Scattering.  
<https://www.semrock.com>

---

## Apéndice A

# Láser aleatorio de sangre entera y Rodamina 6G

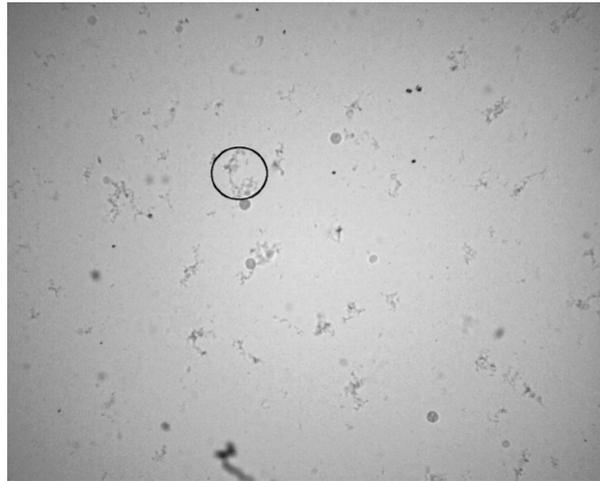
Con la finalidad de desarrollar un método que permita aplicar las propiedades de los láseres aleatorios en el área Biomédica, analizamos la respuesta óptica de sangre entera de pacientes diabéticos en coloides con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  de 405 nm de diámetro y Rodamina 6G a concentraciones de  $\approx 10^{11} \frac{np}{ml}$  y  $2.5 \times 10^{-6} M$ , repectivamente, en un solvente compuesto por agua tridestilada, metanol y solución salina en proporciones 40:40:20. A 1 ml de coloide se le agregaron 50  $\mu l$  de sangre de paciente diabético, en una celda de 10 mm de diámetro y 15 mm de altura, y se excitó con pulsos láser (frecuencia de 10 Hz y 20.80 mJ de energía por pulso). La sangre entera fue donada por el Hospital General de México, para conservar la sangre se utilizó EDTA como anticoagulante. Las características de los campos de radiación emitidos por los coloides se muestran a continuación.



**Figura A.1:** Comparación entre el perfil de intensidades del campo de radiación emitido por un coloide que contiene únicamente Rodamina 6G como medio activo (círculos) y otro al que se le ha añadido sangre entera de paciente diabético. En el primer caso, la longitud de onda central de emisión es de 568 nm, mientras que en el segundo es de 564 nm aproximadamente.

En este caso combinamos sangre entera y Rodamina como medio activo en un coloide de nanopartículas dieléctricas. En la Fig. A.1 se puede observar que existe un corrimiento de aproximadamente 4 nm hacia el azul en la emisión con sangre respecto al que no la contiene. Este experimento nos sugirió por primera vez la idea de que se podría estar presentando efecto CARS en los coloides sanguíneos.

Al observar una muestra de sangre entera en el solvente empleado, sin rodamina ni nanopartículas, notamos que ocurrió una hemólisis casi completa de la muestra en un tiempo de alrededor de 15 minutos. Como consecuencia, el contenido proteínico de los eritrocitos, hemoglobina principalmente, se combinó con todas las componentes del coloide, siendo la hemoglobina la principal responsable de los cambios en los espectros de emisión de los coloides:



**Figura A.2:** Hemólisis presentada en los eritrocitos cuando se encuentran en un solvente de agua tridestilada-metanol-solución salina (40:40:20). Dentro del círculo negro se puede observar cómo se libera el contenido de las células.

Este estudio tiene la finalidad de identificar y clasificar el deterioro de los eritrocitos en sangre de una persona diabética, sin embargo se quiere desarrollar un método para poder clasificar enfermedades de acuerdo a la respuesta óptica de la sangre para conocer el grado de daño en las células.

Los resultados de este proyecto conjunto dieron lugar a la investigación sobre la identificación de condiciones bajo las cuales los eritrocitos se mantienen estables como parte de volumen óptimo de medio aleatorio que, a su vez, de lugar a la generación de láser aleatorio por eritrocitos.

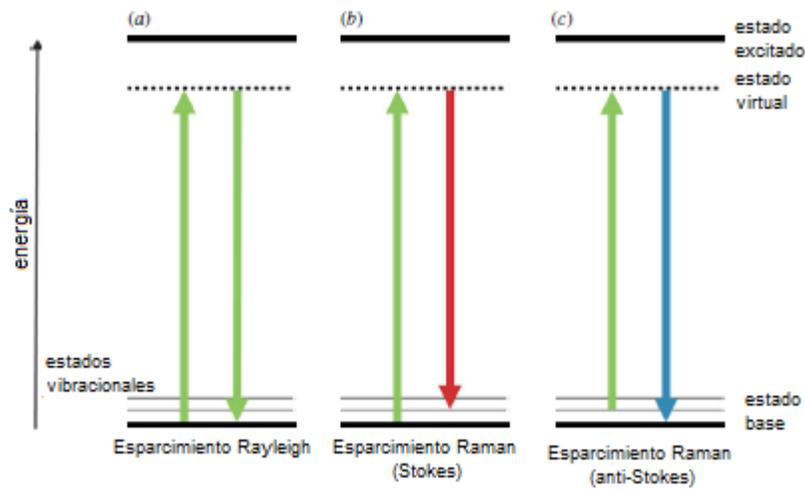
---

## Apéndice B

# Espectroscopía Raman

Cuando un haz de luz interactúa con una molécula se presenta el fenómeno de esparcimiento, en general, la luz esparcida por la molécula tiene la misma frecuencia del haz incidente. Este efecto se conoce como esparcimiento tipo Rayleigh. Sin embargo, también puede suceder que algunos fotones interactúen e intercambien energía con los modos de vibración, dando lugar a un esparcimiento inelástico de la luz. En este caso la frecuencia de la luz esparcida no es la misma que la del haz incidente, este es el esparcimiento tipo Raman.

La espectroscopía Raman involucra esparcimiento inelástico debido a interacciones moleculares vibracionales. Los fotones resultantes de este esparcimiento tienen una mayor o menor longitud de onda que los incidentes dependiendo si el esparcimiento es Stokes o anti-Stokes, respectivamente. La espectroscopía Raman está relacionada con la espectroscopía infrarroja (IR cercano, principalmente) debido a que ambas técnicas son consecuencia de vibraciones moleculares, sin embargo, existen diferencias en su implementación.



**Figura B.1:** Transiciones moleculares que dan lugar a diferentes procesos radiativos: a) esparcimiento Rayleigh. b) Esparcimiento Raman tipo Stokes. c) Esparcimiento Raman tipo anti-Stokes. Modificado de [51].

La espectroscopía Raman es una poderosa técnica analítica capaz de medir la composición química de complejas muestras biológicas tales como biofluidos, células y tejidos. Un espectro tipo Raman representa una huella digital de la muestra analizada. El potencial de la espectroscopía Raman ha sido aprovechado en diferentes campos de investigación, tal como el área Biomédica, en la que se aprovecha por su capacidad para detectar cambios a nivel molecular, permitiendo detectar y cuantificar modificaciones en células y tejidos producidos por enfermedades o malfuncionamientos. Como consecuencia, la espectroscopía Raman se emplea como una herramienta de evaluación en diagnósticos médicos.

Algunas de las ventajas de la espectroscopía Raman sobre otras técnicas son las siguientes:

- No necesita que la luz atraviese toda la muestra. En general, las mediciones para este tipo de estudios se realizan en backscattering.
- Alta resolución espacial.
- Información espectral cualitativa y cuantitativa.

- Detección a nivel sub-celular.
- Análisis de células en tiempo real sin alterar las funciones celulares.

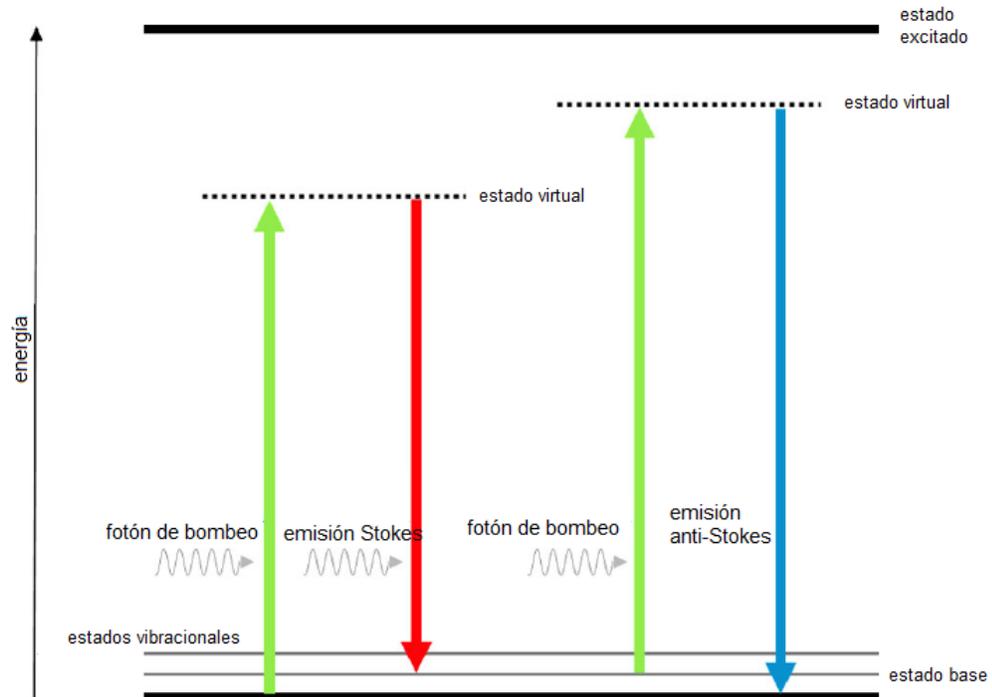
Sin embargo, la eficiencia del esparcimiento Raman es extremadamente pequeño. Aproximadamente 1 de cada  $10^7$  fotones esparcidos es Raman. En particular, para imagenología, esta técnica es muy limitada pues la adquisición de datos puede demorar varios segundos o, incluso, minutos. El uso de técnicas basadas en esparcimiento Raman que den lugar a una señal amplificada ha despertado el interés de la comunidad científica, tanto en desarrollo como en aplicaciones [50, 51]. A continuación se mencionan 2 técnicas basadas en esparcimiento Raman.

## B.1. Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS)

Esta técnica de espectroscopía Raman requiere dos láseres para su funcionamiento: uno de bombeo de frecuencia  $\nu_p$  y otro, conocido como láser "Stokes", de frecuencia  $\nu_s$ , que se encarga de excitar moléculas hacia estados seleccionados con frecuencia  $\nu_{vib}$ . En general, una frecuencia se fija en  $\nu_s$  y la otra se modula en  $\nu_p$  para excitar los modos vibracionales de la molécula de interés a una frecuencia

$$\nu_{vib} = \nu_p - \nu_s. \quad (\text{B.1})$$

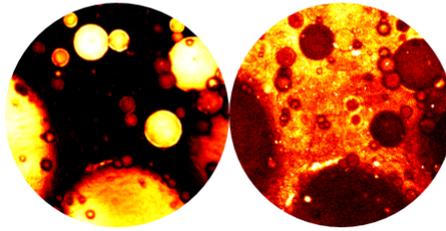
Este proceso consiste en la absorción de dos fotones: dos de bombeo y otro Stokes (véase Fig. ??). La señal correspondiente al fotón anti-Stokes, de frecuencia  $\nu_{as} = 2\nu_p - \nu_s$ , es detectada para crear imágenes CARS. Al modular las frecuencias de los 2 haces para igualar una frecuencia de vibración particular da lugar a la emisión de una señal coherente con una intensidad de hasta 5 órdenes de magnitud mayor al esparcimiento Raman mencionado en la sección anterior.



**Figura B.2:** Efecto CARS como proceso multifotónico: estados vibracionales excitados son alcanzados por la absorción de dos fotones, uno de bombeo y otro Stokes. Cuando la diferencia entre las frecuencias de estos fotones iguala a la de un estado excitado, se produce una emisión anti-Stokes. Modificado de [51].

El efecto CARS se emplea en imagenología de células y tejidos, pues al excitar modos vibracionales de lípidos y proteínas, se obtienen las emisiones anti-Stokes requeridas para construir la imagen incluso en 3D. La imagenología CARS permite la identificación de contenido químico en una muestra (véase Fig. B.3).

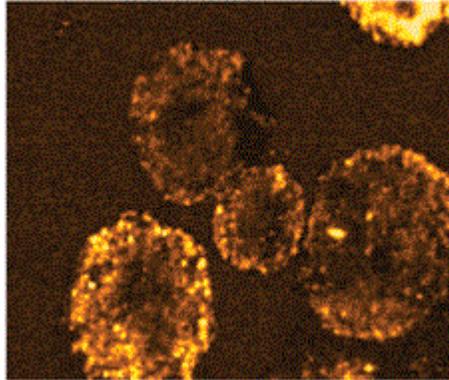
Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)



**Figura B.3:** La imagenología por CARS es útil para identificar el contenido químico de una muestra [52].

## B.2. Stimulated Raman Scattering (SRS)

El proceso de Esparcimiento Raman Estimulado (SRS, por sus siglas en inglés) requiere la absorción de un fotón de bombeo y otro Stokes. Cuando la diferencia entre las frecuencias de los fotones de bombeo y Stokes se acoplan, ocurren transiciones vibracionales por excitaciones estimuladas. En este caso el fotón Stokes experimenta ganancia Raman estimulada, mientras que el fotón de bombeo presenta pérdidas Raman estimuladas.



**Figura B.4:** Imagen SRS de lípidos en melanocitos humanos [53].

Al igual que CARS, SRS está basado en efectos ópticos no-lineales, por lo tanto, la resolución espacial de estas técnicas es superior a la espectroscopía Raman estimulada (véase B.4.

---

# Apéndice C

## Participaciones en Congresos

Los resultados obtenidos en esta investigación han sido presentados, de manera parcial, en diferentes eventos nacionales e internacionales como actividad complementaria a los lineamientos establecidos en el programa de Maestría del Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales de la UNAM. A continuación se enlistan dichos eventos.

- LXI Congreso Nacional de Física: *¿Qué es un láser aleatorio?*, 2018.
- XLII Congreso Nacional de Física: *Análisis espectroscópico de emisión Láser Aleatorio por coloides basados en nanopartículas de SiO<sub>2</sub> y células sanguíneas*, 2019 (trabajo aceptado para ser presentado).
- XLI Colloquium Spectroscopicum Internationale (CSI) & I Latin American Meeting on LIBS. *Spectroscopic Analysis of whole blood colloid mixed with SiO<sub>2</sub> nanoparticles in studies of random laser emission*, 2019. En la siguiente página se muestra el resumen de este trabajo, extraído del libro de memorias del XLI-CSI.



## Spectroscopic analysis of whole blood colloid mixed with SiO<sub>2</sub> nanoparticles in studies of Random Laser emission

O.La.1

Angel E. Escarcega-Mendicuti<sup>1</sup>, Ole Käferlein<sup>2</sup>, Anays Acevedo<sup>1</sup>, Crescencio García-Segundo<sup>1</sup> Augusto García-Valenzuela<sup>1</sup>, and Ricardo U. Macías-Rodríguez<sup>3</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, 04510, Mexico City; Instituto de Ciencias Físicas, UNAM.

<sup>b</sup> Medical Engineering Science, University of Lübeck

<sup>c</sup> Department of Gastroenterología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.  
crescencio.garcia@icat.unam.mx

**Keywords:** optical absorption spectroscopy, random lasers, biofotonics

The random laser (RL) systems, predicted by Letokhov<sup>1</sup> assert that laser emission is also achieved in random active media, with photonic properties. This is a laser modality, free from resonant cavity, and has been a subject of intense research over the last 30 years. Due to its simplicity<sup>2</sup>, it has gained broad interest for applications. In the biomedical field we aim to use it as an analytic device<sup>3</sup>. Hence, the current focus is on the analysis of multi-mode random laser process, from colloid of SiO<sub>2</sub> particles of 200 nm diameter, with ~1% volume fraction per milliliter. This is in the diffuse regime, using the experimental scheme reported in<sup>4</sup>. The current RL matrix is isotonic saline water. We used two kinds of active medium: 1) Rhodamine 6G at concentration of  $2.5 \times 10^{-3}$  M, added to the colloid base, and then we add 30  $\mu$ l of whole blood. 2) Colloid free from Rhodamine, however we add whole blood at 5%/ml. The target is to prevent plasmatic erythrocytes' lysis. In both configurations we produce optical microscopy analysis to characterize the erythrocytes stability, in addition to characterization of the optical emission spectra.

In presence of Rhodamine we observe that the blood causes the spectral shrink and blue shift of the RL bandwidth emission. Passing from 3 to 2 nm bandwidth, and shortening the Rayleigh shift from 569 nm, to 563 nm [4]. The colloid without whole blood only, when illuminated with white light exhibits the normal fluorescence spectrum of the blood. However when it is pumped with laser pulses of 532 nm at repetition rate of 10 Hz, and near 15 mJ, the spectrum exhibits two narrow emission bands. One at 437 nm and the second one at 968 nm; both of 2.5 nm bandwidth, with Lorentz-like line shape. Thus fulfilling the requirements for RL emission. The hypothesis implies that the contributions to the fluorescence are from the protein content of cytoplasm, possibly inducing a Raman shift over the stimulated emission when mixed with Rhodamine. In the RL with whole blood alone, it seems that a two-photon absorption process is activated.

### Acknowledgements:

The author OK thanks to the Lübeck University and the DAAD for the support over the academic leave at ICAT-UNAM to perform the current study. AA and AEEM, thank the CONACyT for the postgraduate scholarship. The author RUMR thanks to Mariana Cruz-Contreras for her assistance with the medical protocol.

### References:

[1] V. S. Letokhov, *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* Vol. 53, 1442 (1967)

[2] D. S. Wiersma, *Nat. Photonics* Vol. 3, 246 (2009)

[3] Xudong Fan and Seok-Hyun Yun: *Optofluidic Bio-Lasers: Concept and Applications*, *Nat Methods*. Vol. 11, pp. 141–147 (2014). doi:10.1038/nmeth.2805.

[4] F. Tenopala-Carmona, C. García-Segundo, Natanael Cuando-Espitia, and Juan Hernández-Cordero: "Angular distribution of random laser emission", *Opt. Lett.*, Vol. 39, pp. 655-658 (2014).